



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA
Curriculum Biologia Generale

ELABORATO DI LAUREA

**CARATTERIZZAZIONE DELLA SEQUENZA GENICA
DELLA GLUTATIONE REDUTTASI NEL TELEOSTEO
ANTARTICO *Chionodraco hamatus***

Tutor: Dott. Gianfranco SANTOVITO
Dipartimento di Biologia

Co-Tutor: Dott.ssa Diana FERRO
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Sabrina Manera

ANNO ACCADEMICO: 2011/2012

1. INTRODUZIONE

1.1 Scopo della tesi

Questa tesi si colloca all'interno di un progetto più ampio finalizzato allo studio dell'evoluzione molecolare e funzionale dell'enzima glutatione reduttasi (GR) nei teleostei antartici. Tale progetto si pone come primo obiettivo la caratterizzazione dell'intera sequenza nucleotidica del gene in quattro specie di pesci appartenenti al sottordine dei Notothenioidei, ampiamente diffusi nell'Oceano Australe, e al confronto filogenetico delle sequenze ottenute con quelle di altri teleostei non antartici. Lo scopo della mia tesi è quello di amplificare la porzione 3' terminale della GR in uno di questi teleostei, *Chionodraco hamatus*.

1.2 ROS e difese antiossidanti

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono molecole derivanti dalla riduzione non tetraelettronica dell'ossigeno molecolare e comprendono sia le forme radicaliche, quali l'anione superossido ($\bullet\text{O}_2^-$) e il radicale ossidrilico ($\bullet\text{OH}$), sia le specie non radicali come l'ossigeno singoletto (O_2^*) e il perossido di idrogeno (H_2O_2). Esse sono prodotte dal normale metabolismo aerobio, dai meccanismi di difesa contro i patogeni, dalla biotrasformazione delle sostanze xenobiotiche e dall'esposizione alle radiazioni UV (Abele e Puntarulo 2004). Le ROS possono risultare dannose per le cellule poiché sono in grado di ossidare le macromolecole biologiche, come i lipidi, le proteine e il DNA, determinando alterazioni delle membrane, inattivazione di enzimi e recettori, modificazione di proteine del citoscheletro e danni al genoma. Elevate concentrazioni delle ROS possono alterare l'equilibrio redox intracellulare instaurando una situazione irreversibile nota come stress ossidativo (Giovannini *et al.* 2006).

Nelle cellule sono presenti sistemi di difesa antiossidante sia enzimatici che non enzimatici. Enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPx) costituiscono una prima linea di difesa convertendo le ROS in composti meno dannosi: la SOD catalizza la dismutazione di $\text{O}_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 , la CAT riduce il H_2O_2 in H_2O , mentre il GPx è in grado di ridurre

idroperossidi sia organici che inorganici utilizzando il glutatione ridotto (GSH) (Santovito *et al.* 2012). Il tripeptide GSH (γ -glutamilcisteinglicina) riveste un ruolo centrale nel metabolismo antiossidante in quanto prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi. L'attività di enzimi quali la GPx e la glutatione transferasi (GSTs) comportano un abbassamento del livello intracellulare di GSH e un aumento del glutatione ossidato (GSSG). Tale aumento è potenzialmente citotossico in quanto può portare alla formazione di ponti disolfuro con proteine cellulari e quindi alla loro modificazione sterica. L'enzima glutatione reduttasi (GR) permette di mantenere basso il livello di GSSG riconvertendolo in GSH (Giovannini *et al.* 2006).

1.3 L'enzima glutatione reduttasi

La GR, una flavoproteina omodimerica di 120 kDa appartenente alla famiglia delle piridin-nucleotide bisolfuro ossidoreduttasi, catalizza la conversione del glutatione bisolfuro (GSSG) nella sua forma ridotta GSH in presenza di NADPH (Fig. 1), permettendo il mantenimento di un elevato rapporto [GSH]/[GSSG] (Arias G. *et al.* 2009).



Fig.1: Reazione enzimatica catalizzata dalla GR

Il ciclo catalitico della GR è costituito da due fasi: una fase riduttiva e una fase ossidativa. Durante la fase riduttiva la FAD, il gruppo prostetico dell'enzima, viene ridotta dal NADPH e gli equivalenti riducenti sono trasferiti al sito attivo redox-disulfide costituito dalle Cys-58 e Cys-63 nel topo. Nella fase ossidativa il risultante ditiolo reagisce con l'accettore finale di elettroni, il glutatione ossidato GSSG, riducendolo a due GSH (Berivan e Nuray 2006).

