UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

CICLO XXII

EVOLUZIONE MOLECOLARE DELLE METALLOTIONEINE NEI NOTOTHENIOIDEI ANTARTICI

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Ester Piccinni

Dottorando: Rigers Bakiu

INDICE

ABSTRACT (IN INGLESE) E RIASSUNTO (IN ITALIANO)

1. INTRODUZIONE **1**

1.1 LE METALLOTIONEINE 1
1.2 CLASSIFICAZIONE DELLE MT 2
1.3 FUNZIONI DELLE MT 4
1.4 MOLTEPLICITA' DELLE MT 5
1.5 STRUTTURA GENICA ED INDUZIONE TRASCRIZIONALE DI *MT* 7
1.6 MT IN TELEOSTEI 10
1.7 I NOTOTHENIOIDEI 12

2. SCOPO DELLA RICERCA **22**

3. PROCEDURE SPERIMENTALI **26**

3.1 ORGANISMI UTILIZZATI 26
3.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI 27
3.3 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA ED AMPLIFICAZIONE DEL cDNA 29
3.4 RACE (*RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS*) 31

3.5 AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO 34
3.6 *GENOME WALKING* 36
3.7 PROGETTAZIONE DEI *PRIMERS* 40
3.8 CLONAGGIO DEI PRODOTTI DI PCR 43
3.9 SEQUENZIAMENTO 48
3.10 ANALISI FILOGENETICA 48

4. RISULTATI E DISCUSSIONE 56

4.1 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE MT DI NOTOTHENIOIDEI ANTARTICI 56
4.2 TEST DELL'OROLOGIO MOLECOLARE 58
4.3 ANALISI DELLE SEQUENZE DI cDNA DI MT DI NOTOTHENIOIDEI ANTARTICI 59
4.4 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DELLA REGIONE CODIFICANTE 68
4.5 TEST DI *MAXIMUM LIKELIHOOD* UTILIZZANDO I MODELLI *BRANCH-SITE* 73
4.6 TEST DI *MAXIMUM LIKELIHOOD* UTILIZZANDO I MODELLI *SITE* 74
4.7 IDENTIFICAZIONE DEGLI AMINOACIDI SOGGETTI A COSTRIZIONI FUNZIONALI STRINGENTI 77
4.8 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DELLA 5' E 3' UTR 79
4.9 CARATTERIZZAZIONE E ANALISI DELLA STRUTTURA GENICA DI MT 85
4.10 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DEGLI INTRONI 88
4.11 CARATTERIZZAZIONE E ANALISI DEL PROMOTORE DI MT 92
4.12 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DEI PROMOTORI 97

5. CONCLUSIONI **101**

6. BIBLIOGRAFIA I

ABSTRACT

Metallothioneins (MTs) are low-molecular weight (6-18 kDa) and sulphur-rich proteins. These proteins have been identified in animals, plants and in both eukaryotic and prokaryotic microorganisms. MTs are involved in the homeostasis of essential metals as well as in the detoxification of the non essential ones. Furthermore they act as scavengers of reactive oxygen species (ROS).

This work is part of wider studies on evolutionary aspects of MTs in teleosts. The molecular evolution of MTs in the Antarctic Notothenioid has been investigated. MT cDNA sequences of some members of Nototheniidae, Bathydraconidae, Artedidraconidae and Channichthyidae families have been characterised and evolutionary aspects have been inferred. Maximum likelihood (ML) and Bayesian methods were applied to the coding and UTR sequences. The results indicate the presence of two MT groups, each containing one of the two isoforms, MT-1 and MT-2. Likelihood tests (LH) results support the hypothesis that molecular evolution of notothenioid MTs is based on relaxed clock model. Several discrepancies (mismatches) were observed between MT gene genealogy and species phylogeny. On the basis of these mismatches analyses have been preformed in order to evaluate if positive selection could have been acted. The data indicate the absence of positive selection and suggest the presence of a strong purifying selection operating at the amino acidic level. In addition, phylogenetic analyses on UTRs indicate that 5' UTRs could have been evolved differently from 3' UTRs. Only the 3'UTR of both *Notothenia coriiceps* MT-1 and *Cygnodraco mawsoni* MT-2 could have been undergone to convergence events. Furthermore, some MT introns and promoter sequences were characterised. The phylogenetic analyses, based on these sequences, suggest they could be more useful than cDNAs in the study of molecular evolution of notothenioids MTs.

These results showed that introns could be generally utilised in evolutionary analyses of nuclear genes.

RIASSUNTO

Le metallotioniene (MT) sono proteine dal basso peso molecolare (6-18 kDa) caratterizzate da un elevato contenuto in cisteine. Esse sono state identificate in animali, piante e microorganismi eucarioti e procarioti. Le MT sono coinvolte nell'omeostasi dei metalli essenziali e nella detossificazione di quelli non essenziali, agiscono inoltre da *scavengers* delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Questo lavoro si inserisce nell'ambito degli studi sugli aspetti evolutivi di queste proteine nei teleostei. E' stata quindi analizzata l'evoluzione molecolare delle MT nel subordine Notothenioidei. Sono state caratterizzati i cDNA delle MT di membri delle famiglie Nototheniidae, Bathydraconidae, Artedidraconidae e Channichthyidae. Le analisi filogenetiche sono state condotte sulle sequenze della regione codificante e delle UTR mediante metodi stocastici di maximum likelihood (ML) e baesiani. I risultati indicano che le MT clusterizzano in due gruppi, ognuno dei quali contiene una delle due isoforme, MT-1 e MT-2. I risultati del test di *likelihood* dimostrano che l'evoluzione molecolare delle MT dei Notothenioidei si baserebbe sul modello dell'orologio molecolare rilassato. Alcune discrepanze (*mismatches*) sono state osservate nel confronto tra la genealogia dei geni delle MT e la filogenesi delle specie. Sulla base di tali *mismatches* sono state altresì condotte analisi allo scopo di valutare se su queste MT abbia agito o meno la selezione positiva. Dai risultati ottenuti si può ipotizzare l'assenza di selezione positiva, ma la presenza di una forte selezione purificante che avrebbe operato a livello aminoacidico. Le analisi filogenetiche basate sulle UTR indicano che le 5' UTR si sarebbero evolute diversamente rispetto alle 3' UTR. Inoltre solo le 3' UTR di MT-1 di *Notoththenia coriiceps* e MT-2 di *Cygnodraco mawsoni* sarebbero andate incontro a fenomeni di convergenza. Successivamente sono state caratterizzate le sequenze di introni e di promotori di MT per alcuni dei Notothenioidei analizzati. Le analisi filogenetiche basate sulle sequenze introniche e dei promotori suggeriscono che, per lo studio dell'evoluzione molecolare delle MT nei Notothenioidei, tali sequenze sono più informative rispetto alle sequenze codificanti.

Tali risultati fanno ipotizzare che le sequenze introniche possono essere proficuamente utilizzate negli studi sull'evoluzione di geni nucleari.

1. INTRODUZIONE

1.1 LE METALLOTIONEINE

Le MT sono una famiglia di piccole proteine costituite da una singola catena polipeptidica e capaci di legare i metalli. Esse sono caratterizzate da:

- basso peso molecolare (2-16 kDa);
- elevato contenuto in metalli e solfuro;
- composizione aminoacidica caratterizzata da alto contenuto in cisteine (circa il 30 % dei residui totali);
- basso contenuto in aminoacidi aromatici;
- distribuzione caratteristica dei residui di Cys nella struttura primaria secondo i motivi Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys, Cys-Cys, dove X e Y sono due amminoacidi qualsiasi;
- caratteristiche spettroscopiche proprie dei metalli tiolati in quanto le Cys sono coordinate in modo da legare gli ioni metallo attraverso legami mercaptidici;
- presenza di clusters metallo-tiolati (Kojima *et al.*, 1999).

Le uniche MT di cui sia nota la struttura tridimensionale sono quelle identificate nei mammiferi, crostacei ed echinodermi. In particolare, nei mammiferi le MT sono costituite da un dominio-α (C-terminale) comprendente 11 Cys e da un dominio-β (N-terminale) comprendente 9 Cys, collegati da un breve segmento conservato che conferisce loro mobilità e indipendenza al momento di legare il metallo. Tutti i residui cisteinici sono coinvolti nel legame di sette ioni metallici bivalenti a formare clusters tetraedrici (Hamer, 1986; Kille *et al.*, 1994; Bell e Vallee, 2008).

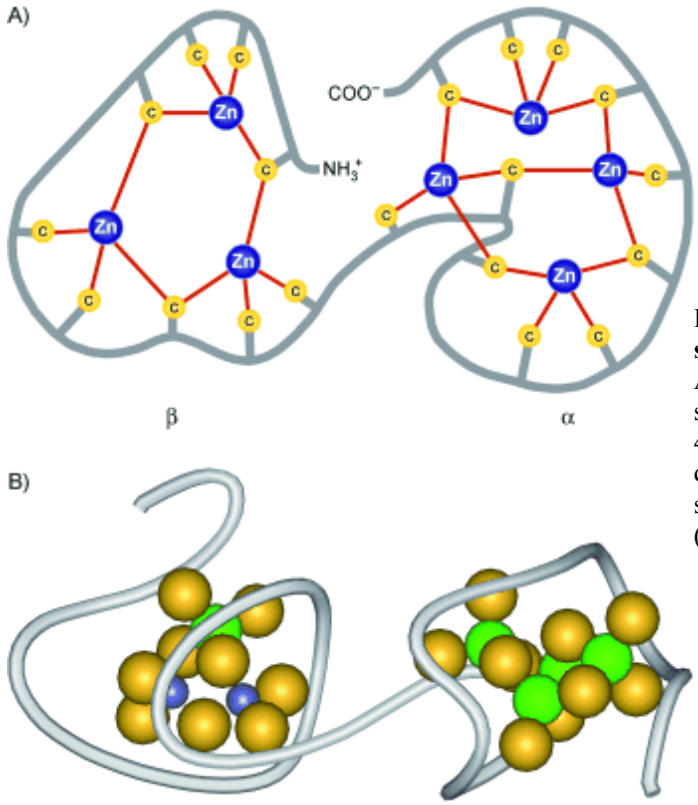


Figura 1.1 Rappresentazione grafica della struttura proteica di MT (Bell e Vallee, 2008)
A) I domini α e β legante lo zinco nella MT B) la struttura proteica di Cd5Zn2MT-2 nel ratto (PDB ID: 4MT2). Quattro atomi di cadmio sono legati nel dominio-α, mentre un atomo di cadmio e due di zinco si legano nel dominio-β: Cd (verde), Zn (blu) e S (giallo).

1.2 CLASSIFICAZIONE DELLE MT

La prima MT fu scoperta nel 1957 da Margoshes e Vallee nel corso di studi per l'identificazione di una proteina legante il Cd nella corteccia renale di cavallo, e responsabile del naturale accumulo del metallo in questo tessuto. Le ricerche condotte in seguito hanno portato all'identificazione di tali proteine in molti *phyla* animali, nelle piante, nei microorganismi eucarioti e nei cianobatteri (Kojima *et al.*, 1999).

Il primo sistema di classificazione, adottato nel 1985, proponeva la suddivisione delle MT in 3 Classi (Fowler *et al.*, 1987) in base alla posizione dei residui di Cys nella struttura primaria:

Classe I: MT aventi le Cys in posizioni strettamente correlate a quelle della MT della corteccia renale di cavallo. Vi appartengono quelle di vertebrati e di qualche invertebrato come crostacei e molluschi.

Classe II: MT con le Cys in posizioni scarsamente correlate con quelle della MT della corteccia renale di cavallo. Vi appartengono le MT rinvenute in qualche invertebrato come la *Drosophila*, i lieviti, i protozoi, i cianobatteri ed in qualche pianta.

Classe III: MT atipiche, in quanto non sono polipeptidi inducibili, ma di sintesi. Contengono unità di γ-glutamil-cisteina e vi appartengono le MT delle piante e di qualche fungo.

Dal momento che il numero delle sequenze proteiche e geniche delle MT identificate è andato progressivamente aumentando, questa suddivisione è diventata inadeguata. Infatti è stato verificato che la loro lunghezza, la composizione aminoacidica, il numero e la ripartizione delle Cys sono altamente variabili. E' stato quindi introdotto un nuovo sistema di classificazione basato sulle similarità delle sequenze e le connessioni filogenetiche (fig. 1.2). In questo modo la SUPERFAMIGLIA delle MT viene suddivisa in FAMIGLIE, SOTTOFAMIGLIE, SOTTOGRUPPI, ISOFORME e CLAN (Binz e Kägi, 1999):

SUPERFAMIGLIA: tutti i polipeptidi che condividono le stesse caratteristiche della MT della corteccia renale di cavallo;

FAMIGLIA: MT che hanno la sequenza aminoacidica allineabile tra loro. Ogni famiglia è identificata da un numero, per esempio la Famiglia 1 include le MT dei vertebrati;

SOTTOFAMIGLIA: MT che, oltre alle caratteristiche della famiglia, mostrano caratteri filogenetici più stringenti come la corrispondenza tra le regioni 5'UTR o 3'UTR del gene o tra le sequenze nucleotidiche, tra esoni e tra introni. Una sottofamiglia è abbreviata con una lettera identificativa della classe dell'organismo e se necessario, da un numero. Per esempio, m1: mammiferi MT-1; e1: echinodermi MT-1;

SOTTOGRUPPO: gruppo di sequenze di una sottofamiglia chiaramente distinguibile per il suo carattere monofiletico;

ISOFORME/FORME ALLELICHE: membri di sottogruppi, sottofamiglie e famiglie. Per esempio MT-1E, MT-1F, ecc. sono isoforme di MT umane;

CLAN: sequenze che non possono essere classificate con i criteri sopra elencati ma che mostrano caratteristiche comuni come la struttura spaziale, proprietà termodinamiche, proprietà di legame con i metalli, ecc.

Family 1: vertebrate MTs
m1: mammalian MT-1
m2: mammalian MT-2
m3: mammalian MT-3
m4: mammalian MT-4
m: n.d. mammalian MT
a1: avian MT-1
a2: avian MT-2
a: n.d. avian MT
b: batracian MT
t: teleost MT

Family 2: mollusc MTs
mo1: mussel MT-1
mo2: mussel MT-2
mog: gastropod MT
mo: n.d. mollusc MT

Family 3: crustacean MTs
c1: crustacean MT-1
c2: crustacean MT-2
c: n.d. crustacean MT

Family 4: echinodermata MTs
e1: echinodermata MT type 1
e2: echinodermata MT type 2

Family 5: diptera MTs
d1: diptera MT type 1
d2: diptera MT type 2

Family 6: nematoda MTs
n1: nematoda MT type 1
n2: nematoda MT type 2

Family 7: ciliata MTs
ci: ciliata MT

Family 8: fungi-I MTs
f1: fungi-I MT

Family 9: fungi-II MTs
f2: fungi-II MT

Family 10: fungi-III MTs
f3: fungi-III MT

Family 11: fungi-IV MTs
f4: fungi-IV MT

Family 12: fungi-V MTs
f5: fungi-V MT

Family 13: fungi-VI MTs
f6: fungi-VI MT

Family 14: prokaryota MTs
pr: prokaryota MT

Family 15: planta MTs
p1: plant MT type 1
p2: plant MT type 2
p2v: plant MT type 2 variant, described as a clan of p2
p3: plant MT type 3
p21: plant MT type 2x1
pec: plant EC MT-like protein

Figura 1.2 Schema classificativo delle MT secondo Binz e Kägi (1999).

1.3 FUNZIONI DELLE MT

Le MT possono venire indotte rapidamente da svariati agenti (Kägi, 1993) quali, tra gli altri:

- metalli;
- agenti infiammatori;

- specie reattive dell'ossigeno (ROS);
- agenti stressori;
- alcuni ormoni;
- fattori di crescita.

Studi di tipo biochimico-molecolare e strutturale hanno condotto all'ipotesi che le MT giochino un ruolo centrale in molteplici processi biologici (Palmiter, 1998; Klaassen *et al.*, 1999). È da notare comunque che il quadro che si evince dalla letteratura è molto complesso, con dati che spesso sono poco chiari e persino contrastanti.

Le MT sono coinvolte nei processi sia di omeostasi dei "metalli essenziali" quali Zn e Cu, che di detossificazione da un eccesso di questi ultimi e dalla presenza di "metalli non essenziali" quali Cd e Hg (Miles *et al.*, 2000).

È stato anche dimostrato che le MT possano agire da chaperonine per la sintesi di altre metalloproteine costituendo una riserva di ioni metallici da rilasciare alle apo-metalloproteine neosintetizzate (Palmiter, 1998; Coyle *et al.*, 2002).

Tali proteine sembra siano altresì coinvolte nella regolazione della proliferazione cellulare (Cherian, 1994; Miles *et al.*, 2000). Studi condotti sulle MT nucleari indicano che esse abbiano un ruolo fondamentale nel trasferimento di Zn ad enzimi nucleari Zn-dipendenti, coinvolti in processi quali la replicazione del DNA, la trascrizione e la traduzione (Kägi *et al.*, 1980; Karin, 1985).

Infine, sembra che le MT abbiano un ruolo protettivo nei confronti delle ROS (**R**eactive **O**xygen **S**pecies), principali cause di stress ossidativo. In tale processo, i clusters metallo-tiolati sarebbero rapidamente ossidati ad opera delle ROS (Karin, 1985; Thornalley e Vašák, 1985).

1.4 MOLTEPLICITA' DELLE MT

Le MT sono presenti nella maggior parte degli organismi in forme multiple chiamate isoforme, ognuna codificata da un gene diverso; è stato visto che l'espressione di ogni isoforma può avvenire in modo differenziale a seconda dell'agente induttore, del tessuto e dell'organismo considerato (Sadhu e Gedamu, 1988; Miles *et al.*, 2000).

Nei mammiferi le MT legano soprattutto Zn, che può essere sostituito da Cu e Cd. Sono state identificate quattro isoforme principali: MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4. MT-1 (che presenta molteplici

sub-isoforme) ed MT-2 sono presenti in tutti gli organi, in particolar modo nel fegato e nei reni (Hamer, 1986). MT-3 ed MT-4 invece sono tessuto-specifiche: MT-3 è espressa preferenzialmente nelle cellule gliali (Uchida *et* al., 1991), ma anche negli organi riproduttivi e nella decidua materna, MT-4 è presente nelle cellule degli epiteli squamosi (Miles *et al.*, 2000). Nell'uomo, in cui si ha il quadro più complesso, i 17 geni fin'ora identificati, 7 dei quali sono pseudo geni, sono raggruppati sul cromosoma 16. Quelli funzionali codificano isoforme multiple di MT-1, generalmente una singola isoforma di MT-2, MT-3 ed MT-4. Nel topo vi sono quattro geni funzionali localizzati sul cromosoma 8. Nel maiale e nella pecora, infine, ne sono stati identificati rispettivamente dieci e quattro (Miles *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda i molluschi, sono state studiate approfonditamente le MT dei bivalvi e dei gasteropodi. In *Mytilus edulis* sono presenti due gruppi principali di isoforme, MT10 e MT20, costituiti rispettivamente da cinque forme dimeriche e quattro monomeriche. La situazione è complessa dal momento che alcune di queste vengono espresse ed indotte in maniera differenziale da metalli diversi. E' stato ipotizzato che il gran numero di isoforme permetterebbe un'alta resistenza alla tossicità causata dalle elevate concentrazioni di metalli assunti con la filtrazione (Barsyte *et al.*, 1999). E' noto che i gasteropodi terrestri tollerano elevate concentrazioni di Cd e Cu accumulandoli nei tessuti molli. In *Helix pomatia* sono state identificate due isoforme di MT, una deputata alla detossificazione da Cd e l'altra implicata nell'omeostasi del Cu in relazione alla biosintesi di emocianina (Dallinger *et al.*, 1997).

Una situazione analoga è stata riscontrata, tra gli artropodi, nel granchio *Callinectes sapidus*, in cui alle due isoforme inducibili dal Cd (una delle quali è indotta però anche da Cu) è attribuita una funzione detossificante. Il Cu induce anche una terza isoforma probabilmente coinvolta nel catabolismo dell'emocianina (Syring *et al.*, 2000). In *Drosophila* sono state identificate quattro MT: MtnA, MtnB, MtnC e MtnD (Zhang *et al.*, 2001; Egli *et al.*, 2003).

Nel nematode *Caenorhabditis elegans* sono presenti CeMT1 ed CeMT2 (Freedman *et al.*, 1993). *Lumbricus rubellus,* invece, possiede due isoforme: MT-1 e MT-2, indotte da Cd (Stürzenbaum *et al.*, 1998). Nei ciliati la maggior parte delle MT caratterizzate sono quelle di specie di Tetrahymena che a seconda della affinità di legame per i metalli (Cd o Cu) si suddividono in CdMT e Cu MT (Gutiérrez *et* al., 2009)

Per quanto riguarda i funghi ed i lieviti, è stato visto che le varie isoforme vengono indotte solamente da Cu. Fa eccezione Zym1, isolata recentemente in *Schizosaccharomyces pombe*, che viene indotta dallo Zn ma non dal Cu (Borrelly *et al.*, 2002). In *Neurospora crassa* è presente una singola isoforma (Münger *et al.*, 1987). In *Candida glabrata* sono state identificate tre isoforme, MTI, MTIIa e MTIIb, le quali sembra giochino ruoli differenti nei processi di omeostasi e

detossificazione da un eccesso di Cu (Winge, 1998). In *Saccharomyces cerevisiae,* elevate concentrazioni di Cu inducono la sintesi di due MT denominate CUP1 e CRS5 (Mehra *et al.*, 1989; Culotta *et al.*, 1994).

In *Arabidopsis* sono state identificate le tre isoforme MT-1, MT-2 ed MT-3 (Murphy *et al.*, 1997); in particolare l'espressione di MT-2 è stata messa in relazione con la tolleranza delle piante al Cu (Murphy e Taiz, 1995; 1997).

Nei batteri infine, oltre a SmtA identificata nel cianobatterio *Synechococcus*, è stata isolata BmtA in *Anabaena, Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* (Blindauer *et al.*, 2002).

1.5 STRUTTURA GENICA ED INDUZIONE TRASCRIZIONALE DI *MT*

I geni che codificano per le MT presentano solitamente una struttura tripartita (fig. 1.3) in cui tre esoni sono intervallati da due introni (Samson e Gedamu, 1998).

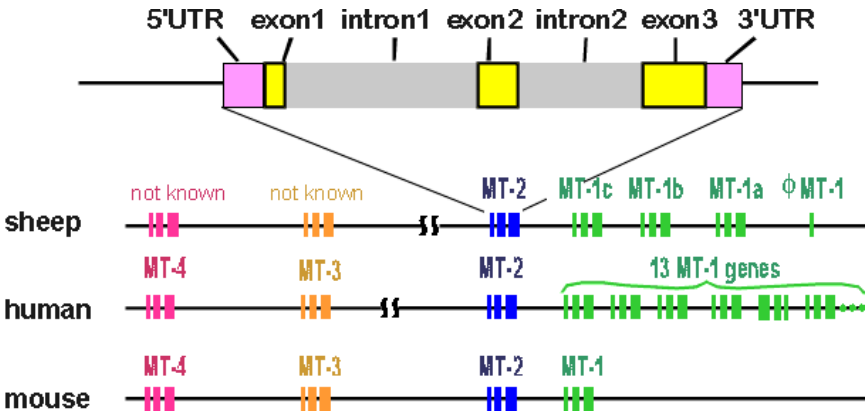


Figura 1.3 Schema dell'organizzazione genica delle MT in tre specie di mammifero (Binz PA, 2003).

A questo modello generale fanno eccezione le MT di *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* e *Neurospora crassa,* nelle quali è presente un solo introne (Maroni *et al.*, 1986; Münger *et al.*, 1987; Silar *et al.*, 1990; Freedman *et al.*, 1993), e le MT di *Saccharomyces cerevisiae* e di *Candida glabrata*, che non presentano introni (Karin *et al.*, 1984; Culotta *et al.*, 1994; Mehra *et al.*, 1989).

L'assenza di introni si osserva anche nelle MT di *Tetrahymena* (Gutiérrez *et* al., 2009).

Da dati statisticamente significativi di letteratura (Jeffares *et* al., 2008) risulta che i geni caratterizzati da rapidi cambiamenti di livelli di espressione in risposta allo stress contengono un numero minore di introni. É stato proposto che gli introni possono ritardare la risposta regolativa e

tendono a mancare nei geni, i quali livelli trascrizionali necessitano rapidi cambiamenti per la sopravvivenza ai cambiamenti ambientali.

Il controllo della sintesi delle MT avviene soprattutto a livello trascrizionale (Klaassen *et al.*, 1999; Saydam *et al.*, 2002). Sebbene, come accennato in precedenza (sezione 1.3), uno svariato numero di agenti e condizioni siano in grado di indurre la biosintesi delle MT, i metalli ne rappresentano i più comuni e potenti induttori (Kägi, 1991; 1993).

La trascrizione metallo-indotta è mediata da particolari sequenze presenti nei promotori dei geni delle MT e chiamate MRE (**M**etal **R**esponsive **E**lements) (Karin *et al.*, 1984; Samson e Gedamu, 1998). Essi sono presenti in multiple copie in entrambi gli orientamenti (*forward* e *reverse*) e agiscono in modo sinergico nella trascrizione (Samson e Gedamu, 1998). Sono costituiti da sequenze consenso di 15 pb ricche in GC, caratterizzate da una regione *core* **TGCRCNC** molto conservata (dai nematodi sino all'uomo) e da due porzioni fiancheggianti più variabili (Klaassen *et al.*, 1999; Ghoshal e Jacob, 2001).

MTF-1 (Metal Transcription Factor-1) è il fattore che, legandosi specificatamente agli MRE, determina la trascrizione genica indotta dai metalli (Radtke *et al.*, 1993; Heuchel *et al.*, 1994). Il fattore di trascrizione MTF-1, clonato per la prima volta nel topo (Radtke *et* al., 1993), è stato successivamente caratterizzato in molte specie animali quali uomo (Otsuka *et* al., 1994), *Takiugu rubripes* (Auf der *et* al., 1999), *Danio rerio* (Chen *et* al., 2002)*, Oncorhynchus mykiss* (Dalton *et* al., 2000), *Drosophila melanogaster* (Zhang *et* al., 2001) e nel pollo (Laity e Andrews, 2007). MTF-1 (fig. 1.4) contiene un dominio a sei dita di zinco della famiglia Cys2-His2, tre domini di attivazione della trascrizione e la sequenza putativa di esclusione (NES) e di localizzazione nucleare (NLS) (Saydam *et* al., 2001).

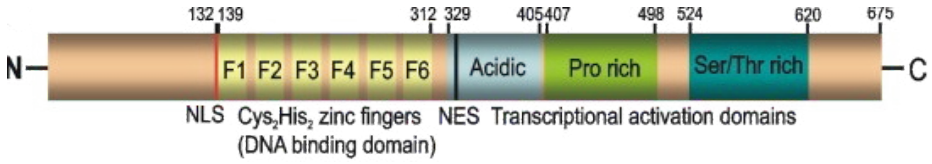


Figura 1.4 La struttura a domini della proteina MTF-1 nel topo (Radtke *et* al., 1993).

Presenta una struttura primaria molto conservata, soprattutto nel dominio a dita di Zn che è quello che si lega al DNA (Smirnova *et al.*, 2000; Saydam *et al.*, 2002).

Nonostante la trascrizione dei geni delle MT venga indotta da molteplici fattori, i modelli proposti per spiegare la modalità di azione di MTF-1 si sono rivelati direttamente applicabili solo nel caso dell'induzione da parte dello Zn (Palmiter, 1994; Roesijadi, 1996; Bittel *et al.*, 1998).

MTF-1 presenta molteplici potenziali siti di fosforilazione che, secondo alcuni autori, sarebbero

coinvolti nella regolazione trascrizionale (Saydam *et* al., 2002).

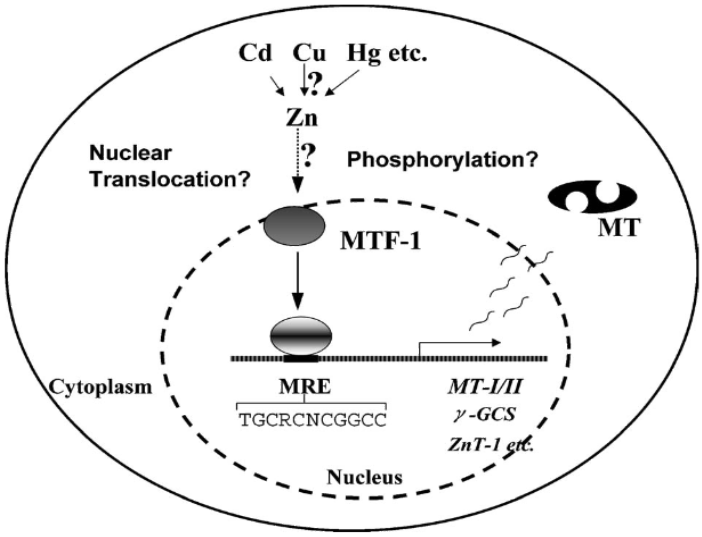


Figura 1.5 I meccanismi previsti coinvolgenti il fattore di trascrizione MTF-1 nell'attivazione trascrizionale dei geni *MT-1* e *MT-2* (Otsuka *et* al., 2007).

Altri elementi regolativi riscontrati nei geni delle MT sono gli ARE (**A**ntioxidant **R**esponsive **E**lements) la cui regione consenso (**TGACNNNGC**) media l'induzione anche di altri geni (glutatione S-transferasi e chinone reduttasi) in risposta al perossido d'idrogeno (Andrews, 2000). Sono presenti inoltre siti di legame per il fattore di trascrizione USF (**U**pstream **S**timulatory **F**actor) (**CRCGTGRY**), che è noto a regolare positivamente e negativamente la trascrizione di una vasta gamma di geni. Da studi condotti su MT-1 di topo è stato visto che USF interagirebbe con fattori di trascrizione che si legano agli ARE in seguito a trattamento con Cd e perossido d'idrogeno (Andrews, 2000).

Ancora altri elementi regolativi sono costituiti dal GC box (vi si lega il fattore di trascrizione Sp1), dai BLE (**B**asal **L**evel **E**nhancers), che sono siti di attacco per AP1 ed AP2 (essi mediano la trascrizione indotta da fattori di crescita, da esteri forbolici e da attivatori delle vie delle protein-chinasi A e C) e dai GRE (**G**lucocorticoid **R**esponsive **E**lements) (Samson e Gedamu, 1998).
Generalmente, tra tutti questi ultimi elementi regolativi, nei teleostei sono presenti AP1 e SP1.

Sull'elemento regolativo AP-1 (**TGAG/CTCA**) (Hess *et* al., 2004) si lega il fattore di trascrizione AP-1. Esso è una proteina eterodimerica composta da proteine che appartengono alle famiglie proteiche di c-Fos, c-Jun, ATF e JDP. Questo fattore di trascrizione regola l'espressione genica in risposta ad una varietà di stimoli che sono citochine, fattori di crescita, stress ed infezioni da batteri e virus, rendendosi importante nel controllo trascrizionale per i processi cellulari di differenziamento, proliferazione e apoptosi.

Come AP-1, anche Sp-1 è un fattore di trascrizione. Esso è una proteina *zinc-finger*. Tramite il motivo *zinc-finger* questo fattore di trascrizione si lega direttamente al DNA e successivamente amplia la trascrizione genica (Poncelet e Schnaper, 2001). I motivi *zinc-finger* sono quelli di tipo Cys2/His2 e legano la sequenza consenso [**(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)**], conosciuta come elemento GC box.

Mentre gli elementi regolativi *cis* presenti nel promotore di MT possono essere unici per un gene o una specie, quelli comuni a tutti gli invertebrati e vertebrati sono gli MRE, i quali sono sempre presenti in copie multiple.

1.6 MT IN TELEOSTEI

Come già detto lo studio della struttura e della funzione proteica delle metallotioneine è stato maggiormente focalizzato sulle metallotioneine dei mammiferi e di alcune specie di invertebrati. Poca attenzione è stata rivolta allo studio della struttura terziaria delle metallotioneine nei vertebrati (Capasso *et* al., 2002). I geni delle MT di diversi gruppi tassonomici dimostrano importanti caratteristiche distintive che sono:

- posizionamento diverso e numero differente degli MRE (Scudiero *et* al., 2001);
- sequenze diverse della regione non tradotta al 3' (3' UTR) e al 5' (5' UTR) (Scudiero *et* al., 1997a,b);
- numerose sostituzioni aminoacidiche nelle posizioni non occupate dalle cisteine (D'Auria *et* al., 2001)

Generalmente la regione N-terminale è quella più variabile e mostra caratteristiche classe specifiche che la rendono responsabile delle proprietà antigeniche delle proteine (Kille *et* al., 1994).
Inoltre, membri della stessa unità tassonomica hanno in comune caratteristiche peculiari. Per esempio, le sequenze di MT degli uccelli contengono istidina (Andrews *et* al. 1996), amino acido raramente presente nelle altre MT, questo è l'unico caso nei vertebrati.

Le MT dei pesci sono caratterizzate dalla diversa posizione della nona cisteina nel dominio alfa, cosi che il motivo CXXC delle MT di mammiferi diventa CXXXC, portando a cambiamenti strutturali importanti (Capasso *et* al., 2003).

Le metallotioneine dei teleostei sono caratterizzate da un'elevata plasticità e flessibilità e sono meno idrofobiche rispetto a quelle dei mammiferi. (Scudiero *et* al., 2004).

Tranne che *Noemachelius barbatulus* (Kille *et* al., 1993), *Esox lucius* (Kille et al., 1993), *Carassus auratus* (Chan, 1994) e *Tilapia mossambica* (Chan, 1994), nelle quali è stato clonato solo 1 isoforma di MT, in tutte le altre specie di teleostei sono state identificate e caratterizzate 2 isoforme (Ren *et* al., 2006).

Come le MT di vertebrati, le MT dei teleostei presentano una struttura genica (fig. 1.6) composta dalla sequenza del promotore, localizzata al 5' terminale, e le UTR, tre esoni separati da due introni e la regione intergenica al 3' terminale (Samson e Gedamu, 1998).

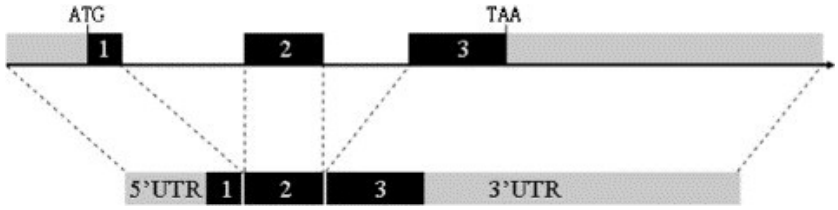


Figura 1.6 Rappresentazione schematica della struttura del gene MT-II di *Carassius cuvieri* (in alto) e del cDNA (in basso). I rettangoli indicano gli esoni. I rettangoli neri rappresentano parti della regione codificante. I rettangoli grigi indicano le regioni non tradotte (Ren *et* al., 2006).

I promotori di *Oncorhynchus mykiss* (Zafarullah *et* al., 1988; Olsson *et* al., 1995), *Oncorhynchus nerka* (Chan e Devlin, 1993), *Esox lucius* (Kille *et* al., 1993), *Nemacheilus barbatulus* (Killie *et* al., 1993), *Chionodraco hamatus* (Scudiero *et* al., 2001), MT-II di *Danio rerio* (Yan e Chan, 2002, 2004; Chen *et* al., 2004), MT-I di *Cyprinus carpio* (Chan *et* al., 2004), MT-I (He *et* al., 2007) e MT-II (Ren *et* al., 2006) di *Carassius carassius* e quello di *Oreochromis aureus* (Cheung *et* al., 2005) contengono MRE multipli allo scopo di massimizzare l'attività genica. La loro posizione è variabile rispetto al TATA box.

La caratterizzazione della struttura genica e del promotore delle MT nei teleostei ha permesso di trarre informazioni importanti sui meccanismi che portano alla regolazione dell'espressione delle MT (Ren *et* al., 2006).

L'argomento di questa tesi è focalizzato, oltre che sulla caratterizzazione delle metallotioneine in un gruppo di organismi, i Notothenioidei antartici, anche sull'aspetto evolutivo.

1.7 I NOTOTHENIOIDEI

L'oceano Antartico circonda l'Antartide e diversamente dagli altri oceani che si trovano all'interno di un proprio bacino, è delimitato e definito dal Fronte Polare Antartico, localizzata tra 50°S e 60°S. L'area tra il Fronte Polare e la margine continentale, racchiude il 10% dell'acqua degli oceani (Laws, 1985) e costituisce la regione geografica antartica.

