

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biotecnologie

Elaborato di Laurea

**Analisi dell'espressione genica di glutatione
reduttasi in fegato di *Trematomus eulepidotus*
esposti a rame e cadmio**

Tutor: Prof. Gianfranco Santovito

Dipartimento di Biologia

Laureando: Giovanni Di Lauro

Anno Accademico: anno 2011/2012

Ringrazio il professor Gianfranco Santovito per la sua disponibilità e chiarezza; la mia famiglia, mia nonna Marisa e Gianna per essere stati molto più che la mia mensa e aula studio.

Voglio dedicare questo lavoro a Beppe, Enrico, Nadir, Sophie: il totale che fa molto più della somma.

*“Le eresie che dobbiamo temere sono quelle
che possono confondersi con l’ortodossia”*

Louis Borges

Indice:

1. Introduzione	
1.1 Scopo dell’esperimento.....	1
1.2 I pesci antartici.....	1
1.3 L’enzima glutatione reduttasi e le ROS.....	2
2. Materiali e metodi	
2.1 Cenni esplicativi sui metodi	
2.1.1 Estrazione di RNA.....	3
2.1.2 Spettrofotometria ottica.....	3
2.1.3 Elettroforesi.....	4
2.1.4 Retrotrascrizione.....	4
2.1.5 Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	5
2.2 Campioni.....	5
2.3 Precauzioni preliminari all’esperimento.....	6
2.4 Estrazione dell’RNA totale da tessuti di fegato.....	6
2.5 Analisi quantitativa dell’RNA allo spettrofotometro.....	6
2.6 Analisi qualitativa dell’RNA con elettroforesi.....	7
2.7 Retrotrascrizione dell’mRNA in cDNA.....	7
2.8 Amplificazione del cDNA con la PCR <i>multiplex</i>	8
2.9 Elettroforesi e quantificazione dei prodotti di PCR.....	9
2.10 Analisi statistica dei dati.....	9
3. Risultati e discussione.....	10
4. Bibliografia.....	11

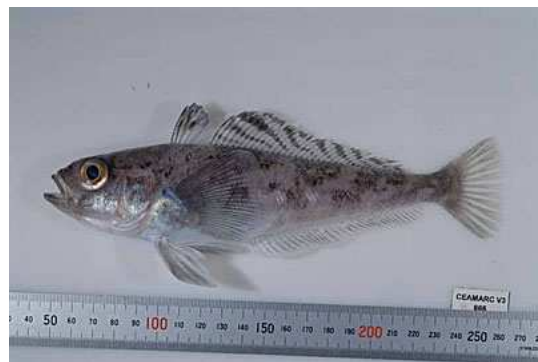
1. Introduzione

1.1 Scopo dell'esperimento

L'obiettivo di questo esperimento è di verificare se l'espressione genica della proteina glutatione reduttasi (GR) nel fegato del teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus* (Figura 1) varia in seguito all'esposizione a rame (Cu) e cadmio (Cd). I pesci antartici sono animali che si sono adattati ad alte concentrazioni di ossigeno disciolto nell'acqua, una conseguenza delle basse temperature. Queste condizioni favoriscono la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'accumulo di metalli nei tessuti provoca un ulteriore aumento della loro produzione, quindi l'ipotesi che si vuole verificare è se anche la risposta del sistema antiossidante sia altrettanto consistente. A questo scopo abbiamo estratto l'RNA, retrotrascritto in cDNA e con la PCR *multiplex* si è amplificata la sequenza che codifica per la GR. I prodotti di amplificazione, separati elettroforeticamente e quantificati mediante *Gel Doc* hanno fornito i livelli di espressione del messaggero per la GR.

1.2 I pesci antartici

Il raffreddamento progressivo del continente Antartico iniziato 65 milioni di anni fa portò a un profondo cambiamento dell'habitat, con la formazione di nicchie ecologiche per la fauna ittica. Negli ultimi 20–30 milioni di anni esse sono state in gran parte occupate da un *taxon* fortemente



endemico di Teleostei: il sott'ordine dei Nototenioidei (Eastman 2005).