1.4 L'Antartide

Il continente Antartico si trova nella corrente posizione da circa 45 milioni di anni (Ma) ed è stato geograficamente isolato dalle altre terre emerse a partire dalla separazione della Penisola Antartica dal Sud America, circa 30 Ma. L'apertura

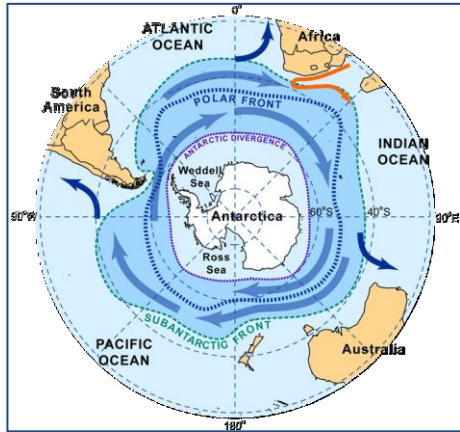


Fig. 2: Immagine del continente Antartico, dell'Oceano Australe e delle isole antartiche

dello Stretto di Drake (25-22 Ma) permise lo stabilirsi della Corrente Circumpolare Antartica e la formazione del Fronte Polare Antartico (APF) che delimita l'Oceano Australe (Fig. 2). Questa barriera idrogeografica, localizzata tra 50°S e il 60°S, si è formata dalla convergenza delle fredde acque Antartiche con le più calde acque sub-Antartiche e si estende fino ad una profondità di 1000 m (Bargagli 2008;

Bargelloni *et al.* 2000). La Convergenza Antartica (APF) costituisce una barriera insormontabile per gran parte degli organismi marini di piccole dimensioni, soprattutto plactonici.

Uno degli aspetti più interessanti dell'Antartide è il contrasto tra l'impovertimento dell'ecosistema terrestre e la ricchezza in organismi marini. Molti organismi dell'Oceano Australe appartengono a specie endemiche con caratteristiche uniche risultanti da un lungo periodo di isolamento evolutivo in un ambiente estremo con temperature che variano da 10°C a -2°C. In generale, gli organismi marini antartici sono caratterizzati, oltre che da un elevato livello di endemismo, da gigantismo negli invertebrati, longevità, basso tasso di crescita, maturazione ritardata e assenza di stadio larvale pelagico (Bargagli 2008).

1.5 Teleostei Antartici: i Notothenioidei

Il sottordine dei Notothenioidei, appartenente all'ordine dei Perciformi, comprende 129 specie divise in otto famiglie, di cui cinque antartiche. Le 101 specie di Notothenioidei antartici rappresentano il 45% delle specie bentoniche e oltre il 90% della biomassa ittica della regione Antartica (Eastman 2004).

Come risultato delle particolari condizioni ambientali marine, caratterizzate da temperature costanti attorno ai -1,9°C e da elevata solubilità dei gas in particolare dell'O₂, i teleostei antartici hanno evoluto speciali adattamenti anatomici e fisiologici e, allo stesso tempo, hanno perso alcuni caratteri non importanti in

acque permanentemente fredde: la presenza di glicoproteine anticongelanti che impediscono la formazione di cristalli di ghiaccio nei tessuti, l'evoluzione di microtubuli in grado di rimanere polarizzati alle basse temperature, la riduzione o la totale perdita dei globuli rossi e dell'emoglobina. Tutti mancano di una vescica natatoria, tuttavia alcune specie pelagiche hanno evoluto una combinazione di mineralizzazione scheletrica e depositi di lipidi che permette il mantenimento di una spinta idrostatica neutra. Inoltre, alcune specie hanno perso la capacità di espressione delle *health shock proteins* (Rutschmann *et al.* 2011; Römisch 2003).

Date le particolari condizioni ambientali dell'Oceano Australe, caratterizzato come detto da acque fredde e ricche di ossigeno, risulta di particolare interesse approfondire lo studio delle difese antiossidanti nei teleostei antartici in quanto tale condizione favorisce la formazione di ROS in relazione all'incremento dell'ossigenazione dei loro tessuti (Santovito *et al.* 2012).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Organismo utilizzato: *Chionodraco hamatus*

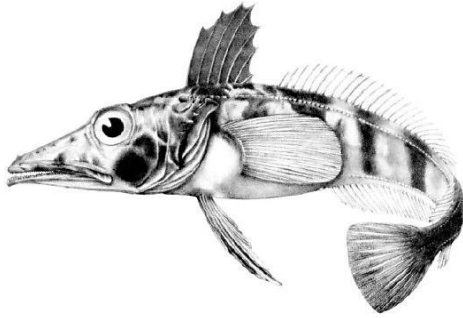


Fig. 3: *Chionodraco hamatus* (Lönnberg, 1905)

L'esemplare utilizzato, appartenente alla specie *C. hamatus* (Fig. 3), è stato campionato dalla Baia di Terra Nova, nel Mare di Ross durante la 21^a Spedizione Italiana in Antartide organizzata nel 2005 dal PRNA. I tessuti sono stati rimossi, congelati in azoto liquido e stoccati a -80°C prima di venire spediti in Italia.

