



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.

Laurea di primo livello in Biologia
Curriculum di Biologia Marina

**Caratterizzazione molecolare
dell'Anidraasi Carbonica in *Trematomus*
*spp.***

Relatore: Ch.mo Mariano Beltramini

Correlatore: Dott.ssa Giovanna Sattin

(Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Padova)

Laureando: Giorgio Fedele

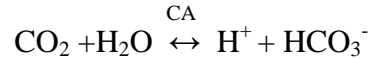
Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. Introduzione: l'Anidrasi Carbonica	1
1.1. Struttura.....	1
1.2. Meccanismi catalitici della CA	2
1.3. Distribuzione nei tessuti e isozimi	3
1.4. CA e scambi gassosi.....	4
1.5. Pesci antartici: ecologia ed adattamenti	7
1.5.1. <i>Trematomus eulepidotus & Trematomus lepidorhinus</i>	7
1.6. Anidrasi carbonica nel <i>Trematomus</i> spp.....	8
2. Materiali e Metodi.....	11
2.1. Estrazione RNA	11
2.2. Quantificazione	11
2.3. Reazione di retrotrascrizione.....	12
2.4. Quantificazione cDNA.....	12
2.5. Reazione a catena della DNA Polimerasi(PCR: Polymerase Chain Reaction)	12
2.6. Reazione di amplificazione rapida delle estremità 5'/3' del filamento del cDNA (RACE 5'/3')	14
2.7. Elettroforesi su gel d'agarosio	14
2.8. Purificazione dei frammenti di DNA da gel	14
2.9. Clonaggio	15
2.9.1. <i>Ligazione</i>	15
2.9.2. <i>Trasformazione con DNA plasmidico</i>	15
2.9.3. <i>Screening delle colonie ricombinanti</i>	15
2.10. Estrazione DNA plasmidico (Minipreps).....	16
2.11. Digestione delle sequenze di DNA per mezzo di enzimi di restrizione	16
2.12. Sequenziamento	16
2.13. Allineamenti	16
2.14. Traduzione e Modelling strutturale	17
3. Risultati	19
3.1. Estrazione dell'RNA e RT	19
3.2. PCR e RACE 3'/5'	19
3.2.1. <i>Progettazione dei Primers per le reazioni di RACE</i>	20
3.3. Reazione di RACE 5'	22
3.4. Reazione di RACE 3'	22
3.5. Traduzione.....	23
3.6. Modelling strutturale	24
3.7. Filogenesi	25
4. Discussione	27
5. Allegati.....	29
6. Bibliografia	35

1. Introduzione: l'Anidraasi Carbonica

L'anidraasi carbonica (CA) è un enzima che catalizza l'idratazione reversibile di CO₂.



Questo enzima venne individuato per la prima volta negli eritrociti dei mammiferi (Meldrum e Roughton, 1933), ma successivamente venne scoperto in una grandissima varietà di tessuti e cellule all'interno del regno *Animalia* nonché *Plantae* (Maren, 1967).

La CA è un enzima multifunzionale che gioca un ruolo indispensabile nei più diversi processi fisiologici e biochimici: scambi respiratori, bilancio acido-base, secrezioni acido-base, ureogenesi, sintesi di acidi grassi, trasporto ionico, contrazione muscolare, e la fotosintesi nelle piante.

1.1. Struttura

L'anidraasi carbonica è una metalloproteina contenente zinco e i suoi diversi isoismi sono divisi in 5 classi differenti (α , β , γ , δ e ϵ) che sembra si siano evolute indipendentemente. Nei mammiferi sono state identificate isoforme della classe α con differenti distribuzioni: citoplasmatica, associata alla membrana plasmatica o mitocondriale.

Il cofattore zinco, presente nel sito attivo, è coordinato con tre istidine e una molecola d'acqua a formare un complesso tetraedrico. A pH fisiologico, il quarto ligando dello zinco è un idrossile.

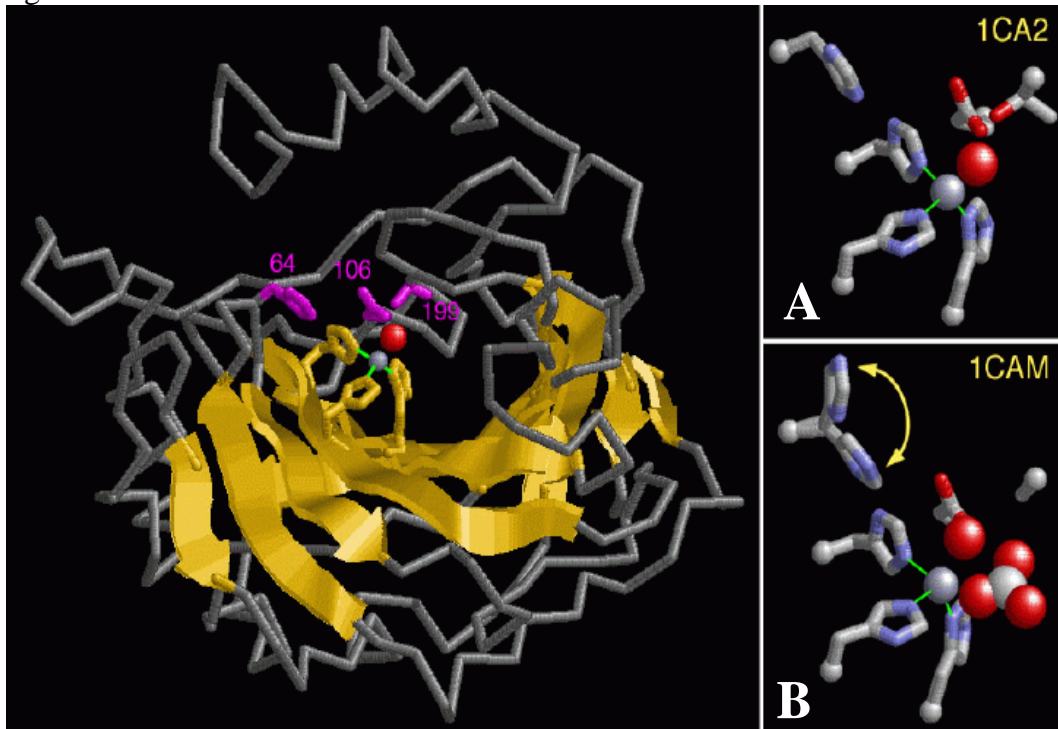


Figura 1.1: Struttura CAII (presente nell'archivio PDB 1ca2): la sfera grigia rappresenta l'atomo di zinco legato al sito attivo. In giallo sono evidenziate le tre istidine i cui atomi di azoto sono coordinati con lo zinco. La sfera rossa indica la molecola d'acqua, mentre le molecole magenta sono treonina 199, glutammato 106 e istidina 64; Figura 1.1 A-B: la sfera rossa rappresenta lo ione idrossido, mentre lo ione bicarbonato è rappresentato con sfere rosse e bianche. (tratto da S.Dutta & D.S.Goodsell, 2004, modificato).

Il sito attivo (Figura 1.1) si trova in una tasca idrofobica della struttura terziaria, legato ad un atomo di zinco. Gli atomi di azoto di tre istidine (numerate 94, 96 e 119) legano direttamente lo zinco. Questi amminoacidi sono estremamente conservati in ogni isozima. Atomi della treonina 199 e del glutammato 106 interagiscono indirettamente attraverso una molecola d'acqua legata. Si noti che questi residui oltre all'istidina 64 aiutano a portare sullo zinco un ione idrossido. Alcuni isozimi differiscono per questi e per altri residui e questo può spiegare le loro differenze di attività enzimatica.

Nelle due immagini sulla destra (Figure 1.1A & 1.1B) si può vedere un primo piano dello ione zinco legato alle catene laterali degli amminoacidi del sito attivo. La figura in alto mostra lo ione idrossido, legato allo ione zinco. La figura in basso mostra una struttura intermedia dove lo ione bicarbonato si è appena formato ed è ancora legato all'enzima. Si noti che la catena laterale dell'amminoacido 199 è quella di una alanina in questa struttura. L'istidina 64 oscilla avvicinandosi e allontanandosi dallo ione zinco ad ogni ciclo enzimatico aiutando lo zinco a ricaricarsi con un nuovo ione idrossido. Le due posizioni di questo residuo, mostrate nella figura in basso a destra, illustrano il suo movimento durante l'azione dell'enzima. Appena lo zinco si è ricaricato con una nuova molecola di acqua e lo ione bicarbonato è stato rilasciato, l'enzima sarà pronto ad agire su un'altra molecola di anidride carbonica (S.Dutta & D.S.Goodsell, 2004).

1.2. Meccanismi catalitici della CA

La reazione, catalizzata dalla CA avviene in diverse fasi. La prima avviene con l'attacco nucleofilo del complesso zinco-idrossile sul substrato CO_2 , seguito dallo scambio del bicarbonato prodotto con una molecola d'acqua. Lo zinco è la chiave di questa reazione enzimatica. L'acqua legata allo ione zinco viene scissa in un protone ed in uno ione idrossido. Poiché lo zinco è uno ione positivo, stabilizza lo ione idrossido carico negativamente che così può attaccare l'anidride carbonica formando così uno ione bicarbonato.

Le reazioni di idratazione/disidratazione della CO_2 che avvengono in un organismo possono seguire due vie diverse: una via prevede l'azione della CA l'altra è la via senza la catalizzazione enzimatica.

La reazione di idratazione non catalizzata è:



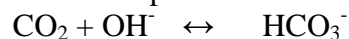
la CO_2 viene idratata ad acido carbonico il quale viene alla fine dissociato a protoni e bicarbonato.

A pH fisiologico (7.4-8.2) la costante di dissociazione della CO_2 ($\text{pK}^1 = 6.4$) favorisce la formazione di protoni e HCO_3^- . La reazione non catalizzata è di per se stessa rapida con una costante di velocità di circa $3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Edsall, 1968).

Siccome l' HCO_3^- potrebbe divenire limitante, la sua sintesi deve essere molto veloce.

D'altro canto la reazione di disidratazione, con una costante di velocità di circa 20 s^{-1} , 3 ordini di grandezza inferiore, è spesso considerata limitante per cui la presenza della CA diventa necessaria.

Una seconda reazione estremamente rapida è:



Questa avviene ad alti pH (superiori a 10) e procede in due tappe (Coleman, 1980):



- 1) la prima coinvolge la scissione dell'acqua e la creazione di un complesso zinco-ossidrilico; il protone risultante viene poi trasportato da un *buffer* mobile (BH), il quale a sua volta dissocerà in tre protoni liberi;
- 2) nella seconda avviene un diretto attacco nucleofilo dell'idrossile alla CO_2 formando così HCO_3^- .

Questa reazione come detto è molto rapida avendo una velocità costante di $8.5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, aumentando il tasso della reazione non catalizzata di quasi di 5 ordini di grandezza. La CA perciò catalizza la stessa reazione che avverrebbe naturalmente a pH fisiologicamente letale, creando un ambiente altamente alcalino circoscritto nel sito attivo.

1.3. Distribuzione nei tessuti e isoziimi

Nei pesci la CA ha una distribuzione ubiquitaria, dai tessuti metabolicamente attivi, dove viene prodotta CO_2 , agli elementi del sistema circolatorio (come le branchie).

L'isozima della CA espresso nei muscoli dipende dal metabolismo delle fibre:

- isozima sulfamide-sensibile tipo II è predominante nelle fibre bianche
- isozima sulfamide-resistente tipo III nelle fibre rosse (Sanyal *et al.*, 1982a-b)
- isozima tipo IV è localizzato invece nel sarcolemma di tutti i diversi tipi di fibre (Henry *et al.*, 1997).

Come in tutti i vertebrati, la CA è presente in grandi concentrazioni anche negli eritrociti dei pesci.

Fino ad ora, dati di elettroforesi hanno dimostrato che agnati, elasmobranchi e teleostei possiedono un singolo isozima nei loro globuli rossi. Nei gruppi più primitivi, gli agnati, l'isozima sembra essere di tipo I caratterizzato da un lento tasso di turnover e una relativa bassa sensibilità ai sulfaminidi, inibitori della CA. I Teleostei sembrano invece avere l'isozima II con un alto tasso di turnover e un'alta sensibilità ai sulfaminidi.

Negli elasmobranchi la CA dei globuli rossi potrebbe essere un isozima evolutosi tra il tipo I e il tipo II, in quanto possiede caratteristiche di entrambi gli isoziimi.

Le branchie sono organi multifunzionali, in quanto non solo sono la sede degli scambi respiratori ma anche sono regioni in cui avviene lo scambio ionico, la regolazione del bilancio acido-base e la secrezione dell'ammonio.

Lo scambio di gas nelle branchie richiede la disidratazione dell' HCO_3^- (generalmente impermeabile alle membrane se non in presenza di determinati trasportatori) a CO_2 , che essendo un gas essa è libera di diffondere attraverso le membrane.

Il trasporto di ioni e il bilancio acido-base, invece richiedono l'idratazione della CO_2 a HCO_3^- e H^+ i quali servono come contro ioni per il trasporto di Cl^- e Na^+ .

Questo "apparente paradosso" è dovuto al fatto che la CA, nelle branchie svolge funzioni diverse a seconda del compartimento sub cellulare in cui è inserita, nel quale idratazione e disidratazione avvengono in modo indipendente. La CA citoplasmatica è coinvolta nel trasporto ionico mentre la CA associata alla membrana, nella reazione di disidratazione e quindi di scambio gassoso. Il

concetto di compartimentalizzazione cellulare è supportato dal fatto che siano stati riscontrati diversi pool di CA subcellulari (mitocondri, microsomi e citoplasma). La localizzazione istochimica, inoltre, ha confermato che la CA è distribuita in modo eterogeneo nelle cellule dell'epitelio respiratorio.

Tuttavia, a differenza della CA citoplasmatica, la cui localizzazione e funzione è stata approfonditamente capita, per la CA associata alla membrana il discorso è diverso. Nei mammiferi ed in altri vertebrati inferiori, è stata individuata una riserva di CA membranale nell'endotelio dell'epitelio respiratorio con il sito attivo accessibile dal bicarbonato plasmatico. Ciò è assente in agnati e teleostei, in quanto è stata dimostrata una variazione di pH nell'arteria postbranchiale la quale suggerisce che le reazioni non siano catalizzate dalle CA. Tuttavia, un caso a sé stante sono gli elasmobranchi, i quali sembrano invece possedere una CA con caratteristiche simili a quella dei mammiferi (Wood *et al.*, 1994).

Alcuni pesci inoltre hanno una respirazione bimodale (per esempio *Dipnoi* o alcuni *Gobidi*) ed attuano scambi respiratori sia in aria che in acqua con la stessa efficienza usando organi particolari come polmoni primitivi o epiteli intestinali.

Recentemente, infine, alcuni studi hanno evidenziato la presenza di un pool di CA nella superficie esterna delle branchie, nel muco dello strato esterno. Ciò è stato suggerito da un'evidenza indiretta, si assiste a variazioni del pH dell'acqua che scorre sopra la superficie delle branchie (Henry *et al.*, 1998).

1.4. CA e scambi gassosi

I tessuti metabolicamente attivi, come i muscoli, sono la fonte principale di produzione della CO₂ nei pesci. Dalla sua formazione nei mitocondri l'anidride carbonica deve attraversare un certo numero di membrane e un elevato numero di compartimenti fluidi prima di essere eliminata.

Le membrane biologiche sono considerate impermeabili agli ioni, compreso quindi l'HCO₃⁻ ovvero la specie predominante di carbonio a pH fisiologico.

Lo step limitante nel trasporto e nell'escrezione della CO₂ è, quindi, il suo movimento attraverso le barriere e questo a sua volta dipende dalla conversione di bicarbonato ad anidride carbonica gassosa.

Un altro processo limitante è la conversione non catalizzata di bicarbonato in anidride carbonica gassosa nello strato esterno della membrana del sarcolemma, in quanto si viene ad annullare il gradiente di diffusione. Con la presenza di CA, invece, viene mantenuto un equilibrio veloce tra le due specie chimiche, permettendo così al trasporto di avvenire al tasso di diffusione della CO₂.

Il primo processo di escrezione della CO₂ è il trasporto attraverso il sarcolemma dal fluido intracellulare (ICF) al fluido extracellulare (ECF) che conduce infine al sistema circolatorio.