Questi pesci vivono in acque le cui temperature variano stagionalmente tra i -2°C e i 4°C : sottoposti a tale pressione selettiva, hanno sviluppato soluzioni adattative uniche. Ne sono un esempio il basso metabolismo basale, la ridotta ossificazione e i depositi lipidici nei tessuti che migliorano l'idrostasi (non hanno la vescica natatoria), o l'emoglobina quasi assente che riduce la viscosità sanguigna. Questi organismi

hanno una temperatura interna pari a quella di equilibrio tra il ghiaccio e l'acqua di mare: -1.87°C . I ponti idrogeno stabiliti tra le glicoproteine anticongelanti di sequenza ripetuta $(-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Thr}-)_n$ e le molecole di H_2O circostanti ostacolano la crescita dei microcristalli di ghiaccio (Prisco et. al, 1998).

La solubilità dell'ossigeno nelle acque antartiche è di circa un quarto maggiore che alle medie latitudini. In acqua con salinità di $35 \text{ g NaCl/l H}_2\text{O}$, a 10°C sono disciolti $8,8 \text{ mg O}_2/\text{l H}_2\text{O}$ contro gli $11,2 \text{ mg O}_2/\text{l H}_2\text{O}$ disciolti a 0°C , in questo caso la differenza è del $27,27\%$ (The Engineering Toolbox, 2011).

A una maggiore solubilità di O_2 si accompagna una maggiore probabilità di produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)(Abele, Puntarulo, 2004).

1.3 L'enzima glutatione reduttasi e le ROS

Le ROS possono essere prodotte dal normale metabolismo cellulare: nel 2% dei casi il coenzima Q nella catena di trasporto degli elettroni riduce solo parzialmente l' O_2 , con formazione di H_2O_2 anziché H_2O (Vercesia et al., 1998). La produzione di ROS può essere favorita da fattori esogeni quali l'esposizione alle radiazioni UV o ai metalli; il rame in particolare tramite la reazione di Fenton produce il pericoloso radicale ossidrile (Rowley, Hallywell, 1983).

Le ROS hanno un elettrone spaiato e tendono a strapparne un altro alle molecole con le quali vengono a contatto, autopropagando la loro reattività. Se non eliminate possono danneggiare i lipidi di membrana, le proteine e gli acidi nucleici, conducendo ad una condizione irreversibile detta stress ossidativo (Breen, Murphy, 1995).

Un meccanismo cellulare per bloccare le ROS utilizza tripeptidi ubiquitari di glutatione ridotto (GSH) che ossidandosi dimerizzano:



L'enzima glutatione reduttasi (GR) catalizza la reazione di rigenerazione a forma ridotta del glutatione ossidato (GSSG) (Holley, 1995):



2. Materiali e metodi

2.1 Cenni esplicativi sui metodi

2.1.1 Estrazione di RNA

L'RNA è estratto col metodo fenolo acido e guanidina tiocianato. Il primo costituisce la fase organica, la seconda provoca la lisi cellulare. Successivamente si aggiunge cloroformio, che migliora la separazione in fasi. Dopo la centrifugazione si distinguono:

- ▷ la fase superiore acquosa, in cui è rimasto l'RNA
- ▷ l'interfase, in cui a causa del tampone acido (pH 5–6) si localizza il DNA
- ▷ la fase inferiore organica, in cui sono precipitati frammenti cellulari, lipidi e proteine

2.1.2 Spettrofotometria ottica

Nello spettrofotometro (Figura 2) un fascio di luce monocromatica di lunghezza d'onda λ attraversa il campione contenuto in una cuvetta. Il sensore quindi capta e misura la diminuzione d'intensità della luce, restituendo un valore di assorbanza (A).



Fig. 2: spettrofotometro.

La macchina si imposta su $\lambda = 260 \text{ nm}$, poiché a questa lunghezza d'onda vi è il picco di assorbimento degli acidi nucleici. L'assorbimento avviene perché nel vicino UV ($\lambda = 180\text{--}300 \text{ nm}$) accade che l'energia dei fotoni sia pari all'energia delle transizioni elettroniche. Esse avvengono tra gli orbitali molecolari π e il rispettivo stato eccitato π^* delle basi pirimidiniche e puriniche dell'RNA (Citosina e Uracile, Guanina e Adenina) (Mergny et al., 2005). Si usa la legge di Lambert Beer per correlare la concentrazione di un substrato (C) con l'A rilevata ad una data λ :

$$A_{\lambda} = C \cdot L \cdot \epsilon$$

Dato il cammino ottico della soluzione $L = 1 \text{ cm}$, il coefficiente di estinzione molare del substrato $\epsilon_{\text{RNA}} = 40$, considerando il fattore di diluizione (D) del campione si calcola così la C di RNA, che costituisce un indicatore della qualità di estrazione:

$$C [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot D \cdot 40$$

2.1.3 Elettroforesi

Nella vaschetta per elettroforesi (Figura 3) viene lasciata gelificare una soluzione di agar. Sul lato dei pozzetti dove sono caricati i campioni e all'estremità opposta vi sono due elettrodi. La differenza di potenziale applicata provoca la migrazione delle molecole cariche. A causa della resistenza opposta dalla matrice del gel le molecole migrano più lentamente tanto più è alto il loro peso molecolare. Al termine della corsa elettroforetica l'RNA risulta quindi separato in bande secondo il gradiente di lunghezza delle catene di acidi nucleici, proporzionale al peso molecolare (PM).