C. hamatus appartiene alla famiglia dei Channichthyidae, radiata circa 10 Ma dal clade antartico dei Notothenioidei, che include 16 specie e 11 generi. La maggior parte delle specie vive alle profondità di 200-800 m (Eastman e Lanoo 2006). I Channichthyidae, conosciuti anche come *icefish* a causa del sangue privo di pigmentazione, oltre a presentare pochi eritrociti vestigiali, sono gli unici vertebrati ad aver perso completamente l'emoglobina. Inoltre, 6 delle 16 specie non esprimono nemmeno la mioglobina. L'assenza di un pigmento respiratorio viene considerata come un'elevata specializzazione a condizioni compatibili con la vita nell'ambiente Antartico: se, da un lato, la mancanza di emoglobina diminuisce la viscosità del sangue alle basse temperature, dall'altro, la buona ossigenazione delle acque fredde non rende indispensabile la presenza di una molecola per la solubilizzazione dell'ossigeno. Tale specializzazione ha inoltre favorito anche l'evoluzione di alcuni adattamenti a livello del sistema cardiovascolare, come l'aumento del volume del sangue, l'aumento del calibro dei capillari, la presenza di un cuore più grande e di un'elevata vascolarizzazione dell'epidermide che, associati ad un metabolismo lento e ad un'elevata solubilità dell'O₂ alle basse temperature, permettono una buona ossigenazione dei tessuti (Sidell e O'Brien 2006).

2.2 Estrazione dell'RNA totale dal tessuto epatico

L'RNA totale è stato estratto da un campione di circa 100 mg di tessuto epatico di *C. hamatus* conservato a -80°C utilizzando il metodo del fenolo acido guanidina isotiocianato (Trizol[®]). La prima fase prevede l'aggiunta di 1 mL di Trizol[®] per 100 mg di tessuto e l'omogeneizzazione del campione per mezzo di azione meccanica. L'omogeneizzato così ottenuto è stato lasciato per 5 min a temperatura ambiente, per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici, e successivamente incubato per 2-3 min con 200 μL di cloroformio per mL di Trizol[®], allo scopo di facilitare la separazione della fase acquosa da quella organica. Si procede quindi alla centrifugazione a 12.000 rcf per 15 min a 4°C . Dopo la centrifugazione emergono tre fasi: una fase superiore acquosa contenente l'RNA, un'interfase bianca costituita da proteine denaturate e una fase inferiore fenolica contenente DNA, proteine, lipidi e i reagenti. L'RNA è stato quindi precipitato con isopropanolo al 100% e lavato con 1 mL di Et OH al 75% in acqua DEPC. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 40-100 μL H_2O *RNasi free* a seconda delle dimensioni del campione.

La concentrazione e la qualità dell'RNA estratto è stata determinata utilizzando il Nanodrop[®] (CRIBI). Gli indici utilizzati per valutare la purezza del campione in esame sono stati i rapporti A260 / A280 (contaminazione da proteine) e A260 / A230 (contaminazione da carboidrati, fenoli o altri composti aromatici). L'RNA può essere ritenuto sufficientemente puro se entrambi gli indici presentano valori compresi tra 1,7 e 2. Una volta quantificato, l'RNA è stato diluito in H_2O *RNasi free* in modo da ottenere un volume finale di 50 μL alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e conservato a -80°C .

2.3 Retrotrascrizione dell'mRNA

La retrotrascrizione permette di ottenere, partendo da un filamento di RNA stampo, una molecola di cDNA. La procedura consiste nella preparazione di due mix di reazione. Nella prima mix sono stati introdotti 2 μL di *primer* Anchor oligo(dT) per 1 μL di RNA templato ed è stata aggiunta H_2O *RNasi free* fino al raggiungimento del volume totale di 5 μL . La mix 1 è stata quindi incubata nel

termociclatore a 70°C per 5 min e a 5°C per altri 5 min per permettere ai *primer* di appaiarsi alle sequenze complementari dei messaggeri. Conclusa l'incubazione sono stati aggiunti 15 µL della *Reverse Transcription Mix*, una soluzione che contiene: 4 µL di Buffer di reazione 5X ImProm™ II, 2,4 µL di MgCl₂ 25 mM, 1 µL di dNTPs mix, 1 µL di inibitore dell'RNAsi e 1 µL dell'enzima ImProm™ II *Reverse Transcriptase* (Promega), il tutto è stato portato a volume con H₂O *RNAsi free*. I campioni sono stati quindi introdotti per una seconda volta nel termociclatore programmato come segue: 25°C per 5 min (*annealing*), 42°C per 60 min, 70°C per 15 min. I 60 minuti a 42° C sono necessari affinché l'enzima trascriva l'mRNA, mentre gli ultimi 15 minuti a 70°C consentono di inattivare la retrotrascrittasi.