Si pensa che l'apertura del Passaggio di Drake (approssimativamente 34-30 milioni di anni fa) e la formazione della Corrente Circumpolare Antartica portò all'isolamento termico dell'Antartide, seguito successivamente da diversi eventi di glaciazione (Livermore et al. 2005). Le condizioni climatiche attuali si pensa siano state raggiunte nel corso del Miocene medio (10–14 milioni di anni fa; Kennett 1977). In effetti, all'inizio del Miocene (25-22 milioni di anni fa) la piattaforma del continente Antartico fu soggetta ad una serie di eventi tettonici e oceanografici che probabilmente alterarono la composizione della fauna. Gradualmente ebbe luogo l'isolamento e il raffreddamento dell'Antartide. L'espansione degli strati di ghiaccio portò alla distruzione e al disturbo degli habitat vicino alla costa (Anderson, 1999). Probabilmente, la perdita degli habitat e i cambiamenti nella struttura trofica dell'ecosistema portarono alla estinzione locale di molte componenti della fauna ittica dell'Eocene. La riduzione della diversità della fauna e l'isolamento dell'Antartide resero disponibili nuove nicchie per gli altri gruppi di organismi che si stavano diversificando *in situ* (i Notothenioidei) o che stavano migrando verso (Liparidae e Zoarcidae) questo nuovo ecosistema. Nella regione antartica esistono 222 specie di teleostei bentonici che costituiscono la componente maggiore della fauna antartica (87,8% delle specie). Sono rappresentati da due gruppi di perciformi (il sottordine dei Notothenioidei e degli Zoarcidae) e da membri di una famiglia dell'ordine scorpaeniformi (Liparidae). I nototenioidi sono la componente indigena della fauna dell'emisfero meridionale che evolvero *in situ* **(**Andriashev, 1965), mentre l'antenato dei Liparidae moderni dell'Antartide sembra sia originario del Pacifico settentrionale e successivamente si disperse nell'Antartide passando per la costa occidentale dell'America del Sud durante il Miocene (Andriashev 1991). Anche i Zoarcidae hanno l'origine dal Pacifico settentrionale. Essi si dispersero verso l'emisfero meridionale durante il Miocene e successivamente si diffusero in Antartide dove mostrano l'area maggiore di endemismo (Anderson 1994).

La fauna moderna dei pesci è limitata tassonomicamente, altamente endemica ed esclusivamente dominata dai pesci del sottordine dei Notothenioidei riguardo al numero delle specie, all'abbondanza e alla biomassa (Eastman e McCune, 2000; Eastman, 2005). Questa dominanza è il risultato delle più interessanti risposte biologiche al verificarsi delle condizioni polari nell'oceano Antartico. Le riposte evolutive sono state a livello organismico, fisiologico e molecolare.

I Notothenioidei attuali sono stenotermi adattati ad ambienti freddi (Somero e DeVries, 1967). Questo caratteristica riflette i cambiamenti adattativi che questi organismi hanno evoluto in modo da avere una stabilità a livello molecolare e cellulare per un funzionamento ottimale in queste condizioni estreme. Esempi di adattamenti evolutivi sono:

- assemblaggio efficiente dei microtubuli (Williams *et* al, 1985; Detrich *et* al., 1989; Detrich *et* al., 2000; Paluh *et* al., 2004) e trasporto proteico attraverso il reticolo endoplasmatico (Römisch *et* al., 2003) a temperature basse;
- alti livelli di insaturazione lipidica delle membrane per l'adattamento omeoviscoso (Logue *et* al., 2000);
- proteine cristalline delle lenti oculari altamente resistenti al freddo per mantenere la trasparenza giusta nelle lenti in temperature tali che causerebbero la cataratta dovuta al freddo nei pesci delle acque temperate o nei mammiferi (Kiss *et* al., 2004)
- perdita della inducibilità della risposta fisiologica *heat shock* a temperature ambientali costantemente basse (Hofmann *et* al., 2000; Buckley *et* al., 2004).

Particolarmente l'adattamento evolutivo è evidente in due cambiamenti genetici a larga scala:

- acquisizione di nuove proteine anticongelamento, indispensabili per la sopravvivenza nelle condizioni estreme tipiche di questo ambiente marino;
- in alcune specie (i Channichthyidae) perdita di emoproteine leganti l'ossigeno

I Notothenioidei si suddividono in otto famiglie (fig. 1.7) che, allo stato attuale, comprendono un totale di 44 generi e 129 specie, di cui 101 antartici e 28 non-antartici (Eastman, 2005). Le 101 specie antartiche costituiscono circa il 45% delle specie dei teleostei bentonici nella regione antartica.

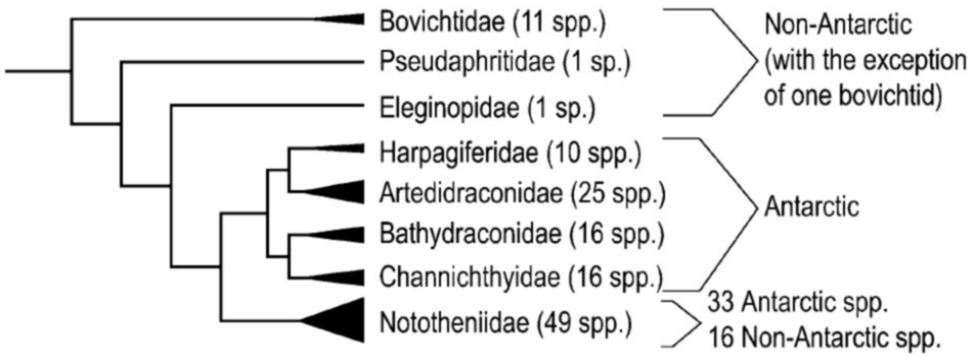


Figura 1.7 Cladogramma delle relazioni filogenetiche tra i Notothenioidei, riportati a livello delle famiglie (Near *et* al., 2004).

Non è l'elevato numero di specie, ma la natura della biodiversità dei teleostei che distingue l'Antartide dalle altre aree geografiche nel mondo. Un aspetto importante che caratterizza "la natura della biodiversità" è che in contrasto alla radiazione evolutiva di altri pesci, i quali possono mostrare diversità filetica ma modesta diversità ecologica e morfologica (Brooks and McLennan 1991; Mayden, 1992; Near *et* al. 2003c),, la radiazione di alcuni membri di Notothenioidei, per esempio i Nototeniidae, esibisce una diversità ecologica e morfologica considerevole. In assenza di competizione da parte di una fauna tassonomicamente diversa, i Notothenioidei andarono incontro alla diversificazione correlata all'habitat o alla profondità, adattandosi all'utilizzo delle nicchie disponibili in varie profondità. La diversificazione dei Notothenioidei è centralizzata nell'alterazione della galleggiabilità. Anche se mancano della vescica natatoria, la riduzione della densità, che porta ad un galleggiamento passivo, è stata raggiunta in alcune specie tramite la combinazione della riduzione della mineralizzazione dello scheletro e la deposizione dei lipidi **(**DeVries e Eastman, 1978; Eastman e DeVries, 1981; 1982; Eastman 1993). Le cinque famiglie di Notothenioidei antartici sono andate incontro a diversi gradi di diversificazione morfologica ed ecologica. La famiglia dei Nototheniidae costituisce la famiglia più ampia e rappresenta un caso estremo riguardo alla diversificazione delle sue specie (fig. 1.8).

-Nototheniidae

Questa famiglia di 49 specie è andata incontro più sostanziale diversificazione ecologica e morfologica del sottordine di Notothenioidei.

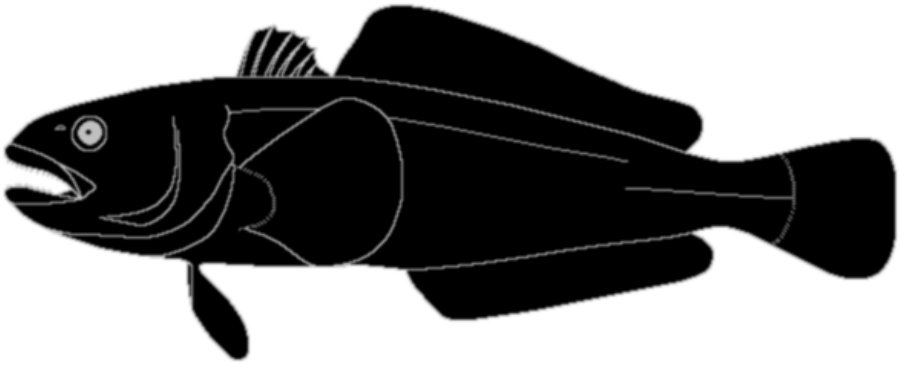


Figura 1.8 Disegno che rappresenta un membro della famiglia di Nototheniidae (Nelson, 1994)

Circa la metà delle 33 specie antartiche occupano l'ancestrale habitat bentonico e le altre specie sono semipelagiche, epibentoniche, criopelagiche e pelagiche (Eastman 1993). Esistono anche i gruppi intermedi composti da Notothenioidei definiti semipelagici, epibentonici e criopelagici che possono essere considerate come specie bentopelagiche partendo dal fatto che sono caratterizzate da una plasticità trofica ed ecologica. Per esempio, nei membri bentonici di questa famiglia è stata riportato un elevato grado di planctivoria (Foster e Montgomery, 1993). Il tipo di radiazione evolutiva, conosciuta con il termine pelagisazione, è avvenuta indipendentemente nelle diverse clade della famiglia dei Nototheniidae (Klingenberg e Ekau, 1996; Bargelloni *et* al. 2000). La diversità ecologica è aumentata ulteriormente dal *shift* dell'habitat durante l'ontogenesi subita da alcune specie durante la transizione dallo stadio giovane a quello adulto. Gli esempi sono *Nototthenii*a *rossi* dove avviene lo *shift* da pelagico a bentonico (Burchett, 1983) e *Dissostichus mawsoni*a nel quale avviene lo *shift* bentonico-pelagico coinvolgendo cambiamenti considerevoli nella galleggiabilità e nella profondità dell'habitat (Near *et* al., 2003).

-Harpagiferidae

Comprendono un unico genere di nove specie simili dal punto di vista ecologico e morfologico che principalmente sono andate incontro alla diversificazione filetica (fig. 1.9).

Figura 1.9 Disegno che rappresenta un membro della famiglia di Harpagiferidae (Hureau, 1990)

La maggior parte di loro sono pesci bentonici che vivono vicino alla costa e che possono anche essere chiamati criptobentonici poichè sono piccoli e quasi invisibili. Gli Harpagiferidae hanno un'ampia distribuzione non sovrapponibile nelle varie isole vicino alla periferia della regione antartica. Recentemente sono state scoperte nuove specie alla profondità di 320 m (Prirodina, 2000, 2002, 2004). Questo indica l'esistenza di una leggera diversificazione ecologica estesa nelle acque più profonde.

-*Artedidraconidae*

Sono diversi riguardo alla dimensione, partendo dalle piccole dimensioni (alcune specie di *Artedidraco*) a quelle grandi (alcune specie di *Pogonophryne*) (fig. 2.0). Queste specie di Notothenioidei non sono morfologicamente o ecologicamente diverse, dato che sono tutte bentoniche con un barbiglio del mento che ha una funzione ancora non chiara. *Pogonophryne*, il genere che contiene più specie all'interno del sottordine, contiene 17 specie morfologicamente simili; proprio questa elevata somiglianza rende questo gruppo difficili da definire tassonomicamente. Questo genere è un esempio di radiazione evolutiva all'interno della radiazione evolutiva dei Notothenioidei; le specie di *Pogonophryne* hanno subito principalmente la diversificazione filetica.

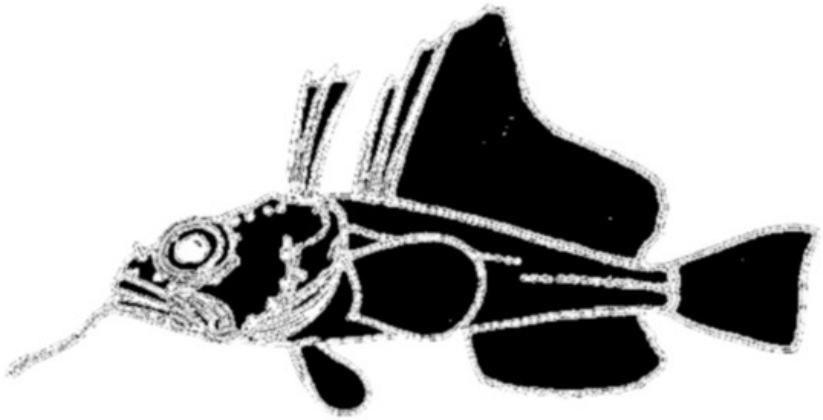


Figura 2.0 Disegno che rappresenta un membro della famiglia di Artedidraconidae (Eakin, 1990)

-Bathydraconidae

Hanno un corpo allungato e mostrano diversificazione moderata in forma, variando da una forma moderatamente robusta e di muscolatura spessa a quella magra e delicata (fig. 2.1).

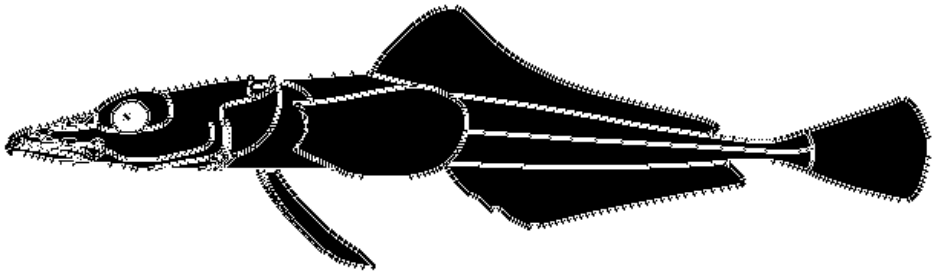


Figura 2.1 Disegno che rappresenta un membro della famiglia di Bathydraconidae (Nelson, 1984)

Queste specie contano meno sulle risorse di cibo bentonico rispetto a Harpagiferidae e Artedidraconidae. Il genere Bathydraconidae comprende le specie delle profondità più elevate

(DeWitt, 1971, 1985), con *B. scotiae* avvistata ad una profondità di oltre 2.950 m (Gon, 1990). Poiché questa famiglia contiene anche specie delle basse profondità, i Batidraconidi mostrano di estendersi nel *range* più grande di profondità tra tutte le famiglia di Notothenioidei.

-*Channichthyidae*

I membri di questa famiglia sono pesci di forma fusiforme simile a quello del luccio con testa grande e muso allungato e concavo (fig. 2.2). Tutte le specie mancano di emoglobina e sono i Notothenioidei con maggiore lunghezza corporea totale da adulti, che va da 25 a 75 cm (Iwami e Kock, 1990). Buona parte di loro hanno combinato lo stile di vita pelagico con quello bentonico esibendo un'attiva migrazione verticale per cibarsi di prede pelagiche. Si alimentano principalmente di pesci e krill. *Dacodraco hunteri*, caratterizzato da densità ridotta e stile di vita pelagico, è la specie più specializzata in questa famiglia (Eastman, 1999). Dato che il processo ascendente dell'osso tra le mascelle è andato perso (Iwami, 1985), essi non sono obbligati ad essere esclusivamente carnivori bentonici (Voronina e Neelov, 2001).

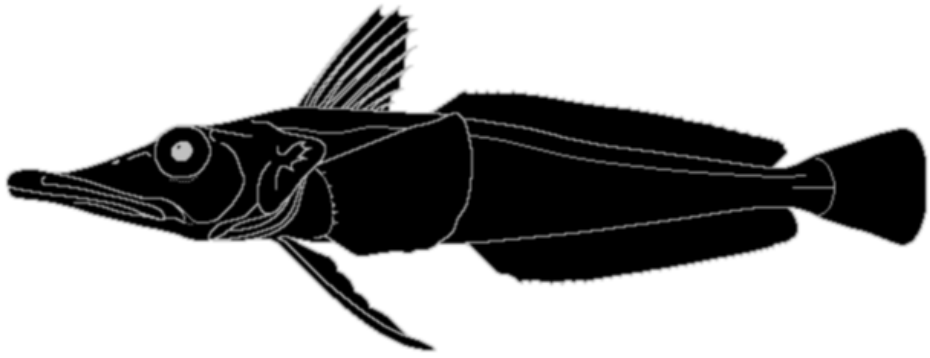


Figura 2.2 Disegno che rappresenta un membro della famiglia di Channichthyidae (Nelson, 1994)

Si pensa che la radiazione dei Notothenioidei sia stato un evento macroevolutivo che portò come risultato alla diversificazione a livello della famiglia, anche se alcuni generi hanno subito un'altra

radiazione evolutiva. La radiazione dei Notothenioidei, in particolare quella dei Notothenioidei antartici, assomiglia di più alla radiazione adattativa per il fatto che soddisfa la maggior parte dei criteri definiti da Losos e Schluter (2001):

1. antenato comune;
2. correlazione fenotipo-ambiente;
3. utilità dei tratti anatomici
4. e speciazione rapida.

Comunque, la radiazione evolutiva complessiva dei Notothenioidei può comprendere anche radiazioni non adattative (Losos e Schluter, 2001) come quelle del genere *Pogonophryne* dove la diversificazione delle 17 specie è stata accompagnata dall'irrilevante differenziamento ecologico. La rapidità di speciazione resta ancora da essere definita nella maggior parte del clade dei Notothenioidei.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Nell'ambito del problema più generale sull'evoluzione delle MT, l'attenzione di questa ricerca è stata focalizzata sull'evoluzione molecolare di queste metalloproteine in un gruppo ristretto di Teleostei, i Notothenioidei antartici. I Notothenioidei rappresentano un sottordine dei Perciformes e costituiscono un gruppo monofiletico di pesci (Balushkin, 2000) endemico nell'Oceano del Sud ed assente nell'Emisfero Boreale.

Sono attualmente conosciute 8 famiglie costituite da specie antartiche e non-antartiche. Le specie antartiche si trovano separate da quelle non-antartiche dalla barriera oceanografica della Corrente Circumpolare Antartica (CCA), la quale crea il fronte polare antartico. La CCA rappresenta una barriera chimico-fisica che ostacola lo spostamento dei pesci in entrambe le direzioni.

É stato stimato che la CCA si sia formata circa 25-22 milioni di anni fa, però le condizioni atmosferiche attuali sono state raggiunte nel Miocene medio (15-10 milioni di anni fa) e sono esse che hanno portato all' isolamento delle specie antartiche. Si pensa quindi che i Notothenioidei si siano diversificati recentemente (circa 15-10 milioni di anni fa). Per questi motivi essi rappresentano un soggetto interessante per effettuare studi evolutivi a livello comparativo.

Le relazioni filogenetiche tra i taxa dei Notothenioidei si basano sia su dati morfologici (Balushkin, 2000) sia su dati molecolari (Near *et* al., 2004). Ciò ha facilitato il lavoro del mio dottorato di ricerca teso ad analizzare l'evoluzione molecolare delle MT nei Notothenioidei antartici.

Gli obiettivi prefissati sono qui di seguito elencati:

1. Caratterizzazione delle sequenze di cDNA dei geni codificanti per le MT, in modo da poter successivamente effettuare le analisi filogenetiche basandosi sia sulle sequenze della regione codificante che delle UTR.

2. Analisi della composizione in esoni ed introni di questi geni, in particolare determinazione delle sequenze degli introni. Infatti in seguito a studi effettuati su altri organismi, le sequenze introniche si sono rivelate utili ad effettuare analisi filogenetiche (Grauer *et* al.,

2000). E' quindi di notevole importanza verificare se tali sequenze possano essere utili per studiare anche l'evoluzione di geni delle MT in queste specie di teleostei che si ritiene si siano diversificate recentemente.

3. Caratterizzazione dei promotori delle diverse isoforme di MT, in relazione alle loro possibili differenze strutturali. È noto infatti che sono presenti differenze nel controllo trascrizionale dei geni codificanti per le differenti isoforme di MT anche nei teleostei antartici (Bargelloni *et* al. 1999).

4. Analisi dell'evoluzione molecolare delle MT utilizzando le sequenze fin'ora note dei promotori delle MT di teleostei e quelle da me riportate. Heygood e suoi collaboratori (2007), usando le sequenze dei promotori delle MT dei mammiferi, hanno determinato con elevata precisione relazioni filogenetiche.

3. PROCEDURE SPERIMENTALI

3.1 ORGANISMI UTILIZZATI

Le specie di Notothenioidei analizzate nel nostro laboratorio (tab. 1.0) appartengono a quattro delle cinque famiglie di Notothenioidei antartici.

Famiglia	Specie	Stile di Vita
Nototheniidae	*Pleuragramma antarcticum*	Pelagico (Miller, 1993)
	Gobbionotothen gibberifrons	Semipelagico (Dewitt *et* al., 1990)
	Trematomus bernacchii	Bentonico (Dewitt *et* al., 1990)
	Trematomus hansoni	Bentonico (Miller, 1993)
	Trematomus pennellii	Bentonico (Miller, 1993)
	Trematomus newnesi	Semipelagico (Miller, 1993)
	Trematomus lepidorhinus	Bentopelagico (Dewitt *et* al., 1990)
	Trematomus eulepidotus	Epibentonico (Fischer e Hureau, 1985)
Artedidraconidae	*Histiodraco velifer*	Bentopelagico (Eakin, 1990)
Bathydraconidae	*Gymnodraco acuticeps*	Bentonico (Gon, 1990)
	Cygnodraco mawsoni	Semipelagico (Gon, 1990)
Channichthyidae	*Chionodraco hamatus*	Bentonico (Iwami e Kock, 1990)

Tabella 1.0 Le specie analizzate nel nostro laboratorio.

Come viene mostrato nella tabella, le specie che abbiamo analizzato, anche se appartengono alla stessa famiglia (Nototheniidae e Bathydraconidae), hanno stili di vita diversi e anche all'interno dello stesso genere di *Trematomus* lo stile di vita cambia tra le diverse specie. Quindi abbiamo scelto di utilizzare un numero maggiore si specie appartenenti alla famiglia dei Nototheniidae, poiché si pensa che all'interno di questa famiglia sia avvenuta la diversificazione ecologica anche all'interno di un unico genere (*Trematomus*). Tutte le specie mostrate nella tabella vivono all'interno della regione antartica delimitata dal fronte polare antartico. *Pleuragramma antarcticum,* essendo un organismo pelagico-oceanico, si muove lungo il fronte polare antartico, mentre *Gobbionotothen gibberifrons* si può trovare anche fuori del fronte polare.

Gli individui di queste specie sono stati campionati presso la Baia di Terra Nova, nel mare di Ross (74°42'S, 164°7'E), su cui si affaccia la base permanente Italiana "Mario Zucchelli", nel corso della 21ª campagna italiana in Antartide da dottor Gianfranco Santovito. Gli esemplari utilizzati per la sperimentazione sono stati pescati a circa 30 metri di profondità. Sono stati sacrificati ed è stato asportato tessuto epatico, immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo in Italia.

3.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

3.2.1 ESTRAZIONE DEL RNA TOTALE

L'RNA totale è stato purificato da fegato o muscolo scheletrico. Per prevenire la degradazione dell'RNA da parte delle RNAsi tutto il materiale utilizzato nell'estrazione è stato preventivamente trattato *overnight* in una soluzione di dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC) e in seguito autoclavato. Una piccola porzione di tessuto (circa 50-100 mg) conservato a -80°C è stata omogeneizzata con 1 ml di TRIzol, sufficiente per la lisi di 5-10 $x10^6$ cellule di tessuto epatico.

Tale reagente contiene guanidina isotiocianato che presenta un'azione litica nei confronti delle cellule e fenolo che serve per la successiva estrazione fenolo-cloroformio dell'RNA. L'aggiunta di cloroformio e la successiva centrifugazione a freddo, permettono la separazione del materiale estratto in tre fasi: la fase superiore è costituita da RNA, la fase intermedia da DNA, quella inferiore da TRIzol e altri componenti cellulari come proteine e lipidi. Una volta prelevato l'RNA, è stato fatto precipitare grazie all'azione dell'alcool isopropilico. Il *pellet* contenente l'RNA totale è stato lavato con etanolo al 75%, lasciato asciugare e infine risospeso in acqua *RNAse free overnight* a 4°C.

3.2.2 QUANTIFICAZIONE E VERIFICA DELL'INTEGRITÀ DELL'RNA

L'RNA estratto è stato quantificato effettuando misure di assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Il valore ottenuto è stato moltiplicato per 40 ng/µl in quanto questo rappresenta il coefficiente di estinzione molare del RNA.

È stata effettuata anche la misura a 280 nm, in quanto il rapporto fra le due lunghezze d'onda (A_{260}/A_{280}) da un'indcazione sul grado di purezza dell'RNA: il valore deve essere compreso tra 1,9 e 2,1 poiché un valore superiore indicherebbe una contaminazione da DNA, mentre uno inferiore indicherebbe una contaminazione da proteine.

Infine è stata verificata l'integrità dell'RNA mediante un'elettroforesi in gel d'agarosio e formaldeide all'1%. L'RNA integro dovrebbe risultare visibile, dopo la colorazione in etidio bromuro, come due bande corrispondenti all'RNA ribosomale (28S e 18S).

3.2.3 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

Per l'estrazione del DNA genomico è stato utilizzato il kit commerciale ZR Genomic DNA II Kit™ serve per il rapido isolamento del DNA totale (genomico, mitocondriale o virale) da vari campioni biologici.

Circa 30-40 mg di tessuto congelato è stato omogeneizzato in 500 µl di Genomic Lysis Buffer. Il lisato è stato successivamente centrifugato alla velocità massima per 5 min e dopo il supernatante è stato trasferito in una colonnina Zymo-Spin™. Dopo un'altra centrifugazione a velocità massima (1 min), la colonnina Zymo-Spin™ è stata trasferita in un altro tubo *DNAsi free* e sono stati aggiunti 200 µl di DNA Pre-Wash Buffer. Successivamente è stata effettuata un'altra centrifugazione a velocità massima per 1 min seguita da aggiunta di un altro buffer che serve anche questo per aumentare il grado di purezza del DNA genomico (500 µl di g-DNA Wash Buffer). Dopo l'ultima centrifugazione per 1 min a velocità massima, in un tubo da 1,5 ml *DNAsi free* si inserisce la colonnina e si aggiungono 50 µl di DNA Elution Buffer, si lascia a temperatura ambiente per 2-5

min e dopo si centrifuga tutto a velocità massima per 30 sec. Il DNA eluito viene conservato a -20°C.

3.2.4 QUANTIFICAZIONE E VERIFICA DELL'INTEGRITÀ DEL DNA

Per determinare la quantità di DNA estratto, ne è stata misurata la $D.O._{260}$. Il valore ottenuto è stato moltiplicato per 50 ng/µl, il coefficiente di estinzione molare del DNA. Si sono inoltre potute valutare le eventuali contaminazioni da proteine effettuando il rapporto $D.O._{260}/D.O._{280}$

Valori compresi tra 1.8 e 2.0 sono indice di un buon livello di purezza.

Per controllare l'integrità del DNA è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0.5% in tampone TAE 1X. La presenza di una singola banda ad alto peso molecolare indica che il DNA non è degradato.

3.3 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA ED AMPLIFICAZIONE DEL cDNA

3.3.1 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA TOTALE IN cDNA

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato come stampo circa 1 µg di RNA totale, al quale sono stati aggiunti 1 µl del *primer* Anchor Oligo (dT) (10 µM) (tab. 1.1) e acqua DEPC fino ad un volume totale di 15,5 µl. La miscela è stata incubata a 70°C per 10 min per denaturare l'RNA. Dopo che la miscela di soluzioni era stata lasciata in ghiaccio per 1 min, sono stati aggiunti:

10X PCR buffer.....2,5 µl

25 mM $MgCl_2$.....2,5 µl

10 mM dNTP mix.....1,0 µl

0,1 M DTT.....2,5 µl

Volume Finale.....8,5 µl

Il volume complessivo delle 2 miscele deve essere 24 µl. Si aggiunge 1 µl di SuperScript™ II RT e si mette tutto nel termociclatore impostato con questo programma:

- 42 °C per 30 min
- 70 °C per 15 min.

3.3.2 AMPLIFICAZIONE DEL cDNA

La miscela della retrotrascrizione è stata utilizzata per l'amplificazione di una porzione centrale del cDNA relativa alle due isoforme di MT mediante la PCR con primer specifici (tab. 1.1).

La miscela di reazione contiene:

H_20 sterile.....36,0 µl

Reaction Buffer 10X,

fornito con DNA polimerasi

contenente: 166mM $(NH_4)_2SO_4$

Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C)

0,1%Tween-20.....5,0 µl

50mM $MgCl_2$….....1,5 µl

10 mM dNTPs.....1,0 µl

Primers forward (10 µM).....2,0 µl

Primers reverse (10 µM).....2,0 µl

cDNA.....3,0 µl

Amplibiotherm DNA Polymerase (5 u/µl)

(Fisher Molecular Biology).....0,5 µl

Volume Finale.....50,0 µl

La miscela nel termociclatore è stata sottoposta al seguente programma:

94°C per 2 min

	94°C per 1 min
30 cicli	55-58°C (a seconda della Tm dei *primers*) per 1 min
	72°C per 2 min

72°C per 10 min.

3.4 RACE (*RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS*)

La RACE è una procedura utilizzata per l'amplificazione di sequenze di cDNA, a partire da un templato di mRNA, comprese tra un determinato sito noto all'interno della sequenza e una sequenza non conosciuta ad una delle due estremità.

3.4.1 3' RACE

Questa metodica sfrutta la coda di *poly A*, naturalmente presente all'estremità 3'-terminale dell'mRNA, come generico sito di attacco per un *primer* Anchor Oligo (dT) (tab. 1.1), nella reazione di retrotrascrizione del cDNA. Per determinare la regione 3'UTR è stata effettuata una normale amplificazione dove sono stati usati come *primer reverse* l'Anchor Primer e come *primer forward* un *primer* specifico per la sequenza di interesse (tab. 1.1), costruito sulla base della sequenza nota. La reazione è stata effettuata con il seguente programma:

94°C per 2 min

	94°C per 30 sec
35 cicli	55-59°C (a seconda della Tm dei *primers*) per 30 sec
	72°C per 1,5 min

72°C per 5 min.

3.4.2 5' RACE

Per la 5' RACE è stato utilizzato il kit commerciale dell'Invitrogen™, 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Version 2.0). L'applicazione della procedura fornita dal kit permette la sintesi e l'amplificazione della regione localizzata al 5'-terminale del cDNA mediante la PCR.

3.4.2.1 Sintesi del primo filamento di cDNA e purificazione

La sintesi del primo filamento di cDNA, a partire dal RNA totale purificato, è stata effettuata utilizzando *primers* specifici per le sequenze di interesse (tab. 1.1). La reazione è catalizzata da una trascrittasi inversa fornita dal kit chiamata Superscript™ II RT (un M-MLV RT con ridotta attività Rnase H) in presenza di PCR buffer, $MgCl_2$, dNTPs, e DTT come antiossidante. Dopo la sintesi è stato ottenuto un doppio filamento ibrido formato da mRNA-cDNA. L'emifilamento di mRNA è stato degradato attraverso l'utilizzo di una RNAsi mix contenente Rnasi H e Rnasi T1. A questo punto il cDNA a singolo filamento è stato purificato mediante l'utilizzo di una colonna S.N.A.P., fornita dal kit, grazie alla quale il cDNA si lega ad una membrana a base silicea. I componenti del Buffer, i dNTPs non utilizzati, gli enzimi ed i *primers* rimasti in soluzione vengono rimossi dopo centrifugazione.

3.4.2.2 *TdT tailing*

Questa procedura permette di creare un sito di attacco per il *primer* Anchor Primer che verrà usato nella successiva reazione di amplificazione. Attraverso l'utilizzo della TdT (*Terminal deoxynucleotidil Transferase*) e in presenza di dCTP viene sintetizzata una coda omopolimerica di poly (C) all'estremità 3' del primo filamento di cDNA purificato.

3.4.2.3 Amplificazione del cDNA *dC-tailed*

Il cDNA contenente il poly (C) all'estremità 3', è stato successivamente amplificato tramite una reazione di PCR usando i diversi *primers forward* progettati in precedenza (GSP2 e *nested*GSP) (tab. 1.1). Come *primer reverse* è stato utilizzato l'AAP (Abridged Anchor Primer) (tab. 1.1) che possiede una sequenza di ancoraggio al 3' complementare alla coda di poly(C) del cDNA. I componenti della reazione sono:

H_2O sterile.....31,5 µl
10X PCR buffer.....5,0 µl
25mM MgCl.....3,0 µl
10 mM dNTPs.....1,0 µl
Primer forward GSP2 (10 µM).....2,0 µl

Primer reverse AAP (10 μM).....2,0 μl
cDNA dC-tailed.....5,0 μl
Taq DNA polimerasi (5u/μl).....0,5 μl
Volume Finale.....50,0 μl

Il programma di PCR impiegato è stato il seguente:

94°C per 2 min

	94°C per 1 min
30 cicli	55°C per 1 min
	72°C per 2 min

72°C per 7 min.

Per controllare l'avvenuta amplificazione i campioni sono stati separati mediante elettroforesi in gel d'agarosio all'1,5%. In alcuni casi, sugli stessi campioni è stata eseguita una successiva amplificazione *nested* in modo da annullare la possibilità di prodotti di PCR aspecifici con il *primer reverse* AUAP (Abridged Universal Amplification Primer), complementare alla sequenza di cDNA nella regione 3', assieme al *primer forward nested* GSP. Il programma al termociclatore è lo stesso utilizzato in precedenza.

3.5 AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO

Per l'amplificazione del DNA con *primers* specifici (tab. P1.2) è stata utilizzata la polimerasi "Finzzymes' Phusion™ High-Fidelity DNA *polymerase"*, la quale offre una performance elevata per ogni tipo di reazione di PCR. Questa DNA polimerasi possiede una proccessività ed un livello

di accuratezza nell'incorporamento dei nucleotidi molto elevata. La quantità di templato di DNA genomico utilizzato in queste reazioni è stata di circa 200 ng. I componenti della reazione sono stati i seguenti:

H_20 sterile.....fino ad un volume finale di 50 µl

5X Phusion HF Buffer.....10,0 µl

10 mM dNTP mix.....1,0 µl

Primer forward (10 µM).....1,0 µl

Primer reverse (10 µM).....1,0 µl

Templato di DNA.....X µl (a seconda della concentrazione del DNA purificato)

Phusion DNA Polymerase (2 u/µl).....0,5 µl

Volume Finale.....50,0 µl

Questo è stato il programma di PCR che poteva dare un'elevata performance della DNA polimerasi:

98°C per 30 sec

30 cicli
- 98°C per 10 sec
- 69-72°C (a seconda della Tm dei *primers*) per 30 sec
- 72°C per 30 sec

72°C per 10 min.

In seguito, mediante l'utilizzo del software bioinformatico Spidey (Wheelan *et al,* 2001) si è riusciti ad ottenere la struttura genica di ognuno dei geni codificanti per le metallotioneine.

3.6 *GENOME WALKING*

Per individuare la regione posta in posizione 5'-terminale dei geni delle 2 isoforme di MT, è stato utilizzato il kit DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit II.

La strategia (fig. 2.3) che sta alla base della tecnologia del DNA Walking ACP-PCR™ applicata nel kit è la seguente.

1. Uno dei quattro *primers* ACP e il primer specifico (TSP1; tab. 1.3) sono utilizzati per determinare la regione *target* a partire dal templato di DNA nella prima reazione di PCR.
2. Nella seconda reazione di PCR, il prodotto della prima PCR (purificato) viene amplificato utilizzando come coppia di *primer* DW-ACPN e uno specifico (TSP2; tab. 1.3)
3. Nell'ultima reazione di PCR viene utilizzato il *primer* Universal Primer assieme ad un altro *primer* (TSP3; tab. 1.3) progettato per amplificare gli amplificati della seconda reazione di PCR.

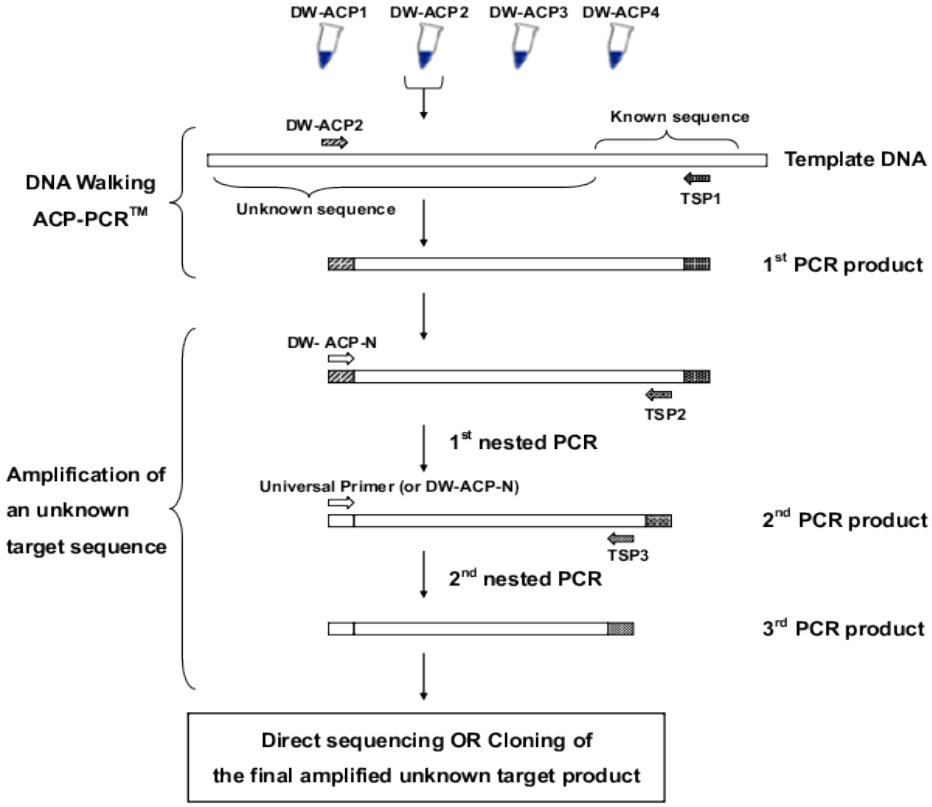


Figura 2.3 La strategia generale della tecnologia DNA Walking ACP-PCR™.