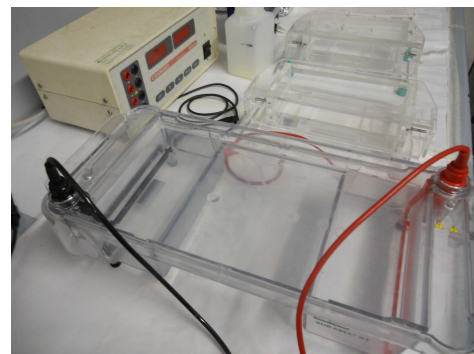


Fig. 3: vaschetta per elettroforesi e trasformatore di tensione.

2.1.4 Retrotrascrizione

La trascrittasi inversa è una DNA polimerasi RNA dipendente: può sintetizzare il DNA complementare ad una catena di RNA data, formando un doppio filamento ibrido RNA-DNA. L'enzima necessita di deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs), una catena di circa 20 residui di timina (oligo dT), una soluzione tampone e Mg^{2+} .

Usando un termociclatore si esegue un programma regolato di tempi e temperature:

- ▷ 25°C per 15 min; fase di appaiamento (*annealing*), la catena oligo dT si lega alla coda di poli(A) dell'mRNA innescando la reazione
- ▷ 42°C per 60 min; fase di allungamento, l'enzima sintetizza il nuovo filamento di cDNA aggiungendo un dNTP alla volta a partire dall'estremità 3'-OH libera dell'oligo dT appaiato
- ▷ 70°C per 15 min; degradazione dell'RNA, rimane il filamento singolo di cDNA

2.1.5 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR è uno strumento essenziale, consente infatti di replicare selettivamente una parte di DNA nelle quantità necessarie a qualsiasi altra applicazione della biologia molecolare.

La DNA polimerasi, a partire da un filamento di DNA, può sintetizzarne un secondo complementare. I *primer forward* e *reverse* permettono il *landing* della proteina, essi vengono disegnati in modo complementare all'estremità 5' della sequenza di interesse. L'enzima in presenza di pH *buffer* e Mg^{2+} polimerizza i dNTPs in direzione 5'→3', formando la doppia elica.

Viene usata la Taq polimerasi del batterio *Thermophilus aquaticus*, che grazie alla sua termostabilità permette di ripetere col termociclatore questo ciclo:

- Δ 95°C per 50 sec; fase di denaturazione, cioè separazione in filamenti singoli (ssDNA)
- Δ 57°C per 1 min; fase di *annealing*, in cui i primer si appaiano al DNA
- Δ 72°C per 1 min; fase di prolungamento, nella quale la polimerasi sintetizza il nuovo filamento (dsDNA)

Al termine di 30–40 cicli si effettua l'allungamento finale (72°C per 10 min), e si ottengono milioni di copie della sequenza di interesse.

2.2 Campioni

Gli esemplari della specie *Trematomus eulepidotus* utilizzati nell'esperimento sono stati catturati a Baia Terra Nova durante la XXI spedizione Italiana in Antartide.

Dopo essere stati stabulati a -2°C, sono stati divisi nei gruppi sperimentali seguenti:

Cd) trattamento con 10 µg/l di Cadmio (aggiunto come $CdCl_2$) per 13 giorni

Cu) trattamento con 10 µg/l di Rame (aggiunto come $CuCl_2$) per 10 giorni

ct) controllo (non trattati)

Gli animali sono stati sacrificati sul posto e dissezionati, gli organi congelati in azoto liquido a -80°C e inviati in Italia.