Il cDNA ottenuto è stato controllato attraverso una PCR per la β-actina, utilizzando *primer Fw* e *Re* specifici.

2.4 3' RACE (*Rapid Amplification of 3' end*)

La 3' RACE sfrutta la presenza della coda di poli A presente nel messaggero per amplificare la regione 3' terminale del relativo cDNA. L'amplificazione è stata effettuata con quattro diverse temperature di *annealing* (62°C, 60°C, 58°C, 54°C) utilizzando il *primer Fw 2* (5'-CAA CGG ACT GAA CAT CGA CCT G-3') specifico, disegnato sulla sequenza nucleotidica precedentemente amplificata e sequenziata dal nostro laboratorio, e il *primer oligo(dT) anchor*. Sono state preparate quattro miscele di reazione, una per ogni temperatura. In ogni miscela di reazione sono stati aggiunti a 0,5 µL di cDNA: 19,5 µL di H₂O *RNAsi free*, 2,5 µL di *thermophilic polymerase reaction* Buffer 5X, 0,75 µL di MgCl₂ 25mM, 0,5 µL dNTPs mix 10 mM, 0,5 µL di *primer Fw*, 0,5 µL di *primer oligo(dT) anchor*, 0,25 µL di enzima Taq DNA polimerasi (Fisher) per un volume totale di 25 µL. L'amplificazione ha seguito il seguente programma: una iniziale denaturazione (2 min, 94°C) seguita da 35 termocicli di denaturazione (30 s, 94°C), *annealing* (30 s per ogni campione rispettivamente alle temperature di 62°C, 60°C, 58°C, 54°C), estensione (1 min , 72°C) e una fase finale di estensione (10 min, 72°C).

Terminata l'amplificazione è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,5% per verificare l'avvenuta amplificazione della sequenza target.

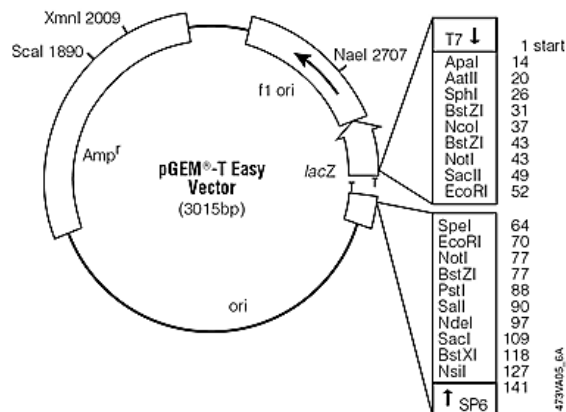
2.5 Nested PCR

Nella *nested* PCR un'aliquota del prodotto ottenuto con la 3' RACE viene utilizzata come stampo per una seconda reazione (*nested*) avvalendosi di una coppia di *primer* complementari a regioni presenti all'interno del primo prodotto amplificato. Al fine di ottenere un maggior quantitativo di amplificato, il prodotto della prima PCR non è stato diluito ma direttamente utilizzato nella mix di reazione della *nested* PCR. E' stato utilizzato un *primer Fw* più interno, il Fw D (5'-TGG TGT TCA GTC ACC CAC CA-3'), e il *primer oligo(dT) anchor 1* con quattro differenti temperature (62°C, 60°C, 58°C, 54°C). La miscela di reazione e il programma al termociclatore sono i medesimi che sono stati utilizzati durante la prima amplificazione. Dal momento che sono state ottenute bande della stessa altezza per tutte e quattro le temperature, i prodotti delle quattro *nested* PCR sono stati riuniti e caricati su una nuova elettroforesi. La banda è stata tagliata e l'amplificato è stato estratto del gel di agarosio attraverso un *clean up* da gel utilizzando il kit Nucleo Spin[®] Extract II (Macherey-nagel).

2.6 Ligazione del cDNA al vettore plasmidico

Il processo di ligazione permette di incorporare il frammento da clonare all'interno di un vettore. La ligazione è stata effettuata utilizzando i reagenti e il protocollo forniti dalla Promega[®]. Il vettore plasmidico è il pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) di 3015 bp, (Fig. 4).

Fig. 4: Vettore plasmidico pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)



Il metodo prevede di aggiungere a 3 μL di amplificato purificato: 5 μL di 2X *Rapid Ligation* Buffer, 1 μL di pGEM[®]-T Easy Vector, in modo da ottenere un rapporto vettore/inserito 1:3, e 1 μL di enzima T4 DNA *Ligase* per un volume totale di 10 μL . Si lascia quindi in incubazione *overnight* a 4°C.