3.6.1 PRIMA REAZIONE DI PCR

I componenti della miscela di reazione sono:

Templato di DNA.....X µl (a seconda della concentrazione del DNA purificato; la quantità è stata 100ng)

Primer forward.(5 µM).....2,0 µl

Primer reverse.(5 µM).....1,0 µl

H_20 sterile.....fino ad un volume finale di 20 µl

2X SeeAmp™ ACP™ Master Mix II....10,0 µl

Volume Finale.....20,0 µl

Il programma impostato al termociclatore è il seguente:

94°C per 5 min

42°C per 1 min

72°C per 2 min

	94°C per 30 sec
30 cicli	55°C per 30 sec
	72°C per 100 sec

72°C per 7 min.

3.6.2 SECONDA REAZIONE DI PCR

I componenti della miscela di reazione sono:

Prodotto della prima PCR purificato....3,0 µl

Primer forward.(5 µM).....2,0 µl

Primer reverse.(5 µM).....1,0 µl

H_20 sterile.....fino ad un volume finale di 20 µl

2X SeeAmp™ ACP™ Master Mix II....10,0 µl

Volume Finale.....20,0 µl

Il programma impostato al termociclatore è il seguente:

94°C per 3 min

35 cicli
- 94°C per 30 sec
- 60°C per 30 sec
- 72°C per 100 sec

72°C per 7 min.

3.6.3 TERZA REAZIONE DI PCR

I componenti della miscela di reazione sono:

Prodotto della seconda PCR (senza purificazione dal gel)

…..... ....2,0 µl

Primer forward.(5 µM).....1,0 µl

Primer reverse.(5 µM).....1,0 µl

H_20 sterile.....fino ad un volume finale di 20 µl

2X SeeAmp™ ACP™ Master Mix II....10,0 µl

Volume Finale.....20,0 µl

Il programma impostato al termociclatore è stato questo:

94°C per 3 min

30 cicli
- 94°C per 30 sec
- 65°C per 30 sec
- 72°C per 100 sec

72°C per 7 min.

3.7 PROGETTAZIONE DEI *PRIMERS*

3.7.1 *PRIMERS* UTILIZZATI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLA SEQUENZA DI cDNA DELLE METALLOTIONEINE

Nei database di *EMBL-bank* e in quello di *GenBank* sono disponibili le sequenze di cDNA (almeno la regione codificante) delle isoforme di MT di molte specie di teleostei, sia antartici che non antartici. Dall'allineamento delle sequenze nucleotidiche della regione codificante tramite l'impiego del programma bioinformatico MUSCLE (Robert, 2004) sono state identificate alcune regioni molto bene conservate. Su queste regioni sono stati disegnati copie di *primers* manualmente o tramite l'utilizzo di *software* bioinformatici come Primer 3 (Rozen e Skascaletski, 2000). Quest'ultimo programma permette di disegnare oligonucleotidi valutando alcuni parametri come la lunghezza dei *primers*, il contenuto in percentuale di GC (40-60%), la probabilità di formazione di strutture secondarie e di dimerizzazione e la temperatura di *melting*. Poichè nei teleostei antartici esistono due geni codificanti per le due isoforme di MT (Bargelloni *et* al., 1999), i *primers* per l'amplificazione della regione codificante sono stati disegnati sulle regioni che dimostravano di essere molto conservate in ciascuna isoforma, ma che erano diverse nel confronto tra le sequenze delle due isoforme di MT della stessa specie di Notothenioidei (tab. 1.1).

Regione	Nome	Sequenza
CODIFICANTE	TAMTFW	AAGAGTGGGACCTGCAACTGC
	TAMTRE	TCTGAAGACATTCACAACAGCA
	THMT1 FW	TGCACCTACTCACGAGGACA
	TAMT RE	CAGTTGCAGGTCCCACTCTT
	THMT2 FW	CAGATACACTGCACCTACTCACG
	BERMT2 RE	AGACATTGGCAACAGGAATG
	Rtspec G.acMT-II	CAAAATTCACCATTCACCATTCTCTG
	ChanMTFW	GCGGAGGATCCTGCACTTGC
	PagMT1RE	AGGTCAGGCCTTTCACTGACAGC
	PagMT2RE	GGCTGAGTTCTTCACTGACAGCAGC
	BathMT2RE	GGCTGAGGTCCTTCACTGACAGCAGC
	1RTMT-I	CGACATTGAAACAAGTACAA
	2RTMT-I	CGACATTGAAACAAGTACAAAAAAA
3' UTR	3'RACE T.han 1 Fw	GTGCAAAGGGAAGACTTGT
	3'RACE T.han 2 Fw	ACACAAGCTGCTGTCAGT
	3RACE T.newMT2Fw1	CTCCTGGAATGGAGCCTTTG
	3RACET.newMT2Fw2	TGGAGCCTTTGTGAACTACT
	3'RACET.pennMT-I	TTCTGCCTTTGGGATGGA
	3'RACET.lepMT-I	CTGCCCGCTTCTGACTTT
	3'RACEMT-II	CCGCTTCTGCTCTGGAAT
	3'RACEChanMT1FW	GCTGTCAGTGAAAGGCCTGACC
	3'RACEPagMT2FW	AGCTGCTGTCAGTGAAGAACTCAGC
	3'RACEHisMT2FW	GCTGACAGTGAAGGACCTCAGC
5' UTR	5'RACE T.han 1 Re	GAAGACATTCACAACAGCAA
	5'RACE T.han 2 Fw	AAGTCTTCCCTTTGCACAC
	5'RACE T.han 3 Fw	AGGAGCAGTTTGTGCAAGT
	5RACETnewMT2Fw1	AGTAGTTCACAAAGGCTCCA
	5RACETnewMT2Fw2	CAAAGGCTCCATTCCAGGAG
	5raceT.hanMT-1Fw 1	TAAGGGCTCCATCCCAAAG
	5'RACEMT-I	AAGGGCTCCATCCCAAAG
	5'RACEMT-II	GCTGGTGCAGGAGCAGTT
	RtspecT.eulMT-I	TGACTTGAAAACAAGAAAAA
	5'RACET.eulMT-II	CTCCTGGAATGGAGCCTTTGTG
	RtspecH.velMT-I	GCCATGGAAACCAAGTCC
	5'RACEH.velMT-II	GTCCTTCACTGTCAGCAGCC
	Rtspec G.acMT-II	CAAAATTCACCATTCACCATTCTCTG
	5'RACEG.acFW	GCGGCTGAGGTCTTCACT
	5'RACE G.acNest	GCTGGTGCAGGAGCAGTT
	1RTMT-I	CGACATTGAAACAAGTACAA
	2RTMT-I	CGACATTGAAACAAGTACAAAAAAA
	5RACEMT1T.bernacchii1	ATAAGGGCTCCATCCCAAAA
	5RACEMT1T.bernacchii2	TATCTGAAGACATTCACAACAGC
	ANCHOR Oligo (dT)	ACCACGCGTATCGATGTCG$(T)_{16}$
	ANCHOR PRIMER	ACCACGCGTATCGATGTCG
	T27	CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC
	T30	CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG
	T7	TAATACGACTCACTATAGGGCGA
	SP6	TCTCATAGTCACCTAAAT
	Abridged Anchor Primer	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG
	Abridged Universal Amplification Primer	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

Tabella 1.1 I *primers* utilizzati per la caratterizzazione della sequenza di cDNA di geni *MT-1* e *MT-2*.

Successivamente, per ogni specie, basandosi sulla sequenza nucleotidica della regione codificante sono stati disegnati i *primers forward* tali da riuscire ad amplificare la 3' UTR in modo specifico a seconda della isoforma di MT a cui appartiene (tab. 1.1). Per la 5' RACE sono stati disegnati *primers* GSP1 *e* GSP2 specifici per ciascuna delle due isoforme di metallotioneine (tab. 1.1).

3.7.2 *PRIMERS* UTILIZZATI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLA SEQUENZA DI DNA GENOMICO DELLE METALLOTIONEINE

Come tutte le MT dei vertebrati, anche la MT dei teleostei presenta una struttura genica composta dalla sequenza del promotore localizzata al 5' terminale, dalle UTR, da tre esoni separati da due introni e dalla regione intergenica al 3' terminale (Samson e Gedamu, 1998; Ren *et* al. 2006). Tenendo conto di questa struttura genica i *primers forward* sono stati disegnati sulla sequenza della 5' UTR e quelli *reverse* sulla sequenza della 3' UTR (tab. 1.2).

Nome	Sequenza
MT1gG.acutFW	ACTCACGAGGACAAGAGACATCACC
MT1gG.acutRE	TCGACATTGAAAACAAGTACCAAAAA
MT2gG.acutFW1	CCTACTCACGAGGACGAGAGACATC
MT2gG.acutRE1	AGGAACTGCATTTATTTCAACATCG
MT2gG.acutFW2	CCAGATACACTGCACCTACTCACGA
MT2gG.acutRE2	TCTCTGTAGACATTTGCAACAGGAATG
MT1gC.mawFW	TCTCATCTCAGACCAAAGACACTGC
MT1gC.mawRE1	CAAGGTATTCATAAGGGCTCCATCC
MT1gC.mawRE2	CATTCACAACAGCAAATTTAGTCAAGG
MT2gC.mawFW	CCTACTCACGAGGACGAGAGACATC
MT2gC.mawRE1	CCAAGGAACTGCATTTATTTCAACA
MT2gC.mawRE2	TCTCTGTAGACATTTGCAACAGGAATG

Tabella 1.2 I *primers* utilizzati per la caratterizzazione degli esoni e introni di geni *MT-1* e *MT-2*.

3.7.3 *PRIMERS* UTILIZZATI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLA SEQUENZA DEL PROMOTORE DELLE METALLOTIONEINE

Sulla sequenza di cDNA della 5' UTR di ogni MT sono stati disegnati manualmente o tramite l'utilizzo del programma Primer 3 i *primers* TSP specifici (tab. 1.3) seguendo le istruzioni per l'utilizzo del kit DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit II che sono:

- la lunghezza degli oligonucleotidi deve essere tra 18 e 23 nucleotidi;
- il contenuto di GC deve essere tra 40 e 60%;
- la temperatura di *melting* tra 60 e 65 °C.

Nome	Sequenza
PRGymacutTSP1	TCCATGTTCTCAGGTGATGTCT
PRGymacutTSP1i	GGTCCATGTTCTCAGGTGAT
PRMT1GymacutTSP2	AGGTGATGTCTCTTGTCCTCGTG
PRMT2GymacutTSP2	TGATGTCTCTCGTCCTCGTGA
PRMT1GymacutTSP3	GGTGCAGTGTCTTCGGTCTG
PRMT2GymacutTSP3	GGTGCAGTGTATCTGGTCTCAG
TSP3C.mawsoniMT1	GGTGCAGTGTCTTTGGTCTG
TSP3C.mawsoniMT2	GGTGCAGTGTATCTGGTCTCAG
TSP2T.pennelliiMT2	TGATGTCTTTCGTCCTCGTGA
TSP3T.pennelliiMT1	AGTGCATTGTCTTTGGTCTG
TSP3T.pennelliiMT2	GGTGCAGTGTATTTGGTCTCAG
TSP1MT-1T.eulepidotus	TCCATGTTCTCAAGTGATGTCT
TSP2T.eulepidotusMT1	AAGTGATGTCTCTTGTCCTCGTG
TSP3T.eulepidotusMT1	GGTGCAGTGTCTTTGGTCTG
TSP3T.eulepidotusMT2	GGTGCAATGTATCTGGTCTCAG
TSP2H.veliferMT2	TGATGTCTCTCGTCCTCCTGA
TSP3H.veliferMT1	GGTGCAGTGTCTTTGGTCTG
TSP3H.veliferMT2	GGTGCAGTCTATCTGGTCTCAA

Tabella 1.3 I *primers* utilizzati per la caratterizzazione dei promotori dei geni *MT-1* e *MT-2*.

3.8 CLONAGGIO DEI PRODOTTI DI PCR

I prodotti di PCR sono stati sepearati elettroforeticamente in gel d'agarosio all'1,5% e la bande corrispondenti al cDNA di interesse sono state estratte e purificate utilizzando il kit Nucleospin® Extract II (Macherey-Nagel), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. La procedura prevede la lisi del gel e la purificazione del DNA grazie ad una colonna Nucleospin® Extract II.

Il DNA purificato è stato quantificato mediante elettroforesi quantitativa in gel d'agarosio e utilizzato nella reazione di ligazione col vettore pGEM-T Easy (kit pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vectors System I, Promega) da utilizzare per il clonaggio in *E. coli*. Questo vettore contiene un gene *amp*^{r} che conferisce al plasmide la resistenza all'ampicillina. Quindi, usando per la trasformazione batteri sensibili a tale antibiotico e piastrandoli in un terreno contenente ampicillina, è possibile selezionare quelli contenenti il plasmide, in quanto saranno gli unici che riusciranno a crescere. La possibilità di selezionare batteri che abbiano internalizzato un vettore richiuso (privo di inserto), è ovviato dal fatto che è possibile sfruttare l'α-complementazione. Infatti il sito di policlonaggio si trova all'interno del *lacZ*, codificante la regione N-terminale della β-galattossidasi, che è in grado di interagire con la porzione di β-galattossidasi codificata dal ceppo di *E. coli* usato per la trasformazione, complementandone la funzione. Se nel terreno di coltura vengono aggiunti IPTG (isopropil β-D-1-tiogalattopiranoside, per indurre l'espressione della β-galattossidasi) e X-Gal (un substrato cromogenico che viene convertito in un prodotto blu dall'enzima), le colonie contenti l'inserto risulteranno di colore bianco mentre quelle contenenti solo il plasmide richiuso saranno di colore blu.

3.8.1 PREPARAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI ALLA TRASFORMAZIONE

Batteri *E. coli* XL1-BLUE sono stati resi competenti utilizzando una metodica che prevede l'uso di $CaCl_2$ 0,1 M. Secondo questa procedura, i batteri vengono fatti crescere *overnight* a 37°C in 3 ml di terreno LB. Il giorno successivo, 1 ml dell'inoculo viene messo nuovamente a crescere a 37° C in 60 ml di LB fino a che i batteri non raggiungeranno la densità ottica utile ($O.D._{600\ nm}$ = 0,5). A questo punto le cellule vanno poste mezz'ora in ghiaccio per arrestarne la crescita. Dopo averle centrifugate per 5 minuti a 5000 rcf, si scarta il supernatante e si risospende il *pellet* in 30 ml di una soluzione $CaCl_2$ 0,1 M. Poste nuovamente in ghiaccio per 30 minuti, si centrifugano nuovamente a 5000 rcf per 5 minuti. Questa volta, il *pellet* va risospeso in 1 ml di $CaCl_2$ 0,1 M al 20% di glicerolo. Successivamente, le cellule ottenute vanno conservate a –80°C in aliquote da 80 µl in glicerolo 25% v/v. Per verificare la loro competenza effettiva, è stato eseguito un test di competenza che segue la normale procedura di trasformazione batterica, utilizzando come controllo il plasmide richiuso pUC18.

3.8.2 LIGAZIONE DELL'AMPLIFICATO AL VETTORE

La miscela di ligazione dell'inserto amplificato con il vettore di clonazione è stata preparata nel seguente modo:

2X Rapid Ligation Buffer.....5,0 µl

pGEM-T Easy Vector (50 ng/µl).....1,0 µl

T4 DNA Ligasi (3 U/µl).....1,0 µl

DNA purificato.....X µl(a seconda della concentrazione del DNA purificato)

H_2O sterile….....(fino ad un volume finale di 10 µl)

Per il calcolo delle quantità di cDNA da utilizzare nella reazione di ligazione è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vettore} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vettore}} \times \text{rapporto inserto/vettore}$$

in cui: ng vettore= 50 ng

kb vettore= 3,015 kb

rapporto inserto/vettore = 3/1

La reazione di legazione è stata incubata per tutta la notte a 4° C per ottenere il massimo numero di trasformanti.

3.8.3 TRASFORMAZIONE DI *E. coli* XL1-BLUE

Ad ogni aliquota di batteri è stato aggiunto il prodotto di ligazione (5 µl), e dopo un'incubazione in ghiaccio di 30 minuti, è stato eseguito uno *shock* termico, ponendo prima il campione a 42°C per 90 secondi, poi in ghiaccio per 3 minuti. Successivamente all'aggiunta di 920 µl di terreno SOC (contenente Bacto Triptone 2%, Bacto estratto di lievito 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 10mM, $MgSO_4$ 10mM e glucosio 20mM), i batteri sono stati messi a crescere per 1 h a 37°C in agitazione. Dopodiché i campioni sono stati centrifugati e, dopo aver eliminato circa 800 µl di terreno, il *pellet* di batteri è stato risospeso. La soluzione è stata piastrata su terreno solido selettivo LB-agar (bacto triptone 1%, bacto estratto di lievito 0,5 %, NaCl 0,5%), ampicilina (100 µg/ml), X-Gal e IPTG. Le piastre sono state incubate overnight a 37° C.

3.8.4 SCREENING DELLE COLONIE TRASFORMATE

Sulle colonie cresciute sono stati eseguiti tre tipi di *screening* che consentono di individuare quelle contenenti l'inserto:

Screening visivo: sfrutta il meccanismo dell'α-compementazione. Dal momento che tale test non risulta attendibile al 100%, le colonie bianche e azzurre sono state sottoposte ad ulteriori analisi.

Screening mediante PCR: le colonie selezionate sono state sottoposte a *colony* PCR utilizzando i due *primers* universali T27 e T30, che permettono di amplificare una regione del plasmide pGEM comprendente il sito di polylinker, in modo da verificare la presenza o meno dell'inserto. Una piccola quantità di batteri è stata pizzicata con una punta sterile ed immersa in 10 µl di una miscela contente il PCR buffer, $MgCl_2$, *i primers* T27 e T30, i quattro dNTP e la *Taq* polimerasi. Il campioni sono stati sottoposti al seguente programma:

	94°C per 2 min
25 cicli	92°C per 30 sec
	70°C per 4min

Al termine, i prodotti sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Le bande di circa 375 bp corrispondono alla regione plasmidica amplificata priva di inserto.

Screening mediante digestione con *Eco*RI: le colonie risultate positive ai due precedenti *screening* sono state fatte crescere *overnight* in terreno liquido LB in presenza di ampicillina (100 µg/ml).

Dopo l'estrazione del plasmide e la quantificazione allo spettrofotometro, ogni campione è stato sottoposto a digestione con *Eco*RI. Questo enzima di restrizione taglia in corrispondenza del sito di policlonaggio del pGEM, permettendo di estrarre l'inserto di DNA dal vettore. 500 ng di ogni campione sono stati digeriti con 0,5 µl di *Eco*RI (12 u/µl), con 1 µl di Buffer H10X e acqua sterile fino ad un volume finale di 10 µl. La soluzione è stata incubata a 37°C per 1 h e successivamente analizzata tramite corsa elettroforetica. I campioni risultati positivi sono stati mandati a sequenziare.

3.8.4 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Il DNA plasmidico è stato estratto da 3 ml di ciascuna coltura mediante il kit NucleoSpin Mini (Macherey-Nagel). Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel). Tale protocollo consente la purificazione del DNA plasmidico grazie all'utilizzo della colonnina Nucleospin® Plasmid.

3.9 SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento è stato eseguito presso il centro BMR Genomics, dotato di un sequenziatore automatico modello ABI 3730XL a 96 capillari. Per determinare la sequenza viene eseguita una PCR , che utilizza i *primers* SP6 e T7 (tab 1.1), che si appaiono alle sequenze del vettore pGEM fiancheggianti il sito di policlonaggio. Oltre ai comuni dNTPs, la miscela contiene anche quattro dideossinucleotidi (ddNTPs) marcati con diversi fluorofori. Ogni volta che uno di questi quattro dideossinucleotidi viene inserito dalla polimerasi, la reazione di sintesi si blocca perché possiedono un 3'-H invece di un 3'-OH nello zucchero deossiribosio, impedendo così la formazione del legame fosfodiesterico. Si ottengono così diversi prodotti di PCR di diversa lunghezza, ognuno terminante con un nucleotide marcato da un diverso colore. Questi frammenti di DNA vengono sottoposti ad elettroforesi capillare su gel fluido di poliacrilammide e, durante la corsa un laser eccita i fluorofori permettendo di determinare quale nucleotide è presente all'estremità di ogni frammento. Le informazioni vengono quindi rielaborate da un computer e presentati in un elettroferogramma che mostra la sequenza nucleotidica.

3.10 ANALISI FILOGENETICA

3.10.1 ANALISI DELLE SEQUENZE DI cDNA E RICOSTRUZIONE FILOGENETICA

Le sequenze di cDNA della regione codificante e quelle della UTR sono state allineate utilizzando MAFFT (Katoh *et* al.,2002), un programma di allineamento multiplo che effettua un allineamento progressivo seguito da una fase di rifinitura. É stato deciso di utilizzare questo programma partendo dal fatto che esso si è rilevato utile nell'allineamento di sequenze nucleotidiche difficili da allineare come le sequenze della 5' UTR. Basandosi sull'allineamento sono state costruiti gli alberi filogenetici utilizzando strumenti bioinformatici come GARLI 0.96 (Derrick Zwickl, unpublished, https://www.nescent.org/wg_garli/Main_Page), Mr. Bayes 3.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) e Beast 1.5b2 (Drummond e Rambaut, 2007).

Prima di effettuare le analisi filogenetiche è stato determinato il modello sul quale si basa l'evoluzione delle MT dei Notothenioidei. Sono stati ricostruiti diversi alberi filogenetici basandosi sull'allineamento delle sequenze aminoacidiche. Ognuno di questi alberi filogenetici rispecchia uno specifico modello di evoluzione molecolare. Con i valori logaritmici di *likelihood* di ciascuno degli alberi filogenetici sono stati eseguiti i test statistici di *likelihood ratio* (LR).

Determinato il modello, si è proseguito con la ricostruzione degli alberi filogenetici basati sulle sequenze di cDNA. Il programma bioinformatico Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 1998) è stato utilizzato per determinare il modello statistico di sostituzioni nucleotidiche migliori per le successive analisi filogenetiche baesiane e di *Maximum Likelihood* (ML). Il Modeltest, basandosi su un set di test statistici hierarchical likelihood (LRTs), discrimina tra i 56 modelli statistici di evoluzione e riesce a trovare il modello ottimale per il set di sequenze da analizzare. I valori di logaritmici di *likelihood* sono stati calcolati con test statistici di *likelihood* (LRTs): hLRT, AIC, AICc e BIC. Basandosi su questi valori è stato scelto il modello di sostituzioni nucleotidiche migliori. Successivamente si è proseguito con le analisi filogenetiche che sono:

Maximum Likelihood: è stata eseguita utilizzando GARLI che, basandosi su un approccio stocastico, simultaneamente, riesce a trovare la topologia, la lunghezza dei rami e i parametri del modello di sostituzione che massimizzano il valore logaritmico del *likelihood (*lnL). GARLI usa un unico modello statistico di evoluzione che è il modello *General Time Reversible* (GTR), che è un modello abbastanza approssimativo. Successivamente è stata eseguita l'analisi ottimizzata del *bootstrap*, ripetuta due volte con 100 repliche. L'albero filogenetico consenso è stato costruito tramite l'utilizzo di PAUP (Swofford, 2000).

L'*analisi Baesiana*: è stata condotta con il miglior modello di evoluzione delle sequenze determinato dai test statistici LRTs. Mr. Bayes 3.0 è stato eseguito per più di 1.000.000 generazioni in modo da assicurarsi che l'algoritmo fosse stato eseguito per un numero appropriato di interazioni, tale da assicurare la convergenza nella stima della topologia dell'albero filogentico con la migliore probabilità posteriore e lunghezza di ramo secondo il modello della sostituzione del DNA. In ogni analisi sono state eseguite quattro *chains* in modo simultaneo e l'analisi è stato ripetuta quattro volte. Il numero effettivo di *sampling* delle catene di Markov è stato stimato utilizzando il programma bioinformatico Tracer 1.4.1 (Rambaut e Drummond, 2007). Il periodo di *burn-in* è stato determinato utilizzando un altro programma, AWTY (Wilgenbusch *et* al., 2004), che determina il punto dove il numero delle generazioni e le probabilità raggiungono il *plateau*. Gli alberi filogenetici e i valori dei parametri risultanti dalle generazioni posizionate prima del punto di *burn-in* sono state scartati.

L'altro programma utilizzato per le analisi baesiane è stato quello di BEAST (Drummond e Rambaut, 2007). Questo è un *software* che può essere utilizzato per studi filogenetici basati sul modello molecolare *clock* (Zuckerkandl e Pauling, 1962) o *relaxed clock* (Thorne e Kashino, 1998). Il modello *clock* e quello *non-clock* sono i due estremi di un *continum* e tutti e due non sono realistici dal punto di vista evolutivo. Fortunatamente, l'assunzione del modello molecolare *clock* si può rilassare permettendo la possibilità di variazioni all'interno del *dataset* (Drummond *et* al., 2006). È stato utilizzato BEAST in un modello *clock* rilassato. Tutti i parametri sono stati impostati nel programma BEAUTi 1.5b2 (Drummond e Rambaut, 2007) che serve per generare l'*input* per BEAST. In tutte queste ultime analisi baesiane è stato utilizzato il modello di speciazione Yule che si mostra essere il modello migliore per le analisi filogenetiche a livello delle specie (Rummbau *et* al., 2006). Dopo aver eseguito BEAST per un numero di generazioni di 10.000.000, la distribuzione delle probabilità posteriori e dei parametri continui è stata analizzata tramite l'impiego del programma bioinformatico Tracer (Drummond e Rambaut, 2007).

Successivamente è stato utilizzato il *software* TreeAnnotator (Drummond e Rambaut, 2007) per trovare il migliore albero filogenetico e per effettuare le annotazioni riguarda i valori medi delle lunghezze dei rami e i range di HPD. Questo programma è servito anche per calcolare i valori delle probabilità posteriori dei nodi.

Tutti gli alberi filogenetici, generati dai diversi programmi, sono stati visualizzati con un programma che serve a rappresentare graficamente gli alberi filogenetici, conosciuto con il nome FigTree 1.2 (Rambaut, non pubblicato, http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

3.10.2 TEST DI SELEZIONE BASATA SULLA TOPOLOGIA DEGLI ALBERI FILOGENETICI

PAML 4.1 (Yang, 1997) è stato utilizzato per individuare la presenza della selezione positiva dopo la duplicazione dei geni delle metallotioneine. I rami degli alberi sono stati suddivisi (a priori) in linee filogenitche *foreground* e *background* per confrontare il modello statistico che permette la presenza della selezione positiva nella linea filogenetica *foreground* (modello alternativo) con il modello che non permette la selezione positiva (il modello *null*).

É stato utilizzato il modello *branch-site* A + B in CODEML per il fatto che questo modello si rivela essere un modello perfetto per identificare selezione positiva dopo la duplicazione genica, dove una delle due copie geniche può aver acquisito una nuova funzione e cosi ha evoluto con tassi di evoluzione accelerati (Yang, 2007). I due modelli matematici implementati da Yang e Nielsen (2002) permettono che il rapporto ω vari nei siti e nelle linee filogenetiche. Successivamente è stato utilizzato un test statistico LRT per confrontare il modello *null* con quello alternativo in tutti i possibili test.

In modo da valutare la presenza di selezione a livello dei singoli codoni (senza permettere variazioni tra le linee filogenetiche) sono state eseguite una serie di analisi basandosi su diversi modelli implementati in PAML ver 4 (Yang, 1997; Yang, 2007), nel quale i modelli neutrali hanno il valore di ω=1, mentre i modelli di selezione includono la classe di siti con ω>1. Anche in questo tipo di analisi bioinformatica è stato utilizzato il test LRT per il confronto dei diversi modelli.

In tutte le analisi di selezione positiva sono stati utilizzati due modelli di frequenze di sostituzione nucleotidiche corrispondenti ai codoni (F3x4 e F61). I modelli di frequenze codoniche F3x4 e F61 differiscono tra di loro per la maniera in cui viene stimata la frequenza di equilibrio per ciascun

codone. Nel modello F3X4 la frequenza d'equilibrio deriva dalle frequenze dei tre nucleotidi nelle tre posizioni del codone, mentre nel modello F61 ogni codone viene utilizzato come un parametro libero finchè la sommatoria diventa uno. Tutte le analisi bioinformatiche di selezione positiva sono state effettuate utilizzando la topologia dell'albero filogenetico ottenuto da BEAST.

Un progresso recente nei metodi statistici, utilizzati per identificare la presenza di selezione nel contesto filogenetico, è di tenere in considerazione la variazione nei tassi di sostituzione sinonima. (Pond e Muse 2005). Kosakovsky Pond e Frost (2005) proposero una serie di modelli per studiare la selezione basandosi sulle variazioni nei codoni. Loro classificarono i metodi precedenti come 'counting methods', 'random effect models' e 'fixed effect models'.

- I *counting methods* ricostruiscono le sequenze ancestrali in modo da stimare il numero di cambiamenti sinonimi e non-sinonimi a livello di ogni codone.
- I *random effect models* tengono conto della distribuzione dei tassi di sostituzione per ogni sito e dopo determinano i tassi di sostituzione solo per i siti che evolvono.
- I *fixed effects models* stimano il rapporto di sostituzioni non-sinonimi su sostituzioni sinonimi sito per sito senza assumere a priori la presenza della distribuzione dei tassi di sostituzione nei vari siti.

I metodi statistici SLAC, REL e FEL sono le nuove versioni dei corrispettivi modelli di 'counting', 'random effect' e 'fixed effect', che permettono la variazione nei tassi di sostituzione sinonima (Kosakovsky Pond e Frost, 2005). Questi metodi sono stati implementati nel *web server* di DATAMONKEY (Pond e Frost, 2005). Tutti questi metodi sono stati utilizzati per identificare le posizioni aminoacidiche dove potrebbe aver operato la selezione.

3.10.3 ANALISI FILOGENTICA CON LE SEQUENZE DI INTRONI ED ESONI DI GENI *MT*

Per effettuare le analisi filogentiche con le sequenze degli esoni e degli introni di geni codificanti per metallotioneine nei teleostei è stato utilizzato il programma bioinformatico BEAST (Drummond e Rambaut, 2007). Prima sono state prese in considerazione le sequenze di tutti i teleostei, sia quelli

antartici che quelli non antartici. Successivamente è stata effettuata un'analisi filogenetica solo con le sequenze di teleostei antartici; tutte queste sequenze sono state caratterizzate nel nostro laboratorio. Dopo che erano impostati i parametri nel programma BEAUTi 1.5b2 (Drummond e Rambaut, 2007), è stato eseguito BEAST per un numero di generazioni di 10.000.000. La distribuzione delle probabilità posteriori e dei parametri continui è stata analizzata tramite l'impiego del programma bioinformatico Tracer. Alla fine è stato utilizzato il *software* TreeAnnotator (Drummond e Rambaut, 2007) per trovare il migliore albero filogenetico.

3.10.4 ANALISI FILOGENTICA CON LE SEQUENZE DI PROMOTORI DI GENI *MT*

Con le sequenze di promotori di *MT* identificate e caratterizate nel nostro laboratorio e quelle presenti nel database di *GenBank* è stata effettuata l'analisi filogenetica utilizzando il programma bioinformatico BEAST (Drummond e Rambaut, 2007).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE MT DI NOTOTHENIOIDEI ANTARTICI

Dalle analisi di metallotioneine di teleostei presenti nel database di *Genbank* risulta che nei teleostei antartici esistono 2 isoforme di MT, MT-1 e MT-2. Le sequenze di cDNA di *MT-1* e di *MT-2* sono costituite da un'*open reading frame* (ORF) di 61 codoni che codificano per una proteina di 60 amminoacidi. Le 2 isoforme delle diverse specie presentano un elevato contenuto in cisteine del 33%, distribuite secondo i motivi ripetuti caratteristici delle MT: **C-x-C**, **C-x-y-C** e **C-C**.

Le specie caratterizzate da me, hanno mostrato di possedere le classiche 2 isoforme di MT, presenti nei teleostei antartici (fig. 2.4).

```
Perca fluviatilis MT              MDPCECSKGGTCNCGGSCTCTNCSCTTCKKSCCPCCPSGCPKCASGCVCKGKTCDAACCQ  60
Trematomus bernacchii MT2         MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Gymnodraco acuticeps MT2          MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Chionodraco hamatus MT2           MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Cygnodraco mawsoni MT2            MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Histiodraco velifer MT2           MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus newnesi MT2            MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus lepidorhinus MT2       MDPCDCSKIGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus pennellii MT2          MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus hansoni MT2            MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus eulepidotus MT2        MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Pagothenia borchgrevinki MT2      MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Notothenia coriiceps MT2          MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Chaenocephalus aceratus MT2       MDPCECTKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Chionodraco rastrospinosus MT2    MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Parachaenichthys charcoti MT2     MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCTSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus bernacchii MT1         MDPCQCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Parachaenichthys charcoti MT1     MDPCECSKSGNCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Chaenocephalus aceratus MT1       MDPCECSKSGNCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCIGKTCDTSCCQ
Notothenia coriiceps MT1          MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Chionodraco rastrospinosus MT1    MDPCECSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus pennellii MT1          MDPWDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus eulepidotus MT1        MDPCDCSKSGTCNWGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus hansoni MT1            MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus newnesi MT1            MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Trematomus lepidorhinus MT1       MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Chionodraco hamatus MT1           MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Histiodraco velifer MT1           MDPCDCAKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Cygnodraco mawsoni MT1            MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Pagothenia borchgrevinki MT1      MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Gymnodraco acuticeps MT1          MDPCDCSKSGTCNCGGSCTCTNCSCKSCKKSCCPCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Lithognathus mormyrus MT          MDPCECAKTGTCNCGGSCSCTNCSCTSCKKSCCSCCPAGCSKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
Pagrus major MT                   MDPCECSKTGTCNCGGSCTCTNCSCTTCKKSCCSCCPSGCTKCASGCVCKGKTCDTSCCQ
```

Figura 2.4 Allineamento multiplo globale delle sequenze aminoacidiche dei Notothenioidei antartici (in grassetto) caratterizzate nel nostro laboratorio, di quelli presenti nel database di *Genbank* e di altri membri dei Perciformes (sottolineati – usati come *outgroups*). Nelle sequenze vengono mostrate in grassetto le differenze in aminoacidi e in sfondo grigio le differenze ripetute in più specie.

Diversamente dagli altri Notothenioidei, le MT-1 di *Trematomus pennellii* e di *Trematomus eulepidotus* mostrano un contenuto di cisteine (31,7%) leggermente inferiore alle MT degli altri Notothenioidei studiati fin'ora. Nelle sequenze aminoacidiche di *T. pennellii* e di *T. eulepidotus*, la cisteina è sostituita dal triptofano nel primo e nel secondo motivo **C-x-C**, rispettivamente (fig. 2.4).

Le sequenze aminoacidiche di MT dei teleostei antartici sono state confrontate tra di loro. La percentuale di aminoacidi conservati è 87%. Questo risultato dimostra che queste proteine mostrano un elevato grado di conservazione.

Inoltre sono state confrontate tra di loro le sequenze di MT-1 con quelle di MT-2 per ciascuno dei Notothenioidei (tab. 1.4), utilizzando il programma bioinformatico Needle (Kruskal, 1983).

Specie	Identità	Similarità
T. bernacchii	96,70%	98,30%
T. newnesi	98,30%	98,30%
T. lepidorhinus	96,70%	96,70%
T. pennellii	96,70%	96,70%
T. hansoni	98,30%	98,30%
T. eulepidotus	96,70%	96,70%
P. borchgrevinki	96,70%	98,30%
N. coriiceps	98,30%	98,30%
C. hamatus	98,30%	98,30%
C. aceratus	93,30%	95,00%
C. rastrospinosus	98,30%	98,30%
P. charcoti	96,70%	96,70%
G. acuticeps	98,30%	98,30%
C. mawsoni	98,30%	98,30%
H. velifer	96,70%	98,30%

Tabella 1.4 Valori delle percentuali di identità e di similarità ottenuti dal confronto a coppie delle sequenze aminoacidiche di MT-1 e MT-2 per ciascuna specie di Notothenioidei utilizzando il programma bioinformatico Needle. La matrice utilizzata è Blosum62. I valori della penalità per il *gap open* e il *gap extend* sono 10 e 0,5, rispettivamente.