2.3 Precauzioni preliminari all'esperimento

L'RNA, rispetto al DNA, è un polimero relativamente instabile; per evitarne la degradazione sono necessarie attenzioni particolari. I campioni vanno tenuti in ghiaccio e le centrifughe iniziali avvengono a 5°C poiché le basse temperature evitano l'attivazione delle RNasi. Nelle soluzioni iniziali si usa H₂O *RNase-free*. Il materiale plastico *RNase-free* ha subito un trattamento con una soluzione al 0,1% di DiEtil PiroCarbonato (DEPC), un alchilante reattivo che inibisce le RNasi.

2.4 Estrazione dell'RNA totale da tessuti di fegato

In una eppendorf si pone 1 ml di *TRIzol*[®], una soluzione contenente guanidina isotiocianato, fenolo e un tampone acido. Si aggiungono circa 100 µg di tessuto di fegato congelato, si omogeneizza con un micropestello, dopo 8 min si aggiungono 200 µl di cloroformio. Si scuote per 15 secondi, si lascia in incubazione per 20 min e si centrifuga 20 min a 12000 x g. Quindi si preleva solo il surnatante senza toccare l'interfase, e si trasferisce in una nuova eppendorf.

Si aggiunge un volume di isopropanolo, si lascia per 30 min a -20°C, si centrifuga per 20 min a 12000 x g e si elimina il surnatante per inversione. Si aggiunge la soluzione di lavaggio (1 ml di etanolo 75% in H₂O DEPC), si stacca il *pellet* depositato con la percussione dell'indice sul fondo della eppendorf. Si centrifuga per 5 min a 12000 x g e si elimina il surnatante con una micropipetta senza intaccare il pellet. Si ripete l'operazione per un totale di tre lavaggi.

Successivamente si lascia ad asciugare sotto cappa a flusso laminare per circa 10 min. Si lascia risospendere l'RNA in H₂O *RNase-free* in quantità adeguata alla dimensione del *pellet* (50–100 µl) per 2 ore a temperatura ambiente o a 4°C *overnight*, si mette poi in incubazione in bagnetto termostatico a 55°C per 10 min, infine si pone in ghiaccio.

2.5 Analisi quantitativa dell'RNA allo spettrofotometro

Per ogni campione si prepara una soluzione con 10 µl di RNA diluiti in 490 µl di H₂O (D = 1:50).

Allo spettrofotometro si leggono le assorbanze a 260, 280 e 230 nm e per valutare la purezza dell'RNA si verificano i seguenti rapporti:

- ▷ $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$; se i valori sono superiori è presente una contaminazione da proteine, se inferiori da DNA.
- ▷ $A_{260}/A_{230} = 2,2$; valori inferiori indicano contaminazione da carboidrati o fenolo.

Si calcola quindi la concentrazione dell'RNA:

$$C = A_{260} \cdot D \cdot \epsilon_{\text{RNA}} = A_{260} \cdot 50 \cdot 40 \mu\text{g/ml}$$

2.6 Analisi qualitativa dell'RNA con elettroforesi

In un gel d'agarosio 1,5% preparato precentemente (con 50 ml di TAE1x, 0,75 g di agar e 4 μl di intercalante degli acidi nucleici *GelRed*) si caricano 1 μl di RNA totale, 2 μl di *loading dye*, 9 μl di H_2O *RNase-free*.

Al termine della corsa elettroforetica si visualizzano al transilluminatore due bande non nette, corrispondenti rispettivamente agli rRNA 28S e 18S (Figura 4). Gli mRNA non sono visibili, ma osservando che gli rRNA non sono degradati possiamo supporre che anche gli mRNA non lo siano.

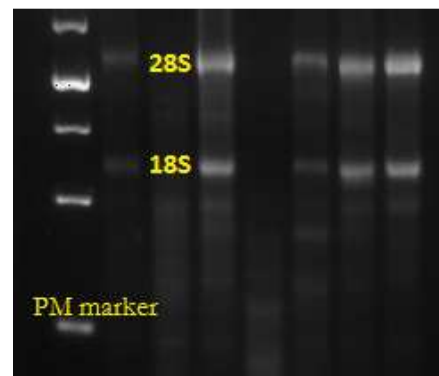


Fig. 4: gel di elettroforesi dell'RNA totale. Le bande rappresentano gli RNA ribosomiali, a sinistra la scala di misura di peso molecolare (*marker ladder*)

2.7 Retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA

Si pipetta un volume pari a 1 μg circa di RNA totale a cui si aggiungono 2 μl di primer Oligo dT (diluiti 1:10) e si porta a 5 μl totali aggiungendo H_2O *RNase-free*. Si pone in incubazione a 70°C per 5 min, poi a 4°C per 5 min.

Successivamente si aggiunge la miscela di retrotrascrizione così composta:

- ▷ 5,0 μl *Reaction Buffer*
- ▷ 2,4 μl MgCl_2 (25 mM)
- ▷ 1,0 μl dNTPs (10 mM)
- ▷ 1,0 μl *RNase Inhibitor* (20 U/ μl)
- ▷ 5,6 μl H_2O

- Δ 1,0 μl *ImProm-II™ Reverse Transcriptase*

La sintesi del cDNA avviene nel termociclatore con questo programma:

- Δ 25°C per 5 min
- Δ 42°C per 60 min
- Δ 70°C per 15 min

2.8 Amplificazione del cDNA con la PCR *multiplex*

I livelli di mRNA della glutatione reduttasi sono stati normalizzati con quelli della β-actina, un gene ad espressione basale in tutte le cellule (*housekeeping*). Per questo motivo si amplificano entrambe le sequenze: con una coppia di *primer* quella di glutatione reduttasi, con un'altra coppia la sequenza di β-actina (*multiplex* PCR).

Poichè la glutatione reduttasi non è ancora stata sequenziata in *Trematomus eulepidotus*, i due *primer* sono stati progettati con un software bioinformatico a partire dalle regioni più evolutivamente conservate del gene di altri vertebrati. In Tabella 1 le sequenze dei *primer* utilizzati.

<i>Primer</i>	Sequenza 5' → 3'
β-actina <i>forward</i>	cctggacttcgagcagga
β-actina <i>reverse</i>	gagcctccgatccagaca
GR <i>forward</i>	caacggactgaacatcgacctg
GR <i>reverse</i>	ggtgggtgactgaacaccactg

Tab.1: sequenze dei *primer* d'innescio complementari al cDNA.

Per l'amplificazione si prepara una mix PCR con campioni dei tre gruppi sperimentali (trattamento con cadmio, con rame o controllo):

- Δ 1,0 μl cDNA
- Δ 5,0 μl *Reaction Buffer* 10x
- Δ 1,5 μl MgCl₂ (50mM)
- Δ 1,0 μl dNTPs (10mM)
- Δ 1,0 μl *Primer GR forward* (10 μM)
- Δ 1,0 μl *Primer GR reverse* (10 μM)

- Δ 1,0 μl *Primer β-actina forward*
- Δ 1,0 μl *Primer β-actina reverse*
- Δ 0,3 μl Taq DNA *polimerase* (5U/μl)
- Δ H₂O *RNase-free* fino a 50 μl totali

Dopo l'iniziazione che avviene a 94°C per 2 min, nella PCR multiplex semiquantitativa si preleva manualmente un'aliquota della soluzione al 25°, 30° e 35° ciclo di reazione. Ogni ciclo ha il seguente programma:

- Δ 94°C per 30 sec
- Δ 60°C per 40 sec
- Δ 72°C per 1 min

2.9 Elettroforesi dei prodotti di PCR e quantificazione

Su un gel di agarosio all'1% si caricano 10 μl degli amplificati prelevati e 2 μl di *loading dye*. Al termine della corsa con *Gel Doc* si fotografa il gel (Figura 5) e si quantifica la fluorescenza.

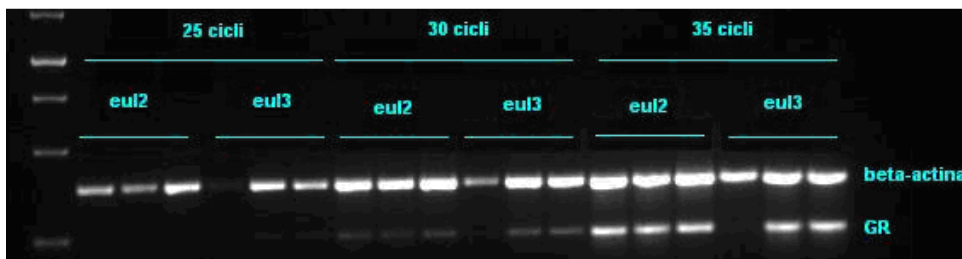


Fig. 5: gel di elettroforesi dei prodotti di PCR *multiplex*. Lo spessore delle bande rappresenta la quantità di cDNA ed aumenta col numero di cicli di reazione. Ogni colonna rappresenta una migrazione che separa i diversi frammenti: l'amplificato di GR (283 paia di basi) si riconosce in basso, quello di β-actina (circa 360 bp) in alto.