2.7 Trasformazione tramite shock termico

Per la trasformazione sono stati utilizzati batteri competenti di *Escherichia coli* DH5-alpha[™] (Invitrogen). La trasformazione è stata effettuata mediante shock termico: nella prima fase sono stati aggiunti 4 μL del prodotto di ligazione a 50 μL di batteri scongelati, i reagenti sono stati lasciati in ghiaccio per 30 min. Si procede quindi all'*heat shock* che consiste nel mettere i batteri per 20 sec esatti a 42°C per poi reintrodurli in ghiaccio. Sono stati aggiunti quindi 950 μL di SOB (un terreno ricco di nutrienti che contiene bactotriptide, lievito, KCl e glucosio) e sono stati lasciati in incubazione per 1 h a 37°C nell'incubatore orbitale impostato a 200 rpm per permettere ai batteri di crescere. Finita la fase di incubazione sono stati piastrati 50 μL di batteri insieme a 100 μL di IPTG, un induttore della trascrizione della β -galattosidasi, e a 160 μL di X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-D-galattoside), in terreno semisolido LB + Ampicillina. Infine, sono stati lasciati ad incubare in stanza calda a 37°C *overnight*. La densità delle cellule piastrate è sufficientemente bassa da poter osservare le singole colonie monoclonali.

2.8 Screening delle colonie e clonaggio

Sono stati effettuati tre *screening* che hanno permesso di identificare le colonie derivate dalle cellule trasformate contenenti il cDNA da clonare. Il primo *screening* si basa sull'uso dell'antibiotico ampicillina: solo le cellule di *E. coli* trasformate, grazie al gene per la resistenza all'ampicillina presente nel vettore plasmidico, sono in grado di crescere e formare delle colonie in un terreno di coltura selettivo. Tra queste è possibile isolare le colonie originatesi da batteri che hanno inglobato il plasmide ricombinante, discriminandole da quelle che presentano un vettore non ricombinato, attraverso la differente colorazione: le cellule contenenti il vettore non ricombinante formeranno colonie blu in quanto

sono in grado di metabolizzare l'X-gal dopo l' α -complementazione, mentre le cellule batteriche contenenti il plasmide ricombinante daranno origine a colonie di colore bianco essendo incapaci di produrre l'enzima β -galattosidasi attivo.

Infine, per assicurarsi che effettivamente i batteri trasformati presentino all'interno del vettore la sequenza di interesse, è stata effettuata l'amplificazione del plasmide utilizzando i *primer Fw* M13 e *Re* M13 complementari a due specifiche regione del plasmide adiacenti al sito di inserzione. Sono state prelevate dalla piastra, contenete i batteri trasformati, due coloni bianche (2a-2b) e una colonia blu (2c) di controllo. Le colonie sono state quindi piastrate in un nuovo terreno di coltura contenuto in una petri precedentemente suddivisa in tre riquadri, in modo da poter distinguere le cellule cresciute dalle relative colonie iniziali. L'amplificazione è stata effettuata preparando una Master MIX di PCR calcolata per quattro campioni per un volume totale di 99 μ L contenente: 78 μ L di H₂O MilliQ autoclavata, 10 μ L di Buffer 5X, 3 μ L di MgCl₂ 25mM, 4 μ L dNTPs mix 10 mM, 2 μ L di *primer Fw* M13 e 2 μ L di *primer Re* M13. Ogni puntale utilizzato per strisciare le tre colonie è stato introdotto in tre *epENDORF* autoclavate ognuna contenente 24,75 μ L di Master MIX. Dopo aver lasciato riposare per circa un minuto, in modo da far diluire le cellule nella mix di PCR, sono stati tolti i puntali e sono stati posti i tubini nel termociclatore. Prima di effettuare l'amplificazione è necessario lisare le cellule, a tal scopo è stata effettuata una preincubazione a 98°C per 8 min. Una volta conclusa l'incubazione è stato introdotto in ogni *epENDORF* 0,25 μ L di enzima Taq DNA polimerasi. Il programma utilizzato per la PCR di controllo delle colonie prevede: una iniziale denaturazione (2 min, 95°C) seguita da 35 termocicli di denaturazione (2 min, 95°C), *annealing* (1 min, 50°C), estensione (5:30 min, 72°C) e una fase finale di estensione (10 min, 72°C). Terminata la PCR sono stati caricati su gel di agarosio al 1,5% 5 μ L di amplificato per campione al fine di verificare la presenza dell'inserito nelle colonie positive allo screening visivo.

Per il clonaggio è stata scelta la colonia bianca 2B. Le colonie che hanno internalizzato l'inserito sono state incubate nell'orbitale *overnight* a 37°C in terreno liquido LB + 5 μ L di ampicillina.