Inizialmente si credeva che la CA muscolare rallentasse l'escrezione della CO₂, in quanto la rapida catalisi della CO₂ prodotta metabolicamente conduceva all'intrappolamento del bicarbonato nelle cellule. Tuttavia le conoscenze attuali hanno dimostrato che la reazione d'idratazione non catalizzata è di 3 ordini di grandezza superiore alla reazione di disidratazione; quindi anche in assenza di CA una significativa frazione di CO₂ viene comunque intrappolata nelle cellule come bicarbonato. È la combinazione della CA compartimentalizzata (citoplasmatica e associata alla membrana) a favorire il passaggio di CO₂ attraverso il sarcolemma sia in mammiferi che nei vertebrati inferiori (Henry *et al.*, 1997). La CA

citoplasmatica mantiene l'equilibrio chimico tra HCO_3^- e CO_2 nell'ICF, questo impedisce che la reazione di disidratazione diventi limitante e permette al trasporto di avvenire al tasso di diffusione di CO_2 anche a basse ICF P_{CO_2} (la CO_2 che diffonde attraverso il sarcolemma viene rimpiazzata in parte dal bicarbonato grazie all'azione della CA). La CA associata alla membrana, nella superficie extracellulare del sarcolemma, invece, catalizza la reazione di idratazione della CO_2 che diffonde esternamente. Ciò mantiene una bassa P_{CO_2} nell'ECF e permette l'instaurarsi di un gradiente attraverso la membrana che fornisca la forza necessaria a promuovere la rimozione di CO_2 .

Dallo spazio interstiziale, la CO_2 attraversa la parete dei capillari ed entra nel sistema circolatorio. Successivamente diffonde attraverso la parete eritrocitaria nei globuli rossi, in quanto è assente la CA associata alla membrana di questi sia nei mammiferi che nei pesci.

All'interno degli eritrociti, la CO_2 viene rapidamente idratata a HCO_3^- e H^+ grazie all'alta attività della CA intracellulare. Nel sistema circolatorio di elasmobranchi e teleostei, l'azione di massa favorisce l'idratazione, mentre l'inibizione è minimizzata dall'effetto tampone dell'emoglobina sui protoni e dallo scambio dei cloruri che rimuovono il bicarbonato all'interno dei globuli rossi. Infatti, a livello dei tessuti, la deossigenazione dell'emoglobina libera siti accettori di protoni. I globuli rossi, a differenza di altre cellule, sono molto permeabili sia agli ioni Cl^- che agli ioni HCO_3^- , in quanto la membrana presenta un'elevata concentrazione di uno speciale trasportatore proteico per gli anioni, la Proteina della Banda III. Tale proteina lega gli ioni cloro e bicarbonato e li trasferisce in opposte direzioni attraverso la membrana eritrocitaria; in questo modo la CO_2 è trasportata nel plasma sotto forma di HCO_3^- (Henry *et al.*, 1998; Figura 1.2).

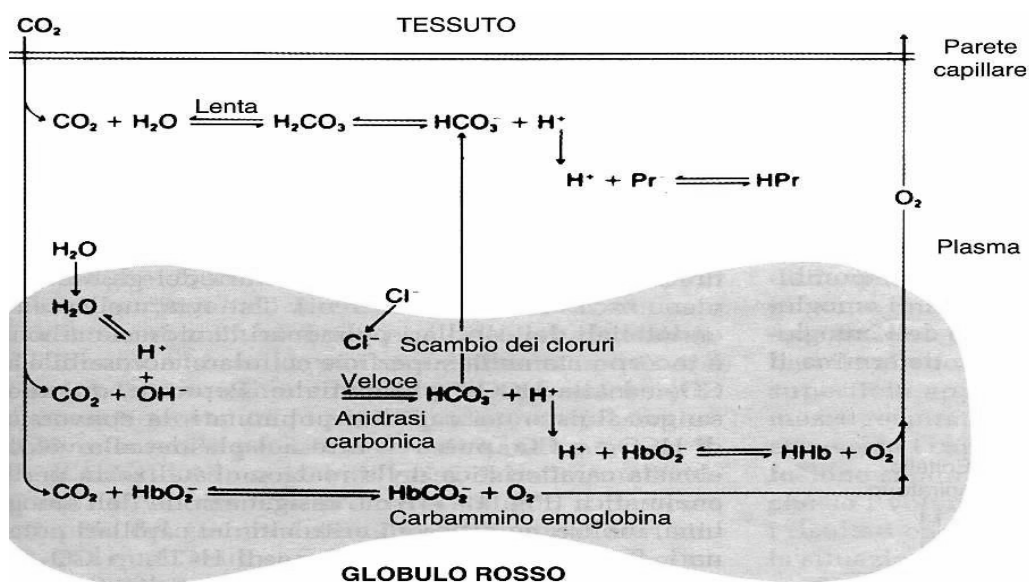


Figura 1.2: scambi gassosi a livello tissutale. L'anidride carbonica che si forma nei tessuti viene trasformata rapidamente in ione bicarbonato nei globuli rossi, attraverso la reazione di idratazione catalizzata dalla CA. HCO_3^- diffonde fuori in scambio con il cloro, e l'eccesso di H^+ viene legato all'emoglobina deossigenata (Hb; tratto da Randall *et al.*, 2006, modificato).

Le branchie sono il sito di scambio dei gas tra ambiente interno ed esterno, in questa regione le reazioni avvengono in senso contrario rispetto a quelle che

1.5. Pesci antartici: ecologia ed adattamenti

Durante il Miocene, circa 22 milioni di anni fa, con l'apertura del Passaggio di Drake e la formazione della Convergenza Antartica, l'ambiente polare divenne totalmente isolato.

Sebbene il destino di molte specie ittiche fu proprio l'estinzione, dovuta all'isolamento, un gruppo di teleostei, i *Nototenioidi*, riuscì ad adattarsi ai cambiamenti delle condizioni ambientali, come l'abbassamento delle temperature, la presenza di ghiacci, riduzione di habitat e un'estrema stagionalità nella produzione primaria. Partendo da un ancestrale bentonico i *Nototenioidi* si evolsero ed occuparono numerose nicchie ecologiche (Bargelloni *et al.*, 1998).

I *Nototenioidi* rappresentano un grande gruppo di pesci teleostei, molti dei quali sono endemici dell'Oceano Antartico.

In questo ambiente, il basso tasso metabolico e l'alta concentrazione di ossigeno hanno ridotto il bisogno di emoglobina, arrivando all'estrema condizione dei *Channichthyidae*, i quali mancano totalmente di emoglobina (Marino *et al.*, 2007).

Molti pesci antartici sono necto-bentonici. I *Nototenioidi* hanno una testa larga e appiattita con una larga bocca e occhi grandi spesso situati apicalmente. Corpo allungato, affusolato verso la piccola coda, grandi pettorali, piccole pinne ventrali e lunghe pinne impari. La vescica natatoria è assente, nonostante questa mancanza molti pesci antartici mantengono comunque un assetto neutro, dovuto a depositi di grasso nella pelle e nei muscoli e alla riduzione della mineralizzazione delle scaglie e delle ossa (Helfman *et al.*, 1997).

Molti pesci antartici sono attivi a temperature molto vicine alla temperatura di congelamento dell'acqua salata (-1.9° C). La resistenza al congelamento sembra essere favorita sia dalla vita ad alte profondità che dalla presenza di molecole "antifreezing" nel sangue. I pesci che vivono a profondità inferiori a 30 m hanno fluidi sanguigni che congelano a temperature più alte di quelle in cui vivono; la loro sopravvivenza è permessa dall'assenza di cristalli di ghiaccio nell'acqua che possano determinare l'inizio della formazione degli stessi all'interno dei fluidi corporei. I *Nototenioidi* che vivono a profondità inferiori di 30 m in cui sono presenti cristalli di ghiaccio, possiedono glicoproteine nel sangue che conferiscono ai fluidi corporei un punto congelamento inferiore dell'acqua circostante (Randall *et al.*, 2006).

1.5.1. *Trematomus eulepidotus* & *Trematomus lepidorhinus*

Trematomus eulepidotus (Reagan, 1914)

Famiglia: Nototheniidae

Ordine: Perciformes

Classe: Actinopterygii

Pesce demersale, presente tra i 70 e i 650 metri di profondità.

Distribuito in tutto l'Oceano del Sud, specialmente in prossimità della piattaforma continentale.

Corpo e testa interamente coperti da scaglie.

Molto comune in acque poco profonde della piattaforma continentale, specialmente in aree sopra i 250 metri, dove gli *up-wellings* forniscono un

maggiore apporto di cibo. I giovanili sono stati trovati vicini alla superficie, spesso in associazione con il Krill (*Euphausia superba*).

Gli adulti si nutrono di salpe, nudibranchi, anfipodi, copepodi, policheti, Krill, crostacei, chetognati e pesci (www.fishbase.org).

Trematomus lepidorhinus (Pappenheim, 1911)

Famiglia: Nototheniidae

Ordine: Perciformes

Classe: Actinopteri

Pesce demersale, presente tra i 200 e gli 800 metri.

Distribuito in tutto l'Oceano del Sud, in relazione alla scarpata continentale, esclusa la regione della penisola antartica.

Si nutre di anfipodi (*Themisto gaudichaudii*), copepodi e policheti (www.fishbase.org).

1.6. Anidraasi carbonica nel *Trematomus spp.*

Trematomus è un pesce antartico appartenente ai *Nototenioidei*, adattato alla vita a basse temperature (-1.9°C), che ha evoluto delle peculiarità fisiologiche adattative per questo ambiente particolare (Helfman *et al.*, 1997).

Come già detto, le specie antartiche si sono evolute indipendentemente dagli altri teleostei in seguito al loro isolamento, e ciò ha comportato anche un'evoluzione degli enzimi, sia in termini di attività massima che di proprietà regolative. L'adattamento risulta quindi peculiare rispetto all'ambiente esterno, e una delle conseguenze di questo adattamento è la temperatura cui l'enzima svolge la sua attività.

Uno studio comparativo su enzimi omologhi appartenenti a specie diverse (Maffia *et al.*, 2001), adattate ad ambienti con diverse temperature, sembra dimostrare che poche modifiche, lontane dai siti di legame e regolativi, sono responsabili delle diverse caratteristiche chimico-fisiche (come la temperatura di denaturazione) e chimiche (come la velocità catalitica). Generalmente il sito di attacco del ligando viene altamente conservato mentre vengono modificate le aree adiacenti. Cambiamenti piccoli sono sufficienti per influenzare la stabilità termica della struttura. Negli organismi che vivono a basse temperature, le differenze maggiori a livello enzimatico si sono osservate su k_{cat} e K_m . Infatti, rispetto ad omologhi in altre specie, presentano una velocità di turnover del substrato maggiore, mentre la K_m si abbassa aumentando l'affinità per il substrato. Queste considerazioni sembrano essere confermate per l'anidraasi carbonica dei pesci antartici studiati, ovvero *Chionodraco hamatus* e *Trematomus bernacchii*; infatti, è stata studiata la sua cinetica enzimatica, in relazione alle variazioni di temperatura, paragonandola con quella della CA citosolica di un pesce temperato come *Anguilla anguilla*.

Probabilmente la stessa relazione può valere per i *Nototenidi* in generale, ed in particolare per le due specie oggetto di questa tesi: *Trematomus lepidorhinus* e *Trematomus eulepidotus*.

I risultati di questo studio sono molto interessanti e confermano l'ipotesi di un adattamento peculiare alla tipologia di ambiente (Figura 1.4).

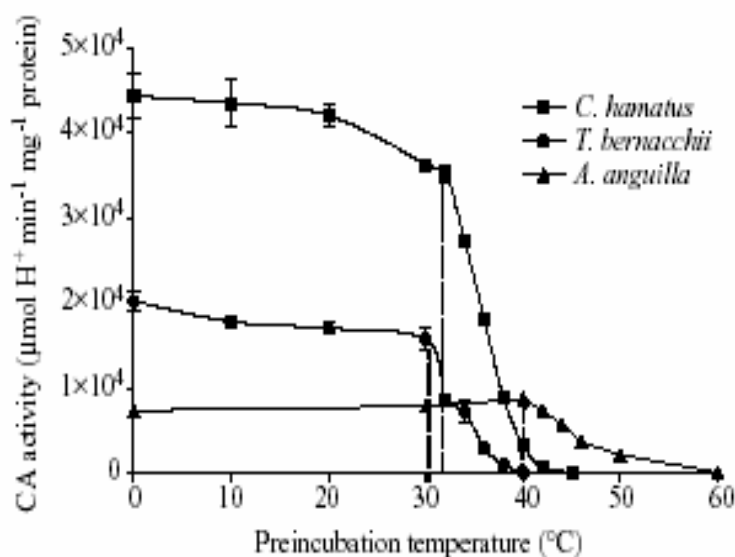


Figura 1.4: attività della CA in funzione della variazione di temperatura (tratto da M.Maffia et al., 2001).

In particolare si è notato che:

- 1) A T superiori di 30°C l'attività enzimatica comincia a diminuire nettamente per le specie antartiche, arrivando ad annullarsi a circa 40°C; mentre la CA di *A. anguilla* permane ad alta attività;
- 2) Il massimo dell'attività per le due specie antartiche si ha per T comprese nel range da 0°C a 10°C, mentre la CA di *anguilla* mantiene un'attività costante;
- 3) Il valore massimo di attività nei pesci antartici è nettamente maggiore che per il pesce temperato;
- 4) L'attività di *C. hamatus* a temperature polari è quasi doppia rispetto a quella di *T. bernacchii*, ciò indica che nell'Icefish sia intervenuto un più probabile adattamento, oltre a quello alla bassa temperatura, alla sua particolare fisiologia, non oggetto di studio in questo lavoro.

Tutte queste caratteristiche possono quindi compensare l'effetto della bassa temperatura sull'attività della CA nelle specie antartiche. Il mantenimento di un'alta affinità enzima-substrato potrebbe essere un'ulteriore strategia evolutiva per ottenere la massima efficienza dell'enzima alle basse temperature.

In conclusione, si evince che pochi residui modificati possano conferire all'enzima una natura specifica a seconda dell'adattamento ad un particolare ambiente (Marino *et al.*, 2007).

2. Materiali e Metodi

2.1. Estrazione RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata da campioni congelati di branchie previa separazione del tessuto branchiale dall'arcata ossea tramite un bisturi sterile. Tutto il materiale utilizzato durante la procedura è stato precedentemente sterilizzato e autoclavato. L'omogenizzazione del tessuto è stata effettuata tramite mortaio con l'aggiunta di azoto liquido.

L'intero processo di estrazione segue il protocollo Sigma MB-205 (Agosto 1999-Product # T9424) con utilizzo di acqua DEPC (**DEPC**: il Dietilpirocarbonato è un potente inibitore delle RNasi che si può aggiungere alle soluzioni acquose che si attiva dopo passaggio in autoclave della soluzione con DEPC aggiunto.):

- a) **Estrazione**-Aggiungere 1 ml di TRIzol per ogni 50-100 mg di tessuto.
- b) **Separazione di fasi**-Lasciare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti per consentire un'appropriata dissociazione dei complessi nucleoproteici. Aggiungere 0.2 ml di Cloroformio per ml di TRIzol usato. Tappare la Eppendorf e agitare in modo vigoroso il campione per 15-20 secondi e infine lasciarlo per 15 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare la miscela (mix) risultante a 12,000 g per 15 minuti a temperatura ambiente. La centrifugazione permette la separazione di tre fasi: la fase inferiore di colore rosso è costituita dalla soluzione di fenol-cloroformio, l'interfase bianca è costituita principalmente da proteine e lipidi; e la fase superiore incolore e acquosa contiene RNA in soluzione.
- c) **Precipitazione RNA**-Trasferire la fase acquosa in una nuova Eppendorf e aggiungere 0.5 ml di isopropanolo per ml di TRIzol usato. Lasciare il campione per 10 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare a 12,000 g per 10 minuti. Il precipitato dell'RNA formerà un pellet nel fondo della Eppendorf. Rimuovere il surnatante e lavare il pellet aggiungendo 1 ml di Etanolo a 75% in acqua DEPC per ml di TRIzol[®] usato. Successivamente centrifugare il preparato a 7,500 g per 5 minuti. Rimuovere l'etanol e ripetere il lavaggio dell'RNA. Una volta rimosso il surnatante lasciare asciugare il pellet e aggiungere 10 µl di acqua DEPC.

2.2. Quantificazione

Dopo l'estrazione, si procede con la quantificazione dell'RNA allo spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda EZ-201. Questo procedimento consiste nel misurare l'assorbanza degli acidi nucleici ($\lambda=260$ nm) e calcolare in modo indiretto la concentrazione degli stessi secondo la seguente formula (Equazione 2.1):

Equazione 2.1 : Formula
calcolo concentrazione

$$Conc = \frac{Abs \times F.D.}{Cammino\ ottico \times \epsilon}$$

con $\epsilon = 0.025 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Cammino ottico = 1 cm
Fattore di Diluizione (F.D.) = 250

2.3. Reazione di retrotrascrizione

La reazione di retrotrascrizione (RT) permette la conversione di RNA in cDNA mediante l'utilizzo di particolari polimerasi. Nel nostro caso l'enzima in questione è l'ImProm (Promega[®]). La reazione di retrotrascrizione prevede l'utilizzo di due diverse mix. La prima mix contiene un *Primers* universale Oligo-dT (Tabella 2.2) che permette l'appaiamento con la coda PoliA dell'RNA. Le quantità della prima mix sono le seguenti (vol. totale 5 μ l):

- AnchorOligo-dT \rightarrow 20 pmoli = 2 μ l
- 1 μ g di RNA corrispondente a x μ l (da quantificare tramite spettrofotometro)
- H₂O sterile fino a volume.