La percentuale di identità va da 93,30%, riscontrata per *Chaenocephalus aceratus*, a 98,70% per *Trematomus bernacchii,* mentre la percentuale di similarità va da 95% a 98,30%, evidenziando che le strutture primarie delle 2 isoforme di MT differiscono tra loro molto poco.

4.2 TEST DELL'OROLOGIO MOLECOLARE

L'ipotesi dell'orologio molecolare assume che segmenti omologhi di DNA evolvono essenzialmente con lo stesso tasso evolutivo lungo linee filogenetiche, finché essi mantengono la funzione originaria (De Salle *et* al, 1987). L'assunzione della costanza nei tassi evolutivi viene violata anche all'interno dei mammiferi. Quindi, non si può assumere veritiera l'esistenza di un orologio molecolare veramente universale che si applichi a tutti gli organismi (Caccone e Powell, 1989). Questo fatto rende obbligatorio effettuare un test *non-clock vs clock likelihood ratio* (**LR = 2 [log L(H_0) – log L(H_A)]**) con **n-2** gradi di libertà, dove **n** è il numero dei taxa considerati nella filogenesi (Felsenstein, 1981).

L'ipotesi nulla (**H_0**) prevede che ogni linea filogenetica evolva in modo indipendente dalle altre secondo un proprio tasso evolutivo. L'ipotesi alternativa (**H_A**) assume che tutte le linee filogenetiche evolvano con lo stesso unico tasso evolutivo. Basandosi sull'allineamento delle sequenze aminoacidiche (fig. 2.4) sono stati costruiti sia alberi filogenetici che non rispettano il modello dell'orologio molecolare (ipotesi nulla – **H_0**) che alberi filogenetici che lo rispettano (ipotesi alternativa – **H_A**).

In questa analisi, come outgroup sono state utilizzate le sequenze di MT di *Perca fluviatilis, Lithognathus mormyrus* e *Pagrus major*. Queste specie appartengono all'ordine dei Perciformes, del quale fanno parte tutti i Notothenioidei. Risultati di analisi filogenetiche precedentemente condotte indicano che queste specie presentano un antenato comune dei Notothenioidei (Bargelloni *et* al., 1999).

Il metodo statistico per la costruzione degli alberi filogenetici è quello baesiano implementato nel *software* bioinformatico Mr. Bayes, il quale è stato applicato utilizzando come modello di sostituzione aminoacidica quello della matrice Dayhoff (Dayhoff *et* al., 1978) selezionato dal programma ProtTest (Abascal *et* al., 2005).

I valori di likelihood stimati da Mr.Bayes per l'ipotesi nulla (**H_0**) e quella alternativa (**H_A**) sono 369.02 and 361.54, rispettivamente. Dal test statistico di *likelihood ratio* (**LR = 2 [log L(H_0) – log L(H_A)]**) l'ipotesi accettata per P = 0,0001 è quella alternativa, corrispondente al modello dell'orologio molecolare stretto (ipotesi alternativa - **H_A**) (Zuckerkandl e Pauling, 1962).

Tra i modelli dell'orologio molecolare esiste il modello dell'orologio molecolare rilassato (Thorne and Kashino, 1998) che si adatta meglio alla realtà biologica (Drummond *et* al., 2006). Secondo

questo modello, le linee filogenetiche evolvono con un tasso evolutivo correlato con la linea filogenetica ancestrale. Per verificare se questo modello si adatti meglio all'evoluzione molecolare delle MT nei teleostei antartici, rispetto al modello dell'orologio molecolare stretto è stato applicato il test di *likelihood ratio*. In questo test statistico, l'ipotesi nulla ($\mathbf{H_0}$) è quella dell'orologio molecolare stretto, che assume l'esistenza di un unico tasso evolutivo omogeneo lungo tutte le linee filogenetiche, mentre l'ipotesi alternativa ($\mathbf{H_A}$) corrisponde all'orologio molecolare rilassato ed assume l'esistenza di correlazioni dei tassi evolutivi tra le linee filogenetiche ancestrali e quelle discendenti. Sull'allineamento delle sequenze aminoacidiche di MT è stato applicato il *software* bioinformatico BEAST (Drummond e Rambaut, 2007), il quale è stato implementato con metodi statistici baesiani. Tale *software* è l'unico che permetta la costruzione di alberi filogenetici che rispettano modelli di orologio molecolare rilassato. Come suggerito da Drummond e suoi collaboratori (2006), per questi dati è stato utilizzato il modello di speciazione Yule. Sia per costruire gli alberi filogenetici che rispettano il modello dell'orologio molecolare stretto, che per quelli che rispettano il modello dell'orologio rilassato, è stato utilizzato il modello di sostituzione aminoacidica della matrice JTT (Jones *et* al., 1992) selezionato come miglior modello da ProtTest (Abascal *et* al., 2005).

I valori medi di *likelihood* stimati da BEAST, sono 360.54 e 356.37 per l'ipotesi nullo ($\mathbf{H_0}$) e quella alternativa ($\mathbf{H_A}$), rispettivamente. Questa ultima analisi ha dato come risultato che il modello del orologio molecolare rilassato è quello che si adatta meglio alla evoluzione molecolare di MT nei Notothenioidei per P-value < 0,005 (P = 0,0039).

4.3 ANALISI DELLE SEQUENZE DI cDNA DI MT DI NOTOTHENIOIDEI ANTARTICI

4.3.1 ANALISI DELLE SEQUENZE DELLA REGIONE CODIFICANTE

Utilizzando coppie di *primers* specifici disegnati sulle regioni conservate delle sequenze di cDNA di MT di Notothenioidei presenti nel *database* di *Genbank* sono state caratterizzate le sequenze della regione codificante del cDNA di MT delle specie da me considerate (fig. 2.5, in grassetto). Anche tali sequenze sono lunghe 183 nucleotidi. Come ci si poteva aspettare la percentuale dei siti nucleotidici conservati (80%) risulta essere minore di quella riguardante gli aminoacidi (87%).

```
Perca fluviatilis MT              ATGGATCCCTGCGAGTGCTCCAAGGGTGGAACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC  60
Trematomus bernacchii MT2         ATGGATCCCTGCGAGTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Gymnodraco acuticeps MT2          ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Chionodraco hamatus MT2           ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Cygnodraco mawsoni MT2            ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Histiodraco velifer MT2           ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus newnesi MT2            ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus lepidorhinus MT2       ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAATTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus pennellii MT2          ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCGTGCACTTGC
Trematomus hansoni MT2            ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus eulepidotus MT2        ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Pagothenia borchgrevinki MT2      ATGGATCCTTGTGAATGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Notothenia coriiceps MT2          ATGGATCCCTGCGAGTGTTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Chaenocephalus aceratus MT2       ATGGATCCCTGCGAGTGCACCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Chionodraco rastrospinosus MT2    ATGGATCCCTGTGAGTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Parachaenichthys charcoti MT2     ATGGATCCCTGCGAGTGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus bernacchii MT1         ATGGATCCCTGCCAGTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Parachaenichthys charcoti MT1     ATGGATCCCTGCGAGTGCTCCAAGAGTGGGAACTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Chaenocephalus aceratus MT1       ATGGATCCCTGCGAGTGCTCCAAGAGTGGGAACTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Notothenia coriiceps MT1          ATGGATCCTTGTGAATGCTCCAAAAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Chionodraco rastrospinosus MT1    ATGGATCCTTGTGAATGCTCCAAGAGTGGGACCTGTAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus pennellii MT1          ATGGACCCTTGGGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus eulepidotus MT1        ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGGGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus hansoni MT1            ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus newnesi MT1            ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Trematomus lepidorhinus MT1       ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Chionodraco hamatus MT1           ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGTAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Histiodraco velifer MT1           ATGGACCCTTGCGACTGCGCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Cygnodraco mawsoni MT1            ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGGACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Pagothenia borchgrevinki MT1      ATGGATCCGTGCGACTGCTCCAAGAGTGGAACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Gymnodraco acuticeps MT1          ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAGAGTGGAACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACTTGC
Lithognathus mormyrus MT          ATGGACCCGTGCGAGTGCGCCAAGACTGGAACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCTCATGC
Pagrus major MT                   ATGGACCCTTGCGAGTGCTCTAAGACTGGAACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCACATGC

Perca fluviatilis MT              ACGAACTGCTCCTGCACCACCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC 120
Trematomus bernacchii MT2         ACAAACTGCTCTTGCACCAGTTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Gymnodraco acuticeps MT2          ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Chionodraco hamatus MT2           ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Cygnodraco mawsoni MT2            ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Histiodraco velifer MT2           ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus newnesi MT2            ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus lepidorhinus MT2       ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus pennellii MT2          ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus hansoni MT2            ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus eulepidotus MT2        ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Pagothenia borchgrevinki MT2      ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Notothenia coriiceps MT2          ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Chaenocephalus aceratus MT2       ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Chionodraco rastrospinosus MT2    ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Parachaenichthys charcoti MT2     ACAAACTGCTCCTGCACCAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus bernacchii MT1         ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Parachaenichthys charcoti MT1     ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Chaenocephalus aceratus MT1       ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Notothenia coriiceps MT1          ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Chionodraco rastrospinosus MT1    ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus pennellii MT1          ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
```

```
Trematomus eulepidotus MT1      ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus hansoni MT1          ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus newnesi MT1          ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Trematomus lepidorhinus MT1     ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Chionodraco hamatus MT1         ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Histiodraco velifer MT1         ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Cygnodraco mawsoni MT1          ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Pagothenia borchgrevinki MT1    ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Gymnodraco acuticeps MT1        ACAAACTGCTCCTGCAAAAGCTGCAAGAAGAGCTGCTGCCCATGCTGCCCATCCGGCTGC
Lithognathus mormyrus MT        ACAAACTGCTCCTGCACCTCGTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCATGCTGCCCGGCCGGCTGC
Pagrus major MT                 ACAAACTGCTCCTGCACCACGTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCATGCTGCCCATCCGGCTGC

Perca fluviatilis MT            CCCAAGTGCGCCTCTGGATGTGTCTGCAAAGGGAAAACTTGTGACGCCGCCTGCTGCCAGTGA 183
Trematomus bernacchii MT2       ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Gymnodraco acuticeps MT2        ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Chionodraco hamatus MT2         ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Cygnodraco mawsoni MT2          ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Histiodraco velifer MT2         ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus newnesi MT2          ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAAACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Trematomus lepidorhinus MT2     ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Trematomus pennellii MT2        ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Trematomus hansoni MT2          ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Trematomus eulepidotus MT2      ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Pagothenia borchgrevinki MT2    ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Notothenia coriiceps MT2        ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Chaenocephalus aceratus MT2     ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Chionodraco rastrospinosus MT2  ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Parachaenichthys charcoti MT2   ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus bernacchii MT1       ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Parachaenichthys charcoti MT1   ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Chaenocephalus aceratus MT1     ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCATAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Notothenia coriiceps MT1        ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGTTGCTGTCAGTGA
Chionodraco rastrospinosus MT1  ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus pennellii MT1        ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus eulepidotus MT1      ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus hansoni MT1          ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus newnesi MT1          ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Trematomus lepidorhinus MT1     ACCAAATGCGCCTCTGGCTGTGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Chionodraco hamatus MT1         ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Histiodraco velifer MT1         ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Cygnodraco mawsoni MT1          ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Pagothenia borchgrevinki MT1    ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Gymnodraco acuticeps MT1        ACCAAATGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
Lithognathus mormyrus MT        AGCAAGTGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACCTGCGACACTAGCTGCTGTCAGTGA
Pagrus major MT                 ACCAAGTGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACAAGCTGCTGTCAGTGA
```

Figura 2.5 Allineamento multiplo globale delle sequenze della regione codificante del cDNA di MT dei Notothenioidei antartici (in grassetto) caratterizzate nel nostro laboratorio, di quelli presenti nel database di *Genbank* e di altri membri dei Perciformes (sottolineati). Nelle sequenze vengono mostrate in grassetto le differenze in nucleotidi e in sfondo grigio le differenze ripetute in più specie.

Successivamente è stato effettuato il confronto a coppie delle sequenze di ciascuna isoforma per ognuna delle specie di teleostei antartici (tab. 1.5) mediante l'utilizzo del *software* Needle.

La percentuale di identità va da 95,60% per *Trematomus pennellii* a 97,80% per *Parachaenichthys charcoti, Gymnodraco acuticeps* e *Cygnodraco mawsoni,* mostrando anche a livello nucleotidico che le 2 isoforme di MT differiscono molto poco tra loro.

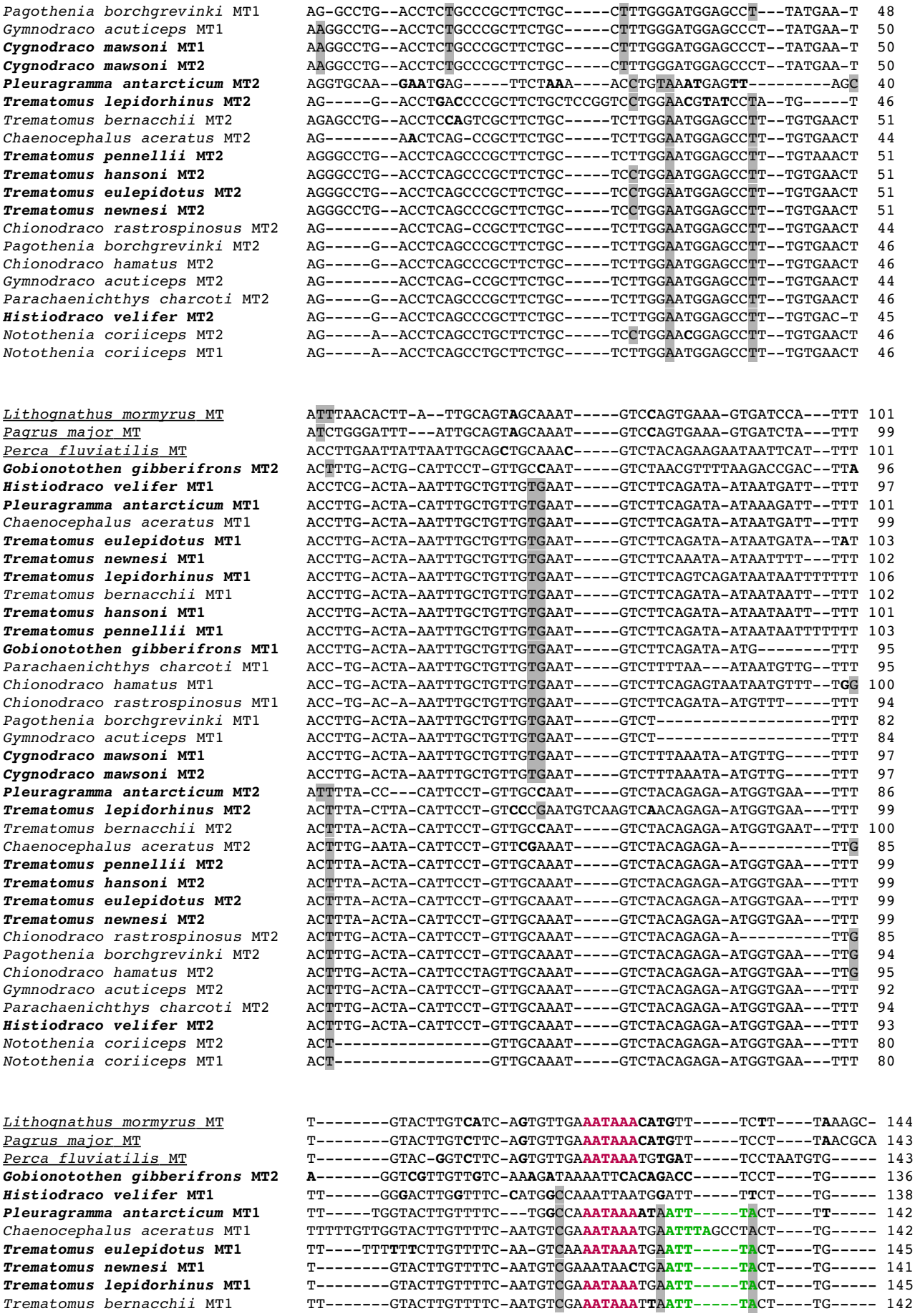
Specie	Identità
T. bernacchii	96,20%
T. newnesi	96,20%
T. lepidorhinus	96,20%
T. pennellii	95,60%
T. hansoni	96,70%
T. eulepidotus	96,20%
P. borchgrevinki	96,20%
N. coriiceps	96,20%
C. hamatus	97,30%
C. aceratus	96,70%
C. rastrospinosus	96,70%
P. charcoti	97,80%
G. acuticeps	97,80%
C. mawsoni	97,80%
H. velifer	97,30%

Tabella 1.5 I valori della percentuale di identità ottenuti dal confronto a copie delle sequenze nucleotidiche della regione codificante di MT-1 e MT-2 per ciascuna specie di Notothenioidei utilizzando il programma bioinformatico Needle. La matrice utilizzata è DNAfull. I valori della penalità per il *gap open* e il *gap extend* sono 10 e 0,5, rispettivamente.

4.3.2 ANALISI DELLE SEQUENZE DELLA 3' UTR

Sulle sequenze delle regioni codificanti delle MT è stato disegnato un *primer forward* specifico per ciascuna delle 2 isoforme, che è stato utilizzato assieme al *primer reverse* per ottenere la sequenza della regione non tradotta all'estremità 3' (3' UTR) del cDNA (fig. 2.6).

```
Lithognathus mormyrus MT          GGCGTCTGCAACATCAGCTGCTTGCTGC-----CCTTGTGATGGTGCCTG--TGTGACCC  53
Pagrus major MT                   GGAGTCCGCAACATCAGCTGCTTGTTGG-----CCTTGTGATGTCACC----TGTGACCC  51
Perca fluviatilis MT              GGATCCTCT-GGATCAGCCCCGTTCTAC-----CCTCATGATTGAGCCGG--TGTGCACC  52
Gobionotothen gibberifrons MT2    AG-----G--ACCTCAGCCCACTTCTGC-----TCTTGGAATGGAGCCTT--TGTGAACT  46
Histiodraco velifer MT1           AAGGCCTG--ACCTCT-CCCGC-TCTGC------TTTGGGATGGAGCCCT--TATGAA-T  47
Pleuragramma antarcticum MT1      AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAACT  51
Chaenocephalus aceratus MT1       AAGGCCTG--ACCTGCTCCCGCTTCTGC------CTTTGGATGGAGCCCT--TATGAA-T  49
Trematomus eulepidotus MT1        AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGA-----CTTTGGGATGGAGCCCTTATATGAACA  53
Trematomus newnesi MT1            AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGA-----CTTTGGGATGGAGCCCTTATATGAACT  53
Trematomus lepidorhinus MT1       AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGA-----CTTTGGGATGGAGCCCTTATATGAACT  53
Trematomus bernacchii MT1         AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGCC----TTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAACT  52
Trematomus hansoni MT1            AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAACT  51
Trematomus pennellii MT1          AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAACT  51
Gobionotothen gibberifrons MT1    AGGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--CATGAACT  51
Parachaenichthys charcoti MT1     AAGGCCTG--ACCTCT-CCCGC-TCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAA-T  48
Chionodraco hamatus MT1           AAGGCCTG--ACCTCTGCCCGCTTCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAA-T  50
Chionodraco rastrospinosus MT1    AAGGCCTG--ACCTCTGCCCGC-TCTGC-----CTTTGGGATGGAGCCCT--TATGAA-T  49
```


Pagothenia borchgrevinki MT1
Gymnodraco acuticeps MT1
Cygnodraco mawsoni MT1
Cygnodraco mawsoni MT2
Pleuragramma antarcticum MT2
Trematomus lepidorhinus MT2
Trematomus bernacchii MT2
Chaenocephalus aceratus MT2
Trematomus pennellii MT2
Trematomus hansoni MT2
Trematomus eulepidotus MT2
Trematomus newnesi MT2
Chionodraco rastrospinosus MT2
Pagothenia borchgrevinki MT2
Chionodraco hamatus MT2
Gymnodraco acuticeps MT2
Parachaenichthys charcoti MT2
Histiodraco velifer MT2
Notothenia coriiceps MT2
Notothenia coriiceps MT1
Lithognathus mormyrus MT
Pagrus major MT
Perca fluviatilis MT
Gobionotothen gibberifrons MT2
Histiodraco velifer MT1
Pleuragramma antarcticum MT1
Chaenocephalus aceratus MT1
Trematomus eulepidotus MT1
Trematomus newnesi MT1
Trematomus lepidorhinus MT1
Trematomus bernacchii MT1
Trematomus hansoni MT1
Trematomus pennellii MT1
Gobionotothen gibberifrons MT1
Parachaenichthys charcoti MT1
Chionodraco hamatus MT1
Chionodraco rastrospinosus MT1
Pagothenia borchgrevinki MT1
Gymnodraco acuticeps MT1
Cygnodraco mawsoni MT1
Cygnodraco mawsoni MT2
Pleuragramma antarcticum MT2
Trematomus lepidorhinus MT2
Trematomus bernacchii MT2
Chaenocephalus aceratus MT2
Trematomus pennellii MT2
Trematomus hansoni MT2
Trematomus eulepidotus MT2
Trematomus newnesi MT2
Chionodraco rastrospinosus MT2
Pagothenia borchgrevinki MT2
Chionodraco hamatus MT2
Gymnodraco acuticeps MT2
Parachaenichthys charcoti MT2
Histiodraco velifer MT2
Notothenia coriiceps MT2
Notothenia coriiceps MT1
Lithognathus mormyrus MT
Pagrus major MT
Perca fluviatilis MT
Gobionotothen gibberifrons MT2
Histiodraco velifer MT1
Pleuragramma antarcticum MT1
Chaenocephalus aceratus MT1
Trematomus eulepidotus MT1
Trematomus newnesi MT1
Trematomus lepidorhinus MT1
Trematomus bernacchii MT1

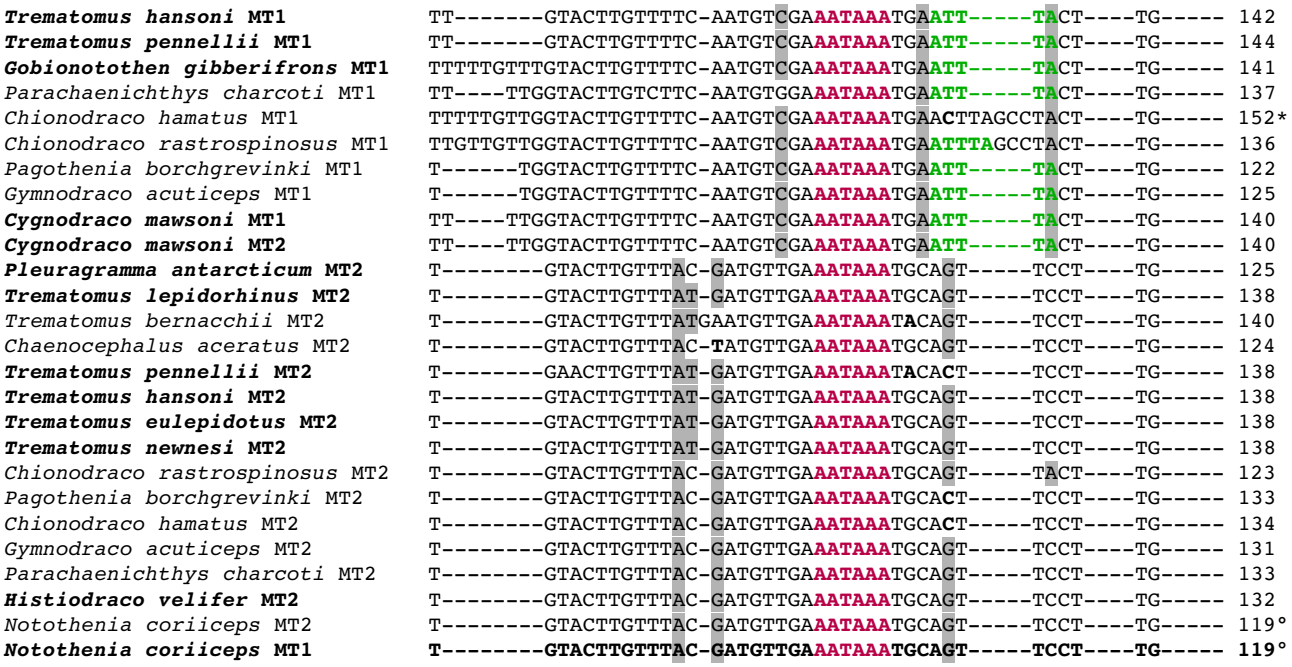


Figura 2.6 Allineamento multiplo globale delle sequenze della 3' UTR del cDNA di MT dei Notothenioidei antartici (in grassetto) caratterizzate nel nostro laboratorio, di quelli presenti nel database di *Genbank* e di altri membri dei Perciformes (sottolineati). Nelle sequenze vengono mostrate in grassetto le differenze in nucleotidi e in sfondo grigio le differenze ripetute. Il putativo segnale di poliadenilazione è mostrato in rosa, mentre quello di rapida degradazione è mostrato in verde.

In figura 2.6 sono riportate anche le regioni 3' UTR di *MT-1* e *MT-2* di *Pleuragramma antarcticum* e *Gobionotothen gibberifrons*.

È da notare che le sequenze delle 3' UTR (*MT-1* e *MT-2*) di *Notothenia coriiceps* sono più corte (119 pb – indicate da °) rispetto alle altre, mentre *Chionodraco hamatus* presenta la sequenza più lunga per la MT-1 (152 pb -indicata con *) (figura 2.6).

Nel confronto a coppie delle sequenze delle isoforme per ognuna delle specie di Notothenioidei, risulta una elevata eterogeneità nei valori della percentuale di identità calcolata secondo Needle (tab. 1.6).

La percentuale di identità più bassa è quella di *Pleuragramma antarcticum* (47,20%), mentre quella più alta è quella di *Cygnodraco mawsoni* (99%). In questa analisi anche la percentuale dei *gaps* è abbastanza eterogenea e va da 0% per *Notothenia coriiceps* e *Cygnodraco mawsoni*, a 36% per *Pleuragramma antarcticum.*

Nelle sequenze nucleotidiche qui riportate della 3' UTR dei Perciformi è presente un putativo segnale di poliadenilazione (**AATAAA**) (Tian *et* al., 2005). Fanno eccezione l'isoforma 1 di *Trematomus newnesi* e *Histiodraco velifer* e quella 2 di *Gobionotothen gibberifrons.*

Specie	Identità	*Gaps*
T. bernacchii	78,50%	4,20%
T. newnesi	76,00%	8,90%
T. lepidorhinus	63,90%	20,90%
T. pennellii	77,10%	4,90%
T. hansoni	79,60%	3,50%
T. eulepidotus	74,80%	7,50%
P. borchgrevinki	70,70%	17,10%
N. coriiceps	98,30%	0,00%
P. antarcticum	47,20%	36,80%
G. gibberifrons	61,00%	25,20%
C. hamatus	70,50%	16,70%
C. aceratus	63,10%	24,80%
C. rastrospinosus	67,10%	18,80%
P. charcoti	73,20%	9,20%
G. acuticeps	68,80%	18,40%
C. mawsoni	99,00%	0,00%
H. velifer	73,20%	5,60%

Tabella 1.6 I valori della percentuale di identità ottenuti dal confronto a coppie delle sequenze nucleotidiche della 3'UTR di *MT-1* e *MT-2* per ciascuna specie di Notothenioidei utilizzando il programma bioinformatico Needle. La matrice utilizzata è DNAfull. I valori della penalità per il *gap open* e il *gap extend* sono 10 e 0,5, rispettivamente.

Un altro putativo segnale presente in quasi tutte le sequenze dei teleostei antartici è quello della rapida degradazione dell'mRNA (**ATTTA**) (Curatola *et* al., 1995). Tale segnale compare solo nella 3' UTR di MT-1 ed è assente nell'isoforma MT-2 dei Notothenioidei. Comunque fanno eccezione le sequenze dell'isoforma 1 di *Chionodraco hamatus*, *Histiodraco velifer* e *Notothenia coriiceps* e l'isoforma 2 di *Gobbionotothen gibberifrons* e *Cygnodraco mawsoni* (dove è presente).

4.3.3 ANALISI DELLE SEQUENZE DELLA 5' UTR

I *primers* specifici per ciascuna delle isoforme di MT sono stati progettati sulle sequenze della regione codificante. Le sequenze 5' UTR ottenute sono state confrontate con le poche sequenze di teleostei presenti in *Genbank* (fig. 2.7) mediante l'utilizzo del programma bioinformatico MAFFT (Katoh *et* al.,2002). Tale *software* è risultato molto efficiente per allineare le sequenze di lunghezze molto variabili come quelle considerate.

```
Notothenia coriiceps MT2      ----------------------ATCTGAGACCAGATACACTGC----ACCTACTCACGAG  34
Notothenia coriiceps MT1      ------------------------CTCAGACCAAAG-----------ACCTTCTCACGAG  25
Danio rerio MT2               --------ATCAACTCATTCACAAGCTGAGTGAACGATATTTCTAAGGAACTTTCAAGCT  52
Anguilla anguilla MT1         ------------ACGCGGGGAGCAGTCTAACTGACAATACTTCTGTTCACATTCGTCAAG  48
Cyprinus carpio MT1           ------------------CTCGAGGTCGACGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTGCACG  41
Gobio gobio MT2               CCTTCCACATCAACTCATTCACAAACCGAGTGAAGTGATATTTCAAGGGACTTTCGGACT  60
Gobio gobio MT1               CCTTCCACATCAACTCATTCACAAACCGAGTGAAGTGATATTTCAAGGGACTTTCGGACT  60
Chionodraco hamatus MT1       --------GACAAAACGCTCTCATCTCAGACCAAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  48
Sparus aurata MT              -------------------------------TGAAGACGCAAT----CACATCTCACGAA  25
Gadus morhua MT               ----------------------------AGACAAGAACACATT----CGCTCAACACAGA  28
Oryzias latipes MT            ------------ACACCGACTCGACTCTGACAGACGGACCTGCAGCGGCTCTCTAAAGGA  48
Chionodraco hamatus MT2       ---GACAACACAACACGCTCTCATCTGAGACCAGATACACTGC----ACCTACTCACGAG  52
Oncorhynchus mykiss MT        -----------AGCTCAACAGTGAAATTAAGCTGAAATACTTC---------ATTTGACTA  41
Trematomus hansoni MT1        ---------ACAACACGCTCTCATCTCAGACCGAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus hansoni MT2        ---------ACAACACGCTCTCATCTGAGACCAGATACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus newnesi MT1        ---------ACAACACGCTCTCACCTCAGACCAAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus newnesi MT2        ---------ACAACACGCTCTCATCTGAGACCAGATACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Cygnodraco mawsoni MT1        ---------ACAACACGCTCTCATCTCAGACCAAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Cygnodraco mawsoni MT2        ---------ACAACACGCTCTCATCTGAGACCAGATACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus eulepidotus MT1    ---------ACAACACGCTCTCATCTCAGACCAAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Histiodraco velifer MT1       ---------ACAAAACGCTCTCATCTCAGACCAAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus lepidorhinus MT1   ---------ACAACACGCTCTCATCTCAGACCAAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus pennellii MT1      ---------ACAACACGCTCTCATGTCAGACCAAAGACAATGC----ACTTACTCACGAG  47
Trematomus lepidorhinus MT2   ----------------------ATCTGAGACCAAATACACTGC----ACCTACTCCCGAG  34
Trematomus pennellii MT2      ----------------------ATCTGAGACCAAATACACTGC----ACCTACTCACGAG  34
Trematomus eulepidotus MT2    ---------ACAACACGCTCTCATCTGAGACCAGATACATTGC----ACCTACTCACGAG  47
Histiodraco velifer MT2       ---------TCAACACGATCTCATTTGAGACCAGATAGACTGC----ACCTACTCAGGAG  47
Trematomus bernacchii MT2     ---------ACAACACGATCTCATCTGAGACCAGATAGACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Gymnodraco acuticeps MT1      ---------ACAACACGCTCTCATCTCAGACCGAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Gymondraco acuticeps MT2      ---------ACAACACGCTCTCATCTGAGACCAGATACACTGC----ACCTACTCACGAG  47
Trematomus bernacchii MT1     ---------ACAACACGCTCTCATCTCAGACCGAAGACACTGC----ACCTACTCACGAG  47


Notothenia coriiceps MT2      GACAAG---AGAGATCATCTGAGAA-C  57
Notothenia coriiceps MT1      GACAAG---AGGCATCACCTGAGAA-C  48
Danio rerio MT2               CTTTGA---GGATACTCTCTGGAAA-A  75
Anguilla anguilla MT1         GAAAAA---GAAGGGAATCTGAAAA-T  71
Cyprinus carpio MT1           AGCTCG---TGCCGCTCTTTAGAAA-A  64
Gobio gobio MT2               CTTTGA---GAATACTCCTGAGGAA-A  83
Gobio gobio MT1               CTTTGA---GAATACTCCTGAGGAA-A  83
Chionodraco hamatus MT1       GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  71
Sparus aurata MT              GAGAAACCTCGACATCACCTGAAAA--  50
Gadus morhua MT               GAAGAA-CTGACCACTACCTGAAAAAA  54
Oryzias latipes MT            TCAAGCAGCCTTTAAAGAAAAATAATA  75
Chionodraco hamatus MT2       GACGAG---AGACATCACCTGAGAA-C  75
Oncorhynchus mykiss MT        AAGAAGCGCGATCAAAAACTGAAAA--  66
Trematomus hansoni MT1        GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus hansoni MT2        GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus newnesi MT1        GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus newnesi MT2        GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Cygnodraco mawsoni MT1        GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Cygnodraco mawsoni MT2        GACGAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus eulepidotus MT1    GACAAG---AGACATCACTTGAGAA-C  70
Histiodraco velifer MT1       GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus lepidorhinus MT1   GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus pennellii MT1      GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus lepidorhinus MT2   GACCAA---AGACATCACCTGAGAA-C  57
Trematomus pennellii MT2      GACGAA---AGACATCACCTGAGAA-C  57
Trematomus eulepidotus MT2    GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
```

```
Histiodraco velifer MT2        GACGAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus bernacchii MT2      GACGAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Gymnodraco acuticeps MT1       GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Gymondraco acuticeps MT2       GACGAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
Trematomus bernacchii MT1      GACAAG---AGACATCACCTGAGAA-C  70
```

Figura 2.7 Allineamento multiplo globale delle sequenze della 5' UTR del cDNA di MT dei teleostei antartici (in grassetto) caratterizzate nel nostro laboratorio e di tutte quelle presenti nel database di *Genbank.* Nelle sequenze vengono mostrate in grassetto le differenze in nucleotidi e in sfondo grigio le differenze ripetute in più specie.

Dal confronto risulta che la sequenza di minori dimensioni è quella dell'isoforma 1 di *Notothenia coriiceps*, mentre quelle di dimensioni maggiori sono quelle di entrambe le isoforme di *Gobio gobio*. Tra i teleostei antartici la sequenza più lunga e quella di MT-2 di *Chionodraco hamatus*.

In tabella 1.7 sono riportati i valori in percentuale di identità tra le coppie delle 2 isoforme per ognuna delle specie di Notothenioidei. È evidente che tali valori presentano una elevata eterogeneità.

Specie	Identità	*Gaps*
T. bernacchii	90,00%	0,00%
T. newnesi	94,30%	0,00%
T. lepidorhinus	74,30%	18,60%
T. pennellii	71,40%	18,60%
T. hansoni	94,30%	0,00%
T. eulepidotus	92,90%	0,00%
N. coriiceps	71,90%	15,80%
C. hamatus	85,50%	6,60%
G. acuticeps	92,90%	0,00%
C. mawsoni	94,30%	0,00%
H. velifer	85,70%	0,00%

Tabella 1.7 I valori della percentuale di identità ottenuti dal confronto a coppie delle sequenze nucleotidiche della 5'UTR di *MT-1* e *MT-2* per ciascuna specie di Notothenioidei utilizzando il programma bioinformatico Needle. La matrice utilizzata è DNAfull. I valori della penalità per il *gap open* e il *gap extend* sono 10 e 0,5, rispettivamente.

La maggiore percentuale di identità è presente nelle specie di *Trematomus newnesi, Trematomus hansoni* e *Cygnodraco mawsoni* (94,30%), mentre quella minore in *Trematomus pennellii* (71,40%) che, assieme a *Trematomus lepidorhinus,* possiede la percentuale di *gaps* più elevata tra tutti i Notothenioidei.