2.10 Analisi statistica dei dati

Per l'analisi statistica si costruisce un grafico a tre punti con le quantificazioni di fluorescenza dell'mRNA di glutatione reduttasi contro il numero di cicli, i dati si estrapolano dalle regioni di incremento lineare, normalizzandoli con i relativi livelli di β-actina. Infine si esegue l'analisi delle varianze seguita dal test di Student-Newman-Keuls.

3. Risultati e discussione

L'RNA estratto è risultato di buona qualità. I rapporti tra le assorbanze rilevate allo spettrofotometro (riportate in Tabella 2) rientrano infatti negli intervalli accettabili, fa eccezione l'ultimo campione che presenta una inquinamento da fenolo; le analisi elettroforetiche successive hanno confermato l'integrità dell'RNA.

	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	C (mg/ml)
eul 1 FE Cd	1,474	0,779	0,621	1,89	2,37	2,948
eul 2 FE Cd	1,028	0,541	0,467	1,9	2,16	2,056
eul 3 FE ct	0,764	0,382	0,355	2	2,15	1,5
eul 4 FE ct	0,925	0,471	0,911	1,96	1,015	1,85

Tab. 2: assorbanze, rapporti di purezza e concentrazioni di RNA totale estratto. La sigla di ogni campione contiene il codice identificativo (eul #), il tessuto (FE = fegato) e il gruppo sperimentale (Cd = organismi trattati con cadmio, ct = controlli non trattati).

In Figura 6 sono riportate medie e deviazioni standard dei livelli di GR mRNA misurate nei gruppi sperimentali. Non vi sono differenze statisticamente significative nell'espressione genica dei tre gruppi sperimentali.

Poiché l'espressione di GR non appare influenzata dai trattamenti, si prefigurano due ipotesi. La prima è che il GSH non venga ossidato a GSSG dalle ROS o dalla GPX e per questo motivo non sia aumentata la trascrizione del gene GR. La seconda ipotesi è che GSH sia effettivamente ossidato a GSSG, ma che

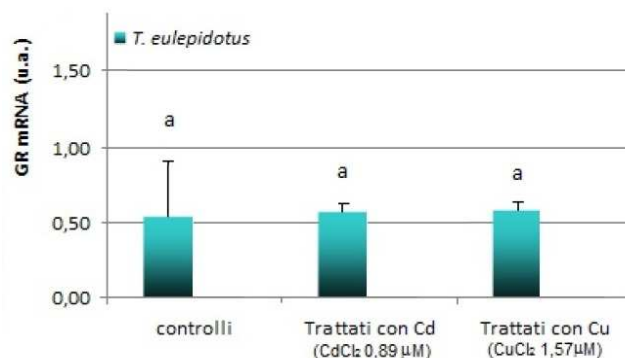


Fig.6: espressione di GR mRNA in unità arbitrarie. A lettere diverse corrispondono differenze statisticamente significative.

questo non venga ridotto dalle GR, bensì biosintetizzato *ex novo* dalla glutammato cistein ligasi (GCL) e la glutatione sintetasi (GS). Per verificare la seconda ipotesi sarebbe necessario valutare l'attività di questi enzimi oppure l'espressione genica di GCL e GS su esemplari esposti alle medesime condizioni sperimentali.

4. Bibliografia

Abele D., Puntarulo S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence system in polar and temperate marine invertebrates and fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 138: 405-41.

Breen A.P., Murphy J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *University of Nottingham, Department of Chemistry, UK. Free Radic Biol, Med.* 18(6):1033-77

Di Prisco G, Pisano E., Clark A., 1998. Fishes of Antarctica: a biological overview. *Eds. Springer-Verlag Berlin, pp.116-30.*

Eastman J.T., 2005. The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Eds. Springer-Verlag Berlin, pp.93-107.*

Holley R.W., 1955. Glutathione. *Journal of the American Chemical Society, ACS Publications.*

Mergny J., Li J., Lacroix L., Amrane S., Chaires J.B., 2005. Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Oxford University Press.*

Rowley D.A., Halliwell B., 1983. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: A physiologically significant reaction? *Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 225, Issue 1, August 1983, Pages 279-284.*

The Engineering Toolbox, 2011. Resources, Tools and Basic Information for Engineering and Design of Technical Applications. http://www.engineeringtoolbox.com/oxygen-solubility-water-d_841.html

Vercesia A.E., Kowaltowskia A.J., 1998. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.*