2.9 Preparazione del plasmide per il sequenziamento

L'isolamento del DNA plasmidico è stato effettuato utilizzando il kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega[®]). Conclusa la purificazione, il DNA plasmidico è stato risospeso in 100 µL di H₂O *Nucleasi Free* e quantificato in modo da inviare al centro almeno 500 ng di materiale plasmidico. A tal fine, sono stati diluiti 10 µL di DNA in modo da ottenere una diluizione 1:5, ed è stata misurata l'assorbanza a λ 260 nm. Per ottenere la concentrazione di DNA presente nel campione è stata applicata la seguente formula:

$$[\text{DNA}] = \text{Abs } 260 \times f \times E$$

in cui abbiamo il prodotto tra l'Abs a λ 260 nm, il fattore di diluizione (f) e il coefficiente di estinzione molare del DNA (E = 50). Il campione è stato quindi liofilizzato e inviato al centro BMR *Genomics* di Padova per il sequenziamento.

2.10 Bioinformatica e analisi filogenetica

La sequenza ottenuta è stata inizialmente confrontata con le sequenze presenti nel *data base* di NCBI (*GeneBank*) attraverso il programma BLAST.

La sequenza amminoacidica corrispondente alla regione codificante è stata dedotta attraverso il programma bioinformatico Expsy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate>). L'allineamento globale tra la sequenza amminoacidica così ottenuta e quelle delle altre specie prese in considerazione è stato effettuato avvalendosi del programma CLUSTAL W2.

Per l'analisi filogenetica e la costruzione dell'albero con il metodo *neighbour joining* (NJ) è stato utilizzando il programma MEGA 5.1 (Tamura *et al.* 2011), basandosi sui dati ottenuti dall'allineamento multiplo effettuato con MUSCLE tra la parziale sequenza amminoacidica di *C. hamatus* e le sequenze proteiche di otto teleostei non antartici ottenute dal *database GeneBank*. Per la costruzione dell'albero è stato utilizzato l'algoritmo del test di *Bootstrap* 5000 repliche. Come specie *out group* sono state utilizzate *M. musculus* e *H. sapiens*.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Risultato dell'amplificazione *Nested*

L'elettroforesi di controllo del prodotto dell'amplificazione *Nested* ha evidenziato una banda di circa 800 bp, compatibile con la regione nucleotidica compresa tra i due *primer* (Fig. 5).

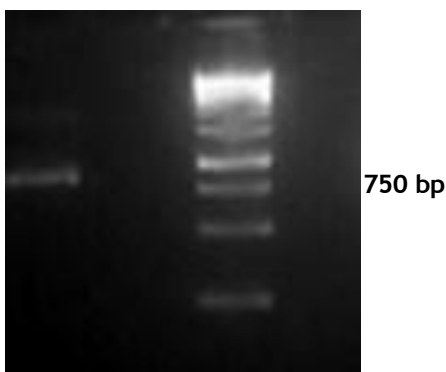
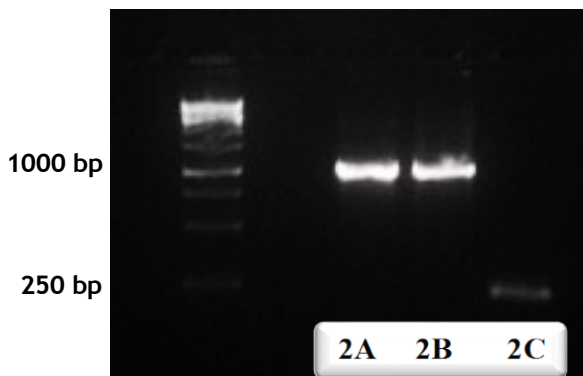


Fig. 5: Gel elettroforetico relativo all'amplificato prodotto della Nested. La banda di circa 800 bp è data dall'amplificazione parziale del gene gr di C. hamatus

3.2 Risultato della corretta internalizzazione dell'inserito nel vettore

Il risultato della corsa elettroforetica dello *screening* mediante amplificazione con *primer* M13 (Fig. 6) dimostra che i batteri trasformati hanno internalizzato un plasmide in cui la ligazione dell'inserito è riuscita. Le bande 2A e 2B sono costituite dall'amplicone di circa 800 bp legato alle estremità a due tratti di plasmide, nel complesso lunghi 242 bp.

Fig. 6: Gel elettroforetico di controllo delle colonie. Le bande 2a-2b di circa 1000 bp derivano dai prodotti di PCR ottenuti dalle due colonie bianche che contengono il frammento di DNA da sequenziare. La banda 2C di circa 242 bp è il risultato della PCR della colonia blu di controllo, priva del tratto di DNA esogeno