Da queste prime analisi condotte sulla regione codificante e sulle regioni non tradotte, posso concludere che le 2 isoforme differiscono maggiormente tra di loro nella regione non tradotta

piuttosto che in quella codificante. Questo risultato rende evidente l'elevato grado di somiglianza delle isoforme di MT correlato alla loro funzione.

4.4 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DELLA REGIONE CODIFICANTE

Basandosi sul dato che l'evoluzione molecolare delle MT nei Notothenioidei è avvenuta secondo l'orologio molecolare rilassato (paragrafo 4.2), è stata effettuata un'analisi filogenetica sulle sequenze delle regioni codificanti dei 12 Notothenioidei caratterizzate nel laboratorio e su quelle dei 16 Notothenioidei presenti in GenBank (fig. 2.5).

Nella figura 2.8 è presentata l'analisi filogenetica basata sulla regione codificante.

È stato applicato il metodo di *maximum likelihood* implementato in GARLI e quello baesiano in Mr. Bayes e un *software* bioinformatico che riesce ad effettuare allineamenti iterativi, ma nonostante tale non tutti rami filogenetici sono supportati da elevati valori di *bootstrap* o di probabilità posteriore baesiana. Il motivo dell'esistenza della bassa risoluzione filogenetica nella regione codificante può essere dovuto alla variabilità estremamente bassa presente tra le MT dei Notothenioidei. Solo l'applicazione del metodo baesiano in Beast secondo il modello di sostituzione nucleotidica Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (frequenze delle basi nucleotidiche variabili; frequenze di transizioni e transversioni variabili) (Hasegawa *et* al., 1985) ha permesso di separare le MT dei Notothenioidei in due cladi, *MT-1* e *MT-2* (fig. 2.8). Ogni clade contiene solo una delle 2 isoforme di MT espresse in ognuna delle specie di Notothenioidei suggerendo l'esistenza di almeno 2 gruppi di geni paraloghi (*MT-1* e *MT-2*) in queste specie di pesci antartici. Il pattern osservato può essere spiegato assumendo che sia avvenuto un evento di duplicazione genica dopo la separazione dell'antenato comune dei Notothenioidei dagli altri teleostei, ma prima della diversificazione delle specie di Notothenioidei.

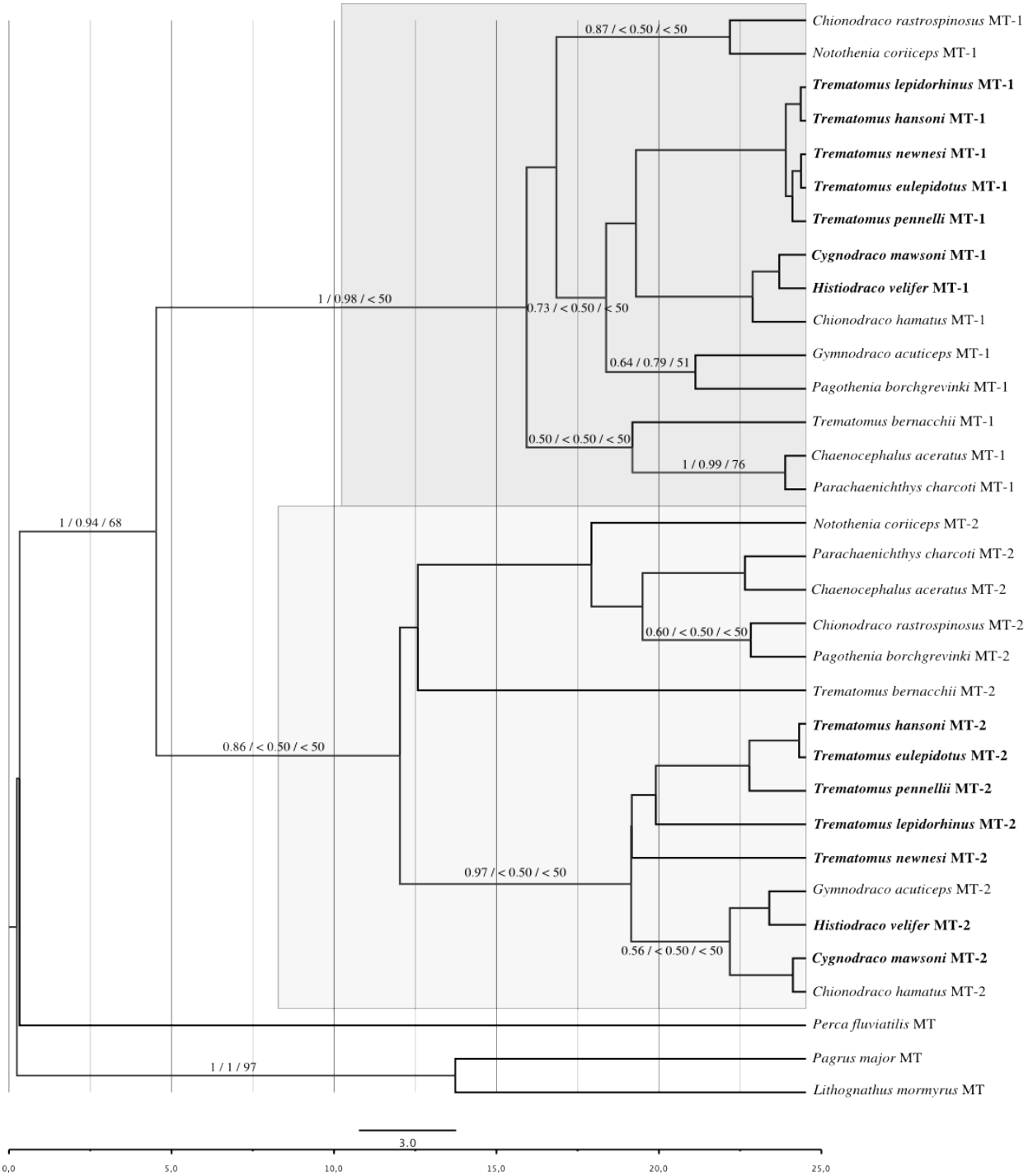


Figura 2.8 Albero filogenetico consenso basato sull'allineamento delle sequenze della regione codificante delle MT ottenuto dalle analisi di *Maximum Likelihood* e quelle baesiane. I numeri presenti nei rami indicano i valori di probabilità posteriore baesiana dell'albero filogenetico costruito con BEAST (a sinistra), Mr. Bayes (in centro) e i valori di *bootstrap* ottenuti con GARLI (destra). I nomi delle specie in grassetto rappresentano le specie le cui sequenze di MT sono state caratterizzate nel nostro laboratorio. Come *outgroup* sono state usate le sequenze di *Perca fluviatilis*, *Lithognathus mormyrus* e *Pagrus major*, in base alla posizione ottenuta negli alberi filogenetici costruiti con sequenze del *citocromo c* e su dati morfologici (Balushkin, 1992). Il *maximum-likelihood score* finale è -602.98. I parametri del modello General Time Reversible (GTR) utilizzato da GARLI sono R (a) AC = 0.529, R (b) AG = 1.079, R (c) AT = 0.654, R (d) CG = 0.410, R (e) CT = 2.102, R (f) GT = 1.000 con le frequenze dei nucleotidi che sono A = 0.2517 , C = 0.2839, G = 0.3052 e T = 0.1592; la proporzione dei siti invariati = 0.387 e il parametro alfa = 0.706. In Mr. Bayes la media aritmetica del *likelihood score* è -736.27 e in BEAST la media del *likelihood score* è -663.91.

Sino al Giurassico, 140 milioni di anni fa (MAF), l'Antartide occupava latitudini temperate e faceva parte del supercontinente Gondwana che includeva anche Africa, Arabia, Madagascar, India, Ceylon, Australia, Nuova Zelanda e Sud America. Alla fine del Giurassico è iniziato lo smembramento del Gondwana e, durante il Terziario (25-22 MAF) l'Antartide si è distaccata completamente dall'America Meridionale (Kennett, 1977).

Questo evento avrebbe portato alla formazione del Corrente Circumpolare Antartica (CCA) e del Fronte Polare. Circa 15–10 milioni di anni fa, le placche terrestri raggiunsero le posizioni attuali e le temperature scesero sotto 0°C durante il Miocene (Bargelloni *et* al., 1994).

Attualmente, i Notothenioidei non antartici non possiedono geni di glicoproteine *antifreeze* (AFGP), indicando che essi si diversificarono prima dell'isolamento tettonico e del raffreddamento dell'Antartide che viene quindi associato alla comparsa delle AFGP (Cheng *et* al., 2003).

É stato stimato da Bargelloni e collaboratori (2000) che la separazione tra gli Eleginopidi (i Notothenioidei non antartici che non hanno le AFGP) e il clade antartico con le AFGP sia avvenuta 27 MAF. Basandosi invece sul tasso evolutivo del DNA mitocondriale (mtDNA) nei Notothenioidei, è stato suggerito che la radiazione dei Notothenioidei antartici sia cominciata non prima del Miocene tardivo (15-7 MAF) (Bargelloni *et* al. 1994). Tenendo conto di tutti questi dati paleontologici della letteratura e assumendo che la radiazione dei Notothenioidei antartci sia iniziata almeno 15 MAF (Bargelloni *et* al., 2000), utilizzando l'algoritmo di Dan Graur e Wen-Hsiung Li (1999) ho stimato che l'evento della duplicazione genica nei Notothenioidei sia accaduto circa 19,84 milioni di anni fa. Quindi, per costringere nella scala temporale la topologia dell'albero filogenetico ho utilizzato come priorità di tempo il valore medio di 20 milioni che indica l'evento di duplicazione genica nei teleostei antartici.

La topologia dell'albero filogenetico ottenuto per le MT dei Notothenioidei (fig. 2.8) è stata successivamente confrontata con l'albero filogenetico (fig. 2.9) costruito sulle sequenze complete di DNA mitocondriale del gene codificante per l'RNA ribosomale (rRNA) 16S (Near *et* al., 2004). L'albero filogenetico basato sulla regione codificante delle metallotioneine (fig. 2.8) e l'albero filogenetico basato sul 16S rRNA (fig. 2.9) sono notevolmente differenti.

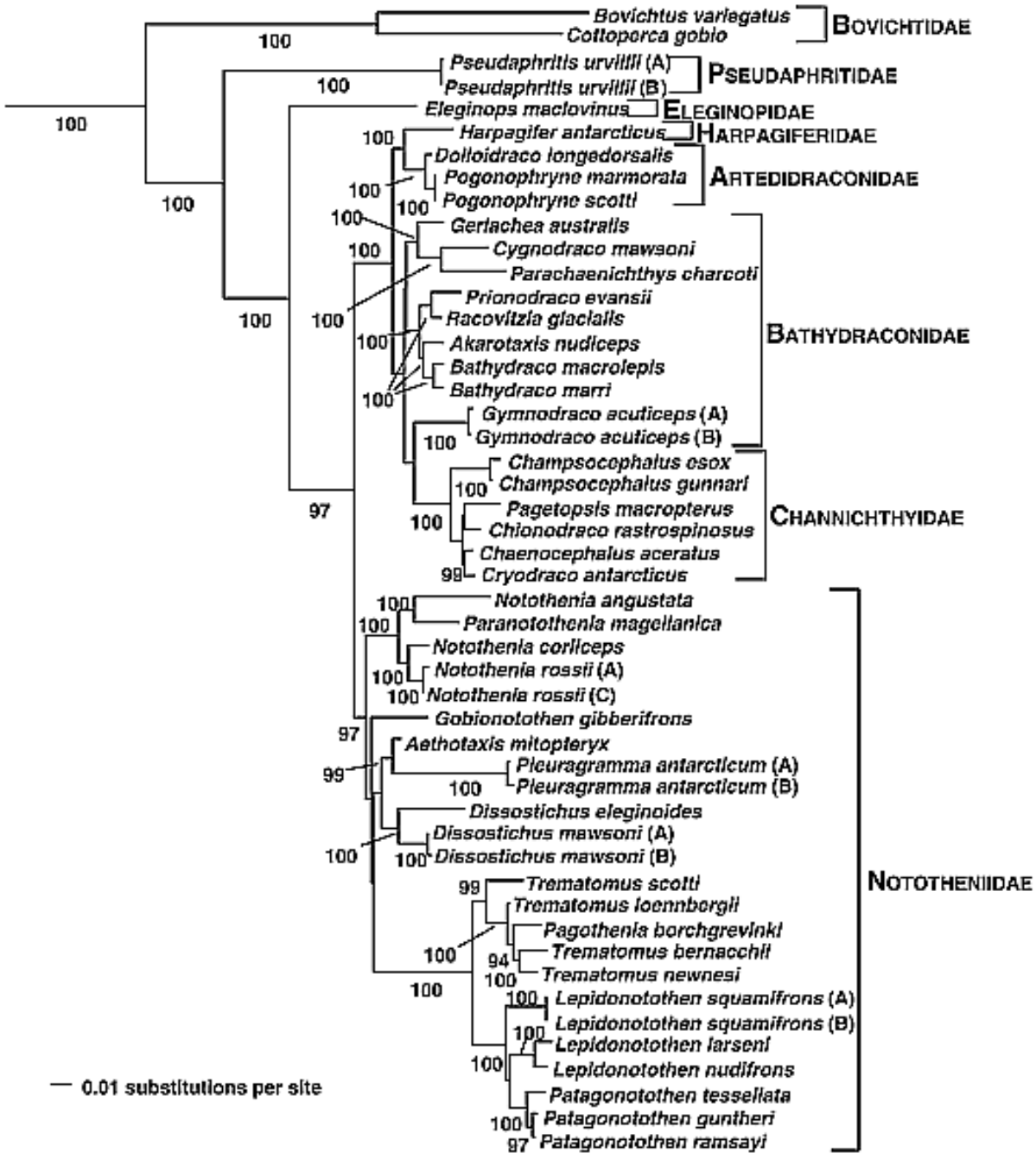


Figura 2.9 L'albero filogenetico risultante dalle analisi di *maximum likelihood* eseguite da Near e suoi collaboratori (2004) sul *dataset* delle sequenze complete del gene 16S rRNA. Il valore di *maximum likelihood* è uguale a -14970,49. I parametri del modello GTR sono R (a) AC = 1.8508, R (b) AG = 6.9370, R (c) AT = 1.8009, R (d) CG = 0.7668, R (e) CT = 8.3020, R (f) GT = 1.0000 con le frequenze dei nucleotidi che sono A = 0.3554, C = 0.2584, G = 0.1735 e T = 0.2127, la proporzione dei siti invariati = 0.4168 e il parametro alfa = 0.7483. I rami filogenetici sono proporzionali al numero di sostituzioni per sito. I numeri nei nodi dell'albero filogenetico rappresentano le probabilità posteriori baesiane.

Riporto le differenze fra le topologie dei 2 alberi, considerando i rami supportati da valori superiori a 0,50 di probabilità posteriore baesiana.

Nell'albero filogenetico della filogenesi delle specie (fig. 2.9) i membri della famiglia Nototheniidae formano un unico clade, *sister group* delle famiglie Channichthyidae, Bathydraconidae, Artedidraconidae e Harpagiferidae, tutti Notothenioidei antartici.

Se nell'albero filogenetico dell'evoluzione molecolare di MT (fig. 2.8) confrontiamo all'interno del clade MT-1, *Notothenia coriiceps* e *Trematomus bernacchii*, entrambi membri della famiglia Nototheniidae, notiamo che le relative sequenze escono come *sister groups* di membri della famiglia Channichthyidae.

Gymnodraco acuticeps e *Pagothenia borchgrevinki*, rispettivamente membri della famiglia Notothenidae e Bathydraconidae (fig. 2.9), escono come *sister groups* nel clade di MT-1.

Nel clade MT-2 alcune specie di Trematomidi (sottofamiglia di Nototheniidae) sono compresi nello stesso clade assieme a specie di Channichthyidae, Bathydraconidae, Artedidraconidae e Harpagiferidae. Queste specie non sono posizionate nello stesso clade nell'albero della filogenesi delle specie (fig. 2.9).

Secondo altri studi su alcuni geni nucleari di altri organismi,, i *mismatch,* evidenziati dal confronto dell'albero filogenetico tratto dalle sequenze di geni nucleari con quello della filogenesi delle specie, sono comuni tra specie strettamente correlate filogeneticamente (Templeton, 2001; Shaw, 2002; Funk e Omland, 2003; Machado e Hey, 2003; Edwards *et* al., 2005; Pollard *et* al., 2006).

Templeton (2001) puntualizza che nei gruppi di organismi che si stanno diversificando o che si sono diversificati recentemente si osservano più *mismatch* nel confronto tra alberi filogenetici dell'evoluzione molecolare e quelli della filogenesi delle specie. Comunque essi rappresentano gli esempi più informativi riguardo ai processi della speciazione. La presenza di questi *mismatch* può essere dovuta principalmente al polimorfismo ancestrale condiviso da tutti i membri presi in esame o dall'ibridazione introgressiva. Quindi, i *mismatch* osservati possono essere spiegati con la presenza della selezione positiva che potrebbe avere operato durante l'evoluzione molecolare delle MT nei Notothenioidei.

4.5 TEST DI *MAXIMUM LIKELIHOOD* UTILIZZANDO I MODELLI *BRANCH-SITE*

Allo scopo di analizzare la possibile esistenza della selezione positiva dopo la duplicazione genica, sono stati effettuati diversi test di *likelihood ratio* utilizzando i modelli matematici *branch-site* A+B implementati nel *software* bioinformatico PAML. In questi modelli viene considerato il rapporto di sostituzioni nucleotidiche nonsinonime su siti nonsinonimi (***dN***) e sostituzioni sinonime su siti sinonimi (***dS***) che indica l'omega (***ω***). I modelli *branch-site* permettono ad omega di variare sia lungo le linee filogenetiche che lungo i siti codonici. .

L'ipotesi nulla ($\mathbf{H_0}$) assume una pressione selettiva omogenea che ha operato durante l'evoluzione molecolare delle MT nei teleostei antartici.

La prima ipotesi alternativa ($\mathbf{H_A}$) assume che il tasso evolutivo sia stato incrementato in MT-1 dopo l'evento di duplicazione genica. Ciò significa che nell'evoluzione molecolare di questa isoforma è successo un cambiamento episodico nella pressione selettiva. Per valutare quale delle 2 ipotesi è valida nel nostro caso è stato utilizzato il modello *branch-site* A+B effettuando il test 1 in PAML.

Successivamente sono state valutate altre 2 ipotesi.

L'ipotesi $\mathbf{H_B}$ considera l'esistenza di una selezione positiva che ha permesso la divergenza funzionale dopo l'evento della duplicazione genica. Perciò solo nell'evoluzione di MT-1 potrebbe essere avvenuto uno *shift* a lungo termine nella pressione selettiva, mentre la MT-2 sarebbe rimasta alla pressione selettiva ancestrale.

L'ipotesi $\mathbf{H_C}$ assume la presenza di un cambiamento a lungo termine nella pressione selettiva; perciò su entrambe le isoforme MT-1 e MT-2 si sarebbe avuto uno *shift* a lungo termine. Queste isoforme quindi potrebbero essere state soggette a pressioni selettive diverse tra di loro e dal gene ancestrale.

Per queste 2 ipotesi sono stati utilizzati i modelli *branch-site* A+B effettuando il test 2 per l'ipotesi $\mathbf{H_B}$ e il test 1+2 per l'ipotesi $\mathbf{H_C}$.

Come mostrato nella tabella 1.8, dal test *LR* solo l'ipotesi $\mathbf{H_C}$ può essere accettata solo per $P < 0,1$, pertanto essendo tale valore probabilistico relativamente alto e non statisticamente significativo, la terza ipotesi alternativa non può essere accettata.

Modelli	Modelli della Frequenza Codonica															g.l.
	F3x4							F61								
	ω1	ω2	ω3	ω4	l	LRT	P	ω1	ω2	ω3	ω4	l	LRT	P		
H 0ω1 =ω2 =ω3 =ω4	0,0972	0,0972	0,0972	0,0972	1,4581			0,1670	0,1670	0,1670	0,1670	1,6008				
H 1ω1 =ω2 =ω3 ≠ ω4	0,1044	0,1044	0,1044	0,0001	1,4615	0,2843	0,5939	0,1811	0,1811	0,1811	0,0001	1,5848	4,2976	0,0382	1	
H 2ω1 =ω2 ≠ ω3 =ω4	0,0953	0,0953	0,1017	0,1017	1,4598	0,0151	0,9022	0,1596	0,1596	0,1860	0,1860	1,6058	1,3137	0,2517	1	
H 3ω1 ≠ ω2 ≠ ω3 =ω4	0,0446	0,1213	0,1274	0,1274	1,4429	2,9085	0,0881	0,0724	0,2150	0,2186	0,2186	1,5889	4,3021	0,0381	1	

Tabella 1.8 Parametri stimati per modelli matematici dove ω ($\omega = dN/dS$) varia lungo le linee filogenetiche e i siti codonici per ognuno dei modelli delle frequenze di codoni. Per il modello **F3x4** le frequenze codoniche dell'equilibrio derivano dalle frequenze dei tre nucleotidi nelle tre posizioni del codone, mentre per il modello **F61** ogni codone è considerato come un parametro libero di variare finché la sommatoria delle frequenze nucleotidiche rimane uguale a uno. ***LRT*** rappresenta i valori del test *LR* per ogni modello considerando il gene MT-1 e MT-2 e ***P*** rappresenta la probabilità della significatività statistica. La lunghezza dell'albero filogenetico (***l***) è il numero atteso di sostituzioni per sito lungo i rami filogenetici nella filogenesi, calcolato come sommatoria della lunghezza di ogni rame filogenetico. (**g.l.**) rappresenta i gradi di libertà del test *likelihood ratio*.

Ho quindi ritenuto opportuno rianalizzare i dati utilizzando altri modelli matematici.

4.6 TEST DI *MAXIMUM LIKELIHOOD* UTILIZZANDO I MODELLI *SITE*

Ho ritenuto opportuno indagare la presenza della selezione positiva considerando solo i codoni: ho perciò utilizzato in questo caso i modelli matematici *site* che permettono a ω di variare lungo i siti codonici e non lungo le linee filogenetiche. Sono stati applicati una serie di modelli *site* implementati in PAML secondo ognuno dei modelli di frequenze codoniche (**F3X4** e **F61**).

Prima è stato confrontato il modello **M0**, nel quale si assume che ω non cambia lungo i rami filogenetici nella filogenesi e lungo i siti nucleotidici nel gene (valori stimati di ω sono 0.09693 per **F3x4** e 0.16743 per **F61**, rispettivamente), con il modello **M3**. Come mostrato nella tabella 1.9, l'unico modello che risulta accettabile da questo confronto è quello di **M3** che assume l'esistenza di una pressione selettiva variabile lungo i siti dei geni delle metallotioneine ($P < 0,01$ per **F3x4** e $P < 0,01$ per **F61**).

Modelli confrontati	Modelli delle Frequenze Codoniche				g.l.
	F3x4		F61		
	LRT	*P*	*LRT*	*P*	
M0 vs M3	28,1828	< 0,01	17,8792	0,0013	4
M1 vs M2	3,6376	0,1622	0,2421	0,8860	2
M7 vs M8	2,5357	0,2814	1,3829	0,3679	2

Tabela 1.9 Risultati di *LRT,* nei quali viene messo in confronto un modello neutrale con un modello di selezione e i loro relativi valori della probabilità (*P*). I modelli matematici sono quelli *site*, nei quali ***ω*** varia lungo i siti codonici dei geni di MT. (**g.l.**) rappresenta i gradi di libertà del test *likelihood ratio*.

Seguendo i suggerimenti di Bielawski e Yang (2004) è stato effettuato il test di *LR* mettendo a confronto il modello **M1,** che rappresenta la condizione di neutralità, con **M2,** che rappresenta la presenza di selezione positiva. Successivamente è stato eseguito un ultimo test statistico confrontando il modello **M7** con **M8**. Per una P < 0,1 è stato rigettato il modello di selezione **M2** ed è stato accettato il modello di neutralità **M1**, nel quale si assume che nell'evoluzione molecolare di questi geni di teleostei antartici esista una variabile pressione selettiva, ma la selezione positiva non opera lungo i siti nucleotidici dei geni. Inoltre, risultati del test statistico di *likelihood ratio* mostrano che il modello rigettato è quello **M8**, mentre il modello che può essere accettato è **M7**, che indica che nei geni delle MT è esistito solo una pressione selettiva variabile seguendo la distribuzione Beta (***β***) e non è presente la selezione positiva (P < 0,1) (Yang, 2004).

Per avere una conferma definitiva dei risultati ottenuti dai modelli *site* è stato utilizzato un altro *software* bioinformatico, PARRIS (Konrad *et* al., 2006). Questo *software* si basa sui modelli matematici *site*, ma diversamente da PAML tiene conto di possibili eventi di ricombinazione genica.

I risultati ottenuti da PARRIS confermano che sull'evoluzione molecolare delle MT dei Notothenioidei non ha operato la selezione positiva per P < 0,05.

Quindi, dai risultati delle analisi si può affermare che i geni delle MT dei teleostei antartici non possiedono mutazioni vantaggiose causate dalla selezione positiva dopo l'evento di duplicazione genica e la diversificazione dei Notothenioidei. Come risulta dall'applicazione dei modelli *branch-*

site, nelle 2 isoforme di MT è avvenuto soltanto uno *shift* a lungo termine. I geni di MT-1 e MT-2 sono stati soggetti a pressioni selettive diversi tra di loro e dal gene ancestrale. Simili risultati si sono ottenuti anche per i geni di miostatina in *Salmo salar* (Ostbye *et* al., 2007).

Generalmente dopo la duplicazione genica, le mutazioni permettono la divergenza delle coppie geniche. Inizialmente, una delle coppie geniche può potenzialmente proteggere l'altra coppia dall'azione della selezione naturale. Se un gene è soggetto a mutazioni deleterie ricorrenti, duplicazioni geniche ricorrenti possono diffondersi in una popolazione di individui più velocemente che nel caso in cui il gene è soggetto a mutazioni neutrali (Clark, 1994). Secondo Ohno (1970) una mutazione è più predisposta ad avere effetti negativi sulla funzione e quindi il modello classico predice che probabilmente una delle coppie geniche perderà la sua funzione originale dopo la duplicazione genica, mentre l'altra copia conserverà quella funzione. Raramente può avvenire una mutazione vantaggiosa che possa cambiare la funzione di una delle coppie geniche e quindi le due coppie geniche possono venire conservate.

Studi precedenti danno ottimi esempi di come la diversità dell'espressione tissutale di geni duplicati contribuisce alla diversificazione funzionale (Markert, 1964). Ohno (1970) propose che la divergenza in espressione costituisce il primo passo nella divergenza funzionale tra i geni duplicati e come conseguenza incrementa la possibilità di conservazione dei geni duplicati nel genoma. Molte copie geniche caratterizzate da un valore di divergenza sinonima bassa (**Ks**) mostrano divergenza in espressione. A causa di ciò, la divergenza in espressione tra i geni duplicati può avvenire rapidamente.

In studi condotti sul lievito è stato trovato che la divergenza in espressione e la divergenza nella sequenza proteica sono inizialmente correlate (Blanc *et* al., 2003). Kim e collaboratori (2005) condussero una serie di analisi di espressione dei geni duplicati associati alla risposta cellulare contro lo stress ossidativo. Questi geni erano il prodotto del più recente evento di duplicazione genomica, il quale si stima essere accaduto 40-20 milioni di anni fa (Blanc *et* al., 2003). La maggioranza di questi geni duplicati si sono diversificati in espressione. Comunque essi mostrano un significativo grado di conservazione nella sequenza nucleotidica della regione codificante.

In *Notothenia coriiceps*, *Chionodraco hamatus* (Bargelloni *et* al. 1999) e *Trematomus newnesi* (Bakiu, dati non pubblicati) è stato osservato che livelli di mRNA di MT-2 sono 6 volte più elevati rispetto a quelli di MT-1 in tessuti di muscolo, cervello e fegato. Questi dati suggeriscono che i 2 geni si siano diversificati in espressione nei teleostei antartici, ma le sequenze delle regioni

codificanti si sono conservate. Infatti, per i 2 modelli di frequenze codoniche, il valore medio di ω stimato (da PAML e PARRIS) è 0,132. Tale risultato indica che i geni di ciascuna delle isoforme si sono evoluti sotto una forte selezione purificante (o negativa) all'interno della linea filogenetica di questi pesci.

4.7 IDENTIFICAZIONE DEGLI AMINOACIDI SOGGETTI A COSTRIZIONI FUNZIONALI STRINGENTI

L'intensità della selezione purificante è determinata dal grado di intolleranza verso le mutazioni che caratterizzano un sito o una regione genomica. Questa costrizione funzionale o selettiva definisce il *range* dei nucleotidi alternativi che risultano accettabili in un sito senza influire negativamente sulla funzione o sulla struttura del gene o del suo prodotto. Regioni del DNA (per esempio le regioni codificanti per proteine o le sequenze regolative) nelle quali una mutazione potrebbe influenzare la funzione, possiedono una costrizione funzionale più stringente rispetto alle regioni prive di funzione (Grauer *et* al., 2000). Maggiore è la costrizione funzionale su una macromolecola, minore sarà il tasso di sostituzione nucleotidica. Finché i geni codificanti per proteine sono conservati, ci saranno buone aspettative di quantificare le costrizioni funzionali indipendentemente dei loro tassi di sostituzione nucleotidica. Un modo per misurare la costrizione funzionale è quello di determinare la densità funzionale (Zuckerland, 1976). La densità funzionale di un gene (***F***) è determinata dal rapporto ***n/N***, dove ***n*** è il numero di siti impegnati a svolgere specifiche funzioni e ***N*** è il numero totale dei siti. In questo modo, ***F*** è la proporzione degli aminoacidi che sono soggetti a costrizioni funzionali stringenti. In questo caso, per stimare ***F*** è necessario conoscere il valore ***n***, definito come la sommatoria del numero di siti di funzione nota e il numero di siti di funzione non nota (ma importanti riguardo la funzionalità proteica) i quali sono stati soggetti alla selezione negativa. È noto che la funzionalità della MT dipende sopratutto dalla distribuzione delle cisteine nella struttura primaria della proteina (Miles *et* al., 2000), i siti di questi aminoacidi sono stati considerati come siti di funzione nota.

I siti di funzione non nota sono stati determinati utilizzando i metodi *maximum likelihood* SLAC, REL e FEL. Solo gli aminoacidi che risultarono statisticamente significativi (basandosi sui risultati di ognuno dei 3 metodi) sono stati considerati come negativamente selezionati (tab. 2.0). ***F*** è stato stimato essere 41,7% per le MT di teleostei antartici. Inoltre è stato calcolato la densità funzionale solo per le MT scelte come *outgroups* che risultano essere 40,0%. Siccome la densità funzionale delle MT di teleostei antartici è leggermente superiore rispetto alla densità funzionale delle MT *outgroups* , sembra probabile che le MT dei Notothenioidei siano evolute con un tasso di sostituzione minore.

Generalmente, gli aminoacidi negativamente selezionati tendono ad essere resistenti alla sostituzione durante l'evoluzione. Ciò è conseguenza della conservazione del volume e la idrofobicità proteica. I nostri risultati indicano che questi aminoacidi sono 4: *Lys 8*, *Lys 52*, *Pro 3* e *Asp 2* (tab. 2.0).

					Metodi *Maximum Likelihood*							
Aminoacido	Codone	Cambiamento Codonico	Numero di cambiamenti paralleli	Numero di cambiamenti convergenti	SLAC		FEL		REL			Clade
					E[dN-dS] normalizzato	*P*	*E[dN-dS]* normalizzato	*P*	*E[dN-dS]* normalizzato	Probabilità posteriore	Fattore baesiano	
Asp	2	GAT→GAC	3	1	-16,1540	0,0010	-4,1510	0,0030	-2,3512	0,9989	221,0540	O, A
Pro	3	CCC(G→)CCT	4	1	-11,9160	0,0040	-7,0040	< 0,01	-2,7068	1	11742,7000	O, A
Lys	8	AAA→AAG	0	2	-14,1570	0,0060	-26,0830	< 0,01	-4,5843	0,9998	1359,5700	A_1
Cys	47	TGC→TGT	5	0	-20,1930	< 0,01	-19,9510	< 0,01	-4,9403	1	26838,5000	O, A
Lys	52	AAG→AAA	2	0	-9,4070	0,0330	-10,4540	0,0020	-3,0828	0,9968	74,4374	O, A_2

Tabella 2.0 I siti aminoacidici di MT sotto selezione negativa identificati utilizzando diversi metodi *maximum likelihood.* I valori normalizzati (*E[dN-dS]*) sono stati stimati per ciascuno dei siti aminoacidici selezionati negativamente applicando i diversi metodi statistici. Il significato statistico è dato dal valore della probabilità di significatività (*P*) e la probabilità posteriore baesiana (solo per il metodo REL). Nella tabella vengono mostrati anche le cladi nelle quali la selezione negativa ha operato per un determinato sito aminoacidico selezionato negativamente; O = metallotioneine scelte come *outgroups*, A = tutte e due le isoforme di MT di Notothenioidei, A_1 = MT-1 di Notothenioidei e A_2 = MT-2 di Notothenioidei.

Gli aminoacidi di lisina (*Lys 8* e *52*) sono probabilmente conservati per il coinvolgimento nella formazione dei legami incrociati tra le catene polipeptidiche. Nelle MT di *Homo sapiens* (MT-1A, MT-2A, MT-3 e MT-4) le lisine e le cisteine sono gli aminoacidi maggiormente conservati ed essi sono coinvolti nella formazione dei dimeri di MT come conseguenza della risposta verso le ROS (Bell e Vallee, 2009). Prolina (*Pro 3*) risulta conservata nella struttura primaria delle isoforme di MT. Probabilmente, questo è legato al contributo delle proline nella formazione dei ripiegamenti flessibili delle strutture terziarie (Grauer *et* al., 2000). La distribuzione degli aminoacidi carichi

(come l'acido aspartico) è un altro fattore importante per l'evoluzione delle proteine (Grauer *et* al., 2000), ma secondo Leunissen e suoi collaboratori (1990), questa proprietà è quella meno rilevante. I risultati dei diversi metodo statistici mostrano che l'acido aspartico (*Asp 2*) è stato selezionato negativamente. La sua conservazione fa pensare che questo aminoacido probabilmente gioca un ruolo importante nell'evoluzione delle MT. Comunque, il ruolo di tutti gli aminoacidi negativamente selezionati rimane da essere chiarito da ulteriori studi basati su approcci biofisici.

Anche se le varie analisi effettuate dimostrarono che le MT di teleostei antartici si sono evolute sotto l'influenza della selezione negativa, molte sostituzioni nucleotidiche parallele e convergenti sono avvenute nelle sequenze delle metallotioneine esaminate (tab. 2.0). Generalmente, le sostituzioni nucleotidiche parallele e convergenti indicano la presenza di selezione positiva, ma questo non è sempre vero come è stato dimostrato precedentemente da Kornegay e collaboratori (1994).

I risultati di questa ultima analisi suggeriscono che nei Notothenioidei antartici, la selezione negativa è stata eterogenea lungo i codoni negativamente selezionati nelle diverse isoforme di MT. Quindi, si osserva che la selezione purificante ha operato contemporaneamente nella struttura primaria delle MT *outgroups* e in una delle due isoforme di alcune specie di teleostei antartici. Per esempio nel codone di *Pro 3* si osserva che la selezione negativa ha operato solo nell'isoforma 1 di Notothenioidei, mentre nel codone di *Lys 52* ha operato nell'isoforma 2 di Notothenioidei.

Questi ultimi risultati dimostrano che anche se tutti i codoni negativamente selezionati relativi ad una specifica posizione aminoacidica codificano per un specifico aminoacido negativamente selezionato, i tassi di sostituzione nucleotidica sinonima variano tra di essi.

4.8 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DELLA 5' E 3' UTR

É oramai accettato che le regioni 3' e 5' UTR danno maggiore informazione filogenetica, dato che hanno subito cambiamenti più frequenti rispetto a quelle della regione codificante. Una grande parte

delle variazioni evidenziate in queste sequenze è dovuta ad eventi di inserzioni o delezioni, particolarmente nelle 5' UTR di MT. Si è cercato di minimizzare il problema dei *gaps* estesi negli allineamenti delle sequenze di 3' e 5' UTR, effettuando allineamenti multipli globali progressivi tramite l'utilizzo di MAFFT. Questo *software* bioinformatico cerca di allineare le sequenze di *input* facendo affidamento prima su un albero filogenetico guida e successivamente sull'albero filogenetico ottimale che viene costruito dopo una serie di interazioni informatiche. L'ultimo *step* di questa procedura di allineamento delle sequenze è quello del perfezionamento. Inoltre per ovviare il problema dei *gaps* sono stati utilizzati metodi stocastici, *maximum likelihood* (GARLI) e baesiano (Mr. Bayes). Questi metodi sono stati applicati all'allineamento delle sequenze della 5' e 3' UTR, tenendo come riferimento il modello di sostituzione nucleotidica scelto in base al *software* bioinformatico ModelTest. L'applicazione di Modeltest ha dato come risultato che il modello HKY è quello che si adatta meglio ai dati considerati in questa analisi. Curiosamente, tale modello di sostituzione nucleotidica è anche quello che si adatta meglio all'allineamento delle sequenze della regione codificante.