Con questa prima mix si segue un preciso protocollo preimpostato nel termociclatore MyCyclerTM Thermal Cycler (BioRad), ovvero:

- 5' a 70° C + 5' a 4° C + pausa in cui si aggiunge la II mix tenendo i campioni in ghiaccio + 5' a 25° C + 60' a 42° C + 15' a 70° C.

La II mix porta il campione a 20 μ l totali ed è così composta:

- *Buffer* : 5x \rightarrow 1x = 4 μ l
- MgCl₂ : 25 mM \rightarrow 3 mM = 2.4 μ l
- dNtPs (miscela di monomeri nucleosidici formati dalle 4 basi:A-T-G-C): 10 mM \rightarrow 0.5 mM = 1 μ l
- RNAasin (enzima inibitore dell'RNAasi) = 1 μ l
- ImProm = 1 μ l
- H₂O = fino a 20 μ l

Le sequenze oligonucleotidiche dei *Primers* sono riportate in Tabella 2.2 con le rispettive temperature di melting (T_m).

2.4. Quantificazione cDNA

In seguito alla reazione di retrotrascrizione si procede quindi con la quantificazione allo spettrofotometro in maniera del tutto simile alla quantificazione dell'RNA.

2.5. Reazione a catena della DNA Polimerasi(PCR: Polymerase Chain Reaction)

Questa reazione permette di amplificare particolari frammenti di DNA. La PCR utilizza l'enzima DNA Polimerasi che sintetizza il DNA a partire da substrati deossinucleotidici su uno stampo a singola elica. La Polimerasi sintetizza in direzione 5' \rightarrow 3' ed è in grado di aggiungere nucleotidi all'estremità 3' di un oligonucleotide apposito. Il procedimento per cui avviene questa amplificazione è il seguente: innanzi tutto vengono sintetizzati due oligonucleotidi a singola elica, complementari rispettivamente all'estremità 5' e 3' (*Primers Forward e Reverse*). Il DNA da amplificare viene quindi denaturato e gli oligonucleotidi si attaccano a

sequenze bersaglio . A questo punto la Polimerasi estende i due inneschi. Questa reazione genera DNA a doppio filamento nella regione di interesse su entrambe le eliche di DNA. Pertanto, due copie a doppia elica del frammento originale vengono prodotte in questo primo ciclo di PCR. Il DNA in seguito è soggetto ad altri cicli , i quali amplificano la sequenza in progressione geometrica (2, 4, 8, 16 e così via). Per ottenere la denaturazione del DNA si pone la mix di reazione nel termociclatore MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad). La mix di reazione varia in quantità a seconda del numero di reazioni da fare e dei µl di matrice che si utilizzano. È stata usata la seguente polimerasi per tutte le mix effettuate: *Go-Taq* (5 U µl). Le mix di reazione vengono così preparate:

- *Buffer* Go-Taq Flexy: 5x → 1x = 4µl
- MgCl₂: 25 mM → 3 mM =2.4 µl
- dNTPs: 10 mM → 0.2 mM =1 µl
- *Primer Forward* : 10 mM → 0.2 mM = 1 µl
- *Primer Reverse* : 10 mM → 0.2 mM = 1 µl
- *Taq* = 0.5 µl
- H₂O = 32.5 µl
- cDNA = 1 µl per ogni tubino PCR

[Ovviamente le suddette dosi si riferiscono ad un unico campione di PCR, in caso di più campioni le dosi vanno calcolate moltiplicandole per il n° di campioni + 1, in modo tale da diminuire errori accidentali].

Il programma di amplificazione impostato nel termociclatore prevede 25-30 cicli così strutturati:

- a) denaturazione del DNA a 94°C per 50'' ;
- b) appaiamento dei *Primers* (annealing) al DNA stampo ad una temperatura compresa tra 56°C e 58°C per 60'';
- c) estensione dei filamenti a 72°C per 60''.

Le sequenze oligonucleotidiche dei *Primers* sono riportate in Tabella 2.2 con le rispettive temperature di melting (T_M).

Primers	Sequenze 5'→3'	T_M
QFH (F)	5'-CAGTTYCAYTTCCAYTG GGG-3'	63.9°C
Anchor (R)	5'-ACCACGCGTATCGATGTCG-3'	67.1°C
Anchor Oligo-dT (R)	5'-ACCACGCGTATCGATGTCGTTTTTTTTT-3'	75.4°C
ReCA (R)	5'-ACRATCCAGGTGACRCTCTC-3'	54.6°C
RP1 (R)	5'-GTTTCACTTCCATTGGGGCA-3'	60°C
RP2 (R)	5'-CTCTGAGCACACTGTGAAT-3'	56°C
RP3 (R)	5'-GTGCACTGGAACACTAAGTA-3'	58°C
VIAL-8 (F)	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTT-3'	77.1°C
VIAL-9 (F)	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'	70.8°C
ReAnt1 (F)	5'-GTATTCCTCAAGATCGGTG-3'	56°C
ReAnt2 (F)	5'-CCAAAGGCAAGCAGACC-3'	54°C
ReAnt3 (F)	5'-GCTGACTTCGACCCATAG-3'	58°C

Tabella 2.2: Sequenze e Temperature di Melting *Primers* Sigma® (Y= C o T, F= forward R= reverse)

2.6. Reazione di amplificazione rapida delle estremità 5'/3' del filamento del cDNA (RACE 5'/3')

La sigla RACE è l'abbreviazione di *Rapid Amplification of cDNA Ends* ed è una tecnica che serve ad estendere la porzione di sequenza nota di un RNA messaggero all'estremità 5' (5'-RACE) o 3' (3'-RACE). Le classiche tecniche di clonaggio del cDNA infatti spesso producono soltanto frammenti della sequenza, che possono essere estesi tramite le tecniche di RACE.

Il metodo si basa sull'uso della PCR; il problema maggiore è quindi quello di individuare due *Primers* specifici ai lati della sequenza da amplificare. Uno dei *Primer* può essere basato sulla sequenza nucleotidica già nota, che deve venire estesa.

Per consentire l'amplificazione, la reazione sfrutta la coda di Poli-A normalmente presente in 3' e, in 5', una coda di Poli-A creata dall'enzima Terminal Transferasi (TT). Per fare ciò è stato utilizzato un particolare enzima, la Terminal Transferasi, ed un particolare *Primer*, VIAL-8 (Tabella 2.2) seguendo il protocollo Terminal Transferase, recombinant EC. 2.7.731 della Roche®.

Successivamente sono state fatte diverse reazioni di PCR utilizzando *Primers* particolari disegnati su sequenze precedentemente note o sulle sequenze parziali trovate; essi sono i RP1, RP2, RP3 come *Reverse*, VIAL-8 e VIAL-9 come *Forward* per quanto riguarda la reazione in 5'; mentre per la 3' REAnt1, REAnt2, REAnt3 come *Forward* e Anchor come *Reverse* (Tabella 2.2).

2.7. Elettroforesi su gel d'agarosio

Questo procedimento permette di separare ed identificare i frammenti di DNA a doppio filamento.

Il suddetto gel è stato ottenuto aggiungendo 2 gr di agarosio (Agarose Standard Low EEO, AppliChem™) a 100 ml di tampone TAE 1x (Tris-Acetate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3). La soluzione ottenuta è stata portata ad ebollizione (microonde e piastra riscaldante); successivamente è stato aggiunto etidio bromuro (0.25 µg/ml. Nei pozzetti sono stati caricati 10 µl di prodotto di PCR insieme a 3 µl di Loading Dye (Blue/Orange 6x Loading con Glicerolo). Vengono caricati anche 5 µl di marcatore di peso molecolare, DNA Ladder 100 bp (Promega®), che permette di stabilire il peso molecolare delle bande prese in considerazione. Il gel così preparato viene immerso in un campo elettrico di circa 100 Volt. Una volta finita la corsa il gel viene osservato al transluminatore e fotografato con una telecamera Eudora Light utilizzando il programma Gel-Doc 1000 (BioRad). La quantificazione avviene tenendo conto dell'altezza della banda in rapporto al Ladder e della sua luminosità (luminosità uguale alla corrispondente banda del Ladder significa stessa concentrazione, luminosità ridotta della metà equivale a metà concentrazione, e così via); ogni banda di Ladder corrisponde non solo ad un determinato peso ma anche ad una determinata concentrazione.

2.8. Purificazione dei frammenti di DNA da gel

Attraverso la purificazione da gel dopo l'elettroforesi si possono isolare bande di interesse che corrispondono al frammento di DNA cercato. Tali bande vengono tagliate da gel utilizzando un bisturi sterile e vengono purificate tramite il kit di purificazione Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System® (Promega®). Questo kit si basa sulle capacità del DNA di legarsi a membrane di silice in presenza di sali caotropici.

2.9. Clonaggio

Questo processo consiste nel mantenere molecole di DNA ricombinante in cellule vive e di poterle propagare. Esso coinvolge un vettore che fornisce l'informazione per propagare il DNA clonato nella cellula, ed un inserto di DNA, che viene inserito nel vettore e contiene il DNA di interesse. Il vettore altro non è che DNA plasmidico, ovvero un elemento extracromosomico circolare che si replica indipendentemente e ha caratteristiche proprie come quella di conferire resistenza agli antibiotici. Per costruire molecole di DNA ricombinante sono fondamentali gli enzimi di restrizione, che tagliano il DNA in siti specifici, ed altri enzimi che consentono di unire gli uni agli altri frammenti di DNA tagliati. In questo modo un inserto di DNA può essere sia purificato da altri DNA che amplificato per produrne grandi quantità.

2.9.1. Ligazione

Questo processo prevede la ligazione del nostro inserto, ovvero il DNA purificato, all'interno del nostro vettore, in questo caso il pGEM-®-T Easy Vector System (Figura 2.2).

Una volta completato questo processo il vettore con l'inserto viene inserito in cellule batteriche competenti (DH5α) attraverso uno shock termico.

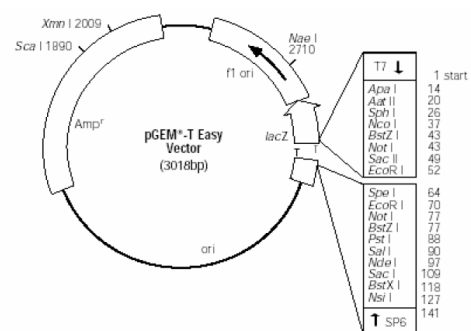


Figura 2.2: Vettore plasmidico pGEM-®-T Easy Vector Systems (Promega Protocol).

2.9.2. Trasformazione con DNA plasmidico

Con trasformazione si intende l'inserimento del vettore all'interno delle cellule competenti DH5α tramite shock termico; ovvero il passaggio da un ambiente a 0°C ad una temperatura di 42°C. Lo shock termico provoca delle aperture a livello della parete batterica. Attraverso queste aperture il vettore entra e si replica assieme al cromosoma batterico. Il passaggio altrettanto repentino ad una temperatura di 0°C fa collassare la parete e chiude le aperture bloccando così all'interno del battere il plasmide.

Successivamente le cellule vengono incubate per 90' a 37°C e poi piastrate su un terreno di coltura con aggiunta dell'antibiotico Ampicillina o Kanamicina, a seconda della resistenza delle cellule.

2.9.3. Screening delle colonie ricombinanti

Per verificare l'avvenuta trasformazione delle cellule si sfrutta la colorazione di screening blu-bianco dovuta all'aggiunta di X-Gal all'inoculo delle cellule batteriche. Se la presunta

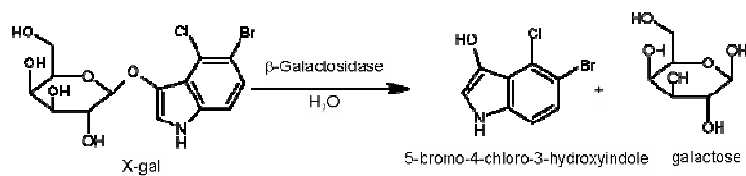
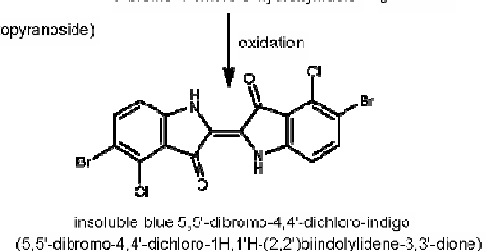


Figura 2.3 : Reazione X-Gal (tratto da <http://en.wikiPedia.org>.)



trasformazione ha avuto luogo, le colonie batteriche non reagiranno all'X-Gal, in quanto il vettore contenente l'inserto interrompe esattamente il promotore dell'operone lac in questo modo viene inibita la sintesi della β -galattosidasi. Se ciò accade abbiamo colonie bianche, se invece la trasformazione non è avvenuta le cellule risponderanno all'X-Gal producendo β -galattosidasi la quale taglierà l'X-Gal producendo 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo un prodotto insolubile di colore bluastro (Figura 2.3).

Tuttavia lo screening delle colonie non assicura che le cellule abbiano il vettore con l'inserto, infatti alcune potrebbero essere falsi positivi, ovvero sebbene il vettore si sia inserito all'interno della cellula è possibile che l'inserto si sia degradato o siano avvenute alcune mutazioni ricombinanti, perciò si è reso necessario attuare una corsa elettroforetica, con un prodotto di PCR effettuato inoculando un pezzetto di colonia positiva per ogni tubino da PCR, per assicurarsi che sia presente il frammento di DNA cercato.

Si attua infine l'inoculo con le colonie ricombinanti, ponendone una parte di esse in un tubo da coltura contenente terreno LB e antibiotico (ampicillina a una concentrazione finale 1X), l'inoculo viene lasciato incubare *overnight* a 37°C.

2.10. Estrazione DNA plasmidico (*Minipreps*)

Per estrarre il DNA plasmidico dalle cellule batteriche trasformate è stato utilizzato il kit della Promega[®] Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System[®] (protocollo # **TB225** della Promega[®]).

2.11. Digestione delle sequenze di DNA per mezzo di enzimi di restrizione

Una volta estratto il plasmide dalle cellule batteriche è possibile determinare la presenza o meno dell'inserto di interesse attraverso una digestione con enzima di restrizione.

A questo scopo è stato utilizzato l'enzima di restrizione EcoRI che taglia il DNA a livello della sequenza:



La reazione ha una durata di 120' a 37°C; il prodotto è caricato su gel d'agarosio al fine di verificare l'avvenuta digestione e la presenza dell'inserto.

2.12. Sequenziamento

Una volta accertata la presenza dell'inserto il prodotto di Miniprep viene inviato al Centro di Sequenziamento del CRIBI.

Il referto ottenuto è stato analizzato con il programma Chromas 1.45 (www.techne.lysium.com.au/chromas.html) e con il programma online Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

2.13. Allineamenti

Le sequenze nucleotidiche sono state allineate con il programma online ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw), mentre quelle amminoacidi che con Muscle (www.ebi.ac.uk/muscle).

2.14. Traduzione e Modelling strutturale

Grazie al programma on line ExPASy Translate Tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) tutte le sequenze nucleotidiche trovate, sono state tradotte in amminoacidiche facilitando così la ricerca del sito attivo.

Il modelling strutturale delle sequenze ottenute è stato realizzato con il programma online 3D-JigSaw (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>), utilizzando come templatato di confronto la CA umana, *2cba*; mentre per la visualizzazione dell'immagine è stato usato il programma PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

3. Risultati

3.1. Estrazione dell'RNA e RT

L'RNA totale è stato estratto da diversi campioni di branchie delle due diverse specie di pesci: la quantità dell'RNA estratto ha fornito i risultati riportati in Tabella 3.1. Per valutare la qualità e la concentrazione dell'RNA estratto, è stata effettuata un'elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. La qualità dell'RNA estratto è stata valutata in base alla presenza delle bande corrispondenti all'RNA ribosomiale. Se l'RNA fosse contaminato, infatti, tali bande non apparirebbero nette e si osserverebbe la presenza di *smear*.

Specie	Abs 260	Abs 280	260/280	Abs Effettiva	Concentrazione $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
<i>Trematomus eulepidotus</i> 1	0,119	0,066	1,80	29,75	1,19
<i>Trematomus eulepidotus</i> 2	0,108	0,058	1,86	27	1,08
<i>Trematomus eulepidotus</i> 10	0,505	0,303	1,67	126,25	5,05
<i>Trematomus eulepidotus</i> 13	0,539	0,313	1,72	134,75	5,39
<i>Trematomus lepidorhinus</i> 1	0,246	0,139	1,77	61,5	2,46
<i>Trematomus lepidorhinus</i> 2	0,268	0,158	1,70	67	2,68
<i>Chionodraco hamatus</i>	0,137	0,076	1,80	34,25	1,37

Tabella 3.1: Quantificazione RNA totale.