3.3 Risultato del sequenziamento

Dal sequenziamento abbiamo ottenuto un frammento di 864 bp corrispondente alla porzione 3' terminale del cDNA della GR di *Chionodraco hamatus* (Fig. 7). La regione codificante consta di 329 bp e codifica per una catena polipeptidica di 108 amminoacidi.

```
tg gtg ttc agt cac cca ccc atc gga acg atg ggc ctc aca gaa gag
  V  F  S  H  P  P  I  G  T  M  G  L  T  E  E  15
gaa gct att aaa ctt cga gga aag gag aac ata aag gtc tac aag act
  E  A  I  K  L  R  G  K  E  N  I  K  V  Y  K  T  31
tct ttc act ccg atg tat cac gcc atc acg agc agg aag agt ctg tgc
  S  F  T  P  M  Y  H  A  I  T  S  R  K  S  L  C  47
atc atg aag ctg gtg tgt gag ggc aag gag ggg aag gtg gtg ggt ctg
  I  M  K  L  V  C  E  G  K  E  G  K  V  V  G  L  63
cac atg cag ggg ctg ggc tgt gat gag atg ctg cag gga ttc tct gtg
  H  M  Q  G  L  G  C  D  E  M  L  Q  G  F  S  V  79
gcc atc aag atg ggc gct acc gaa gca gac ttt gac aag act atc gca
  A  I  K  M  G  A  T  E  A  D  F  D  K  T  I  A  95
att cac ccc acc tca tct gag gag ttt gtc aca atg cgt tag tgcaaac
  I  H  P  T  S  S  E  E  F  V  T  M  R  -  108
acaatctccatccttgcttccctatacgcaccagcaaccagacaatcataccaggacggggtc
gctcctctgttccactcttgcacagcttgacgactttctttctaaaacggttctacttcttt
ttcactcatttaagtgaccttatttgtgcgagtggtttatcttctcattctgacatgaatgg
attatggccttcttaaacgtactgtgggtcttgatttttgattgaatactctagattccatt
ttgatcatcgtgatgtggaagtgatggatctgcaggtattgttgcaagtattgattgcaatggaa
aacaaactacaaaatacctctctcctagtatatgtggttgatttgcaagtcatattgtccgat
gaatattgcaaacactgctgctccttaaggcacatacctactaccaatgtgaggtcacaatgta
tccactgtactgttctaaacaaagactgaataaacacaagtttttttcttaaaaaa
aaaaaaagtcgtgactgtgaaaac
```

Fig. 7: Sequenza nucleotidica parziale del cDNA della GR in *C. hamatus* (lettere minuscole) e sequenza amminoacidica dedotta (lettere maiuscole). In rosso e in azzurro sono indicati rispettivamente i primer Fw e Re oligo-dT anchor, in giallo è indicato il putativo segnale di poliadenilazione e in verde l'ipotetico segnale di degradazione rapida dell'mRNA. In nero due residui amminoacidici del sito attivo dell'enzima.

Nonostante la sequenza amminoacidica della GR sia parziale, dall'allineamento multiplo effettuato con ClustalW con sequenze ortologhe di altri metazoi, è stato possibile verificare la conservazione di 2 residui amminoacidici importanti per l'attività dell'enzima, l'His-97 e il Glu-103 (Fig. 7). L'His-97 e il Glu-103 della sequenza di *C. hamatus* corrispondono rispettivamente all'His-467 e al Glu-472 presenti all'interno del sito attivo dell'enzima murino (Krauth-Siegel *et al.* 1998). Durante la fase ossidativa del ciclo catalitico della GR, l'anello imidazolico dell'His-467 protona l'anione GS⁻ formatosi in seguito dell'attacco nucleofilo della Cys-58 al ponte disolfuro del glutatione ossidato GSSG, andando a formare il primo GSH. L'orientamento dell'anello imidazolico viene probabilmente mantenuto in posizione dal legame idrogeno con il gruppo carbossilico del Glu-472 (Krauth-Siegel *et al.* 1998; Pai e Schulz 1983).

3.4 Risultato dell'analisi filogenetica

L'albero ottenuto risulta non completamente risolto, in quanto valori di *bootstrap* elevati supportano solo il clade delle GR di mammifero (*bootstrap* 100%), il clade delle GR dei ciprinidi (*C. carpio* e *D. rerio*, 99%) e quello dei perciformi (*Dentex dentex* e *Sparus aurata*, 55%). In Fig. 8 è riportato l'albero NJ non collassato. La sequenza di *C. hamatus* emerge insieme alle sequenze della GR dei due teleosti non antartici *Dentex dentex* e *Sparus aurata*, ma dato il basso valore di *bootstrap*, inferiore del 50%, non possiamo ritenere queste ultime sequenze *sister group* della GR del Channichthyidae *C. hamatus*. In Fig. 9, lo stesso albero ma collassato, pone infatti *C. hamatus* all'interno di un clade indeterminato staccatosi precocemente da tutti gli altri teleostei.

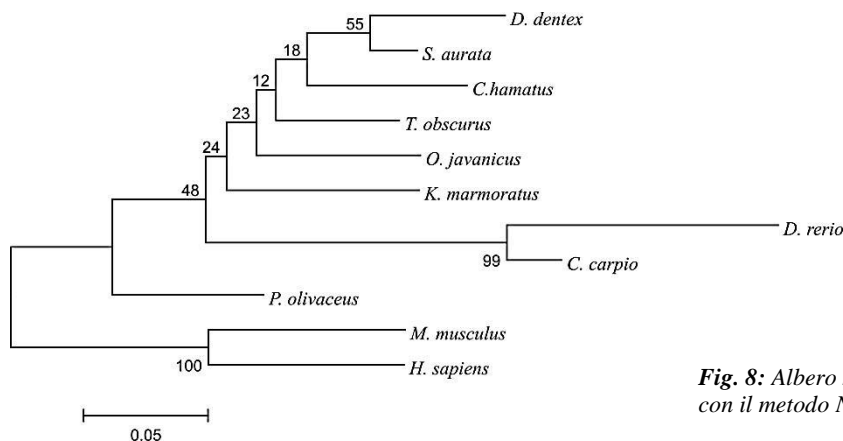


Fig. 8: Albero non collassato ottenuto con il metodo NJ

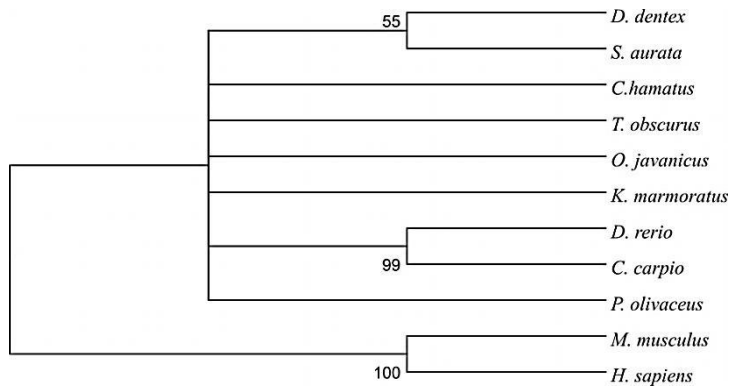


Fig. 9: Albero collassato

4. CONCLUSIONI

Attraverso questo lavoro siamo riusciti a caratterizzare la porzione 3' terminale del cDNA per l'enzima GR nel teleosteo antartico *C. hamatus*. Per poter ottenere dati filogenetici più affidabili, saranno necessari ulteriori studi atti a completare la sequenza del cDNA e a caratterizzare le sequenze ortologhe di altri teleosti antartici, sia appartenenti alla famiglia dei Channichthyidae sia appartenenti alle altre famiglie antartiche.

BIBLIOGRAFIA

Abele D., Puntarulo S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, pp.402-415

Arias. G. D., Marquez E. V., Beccaria J. A., Guerrero A. S., Iglesias A. A., 2009. Purification and characterization of a Glutathione Reductase from *Phaeodactylum Tricornutum*. *Protist*, Vol. 161, pp. 91-10

Bargagli R., 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the total environment* 400, pp. 212-226

Bargelloni L., Zane L., Derome N., Lecointre G., Patarnello T., 2000. Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of genetic variation. *Antarctic Science* 12 (3), pp. 259-268

Berivan T., Nuray N. U., 2006. Kinetic Mechanism and Molecular Properties of Glutathione Reductase. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 31, pp. 230-237

Eastman J.T., 2004. The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Bio* 28, pp. 93-107

Eastman J.T., Lanoo M.J., 2004. Brain and Sense Organ Anatomy and Histology in Hemoglobinless Antarctic Icefish (Perciformes: Notothenioidei: Channichthyidae). *Journal of Morphology* 260, pp. 117-140

Giovannini C., Filesi C., D'Archivio M., Scazzocchio B., Santangelo C., Masella R., 2006. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutathione e sugli enzimi ad esso correlati. *Ann Ist Super Sanità Vol. 42 No. 3*, pp. 336-347

Krauth-Siegel R. L., Arscott L. D., Schönleben-Janias A., Schirmer R. H., Williams C. H., 1998. Role of Active Site Tyrosine Residues in Catalysis by Human Glutathione Reductase. *Biochemistry* 37, pp. 13968-13977

Pai E. F., Schulz G. E., 1983. The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Delivered from X-ray Diffraction Analyses of Reaction Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 259 No. 3, pp. 1752-1757

Römisch K., Matheson T., 2003. Cell biology in the Antarctic: studying life in the freezer. *Nature Cell Biology*, vol. 4

Rutschmann S., Matschiner M., Damerau M., Muschick M., Lehmann M.F., Hanel R., Salzburger W., 2011. Parallel ecological diversification in Antarctic notothenioid fishes as evidence for adaptive radiation. *Molecular Ecology* 20, pp. 4707-4721

Santovito G., Piccini E., Boldrin F., Irato P., 2012. Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part. C* 155, pp. 580-586

Sidell B.D., O'Brien K.M., 2006. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. *The Journal of Experimental Biology* 209, pp. 1791-1802

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, pp. 2731-2739.