Poiché l'applicazione di Beast risulta dare alberi filogenetici maggiormente risolti rispetto agli altri *software* bioinformatici, è stato applicato anche questo programma all'allineamento delle sequenze della 5' e 3' UTR (fig. 3.0 e 3.1).

In questo studio si è cercato di verificare se le sequenze della 5' UTR potessero rilevarsi utili per effettuare studi filogenetici sui teleostei. Sono stati utilizzati come *outgroups* tutte le sequenze di 5' UTR di teleostei non antartici presenti in *Genbank*, dopo aver calcolato, tramite l'utilizzo di Beast, i tassi di sostituzione nucleotidica.

Dai dati di letteratura risulta che la media dei tassi di sostituzione per 5' e 3' UTR sono confrontabili tra loro: $1{,}96 \times 10^{-9}$ e $2{,}10 \times 10^{-9}$ sostituzioni per sito per anno (Grauer e Lii, 2000).

Nel mio caso i dati ottenuti sono entrambi di molto superiori (per 5' UTR è $2{,}26 \times 10^{-2}$ nt / sito / milione di anni e per 3' UTR è $8{,}44 \times 10^{-3}$ nt / sito / milione di anni) e non confrontabili tra loro.

Il dato da me ottenuto può essere spiegato tenendo conto che le sequenze della 5' UTR scelte come *outgroups* appartengono ad organismi filogeneticamente distanti tra di loro e rispetto ai Notothenioidei e diversi da quelli scelti per le 3' UTR. La scelta di usare tali sequenze, come è stato accennato precedentemente, è dovuta alla disponibilità limitata delle sequenze della 5' UTR. Comunque è da notare che nell'albero filogenetico (fig. 3.0), la topologia del clade che raggruppa le

sequenze della 5' UTR *outgroup* concorda con la filogenesi delle specie costruita da Buchmann e Pedersen (1994).

In elaborazioni eseguiti solo con le specie di Notothenioidei la 5' UTR mostra un tasso di sostituzione confrontabile con quella di 3' UTR: i valori stimati per la 5' e 3' UTR sono $1{,}04 \times 10^{-5}$ nt / sito / anno e $1{,}14 \times 10^{-5}$ nt / sito / anno, rispettivamente. Le sequenze della 5' UTR possono essere utili per effettuare analisi filogenetiche solo nei teleostei antartici. Riguardo agli altri teleostei, sono necessarie altre sequenze della 5' UTR ed ulteriori indagini bioinformatiche.

Inoltre, in questo studio è stato mostrato che i tassi di sostituzione nucleotidica delle UTR di teleostei antartici sono superiori rispetto alla media dei tassi di sostituzione delle UTR della maggioranza dei geni noti fin'ora (Grauer e Lii, 2000) ed inoltre tenendo in considerazione tutte le sequenze risulta che i tassi di sostituzione di 5' e 3' UTR sono superiori rispetto al tasso di sostituzione della regione codificante, il cui tasso è $2{,}5 \times 10^{-3}$ nt / sito / milioni di anni.

E' stato inoltre osservato che le UTR hanno un tasso di sostituzione ($\mathbf{K_{5'UTR}}$ e $\mathbf{K_{3'UTR}}$) inferiore rispetto al tasso di sostituzione sinonima nella regione codificante (**Ks**). Questo spinge a concludere che nei teleostei antartici esista la costrizione funzionale in queste regioni.

Analogamente all'albero filogenetico costruito sulle sequenze della regione codificante, anche negli alberi filogenetici costruiti sulle sequenze della 5' (fig. 3.0) e 3' UTR (fig. 3.1) si osserva che le sequenze si raggruppano in 2 cladi che corrispondono a ciascuna delle 2 isoforme di MT.

La topologia dell'albero filogenetico costruito sulle sequenze della 5' UTR (fig. 3.0) è stato confrontato con quello della filogenesi delle specie costruito su dati molecolari, mostrata in figura 2.9. Osservando i rami filogenetici supportati da buoni valori di *bootstrap* e di probabilità posteriore baesiana risultano molte discrepanze. Ad esempio, nel clade di *MT-2* si osserva che le sequenze di *Trematomus bernacchii, Trematomus pennelli* e *Trematomus lepidorhinus* (membri della famiglia di Nototheniidae) vengono raggruppate assieme a sequenze di membri di altre famiglie di teleostei antartici. Per esempio, la sequenza di *Trematomus bernacchii* si trova posizionata come *sister group* di *Histiodraco velifer* che è membro della famiglia di Artedidraconidae. Membri di tale famiglia sono posizionati diversamente da *Trematomus bernacchii* nell'albero filogenetico della filogenesi delle specie (fig. 2.9). Nel clade di *MT-1*, *Trematomus hansoni* è sister group di *Gymnodraco acuticeps,* ma nell'albero filogenetico della filogenesi delle specie (fig. 2.9) membri della famiglia di cui fa parte *Trematomus hansoni* si trovano posizionati lontano rispetto a

Gymnodraco acuticeps. Altre discrepanze sono presenti per la famiglia di Channichthyidae, Bathydraconidae e Artedidraconidae.

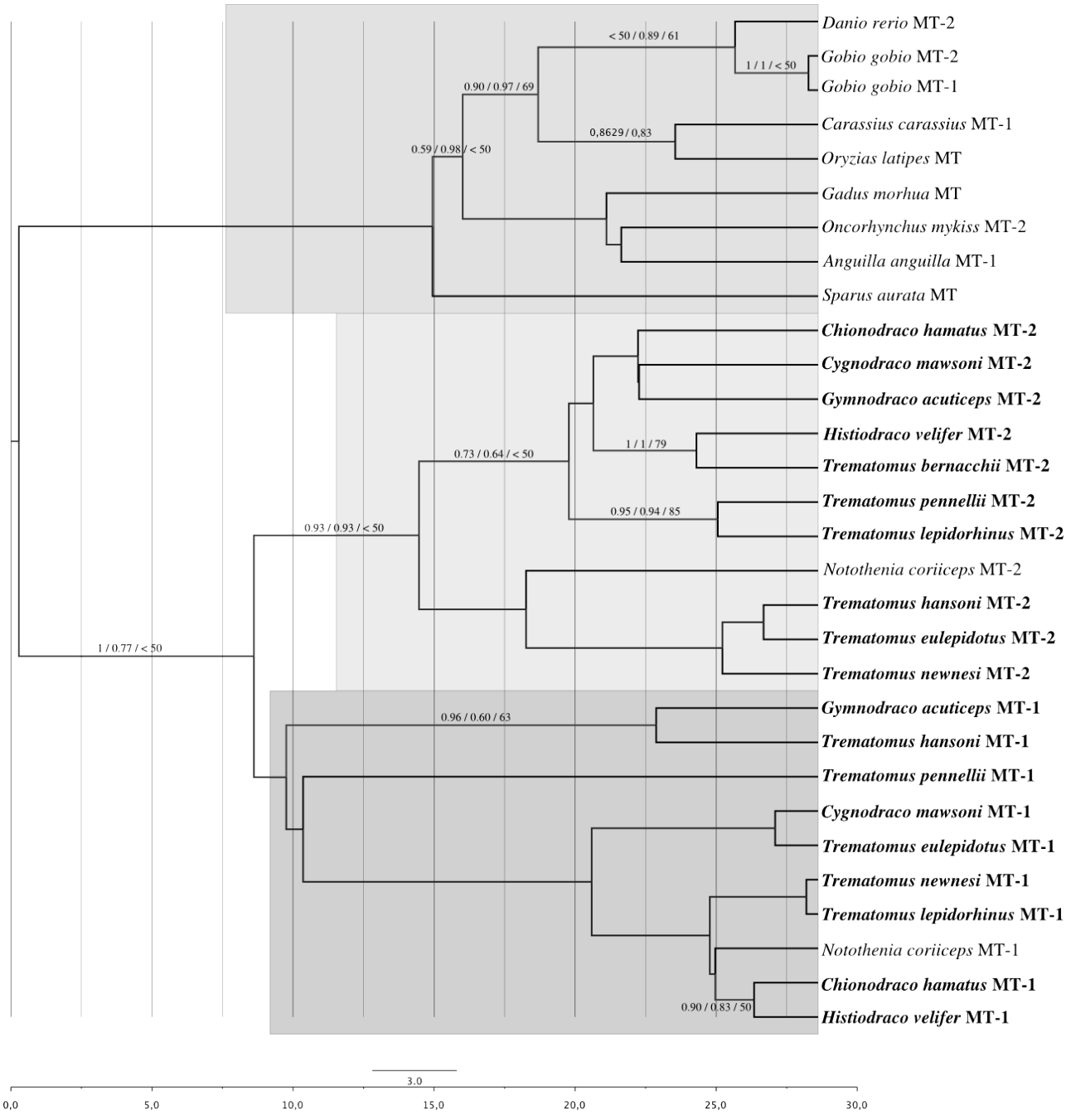


Figura 3.0 Albero filogenetico consenso basato sull'allineamento delle sequenze della 5' UTR delle MT ottenuto dalle analisi di *Maximum Likelihood* e quelle baesiane. I numeri presenti nei rami indicano i valori di probabilità posteriore baesiana dell'albero filogenetico costruito con BEAST (a sinistra), Mr. Bayes (in mezzo) e i valori di *bootstrap* ottenuti con GARLI (destra). I nomi delle specie in grassetto rappresentano le specie le cui sequenze di MT sono state caratterizzate nel nostro laboratorio. Il *maximum-likelihood score* finale (GARLI) è -782.4569. I parametri del modello GTR sono R (a) AC = 8.617, R (b) AG = 60.968, R (c) AT = 9.878, R (d) CG = 31.228, R (e) CT = 50.333, R (f) GT = 1.000 con le frequenze dei nucleotidi che sono A = 0.3865, C = 0.2830, G = 0.1729, T = 0.1577, la proporzione dei siti invariati = 0 e il parametro alfa = 19.2560. In Mr. Bayes la media aritmetica del *likelihood score* è -864.40 e in BEAST la media del *likelihood score* è = -861.0788. Per l'analisi baesiana è stato usato il modello matematico di sostituzione nucleotidica HKY.

Per costruire l'albero filogenetico della 3' UTR (fig. 3.1) è stato utilizzato un numero maggiore di sequenze rispetto a quello della regione codificante e l'albero filogenetico risulta più risolto. Anche in questo caso risultano molte discrepanze con l'albero della filogenesi delle specie (fig. 2.9).

Nel clade di *MT-1*, le sequenze vengono raggruppate assieme tranne quella di *Pagothenia borchgrevinki*. Inoltre, le sequenze delle specie di *Chionodraco* non sono posizionate come *sister group* tra di loro, ma quella di *Chionodraco hamatus* si raggruppa assieme alle sequenze di membri della famiglia di Bathydraconidae (*Gymnodraco acuticeps* e *Cygnodraco mawsoni*). La sequenza di *MT-1* di *Pleuragramma antarcticum* si trova posizionata come *sister group* a quella di *Histiodraco velifer*. Nell'albero della filogenesi delle specie (fig. 2.9), la specie di *Pleuragramma antarcticum* (Nototheniidae) si trova posizionata lontano dai membri della famiglia di Artedidraconidae, di cui fa parte *Histiodraco velifer.*

Nel clade di *MT-2*, le sequenze dei membri della famiglia di Nototheniidae si trovano vicine tra di loro. Fanno eccezione le sequenze di *Gobbionotothen gibberifrons* e *Pagothenia borchgrevinki*. Quest'ultima si trova posizionata come *sister group* a quella di *Chionodraco hamatus.* Le sequenze della famiglia di Channichthyidae si trovano raggruppate assieme, tranne quella di *Parachaenichthys charcoti.*

In conclusione, nel confronto degli alberi filogenetici delle UTR con quello della regione codificante e degli alberi filogenetici delle UTR tra di loro, si osserva che vi sono *mismatch* diversi. Poiché i valori dei tassi evolutivi sono confrontabili solo tra le UTR, il confronto tra le topologie dei loro alberi filogenetici risulta più significativo ed inoltre si può dedurre che la 5' UTR ha seguito un percorso evolutivo diverso da quello della 3' UTR.

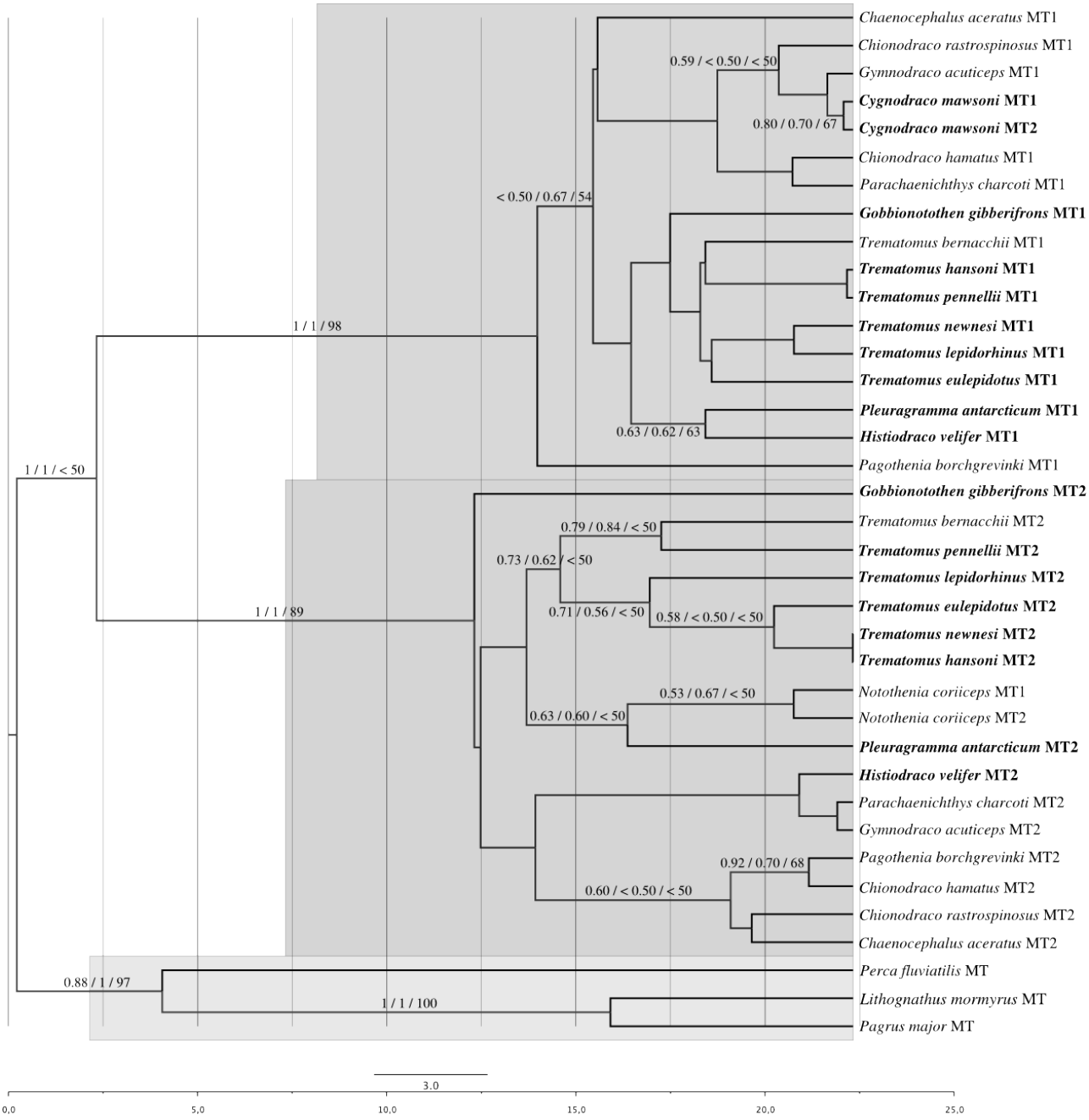


Figura 3.1 Albero filogenetico consenso basato sull'allineamento delle sequenze della 3' UTR delle MT ottenuto dalle analisi di *Maximum Likelihood* e quelle baesiane. I numeri presenti nei rami indicano i valori di probabilità posteriore baesiana dell'albero filogenetico costruito con BEAST (a sinistra), Mr. Bayes (in mezzo) e i valori di *bootstrap* ottenuti con GARLI (destra). I nomi delle specie in grassetto rappresentano le specie le cui sequenze di MT sono state caratterizzate nel nostro laboratorio. Come *outgroups* sono state usate le sequenze di *Perca fluviatilis*, *Lithognathus mormyrus* e *Pagrus major*, in base alla posizione ottenuta negli alberi filogenetici costruiti con sequenze del *citocromo c* e su dati morfologici (Balushkin, 1992). Il *maximum-likelihood score* finale (GARLI) è -1217.63. I parametri del modello GTR sono R (a) AC = 1.816, R (b) AG = 2.592, R (c) AT = 0.765, R (d) CG = 2.267, R (e) CT = 2.089, R (f) GT = 1.000 con le frequenze dei nucleotidi che sono A = 0.2491, C = 0.1613, G = 0.1911, T = 0.3985, la proporzione dei siti invariati = 0 e il parametro alfa = 17.8219. In Mr. Bayes la media aritmetica del *likelihood score* è -1422.26 e in BEAST la media del *likelihood score* è -1421.8701. Il modello di sostituzione usato è HKY.

Nell'albero filogenetico della 3' UTR si osserva che la sequenza di *MT-2* di *Cygnodraco mawsoni* è *sister group* della isoforma *MT-1* all'interno del clade *MT-1*, mentre la sequenza di *MT-1* di *Notothenia coriiceps* è *sister group* di *MT-2* all'interno del clade MT-2. Questo risultato può rappresentare un caso di evoluzione reticolata. L'evoluzione reticolata è un processo di convergenza che coinvolge solo una parte della sequenza genica. In questo caso, pare che l'evoluzione reticolata abbia agito su tutta la 3' UTR, che è identica nelle sequenze delle 2 isoforme di *Cygnodraco mawsoni* e *Notothenia coriiceps*. In accordo ai tassi di sostituzione della 5' e 3' UTR che risultano confrontabili tra di loro, si può suggerire che solo la 3' UTR di MT-1 di *Notothenia coriiceps* e di MT-2 di *Cygnodraco mawsoni* sono andate incontro a convergenza.

4.9 CARATTERIZZAZIONE E ANALISI DELLA STRUTTURA GENICA DI MT

Tutti i vertebrati mostrano la struttura tripartita del gene codificante per MT (fig. 3.2), nella quale il primo esone è costituito dalla 5' UTR ed una parte della regione codificante, il secondo esone è costituito da una parte della regione codificante ed il terzo esone è composto da una parte della regione codificante e dalla 3' UTR.

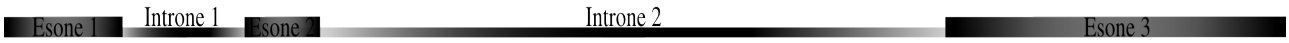


Figura 3.2 Rappresentazione schematica della struttura genica delle MT in Teleostei.

Basandosi su tale fatto sono stati costruiti *primers forward* specifici per ciascuna isoforma sulla sequenza della 5' UTR. I *primers reverse* sono stati progettati sulla estremità della 3'UTR di ciascuna isoforma. Utilizzando una DNA polimerasi (Finzzymes' Phusion™ High-Fidelity DNA *polymerase*) molto proccessiva, caratterizzata da elevati livelli di accuratezza, si è riusciti ad ottenere la sequenza di MT-1 di *Chionodraco hamatus*, *Trematomus eulepidotus*, *Trematomus pennellii*, *Cygnodraco mawsoni* e *Histiodraco velifer* e la sequenza di MT-2 di *Chionodraco hamatus* e *Gymnodraco acuticeps*. Quindi solo per la specie di *Chionodraco hamatus* sono state ottenute le sequenze delle 2 isoforme (fig. 3.3).

(A)

gacaaaacgc tctcatctca gaccaaagac actgcaccta ctcacgagga caagagacat 60

cacctgagaa cATGGACCCT TGCGACTGCT CCAAGAGTAA GTGTTGTTTA CGGTGTTAAC 120

GTTTGTAGCA GCTGAAACGT TAATGTTTTT CTTTGTCTAT GGACGATATG AAGCTGACCT 180

GGCTTTATTT TGTTTTCCAG **GTGGGACCTG TAACTGCGGA GGATCCTGCA CTTGCACAAA** 240

CTGCTCCTGC AAAAGCTGCA AGAAGAGTAA GTCAAAACAT CCATACATCG ATTACATAAC 300

AAGAATAATA TATTTGCATT ATATTGTCCC TCACAGTGCG TGTGCAATTG TCCTCTTCAA 360

TGTTTTTTAC AGAATCAATT GCTTACGATG TTATGTTTCC TTCATGATTG TAGTTGATGC 420

TGAATGTATA GGTTTGTATC CGGTATAGTC TTTTTCCTTA AGGCAACTGC CCAGGTGGCT 480

CCTATTGGGG TAATGAGCTG CTATTCAAAG TTGACCGAAT GTTGGATATT GTCTTTGGCT 540

CAAAAGCAGT TTTTCTTATC ATACTACTAG TTTAACCACA TGAAACTACA GTTTCTTAAC 600

ACTTTGAGTA CACTGGAATT CCATGTGCAT AAAGTTTAAC TGGGATTTTA AGGCGAAACT 660

ACAAGGAGTA TTTGGTATCT TAGCTAACTG GATAAAGGTG AGCGCTGCCT GAGGGTTTTT 720

CTTCCTCAGA CTTAAGATGA CTTAACTATT GGGCTGACAC AAACACTTTT TCCTTCTTCT 780

TGCAG**GCTGC TGCCCATGCT GCCCATCCGG CTGCACCAAA TGCGCCTCTG GCTGCGTGTG** 840

CAAAGGGAAG ACTTGTGACA CAAGCTGCTG TCAGTGAaag gcctgacctc tgcccgcttc 900

tgcctttggg atggagccct tatgaatacc tgactaaatt tgctgttgtg aatgtcttca 960

gagtaataat gttttggttt ttgttggtac ttgttttcaa tgtcgaaata aatgaactta 1020

gcctacttg 1029

(B)

gacaacacaa cacgctctca tctgagacca gatacactgc acctactcac gaggacgaga 60

gacatcacct gagaacATGG ACCCCTGCGA CTGCTCCAAA AGTGTGTTGT TTACGGTTAC 120

GCCTTGACAT TAGTCGTTGA AAATAGTATG ATATCTGCCT ATGTACGATA CAGTATAAAG 180

ATGACTTTGG TTTTTCAG**GT GGGACCTGCA ACTGCGGAGG ATCCTGCACT TGCACAAACT** 240

GCTCCTGCAC CAGCTGCAAG AAGAGTAAGT CCAATACCTC TACACGTGGG GAGGGATTTA 300

TTGAAATATA AATAGTATTC ACCCTGATGG AGACAGTTGG ATGCAATATG GCCTAACCTC 360

ACACTCTTTT CACGATGTTA TATTATCTTC GCAGCTATCT ATAGGCCAAA AGGTAACATG 420

TCAGTGATGT ATAGTTTCTT TACATTTTAT CACTTGCTTT TTGGGGGTTT TGTAGTCTGT 480

ATCTGGTATC CCCTTGTTTT AATTGCCGTG AGCAACTGCC CAGGTGGCTC CTATTGGGAT 540

AATGAGCTCC AATCTAAAAG TGTTAATGCT CAATTTTCAG TTGTATTTTT AAATGGACTG 600

CTGTTCTTTA TGTGGCTAAA GACGAACTAT ATATGGAAAG AACAGGCTGT ACCACATCTA 660

GTATCTACTT TAACTCTCAA TATACCCACA TGCAGTGTAA AAATGAGTTG ACCCTTTTTA 720

TTAGTACATT TTCCCATAGG GATTTGCCAT TTGATTTAAA AATGTAATGT TGGATAAATG 780

CCTAGATTTC AAGCTTTATA CCAGTGGATC AGATGTGGCC TCTTTGTTTT TCATTATAAA 840

TATAGTCTTG GGGCACCAAT AGGTTAATGT CCTGGATTTA GTACTAAATA TAACTTTTTG 900

CTGTTCTGTC ACTTAACAAA AACATTTTTA TGTTGTATTG CAG**GCTGCTG CCCATGCTGC** 960

CCATCCGGCT GCACCAAATG CGCCTCTGGC TGCGTGTGCA AAGGGAAGAC TTGTGACACA 1020
AGCTGCTGTC AGTGAaggac ctcagcccgc ttctgctctt ggaatggagc ctttgtgaac 1080
tactttgact acattcctag ttgcaaatgt ctacagagaa tggtgaattg tgtacttgtt 1140
tacgatgttg aaataaatgc acttccttg 1169

Figura 3.3 La sequenza genica (esone + introne) della (A) MT-1 e (B) MT-2 di *Chionodraco hamatus.* La parte della sequenza mostrata in grassetto è quella degli esoni. Le UTR sono mostrate in minuscolo e sottolineate, mentre la regione codificante è mostrata in maiuscolo.

Osservando le sequenze di MT di *Chionodraco hamatus* risulta che la *MT-2* (1169 pb) è 140 pb più lunga rispetto alla *MT-1* (1029 pb). Questo è dovuto sopratutto alla maggior lunghezza del secondo introne della *MT-2* rispetto a quello della *MT-1*. Il secondo introne di *MT-2* è lungo 679 pb, mentre quello di *MT-1* è lungo 519 pb. Le lunghezze degli esoni e dell'altro introne sono confrontabili tra di loro.

Inoltre, per *Chionodraco hamatus* le sequenze di esoni ed introni di ciascuna delle isoforme di MT sono state confrontate a coppie (tab. 2.1). Ovviamente, gli esoni mostrano una percentuale di identità maggiore rispetto a quella degli introni. Inoltre gli esoni mostrano una percentuale di *gaps* 5 volte inferiore rispetto a quella degli introni. Tra tutti gli esoni, quello che mostra la percentuale di identità più elevata (95,50%) è il secondo esone. Confrontando tra di loro gli introni, il primo introne risulta essere quello più conservato (56,30%) e risulta avere una percentuale di *gaps* (31,10%) inferiore rispetto al secondo introne (40,30%).

	Identità	*Gaps*
Esoni + Introni	60,90%	28,80%
Esoni	84,80%	7,50%
Esone 1	87,10%	5,00%
Esone 2	95,50%	0,00%
Esone 3	81,00%	10,50%
Introni	49,50%	39,00%
Introne 1	56,30%	31,10%
Introne 2	48,40%	40,30%

Tabella 2.1 I valori della percentuale di identità ottenuti dal confronto a coppie delle sequenze nucleotidiche mostrate, utilizzando il programma bioinformatico Needle. La matrice utilizzata è DNAfull. I valori della penalità per il *gap open* e il *gap extend* sono 10 e 0,5, rispettivamente.

Dal confronto tra di loro di tutte le sequenze geniche caratterizzate da me, risulta che la sequenza più corta è quella di *MT-1* di *Trematomus eulepidotus* (1005 pb), mentre quella più lunga è quella di *MT-2* di *Chionodraco hamatus* (1169 pb). Rispetto a tutte le sequenze geniche di MT di teleostei caratterizzati fin'ora, quella più corta è di *MT-A* di *Oncorhynchus mykiss* (589 pb), mentre la più lunga rimane quella di *MT-2* di *Chionodraco hamatus.*

In tutte le sequenze geniche di teleostei antartici e non antartici, il secondo esone mostra sempre la stessa lunghezza (66 pb) tranne che nella *MT-1* di *Trematomus eulepidotus* (77 pb). Questo è un risultato molto particolare in quanto questo esone è lungo 66 pb in tutti i geni di MT di vertebrati.

4.10 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DEGLI INTRONI

Con lo scopo di analizzare più approfonditamente l'evoluzione molecolare della MT nei teleostei antartici, si è focalizzato lo studio basandosi sulle sequenze introniche. Si è pensato di utilizzare tali sequenze dal momento che la speciazione dei teleostei antartici è avvenuta in tempi relativamente recenti. Dalla letteratura è noto il fatto che il tasso di mutazioni delle sequenze introniche è più elevato di quello delle regioni esoniche. Quindi, durante il periodo di speciazione che risulta relativamente breve, anche negli introni delle MT dei Notothenioidei antartici si sono accumulate più mutazioni rispetto a quelle degli esoni. Inoltre, come dimostrato precedentemente, su queste proteine ha probabilmente agito una selezione negativa, la quale potrebbe avere fortemente abbassato la frequenza di sostituzioni nucleotidiche a livello degli esoni. Pertanto le analisi effettuate sulle sequenze introniche potrebbero essere maggiormente informative.

Basandosi sulle sequenze introniche di MT è stata effettuata l'analisi filogenetica mediante l'utilizzo del software BEAST. In questa analisi sono state utilizzate anche le poche sequenze introniche di altri teleostei presenti nel *database* di *GenBank*. Nell'albero filogenetico ottenuto (fig. 3.4), le sequenze di membri dell'ordine di Perciformes, rappresentati dai teleostei antartici, si trovano all'interno di un grande clade che li separa dalle sequenze di *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) e *Danio rerio* (Ciprinoformes).

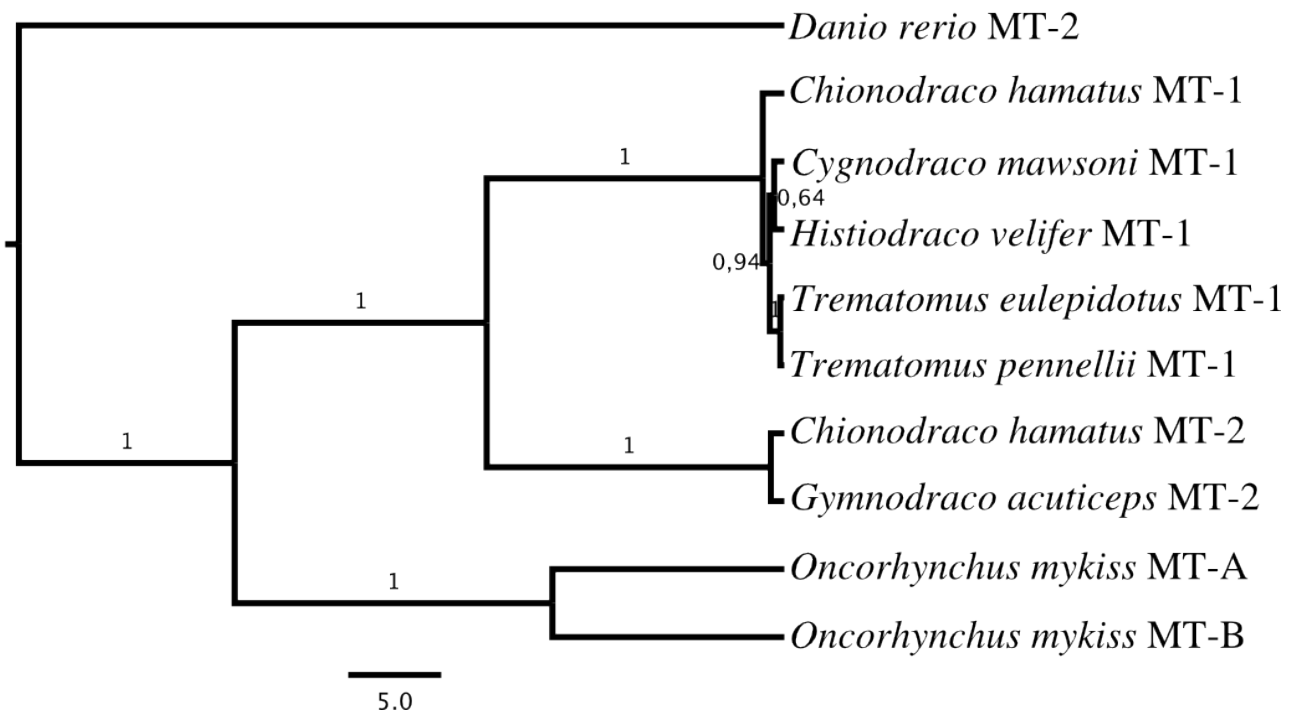


Figura 3.4 Albero filogenetico basato sull'allineamento delle sequenze di introni delle MT di teleostei antartici e non antartici. I valori numerici nei rami rappresentano la probabilità posteriore baesiana. Il modello di sostituzione nucleotidica utilizzato è quello di HKY determinato da Modeltest. Il valore medio di *likelihood* score = -2264,95 per un valore di *Effective Sample Size* (ESS) = 7199,84.

Come anche nella topologia dell'albero filogenetico costruito basandosi sulle sequenze della regione codificante (fig. 2.8) e delle UTR (fig. 3.0 e 3.1), dalla topologia dell'albero filogenetico risulta evidente che nei teleostei antartici si distinguono due cladi corrispondenti a ciascuna delle isoforme di MT.

Diversamente dalla topologia degli alberi filogenetici costruiti basandosi sulle sequenza della regione codificante e delle UTR delle MT, questo albero filogenetico rispecchia la filogenesi delle specie costruito su dati molecolari (fig. 3.4).

La topologia di tale albero filogenetico è stato confrontato con quella dell'albero filogenetico costruito sulle sequenze della regione codificante (fig. 2.8). Anche se la topologia è la stessa, le relazioni filogenetiche sono supportate da buoni valori di probabilità posteriore, solo nell'albero filogenetico costruito sulle sequenze introniche.

Nei teleostei antartici, il tasso stimato di sostituzione nucleotidica delle sequenze introniche di MT ($2,39 \times 10^{-2}$ nt / sito / milioni di anni) è 5,5 volte superiore rispetto a quello delle sequenze esoniche ($4,35 \times 10^{-3}$ nt / sito / milioni di anni).

Basandosi sui risultati ottenuti precedentemente, si può assumere che sia più conveniente studiare l'evoluzione dei geni dei teleostei antartici considerando le sequenze introniche.

I dati prodotti dall'applicazione dell'allineamento delle sequenze di BEAST sono stati analizzati utilizzando il *software* bioinformatico Tracer.

Nella figura 3.5 viene illustrato il confronto tra i tassi di sostituzione nucleotidica calcolati per il gruppo dei teleostei antartici rispetto a quelli calcolati considerando anche i teleostei non antartici.

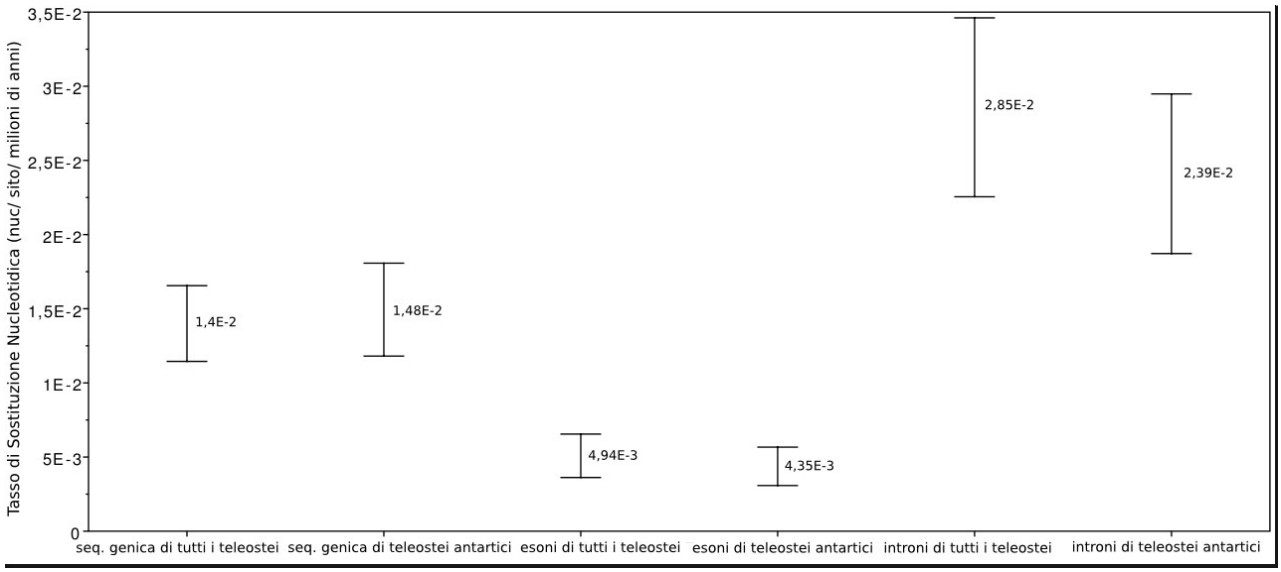


Figura 3.5 Valori medi dei tassi di sostituzione nucleotidica di intera sequenza genica, esone e introne di teleostei antartici e non antartici.