L'RNA totale è stato utilizzato per sintetizzare un filamento di cDNA tramite una reazione di retro-trascrizione (RT), utilizzando l'enzima ImProm. Dopo elettroforesi su gel d'agarosio la banda risultante era di dimensione stimata di 400 bp (Figura 3.1).

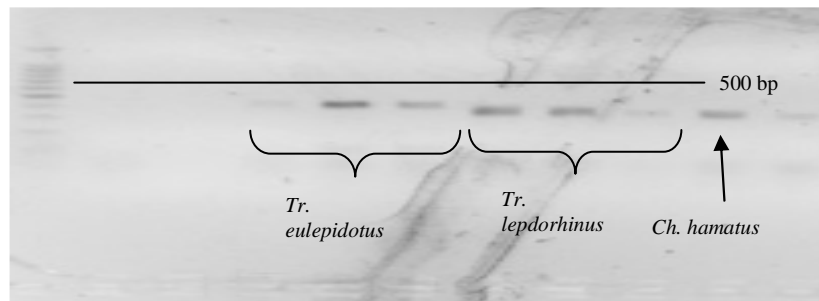


Figura 3.1: Risultati RT (foto a colori invertiti).

3.2. PCR e RACE 3'/5'

Sono state eseguite diverse PCR partendo dai campioni di cDNA precedentemente quantificati, modificando sia temperatura che il numero di cicli al fine di ottimizzare la reazione di amplificazione, questo perché la sequenza cercata non era nota e i *Primers* usati erano degeneri per cui cambiando anche una sola variabile si sono ottenuti risultati accettabili. In Figura 3.2 sono riportati i risultati della prima PCR dove si evidenzia la presenza di bande corrispondenti al numero di basi aspettato, insieme a *smear*:

- 1) la banda da 500 bp (la più luminosa) ha una concentrazione di 150 ng/5 μl ;
- 2) tutte le altre bande invece sono concentrate a 50 ng/5 μl .

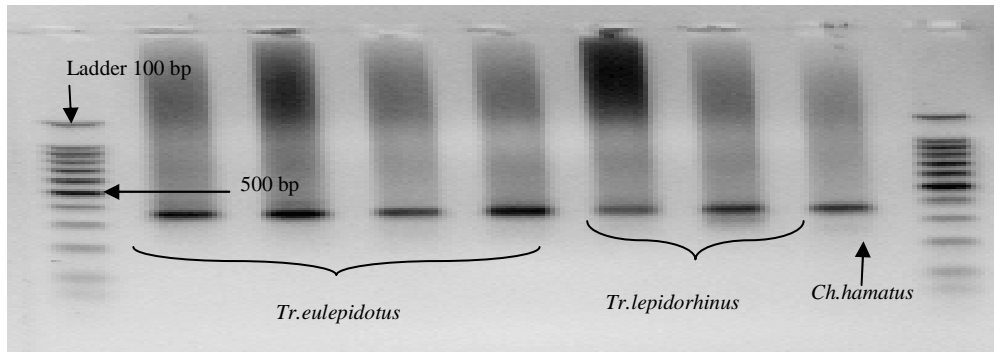


Figura 3.2: Elettroforesi su gel d'agarosio (Foto a colori invertiti).

Successivamente sono state eseguite PCR di PCR per avere una maggiore discriminazione tra le PCR precedentemente fatte. Non ottenendo risultati soddisfacenti con l'utilizzo dell'Anchor (troppo smear e troppi aspecifici, dati non mostrati) si è utilizzato un altro *Primer Reverse*, il Re-Ca (Tabella 2.2).

Questo *Primer* è più interno rispetto all'Anchor e più specifico; ne è risultata la sequenza riportata in figura 3.3. Tale sequenza, analizzata sia con Chromas che con Blast, corrisponde alla parte centrale della sequenza totale, la parte codificante per il sito attivo dell'enzima. Sebbene consigliato, il clonaggio di questo frammento non è stato effettuato in quanto prove precedenti avevano dato esiti negativi, forse a causa del mal funzionamento delle cellule competenti.

Essendo il Re-CA molto più interno nella sequenza rispetto all'Anchor, la sequenza trovata risulta essere troppo breve per un'analisi filogenetica, in quanto mancante dell'estremità 3'e 5'. È stato quindi necessario effettuare la reazione di RACE 3' e RACE 5'.

>EuCa

5'→CCCAGTTCCTTTCCTTTTTTTTTGACATTGATCAGCGATGTATGTTGTCATTTTGCAAAAAAACTAGTTTC
 ATTTCCATTGGGGAGCGTGTGATGGCAAAGGCTCTGAACACACCCGTGAATGGCATCAAGTTTCCTTGTGAGC
 TTCACTTGGTGCACCTGGAACACCAAATACCCAGCTTTGGAGAGGCAGCCAGCAAGCCTGATGGCCTTGCCAG
 TGGTGGGGGTATTCTCAAGATCGGTGACGCCAACCCAGTCTTCAGAAGGTTCTGGATGCCTTTAACAAACA
 TCAAGACCAAAGCAAGCAGACCTTTTCGCTGACTTCGACCCATAGACCTTGCTGCCCGGTGCTTTGAATATC
 GGACATAAAAGGTTCTTTAACACCGCCTAGCTTT→3'

>LpCa

5'→AACACCCAGTTCCTTCCCTTTGATTTGACATCGAACCGGAGGTATGTTTCACATTTACACCAAAA
 AGTTTCATTTCCATTGGGGAGCGTGTGATGACAAAAGGCTCTGAACATACCCGTGGCTGGGACCAAGTTTCCTTT
 TGAGTCCATTTGGTGCACCTGGAATACCAAATACCAAGCTTCGGTGAGGCTGCAAGCAAGCCTGATGGCCT
 CGCTGTTGTTGGAGTATTCCTGAAGATCGGTGATGCAAAATCCAGTCTCCAGAAGGTTCTCGACGCCTTCAAT
 AACATCAGGGCCAAAAGCAAGCAGACCTTTTTTGCTGACTTCGACCCAAAAGACCCTCCGCCCTGGATGCCTT
 GGACATCTGACATAATGCGGTTCTCGAAACCGCCAGGTTTCAT→3'

Figura 3.3: Sequenze 5'→3' dell'Anidrasi Carbonica di *Tr. eulepidotus* (EuCa) e *Tr. lepidorhinus* (LpCa)

3.2.1. Progettazione dei *Primers* per le reazioni di RACE

Date le sequenze parziali da noi sequenziale di *Tr. eulepidotus* e *Tr. lepidorhinus*, abbiamo effettuato un allineamento con altre sequenze di Anidrasi Carbonica disponibili nei data base, utilizzando il programma Clustalw. Per ciascuna sub unità sono stati progettati *Primers* specifici, per la reazione di RACE, come riportato in Figura 3.4.

CLUSTAL 2.0.5 multiple sequence alignment

```
EuCa          TCAGCGATGT--ATGTTGTCATTTTGCAAAAAAACTAGTTTCATTTCATTGGGGAGCGT 90
LpCa          ACCGCGAGGT--ATGTTTCACATTTACACCAAAAACCTAGTTTCATTTCATTGGGGAGCGT 94
```


- Lunghezza di circa 16/20 basi;
- Contenuto in G-C di 40%/60%;
- Assenza di regioni complementari all'interno;
- Temperatura di annealing di 54°C/56°C calcolata come $T = [(C+G) \times 4 + (A+T) \times 2]$;
- Inizio e fine della sequenza con C o G.

Soddisfando questi criteri sono stati ottenuti i seguenti *Primers*: RP1-RP2-RP3-REAnt1-REAnt2-REAnt3 (Tabella 2.2).

3.3. Reazione di RACE 5'

Disegnati i *Primers* RP1, RP2, RP3, uno più esterno all'altro, sono state fatte le reazioni necessarie per completare la sequenza all'estremità 5'.

Si è ottenuto il primo filamento di cDNA utilizzando il *Primer* RP3 ($T_A=58^\circ\text{C}$), a partire da questa sono state poi fatte successive reazioni di PCR utilizzando i rimanenti *Primers* e seguendo diversi protocolli, in modo tale da ottenere risultati maggiormente attendibili.

La reazione con PR1 e VIAL-9 ha dato i risultati migliori, infatti vedendo la corsa elettroforetica al transluminatore, si sono evidenziate diverse bande a differenti altezze. Si è reso necessario quindi effettuare un'ulteriore amplificazione preparando una mix contenete VIAL-9, RP1 e 1 μl del precedente prodotto di PCR. La prima reazione è stata condotta a 54°C di temperatura di *annealing*, ma, data la presenza di molti aspecifici, è stata effettuata una seconda reazione alzando la temperatura a 56°C e a 58°C con lo scopo di diminuirne l'aspecificità. I risultati migliori sono stati ottenuti solo per il *Tr. Eulepidotus* la quale banda è stata purificata direttamente dal gel e inviata al CRIBI. A causa di un rumore di fondo il sequenziamento non è riuscito e non è stato letto il campione di DNA.

3.4. Reazione di RACE 3'

Come per la reazione di RACE 5', sono stati utilizzati dei *Primers* disegnati sulla sequenza parziale di carbonico anidasi ottenuta (Tabella 2.2).

A partire dal cDNA è stata effettuata una prima reazione di PCR con i *Primers* ReAnt1 e Anchor a 54°C; ma questa ha dato come risultato diverse bande (Figura 3.5) indice di un alto tasso di aspecificità. È stato così effettuato un secondo ciclo di PCR utilizzando questa volta i *Primers* ReAnt2 e ReAnt3 come *Forward* e sempre l'Anchor come *Reverse*, sia a 54°C che a 56°C per entrambi. La matrice di partenza di questo secondo ciclo era il primo prodotto di PCR, poiché avendo già amplificato la sequenza cercata con un *Primer* interno, utilizzando gli altri due *Primers*, più esterni, si ottiene una maggiore specificità di amplificazione.

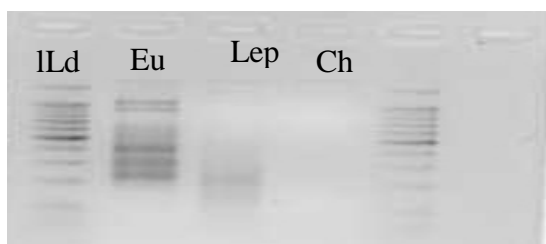


Figura 3.5: Primo ciclo di PCR reazione RACE 3'. Le diverse bande indicano alta aspecificità.
Ld : ladder da 100 bp
Eu: *Tr. eulepidotus*
Lep: *Tr. lepidorhinus*
Ch : *Ch. hamatus*

La seconda amplificazione ha dato risultati migliori, sono stati infatti purificati i prodotti di PCR di entrambi i pesci aventi come *Primer* il ReAnt3 sia a 54°C che

a 56°C, e successivamente si sono stati inviati al CRIBI 4 µl di purificato da sequenziare. Il sequenziamento ha dato i seguenti risultati:

>AntL

```
5'→AGCTTATCCTGGATCTGGACTATGACGGCTCTCTGACCACGCCCTCTGTTGGAGAGCGTCAGCTGGAT
TGCTCTCAAGGAGCCAATCAGTGTGACGCCACTCAGATGACCAGGTTCCGCGGCCCTCTCTCACCGGAGA
AGGAGAGGGCTCCATGCTGCATTGTGGACAACCTACCGCCCCCCCCAGCCTCTGAAGGGCCGTCAGGTCCGCGC
CTCCTTCAAATAAACTTCGCTTCTCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAACTTCATTCTCTATTATAT
CCACATGCAGTGCAGCTTATACTAGCCTTAAGGAAATGAACCTGAAGTAGATCTGCTTAAAGTTTCTATAATAT
AGACTTACTGGATGTATGTTGAACAAAATAACTGATTTTTGAGCTTTGACACTATAAAGACACAAGACATAT
TTACGCTTATCATATCAAAAAGTCCAGATGATATTTAAGATATTTTTATTACATTGAGCCACGGATATGCTCC
CTAGACAGACCATAGATTTTTTATGGAAATCAAACAGTAAAAGGCTATTTTCACAGAGATCCTCTGGCATT
ACTCATGTGAGTGTAGGGGTGGATGCATGAAGTGTAAATTTGGTTCATACGTTTGCCTCATGGAATATT
AAATACATATTGTCCCTTGGTCCAGACTGCCTTAATACAGACAAAAGGTGGCCTAATATTTTAAAGTCTTTAT
AGGCTAACAGAGGGACCCGAGATCTCTGAAATTTGCACAAAAGAGAGACAGGATTTCTGGCTCCTAATCTCA
TAATTAATTATAATTAATTAATATTGATGTGTGCCAATAATAATATGCTTTTTCTTCTACTAAATATACTCAAAA
TAGAAGCCAATATATTCTAAAACCTTAATTAATACAATTAATAAAAAAAAAAAAAACACTCCATCCCCGGGGA
GAAAAA→3'
```

>AntE

```
5'→CCCAGTTCCTTTCTTTTTTTTCGACATCGATCAGCGATGTATGTTGTCATTTTGCAAAAAAACCAGTTT
CATTTCCATTGGGGAGCGTGTGATGGCAAAGGCTCTGAACACACCGTGAATGGCATCAAGTTTCTTGTGAG
CTTCACTTGGTGCCTGGAACACCAATACCCAGCTTTGGAGAGGCAGCCAGCAAGCCTGATGGCCTTGA
GTGGTGGGGGTATTCTCAAGATCGGTGACGCCAACCCAGTCTTCAGAAGGTTCTGGATGCCTTAAACAAC
ATCAAGACCAAAAGGCAAGCAGACCTTTTCGCGGTGTTCCACATTCTACTTGTGCTGCTGGTTGCCTTGACTACT
GGACATATGACGGTCCCTGACCACACCCCTGCTGGAGAGCGTTACCTGGATTGTCTGCAAAAGGCCAA
TCAGTGTGAGCTGTGAGCAGATGGCCAAATTCGCGAGCCTGCTCTTCTGCTGAGGGTGAGCCCGAGTGTCT
GCATGGTGGACAACCTACCGCCTCCCGAGCGCTCAAGGGTGCCTGTCCGTGCTTCCCTCCAGTAATACCC
CTTCCCCCTTTTACCTTTTCTGCCCCTGTTGCTCTCTCCCTTCCCCCTCCCTTTAGTCAGAGTTGCCTTTTT
GCAGTGGCCACAAGCACACATGTCTCTGCGTCCAATTTTTTAAAAGAAATGAAATTCCTGTAGCCATT
GCTTTTTACGTTGGGCGCTCTAAAAGACACAAGACATATTTACGCTTATCATATCAAAAAGTCCAGATGATTT
TAAGATATTTTTATTACATTGAGCCACGGATATGCTCCCTAGACAGACCATAGATTTTTTATGAAAATCAA
CAGTAAAAGGCTATTTTCACAGAGATCCTCCTGGCATTACTCATTGTGAGTAGTAGGGGTGGATGCATGAAG
TGTAATTTGGGTCATACGTTGTGCCCTCATGGAATATTAATACATATTTGCCCCTGGTCCAGACTGCCTT
AATACAGACAAAAGGTGGCCTAATATTTTAAAGTCTTTATAGGCTAACAGAGGGACCCGAGATCCTGAAAT
GTCACAAAAGAGACAGGATTTCTGGCTCCTAATCTCATAATTAATTATAATTAATTAATTAATTAATTAAT
AATATAATATGCTTTTTCTTCTACTAAATATACTCAAAAATAGAAGCCAATATATTCTAAAACCTTAATTAATAC
AATTAATAAAAAAAAAACGAGTT→3'
```

Figura 3.6: Sequenza parziale dell'estremità 3' di *Tr. Lepidorhinus* (AntL) e *Tr. eulepidotus* (AntE)

3.5. Traduzione

Avendo trovato, grazie alle reazioni di RACE, altri frammenti di sequenza, essi sono stati uniti alla sequenza precedentemente trovata e tradotti così poter individuare, sulla base di studi precedenti e sulla base della traduzione, il sito attivo e poter così attuare dei confronti con sequenze note ed individuare quali amminoacidi variano e in quale posizione all'interno del sito catalitico (Figura 3.7).

Il sito attivo è compreso dal primo codone della sequenza fino al primo codone di stop presente, il resto della sequenza è parte esterna al sito attivo.

>EuCa

```
cccagttccctttccttttttttcgacatcgatcagcgatgatgtgtcattttgcaaaaa
Q F P F L F F R H R S A M Y V V I L Q K
aaccagtttcatttccattggggagcgtgtgatggcaaggctctgaacacaccgtgaat
N Q F H F H W G A C D G K G S E H T V N
ggcatcaagtttccctgtgagcttcacttgggtgactggaacaccaaataccccagcttt
G I K F P C E L H L V H W N T K Y P S F
ggagaggcagccagcaagcctgatggccttgagtggtgggggtattcctcaagatcggg
G E A A S K P D G L A V V G V F L K I G
gacgccaaccagctctcagaaggttctggatgcctttaacaacatcaagaccaaaggc
D A N P S L Q K V L D A F N N I K T K G
aagcagaccttttcgcggtgttccacattctacttggctgctggttgcttgccttgactactgg
K Q T F S R C S T F Y L L P G C L D Y W
acatatgacggctccctgaccacacccccctgctggagagcgttacctggattgtctgc
T Y D G S L T T P P L L E S V T W I V C
```

3. Risultati

```
aaagagccaatcagtgctcagctgtgagcagatggccaaatccgcagcctgctcttctct  
K E P I S V S C E Q M A K F R S L L F S  
gctgaggggtgagcccgagtgctgcatgggtggacaactaccgccctcccagcgcgctcaag  
A E G E P E C C M V D N Y R P P Q P L K  
ggtcgccctgtccgtgcttccctccagtaatacccttcccccccttttaccctttct  
G R P V R A S F Q -
```

>LpCa

```
aacacccagttcccttccctcagattagacatcgaaccgcgaggtatgttcacatttca  
N T Q F P F P Q I R H R T A R Y V H I S  
caccaaaaaccagtttcatttccattggggagcgtgtgatgacaaaggctctgaacatacc  
H Q N Q F H F H W G A C D D K G S E H T  
gtggctgggaccaagtttcttttgagctccatttgggtgcactggaataccaaatacca  
V A G T K F P F E L H L V H W N T K Y P  
agcttcgggtgagcgtgcaagcaagcctgatggcctcgctgttggaggatattcctgaag  
S F G E A A S K P D G L A V V G V F L K  
atcgggtgatgcaaatcccagtcctccagaagttctcgacgccttcaataacatcagggcc  
I G D A N P S L Q K V L D A F N N I R A  
aaaggcaagcagacctttttgctgacttcgacccaagacctccgccctggatgcctg  
K G K Q T F F A D F D P K T L R P G C L  
gatctggactatgacggctctctgaccacgccccctctgttggagagcgtcagctggatt  
D L D Y D G S L T T P P L L E S V S W I  
gtcctcaaggagccaatcagtgctcagccccactcagatgaccaggttccggcgcctcctc  
V L K E P I S V S P T Q M T R F R G L L  
ttcaccggagaaggagggctccatgctgcattgtggacaactaccgccccccagcct  
F T G E G E A P C C I V D N Y R P P Q P  
Ctgaagggcgcgtcaggtccgcgcctccttcaataaacttcgctttctcttcaaaaaaa  
L K G R Q V R A S F K -
```

Figura 3.7: Sequenze nucleotidiche di CA tradotte di *Tr.eulepidotus* (EuCa) e *Tr.lepidorhinus* (LpCa). Le sottolineature indicano la parte codificante il sito attivo (traduzione ottenuta su <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

3.6. Modelling strutturale

Grazie all'aiuto di diversi programmi è stato costruito un modello in 3D della sequenza codificante il sito attivo partendo da strutture simili già presenti nei database.

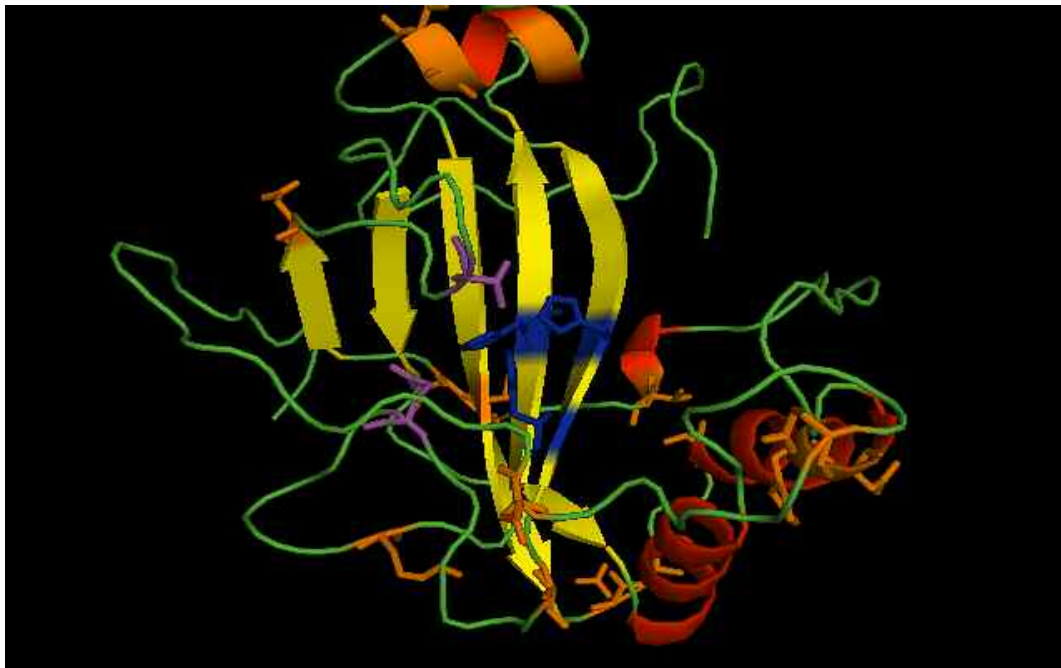


Figura 3.8: Struttura 3D CA *Tr. lepidorhinus*: in blu le His 94-96-119 in magenta il Glu 106 e la Thr 199. In arancione le mutazioni comuni alle specie antartiche (Tabella 4.1).

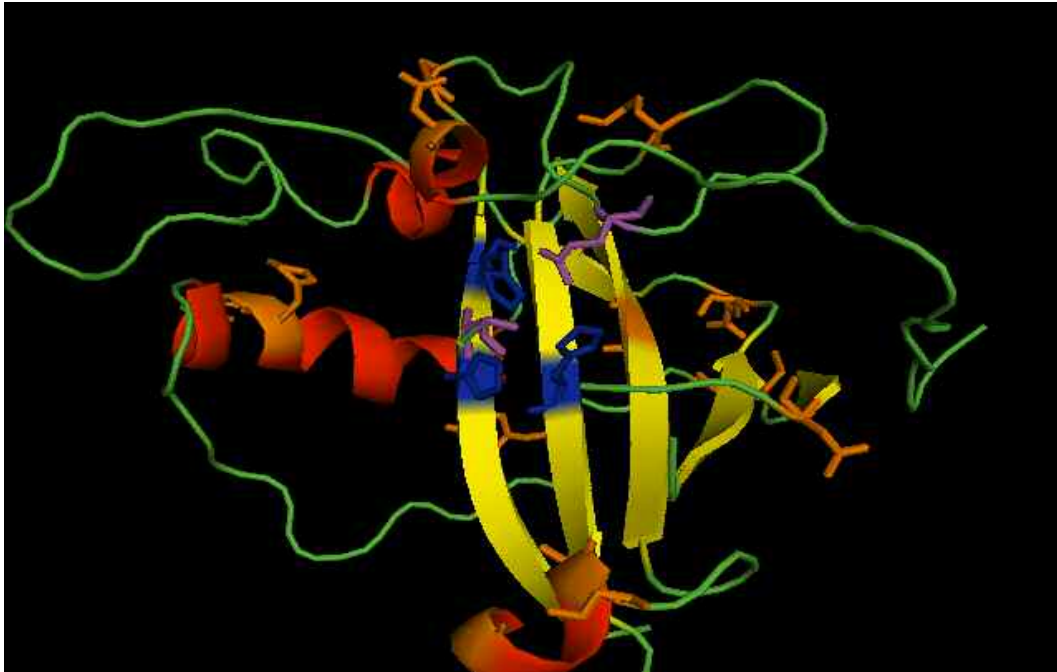


Figura 3.9: Struttura 3D CA *Tr. eulepidotus.*: in blu le His 94-96-119 in magenta il Glu 106 e la Thr 199. In arancione le mutazioni comuni alle specie antartiche (Tabella4.1).

3.7. Filogenesi

Grazie ai risultati ottenuti è stato possibile eseguire un'analisi filogenetica, sulle Anidrasi Carboniche di diverse specie di teleostei al fine di indagare l'evoluzione di questo enzima e quali specie abbiano avuto un'evoluzione più simile all'interno del gruppo *Teleostei*. L'albero filogenetico è stato effettuato con il programma PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 2002).

L'albero filogenetico è stato costruito secondo il metodo del Neighbor-Joining, che consiste nel calcolare matrici di distanza delle sequenze sulla base degli allineamenti effettuati. Questo è un albero non radicato, cioè illustra le relazioni evolutive che intercorrono tra gli organismi che si trovano agli apici, ma non fornisce alcuna informazione in merito alla loro evoluzione rispetto ad un antenato comune a tutte le specie considerate. Dalla ricostruzione (Figura 3.10) si possono individuare 3 grandi gruppi di sequenze ben distinte: le CA legate alle membrane, in alto; le CA citoplasmatiche non eritrocitarie, in basso; e le CA eritrocitarie, le più numerose, al centro. In questa prima ricostruzione vengono presi in considerazione solo membri della superclasse *Ittiopsidi*. Interessante è l'ulteriore gruppo creatosi all'interno delle CA eritrocitarie, in cui tutte le specie antartiche risultano vicine. Il *cluster* dei pesci antartici è un esempio di omologia, in cui le specie vantano un antenato in comune; inoltre si individuano coppie paraloghe che divergono per duplicazione, e coppie ortologhe, all'interno delle coppie paraloghe, che invece divergono per speciazione.

È stato prodotto un secondo albero filogenetico prendendo in considerazione diversi organismi appartenenti a diverse classi. Anche in questa ricostruzione sono mantenuti gli stessi gruppi di compartimentalizzazione della CA (Figura 3.11).

In entrambi gli alberi vengono riportati i numeri di *bootstrap*, ovvero una tecnica statistica di ricampionamento per approssimare al meglio la ricostruzione filogenetica, al fine di renderla il più realistica possibile. Il valore di *bootstrap* considerato accettabile deve essere superiore a 50 %.

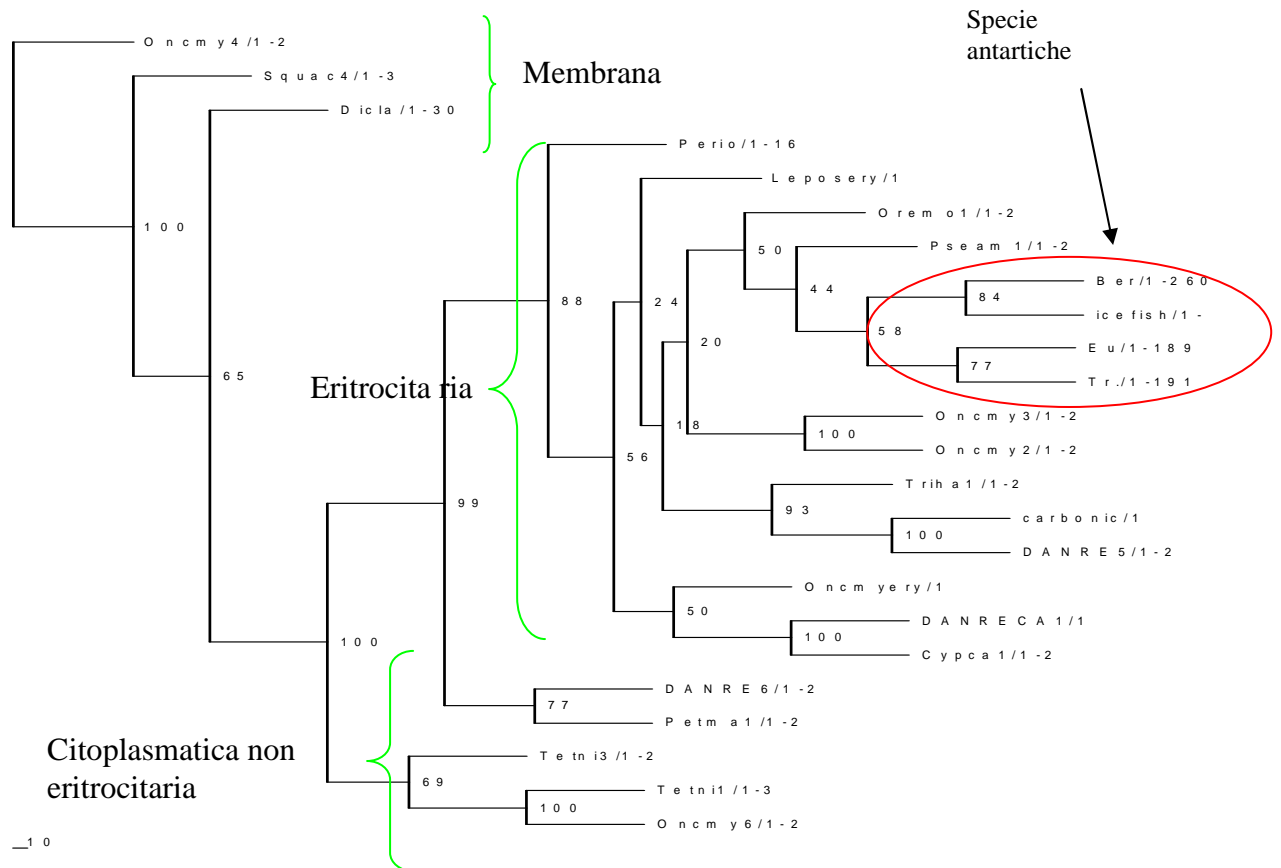


Figura 3.10: Albero filogenetico costruito secondo il metodo di NJ, rappresentante solo *Ittiopsidi*. (Per la sequenze complete si veda la sezione Allegati).

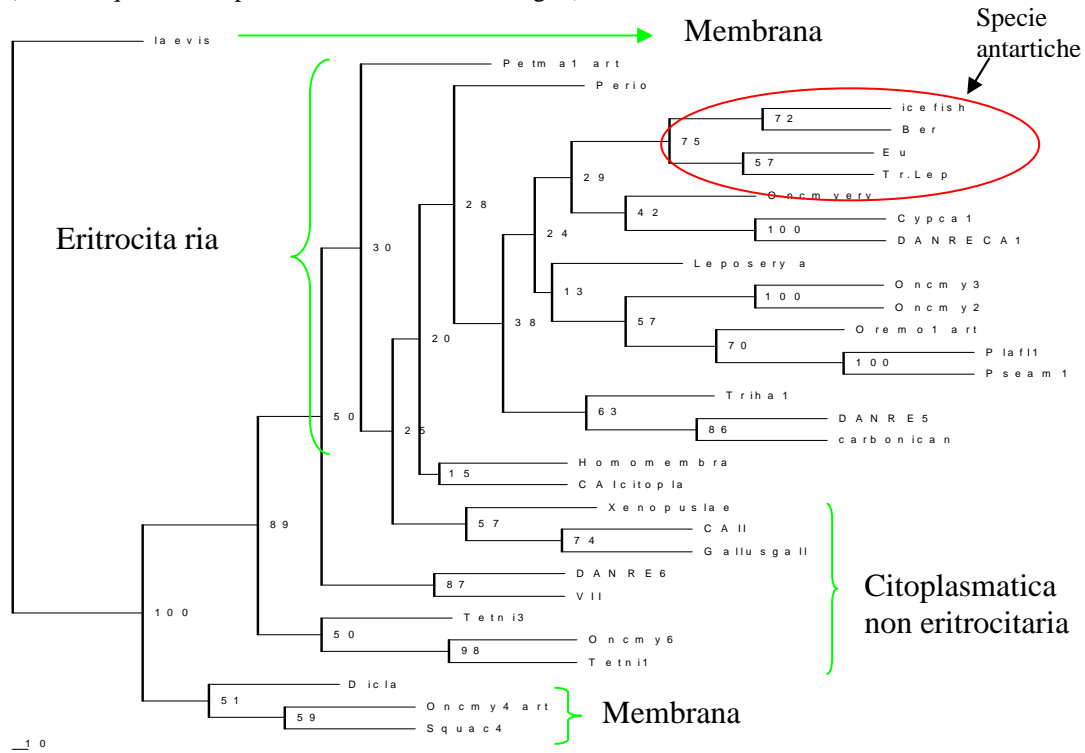


Figura 3.11: Albero filogenetico costruito secondo il metodo di NJ (Per la sequenze complete si veda la sezione Allegati).

4. Discussione

Il confronto con sequenze presenti nei database online di NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), ha permesso di assegnare le sequenze trovate alla forma eritrocitaria nelle due specie (Figura 4.1).

```
MUSCLE (3.7) multiple sequence alignment

Eul      -----QFPFL-----FFRHRSAMYVVIL 60
Lep      -----NTQFPFP-----QIRHRTARYVHIS
icefish  -AHAWGYGPTDGPDKWVSNFPIADGPRQSPIDILPGGASYDSGLKPLSLKYDPSNACLEIL
Danio    MADHWGYDKHNGPDKWGESYPIANGSRQSPIDIKSSTTTYDEKLTPLKLYDPPSTSLDIQ
2CB      -SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL
          .:.*:                               . : : : *

Eul      QK-----NQFHFHWGACDGGKSEHTVNGIKFPCELHL 120
Lep      HQ-----NQFHFHWGACDDKGEHTVAGTKFPFELHL
icefish  NNGHSFQVTFADSDSSTLKEGPISGVYRLKQFHFHWGASNDKGEHTVAGTKYPAELHL
Danio    NNGHSFQVSVFVDDQNSSTLTGGPVGTGTFRLKQFHFHWGSADDKGEHTVNGKCYPAELHL
2CB      NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDKKKYAAELHL
          ::                               *****: :.:***** :. ****

Eul      VHWNTKYPSFGEAASKPDGLAVVGVFLKIGDANPSLQKVLDAFNINIKTKGQT-FSRCST 180
Lep      VHWNTKYPSFGEAASKPDGLAVVGVFLKIGDANPSLQKVLDAFNINIRAKGQTFADFD
icefish  VHWNTKYPSFGEAASKPDGLAVVGVFLKIGDANASLQKVLDAFNIDIRAKGQTSFADFD
Danio    VHWNTKYPSFKDAVDKPDGLAVVGVFLKIGADNPKLQKILDAMDIAIKSKGQTFPFPNFD
2CB      VHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAVLGIFLKVGSAKPLQKVVVDVLDSEIKTKGSADFTNFD
          ***** . * .*.:*****:****:* :. ****:*.:: **:****: * . ..

Eul      FTLLPGCLDYWTYDGSLLTPPLESVTWIVCKEPI SVSCEQMAKFRSLLFSAEGEPECCM 240
Lep      KTLRPGCLD-LDYDGSLLTPPLESVSWIVLKEPI SVSPTQMTFRFRGLLFTGEGEAPCCI
icefish  SFTLLPGCLDYWTYDGSLLTPPLESVTWIVCKEPI SVSCEQMAKFRSLLFSAEGEPECCM
Danio    SVLLPSSLDYWTYLGSLTTPPLESVTWIVCKQSI SVSSAQMKRFRSLLFSGDGEKACCM
2CB      RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEPEPEELM
          * * . * * * *****.*:*** *: .*** *: :** * * .:.* :

Eul      VDNYRPPQPLKGRPVRSFQ
Lep      VDNYRPPQPLKGRQVRSFK
icefish  VDNYRPPQPLKGRHVRASFQ
Danio    VNNYRPPQPLKGRVVRASFQ
2CB      VDNWRPAQPLKNRQIKASFQ
          *:***.*****.* :****:
```

Figura 4.1: Allineamento delle sequenze codificanti il sito attivo. In blu gli le His 94-56-119 in magenta la Thr 199 e il Glu 106 – vedi pp 1-2. In rosso gli A.A. comuni alle tre specie antartiche (Eul: *Tr. eulepidotus* ; Lep: *Tr. lepidorhinus* ; Danio: *Da. rerio*; Icefish: *Ch. Hamatus*; 2CB: *H. sapiens*).

Dagli allineamenti effettuati si può notare come la sequenza codificante il sito attivo si sia altamente conservata sia nelle due specie oggetto di questo studio che più in generale in modo interspecifico (allineamenti con *Icefish*, *Zebrafish* e *Homo*). La struttura di base del sito attivo è del tutto simile a quella della CAII umana (Figura 1.1), si possono infatti individuare le tre Istidine 94-96-119 della tasca idrofobica del sito attivo sulle quali si posiziona l'atomo di zinco che coordina la reazione di scissione dell'acqua e la successiva idratazione della CO₂, come spiegato sopra.

Tuttavia, prendendo in considerazione solo le sequenze di teleostei, si nota che alcuni amminoacidi cambiano all'interno della sequenza.

Molte di queste mutazioni, segnalate in rosso in Figura 4.1, sono comuni a tutte e tre le specie antartiche *Tr.eulepidotus*, *Tr. lepidorhinus* e *Ch. hamatus* ma assenti in *Zebrafish* e *Homo*. Ciò fa supporre che queste mutazioni siano dovute alle strategie di adattamento dell'enzima a particolari condizioni comuni a tutti e tre i campioni presi in considerazione, ovvero le basse temperature (-1.9°C) a cui le tre

specie vivono (Tabella 4.1). Queste mutazioni potrebbero quindi conferire all'enzima un adattamento in relazione all'ambiente in cui vivono gli organismi, ottenendo così una miglior efficienza a temperature più basse piuttosto che a temperature più alte e un picco di attività molto più elevato rispetto alla CA di un pesce temperato, come dimostrato dal grafico in Figura 1.4.

Nelle sequenze incorrono altre mutazioni, alcune delle quali sono simili tra specie diverse mentre altre sono caratteristiche della singola specie.

AA	Posizione	AA	Posizione
A	99	V	159
K	112	F	163
G	131	N	164
A	134	T	182
S	135	G	186
V	145	C	187
D	151	D	194
A	152	E	213
S	155	D	242

Tabella 4.1: Elenco delle mutazioni comuni alle tre specie antartiche, vengono riportati gli amminoacidi e la loro posizione in sequenza.

Come detto precedentemente, le sequenze trovate sono parziali, mancano infatti le estremità 3' e 5' (Figura 4.2); tuttavia sebbene importanti le estremità non sono coinvolte nel funzionamento catalitico dell'enzima ma svolgono una funzione di protezione alla parte codificante il *core* dell'enzima stesso, ovvero il sito attivo. Perciò, nonostante questa lacuna, il lavoro di caratterizzazione molecolare dell'enzima si è potuto attuare in ogni caso avendo comunque sequenziato il sito catalitico e regolativo dell'enzima.

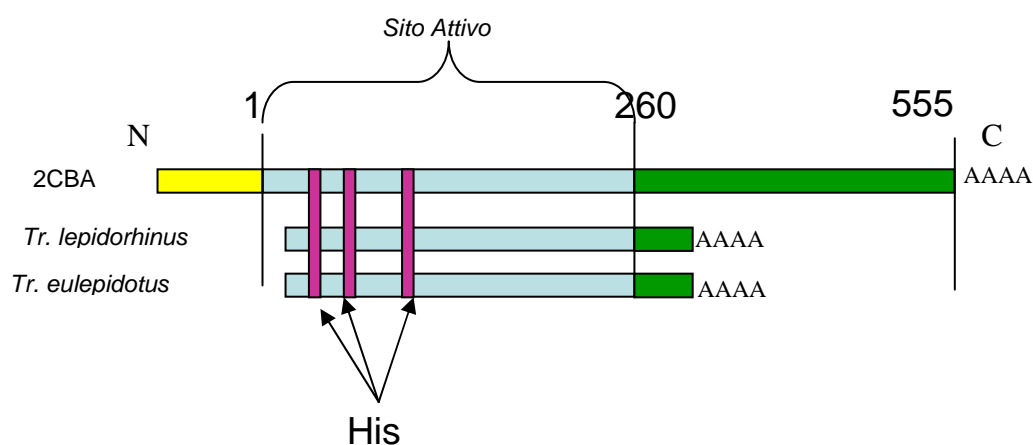


Figura 4.2: Rappresentazione dei frammenti sequenziati a confronto con una sequenza nota, la CAII umana. Entrambe le specie mancano di 30 amminoacidi in 5'. Mentre il sito attivo è stato quasi interamente sequenziato (mancano 11 aa in 5'). In verde sono riportate le estremità 3' esterne al sito attivo (colorato in azzurro), mentre in giallo l'estremità 5'. In magenta sono evidenziate le tre Istidine.

5. Allegati

Sequenze di Anidraasi Carbonica utilizzate sia per gli allineamenti che per l'analisi filogenetica.

>**VII** *Homo sapiens* CAVII |28192445|gb|AAL78167.1

```
MTGHHGWYQDDGPSHWHKLYPIAQGDRQSPINIISSQAVYSPSLQPLELSYEACMSLSITNNGHSVQVDFNDSDDRTVVV  
GGPLEGYPYRLKQFHFHWGKHDVGESEHTVDGKSFPSSEHLVHWNNAKKYSTFGEAASAPDGLAVVGVFLETGDEHPSMNR  
LDALYMVRFKGTAKAFSCFNPKLLPASRHYWYTPGSLTTPPLESVTWIVLREPICISERQMGKFRSLLFTESEDDER  
IHMVNNFRPPQPLKGRVVKASFRA
```

>**CAIcitopla** *Homo sapiens* CAI gi|29600|emb|CAA28663.1

```
MASEPDWGYDDKNGPEQWSKLYPIANGNNQSPVDIKTSEKHDTSKLPISVSYNPATAKEIINVGHSHFVNFEDNDRSVL  
GGPFDSDSYRLQFHFHWGSTNEHGSEHTVDGKYSAEHLVAHWNNAKYSLSLAEAAASKADGLAVIGVLMKVG  
EANPKLQKVLDA LQAIKTKGKRAPFTNFDPSTLLPSSLDWYTPGSLTTHPLYESVWIIICKESISVSSEQLAQFR  
SLLSNVEGDNAVPMQHNNRPTQPLKGRVTRASF
```

>**CAII** *Homo sapiens* 2CBA

```
SHHWYGGKHNPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKLPSVSYDQATSLRIILNNGHAFNVEFDDSDKAVL  
KGGP LDGTYRLIQFHFHWGSLDGQSEHTVDKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGI  
FLKVGSAKPLQKVVLDLS IKTKGKSADFTNFDPGRLLPESLDYWYTPGSLTTPPLLEC  
VTVIVLKEPISVSSSEQVLKFRKLNFNNGEPEELMVDNWRPA QPLKNRQIKASFK
```

>**Cypcal** *Cyprinus carpio* DQ157850.1 AAZ83743.1

```
ATGTCTCACGCTTGGGGTTATGGAACACAAAGACGGGCCAGAAACGTGGGCAGAAAGCTTCCCGTTG  
CCAACCGGACCCAGGCAGTCTCCATTCCAAAGTGGATTCACTGATGACGACAACAGCTCAACTCTGGCTGGAGGT  
CCCGTGACGGGGATATACAGGTTGAGACAGTTCATTCCACTGGGGAAGCAGTGATGACAAGGGCTCAGAGC  
ACACTGTTG CTGGAACCAAGTTCCCTTGTGAGCTTCATCTCGTTCCTGGAACACCAAGTACCCAAACTTTGG  
GGAAGCTGCCAGTAAGCC TGATGGCCTTGCTGTGGTTGGAGTTTTTCTAAAGATTGGTTCTGCAAT  
CCAAGACTTCAGAAAGTTTTAGATGCTCTTGAT GACATCAGATCAAAGGGCAGACAGACTACATTTAGCA  
ACTTTGATCCTAAGACCTTGCTGCCCGCCGCTCTGGATTCTTGGA CTTACGAGGGGTCTCTGACCACAC  
CTCCTCTCTGGAGAGTGTACCTGGATCGTTCTGAAAGACCCAGTCAGTGTAGTCC TGCTCAGATGGCT  
AAATTTCCGACGCTGCTGTTTCATCTGAAGGAGAGGCACCTTCTGATGCTGTTGACA  
ACTTCAGACCCCTCAACCTCTCAAGGGACGTAAGTCCGCTGCATCCTTCAAG
```

>**DarreCA1** *Danio rerio* BC065611.1 AAH65611.1

```
ATGCCCCACGCTTGGGGATATGGACCAGCTGACGGGCCAGAGAGTTGGGCAGAAAGCTTCCCTATTG  
CAAATGGACCCAGGCAGTCTCCATTCCAAAGTGGACTTCGTTGATGACGACAACAGCTCAACTCTGGCTGGAGGT  
CCCATCAGAGGGATATACAGGTTGAGACAGTTCATTCCACTGGGGAAGCAGTGATGACAAGGGATCCGAGC  
ACACTATTG CTGGAACCAAGTTCCCTTGTGAGCTTCACCTGTTCACTGGAACACAAAGTACCCAAACTTTGG  
GGAAGCTGCCAGTAAGCC TGATGGCCTTGCTGTGGTTGGAGTTTTTCTAAGATCGGCGCTGCAAAAT  
CCAAGACTTCAGAAAGTTCTAGATGCCCTTGAT GACATCAAATCAAAGGGCAGACAGACTACATTTGCA  
ACTTTGATCCTAAAACCTTGCTGCCTGCCTCTCTGGACTACTGGA CTTATGAGGGGTCTCTGACCACCC  
CTCCTCTGCTGGAGAGTGTACCTGGATTGTTTTGAAAGGACCGATCAGTGTAGTCC TGCTCAGATGGCT  
AAATTTCCGACGCTGCTGTTTCATCTGAAGGAGAAACACCTTGCTGATGCTGTTGACA  
ACTTACAGACCCCTCAACCTCTCAAGGGACGTAAGTCCGCTGCATCCTTCAAG
```

>**Danre5** *Danio rerio* BC057412.1 AAH57412.1

```
ATGGCTGACCCTGGGGATACGATAAGCATAACGGCCAGACAAATGGGGTGGAGTTACCCGATAGCGAACGGCTCTCGCC  
AGTCTCCAAATAGACATTAAGAGCTCAACAACAACCTATGATGAAAAGCTGACTCCTCTGAAACTGAAGTATGACCCG  
TCCAC ATCTCTGGACATCCAGAACAATGGACACTCTTTCCAAAGTGTCTTCGTTGATGATCAAAAACAGCTCA  
AACTCTGACTGGAGGC CCGGTACAGGCACATTGACACTCAAACAGTTTCACTTCCACTGGGGATCTGCAGACG  
ACAAGGGCTCCGAACACACGGTCA ATGGCAAATGTTTACCCAGCCGAGCTCCATCTGGTCCACTGGAACACT  
AAATATCCAGTTTAAAGGACCGAGTTGATAAGCC TGATGGTCTTGCTGTGGTTGGGATTTTTCTGAAGATT  
GGTGCAGACAACCTAAACTCCAGAAAATTTGGATGCTATGGAT GCTATCAAGTCCAAAGGAAAGCAAAAC  
CCCTTCCAAACTTTGACCCAAAGTGTGTTGCTGCCAGTTCTCTGGACTACTGGA CATACTGGGCTCTCTG  
ACCACACCACCTGCTGGAGAGCGTACCTGGATCGTCTGCAAAACAGTCCATCAGCGTCAGCTC TGCA  
CAGATGAAAAGATTTGCTCTCTGCTTTTTCTCCGTTGAGAGAAAAGGCCTGCTGTATGGTGAACA  
ACTATCGTCTCCTCAGCCACTGAAGGGTCTGTGGTGCATCTTTTAA
```

5. Allegati

>**DANRE6** *Danio rerio* BC059693.1 AAH59693.1

```
ATGACTGGCCATCACTGGGGATACGGAGAGGACAAACGGTCCATCGGCATGGCACAAAGATTATCCCATAGCTGAGGGGAATC
GCCAGTCACCGATTGATATAGTCCCTTCAGAAGCTGTGTTTGTATGGCCAAACTGTCTCCAATCTCACTGTCTTACAACAACCTG
CACCTCTCTCAGCATATCTAACAATGGCCATTCAGTGGTGGTGGAGTTTGTGACACCGATGAGAGATCAGTGATTACAGGA
GGTCTCTGAAAAATATGTACAGGCTTAAACAGTTTCACTTCCACTGGGGAAAGCAAGGGTGTCTGTGGCTCCGAACATACAG
TTGCTGAAAAAACCTTGTGTTCTGAGCTTCACTGGTTCACCTGGAATGCCAATAAGTACAAGTCTTTAGTGAGGCTGCAGC
TGCCCTGTATGGCTTGGCGGTGCTTGGCATCTTTCTGGAAACCGGTGATGAGCACAGAGCTTTCATCAAATAACAGATGCC
TTGTATATGTTAGATTCAAGGGCAGCCTTGTGTAATTTAAGGGCTTTAACCCCTAAGTGCCTCCTGCCAAACAGTCTTGAGT
ACTGGACATACCCGGGCTCTCTCACCCTCTCTCTGTATGAGAGCGTCACTGGATTGTGCTGAAAGAGCCTATTTATGT
GTCAGAGAAACAGATGGGAAAGTTTCGCACGCTTCTGTTTAAACGGTGAGGAGGAAGAAGACCGAAATCGAATGGAGAACAAC
TACAGACCACCACAACCACTGAAAGGCAGGATGGTGGCAGCCTCTTTTAA
```

>**Dicla** *Dicentrarchus labrax* AJ854106.1 CAH69488.1

```
ATGAACTGGCTTGTAGCTGCGCTTGTGTGTGCGTCTAGTGCCAGCGCAAACCTGTGCTTCACTCAGTCCGCTGGTGTGTT
ATCATCAGCCAAAGCTGCAATGACACTACCTGGCCAACCATCGCTGCTAAGTATTGCAATGGCACCCGACAGTCTCCCATTTAA
CATCGTCTCAGCATCTGCGGAACCTAACGCCAACCTGACTGAATTCACCTTTCAGAACTACGGGCACACCTCCATCTTGAAA
AAGATCTTAAACACTGGCAAGACAGTNCAGTCACTTGGGCAGTGGCGTTAGCATTTTCAGGGGGAGATCTGTCTGAGGCAT
ATGACAGCCTGCAGTTCACCTTGCCTGGGTTAAAGGCTCCTCCATCCCGGCTCCGATGGAAAGCGCTATCCCATGGAGTT
ACACATTGTAACAGCAAGTCAACCTTTAATGGGAACACAACTTAGCTGTAAAGACTCTACAGGACTTGTGCTCTTGGT
TTCTTTATTGAGGAAACGTCAGGCAATGAAACTCAGCAACCTGCAAGCTGGAAACACTTTGACCTCTACCTGGCCAAACATCA
CAAACAGTGTGACTCTGTTTCAATGACCTGGAATTTCAATGGATGACCTCTGGTGGGGTGGATCGTACCAAAATATTA
CCGCTATCTTGGTTCCTTGACCACCCCAATGCAAGAGCGTGTGGTTTGGACTGTGTTCAAGGATTCGATCAAAGTCAAG
AAAGATTGATTGACTCTTCAAGCACAACAGTACAGTCTCAACACCTCGTCACTTTGATGACCAATGTCTTCAGAAACG
TCCAGCTCAGCAACCACTGCAACACAGGCTGCCAGCAGTAGCGCTACCTCCAAAACCTGTTACTCTCTGGGGTTGATGGC
ACTGAGCCTGGCTCTGGGGAGGAGT
```

>**Gallusgall** *Gallus gallus* CAII |1334630|emb|CAA31175.1

```
SHNGPAHWHEHPPIANGERQSPIAISTKAARYDPALPKPLSFSYDAGTAKAIVNNGHSFNVEFDDSSDKSVLQGGALDGVYRL
VQFHIHWGSCGEGQSEHTVDGVKYDAELHI VHWNVKYGKFAEALKHPDGLAVVGI FMKVGNAPKEIQKVVDALNSIQTKGKQ
ASFNTFDPTGLLPDCRDYWTYPGSLTTPPLHECVIWHVLKEPITVSSSEQMCKLRGLCFSAENEPVCRMVDNWRPCQPVKSRE
VRASFQ
```

>**Homomembra** *Homo sapiens* Q9NXM9|Q9NXM9_HUMAN CDNA FLJ20151 fis, clone COL08412

```
MTKQHELGLLALVQNCQSEMNIKDSRAVGLSVKRLCISFVDFCERTERPLYLAQGLFMKRETYWEVQDSGISPLLLLLLST
ALDCSPEAETRQSPGGRKMLQEP TLSMSLQILTGFLWVQLWNWETFLRIRTHSTDASCP
```

>**Laevis** *Xenopus laevis* gi|32450213|gb|AAH54242.1| MGC64443 protein

```
MMKCFSLTLLVLSLFIKNSAAAAAAEGHWCYEIQACQDPGCGPRFWNNANTFCGEKEQSPINILTKKAVFMESLKEFDLKS
YGVSIQRLNVTNNGHSAQVDLPPGIEISGGGLSGTYDAIQFHFHWGSEEFPGSEHTIDGKYPMELHIVHRRKTAKADTGGT
GSRDLAVLGFYFYEETSTNNNDYEP LINSLEAIRTKGAVKNFSANLTKLIPDKEELKVYYRYNGSLTTPPCNETVTWTLFNTT
IKLSQQQLRAFYNLSLNFTE NQRMVENFRPVQRLGDRTVYI SSSQAILSSFRSLFICFIVSLLTIMS
```

>**Leposery** *Lepisosteus osseus* AY125007.1 AAM94169.1

```
ATGTCTCACTCATGGGATATGCACTAACAACCGACAGACAAATGGCATGAGAAATTTCCAATTGCTCAAGGACCCAGGC
AGTCTCCATTTGACATTTGTGCCCTCCAGGCACAGCAGCAGCCAGATTTGAAGCCACTCCGTATCGTTTATGATCCCAGCAC
ATCCAAAGGGATTTGAACAATGGACATTTCTTCCAAGTTGACTTTGCGGATGAAAACGACAGCTCGACACTGCAAGGAGGA
CCAATTTCCGGCGTTTACAGGCTGCGTCACTTCCACTTCCATTGGGGTGTAGCGATGAAAGAGGATCAGAGCACACTGTGG
GGGAGTGAAGTATGCACTGAGCTTCACTGTTTCACTGGAATGCTGGGAAATACGCGAGCTTTGGAGATGCTGCAAGGC
ACCAGATGGGTTGGCTGTTGTCGGCGTTTTCTCAAGATTGGCGCCGAGTCTTAACCTGCAGAAGGTCCTCGATGCCCTT
GATCGGATTAAGACAAAGGAAAGCAAACCTCTTTCCCAATTCGACCCCAAGATTCTACTTCTTCTCTCTGGACTTCT
GGACATATGAGGGTCTCTGACAACCCACCCCTGCTGGAGAGTGTACCTGGATCGTCTCAAAGAGCCCATCACTGTCTCAG
CTCAGAACAGATGGCGAAATTCGCGAGTCTCTGTTACCCGACAGGGCGAGACCCTTGTGTCATGGTGGACAACCTACCCG
CCACCCAGCCCTCAAGGGAAGGAAGGTCGAGCCTCTCTCAA
```

>**Oncmyery** *Oncorhynchus mykiss* NM_001124221.1 NP_001117693.1

```
ATGTCTCACAGCTGGGATATGGACCATCTGATGGACCTGAGAAGTGGTGTGATGGCTTTCTGTTGCTAATGGACCCAGGC
AGTCTCTATTGATATTTCTGGTCAAACCTCCTATGATTCTACCTTGAAGCCCTCAAACCTGAAATATGACCCATCCAA
CTCCACAGACATTTGAACAATGGCCATTTCTTCCAAGTTGGCTTTGTGGATGATGTTGACAGTTCAACACTGACCCGAGGC
CCCATCACTGGCATATACAGGCTAAAGCAGTTCACCTTCCACTGGGGCGCCAGTGACGACAGGGGCTCTGAGCACACCGTCA
ATGGAATCAAGTTCCTCTGTGAGCTCCATCTGGTGCCTGGAACCAAGTACCTTAGCTTTGGTGGGCGCTAGTGAACC
CGATGGACTCGTGTGGTGGAGTGTCTTGAAGATTGGTGTGCAAAACCCAGACTGCAGAAGGTTCTCGATGCTCTGGGG
GCCATCAAATCAAAGGAAAGCAAACCTACATTTTCCAAGTTGATGCCAAAACCTGTTGCTTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CATATGATGGCTCCCTGACCACTCCCTCTGCTGGAGAGTGTACCTGGATCGTCTGAAAGAACCCGATCAGTGTCTGAGCC
TACCCAGATGGGTAATTCGCGAGCTTAATGTTTCAAGTGGTGGATGGAGAGGACCTTGTGTCATGACAGGACAACCTACCCG
CCTCAGCCTCTCAAGGGACGCAAGTCCGCGGCTCTTCAA
```

>**Oncmy2** *Oncorhynchus mykiss* AY514870.1 AAR99329.1

ATGTCTCATGCATGGGGATACGCACCGGACAATGGACCCGACAAATGGTGTGAAGGCTTCCCAATTGCCAACGGACCCCGCC
AGTCTCCCATTTGACATCGTACCTGGGGAGGCTGCCTTCGACGCAGCCTTGAAGGCGCTCACTTTGAAGTACGACCCCTCCAC
CTCCATTGACATTTCTCAACAACGGACATTCCTTTCAAGTGACCTACACCAGCACAACGACAACCTCAACTCTGACAGGGGGG
CCCATTTCAGGGACGTACAGGCTAAAGCAGTTCCACTTCCACTGGGGCGCCAGCGACGACAGGGGTTCTGAGCATAACCGTGG
CCGGACCAAGTATGCTGCCGAGCTCCACCTGGTACACTGGAACACCAAGTACCCAGCTTTGGTGATGCTGCTAGCAAGTC
TGATGGCCTTGCTGTTGTAGGAGTCTTCTCCAGGTTGGAATGAAATGCCAATCTTTCAGAAGGTCCTTGATGCTTTTGAT
GCCATTAAGCCAAAGGGCAAGCAGACCTCTTCGAGAATTTTGACCCCAACCATCTGCTCCCAAGTCCCTAGACTACTGGA
CTTACGACGGCTCCCTGACCACACCTCTCTGCTGGAGAGTGTCACTGGATCGTCTGCAAGGAGTCAATCAGCGTCAGCC
TGCCAGATGGGCAAATTCGGAGCCTGCTTTTCTGAGAGGGCGAGCCGCTGCTGCATGTTGGACAACCTACCGCCCC
CCTCAGCCCTCAAGGGCCGCTGTGCTGCATCCTTCAA

>**Oncmy3** *Oncorhynchus mykiss* AB117756.2 BAD36835.2

ATGTCTCATGCATGGGGATACGCACCGGACAATGGACCCGACAAATGGTGTGAAGGCTTCCCAATTGCCAACGGACCCCGCC
AGTCTCCCATTTGACATCGTACCTGGGGAGGCTGCCTTCGACGCAGCCTTGAAGGCGCTCACTTTGAAGTACGACCCCTCCAC
CTCCATTGACATTTCTCAACAACGGACATTCCTTTCAAGTGACCTACACCAGCACAACGACAACCTCAACTCTGACAGGGGGG
CCCATTTCAGGGACGTACAGGCTAAAGCAGTTCCACTTCCACTGGGGCGCCAGCGACGACAGGGGTTCTGAGCATAACCGTGG
CCGGACCAAGTATGCTGCCGAGCTCCACCTGGTACACTGGAACACCAAGTACCCAGCTTTGGTGATGCTGCTAGCAAGTC
TGATGGCCTTGCTGTTGTAGGAGTCTTCTCCAGGTTGGAATGAAATGCCAATCTTTCAGAAGGTCCTTGATGCTTTTGAT
GCCATTAAGCCAAAGGGCAAGCAGACCTCTTCGAGAATTTTGACCCCAACCATCTGCTCCCAAGTCCCTAGACTACTGGA
CTTACGACGGCTCCCTGACCACACCTCTCTGCTGGAGAGTGTCACTGGATCGTCTGCAAGGAGTCAATCAGCGTCAGCC
TGCCAGATGGGCAAATTCGGAGCCTGCTTTTCTGAGAGGGCGAGCCGCTGCTGCATGTTGGACAACCTACCGCCCC
CCTCAGCCCTCAAGGGCCGCTATCACAGCTAGGTCC

>**Oncmy4** *Oncorhynchus mykiss* NM_001124487.1 NP_001117959.1

ATGCATTTATTTATTTCTTTTCTTCGCCATCATTGTGAAGATTCAAGGGCAGATTGGTGCTACCAGTCCAGGTTACAT
GTGGTGGCAACTGCATAGGACCTGATGGTTGGCCAACGGTTGCTGGGGCTTGTGGCGGAAAGCCAGTCCCCATTAACAT
TGTGACAAGAAGAACTCTACCAGATGAACGCCTTACACCATTACATTTACTGGGTACCAAGAGGCCTTCCACAGTCTCATC
ACAAACAATGGTCCGACTGTTCAAGTGGACCTGCCTGCCACAGCAAAAGTACATGGTGGAGATCTGGCTGTGCCATACAAGG
CAATACAGCTCCACCTGCCTTGGCAAGGATGGTGGCCCTGGATCCGAACACACCATCGATGGAGAACGATATCCCATGGA
GCTGCATATAGTAAATATAAAAAAGAGTACAACCTCTTTGGATGAAGCTCTGAAAGACCTTGCAGGGGTTGGAGTTCTGGGA
TTCTTTACGCTCTGGATTCTTTTACGAGCAATCAGGAAGCTCCAACAAAAAATACGAATCCATCATAAATGCTCTGAACTCAA
TCAATATGCCAGTCCCAACACTACCCTGAGTGTGTTGCTCCCTGGACATGTTTCAATCCCTCTCAGAGTAAATGACCAGCTA
CTTCCGCTACCAGGGCTCTCTTACCACACCTCCCTGTGAAGAAGCTGTAGTTTGGACCGTGTTCAAAAATACCATTCTCTC
AGCAGGCAACAGCTTGATGCATTTCTCGCTTCAGTTTGTGATGGAAAGCCTATGGTGGGAACCTATCGCCAGTCCAGC
CGTTGAATGGTCCGCCGTGATCGCTCTGGAAGTCAAGTTATCTTAGTCAGCACTTTGCCACTCTCTTAC

>**Oncmy6** *Oncorhynchus mykiss* AY860422.1 AAW55642.1

ATGGCAGACAGTGTGATTGAGGAGTCAGACTACTACCCTGGGAAGGATGAATTGGACTGGGGATATCAAGGAGGTGTAGAGT
GGGGTTTGTGTTCCCTGATGCCAATGGGGAGTACCAGTCAACCTGAACTCCCGGGAGGCGGTTATGACCCCTTT
GCTCCTGGACGAGGGGCTAACACCCAACCTACGTTGTGTGTCGGGACTGTGAGGTATCAACGATGGACACACCCGTACGCATC
ATGCTGAGGTCCAAATCAGTGGTAACTGGTGGACCGTTGCAAAATGATCATGAGTACGAGCTGCATGAGGTGCGCTTCCACT
GGGGCAAAGAGAACCAGCGGGGCTCAGAACACACAGTCAACTTTAAGGCCTTCCCATGGAGCTCCATCTGATCCACTGGAA
CACAACCTTGTTCAGCAGTGTGGAGGAAGCCCTGGGTAAGACGAACGGAGTTCTCATCATCGCTCTGTTTGTGCAGATAGGG
AAGGAGCATCTGGGGTTGAAGGCATAACAGAAGTGTGTGACGACCTACAATACAAGGGCAAGACCAAGATCATACCGTGTG
TCAATCCCAACACATTACTTCTGACCCTCTCCTGAGAGACTACTGGGTGTATGAGGGCTCCCTGACCACCCCTCCATGTAG
TGAGAGCGTACCTGGATCCTGTACCGCTACCCACTCACATCTCACAGTTACAGATAGAGGAGTTGAGGAGGCTCAGGTCC
CATCTGAAAGGTGCTGATCTACCTGAGGGGAACGACGGGATGTTGGGAGACAACCTCCGCCCTCTCAGCCCTCAGCGACA
GAACCGTCCGGGCTGCCTTCCAG

>**Oremol** *Oreochromis mossambicus* AY322477.1 AAQ89896.1

ATGTCTTGGGGATACAAAGCAAACAATGGACCTCAGAAATGGGTTGAAAATTTCCCTATTGCCGATGGAGTCCGTCAGTCTC
CCATTGACATCGTACCGGGCAAGCATCATAACGACCGGGGCTGAAGCCGCTCAACCTGAAGTACGACCCCTCCACCTGCCT
CGATATTTCTCAACAACGGGCATTCCTGCAAGTACCTTCGCGGACGACACCCGACAGCTCACGTTTAAACGGATGGACCAATC
TCAGGGTTATACAGACTCAAGCAGTTTCAATTTCCACTGGGGAGCTTCTGATGACAAGGGCTCTGAACATACTGTGGCTGGGA
CCAAATATCCCGCTGAGCTTCATCTGGTGCATTGGAACACCAAAATATGCAAGTTTCAGCGAGGCTGCTAGCAAGCCGATGG
ACTCGCTGTGGTTGGAGTTTCTTGAAGATTGGTGGTGAATACTCAATCTCCAGAAGCTTCTCAAGGCCTTTGACACCATC
AAGTCCAAAGGCAAGCAGACCTCTTTTGCAAATTTGACCCCTCTACTTTGCTCCCTGGTTGCGCTAGACTACTGGACTTATG
ATGGCTCTCTCACACACCCCTCTGTATGAGAGCGTTACCTGGATTGTCTGCAAAGAACAATCACTGCCAGCTCTGCACA
GATGGCCAAATTCGACCCCTGCTTCTCCGCTGATGGGGCGGCTCCGACTGCATGGTGAACAACTACCGCCACCCCGAG
CCTGAAAGGTCGACCCGCTCCGTGCTTCTTCAAG

>**Petmal** *Petromyzon marinus* DQ157849.1 AAZ83742.1

5. Allegati

ATGTCCGGACATCACTGGGGGTATGGCGAGGAGAACGGCCCCGCCGAGTGGCACAAGGACTTCCAGATCGCCAAAGGGGAGC
GGCAGTCGCCCATCGACATCCAGCCGGGCGAGGCGAGCTACGATGCCACCCCTGAAGCCCCCTCGGTGATCTACGACCCCGC
GTCTGCCCTCAGCATGGGCAACAACGGCCACTCCTTCTCCGTGGAGTACGACGACTCCGGCGAGAAGTGCCTGTTGAGTGGG
GGGCCCTGCCAACCCGTACAAGCTGAAGCAGTTCACCTTCCACTGGGGGGCTGCGGACGGCAGTGGCTCTGAGCACCCG
TGGCCGGCAAGACGTAATCCGCTGAGCTGCACCTCGTCCACTGGAACCTCGGCCAAGTACAAGAGCTTCGCGGAGGGCGCCAA
CAAGAGCGATGGCCTCGCGTTCCTGGGCGTCTTCTCGAGGCTGGTGGGAGAACCCTGGTCTGAAAAAGGTACGGACACT
CTGAACATCATCAGGAGCAAGGGAGCCAAAGTGGACTTCTCGACTATGACCCCTCGGTTCTCCTGCCAAAGTCACTGGACT
TCTGGACCTACCTGGGCTCGCTCACGACCCCGCGCTCTTTCGAGAGCGTCACTGGATCGTGTTCAGGAGCCGATCCCCGC
CAGCAAGGAGCAGTGGCGCGCTTCCGCGAGCTGCTTTCACGTGCGAGGGGACAGCGAGAAGTGCATGGTGGACAACCTAC
CGTCCGCCACAGCCCTGGGCGGACGCACGGTGGCGCCCTCCTCCAG

>**Platf11** *Platichthys flesus* AF093622.1 AAC64172.1

ATGTTTGGGGATACGCAGCAGACAACGGACCCGACAAATGGGCTGATAACTTCCAGTGGCCAATGGCCCCGCCAGTCTC
CCATTGACATCTTACTGGGGACGCGTCTTTCGACGCGAGCGTGAAGCCGCTCAGCCTGAAGTACGACCCCTCCAAGTGCAG
GAGCATTCTCAACAACGGACATTCCTTCCAGGTGACCTTCATAGATGACACCGACAGCTCAACTCTGAAAGATGGGCGGATC
TCAGGCGTCTACAGGCTCAAGCAGTTTCATTTCCACTGGGGAGCTTGTGATGAGAAGGGCTCCGAGCACACAGTGGCCGGGA
ACATGTGTATCTGCGGAGCTCCATCTCGTGCACCTGGAACACCAAATACCGAGCTTCGGAGAAGCCGCTAGCAAACCTGAC
GGACTCGCCGTTGTGCGAGTTTCTCCTCAAATTTGGGGCTGAAAACGCCAACCTCCAGAAGGTTCTTGACGCCTTCAGTTCCA
TCAAGGCCAAAGGCAAGCAGACACCTTCCGCTGGGCTTCGACCCCGCAGCTGCTCCCCGGGTGCTGAAAGATGGGCGGAT
AGAAGGCTCCCGGACCACTCCCCCTCTGCTGGAGAGCGTCACTGGATTGCTGCAAGGGAGCCAATCAGCGTCAGCCCGA
GCAGATGGCCAAATTCGCGAGCCTGCTTCTTCCGCTGAGGGTGAGGCAGAAATGCTGCATGGTGGACAATAACCGTCTCC
CAACCGCTCAAGGGTCCGCTGTCCGTGCTTCTTCAAG

>**Pseam1** *Pseudopleuronectes americanus* AY836578.1 AAV97962.1

ATGTTTGGGGATACGCAGCAGACAACGGACCCGACAAATGGGCTGATAACTTCCAGTGGCCAATGGCCCCGCCAGTCTC
CCATTGACATCTTACTGGGGAAAGCGTCTTTCGACGCGAGCGTGAAGCCGCTCAGCCTGAAGTACGACCCCTCCAAGTGCCT
GGAGATCTCAACAACGGACATTCCTTCCAGGTGACCTTCGTAGATGACACCGACAGCTCAACTCTGAAAGATGGGCGGATC
TCAGGCGTCTACAGGCTCAAGCAGTTTCATTTCCACTGGGGAGCTTGTGATGAGAGGGGCTCCGAGCACACAGTGGCCGGGA
CCATGTATCTGCCGAGCTGCATCTCGTGCACCTGGAACACCAAATACCGAGCTTCGGTGCAGCCGCTAGCAAACCTGATGG
CCTCGCCGTGCTCGGAGTTTCTCAAATTTGGGGCTGAAAACGCCAACCTCCAGAAGGTTCTTGACGCCTTCAGTTCCATC
CAGGCCAAAGGCAAGCAGACACCTTCCGCTGGGCTTCGACCCCGCAGCCTGCTCCCCGGTTGCTGGACTACTGGACGTACG
ACGGTCTCTGACCACTCCCCCTCTGCTGGAGAGCGTCACTGGATTGCTGCAAGGGAGCCAATCAGCATCAGCCCGAGCA
GATGGCCAAATTCGCGAGCCTGCTTCTTCCGCTGAGGGTGAGGCCGAGTGTGCATGGTGGACAATAACCGTCTCCCCAG
CCGCTCAAGGGTCCGACTGTCCGTGCTTCTTCAAG

>**Squac4** *Squalus acanthias* DQ092628.1 AAZ03744.1

ATGCACTCACTTATTCTCTTGTCTCATCAGCCTGTGTTTGGCCCTTCTCTGTGCTTGGGAAAGGGTAAATGGTGTCTACGACATCC
AGGACGCCAGCTGTGGACCCAGCCACTGGAAAATTGATTATGAAAAGTTGTGGATACAAGAAGCAGTCCCCCATCAACATTGT
AACCAGGAATGCTCAGAGTAATGTTTCATTTGACTCCCATTTATATTTGAGGGCTATGATGATCTTGATACAGATGATAAATGG
ACTATAACAACAATGGTCACTCGGTCCAGGTAACATTAAGAGGAGACATCGCCATTAAGGGTGGAGATCTTCCAAATAGAT
ACAAGGCAGTTTCACTTACTATCACTGGGGAACAAGGTGGATCCTGGGTGAGAGCATAAATAGATGGGGAACAGTACCC
CATGGAGTTGCATATAGTCCACATGAATGAAAAATACAGTGAATAAACGATGCTGTAAGAAGATCCGGAAGTCTGGCTGTG
CTGGGATTTCATGTTTGTGTAATCACCTGAAGAGAATTCAAAAACCGAACCCCTGATCAATGCTCTGAAAACAGTTCCACAGC
CAGGTGACAGTAAACCGTTGGAACCTTCTACTGAAAGAAATGATTCAGACCAGGAAAGGCTTAAAAAATACTACCGCTA
TCATGGCTCATTAATACTCTCTGGGTGTTTGGAGGAGTAATCTGGACAGTATTTGAAGAACCCTTCTGCTCAGCAAGGGG
CAGCTCGACGATTTCTGAAACTCTTCTTACAATGCTCACAACAACAAGGCTTTAAACTTCAGGCTGTTCAAAAACGAA
ATGGTCTATAGTCTATGTTTCGGATTACGCTGTGACACCTTTTGTGCTGACAGTGTGCTGCTGCTACTTTCAGTCTGGTCT
ATCTATATTATTCAACT

>**Tetni1** *Tretraodon nigroviridis* CR692434.2

GGTGTAGAGTGGGGGCTTCTGTTCCCTCGGCCAACGGCGAGTACCAGTCTCCCATCAACCTGAACTCCAGGGAGGCGCCGCT
ACGACCCGGCGCTGCTGGACGTGGGCTGGCCCCAACTACTGGTGTGTCGGGACTGCGAGGTGCTCAACGACGGCCACAC
CGTCCGATCCTCCTCAGGTCAAAGTCAAGTGGTGGCCGGGGGCCCTGCCAGCGGTCAAGAGTACGAGTCCACGAGGTG
CGATTCCACTGGGGCAAGGAGAACCAGAGGGGATCAGAGCACACCGTCAACTTCAAGGCTTTCCCATGGAGTCTAAACCAG
TTTGTCCAGGGGGCCGACCAAGTGGCTCAACCACGGCTGTGGCTCCACTGATCCACTGGAACACCACTTCTCAGCACCT
TAGAAGACGCTCTGGGGCAGAAGAACGGGGTGTCTCATCATCGCCCTCTTTGTTTCAGATCGGGAAGGAGCATCTGGGTCTGAA
GGCCATCACCGAAGTCTGACGAGCTGACAGTACAAGGTGAGAGCGTGGTCTGAGGACCTCCACCAAAGATGGGCGCTA
TGCTAGCGGCAGAAATGAAAACCACTGGGTGTTTGTGTTTCCACAGGGGAAGAGCAAGATAATCCCTGCTTTAATCCCAA
CACTCTGTTACCCGATCCGCTGCTCAGGGACTACTGGGTGATGAGGGCTCCCTGACCAACGCCCCCTGTAGTGGAAAGGTG
ACCTGGATCTCTCCGCTACCTCTGACCATCTCCAGGTCCAGGTAAGAGCACACTCGGAGCCCTAACCCCTAACCTTTC
CCTCCATCAGTTCAGACACGACCACTCCTCTGTGCTCCAGATCGAAGAGTTTCAGAGGCTGCGGTCCACATCAAGGGGGC
GGAGTCTCTGGAAGGAAATGACGGGCTGCTGGGGGACAACCTCCGGCCCAACCCAGCCGCTCAGCGACCGGATGGTGGAGCA
GCTTCCAG

>**Tetni3** *Tretraodon nigroviridis* CR700052.2

ATGATAGCCAACAGCTGCGCTATCAGCTGCCAGCGAGCGGTTGGCTCATCCAGATGGGAGGCACCATGTACAACACGGGGA
AGCACGTGTCCCTGCGACCCGGACAAAGCCCACCTTGTGAACATCTCCGGCGGCCCGCTGGGCTACAGCTACAGGCTGGAGGA
GGTGCGCCTCCATTTGGAAGCGAGGACTCCAGGGTTCAGAGCACCTCTCAACGGACAGGGGTTTCCCGGAGAGGTCCAG
CTAATCCATTATAACCAGGATCTGTACGCCAACTACACCGAGGCGGCCAAGAGCCCCACGGCATCGCCGTGGTTTCCATCT
TCATCAAGCTCTCTGAGAACTCCAACCTTCTCAACCGTATGCTGAACAGAGACACCATCACCAGAATCAACAACAGACA
CGATGCTTTCTTATGATGGGCCCTGAACATAGCCGACCTTTACCCTGACACCACACGCTACATCACCTACGAGGGCTCCATC
ACCATCCCTCCGTGTACGAGACCTCCACTTGGATACTCATCAACAAACCTGTCTACGTGACACAGATGCAGATGCACCTCC
TGCGCCTCTCAGTCAGAATGAGCCCTACAAGATCTTCCCTGAGCATGAGCGACAACATCCGCCCCGCTCAGCCTCTGCTGCA
GCGTGCATCCGGACCAACATCAACTTCAAGCAAGCAGGGCCGCAACTGTCCCAACACCGTGCCCTCCGCCACAGTACAGA
GCGCCAGAGAGACGCGCGGAGTGGAGAAGACGATTTTCACTGACAGAAACAACAGAGACTCACACAGCCTGCGGATTTCATC
GAACTGGGCGAACACTCAGCAAACTCTTGGAAAGTGTGCCGGCCTCTACATGCAAAGAATCGCTAA

>**Trihal** *Tribolodon hakonensis* AB055617.1 BAB83090.1

ATGTCTCACGGATGGGGATACGCGGACCATAACGGACCTCAGAAATGGTGTGAAAACTTCCCCATTGCTAATGGACCTCGCC
AGTCTCCAATAGACATTTCAAACCAAGGGAGCGTCTTATGATGATACTCTGAAGCCGCTGAAACTGAAGTATGACCCACCCAC
TTCACTGGACATCCTGAATAATGGACACTCTTTCCAAGTGACCTTCGCCGATGATAACGACAGCTCAATGCTGACAGAAGGC
CCGATCTCAGGGAATACAGACTCAAACAGTTCCACTTCCACTGGGGTGCCAGTGACGGCAAAGGCTCCGAGCACACAGTCG
ATGGGAAATGCTACCCAGCCGAGCTCCATCTGGTCCACTGGAACACAAAATATGCCAGCTTTGGGGAAGCAGCCAAATAAGCC
TGATGGTCTTGCTGTGGTGGGAGTATTCTGCAGATCGGTGAAGACAATCCTAAGCTTCAGAAGATTCTGGATGCTATGGAT
GCTATCAAGTCCAAGGGAAGCAGACCTCATTCAAAAATTTGACCCAACTGTCTGCTCCCGAAATCTCTGGAGTACTGGA
CGTACCCAGGGTCTCTGACCACCCCTCTGTACGAGAGCGTACATGGATTGTCTGCAAGCAGCCGATCAGCGTTAGCTC
TGAGCAGATGAAAAATTCGATCTCTGCTTTTACCGCAGAGGAAGAGAAGGCTTGTGCATGGTGAATAACTATCGTCCC
CCTCAACCTCTTAAAGATCGCAAAGTCTGTGCCTCTTTCAAG

>**Xeanopuslae** *Xenopus laevis* gi|27735418|gb|AAH41213.1| MGC52685 protein

MAHAWGYGPDNGPSTWHHAFPLANGEYQSPINIVPAEAKYDQHLKPI SIKYDPSTAKVILNNGHAFNVEFDDSENRSVLSGG
ALSEPYRLKQFHFHWGSCGEGHSEHTVNGVKCEAELHLVHWNTKYGSMAEAVKHCDGLAVVGVFLKVGAEHPGLQKVLDAK
LIPNKGNEAHFSDFDPSVLLPNSLDFWYKGLSTPPLLQCVLWHVLKEPIAVSKQQLSRLSLFFNAEGDTPCSMVDNFRP
AQPLKGRDVRASFQ

6. Bibliografia

Bargelloni, L., S. Marcato and T. Patarnello (1998). Antarctic fish hemoglobins: Evidence for adaptive evolution at subzero temperature. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**: 8670-8675.

Coleman, J.E. (1980). Current concepts of the mechanism of action of carbonic anhydrase. In *Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide*, (C. Bauer, G. Gros and H. Bartels, eds.), pp. 133-150. Springer-Verlag, New York.

Dutta, S. and D.S. Goodsell (2004). Carbonic Anhydrase. Molecola del Mese (<http://www.pianetachimica.it>) . Protein Data Bank.

Edsall, J.T. (1968). Carbon dioxide, carbonic acid and bicarbonate ion: Physical Properties and Kinetics of interconversion. In *CO₂: Chemical Biochemical and Physiological Aspects* (R.E. Forster, J.T. Edsall, A.B. Otis and F.J.W. Roughton, eds.), pp. 15-28. NASA SP #188, Washington, D.C.

Felsenstein, J. (2002) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3 (Univ. of Washington, Seattle)

Froese, R. and D. Pauly Editors. 2008.FishBase.World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (04/2008).

Helfman, G., B. Collette and D. Facey (1997). Special Habitats and Special Adaptation. In *The Diversity of Fishes*, pp.306-309. Blackwell Science, Inc.

Henry, R.P. and T.A. Heming (1998). Carbonic anhydrase and respiratory gas exchange. In *Fish Physiology Haemoglobin and Respiration*, vol.17 (ed.S.F. Perry and B.L. Tufts), pp 77-11. San Diego: Academic Press.

Henry, R.P., Y. Wang and C.M. Wood (1997). Carbonic anhydrase facilitates CO₂ and NH₃ transport across the sarcolemma of trout white muscle. *Amer. J. Physiol.*

Maffia, M., A. Rizzello, R. Acierno, M. Rollo, R. Chiloiro and C. Storelli (2001). Carbonic anhydrase activity in tissue of the icefish *Chionodraco hamatus* and of the red-blooded teleosts *Trematomus bernacchii* and *Anguilla anguilla*. *J. Exp. Biol.* **204**: 3983-3992.

Maren, T.H. (1967). Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.* **47**, 595-781.

Marino, S., K. Hayakawa, K. Hatada, M. Benfatto, A. Rizzello, M. Maffia and L. Bubacco (2001). Structural Features that Govern Enzymatic Activity in Carbonic Anhydrase from a low-Temperature Adapted Fish, *Chionodraco hamatus*. *Biophys. J.* **93**: 1-10.

Meldrum, N.U. and F.J.W. Roughton (1933). Carbonic anhydrase: Its preparation and properties. *J.Physiol. (London)* **80**, 113-142.

Randall, D., W. Burggren and K. French (2006). Scambi Gassosi e Bilancio Acido-Base. In *Fisiologia Animale: meccanismi e adattamenti*, Cap.13, pp.599-661. Zanichelli Editore S.p.A.

Sanyal, G., E.R. Swenson and T.H. Maren (1982a). The isolation of carbonic anhydrase from the muscle of *Squalus acanthias* and *Scomber scombrus* : Inhibition studies. Bull. Mt. Desert Isl. Biol. Lab. **24**, 66-68.

Sanyal, G., E.R. Swenson, N.I. Pessah and T.H. Maren (1982b). the carbon dioxide hydration activity of skeletal muscle carbonic anhydrase. Mol. Pharmacol. **22**, 211-220.

Wood, C.M., S.F. Perry, P.J. Walsh and S. Thomas (1994). HCO_3^- dehydration by the blood of an elasmobranch in the absence of a Haldane effect. Respir. Physiol. **98**, 319-337.