Dal grafico (fig. 3.5) risulta che nel confronto tra i tassi di sostituzione nucleotidica dell'intera sequenza genica, i teleostei antartici si sono evoluti con un tasso evolutivo confrontabile con quello stimato considerando anche i teleostei non antartici. Diversamente accade nel confronto tra i tassi di sostituzione nucleotidica degli esoni e degli introni. Rispetto agli esoni dei teleostei antartici, gli esoni di tutti i teleostei presi in considerazione si sono evoluti con un tasso medio di sostituzione leggermente maggiore. Negli introni, il tasso medio di sostituzione di tutti i teleostei è 1,2 volte

superiore rispetto a quello dei teleostei antartici. Quindi, da concludere che non solo gli esoni, ma anche gli introni delle MT di teleostei antartici, hanno subito meno sostituzioni nucleotidiche rispetto a quelli di MT di tutti i teleostei. In entrambi i casi le differenze sono statisticamente significative.

Successivamente è stato effettuato anche un confronto tra i tassi di sostituzione nucleotidica di ciascuno dei 3 esoni del gene MT di tutti i teleostei considerati (fig. 3.6).

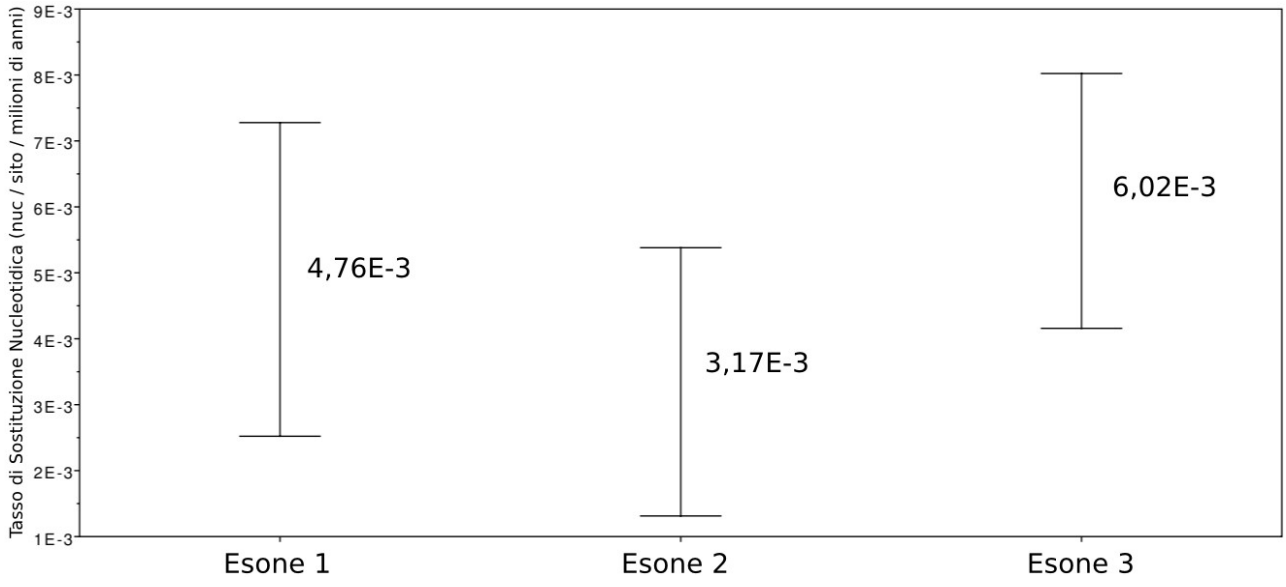


Figura 3.6 Valori medi dei tassi di sostituzione nucleotidica degli esoni di teleostei antartici e non antartici.

Da questo confronto è emerso un risultato abbastanza interessante. Gli esoni posizionati alle estremità del gene hanno subito più sostituzioni nucleotidiche rispetto a quello centrale. Un motivo può essere che l'esone centrale è più corto rispetto agli altri due e ciò rende meno probabile l'acquisizione di nuove mutazioni rispetto agli altri. Un secondo motivo è che questo esone contiene solo parte della sequenza della regione codificante, dove probabilmente la selezione negativa ha operato con più forza che nelle regioni UTR comprese negli altri due esoni.

Come per gli esoni, anche per gli introni è stato effettuato il confronto tra i tassi di sostituzione nucleotidica di ciascuno dei 2 introni (fig. 3.7).

I risultati dell'analisi mostrano che il tasso di sostituzione nucleotidica del secondo introne (2,61 x 10^{-2} nt / sito / milioni di anni) è 1,4 superiore rispetto a quello del primo (1,87 x 10^{-2} nt / sito /

milioni di anni). Cioè, l'introne 2 ha subito più sostituzioni rispetto all'introne 1. Questo può essere semplicemente spiegato con il fatto che le maggiori dimensioni del secondo introne aumentano la probabilità di avere sostituzioni nucleotidiche rispetto al primo introne.

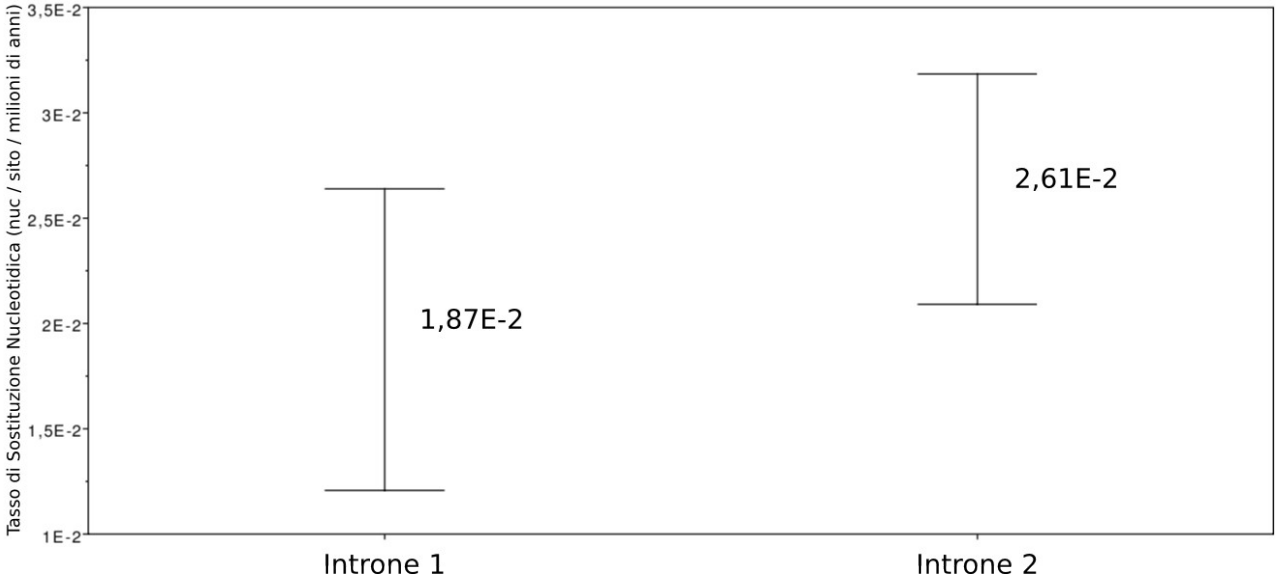


Figura 3.7 Valori medi dei tassi di sostituzione nucleotidica degli introni di teleostei antartici e non antartici.

4.11 CARATTERIZZAZIONE E ANALISI DEL PROMOTORE DI MT

Utilizzando i *primers reverse* (specifici per ciascuna delle isoforme) progettati sulla sequenza della 5' UTR e *primers forward* degenerati del kit DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit II, sono state ottenute le sequenze dei promotori di MT. Solo per la specie di *Trematomus pennellii* è stata ottenuta la sequenza completa del promotore di MT-1 (fig. 3.8). Tale sequenza è lunga circa 1.9 Kb.

L'analisi di questa regione ha rivelato che questo promotore è ricco in A-T (54%) e non dispone del TATA box canonico **TATAAAA**. Infatti, il TATA box presuntivo è caratterizzato dalla sequenza **TTTAAAA**, che è posizionata da -24 a -31 pb a monte dal sito di inizio della trascrizione.

In modo da identificare putativi elementi regolativi *cis* nella sequenza di questo promotore, tenendo come riferimento il *database* di TRANSFAC 7.0 (Matys *et* al., 2006), è stato utilizzato il *software* bioinformatico TESS (Shug e Overton, 1997).

Sono stati identificati 3 putativi elementi regolativi *cis* MRE: MREa, MREb e MREc.

MREa (**TGCACCC**) si trova localizzato da −52 a −59 pb a monte del sito di inizio della trascrizione. MREb (**TGCACGC**) e MREc (**TGCACAC**) sono localizzati in orientamento *reverse* da −77 a −84 e da −113 a −120 pb, rispettivamente.

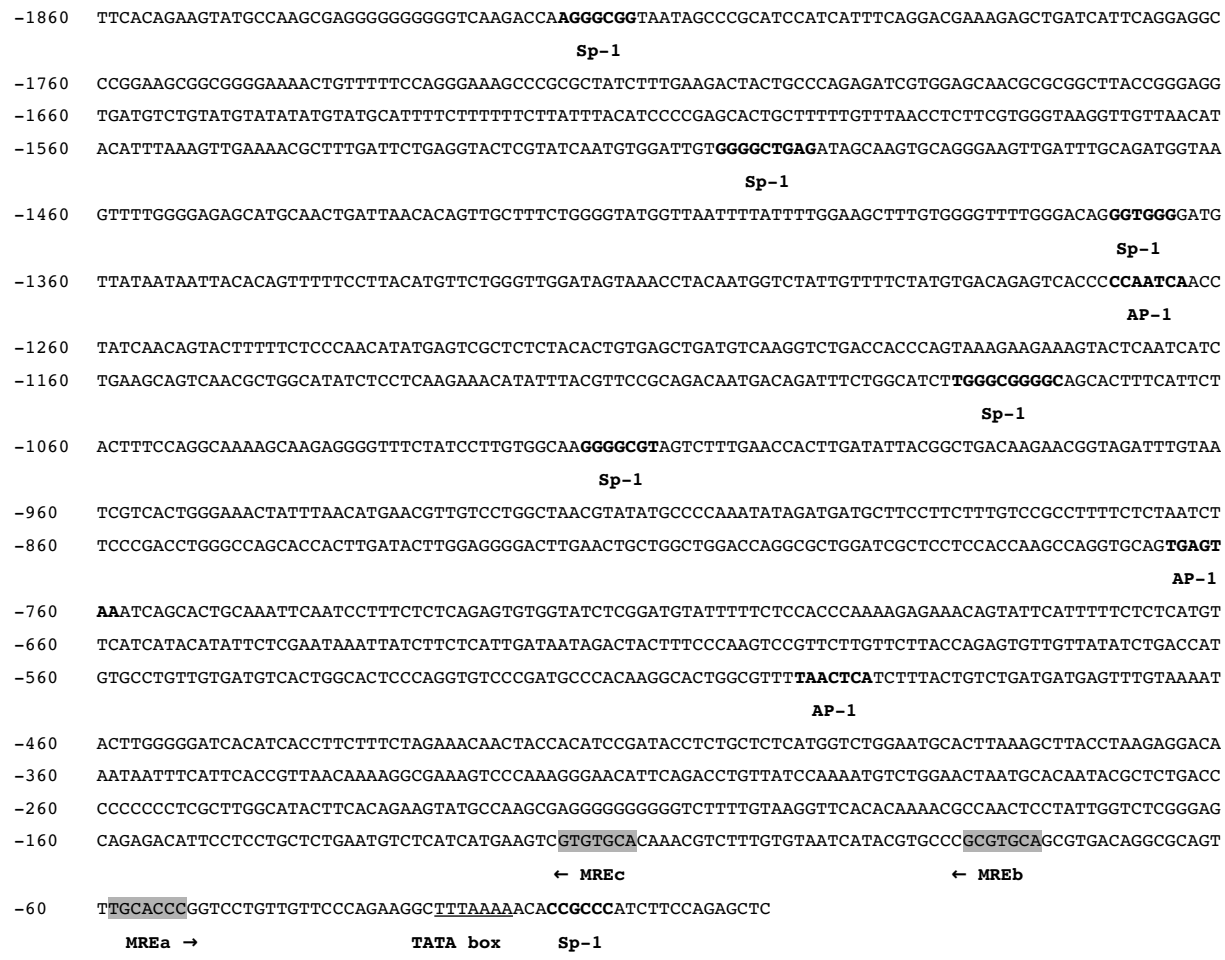


Figura 3.8 La sequenza nucleotidica della regione all'estremità 5' del gene MT-1 di *T. pennellii*. Gli elementi putativi come MRE e altre sequenze consenso di legame per i fattori di trascrizione AP-1 e Sp-1 sono indicati accompagnati da una freccia che mostra l'orientamento della trascrizione. Il TATA-box (sottolineato) è rappresentato dalla variante TTTA.

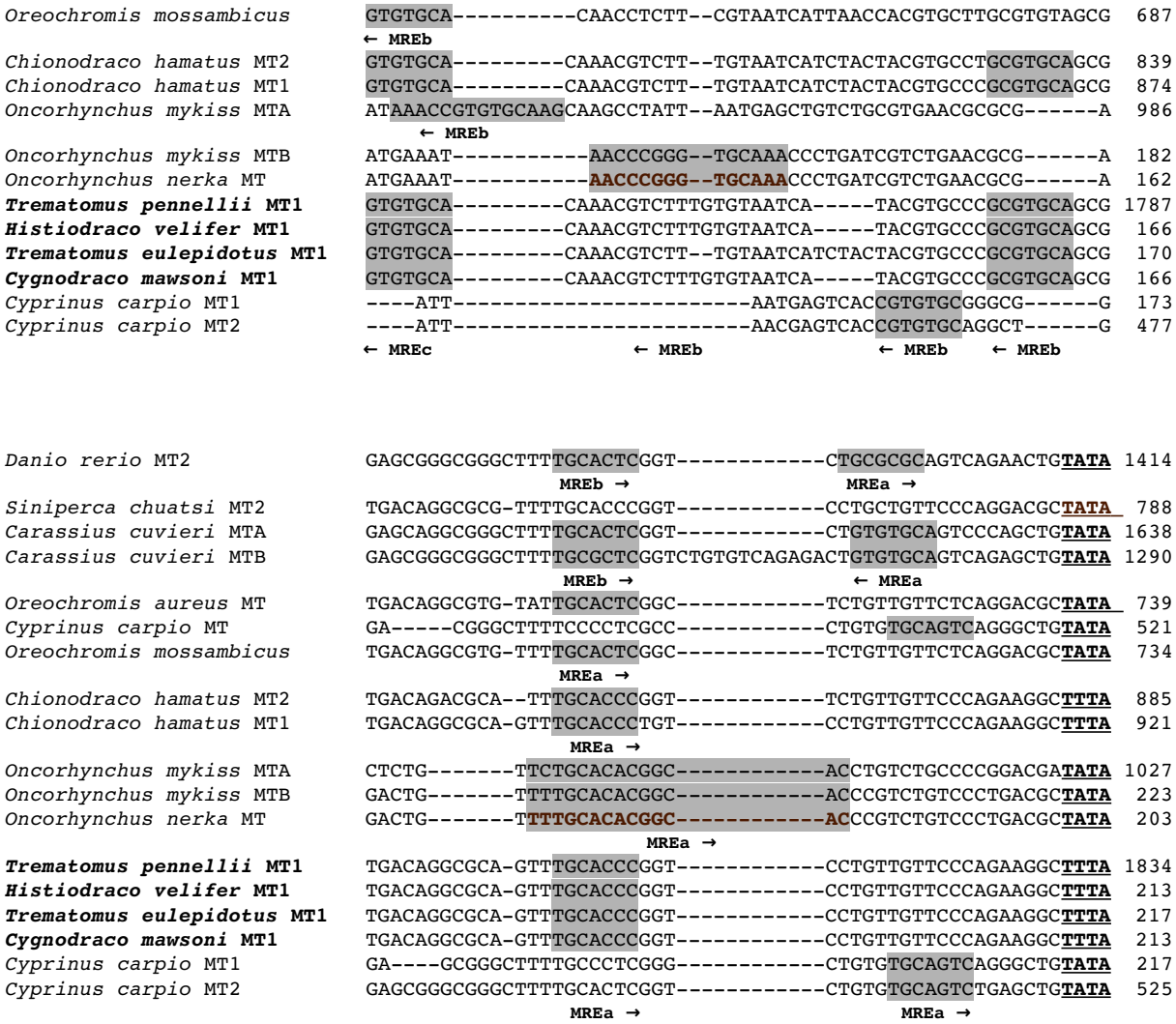
Gli altri putativi elementi regolativi *cis* sono 3 AP-1 e 6 Sp-1. Sono stati identificati 3 e 6 putativi elementi regolativi AP-1 e Sp-1, rispettivamente.

Poiché i geni delle MT vengono indotti dalle citochine, probabilmente i putativi elementi regolativi

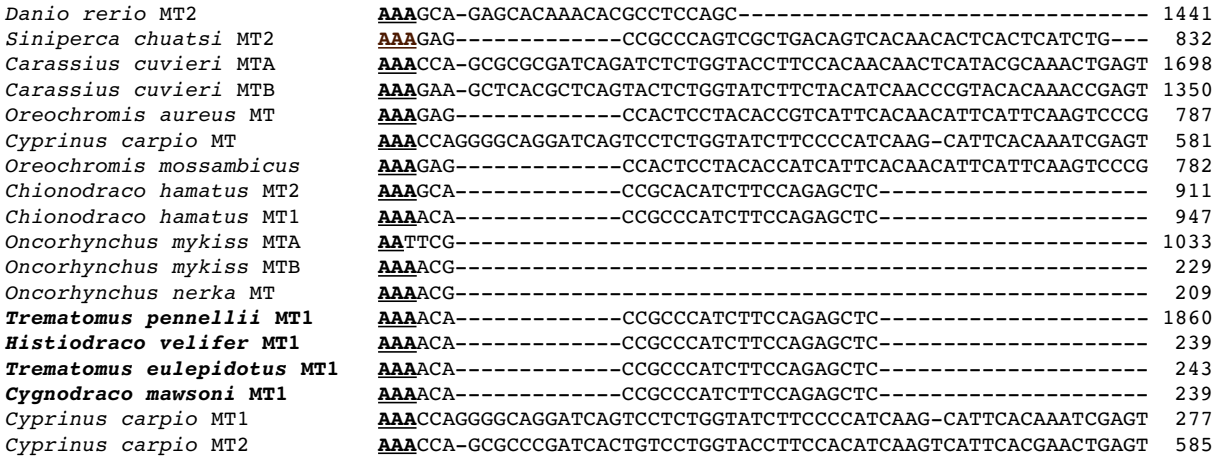
AP-1 identificati nel promotore di MT-1 di *Trematomus pennellii* potrebbero essere legati dal fattore di trascrizione AP-1 in risposta alle citochine. Questo resta da essere verificato mediante studi mirati di biologia molecolare.

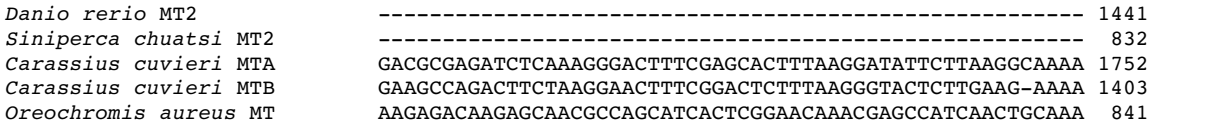
Per le specie di *Trematomus eulepidotus*, *Histiodraco velifer* e *Cygnodraco mawsoni,* sono stati sequenziati solo frammenti di DNA di una parte del promotore di MT-1. Le sequenze dei promotori da me identificate sono state confrontate con tutte le sequenze di promotori di teleostei presenti nel *database* di *GenBank* (fig. 3.9).

```
Danio rerio MT2                 -------------------TGGAAA---TAGTTATATAATCTTATAAACAACACGTTGAT 1294
Siniperca chuatsi MT2           -------------------GGCCCGGGCGTCTTACGTAAT-TTTCACACAACAAGCCAAC  636
Carassius cuvieri MTA           -------------------TGGAAACGGTAGCTATATAATCGTATAAATAACACATTGAT 1511
Carassius cuvieri MTB           -------------------TGGAACTGGTAGTTATATAATCTTATAAATACCACATTGAT 1144
Oreochromis aureus MT           -------------------AAGTTGACGTTCTTATATAAT-GTTCAGGCAGCAGGCC-AT  597
Cyprinus carpio MT              -------------------TGGAAATGATAGTTATATAATAGTGTAAAACCAACATTGAT  396
Oreochromis mossambicus MT      -------------------AAGTTGACATTCTTATATAAT-GTTCACGCAGCAGGCC-AT  592
Chionodraco hamatus MT2         -------------------GGAAATGGGGTCTTATGTAAG-GTTCAGACAAAACGCC---  739
Chionodraco hamatus MT1         -------------------GGGGAGGAGTATTTTTGTTAG-GTGCACACAAAACGCCAAC  766
Oncorhynchus mykiss MTA         -------------------TGGTAATTAGGCT-----------ATGTAGGCTATTTAAAC  890
Oncorhynchus mykiss MTB         -------------------TGGTAATCAGGTTTATGTAACAGACTATGGAATTTGGAAAC  103
Oncorhynchus nerka MT           -------------------TGGTAATCAGGTTTATGTAACAGGCTATGGAATTTGGAAAC   83
Trematomus pennellii MT1        ACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGGTCTTTTGTAAG-GTTCACACAAAACGCCAAC 1682
Histiodraco velifer MT1         -------------------GGGGGGGGGTCTTTTGTAAG-GTTCACACAAAACGCCAAC   61
Trematomus eulepidotus MT1      -------------------GGGGGGGGGTCTTTTGTAAG-GTTCACACAAATCGCCAAC   62
Cygnodraco mawsoni MT1          -------------------GGGGGGGGGTCTTTTGTAAG-GTTCACACAAAACGCCAAC   61
Cyprinus carpio MT1             -------------------TGGAAATGATAGTTATATAATAGTGTAAAACCAACATTGAT   91
Cyprinus carpio MT2             -------------------AGGAAATGGTAGTTATATAATCGTATAAATAACCCATTGAT  397
                                                                          MREd →

Danio rerio MT2                 GTGA--CATGGTGGGAACGGTGATTGCTGATT------------GTTTGCACCCAGTGTC 1340
Siniperca chuatsi MT2           TCGTCCTCGCCTGGGAATC----TCACTGCTCCCGCTGCCGGGTGGTTAACCCCGAAGTC  692
Carassius cuvieri MTA           GTGA--CAAGGTGGGAATGGTGATTCCTGATT----GTTTGATAGTTTGCACCCAGTTTC 1565
Carassius cuvieri MTB           GTGAATCAGGGTGGGACTGGTAACTCTTGATT----GTTTGATAGTTTGCAGCCAGTTTT 1200
Oreochromis aureus MT           AGATCTGGGTATGAGGATC----TCTCTGTTCCCGCTGCTGAAAGGTT---------GTC  644
Cyprinus carpio MT              GTGAATCAGGGTGGGATTGGAGATTCCTGATT----GTTTGATAGTTTGCACCCGGTTTC  452
Oreochromis mossambicus MT      AGATCTGGGTATGAGGATC----TCTCTGTTCCCGCTGCTGAAAGGTT---------GTC  639
Chionodraco hamatus MT2         --------GTCTCGGGAGCAAAGACATTCCTCCTGCT-CTGAATGTCTCATCATGAAGTC  790
Chionodraco hamatus MT1         TCCTATTGGTCTCGGGAGCAGAGACATTCCTCCTGCT-CTGAATGCCTCATCATGAAGTC  825
Oncorhynchus mykiss MTA         AATA--------------GGCTACTATTCCCTTGATG--GGCATGTTTTCGCTCTAGATA  934
Oncorhynchus mykiss MTB         AATA--------------GGAAACTCTTCCTT--------GATTATTTTCGCGCAGTATA  141
Oncorhynchus nerka MT           AATA--------------GGAAACTCTTCCTT--------GATTATTTTCGCGCAGTATA  121
Trematomus pennellii MT1        TCCTATTGGTCTCGGGAGCAGAGACATTCCTCCTGCT-CTGAATGTCTCATCATGAAGTC 1741
Histiodraco velifer MT1         TCCTATTGGTCTCGGGAGCAGAGACATTCCTCCTGCT-CTGAATGTCTCATCATGAAGTC  120
Trematomus eulepidotus MT1      TCATGTTGGTCTCGGGAGCAGAGACATTCCTCCTGCT-CTGAATGTCTCATCATGAAGTC  121
Cygnodraco mawsoni MT1          TCCTATTGGTCTCGGGAGCAGAGACACTCCTCCTGCT-CTGAATGTCTCATCATGAAGTC  120
Cyprinus carpio MT1             GTGAATCAGGGTGGGATTGGAGATTCCTGATT----GTTTGATAGTTTGCACCCGGTGTC  147
Cyprinus carpio MT2             GTGA--CAGGGTGGGAATGGTGATTCCTGATT----GTTTGATAGTTTGCACCCAGTTTC  451
                                                                      MREc →

Danio rerio MT2                 ----ATT------------------------AACGAGTCACCGTGTTCAGGCT------G 1366
Siniperca chuatsi MT2           GTGTGCA---------CAAACTTCTT--TGTAATCGCTTACTACGTGCCTGCGCGCAGCG  741
Carassius cuvieri MTA           ----ATT------------------------AAAAAGGCCCCGTG-GCAGGCT------G 1590
Carassius cuvieri MTB           TTTGATT------------------------AATGCGTCACCGTGTGCAGGCT------G 1230
                                                                ← MREc
Oreochromis aureus MT           GTGTGCA----------CAACCTCTT--CGTAATCATTAACCACGTGCTTGCGTGTAGCG  692
Cyprinus carpio MT              ----ATT------------------------AATGAGTCACCGTGTGCGGGCG------G  478
```


Oreochromis mossambicus GTGTGCA----------CAACCTCTT--CGTAATCATTAACCACGTGCTTGCGTGTAGCG 687
← MREb
Chionodraco hamatus MT2 GTGTGCA----------CAAACGTCTT--TGTAATCATCTACTACGTGCCTGCGTGCAGCG 839
Chionodraco hamatus MT1 GTGTGCA----------CAAACGTCTT--TGTAATCATCTACTACGTGCCCGCGTGCAGCG 874
Oncorhynchus mykiss MTA ATAAACCGTGTGCAAGCAAGCCTATT--AATGAGCTGTCTGCGTGAACGCGCG------A 986
← MREb
Oncorhynchus mykiss MTB ATGAAAT-----------AACCCGGG--TGCAAACCCTGATCGTCTGAACGCG------A 182
Oncorhynchus nerka MT ATGAAAT-----------AACCCGGG--TGCAAACCCTGATCGTCTGAACGCG------A 162
Trematomus pennellii MT1 GTGTGCA----------CAAACGTCTTTGTGTAATCA-----TACGTGCCCGCGTGCAGCG 1787
Histiodraco velifer MT1 GTGTGCA----------CAAACGTCTTTGTGTAATCA-----TACGTGCCCGCGTGCAGCG 166
Trematomus eulepidotus MT1 GTGTGCA----------CAAACGTCTT--TGTAATCATCTACTACGTGCCCGCGTGCAGCG 170
Cygnodraco mawsoni MT1 GTGTGCA----------CAAACGTCTTTGTGTAATCA-----TACGTGCCCGCGTGCAGCG 166
Cyprinus carpio MT1 ----ATT------------------------AATGAGTCACCGTGTGCGGGCG------G 173
Cyprinus carpio MT2 ----ATT------------------------AACGAGTCACCGTGTGCAGGCT------G 477
← MREc ← MREb ← MREb ← MREb

Danio rerio MT2 GAGCGGGCGGGCTTTTGCACTCGGT----------CTGCGCGCAGTCAGAACTGTATA 1414
MREb → MREa →
Siniperca chuatsi MT2 TGACAGGCGCG-TTTTGCACCCGGT----------CCTGCTGTTCCCAGGACGCTATA 788
Carassius cuvieri MTA GAGCAGGCGGGCTTTTGCACTCGGT----------CTGTGTGCAGTCCCAGCTGTATA 1638
Carassius cuvieri MTB GAGCGGGCGGGCTTTTGCGCTCGGTCTGTGTCAGAGACTGTGTGCAGTCAGAGCTGTATA 1290
MREb → ← MREa
Oreochromis aureus MT TGACAGGCGTG-TATTGCACTCGGC----------TCTGTTGTTCTCAGGACGCTATA 739
Cyprinus carpio MT GA-----CGGGCTTTTCCCCTCGCC----------CTGTGTGCAGTCAGGGCTGTATA 521
Oreochromis mossambicus TGACAGGCGTG-TTTTGCACTCGGC----------TCTGTTGTTCTCAGGACGCTATA 734
MREa →
Chionodraco hamatus MT2 TGACAGACGCA--TTTGCACCCGGT----------TCTGTTGTTCCCAGAAGGCTTTA 885
Chionodraco hamatus MT1 TGACAGGCGCA-GTTTGCACCCTGT----------CCTGTTGTTCCCAGAAGGCTTTA 921
MREa →
Oncorhynchus mykiss MTA CTCTG-------TTCTGCACACGGC----------ACCTGTCTGCCCCGGACGATATA 1027
Oncorhynchus mykiss MTB GACTG-------TTTTGCACACGGC----------ACCCGTCTGTCCCTGACGCTATA 223
Oncorhynchus nerka MT GACTG-------TTTTGCACACGGC----------ACCCGTCTGTCCCTGACGCTATA 203
MREa →
Trematomus pennellii MT1 TGACAGGCGCA-GTTTGCACCCGGT----------CCTGTTGTTCCCAGAAGGCTTTA 1834
Histiodraco velifer MT1 TGACAGGCGCA-GTTTGCACCCGGT----------CCTGTTGTTCCCAGAAGGCTTTA 213
Trematomus eulepidotus MT1 TGACAGGCGCA-GTTTGCACCCGGT----------CCTGTTGTTCCCAGAAGGCTTTA 217
Cygnodraco mawsoni MT1 TGACAGGCGCA-GTTTGCACCCGGT----------CCTGTTGTTCCCAGAAGGCTTTA 213
Cyprinus carpio MT1 GA----GCGGGCTTTTGCCCTCGGG----------CTGTGTGCAGTCAGGGCTGTATA 217
Cyprinus carpio MT2 GAGCGGGCGGGCTTTTGCACTCGGT----------CTGTGTGCAGTCTGAGCTGTATA 525
MREa → MREa →


Danio rerio MT2 AAAGCA-GAGCACAAACACGCCTCCAGC---------- 1441
Siniperca chuatsi MT2 AAAGAG-------------CCGCCCAGTCGCTGACAGTCACAACACTCACTCATCTG--- 832
Carassius cuvieri MTA AAACCA-GCGCGCGATCAGATCTCTGGTACCTTCCACAACAACTCATACGCAAACTGAGT 1698
Carassius cuvieri MTB AAAGAA-GCTCACGCTCAGTACTCTGGTATCTTCTACATCAACCCGTACACAAACCGAGT 1350
Oreochromis aureus MT AAAGAG-------------CCACTCCTACACCGTCATTCACAACATTCATTCAAGTCCCG 787
Cyprinus carpio MT AAACCAGGGGCAGGATCAGTCCTCTGGTATCTTCCCCATCAAG-CATTCACAAATCGAGT 581
Oreochromis mossambicus AAAGAG-------------CCACTCCTACACCATCATTCACAACATTCATTCAAGTCCCG 782
Chionodraco hamatus MT2 AAAGCA-------------CCGCACATCTTCCAGAGCTC---------- 911
Chionodraco hamatus MT1 AAAACA-------------CCGCCCATCTTCCAGAGCTC---------- 947
Oncorhynchus mykiss MTA AATTCG---------- 1033
Oncorhynchus mykiss MTB AAAACG---------- 229
Oncorhynchus nerka MT AAAACG---------- 209
Trematomus pennellii MT1 AAAACA-------------CCGCCCATCTTCCAGAGCTC---------- 1860
Histiodraco velifer MT1 AAAACA-------------CCGCCCATCTTCCAGAGCTC---------- 239
Trematomus eulepidotus MT1 AAAACA-------------CCGCCCATCTTCCAGAGCTC---------- 243
Cygnodraco mawsoni MT1 AAAACA-------------CCGCCCATCTTCCAGAGCTC---------- 239
Cyprinus carpio MT1 AAACCAGGGGCAGGATCAGTCCTCTGGTATCTTCCCCATCAAG-CATTCACAAATCGAGT 277
Cyprinus carpio MT2 AAACCA-GCGCCCGATCACTGTCCTGGTACCTTCCACATCAAGTCATTCACGAACTGAGT 585


Danio rerio MT2 ---------- 1441
Siniperca chuatsi MT2 ---------- 832
Carassius cuvieri MTA GACGCGAGATCTCAAAGGGACTTTCGAGCACTTTAAGGATATTCTTAAGGCAAAA 1752
Carassius cuvieri MTB GAAGCCAGACTTCTAAGGAACTTTCGGACTCTTTAAGGGTACTCTTGAAG-AAAA 1403
Oreochromis aureus MT AAGAGACAAGAGCAACGCCAGCATCACTCGGAACAAACGAGCCATCAACTGCAAA 841

```
Cyprinus carpio MT          GAAGCGAGACTTTTTAAGGGACTTCGGACTCTTGAGG---------------AAA  620
Oreochromis mossambicus     AAGAGACAAGAGCAACGCCAGCATCACTCTGAACAAACGAGCCATCAACTGAAAA  836
Chionodraco hamatus MT2     ------------------------------------------------------  911
Chionodraco hamatus MT1     ------------------------------------------------------  947
Oncorhynchus mykiss MTA     ----------------------------------------------------AA 1035
Oncorhynchus mykiss MTB     ----------------------------------------------------GC  231
Oncorhynchus nerka MT       ----------------------------------------------------GT  211
Trematomus pennellii MT1    ------------------------------------------------------ 1860
Histiodraco velifer MT1     ------------------------------------------------------  239
Trematomus eulepidotus MT1  ------------------------------------------------------  243
Cygnodraco mawsoni MT1      ------------------------------------------------------  239
Cyprinus carpio MT1         GAAGCGAGACTTTTTAAGGGACTTCGGACTCTTGAGG--------------AAAA  317
Cyprinus carpio MT2         GAAGTGAGATTTCTGAGGGACTTTCGGGCTCTTTAAGGATACTCTTGAGG-AAAA  638
```

Figura 3.9 Allineamento multiplo globale delle sequenze di promotori dei teleostei antartici (in grassetto) caratterizzate nel nostro laboratorio e di quelli presenti nel database di *Genbank*. Il *software* bioinformatico utilizzato per allineare le sequenze è MAFFT (Katoh *et* al., 2002). Nelle sequenze vengono mostrate in sfondo grigio le sequenze degli MRE. In colore marrone scuro è mostrata la sequenza degli MRE che non erano stati identificati precedentemente dal gruppo di ricerca responsabile per la caratterizzazione della sequenza del promotore. La sequenza del TATA box è mostrata in grassetto e sottolineata.

In questo *database* sono presenti solo 2 sequenze di promotori di MT di teleostei antartici, MT-1 e MT-2 di *Chionodraco hamatus* (Scudiero *et* al., 2001). Da questo confronto risulta che in tutte le specie di teleostei antartici non è presente il TATA box canonico, il quale è presente negli altri teleostei.

Gli MREa dei teleostei antartici si trovano nello stesso orientamento e nella stessa distanza in pb dal TATA box come anche gli MREa delle specie non antartica di *Oreochromis*. MREa di *Danio rerio*, *Carassius cuvieri* e *Cyprinus carpio* si trovano più vicini alla TATA box. L'unico MREa che si trova nell'orientamento *reverse* è quello di *Carassius cuvieri*.

Per tutte le specie di teleostei, gli MREb e MREc si trovanno in diversi orientamenti e distanze dal TATA box.

Nella sequenza del promotore di MT-1 di *Chionodraco hamatus* è presente un quarto MRE. Questo putativo elemento regolativo *cis* è il MREd che si trova posizionato in orientamento *forward* da -256 a -263 pb a monte del sito di inizio della trascrizione (Scudiero *et* al., 2001). Nelle sequenze da me determinate di teleostei antartici, questo MRE è assente.

Tutte le altre specie considerate in questa analisi possiedono altri MRE, oltre a quelli mostrati nella figura 3.9.

Anche se non viene mostrato nella figura 3.9, (come per tutti gli altri elementi regolativi *cis*), in tutte le sequenze del promotore di MT-1 dei teleostei antartici, a valle del TATA box è presente il

putativo elemento Sp-1, il quale è localizzato da -15 a -21 a monte del sito di inizio della trascrizione.

Quindi, il putativo elemento regolativo *cis* Sp-1 e i 3 MRE mostrano di essere conservati in sequenza e posizione nella sequenze del promotore di MT-1 dei Notothenioidei da me caratterizzate

4.12 ANALISI FILOGENETICA BASATA SULLE SEQUENZE DEI PROMOTORI

In generale, dalla letteratura è noto che il tasso di evoluzione dei promotori è superiore rispetto a quello della regione codificante; quindi si possono determinare relazioni filogenetiche tra i geni con una più elevata precisione (Heygood *et* al., 2007).

Si sa che negli eucarioti le informazioni per il controllo della sintesi dell'RNA ad opera della RNA polimerasi si trovano nel promotore tra i 200-2000 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione (Wray *et* al., 2003).

Meera e suoi collaboratori (2009) hanno anche indagato sulla presenza della selezione positiva in una serie di promotori di geni nucleari nei primati, basandosi sulla filogenesi costruita sulle sequenze dei promotori. Per questi motivi ho ritenuto opportuno effettuare analisi filogenetiche utilizzando il metodo baesiano implementato in BEAST utilizzando le sequenze dei promotori da me determinate e quelle di altri teleostei disponibili in *GenBank*.

La topologia dell'albero filogenetico (fig. 4.0) mostra che le sequenze sono raggruppate in 2 cladi Il primo, a sua volta, risulta diviso in 2, Cypriniformes e Salmoniformes. Da questo risultato, si può ipotizzare che Cipriniformi e Salmoniformi condividono lo stesso gene ancestrale di MT.

Inoltre, dalla topologia dell'albero filogenetico risulterebbe che un evento di duplicazione genica sia avvenuto indipendentemente nei Cipriniformi e nei Salmoniformi. Questa ipotesi è già stata avanzata da altri ricercatori che avevano effettuato analisi simili sulle sequenze aminoacidiche e nucleotidiche della regione codificante (Bargelloni *et* al., 1999).

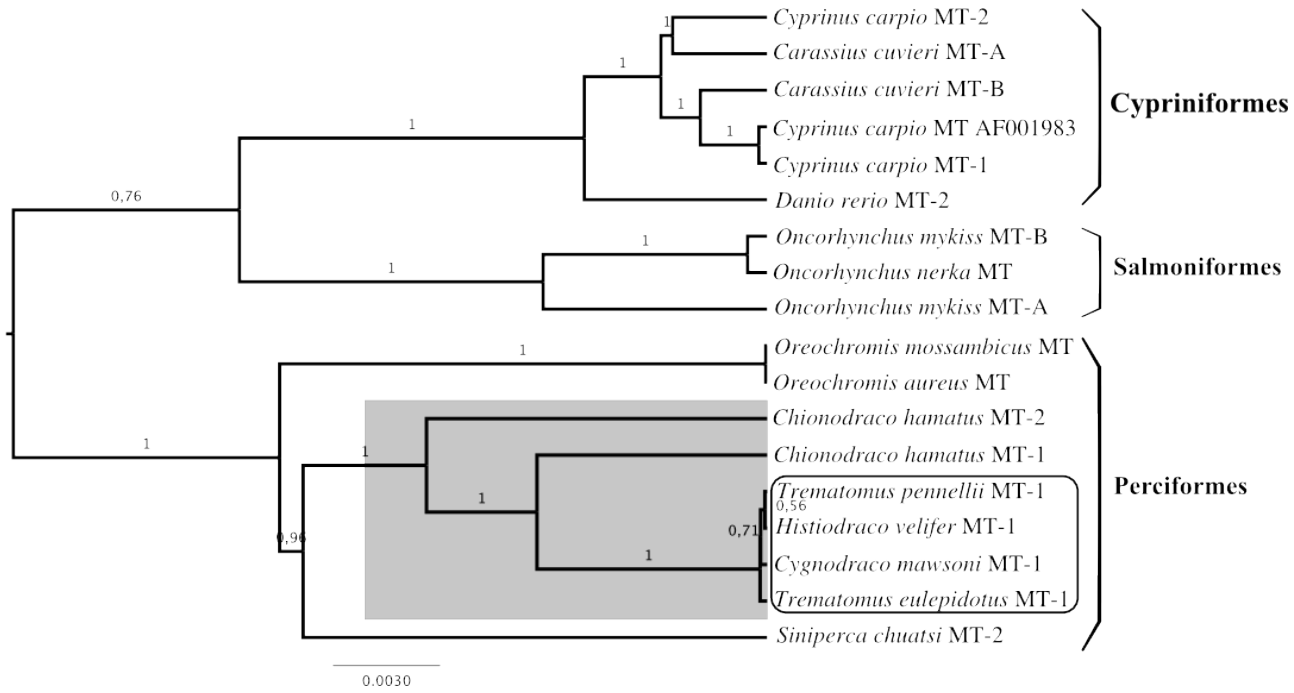


Figura 4.0 Albero filogenetico basato sull'allineamento delle sequenze di promotori delle MT di teleostei. I valori numerici nei rami rappresentano la probabilità posteriore baesiana. Il modello di sostituzione nucleotidica utilizzato è quello di GTR (Rodriguez *et* al., 1990) determinato da Modeltest. Il valore medio di *likelihood* score è -14656.83 per un valore di *Effective Sample Size* (ESS) = 159.5.

Il secondo clade contiene solo le sequenze dell'ordine di Perciformes. All'interno di questo si trovano le sequenze del promotore di MT di teleostei antartici (rettangolo grigio). Le sequenze caratterizzate nel nostro laboratorio sono riportate nel riquadro. Nei Notothenioidei, all'interno del clade di MT-1 le sequenze di Trematomidi non si trovano posizionate come *sister groups*, confermando il dato ottenuto dall'albero filogenetico di figura 2.8.

Quest'ultimo risultato sembra dimostrare che un'analisi attendibile possa essere effettuata utilizzando anche le sequenze dei promotori.

5. CONCLUSIONI

✓ Il lavoro di ricerca svolto durante i 3 anni di dottorato di ricerca ha condotto alla caratterizzazione di nuovi geni delle MT di Notothenioidei antartici, qui sotto riportate:

- *MT-1* e *MT-2* di *T. hansoni* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *T. pennellii* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *T. newnesi* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *T. lepidorhinus* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *T. eulepidotus* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-2* di *T. bernacchii* (5' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *P. antarcticum* (3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *G. gibberifrons* (3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *G. acuticeps* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *C. mawsoni* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *H. velifer* (5' UTR, codificante, 3' UTR);
- *MT-1* e *MT-2* di *C. hamatus* (5' UTR).

✓ Dalle analisi filogenetiche effettuate sulle sequenze aminoacidiche dedotte e quelle di cDNA (regione codificante e UTR), introni e promotori, risulta che le MT di Notothenioidei antartici vengono raggruppati in 2 cladi corrispondenti a ciascuna delle isoforme di MT.

✓ L'analisi filogenetica basata sulle sequenze aminoacidiche e quelle di cDNA della regione codificante, assieme ai diversi test statistici basati sulla topologia degli alberi filogenetici, mi permettono di concludere quanto segue:

- Nei Notothenioidei, l'evoluzione molecolare delle MT è avvenuta secondo l'orologio molecolare. Tra i modelli dell'orologio molecolare, quello che si adatta meglio a tale evoluzione è quello dell'orologio molecolare rilassato.

- Probabilmente, la selezione positiva non ha operato sull'evoluzione delle MT dopo l'evento di duplicazione genica che ha prodotto il gene *MT-1* e *MT-2*. Ciascuna delle isoforme si è evoluta sotto una forte selezione negativa all'interno della linea filogenetica dei Notothenioidei antartici.

- *MT-1* e *MT-2* sono state soggette a pressioni selettive differenti tra loro e rispetto al gene ancestrale.

- I valori della densità funzionale suggeriscono che le MT di Notothenioidei antartici siano evolute con un tasso di sostituzione minore rispetto agli altri teleostei considerati in questa tesi.

✓ Dalle analisi filogenetiche effettuate con le sequenze delle UTR risulta che:

- Nei Notothenioidei, i tassi di sostituzione nucleotidica delle UTR di teleostei antartici sono superiori rispetto alla media dei tassi di sostituzione delle UTR della maggioranza dei geni noti fin'ora e rispetto al tasso di sostituzione della regione codificante.

- In alcune specie come *N. coriiceps* e *C. mawsoni* potrebbe essere intervenuto un evento di evoluzione reticolata.

✓ Ho inoltre caratterizzato la struttura genica, in termini di introni ed esoni di alcuni dei geni di MT di Notothenioidei antartici:

- *MT-1* di *C. hamatus*, *T. eulepidotus*, *T. pennellii*, *C. mawsoni* e *H. velifer*;

- *MT-2* di *C. hamatus* e *G. acuticeps*.

  ✓ Dalle elaborazioni statistiche risulta che gli esoni e introni delle MT di Notothenioidei antartici, hanno subito meno sostituzioni nucleotidiche rispetto a quelli di MT di tutti i teleostei.

  ✓ É importante notare che questo è il primo dato ottenuto utilizzando sequenze introniche per studiare l'evoluzione molecolare di proteine nucleari nei teleostei. Tali sequenze si sono rilevate più informative rispetto a quelle della regione codificante, perché l'albero filogenetico ottenuto rispecchia la filogenesi delle specie ed è maggiormente risolto rispetto agli altri alberi filogenetici presentati in questa tesi.

  ✓ É stata caratterizzata la sequenza del promotore di *MT-1* di *T. pennellii* e sono state caratterizzate parzialmente le sequenze del promotore di *MT-1* di *T. eulepidotus*, *H. velifer* e *C. mawsoni.* Il confronto tra le sequenze di promotori mostra che i putativi elementi regolativi *cis* (MRE e Sp-1) sono conservati in sequenza e posizione rispetto ai promotori di MT-1 dei Notothenioidei antartici.

  ✓ L' indagine sulla evoluzione delle MT è stata approfondita utilizzando anche le sequenze dei promotori.

6. BIBLIOGRAFIA

Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics. **21(9)**: 2104-2105

Anderson ME (1994) Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes). JLB Smith Inst Ichthyol Ichthyol Bull **60**: 1–120

Anderson JB (1999) Antarctic Marine Geology. Cambridge, New York, Melbourne: Cambridge University Press. 298 p.

Andrews GK (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem Pharmacol **59**: 95-104

Andrews GK, Lee DK, Ravindra R, Lichtlen P, Sirito M, Sawadogo M and Schaffner W (2001) *EMBO J.* **20**: pp. 1114–1122

Andrews GK, Fernando LP, Moore KL, Dalton TP, Sobieski RJ (1996) Avian metallothioneins: Structure, regulation and evolution. J Nutr **126**: 1317S–1323S

Andriashev AP (1965) A general review of the antarctic fish fauna. Biogeography and Ecology in Antarctica. pp. 491-550

Andriashev AP (1991) Possible pathways of Paraliparis (Pisces: Liparidae) and some other North Pacific secondarily deep-sea fishes to North Atlantic and Arctic depth. Polar Biology. **11**: 213

Auf der MA, Belser T, Elgar G, Georgiev O and Schaffner W (1999) *Biol. Chem.* **380:**pp. 175–185

Bakiu R (2006) Superossido dismutasi a rame e zinco e metallotioneine del teleosteo antartico *Trematomus newnesi*: caratterizzazione delle sequenze del cDNA ed espressione tessutale dell'mRNA. Tesi della laurea specialistica in Biologia Molecolare.

Balushkin AV (1992) Classification, phylogenetic relationships, and origins of the families of the suborder Notothenioidei (Perciformes). J. Ichthyol. **32 (7)**: 90–110

Balushkin, AV (2000) Morphology, classification, and evolution of notothenioid fishes of the Southern Ocean (Notothenioidei, Perciformes). J. Ichthyol. **40**: S74–S109

Bargelloni L, Marcato S, Zane L, Patarnello T (2000) Mitochondrial phylogeny of notothenioids: a molecular approach to Antarctic fish evolution and biogeography. Syst Biol. **49(1)**: 114-29

Bargelloni L, Ritchie PA, Patarnello T, Battaglia B, Lambert DM, Meyer A. (1994) Molecular

evolution at subzero temperatures: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (suborder Notothenioidei), and the evolution of antifreeze glycopeptides. Mol Biol Evol. **11(6)**: 854-63

Bargelloni L, Scudiero R, Parisi E, Carginale V, Capasso C, Patarnello T (1999) Metallothioneins in antarctic fish: evidence for independent duplication and gene conversion. Mol Biol Evol. **16(7)**: 885-97

Barsyte D, White KN, Lovejoy DA (1999) Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. Comp Biochem Physiol **122C**: 287-296

Bell S. G. and Vallee B. L. (2009) The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link. ChemBioChem **10**: 55–62

Binz PA (2003) Metallothionein homepage. http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html

Binz PA, Kägi JHR (1999) Metallothioneins: molecular evolution and classification. In Klaasen CD (ed) Metallothionein IV. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 7-13.

Bittel D, Dalton T, Samson S, Gedamu L, Andrews GK (1998) The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. J Biol Chem **273**: 7127-7133

Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. Genome Res. **13**: 137–144

Blindauer C, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc finger. Molec Microb **45**: 1421-1432

Buchmann K, Pedersen K (1994) A study on teleost phylogeny using specific antisera. The Fisheries Society of the British Isles. Journal of Fish Biology. Volume **45**, Issue 5 , Pages 901-903

Buckley BA, Place SP, Hofmann GE (2004) Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. J. Exp. Biol. **207**:3649–3656

Burchett C (1983) At last--the hearing conservation standard. Occup Health Saf. **52(4)**: 45-6

Capasso C, Abugo O, Tanfani F, Scire A, Carginale V, Scudiero R, Parisi E, D'Auria S (2002) Stability and conformational dynamics of metallothioneins from the Antarctic fish Notothenia coriiceps and mouse. Proteins **46**: 259–267

Capasso C, Carginale V, Crescenzi O, Di Maro D, Parisi E, Spadaccini R, Temussi PA (2003) Solution structure of MT_nc, a novel metallothionein from the Antarctic fish Notothenia coriiceps. Structure **11**: 435–443

Chan KM (1994) PCR-cloning of goldfish and tilapia metallothionein complementary DNAs. Biochem. Biophys. Res. Commun. **205**: 368–374

Chan WK, Devlin RH (1993) Polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B and protamine promoters. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **2**: 308–318

Chen WY, John JAC, Lin CH and Chang CY (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**: pp. 798–805

Chen W-Y, John JAC, Lin C-H, Lin H-F, Wu S-C, Lin C-H, Chang C-Y (2004) Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. Aquat. Toxicol. **69**: 215–227

Cheng CHC, Chen LB, Near TJ, Jin YM (2003) Functional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand nototheniid fish infer an antarctic evolutionary origin. Mol. Biol. Evol. **20**: 1897–1908

Cherian MG (1994) The significance of the nuclear and cytoplasmatic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. Environ Health Persp **102**: 131-135

Cheung PLA, Kwok LLV, Chan KM (2005) Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. Biochim. Biophys. Acta **1731**: 191–201.

Clark AG (1994) Invasion and maintenance of a gene duplication. Proc Natl

Acad Sci USA. **91**: 2950-2954

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. Cell Mol Life Sci **59**: 627-647

Culotta VC, Howard WR, Liu XF (1994) CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *S. cerevisiae*. J Biol Chem **269**: 26295-26302

Curatola AM, Nadal MS, Schneider RJ (1995) Rapid degradation of AU-rich element (ARE) mRNAs is activated by ribosome transit and blocked by secondary structure at any position 5J to the ARE. Molecular AND Cellular Biology. Vol. 15, No. **11**, p. 6331–6340

D'Auria S, Carginale V, Scudiero R, Crescenzi O, Di Maro D, Temussi PA, et al. (2001) Structural characterization and thermal stability of Notothenia coriiceps metallothionein. Biochem J **354**: 291–299

Dallinger R, Berger B, Hunziker P, Kägi JHR (1997) Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. Nature **388**: 237-238

Dalton TP, Solis WA, Nebert DW, Carvan MJ (2000) Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. Comp Biochem. Physiol: B Biochem. Mol. Biol. **126**: 325–335

Dan Graur and Wen-Hsiung Li (1999) Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates Inc.,U.S. p. 439

Dayhoff MO, Schwartz RM and Orcutt BC (1978) A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence Structur, Vol. 5, Suppl. 3. National

Biomedical Research Foundation, Washington DC, pp. 345-352

DeSalle R, Freedman T, Prager EM, Wilson AC (1987) Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian Drosophila. J Mol Evol. **26(1-2)**: 157-64

Detrich III HW, Johnson KA, Marchese-Ragona SP (1989) Polymerization of Antarctic fish tubulins at low temperatures: energetic aspects. Biochemistry. **28**: 10 085–10 093

Detrich III HW, Parker SK, Williams RCJ, Nogales E, Downing KH (2000) Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the alpha- and beta-tubulins of Antarctic fishes. J. Biol. Chem. **275**: 37 038–37 047

DeVries AL and Eastman JT (1978) Lipid sacs as a buoyancy adaptation in an Antarctic fish. *Nature*, **271**: 352-353

DeWitt HH (1971) Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. In: Bushnell VC (ed) Antarctic map folio series, folio 15. American Geographical Society, New York, pp 1–10

DeWitt HH (1985) Reports on fishes of the University of Southern California Antarctic Research Program, 1962–1968. 1. A review of the genus Bathydraco Gunther (Family Bathydraconidae). Cybium **9**: 295-314

Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. PLoS Biol **4(5)**: e88.

Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214

Eakin RR (1990) Artedidraconidae. In: Gon O, Heemstra PC (eds) Fishes of the Southern Ocean. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, South Africa, pp 332-356

Eastman JT (1993) Antarctic Fish Biology: Evolution in A Unique Environment. Academic Press, San Diego, CA, USA

Eastman JT (2005) The nature of the diversity of Antarctic fishes. Polar Biol. **28**: 94–107

Eastman JT, McCune AR (2000) Fishes on the Antarctic continental shelf: evolution of a marine species flock? J. Fish Biol. **57(Suppl. A)**: 84–102

Eastman JT and DeVries AL (1981) Buoyancy adaptations in a swim-bladderless Antarctic fish. *Journal of Morphology*, **167**: 91-102

Eastman JT and DeVries AL (1982) Buoyancy studies of notothenioid fishes in McMurdo Sound, Antarctica. **2**: 385-393

Eastman JT (1999) Aspects of the biology of the icefish *Dacodraco hunteri* (Notothenioidei, Channichthyidae) in the Ross Sea, Antarctica. *Polar Biology*, **21**: 194-196

Edwards SV, Kingan SB, Calkins JD, Balakrishnan CN, Jennings WB, Swanson WJ and Sorenson MD (2005) Speciation in birds: genes, geography, and sexual selection. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA **102**: 6550–6557

Egli D, Selvaraj A, Yepiskoposyan H, Zhang B, Hafen E, Georgiev O, Schaffner W (2003) Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. EMBO J **22**: 100-108

Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution **17**: 368-376

Foster BA and Montgomery JC (1993) Planktivory in benthic nototheniid fish in McMurdo Sound, Antarctica. Environ. Biol. Fish. **36**: 313-318

Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M (1987) Nomenclature of metallothonein. In: Kägi J. H. R., Kojima Y., eds. Metallothionein II. Experientia Supplememtum. Basel: Birkhäuser Verlag; pp. 19-22

Freedman JH, Slice LW, Dixon D, Fire A, Rubin CS (1993) The novel metallothionein genes of *Caenorabdtis elegans.* Structural organization and inducible, cell-specific expression. J Biol Chem **268**: 2554-2564

Funk DJ and Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences with insights from animal mitochondrial DNA. Annu. Rev. Ecol. Syst. **34**: 397–423

Ghoshal K, Jacob ST (2001) Regulation of metallothionein gene expression. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **66**: 357-84

Gon O (1990) Bathydraconidae. p. 364-380. In O. Gon and P.C. Heemstra (eds.) Fishes of the Southern Ocean. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, South Africa. 462 p.

Gutiérrez JC, Amaro F and Martin-Gonzales A (2009) From heavy metal-binders to biosensors: Ciliate metallothioneins discussed. BioEssays 1-12

Hamer DH (1986) Metallothionein. Ann Rev Biochem **55**: 913-951

Hasegawa M, Kishino H and Yano T (1985) J. Mol. Evol. **22**: 160-174

Haygood R, Fedrigo O, Hanson B, Yokoyama1 KD, Wray GA (2007) Promoter regions of many neural- and nutrition-related genes have experienced positive selection during human evolution. Nature Genetics **39**: 1140-144

He P, Xu M, Ren H (2007) Cloning and functional characterization of 5-upstream region of metallothionein-I gene from crucian carp (Carassius cuvieri). Int. J. Biochem. Cell Biol. **39**: 832–841

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. J. Cell. Sci. **117 (Pt 25)**: 5965–73

Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W (1994) The trascription factor MTF-1 is essential for basal and haevy metal-induced metallothionein gene expression. EMBO J **13**: 2870-2875

Hofmann GE, Buckley BA, Airaksinen S, Keen J, Somero GN (2000) The Antarctic fish *Trematomus bernacchii* lacks heat-inducible heat shock protein synthesis. J. Exp. Biol. **203**: 2331–2339

Hureau JC (1990) Harpagiferidae. p. **357-363**. In O. Gon and P.C. Heemstra (eds.) Fishes of the Southern Ocean. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, South Africa. 462 p

Iwami T (1985) Osteology and relationships of the family Channichthyidae. Memoirs of National Institute of Polar Research, Tokyo, **E36**: 1–69

Iwami T and Kock KH (1990) Channichthyidae. p. 381-389. In O. Gon and P.C. Heemstra (eds.) Fishes of the Southern Ocean. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, South Africa. 462 p

Jeffares DC, Penkett CJ and Bahler J (2008) Rapidly regulated genes are intron poor. TIG 24: 375-378

Jones DT, Taylor WR and Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. CABIOS 8. **3**: 275-282

Kägi JHR (1991) Overview of metallothionein. Methods Enzymol **205**: 613-626

Kägi JHR (1993) Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: and overview. In Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds) Metallothionein III. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 29-55

Kägi JHR, Kojima Y, Kissling MM, Learch K (1980) Metallothionein: an exceptional metal thiolate protein. Excrepta medica **72**: 223-237

Karin M (1985) Metallothioneins: proteins in search of function. Cell **41**: 9-10

Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M (1984) Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. Nature **308**: 513-519

Katoh K, Misawa K, Kuma K and MiyataT. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acid Res., 30:3059-3066

Kennett JP (1977) Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic Ocean, and their impact on global paleoceanography. J. Geophys. Res. **82**: 3843–3860

Kennett JP, Thunell RC (1977) On Explosive Cenozoic Volcanism and Climatic Implications. Science. **196(4295)**: 1231-1234

Kille P, Hemmings A, Lunney EA (1994) Memories of metallothionein. Biochim Biophys Acta **1205**: 151-161

Kille P, Kay J, Sweeney GE (1993) Analysis of regulatory elements flanking metallothionein genes in Cd-tolerant fish (pike and stone loach). Biochim. Biophys. Acta **1216**: 55–64.

Kim SK et al. (2005) Transcriptional divergence of the duplicated oxidative stress-responsive

genes in the Arabidopsis genome. Plant J. **41**: 212–220

Kiss AJ, Mirarefi AY, Ramakrishnan S, Zukoski C, DeVries AL, Cheng C-HC (2004) Cold stable eye lens crystallins of the Antarctic notothenid toothfish *Dissostichus mawsoni* (Norman). J. Exp. Biol. **207**: 4633–4649

Klaassen CD, Liu JE Choudhuri S (1999) Metallothionein: an intracellular protein against cadmium toxicity. Ann Rev Pharmacol Toxicol **39**: 267-294

Klaassen CD, Liu JE Choudhuri S (1999) Metallothionein: an intracellular protein against cadmium toxicity. Ann Rev Pharmacol Toxicol **39**: 267-294

Klingenberg CP and Ekau W 1996 A combined morphometric and phylogenetic analysis of an ecomorphological trend: pelagization in Antarctic fishes (Perciformes: Notothenioidae). Biol. J. of the Linnean Society **59**: 143-177

Kojima Y, Binz PA, Kägi JHR (1999) Metallothionein nomenclature and structure. In: Metallothionein IV, Klaassen CD (ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 3-6

Kojima Y, Binz PA, Kägi JHR (1999) Metallothionein nomenclature and structure. In: Metallothionein IV, Klaassen CD (ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 3-6

Konrad S., Darren P. M. and Cathal S. (2006) Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. Bioinformatics. **22(20)**: 2493-2499

Kornegay JR, Schilling JW and Wilson AC (1994) Molecular adaptation of a leaf-eating bird: Stomach lysozyme of the hoatzin. Mol. Biol. Evol. **11**: 921-928

Kruskal JB (1983) An overview of sequence comparison. In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley

Laity JH, Andrews GK (2007) Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). Arch Bochem Biophys. **463(2)**: 201-10

Laws (1984) Antarctic ecology. Accademy Press – London, 855 pp

Leunissen JA, Van den Hooven HW, and de Jong WW (1990) Extreme differences in charge changes during protein evolution, J. Mol. Evol. **31**: 33-39

Livermore R, Nankivell A, Eagles G, Morris P (2005) Paleogene opening of Drake Passage. Earth Planet. Sci. Lett. **236**: 459–470

Logue J.A, DeVries A.L, Fodor E, Cossins A.R (2000) Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane structure. J. Exp. Biol. **230**: 2105–2113

Losos J and Schluter D (2000) Analysis of an evolutionary species-area relationship. Nature **408**: 847-850

Machado CA and Hey J (2003) The causes of phylogenetic conflict in a classic Drosophila species

group. Proc. R Soc. Lond. B. **270**: 1193–1202

Markert CL (1964) Cellular differentiation – an expression of differential gene function. In Congenital Malformations, pp. 163–174 International Medical Congress

Maroni G, Otto E, Lastowski-Perry D (1986) Molecular and cytogenetic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. Genetics **112**: 493-504

Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A et al. (2006) TRANSFAC(R) and its module TRANSCompel(R): Transcriptional gene regulation in eukaryotes. Nucleic Acids Res. **34(Suppl. 1)**: D108–D110

Mayden RL (1992) An emerging revolution in comparative biology and the evolution of North American freshwater fishes In: Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes. RL. Mayden (ed.). Stanford University Press. **p. 864-890**

McLennan DA, Brooks DR (1991) Parasites and sexual selection: a macroevolutionary perspective. Q Rev Biol. **66(3)**: 255-86

Meera A, Rangarajan L, Bhat S (2009) Computational approach towards finding evolutionary distance and gene order using promoter sequences of central metabolic pathway. Interdiscip Sci Comput Life Sci **1**: 128–132

Mehra RK, Gaery JR, Butt TR, Gray WR, Winge DR (1989) *Candida glabrata* metallothioneins. Cloning and sequence of the genes and characterization of proteins. J Biol Chem **264**: 19747-19753

Mertz W (1981) The essential trace elements. Science **213**: 1332-1338

Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V (2000) Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. Crit Rev Biochem Mol Biol **35**: 35-70

Münger K, German UA, Lerch K (1987) The *Neuspora crassa* metallothionein gene. Regulation of expression and chromosomal location. J Biol Chem **25**: 7363-7367

Murphy A, Taiz L (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes: Correlation with copper tolerance. Plant Physiol **109**: 945-954

Murphy A, Taiz L (1997) Correlation between long term K^+ leakage and copper tolerance in ten *Arabidopsis* ecotypes. New Phytol **136**: 211-222

Murphy A, Zhou J, Goldsbrough BP, Taiz L (1997) Purification and immunological identification of metallothionein 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol **113**: 1293-1301

Near TJ, Kassler TW, Koppelman JB, Dillman CB, Philipp DP (2003) Speciation in North American black basses, Micropterus (Actinopterygii: Centrarchidae). Evolution. **57(7)**: 1610-21

Near TJ, James JP, Chi-Hing CC (2004) Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid

fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA. Molecular Phylogenetics and Evolution. **32**: 881–891

Nelson JS (1984) Fishes of the world. 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 523 p

Nelson JS (1994) Fishes of the world, 3rd edn. Wiley, New York

Ohno S (1970) Evolution by Gene Duplication. New York: Springer

Olsson PE, Kling P, Erkell LJ, Kille P (1995) Structural and functional analysis of the rainbow trout (Oncorhyncus mykiss) metallothionein-A gene. Eur. J. Biochem. **230**: 344–349.

Ostbye TK, Wetten OF, Tooming-Klunderud A, Jakobsen KS, Yafe A, Etzioni S, Moen T, Andersen O (2007) Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (Salmo salar): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. Gene. **403(1-2)**: 159-69

Otsuka F, Iwamatsu A, Suzuki K, Ohsawa M, Hamer DH and Koizumi S (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: pp. 23700–23707

Otsuka F, Ohno S, Suzuki K, Takahashi K, Ohsawa M, Koizumi S (2007) Mechanism of metallothionein gene activation mediated by heavy-metal dependent transcription factor MTF-1. Yakugaku Zasshi. **127(4)**: 675-84

Palmiter R D (1994) Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a sensitive inhibitor that interacts with a costitutively active transcription factor, MTF 1. Proc Natl Acad Sci USA **91**: 1219-1223

Palmiter RD (1998) The elusive function of metallothioneins. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 8428-8430

Paluh JL, Killilea AN, Detrich III HW, Downing KH (2004) Meiosis-specific failure of cell cycle progression in fission yeast by mutation of a conserved β-tubulin residue. Mol. Biol. Cell. **15**: 1160–1171

Peña MA, Koch KA, Thiele DJ (1998) Dynamic regulation of copper uptake and detoxification in *Saccharomices cerevisiae.* Mol Cell Biol **18**: 2514-2523

Pollard DA, Iyer VN, Moses AM and Eisen MB (2006) Widespread discordance of gene trees with species tree in Drosophila: evidence for incomplete lineage sorting. PLoS Genet. **2**: e173

Poncelet AC, Schnaper HW (2001) Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells. J. Biol. Chem. (United States) **276 (10)**: 6983–92

Pond SK, Muse SV (2005) Site-to-site variation of synonymous substitution rates. Mol Biol Evol. **22(12)**: 2375-85

Pond SL, Frost SD, Muse SV (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics. **21(5)**: 676-9

Posada D and Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics **14 (9)**: 817-818

Powell JR, Caccone A (1989) Intraspecific and interspecific genetic variation in Drosophila. Genome **31(1)**: 233-8

Prirodina VP (2000) On the systematic position of littoral and deep-water species of the genus *Harpagifer* (Harpagiferidae, Notothenioidei) from Macquarie Island with a description of two new species. J. Ichthyol. **40**: 488-494

Prirodina VP (2002) Redescription of littoral and deep-sea species of the genus *Harpagifer* (Harpagiferidae, Notothenioidei) off islands of the Indian Ocean Sector of the Southern Ocean with the description of a new species. J. Ichthyol. **42**: 701-712

Prirodina VP (2004) *Harpagifer crozetensis* sp. nova (Harpagiferidae, Notothenioidei), a new species from the littoral of the Crozet Islands (Indian Ocean Sector of the Antarctic). J. Ichthyol. **44**: 395-399

Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Hergersberg M, Gariglio M, Dembic Z, Schaffner W (1993) Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. EMBO J **12**: 1355-1362

Rambaut A (2000) Estimating the rate of molecular evolution: Incorporating non-contemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies. Bioinformatics **16**: 395–399

Rambaut A, Drummond AJ (2003) Tracer version 1.2 [computer program]. Available: http://evolve.zoo.ox.ac.uk. Accessed 31 January 2006

Ren H, Xu M, He P, Muto N, Itoh N, Tanaka K, Xing J, Chu M (2006) Cloning of crucian carp (Carassius cuvieri) metallothionein-II gene and characterization of its gene promoter region. Biochemical and Biophysical Research Communications **342**: 1297–1304

Robert EC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, Nucleic Acids Research **32(5)**: 1792-97

Rodriguez F, Oliver JF, Marin A and Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitutions. J. Theor. Biol. **142**: 485-501

Roesijadi G (1996) Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp Biochem Physiol **113**: 117-123

Römisch K, Collie N, Soto N, Logue J, Lindsay M, Scheper W, Cheng C-HC (2003) Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane in cold-adapted organisms. J. Cell Sci. **116**: 2875–2883

Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574

Rozen S and Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols:

Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

Sadhu C, Gedamu L (1988) Regulation of human metallothionein (MT) genes. Differential expression of MT-1F, MT-1G e MT-2A genes in the hepatoblastoma cell line (HepG2). J Biol Chem **263**: 2679-2684

Samson SLA, Gedamu L (1998) Molecular analyses of metallothionein gene regulation. Progr Nucleic Acid Res **59**: 257-288

Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription.. J Biol Chem **277**: 20438-20445

Saydam N, Georgiev O, Nakano MY, Greber UF, Schaffner W. (2001) Nucleo-cytoplasmic trafficking of metal-regulatory transcription factor 1 is regulated by diverse stress signals. J Biol Chem **276**: 25487-2595

Scudiero R, Capasso C, Carginale V, Riggio M, Capasso A, Ciaramella M, et al. (1997a) PCR amplification and cloning of metallothionein complementary DNAs in temperate and Antarctic sea urchin characterized by a large difference in egg metallothionein content. Cell Mol Life Sci **53**: 472–477

Scudiero R, Carginale V, Capasso C, Riggio M, Filosa S, Parisi E (2001) Structural and functional analysis of metal regulatory elements in the promoter region of genes encoding metallothionein isoforms in the Antarctic fish Chionodraco hamatus (icefish). Gene **274**: 199–208

Scudiero R, Carginale V, Riggio M, Capasso C, Capasso A, Kille P, et al. (1997b) Difference in hepatic metallothionein content in Antarctic red-blooded and haemoglobinless fish: Undetectable metallothionein levels in haemoglobinless fish is accompanied by accumulation of untranslated metallothionein mRNA. Biochem J **322**: 207–211

Scudiero R, Temussib PA, Parisi E (2005) Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. Gene **345**: 21–26

Shaw KL (1998) Species and the diversity of natural groups. Pp. 44–56 in D. J. Howard, and S. H. Berlocher, eds. Endless forms: species and speciation. Oxford Univ. Press, Oxford, England

Shug J, Overton GC (1997) Tess: Transcription element search software on the www. University of Pennsylvania, PA

Silar P, Theodore L, Mokdad R, Erraiss NE, Cadic A, Wegnez M (1990) Metallothionein Mto gene of *Drosophila melanogaster*: structure and regulation. J Mol Biol **215**: 217-224

Smirnova IV, Bittel DC, Ravindra R, Jiang H, Andrews GK (2000) Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. J Biol Chem **275**: 9377-9384

Somero GN, DeVries AL (1967) Temperature tolerance of some Antarctic fishes. Science. **156**: 257–258

Stürzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ (1998) The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. FEBS Lett **431**: 437-442

Swofford DL (2003) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4 [computer program]. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates

Syring RA, Brouwer TH, Brouwer M (2000) Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. Comp Biochem Physiol **125C**: 325-332

Templeton AR (2001) Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. Mol. Ecol. **10**: 779–791

Thornalley PJ, Vašák M (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim Biophys Acta **827**: 36-44

Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. Mol Biol Evol **15**: 1647–1657

Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS (2005) A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. Nucleic Acids Res. **33(1)**: 201-12

Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. Neuron **7**: 337-347

Vallee BL (1987) Implications and inferences of metallothionein structure. Experientia Suppl **52**: 5-16

Wheelan SJ., Church DM, Ostell JM (2001) Spidey: A tool for mRNA-to-Genomic Alignment. Genome Research. **11**: 1952–1957

Wilgenbusch JC, Warren DL, Swofford DL (2004) AWTY: A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetic inference

Williams RC, Correia JJ, DeVries AL (1985) Formation of microtubules at low temperature by tubulin from Antarctic fishes. Biochem. **24**: 2790–2798

Winge DR (1998) Copper-regulatory domain involved in gene expression. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **58**: 165-195

Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. Mol Biol Evol **20**: 1377–1419

Yan CH, Chan KM (2002) Characterization of zebrafish metallothionein gene promoter in a zebrafish caudal fin cell-line, SJD. 1. Mar. Environ. Res. **54**: 335–339

Yan CH, Chan KM (2004) Cloning of zebrafish metallothionein gene and characterization of its gene promoter region in HepG2 cell line. Biochim. Biophys. Acta **1679**: 47–58

Yang Z (2007) PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Molecular Biology and Evolution **24**: 1586-1591

Yang Z, Nielsen R, Goldman N and Pedersen A-MK (2000b) Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. Genetics **155**: 431-449

Yang Z, Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov Chain Monte Carlo Method. Mol Biol Evol **14**: 717–724

Zafarullah M, Bonham K, Gedamu L (1988) Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal–responsive region. Mol. Cell Biol. **8**: 4469–4476

Zhang B, Egli D, Georgiev O, Schaffner W (2001) The *Drosophila* homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. Mol Cell Biol **21**: 4505-4514

Zuckerkandl E (1976) Evolutionary processes and evolutionary noise at the molecular level. I. Functional density in proteins. J Mol Evol. **7(3)**: 167-83

Zuckerkandl E, Pauling L (1962) Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. In: Kasha M, Pullman B, editors. Horizons in biochemistry. New York: Academic Press. pp. 189–225

Zwickl DJ (2006) Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin