

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE E
BIOTECNOLOGIE
INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
CICLO XXIII

INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI GENI PER
METALLOTIONEINE E ALTRE PROTEINE DETOSSIFICANTI IN ASCIDIE

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro
Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Ester Piccini

Dottorando: Nicola Franchi

Abstract

In order to study the evolution of metallothioneins (MTs) in deuterostomes I have analysed these proteins in Tunicates, which are invertebrate chordates, sister-group of vertebrates. I have isolated the complete cDNA sequences of *Ciona intestinalis*, *Molgula manhattensis* and *Ascidrella aspersa* MTs. Their deduced amino acid sequences are similar in length (39 to 41 amino acids) and each protein has about 30% of cysteine residues which are organised in the typical clusters of vertebrate MTs.

Afterward, my investigation was mainly focused on *C. intestinalis*, a model tunicate of which the whole genome is available. Nevertheless, no MTs had been previously annotated. After the identification of MT, the research has followed two pathways. The first one was aimed at identifying the tissues involved in the transcription and the gene expression profiles in response to heavy metals such as Zn, Cd and Cu. As regards this last point, in addition to MT, I also considered genes for phytochelatin synthase (PCS), Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD), glutamate-cysteine ligase (GCLC) catalytic subunit, glutathione synthetase (GS), glutathione peroxidase 7 (GPX7) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), looking for relationships between them. In order to define their possible evolution, the second approach involved bioinformatic analyses, aimed at understanding the organisation of the gene structure, promoter regions and sequence identity of MTs and of all the other considered proteins.

The deduced protein sequence of *C. intestinalis* MT (CiMT-1) is quite different from the other deuterostome MTs: it is the shortest MT so far identified in this group, with only 39 amino acids in comparison with 61-68 amino acids of the other taxa. In addition, the KKS motif, that links the two domains (α and β) of the vertebrate MTs, is completely missing. The identity between CiMT-1 and other deuterostome MTs is quite low, ranging from 18.8 and 38.3%.

Vertebrate MT genes show a tripartite structure, with three exons and two introns. Introns differ in length, but their relative position is conserved: the first intron

Abstract

interrupts the sequence at amino acid 9, while the second intron at amino acid 31 or 32, at the junction of the α and β domains. *CIMT-1* shows the same tripartite structure, with the first intron in the typical vertebrate position, while the second intron is located in the 3'UTR, as in echinoderm MTs.

The promoter region of *CIMT-1* shows features present in both vertebrates and in echinoderms: it contains three half-AREs (antioxidant responsive element) as in echinoderms, and one typical vertebrate ARE. Four MREs (metal responsive elements) are also present.

Cd exposure increases the transcription of *CIMT-1* in a non linear way: an initial increase, at 6 h, is followed by a decrease to the control levels at 24 h, then another increase is present after 96 h. Treatments with Zn and Cu, however, induce the gene transcription progressively up to the end of treatment (120 h) when the messenger levels are fourfold the control values.

CiMT-1 mRNA is present only in haemocytes, specifically in granulocytes. These cells, after 24 h of treatment with Cd, are present in tunic and their amount is twice that of controls. Therefore, the decrease of transcript at 24 h may be a result of this cell migration. The subsequent increase is presumably due to specific cellular proliferation of granulocytes in the blood lacunae. This scenario is confirmed by the high rate of cell death in tunic, where haemocytes accumulate, and also by the massive transcription of PCNA in treated samples. Indeed, both *CiMT-1* and *PCNA* show a peak of expression at 96 h. The results obtained with phytochelatin synthase fit with this hypothesis.

In *C. intestinalis*, PCS is expressed in granulocytes and the mRNA levels remain comparable to those of controls up to 72 h, but then they rise up to 96 h. From literature data it is known that this gene is not inducible, but it is activated in presence of divalent metal ions. Again, it is very likely that the observed messenger peak is not a consequence of an induction phenomenon, but of a strong proliferation of granulocytes.

This is the first data on the transcription of this gene, on the location at granulocyte level and on its involvement in metal detoxification processes in deuterostomes.

The study of the behaviour of the genes involved in detoxification suggests that the enzymes (SOD, GPX) may have a marginal role, whereas the cystein-rich molecules (PCS, GS, GCL) play an important role in presence of Cd, Cu and Zn. Moreover, the localisation of these transcripts, by *in situ* hybridisation, suggests that circulating haemocytes are the cells mostly involved in detoxification processes.

Abstract

Riassunto

Lo scopo di questa ricerca è quello di analizzare le metallotioneine (MT) nei Tunicati, taxon il sister-group dei Vertebrati, allo scopo di studiare l'evoluzione delle metallotioneine nei deuterostomi invertebrati. Ho quindi isolato sequenze complete di cDNA per MT nei Tunicati *Ciona intestinalis*, *Molgula manhattensis* e *Asciidiella aspersa*. In questi organismi le MT presentano sequenze aminoacidiche dedotte simili, di lunghezza compresa tra 39 e 41 aminoacidi e con circa il 30% di residui cisteinici organizzati nei tipici cluster conservati delle MT dei Vertebrati.

La mia indagine si è quindi concentrata su *C. intestinalis*, organismo modello dei Tunicati per il quale è disponibile la sequenza dell'intero genoma. Nonostante questo, nessuna MT era stata annotata. Dopo aver identificato la MT, la ricerca si è orientata su due percorsi. Il primo percorso era volto a comprendere quali fossero i tessuti coinvolti nella trascrizione di questo gene e quali ne fossero i profili di espressione in risposta a metalli pesanti quali Zn, Cd e Cu. In quest'ambito ho anche considerato la fitochelatino sintetasi (PCS), la Cu/Zn superossido dismutasi (Cu-Zn SOD), la glutammato cistein-ligasi (GCLC) subunità catalitica, la glutatione sintetasi (GS), la glutatione perossidasi 7 (GPX7) e l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA), al fine di valutarne le relazioni. Il secondo approccio, di tipo bioinformatico, era volto a chiarire l'organizzazione genica, la struttura delle regioni promotrici e le identità di sequenza delle metallotioneine e delle altre proteine studiate, al fine di far luce sulla possibile evoluzione delle sequenze prese in esame.

Le sequenza proteica dedotta da *C. intestinalis* (CiMT-1) è decisamente diversa dalle MT degli altri deuterostomi: essa risulta essere la più corta MT fino ad ora individuata in questo gruppo, presentando 39 aminoacidi contro 61-68 degli altri taxa. Inoltre, manca completamente il motivo KKS che connette i due domini (alpha e beta) delle MT dei vertebrati. Si evidenziano quindi bassi livelli di identità aminoacidica, tra 18,8% e 38,3%, con le MT degli altri deuterostomi.

Riassunto

Tutte le MT dei vertebrati hanno struttura genica tripartita, con tre esoni e due introni. Gli introni differiscono in lunghezza, ma la loro posizione relativa è conservata: il primo introne interrompe la sequenza all'aminoacido 9, mentre il secondo introne interrompe la sequenza all'aminoacido 31 o 32, alla giunzione dei domini alpha e beta. CiMT-1 mostra la stessa struttura tripartita, con il primo introne nella posizione tipica dei vertebrati, mentre il secondo introne è posto nella regione 3'UTR, come nelle MT degli echinodermi.

Anche la regione promotrice di CiMT-1 mostra caratteristiche presenti sia negli echinodermi che nei vertebrati: possiede tre half-ARE (antioxidant responsive element) come negli echinodermi ed una sequenza ARE tipica dei vertebrati. Esso presenta inoltre quattro MRE (metal responsive elements) ben distanziati.

Il trattamento con Cd induce aumenti del trascritto di CiMT-1 con andamento irregolare: un primo aumento è presente a 6 h, seguito da una diminuzione fino a quasi i livelli di controllo a 24 h per poi ricrescere fino ad un picco massimo dopo 96 h. I trattamenti con Zn e Cu, invece, inducono valori di trascrizione quattro volte superiori rispetto ai livelli dei controlli solo a fine trattamento (120 h) con un andamento di crescita pressoché lineare nel tempo. Il trascritto per CiMT-1 è presente a livello dei soli granulociti. Tali cellule a 24 h di trattamento con Cd si accumulano nella tunica in numero circa doppio rispetto ai controlli. Pertanto la diminuzione di trascritto riscontrato a 24 h può essere conseguenza di questa migrazione cellulare, mentre il successivo aumento è presumibilmente da imputare a proliferazione cellulare specifica dei granulociti in circolo. Questo scenario è confermato dall'alto tasso di morte cellulare nella tunica, dove gli emociti si accumulano, ed inoltre dalla massiccia trascrizione di PCNA nei campioni trattati. Infatti sia CiMT-1 che PCNA presentano un picco di espressione a 96 h. A confermare tale ipotesi sono i risultati relativi alla fitochelatino-sintetasi. In *C. intestinalis* il gene viene espresso dai granulociti ed i livelli di trascritto rimangono simili a quelli di controllo fino a 72 h, per poi crescere a 96 h. Da dati di letteratura è noto che questo gene non è inducibile, ma viene attivato in presenza di ioni metallici bivalenti. E' molto probabile quindi, che questo picco non sia una conseguenza di un fenomeno di induzione, ma della forte

proliferazione cellulare dei granulociti. E' da notare che questo è il primo dato che dimostra la trascrizione di questo gene in organismi deuterostomi, la sua localizzazione esclusiva a livello dei granulociti e il suo coinvolgimento in processi di detossificazione da metalli.

Lo studio degli andamenti degli altri geni coinvolti nella detossificazione suggerisce che la componente enzimatica (SOD, GPX) possa avere un ruolo marginale, mentre la componente tiolica (PCS, GS, GCL) svolga un ruolo primario in presenza sia di Cd, che di Cu e Zn. Inoltre la localizzazione tramite ibridazione *in situ* di questi trascritti evidenzia che gli emociti circolanti sono le cellule maggiormente coinvolte nei processi di detossificazione.

Riassunto

Indice

1. Introduzione

| | |
|--|----|
| 1.1 I Tunicati | 1 |
| 1.2 La classe Ascidiacea | 2 |
| 1.3 Metallotioneine | 3 |
| 1.3.1 Classificazione e struttura proteica delle MT | 4 |
| 1.3.2 Molteplicità delle MT | 6 |
| 1.3.3 Espressione genica delle MT in risposta ai metalli | 8 |
| 1.3.4 Ciclo redox delle MT | 11 |
| 1.3.5 MT e detossificazione da metalli | 13 |
| 1.3.6 MT e funzione antiossidante | 14 |
| 1.3.7 MT ed immunità | 15 |
| 1.3.8 MT: rigenerazione e proliferazione cellulare | 17 |
| 1.4 Fitochelatine | 19 |
| 1.5 Le forme reattive dell'ossigeno e lo stress ossidativo | 22 |
| 1.6 Superossidodismutasi | 24 |
| 1.7 Il glutatione | 25 |
| 1.8 L'enzima glutatione perossidasi | 28 |

2. Materiali e Metodi

| | |
|--|----|
| 2.1 Terreni | 31 |
| 2.2 Primer per PCR | 31 |
| 2.3 Organismi utilizzati | 32 |
| 2.4 Trattamenti con metalli | 34 |
| 2.5 Retrotrascrizione dell'RNA ed amplificazione del DNA mediante PCR | |

| | |
|---|----|
| 2.5.1 Progettazione di primer degenerati ed analisi di sequenze | 34 |
| 2.5.2 Estrazione RNA | 36 |
| 2.5.3 Sintesi del cDNA | 36 |
| 2.5.4 Amplificazione del cDNA | 36 |
| 2.5.5 Clonaggio del DNA amplificato | 37 |
| 2.5.6 Preparazione dei batteri competenti alla trasformazione | 38 |
| 2.5.7 Trasformazione dei batteri competenti | 38 |
| 2.5.8 Screening delle colonie trasformate | 38 |
| 2.5.9 Sequenziamento | 39 |
| 2.6 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) | |
| 2.6.1 3' RACE | 39 |
| 2.6.2 5' RACE | 40 |
| 2.7 Studio di espressione | |
| 2.7.1 RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR) | 42 |
| 2.7.2 Ibridazione <i>in situ</i> | 43 |
| 2.8 Allineamenti multipli e analisi di sequenza | 45 |
| 2.9 Alberi filogenetici | 46 |
| 2.10 Saggio TUNEL e conta emocitaria | 46 |
| 3. Risultati MT, PCS, PCNA | |
| 3.1 Metallotioneine | 49 |
| 3.2 Fitochelatina sintetasi | 58 |
| 3.3 Antigene nucleare di proliferazione cellulare | 65 |
| 4. Discussione metallotioneine | 71 |

| | |
|--|-----|
| 5. Discussione fitochelatino sintetasi | 74 |
| 6. Detossificazione in <i>C. intestinalis</i> | 76 |
| 7. Risultati SOD, GCLC, GS, GPX7 | |
| 7.1 Cu/Zn superossido dismutasi | 79 |
| 7.2 Glutammato cistein ligasi subunità catalitica | 84 |
| 7.3 Glutathione sintetasi | 90 |
| 7.4 Glutathione perossidasi | 96 |
| 8. Discussione SOD, GS, GCLC, GPX7 | |
| 8.1 Sequenze geniche e filogenesi | 101 |
| 8.2 Espressione | 104 |
| 9. Conclusioni | 107 |
| 10. Bibliografia | I |

Abbreviazioni

| | |
|-------------|---|
| ARE | <i>antioxidant responsive element</i> |
| CDS | regione codificante |
| GCLC | glutammato cistein-ligasi subunità catalitica |
| GPX | glutazione perossidasi |
| GS | glutazione sintetasi |
| ISH | ibridazione <i>in situ</i> |
| LPS | lipo-poli saccaridi |
| MRE | <i>metal responsive element</i> |
| MT | metallotioneina |
| PC | fitochelatina |
| PCNA | antigene di proliferazione cellulare |
| PCS | fitochelatino sintetasi |
| RACE | amplificazione rapida dei terminali di cDNA |
| ROS | specie reattive dell'ossigeno |
| SOD | superossido dismutasi |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription protein</i> |
| UTR | regione non tradotta |

1. Introduzione

1.1 I Tunicati

I Tunicati rappresentano un subphylum dei Cordati e comprendono organismi filtratori presenti in tutti i mari, bentonici o planctonici, solitari o coloniali; questi ultimi presentano sia riproduzione sessuata che asessuata. Condividono con i Vertebrati e i Cefalocordati i caratteri peculiari del phylum Cordati quali notocorda, tubo neurale, coda muscolare e faringe respiratoria. Tale piano organizzativo è presente solo allo stadio larvale e con la metamorfosi viene generalmente perso (fanno eccezione le Appendicolarie).

La larva giriniforme, liberamente natante, presenta una regione anteriore (cefalenteron) dove si concentrano gli organi interni e le strutture sensoriali, e una coda muscolare dove è localizzata la notocorda (da cui il nome Urochordata). Alla metamorfosi la coda e le strutture interne vengono riassorbite mentre il sistema nervoso centrale si riduce a un singolo ganglio.

Altre caratteristiche, come l'assenza di metameria, di cavità celomatiche (tranne la cavità pericardica) e la presenza della tunica, sottolineano le differenze tra Tunicati e altri Cordati.

Il nome tunicati deriva dalla presenza della tunica, un tessuto secreto dall'animale stesso, che ha tutte le caratteristiche di un tessuto connettivo, pur essendo posto all'esterno dell'epidermide. La tunica è costituita da un materiale simil-cellulosico (tunicina) composto da mucopolisaccaridi, acqua, proteine strutturali, collagene ed elastina. La tunica è implicata in molteplici funzioni quali rivestimento, protezione meccanica, difesa, adesione al substrato e alloriconoscimento.

I tunicati sono classicamente suddivisi nelle classi degli Ascidiacei (bentonici sessili), Taliacei e Larvacei (entrambi planctonici).

Vertebrati e Tunicati sono filogeneticamente correlati e hanno un antenato in comune (...). Sulle relazioni filogenetiche dei vari subphyla dei Cordati si è molto dibattuto, soprattutto sulla questione di chi, tra Cefalocordati ed Urochordati, fosse

il sister group dei vertebrati. Solo recentemente Delsuc (2006) sembra aver risolto, con un approccio di filogenesi molecolare, la diatriba. Secondo questo studio sarebbero gli Urocordati il subphylum più vicino ai vertebrati e non i Cefalocordati, come invece si riteneva, soprattutto su base morfologica (...).

1.2 La classe Ascidiacea

La classe Ascidiacea è la più numerosa del subphylum Tunicata e annovera circa 2300 specie, solitarie e coloniali. Troviamo individui bentonici e sessili, tra i quali la maggior parte aderisce a substrati quali rocce, conchiglie o alghe. La classe Ascidiacea si divide in tre ordini: Aplousobranchiata, Phlebobranchiata e Stolidobranchiata.

L'adulto delle Ascidie ha un aspetto sacciforme, con il volume corporeo occupato in gran parte dal cestello branchiale, che comunica con l'esterno mediante due aperture: alla sommità un sifone orale (inalante) e lateralmente un sifone atriale o esalante. Le Ascidie sono organismi filtratori: l'acqua e le particelle di cibo entrano, attraverso il sifone orale, nel faringe, fornito di fessurazioni cigliate dette stigmi. Dal faringe l'acqua passa alle camere peribranchiali (laterali al faringe) mentre le particelle di cibo vengono trattenute dalla rete di muco, prodotta dall'endostilo, che tappezza l'interno del cestello branchiale.

L'endostilo è una doccia cigliata, posta ventralmente al faringe: viene considerato omologo alla tiroide dei vertebrati e in esso sono presenti cellule in grado di fissare lo iodio. La rete di muco viene appallottolata dalla lamina dorsale e il cordone alimentare mucoso così formatosi viene spinto dalle ciglia posteriormente nell'esofago e prosegue nello stomaco, fino all'intestino che sbocca nella camera atriale, in prossimità del sifone esalante, dove terminano anche i gonodotti. Feci, gameti e acqua filtrata fuoriescono attraverso il sifone atriale.

Le ascidie possiedono un sistema circolatorio aperto con lacune nei tessuti degli organismi adulti nelle quali scorre l'emolinfa. Il cuore, tubulare, è in posizione ventrale e pompa il sangue in senso alterno.

Il sistema nervoso dell'adulto consta in un ganglio cerebrale, nervi della parete del corpo, nervo viscerale e plesso del cordone dorsale.

Nel mantello, formato da epidermide, epitelio peribranchiale e tessuto di origine mesenchimale, troviamo i fasci longitudinali di muscolatura liscia che si estendono dal sifone inalante alla base dell'addome. In entrambi i sifoni troviamo muscolatura circolare.

La riproduzione delle Ascidie può essere sia sessuata che asessuata (nelle specie coloniali). Tutte sono ermafrodite proterandriche. Accanto alla più diffusa fecondazione esterna, vi sono specie con fecondazione interna, ovovivipare o vivipare (Burighel e Cloney, 1997).

1.3 Metallotioneine

La prima metallotioneina (MT) fu scoperta nella corteccia renale di cavallo, mezzo secolo fa, nel 1957 (Margoshes e Vallee, 1957); fu chiamata così perché si trattava di una proteina ad elevato contenuto in zolfo e capace di legare vari metalli (Kagi e Valee, 1960). Le numerose ricerche, condotte fino ad oggi, hanno permesso di identificare proteine con caratteristiche simili in una larghissima varietà di organismi come vertebrati, invertebrati, piante, funghi, cianobatteri (Kagi, 1993) e protisti (Piccinni *et al.*, 1994). Le caratteristiche principali che contraddistinguono le MT sono:

- Basso peso molecolare (2000-18000 Da)
- Elevato contenuto in metalli
- Elevato contenuto in cisteine e generale assenza di amminoacidi aromatici
- Spettro di assorbimento UV-visibile caratteristico di complessi metallo-tiolati
- Presenza di clusters metallo-tiolati

1.3.1 Classificazione e struttura proteica delle MT

Inizialmente le diversità nella struttura primaria delle MT ha portato una suddivisione delle MT in tre classi (Fowler *et al.*, 1987):

Classe I

Polipeptidi con una struttura primaria simile a quella trovata per la prima volta nella corteccia renale di cavallo, caratterizzati da residui di cisteina distribuiti in motivi ripetuti (Cys-Cys, Cys-X-Cys, e Cys-X-X-Cys) all'interno della struttura primaria (Kagi, 1991). Comprende MT di tutti i vertebrati e di alcuni invertebrati come crostacei e molluschi. Presentano una lunghezza di 60-68 aminoacidi e la posizione dei 20 residui di cisteina nella sequenza rimane pressoché invariata. Sono costituite da un dominio α (C-terminale), comprendente 11 cisteine, e da un dominio β (N-terminale), comprendente 9 cisteine, collegati da un breve segmento conservato che conferisce loro mobilità ed indipendenza al momento di legare il metallo (Hamer, 1986; Kille *et al.*, 1994).

Classe II

Mantengono costanti i motivi cisteinici della classe precedente, ma la posizione delle cisteine nella struttura primaria è diversa. Presentano una lunghezza che varia da 25 a 181 residui aminoacidici. E' una classe molto eterogenea, poiché comprende MT isolate in cianobatteri, ricci di mare, nematodi, alcune piante e protisti. Appartengono a questa classe anche le MT isolate dai lieviti. In *Saccharomyces cerevisiae*, ad esempio, sono state isolate MT che hanno scarsa similarità con quelle di altri organismi e tra loro stesse (Culotta *et al.*, 1994; Karin *et al.*, 1984). In *Neurospora crassa*, invece, è presente una particolare MT, costituita da solo 25 aminoacidi e avente 7 Cys che possono essere precisamente allineate con quelle del dominio β della MT dei vertebrati (Lerch, 1980).

Classe III

Si tratta di polipeptidi atipici, molto diversi da quelli delle classi precedenti che contengono unità di γ -glutamyl-cisteina; comprendono le fitochelatine isolate da alcune piante.

Dal momento che il numero delle sequenze proteiche e geniche delle MT identificate è andato progressivamente aumentando, questa suddivisione è diventata inadeguata. Infatti, la loro lunghezza, la composizione amminoacidica, il numero e la ripartizione delle Cys sono molto variabili. E' stato quindi introdotto un nuovo sistema di classificazione basato sulle similarità delle sequenze e le relazioni filogenetiche (Tabella 1). In questo modo la superfamiglia delle MT è suddivisa in famiglie, sottofamiglie, sottogruppi, isoforme e clan (Binz e Kagi, 1999):

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

famiglia: MT che hanno sequenza amminoacidica 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 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.

| | |
|--|---|
| <p>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</p> | <p>Family 7: ciliata MTs ci: ciliata MT</p> |
| <p>Family 2: mollusc MTs mo1: mussel MT-1 mo2: mussel MT-2 mog: gastropod MT mo: n.d. mollusc MT</p> | <p>Family 8: fungi-I MTs f1: fungi-I MT</p> |
| <p>Family 3: crustacean MTs c1: crustacean MT-1 c2: crustacean MT-2 c: n.d. crustacean MT</p> | <p>Family 9: fungi-II MTs f2: fungi-II MT</p> |
| <p>Family 4: echinodermata MTs e1: echinodermata MT type 1 e2: echinodermata MT type 2</p> | <p>Family 10: fungi-III MTs f3: fungi-III MT</p> |
| <p>Family 5: diptera MTs d1: diptera MT type 1 d2: diptera MT type 2</p> | <p>Family 11: fungi-IV MTs f4: fungi-IV MT</p> |
| <p>Family 6: nematoda MTs n1: nematoda MT type 1 n2: nematoda MT type 2</p> | <p>Family 12: fungi-V MTs f5: fungi-V MT</p> |
| | <p>Family 13: fungi-VI MTs f6: fungi-VI MT</p> |
| | <p>Family 14: prokaryota MTs pr: prokaryota MT</p> |
| | <p>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</p> |

Tabella 1: Schema di classificazione delle MT.

1.3.2 Molteplicità delle MT

La maggior parte delle specie presenta un ampio polimorfismo genico permettendo così la sintesi di diverse isoforme di MT che differiscono anche solo di pochi residui amminoacidici (Kagi e Kojima, 1987). Solitamente sono espresse due isoforme principali, MT-1 e MT-2, codificate da geni non allelici (Roesijadi, 1992). Nei mammiferi sono state identificate quattro isoforme principali MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4, codificate da una famiglia multigenica. Le prime due isoforme, MT-1 e MT-2 sono le più espresse, in particolar modo nel fegato e nei reni. Nell'uomo la situazione è molto più complessa, poiché le MT sono codificate da una famiglia genica costituita da 17 geni, di cui 10 espressi (Mididotti *et al.*, 1996). Questi ultimi codificano isoforme multiple per la MT-1, mentre codificano una sola isoforma per la MT-2 (MT-2a). L'isoforma MT-3 è prevalentemente espressa nel cervello, ma la sua presenza è stata rilevata anche

nei tessuti riproduttori, nella lingua, nello stomaco e nei reni (Miles *et al.*, 2000). L'espressione delle MT-4, invece, sembra limitarsi solamente a livello degli epitelii squamosi stratificati di vari organi (Quaife *et al.*, 1994).

Il significato dell'esistenza delle forme multiple di MT risiede probabilmente nel fatto che ciascuna di esse ha funzioni peculiari (Roejadi, 1992; Miles *et al.*, 2000). È il caso, ad esempio, di MT-3, le cui proprietà funzionali differiscono da quelle di MT-1 e MT-2, pur essendo tutte espresse a livello del sistema nervoso centrale. La biosintesi dell'MT-3 non è, infatti, stimolata dai tipici induttori di MT-1 e MT-2 (Zeng *et al.*, 1995; Hidalgo *et al.*, 2001).

Anche in altri organismi la molteplicità di isoforme sembra essere correlata ad una specifica funzione. 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, MT-10 e MT-20, 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. È 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). È noto che i gasteropodi terrestri tollerano elevate concentrazioni di cadmio e rame 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 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 e CeMT2 (Freedman *et al.*, 1993). *Lumbricus rubellus*, invece, possiede due isoforme: MT-1 e MT-2, indotte dal Cd

(Sturzenbaum *et al.*, 1998). Per quanto riguarda i funghi, è stato visto che le varie isoforme vengono indotte solamente dal Cu. Fa eccezione *Zym1*, isolata in *Schizosaccharomyces pombe*, che viene indotta dallo zinco (Zn) ma non dal Cu (Borrelly *et al.*, 2002). In *Neurospora crassa* è presente una singola isoforma (Munger *et al.*, 1987). In *Candida glabrata* sono state identificate tre isoforme, MTI, MTIIa e MTIIb, le quali sembrano giocare 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 (Culotta *et al.*, 1994; Mehra *et al.*, 1989). Nei tessuti vegetali sono state identificate le tre isoforme MT-1, MT-2 e 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; Murphy e Taiz, 1997).

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

1.3.3 Espressione genica delle MT in risposta ai metalli

Nei vertebrati l'attivazione della trascrizione genica delle MT da parte dei metalli di transizione necessita della presenza di tre componenti minime (Cousins, 1994):

- fattori di trascrizione *cis-acting*, costituiti da sequenze di DNA dette MRE (*Metal Responsive Element*) presenti in copie multiple nei promotori dei geni coinvolti;
- fattori di trascrizione *trans-acting*, costituiti da proteine sito-specifiche dette MTF (*Metal Transcription Factor*) o MRE-BP (*MRE binding protein*) in grado di legarsi alle sequenze MRE come risposta alle variazioni di concentrazione dei metalli nella cellula;
- metallo induttore, il quale, trasportato all'interno della cellula, va a legarsi con una serie di ligandi citoplasmatici formando un *pool* precursore per l'eventuale interazione con le proteine (MTF o MRE-BP) che regolano la trascrizione genica delle MT.

Un modello generale che descrive le possibili interazioni tra queste componenti all'interno della cellula è presentato in Figura 1.

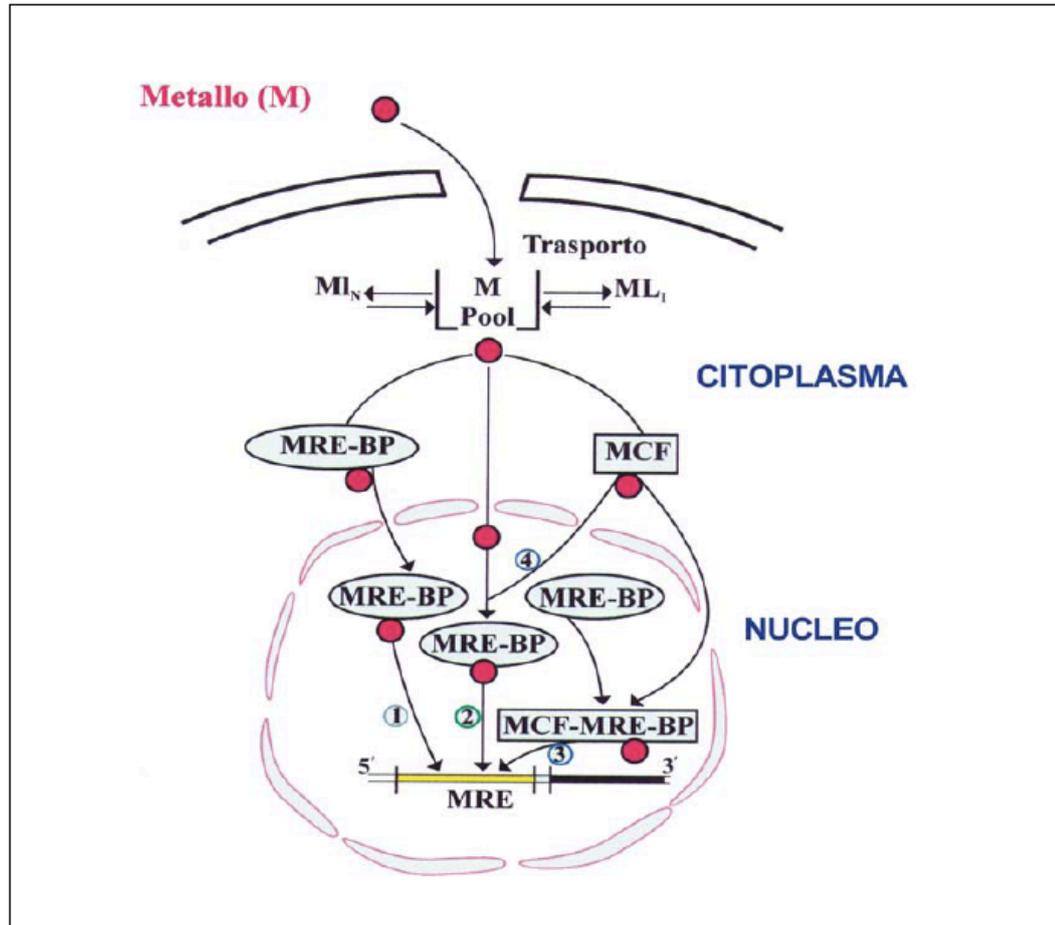


Figura 1: Possibili modi di interazione tra le componenti importanti per la regolazione della trascrizione genica da parte dei metalli. Il metallo (M) interagisce con una larga varietà di ligandi citoplasmatici (L). Successivamente il metallo entra nel nucleo della cellula come ione libero o più probabilmente complessato alle MRE-BP o a fattori cellulari (MCF) fra cui anche MTF. L'inizio della trascrizione richiede il legame dei complessi MTF-metallo (modalità 1, 2 o 4) o MTF-MRE-metallo (modalità 3) con le sequenze MRE presenti nel promotore dei geni responsabili.

Sebbene un gran numero di agenti e di condizioni siano in grado di indurre la biosintesi delle MT, i metalli rappresentano i loro più comuni e potenti induttori (Kagi, 1991). Il processo di induzione si manifesta con una rapida risposta trascrizionale che determina un notevole aumento dei livelli dell'mRNA delle MT, anche se il tempo necessario per il raggiungimento della massima sintesi varia nei diversi organismi (da minuti nei lieviti e nei protisti, fino a giorni nei vertebrati); questa differenza riflette le diverse velocità con le quali il metallo entra e raggiunge il bersaglio nella cellula (Hamer, 1986). Il rapido incremento dei livelli dell'mRNA delle MT porta ad un notevole aumento della velocità di sintesi di tali proteine, con un conseguente loro accumulo nelle cellule in modo da legare i metalli in eccesso (Andrews, 1990).

La regolazione dell'espressione genica delle MT è stata studiata soprattutto nei vertebrati e nei lieviti. In questi ultimi è noto che i metalli capaci di indurre la sintesi di MT sono solo Cu e Ag (Hamer, 1986). In *Saccharomyces cerevisiae*, il locus CUP1 codifica per una Cu-tioneina di 61 aminoacidi. L'espressione genica di CPU1 è regolata da una proteina *trans-acting* detta ACE1, che in condizioni normali è inattiva. L'eventuale presenza di un eccesso di Cu determina la conversione della proteina ACE1 nella sua forma attiva capace così di legarsi ad una specifica sequenza di attivazione nel promotore del gene CUP1 detta UASCUP1 (*upstream activator sequences*); questa, infatti, contiene vari MRE costituiti da sequenze consenso TCY (4-6) GCTG (dove Y è C o T).

Negli eucarioti più complessi la situazione complica, poiché le MT sono indotte da vari metalli di transizione essenziali (come Zn e Cu) e non essenziali (come Cd e Hg) (Hamer, 1986).

Come detto, la trascrizione metallo-indotta è mediata da particolari sequenze presenti nei promotori dei geni delle MT chiamate MRE (Metal Responsive Element) (Karin et al., 1984; Samson e Gedamu, 1998). Esse sono presenti in copie multiple in entrambi gli orientamenti (forward e reverse) e sono costituite da sequenze consenso di 15 pb ricche in GC, caratterizzate da una regione centrale TGCRNC molto conservata e da due porzioni fiancheggianti più variabili (Klaassen *et al.*, 1999; Ghoshal e Jacob, 2001). È stato visto che le varie copie degli MRE agiscono in modo sinergico nell'attivazione della trascrizione (Samson e Gedamu, 1998). MTF-1 (Metal Transcription Factor-1) è il fattore che, legandosi specificatamente agli MRE, determina la trascrizione genica indotta dai metalli (Radtke, 1993). Questa proteina è un fattore di trascrizione a sei dita di Zn della famiglia Cys2-His2, caratterizzato dalla presenza di tre domini che risultano fondamentali per l'attivazione: un dominio ricco in amminoacidi acidi, uno ricco in proline ed uno in serine/treonine. È stato caratterizzato in molte specie animali tra cui uomo, topo, *Fugu rubripes*, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* e *Drosophila melanogaster*. Esso presenta una struttura primaria evolutivamente molto conservata, soprattutto nel dominio a dita di Zn (Smirnova *et al.*, 2000; Saydam *et al.*, 2002).

Sono stati proposti vari modelli per spiegare la modalità d'azione dell'MTF-1, tutti contemplano il ruolo essenziale dello Zn (Palmiter, 1994; Roesijadi, 1996; Bittel *et al.*, 1998; Haq *et al.*, 2003). E' stato proposto un modello in cui la trascrizione dei geni delle MT è attivata dalla dissociazione, in presenza di Zn, di un inibitore (MTI) legato in condizioni normali a MTF-1, permettendo così a quest'ultimo di legarsi agli MRE. Lo Zn, quindi, indurrebbe la biosintesi delle MT mentre gli altri metalli (come Cu, Cd e Hg) spiazzerebbero lo Zn dai vari ligandi citoplasmatici rendendolo disponibile per interagire con MTI (Roesijadi, 1996). Inoltre, è stato proposto anche un altro modello

che prevede che l'MTF-1, presentando molteplici potenziali siti di fosforilazione fosforilati dal trattamento con vari agenti, venga traslocato dal citoplasma al nucleo, in ragione della presenza di un NLS (*Nuclear Localization Signal*) (Smirnova *et al.*, 2000; Saydam *et al.*, 2002). Condizioni di stress, quali un eccesso di metalli (Zn, Cd e Cu), agenti ossidativi (ROS), radiazioni ionizzanti e ipossia, potrebbero attivare *pathways* di trasduzione del segnale in grado di causare la fosforilazione di MTF-1 che verrebbe attivato. L'MTF-1 così attivato verrebbe traslocato, grazie alla presenza di un NLS, dal citoplasma al nucleo; una volta entrato nel nucleo, MTF-1 si legherebbe agli MRE, determinando l'inizio della trascrizione genica delle MT.

Altri elementi regolativi riscontrati nei promotori dei geni delle MT sono gli ARE (*Antioxidant Responsive Element*), i GRE (*Glucocorticoid Responsive Element*), i siti di legame per il fattore di trascrizione USF (*Upstream Stimulatory Factor*), che è noto regolare positivamente e negativamente la trascrizione di una vasta gamma di geni, i GC *box* cui si lega il fattore di trascrizione Sp1, i BLE (*Basal Level Enhancer*) che sono siti di attacco per AP1 ed AP2 e che mediano la trascrizione indotta da fattori di crescita, da esteri forbolici e da attivatori delle vie delle protein-chinasi A e C (Samson e Gedamu, 1998) e sequenze riconosciute da *signal transducer and activator of transcription protein* (STAT), fattori di trascrizione attivati durante la risposta immunitaria.

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione dei geni delle MT è poco conosciuta. E' indubbio che la stabilità degli mRNA e delle proteine gioca un ruolo importante nell'espressione di molti geni. Gli mRNA delle MT negli eucarioti non sono molto stabili; infatti nei mammiferi la loro emivita sembra essere di circa 2 ore (Andrews, 1990).

1.3.4 Ciclo redox delle MT

La caratteristica più importante delle MT, che conferisce importanza biologica a queste proteine, è la loro ricchezza in cisteine.

Nei mammiferi le MT legano principalmente Zn (Kagi, 1991), ma in presenza di Cd e Cu lo Zn può essere rapidamente sostituito (Shaw, 1991). Il legame dello Zn alle MT è stato dimostrato essere fisiologicamente importante. Diversi studi hanno prodotto evidenze a supporto dell'idea che le MT funzionino da trasportatrici dello Zn per la regolazione dell'espressione genica e l'attività di proteine come metallo-proteine e fattori di trascrizione dipendenti da metalli

(Maret, 1995; Zeng *et al.*, 1991a; Zeng *et al.*, 1991b; Jacob *et al.*, 1998; Maret *et al.*, 1997). Il legame dello Zn alle MT è termodinamicamente stabile, il che rende le MT un'ottima riserva di questo metallo essenziale *in vivo*. La questione è come le MT rendano disponibile lo Zn per le altre molecole.

Il gruppo tiolico conferisce l'attività redox al complesso Zn-MT che può essere ossidato con conseguente rilascio dello ione metallico che diviene così biodisponibile per le altre metallo-proteine. La riduzione delle MT ossidate restituisce la capacità di legame e il ricostituirsi della riserva di Zn. Questo processo costituisce il ciclo redox delle MT (Fig. 2).

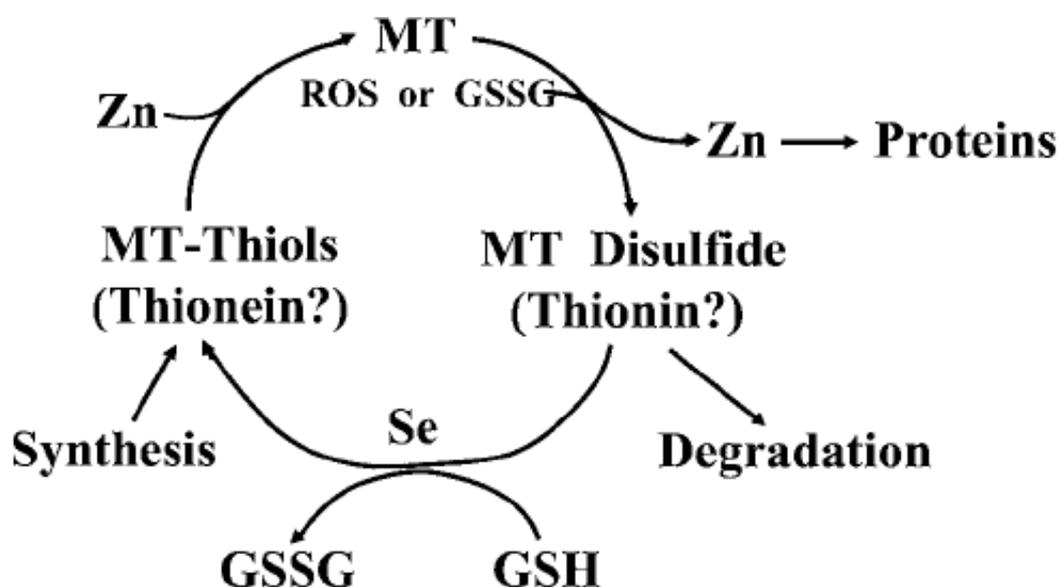


Fig. 2: rappresentazione schematica del ciclo redox delle MT. In condizioni fisiologiche, lo Zn legato alle MT viene rilasciato in seguito all'ossidazione dei gruppi tiolici, quando l'ambiente intracellulare diventa ossidato. Alla formazione dei ponti disolfuro all'intero delle MT (tioneine) segue il rilascio di Zn. Quando l'ambiente intracellulare torna allo stato ridotto, attraverso, per esempio, un incremento del rapporto GSH/GSSG, le tioneine si riducono e tornano ad essere metallotioneine. In presenza di Zn, le MT si ricostituiscono rapidamente. Questo processo costituisce il ciclo redox delle MT, che gioca un ruolo fondamentale nelle funzioni biologiche delle MT. (da Kang, 2006)

Il rilascio di Zn dalle MT è modulato sia dal glutatione (GSH, vedi oltre) che dal glutatione ossidato (GSSG) (Maret, 1995; Jiang *et al.*, 1998; Maret, 1994). Un alto

rapporto GSH/GSSG previene l'ossidazione delle MT e, di conseguenza, promuove il legame dello Zn ai cluster tiolici. Viceversa un basso rapporto GSH/GSSG stimola il rilascio di Zn e l'ossidazione delle MT. Questo processo integra il ciclo redox delle MT e facilita le funzioni e il metabolismo cellulare dello Zn. Il tasso di rilascio dello ione metallico dalle MT dipende dalla quantità di GSSG in maniera lineare: più lo stato redox della cellula diventa ossidato e più efficientemente lo Zn è rilasciato dalle MT (Maret e Valee, 1998). Inoltre altre disolfuri cellulari possono reagire con le MT al fine di rilasciare Zn (Maret, 1995). Anche durante condizioni di stress ossidativo, quando i livelli di ossido nitrico (NO) o delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) aumentano, avviene il rilascio dello Zn dalle MT (Kroncke *et al.*, 1994; St Croix *et al.*, 2002; Spahl *et al.*, 2003; Malaiyandi *et al.*, 2004) con conseguente formazione di ponti disulfuro intramolecola. Questo è un processo casuale dove il numero di ioni di Zn rilasciati e la formazione di ponti disulfuro varia, ma aumenta quando l'ambiente diventa più ossidato.

Diversi studi si sono occupati della riduzione delle MT ossidate *in vitro* (Quesada *et al.*, 1996; Brouwer *et al.*, 1993; Fabisiak *et al.*, 1999; Chen e Maret, 2001). Si è osservato che l'aggiunta di GSH causa una sensibile riduzione delle MT ossidate (Brouwer *et al.*, 1993), laddove agenti riducenti come il 2-mercaptoetanolo o il diitiotreitolo non sono in grado di ridurre i ponti disulfuro delle MT.

1.3.5 MT e detossificazione da metalli

Esperimenti genetici condotti usando topi transgenici o knockdown per le MT hanno prodotto evidenze dirette che le MT sono in grado di proteggere dalla tossicità del Cd (Liu *et al.*, 1995; Michalska e Choo, 1993; Masters *et al.*, 1994).

Il Cd è uno dei maggiori induttori di MT ed è stato dimostrato che tale ione metallico si può dissociare dalle MT attraverso le stesse reazioni ossidoriduttive descritte sopra per lo Zn. Come regolatrici di metalli, le MT possono in questo modo, eliminare le interazioni del Cd con componenti vitali delle cellule. Tuttavia, in risposta a cambiamenti redox, il Cd torna biodisponibile.

Le MT possono partecipare anche alla detossificazione da Cu, anche se attraverso meccanismi diversi rispetto al Cd. Nei mammiferi sono stati identificati sistemi di trasporto per il rame (Pena *et al.*, 1999) e che comprendono anche proteine solubili (Culotta *et al.*, 1997; Glerum *et al.*, 1996). Le MT possono funzionare come regolatrici temporanee del rame in condizioni di sovraccarico, per poi lasciare che siano le proteine trasportatrice a traslocarlo fuori dalla cellula o nelle vescicole.

E' importante considerare che in condizioni di sovraccarico di Cd e Cu, lo Zn legato alle MT viene rapidamente rimpiazzato. L'alta affinità delle MT a Cd e Cu rispetto allo Zn rende le MT più termodinamicamente favorite a legare questi due metalli. Se lo spostamento dello Zn crei o meno alterazioni nel suo metabolismo è ancora poco chiaro (Kang, 2006).

1.3.6 MT e funzione antiossidante

L'ipotesi che le MT funzionino da antiossidante contro ROS e specie azotate ha ricevuto largo supporto da evidenze *in vitro* (Thornalley e Vasak, 1985; Abel e Ruitter, 1989; Cai *et al.*, 2000). Questi studi hanno dimostrato che MT contenenti Zn e/o Cd possono fungere da scavenger nei confronti di radicali idrossili e superossidi. Tutti gli atomi di zolfo delle cisteine sono coinvolti nel processo di eliminazione dei radicali e l'affinità delle ROS per le MT è di qualche centinaio di volte superiore a quello del GSH per le ROS (Thornalley e Vasak, 1985). Studi su topo hanno dimostrato che le MT sono circa 800 volte più potenti del GSH nel prevenire *in vitro* la degradazione del DNA in seguito a stress ossidativo (Abel e Ruitter, 1989). Che le MT reagiscano direttamente con tutte le ROS è stato però dimostrato solo in sistemi cell-free (Thornalley e Vasak, 1985; Abel e Ruitter, 1989; Cai *et al.*, 2000). Le ROS, specialmente i radicali ossidrilici, sono estremamente reattive e hanno una emivita estremamente bassa. E' stato quindi ipotizzato che le MT potrebbero effettivamente funzionare da scavenger *in vivo* solo se posizionate molto vicino al sito di produzione dei radicali. Inoltre, dal momento che lo Zn protegge dalla perossidazione lipidica e stabilizza le

membrane, è stato sostenuto che la principale funzione protettiva svolta dalle MT contro i ROS sia proprio il rilascio di Zn e il successivo incorporamento di questo metallo nella membrana plasmatica (Thomas *et al.*, 1986; Chvapil *et al.*, 1972). Una più condivisibile spiegazione della funzione antiossidante delle MT può arrivare dal loro ciclo redox. E' possibile che la funzione delle MT come antiossidante *in vivo* sia dovuta alla sua interazione con ossidanti cellulari, che a loro volta potrebbero interagire direttamente con le ROS. A sostegno di questa idea è stato dimostrato che il GSH è uno scavenger intracellulare di radicali liberi e che le MT ossidate vengono ridotte solo in presenza di GSSG (Reed, 1990; Meister, 1989). L'accoppiamento tra il metabolismo del GSH e il ciclo redox delle MT potrebbe essere quindi alla base della funzione antiossidante delle MT.

1.3.7 MT ed immunità

Le risposte immunitarie della fase acuta descrivono l'insieme dei processi fisiologici e biochimici conseguenti ad un'inflammatione (di origine infettiva o immuno-mediata) o ad un danno tissutale (trauma, chirurgia, neoplasie). In particolare la risposta dell'organismo riguarda la sovra-regolazione di numerose proteine, prevalentemente di origine epatica, grazie alla liberazione di citochine da parte del sito danneggiato. Le proteine che rispondono allo stress possono avere un ruolo importante nella modulazione delle funzioni cellulari e possono essere coinvolte in meccanismi fondamentali di tale risposta immunitaria. Le MT, per i diversi ruoli che ricoprono nella cellula, potrebbero partecipare nelle risposte immunitarie (Crowthers *et al.*, 2000).

I geni per le MT (MT-1 e MT-2 nei vertebrati) sono costitutivamente espressi a bassi livelli in diversi tessuti e tipi cellulari e la loro trascrizione può essere incrementata da cationi metallici e citochine. Le citochine della fase acuta, come IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ , sono in grado di promuovere la sintesi di MT-1 e MT-2 (De *et al.*, 1990; Karin *et al.*, 1985; Leibbrandt e Koropatnick, 1994; Sato *et al.*, 1992; Schroeder e Cousins, 1990). Inoltre diversi studi hanno dimostrato che le MT sono presenti in tessuti in rapida divisione, inclusi tessuti ematopoietici e

tessuti embrionali (Andrews *et al.*, 1984, 1987, 1991; Huber and Cousins, 1993a,b; Schmid *et al.*, 1993) e questo suggerisce che le MT possano funzionare non solo nella detossificazione da metalli, ma anche in altri processi fisiologici.

Le MT possono regolare l'attività di metalloproteine, inclusi fattori di trascrizione (Cano-Gauci e Sarkar, 1996) come Sp-1, un fattore di trascrizione coinvolto nei processi infiammatori ed in grado di attivare geni come collagene 1 α 1 (Lidè *et al.*, 1998), ligando di Fas (McClure *et al.*, 1999) e metalloproteinasi-9 della matrice (Yoshizaki *et al.*, 1998). E' altrettanto vero che anche le ROS sono in grado di influenzare l'attivazione di fattori di trascrizione e quindi i cambiamenti nei livelli di ROS mediati dalle MT potrebbero indirettamente influenzare l'attività genica.

Lynes e collaboratori hanno dimostrato nel 1993 che MT esogene in topo deprimono significativamente la risposta immunitaria e questa soppressione viene bloccata dalla presenza di anticorpi anti-MT. Inoltre, è stato visto che le MT agiscono come agenti linfo-proliferativi *in vitro* agendo sinergicamente con altri mitogeni linfocitari come la Concanavalina A e l'LPS (Borghesi *et al.*, 1996; Lynes *et al.*, 1990). In fine le MT diminuiscono la capacità dei macrofagi di stimolare la proliferazione dei linfociti-T (Youn *et al.*, 1995) e possono influenzare la risposta immunitaria cellulo-mediata diminuendo l'attività dei linfociti-T citotossici contro bersagli allogenici (Young e Lynes, 1999).

L'osservazione che, nei mammiferi, l'espressione epatica di MT è estremamente elevata in risposta ad LPS (Sobocinski *et al.*, 1978), ha portato a classificare queste proteine come proteine della fase acuta. Il fatto poi che questa capacità sia presente in diversi vertebrati (Wei e Andrews, 1988) suggerisce che possa essere una caratteristica fondamentale di tutte le MT dei vertebrati.

Diversi elementi nel promotore possono essere coinvolti nell'espressione di MT indotta da LPS. L'espressione costitutiva di MT-1 nel fegato di topo è mantenuta da proteine leganti gli ARE e Sp-1, ma in risposta ad LPS sembra siano le proteine STAT (attivate da citochine come IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) le responsabili dell'induzione di MT-1. Sia STAT1 che STAT3 hanno la capacità di legarsi ai loro siti bersaglio nel promotore delle MT e in maniera qualitativamente

simile. Studi condotti su topi knockout per STAT1 dimostrano che questa proteina funziona nella regolazione dei geni della risposta immunitaria innata (Meraz *et al.*, 1996). Mentre STAT3 sembra avere anche funzioni nello sviluppo, dato che topi knockout per questo gene non sono vitali.

1.3.8 MT: rigenerazione e proliferazione cellulare

Studi recenti su topo suggeriscono che le MT potrebbero avere un ruolo nella riparazione e rigenerazione del fegato danneggiato (Oliver *et al.*, 2005a; Jiang e Kang, 2004; Oliver *et al.*, 2005b).

Gli epatociti di mammiferi adulti, normalmente, non sono in grado di dividersi e hanno un lungo ciclo vitale, ma a differenza delle altre cellule, possono uscire dallo stato di riposo del ciclo cellulare (G_0) attraverso stimoli esterni, entrare nella fase G_1 , attraversare la fase S ed andare in mitosi. Questo processo dinamico nelle cellule del fegato è controllato dall'espressione di un gran numero di geni codificanti vari fattori di crescita, citochine e fattori di trascrizione. La via di trasduzione del segnale parte con fattori di crescita e citochine come TNF- α e IL-6. Durante i primi passaggi le cellule quiescenti entrano nella fase di replicazione ed è in questa fase che vi è l'induzione e la localizzazione nel nucleo delle MT. Fattori di trascrizione come NF- κ B e STAT3, che sono indotti da TNF- α , giocano un ruolo importante nelle fasi iniziali della rigenerazione del fegato. Nella fase successiva entrano in gioco diversi fattori di crescita che, di fatto, fanno cominciare la replicazione e permettono alle cellule del fegato di entrare in fase S. Lo stadio finale è raggiunto con la sovraespressione di TGF- β che sopprime la crescita epiteliale cellulare. Durante la fase finale della riparazione dei tessuti, le metalloproteinasi sono chiamate a completare il processo di riparazione degradando la matrice extracellulare e rimodellando i tessuti. Quindi, durante il processo di rigenerazione delle cellule del fegato, queste si trovano in uno stato di elevato metabolismo con una conseguente alta richiesta di zinco e rame.

La localizzazione transiente di MT nel nucleo delle cellule in rapida proliferazione indica che vi è un'elevata richiesta di zinco per la riparazione e

sintesi del DNA, così come un'elevata necessità di trasferire Zn a metalloenzimi e fattori di trascrizione.

Durante le prime fasi della rigenerazione cellulare sia IL-6 che TNF- α sono coinvolti nella conversione delle cellule del fegato da uno stato quiescente ad uno stato di replicazione. Dopo il danneggiamento delle cellule, i livelli di citochine aumentano andando a legarsi ai loro recettori sulle cellule danneggiate. Subito dopo, la sintesi di MT aumenta contemporaneamente all'espressione concomitante di altri geni (Cherian e Kang, 2006). Tutti questi studi suggeriscono che l'induzione di MT sia uno dei primi eventi della rigenerazione epatica e recenti risultati ottenuti con topi knockdown per le MT, suggeriscono che la sintesi di queste proteine possa essere essenziale per la proliferazione cellulare dopo parziale rimozione chirurgica o danno chimico del fegato (Oliver *et al.*, 2005a; Jiang e Kang, 2004; Oliver *et al.*, 2005b).

In due recenti studi (Oliver *et al.*, 2005a; Oliver *et al.*, 2005b) è stato investigato il possibile ruolo delle MT nella rigenerazione epatica utilizzando topi wild-type e topi knockdown per MT-1 e MT-2. Nei topi wild-type, dopo trattamento chirurgico di asportazione parziale del fegato, vi è incremento nella sintesi di MT e un aumento del tasso di proliferazione cellulare dedotto dall'incremento di espressione di PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Nei topi knockdown per le due principali isoforme di MT, oltre a non esserci alcuna espressione di MT, vi è anche un basso tasso di proliferazione cellulare. Questo suggerirebbe un ruolo essenziale delle MT in questo tipo di eventi.

Dato che le MT possono legare metalli con alta affinità, la loro elevata espressione è correlata all'alta richiesta di metalli essenziali, come zinco e rame, durante la proliferazione cellulare. Inoltre, essendo le MT in grado di attivare diversi metalloenzimi e fattori di trascrizione necessari per la rigenerazione cellulare, è possibile che agiscano come fattore di crescita essenziale durante questi processi.

1.4 Fitochelatine

Nelle piante, i metalli possono essere complessati con ligandi extracellulari, come ad esempio il malato e il citrato secreto dalle radici o nelle cellule attraverso ligandi peptidici come metallotioneine e fitochelatine (PC).

Le PC sono molecole citoplasmatiche identificate in una grande varietà di piante incluse monocotiledoni, dicotiledoni e gimnosperme, ma anche in alghe e lieviti (Gekeler *et al.*, 1989) suggerendo che la via di produzione delle PC possa essere comparsa molto presto nell'evoluzione.

Queste molecole sono costituite di soli tre aminoacidi: glutamina (Glu), cisteina (Cys) e glicina (Gly) con Glu e Cys legati da un legame γ -carbossilaminico. Esse sono sintetizzate enzimaticamente e sono strutturalmente correlate al glutatione (GSH; γ -GluCysGly) (Grill *et al.*, 1989; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999) essendo costituite da unità ripetute del dipeptide Glu-Cys seguite da una Gly terminale. La struttura biochimica di queste molecole è: $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ dove n normalmente è compreso tra 2 e 5, ma può arrivare anche a 11 (Cobbett, 2000). Vengono prodotte in cellule e tessuti dopo esposizione a diversi ioni metallici (Cd>Pb>Zn>Ag>Hg>As>Cu) con una correlazione positiva rispetto all'accumulo degli stessi metalli nei tessuti (Rauser, 1995; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008; Yang e Yang, 2001; Gzy e Gwozdz, 2005; Ramos *et al.*, 2007). La sintesi di questi peptidi in presenza di ioni metallici è catalizzata dall'enzima PC sintetasi a partire da substrati come il GSH.

Per primi Grill e collaboratori (Grill *et al.*, 1989) proposero che, in presenza di ioni metallici liberi, le PC fossero sintetizzate dalla PC sintetasi in due distinti passaggi:

1. il GSH viene tagliato per generare l'unità γ -GluCys
2. l'unità γ -GluCys viene trasferita ad un'altra molecola, che può essere sia GSH che un oligomero di PC (PC_n), per generare PC_{n+1} .

La PC sintetasi è in grado di catalizzare la reazione di sintesi delle PC utilizzando concentrazioni nell'ordine delle micromoli di Cd-GSH e nell'ordine delle millimoli di GSH libero.

Studi genetici mirati, condotti su *S. pombe* mutato, deficiente per il GSH, hanno confermato che senza il GSH l'organismo risulta mancante di PC e ipersensibile al Cd (Glaeser *et al.*, 1991; Coblenz e Wolf, 2006). In modo sorprendente, gli organismi in cui viene sovraespresso il gene per la PC sintetasi, risultano ipersensibili ai metalli pesanti. A dimostrazione del fatto che non sono le PC di per se stesse responsabili della detossificazione da Cd, Lee e collaboratori (2003) hanno condotto esperimenti su *Arabidopsis* mutata in grado di sovraesprimere PC sintetasi (Lee *et al.*, 2003). Questi organismi accumulano mRNA per PC sintetasi da 15 a 25 volte in più rispetto agli organismi non mutati, ma la concentrazione di PC aumentava solo da 1,3 a 2,1 volte. La capacità di accumulare Cd veniva ristabilita incrementando i livelli di GSH nel mezzo. In esperimenti analoghi condotti su piante di tabacco, in grado di sovraesprimere PC sintetasi, si nota un enorme accumulo di γ -GluCys e un forte abbassamento nella concentrazione di GSH. Tuttavia questo abbassamento nella concentrazione di GSH riduce solo moderatamente la capacità di legame con il Cd (come riflette il basso rapporto SH-Cd), ma aumenta lo stress ossidativo che è alla base dell'ipersensibilità da Cd. Questo farebbe dedurre che la chelazione dei metalli pesanti ad opera delle PC debba lavorare in sinergia con sistemi di detossificazione da ROS indotti dagli stessi metalli (Pal e Rai, 2010).

In *Silene cucubalis*, *Arabidopsis* e pomodoro è stato osservato che l'espressione del gene per la PC sintetasi è indipendente dall'esposizione a metalli (Grill *et al.*, 1989; Klapheck *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997). Questa osservazione implica che l'attivazione dell'enzima è il momento chiave della regolazione della sintesi di PC. I livelli intracellulari di GSH, oltre alla presenza di ioni metallici, modulano la sintesi di PC (Chen *et al.*, 2008; Collin-Hansen *et al.*, 2007). Poiché la sintesi di GSH è regolata dallo stress ossidativo (Liang *et al.*, 2008), Xiang e Oliver (1998) hanno proposto che la sintesi di PC sia regolata a vari livelli dopo esposizione a Cd.

Questo metallo da una parte promuoverebbe la sintesi di PC (a spese del GSH) e dall'altra promuoverebbe la sintesi del GSH sia attraverso l'attivazione della via biosintetica, sia stimolando la produzione di ROS endogene. Quindi un modo per

incrementare la produzione delle PC sarebbe quello di sovraesprimere gli enzimi della via biosintetica del GSH.

Sottolineando ulteriormente che la trascrizione del gene per la PC sintetasi nelle piante superiori è costitutiva e quindi non inducibile (sia da metalli che da ROS, stress salino, acido jasmonico o acido salicilico), questi dati indicherebbero che la biosintesi delle PC è limitata dalla disponibilità di Gly in presenza di alte concentrazioni di Cd (Pal e Rai, 2010).

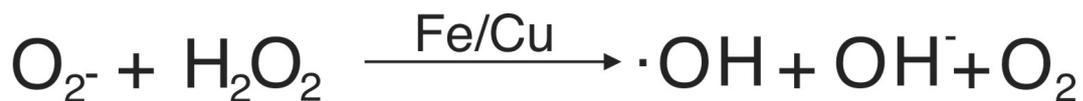
L'identificazione di un gene omologo alla PC sintetasi di *Arabidopsis* (AtPCS1) in metazoi è avvenuta in epoca recente. Nel 1999, nel nematode *C. elegans*, è stato individuato un gene codificante per una proteina putativa di 40,5 kDa che mostra un'identità di sequenza del 32% con AtPCS. Questo gene rappresenta la prima evidenza che non solo GSH e MT, ma anche PC possano partecipare all'omeostasi dei metalli negli animali.

Poco dopo il completamento del sequenziamento del genoma di *C. elegans*, due pubblicazioni indipendenti hanno evidenziato la funzionalità di PC sintetasi in questo organismo modello (Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001). Dati ottenuti nell'anellide *Eisenia fetida* mostrano come vi sia una netta conservazione tra animali e piante della porzione N-terminale dell'enzima (circa 50% di identità aminoacidica), mentre la regione C-terminale sembra essere estremamente variabile. Più precisamente sembrano altamente conservati 5 residui cisteinici fondamentali per il legame degli ioni metallici all'enzima. In *E. fetida* e *C. elegans* l'espressione di PC sintetasi avviene principalmente a livello dei celomociti dove avviene anche l'espressione di MT. In *E. fetida* sembra che questi due geni agiscano insieme nei processi di detossificazione da Cd; la PC sintetasi agisce immediatamente e a basse concentrazioni e l'MT più tardivamente e a maggiori concentrazioni (Brulle *et al.*, 2008). In *C. elegans* invece è stato suggerito che le PC possano costituire una via alternativa alla detossificazione da Cd parallelamente alle MT (Hughes e Sturzenbaum, 2007).

1.5 Le forme reattive dell'ossigeno e lo stress ossidativo.

Una delle principali conseguenze del metabolismo aerobio è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Negli organismi aerobi l'unico accettore di elettroni è rappresentato dall'ossigeno molecolare (O₂) che è ridotto ad acqua durante la respirazione cellulare. Quando questa reazione di riduzione è incompleta, come frutto della normale attività cellulare, essa porta alla formazione delle ROS (Gordeeva *et al.*, 2005). Tra le ROS troviamo l'anione superossido ($\bullet\text{O}_2^-$), l'ossigeno singoletto ($\bullet\text{O}_2$), i perossidi (come il perossido d'idrogeno, H₂O₂) e il radicale ossidrilico ($\bullet\text{OH}$).

Il radicale ossidrilico è la forma più reattiva di tutte le ROS e può formarsi con la reazione definita di Haber-Weiss catalizzata da ioni metallici (Reazione 1).



Reazione 1: Reazione di Haber-Weiss. Produzione di radicale ossidrilico dall'interazione tra l'anione superossido e il perossido d'idrogeno, la reazione è catalizzata dagli ioni metallici

Il radicale ossidrilico può essere inoltre prodotto dall'interazione tra un metallo ridotto e H₂O₂, nella reazione chiamata: Reazione di Fenton (Reazione 2).



Reazione 2: Reazione di Fenton. Produzione di radicale ossidrilico per interazione tra uno ione metallo e il perossido d'idrogeno.

Le ROS sono prodotte, sia negli animali sia nelle piante, da diversi meccanismi tra cui l'azione delle NADPH-ossidasi, le ossidasi mitocondriali e microsomiali (Gamelei *et al.*, 1996; Tarchewskii, 2002). I siti di maggiore produzione delle ROS sono quindi i mitocondri (Boveris e Cadenas, 1982; Chance *et al.*, 1979), i microsomi (Staats *et al.*, 1988), i perossisomi (Dhaunsi *et al.*, 1992) e il citosol (Shaw e Jayatilike, 1990).

Nei metazoi la produzione di ROS a significato microbicida avviene anche sulla superficie dei fagociti e nelle cellule ad attività citotossica, per opera di un'ossidasi di membrana NADPH-dipendente durante il "burst respiratorio".

Le ROS sono una componente importante del sistema immunitario e stimolano alcune vie di trasduzione che portano all'attivazione di MAPK e NF-kB (Morey *et al.*, 2001; Pantano, 2006) agendo sulla trascrizione e mediando varie risposte tra cui la crescita cellulare e l'apoptosi. Le ROS, a causa della propria reattività, possono provocare alterazioni nelle macromolecole biologiche alterandone la funzionalità (Figura 1). Ad esempio possono ossidare proteine contenenti gruppi tiolici e indurre perossidazione lipidica, con effetti nocivi spesso irreversibili (Stohs *et al.*, 2000).

Per limitare gli effetti dannosi delle ROS, riducendo a bassi livelli la quantità di tali molecole, gli organismi hanno evoluto meccanismi di difesa antiossidante (Manduzio *et al.*, 2004). Si possono distinguere due tipi di meccanismi antiossidanti: non-enzimatici, rappresentato ad esempio dal glutatione ridotto (GSH), dalle metallotioneine e dalle fitochelatine, ed enzimatici. Nella componente enzimatica del sistema di difesa dalle ROS troviamo la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione reduttasi (GR), le glutatione perossidasi (GPx) e la glutatione-S-transferasi (GST) (Cadenas, 1989).

La principale funzione della SOD è la rimozione dello ione superossido tramite la conversione ad acqua e ossigeno molecolare. La CAT, invece, ha come substrato H_2O_2 e porta alla formazione di acqua e O_2 . GR è un enzima appartenente alla famiglia delle ossidoriduttasi, la sua funzione è quella di ridurre il GSH ossidato rendendolo nuovamente disponibile per la reazione con le ROS. Le GPx costituiscono una famiglia di enzimi, alcuni dei quali contenenti selenio, capaci di ridurre idroperossidi, sia organici sia inorganici, nei corrispondenti composti idrossilici, utilizzando il GSH o/e altri equivalenti riducenti. L'enzima GST invece catalizza la coniugazione del GSH con i prodotti finali dei processi ossidativi (Giovannini *et al.*, 2006).

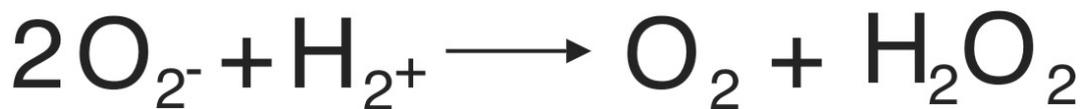
Quando l'equilibrio tra produzione di ROS e la loro rimozione viene a mancare siamo in presenza di stress ossidativo. Lo stress ossidativo viene a instaurarsi

quando, ad esempio, l'organismo è esposto a fattori che aumentano la produzione delle ROS, come l'ingresso di un patogeno nell'organismo, l'esposizione a radiazioni ultraviolette, processi infiammatori e inquinanti come i metalli pesanti (Figura 3).

1.6 Superossidodismutasi (SOD)

L'enzima superossidodismutasi (SOD) è una componente importante del sistema di difesa antiossidante ed è presente in tutti gli organismi aerobi. Questo enzima catalizza la reazione

attraverso la quale il $\bullet\text{O}_2^-$ è rimosso e trasformato in O_2 e H_2O_2 (reazione 3) (Lin *et al.*, 2008).



Reazione 3 Reazione catalizzata dalla SOD.

La SOD è una metallo-proteina e in funzione del metallo in essa contenuto distinguiamo tre tipi di SOD: ferro SOD (Fe-SOD), manganese SOD (Mn-SOD) e rame e zinco SOD (Cu/Zn-SOD) (Brouwer *et al.*, 1993). Fe-SOD è presente nei procarioti e nelle piante (Fridovich, 1995) e mostra una struttura simile alla Mn-SOD localizzata nei mitocondri (Stallings *et al.*, 1984). Sia la Fe-SOD che la Mn-SOD hanno struttura dimerica con i siti di legame per il metallo nella medesima posizione (Barra *et al.*, 1985). Nei procarioti è presente un quarto tipo di SOD contenente nichel. Questa SOD mostra una struttura esamerica contenente il motivo His-Cys-X-X-Pro-Cys-Gly-X-Tyr indispensabile per l'attività catalitica in quanto è responsabile del legame con il metallo (Barondeau *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la Cu/Zn-SOD esistono due forme: una extracellulare (EC-Cu/Zn-SOD), che porta nella regione N-terminale un peptide segnale per la secrezione (Lin *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 1976; Cheng *et al.*, 2006), ed una intracellulare (IC-Cu/Zn-SOD). Nei mammiferi l'IC-Cu/Zn-SOD è stata trovata

nel citoplasma e nei lisosomi mentre l'EC-Cu/Zn-SOD esiste in struttura tetramerica nel plasma, nella linfa, e nei fluidi cerebrospinali (Marklund *et al.*, 1982). Recentemente è aumentata l'attenzione per la IC-Cu/Zn-SOD per le sue multiple funzioni, ad esempio la catalisi delle reazioni di formazioni della nitrotirosina nel topo (Jian-hong *et al.*, 2008).

Le IC-Cu/Zn-SOD, definite anche SOD1, svolgono un importante ruolo sia per la loro funzione fisiologica sia per il potenziale terapeutico come dimostrato nel teleosteo *Chlamys ferrerii* successivamente a inoculo con patogeno (Ni *et al.*, 2007). Inoltre un aumento dell'espressione e dell'attività di questi enzimi può essere indice d'infezione microbica, come riscontrato nei crostacei decapodi, poiché con l'ingresso del patogeno negli emociti viene ad attivarsi la NADPH-ossidasi che libera ROS con funzione anti-microbica: la produzione delle ROS stimola l'espressione della Cu/Zn-SOD che protegge le cellule dal danno ossidativo (Homblad *et al.*, 1999; Campa-Cordòva *et al.*, 2002).

I geni delle Cu/Zn-SOD sono stati clonati in molte specie di vertebrati, tra cui i teleostei come *Acanthopagrus chlegeli*, *Danio rerio*, e invertebrati tra cui il crostaceo decapode *Macrobrachium rosenbergii* in cui è stato dimostrato l'aumento di espressione in seguito a infezione con *Lactococcus garvieae* (Cheng *et al.*, 2006).

1.7 Il glutatione

Il glutatione (GSH) è un tripeptide costituito da glutammato, cisteina e glicina, che si trova in concentrazione millimolare all'interno delle cellule. Esso gioca un importante ruolo nella difesa antiossidante, nella detossificazione da xenobiotici, nella regolazione del ciclo cellulare e dell'espressione genica. Ad esempio, durante il processo infiammatorio e l'esposizione a inquinamento, le ROS reagiscono con i lipidi poli-insaturi delle membrane cellulari formando aldeide α , β -insatura (4HNE). Quest'ultima è continuamente rimossa grazie alla reazione con il GSH, del quale aumenta la biosintesi, com'è stato dimostrato nelle cellule esposte a 4HNE (Griffith *et al.*, 1999; Dickinson e Forman, 2002). Il GSH è

implicato nella difesa antiossidante in diversi modi: è substrato di enzimi antiossidanti, scavenger di ROS, è in grado di riattivare molti enzimi inattivati dallo stress ossidativo e contribuisce alla rigenerazione della vitamina E (Storey, 1996). In particolare il GSH può essere ossidato dalle ROS prodotte in condizione di stress ossidativo indotto dalla presenza di metalli pesanti (Hansen *et al.*, 2007). È stato, infatti, ampiamente dimostrato che l'esposizione a metalli pesanti come Cd e Zn, provocano un aumento del GSH tempo e dose dipendente in numerose specie di pesci (Sayeed *et al.*, 2003; Atli *et al.*, 2008). In particolare il ruolo antiossidante del GSH varia in funzione della sua concentrazione, tasso di turnover e di sintesi (Potter *et al.*, 1993).

La sintesi di GSH è intracellulare e avviene per opera di due enzimi: la γ -glutamylcysteine synthetase, detta anche glutamylcysteine ligase (GCL) (Reazione 4.1) e glutathione synthetase (GS) (Reazione 4.2).



Reazione 4: Biosintesi del glutathione. 1) Glutamylcysteine ligase (GCL, 2) glutathione synthetase (GS).

La sintesi del GSH è regolata tramite un meccanismo di feedback negativo della GCL ed è noto che gli animali che hanno una deficienza patologica in cisteina non sopravvivono al test dello stress ossidativo (Demeke *et al.*, 1983).

Nonostante ciò le cellule sane non necessitano solo del GSH per detossificarsi dalle ROS ma hanno altri meccanismi di detossificazione tra cui le già citate SOD e CAT. Il GSH assume importanza nelle cellule tumorali, nelle quali l'attività di questi enzimi diminuisce e aumentano i danni cellulari. In questi casi è, infatti, possibile agire farmacologicamente sul ciclo del GSH per limitare i danni causati dall'inattivazione delle altre vie antiossidanti (Oberley, 1982). Winterbourn (1993) sostiene che la capacità antiossidante del GSH derivi dalla possibilità di reazione con i radicali carbonilici ($\bullet R$). Secondo questa ipotesi il GSH agirebbe con la SOD per prevenire il danno ossidativo. Il meccanismo di reazione è mostrato in figura 3.

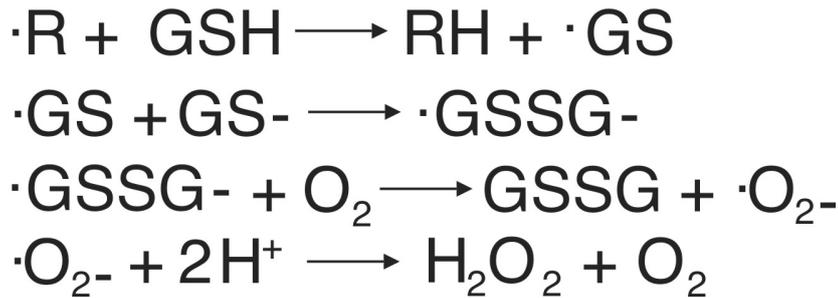
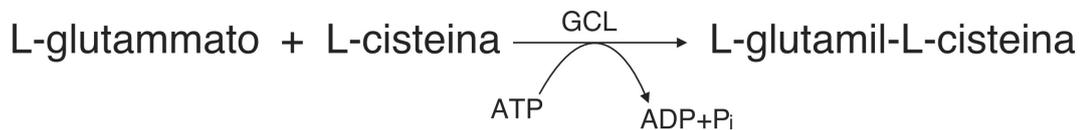


Figura 3: Ipotesi di Winterbourn (1993) sul meccanismo di reazione non-enzimatico.

La GCL è il primo enzima che interviene nella sintesi del GSH, esso catalizza il legame tra la cisteina e il glutammato (Reazione 5). La reazione è ATP-dipendente.



Reazione 5: Reazione catalizzata dal primo enzima nella biosintesi del glutatione.

In particolare GCL è un eterodimero costituito da due subunità; una catalitica, che include il sito di legame, e una subunità modulatoria che agisce sull'affinità per il substrato e inibitore (Griffith *et al.*, 1999; Dickinson e Forman, 2002). La subunità catalitica è stata di recente maggiormente studiata rispetto a quella modulatoria sia nei mammiferi, sia in altri gruppi di vertebrati in cui è stata clonata e sequenziata. Sono meno studiate le sequenze degli invertebrati. È però stato dimostrato che anche in questi ultimi l'esposizione a Cd comporta un aumento nell'espressione dei geni per la sintesi del GSH (Sandrini *et al.*, 2006). Analisi filogenetiche condotte sulle sequenze amminoacidiche di vari organismi, comprese diverse specie di funghi, hanno dimostrato che la subunità catalitica è ampiamente conservata durante l'evoluzione (Sandrini *et al.*, 2006).

L'enzima GS catalizza l'addizione della glicina al dipeptide, anche questa reazione richiede l'energia fornita dalla rottura del legame con il fosfato dell'ATP (Reazione 6).



Reazione 6: Seconda reazione della biosintesi del glutatione.

Le GS batteriche ed eucariotiche formano due diverse famiglie che non mostrano somiglianze nelle sequenze amminoacidiche. Studi strutturali e funzionali sulle GS di *Escherichia coli* mostrano che l'enzima è un omotetramero le cui subunità monomeriche sono costituite da circa 300 amminoacidi (Tanaka *et al.*, 1992; Hara *et al.*, 1996), a differenza di quanto è stato trovato nei mammiferi, nei lieviti e nelle piante ove l'enzima è attivo come omodimero, con monomeri di circa 470 amminoacidi (Gogos e Shapiro, 2002).

1.8 L'enzima glutatione perossidasi (GPx)

L'enzima glutatione perossidasi catalizza la rimozione dei perossidi che si formano nel corso del metabolismo negli organismi aerobi. La reazione catalizzata da questo enzima porta all'ossidazione di GSH (Reazione 7) in GSH ossidato (GSSG).



Reazione 7: Reazione catalizzata dall'enzima glutatione perossidasi.

Sono state descritte un totale di otto isoforme di GPx nei mammiferi, classificate in funzione di struttura primaria, specificità dell'accessibilità al substrato e localizzazione tissutale (Arthur, 2000; Tosatto *et al.*, 2008). La maggior parte delle GPx contengono un residuo di selenocisteina, cioè un atomo di selenio covalentemente legato a una cisteina. Questa selenocisteina è codificata dal codone AUG normalmente riconosciuto come segnale di stop in assenza di un particolare fattore di traduzione (Sec-tRNA). Il selenio è essenziale per l'attività catalitica dell'enzima. La sostituzione del selenio con un disolfuro ha come risultato una diminuzione dell'attività perossidativa verso H₂O₂ e gli idroperossidi lipidici (Bell

et al., 1993). La deficienza di questa proteina o di selenio ha come risultato una disfunzione biologica associata a un danno a proteine e membrane (Gambe *et al.*, 1996). Il selenio, come il rame nella Cu/Zn-SOD, partecipa attivamente alla reazione di riduzione del perossido agendo come donatore di elettroni al substrato. L'enzima utilizza il GSH ridotto come donatore di elettroni per rigenerare il sito attivo costituito dalla selenocisteina.

Questi isoenzimi sono generalmente omotetramerici e conservano le proprietà strutturali e biochimiche. Tuttavia, gli enzimi che sono stati classificati nella famiglia GPx-4 (fosfolipide idroperossidi GPx, PHGPx) possono funzionare in forma monomericamente e mostrare reattività esclusivamente contro i perossidi lipidici.

2. Materiali e Metodi

2.1 Terreni

| | Triptone | Estratto di lievito | Agar | Glucosio | NaCl | KCl | Mg SO ₄ | pH |
|-----------------|----------|---------------------|-------|----------|-------|--------|--------------------|-----|
| LB Broth | 1% | 0,50% | - | - | 10 mM | - | - | 7,0 |
| LB Agar | 1% | 0,50% | 1,50% | - | 10 mM | - | - | 7,0 |
| SOC | - | 0,50% | - | 20 mM | 10 mM | 2,5 mM | 20 mM | 7,0 |

2.2 Primer per PCR

Tutti i *primer* utilizzati in questo studio sono elencati in Tabella 2:

| Primer 3' e 5' RACE | | | |
|------------------------------|----------------|--------------------|--|
| Descrizione | Sigla | T melt in g | Sequenza 5'-3' |
| Primer RT kit invitrogen | Anchor-oligodT | | GTTTTCCCACGACTTTTTTTT TTTTTTTTTTTT |
| Primer 5'RACE kit invitrogen | AAP | | GGCCACGCGTCGACTAGTAC GGGIIGGGIIGGGIIG |
| Primer 3'RACE kit invitrogen | Anchor-oligodT | | GTTTTCCCACGAC |
| MT degenerato FW | MTH | 59-63 | ATGGAYCCYTGAAATTGYGCTGA |
| MT Ciona RE 5' RACE | MCR | 56 | TTGGGCAGCAAGCCTTAG |
| MT Ascidiella RE 5'RACE | MAR | 65 | TTGCAGCACGGCCGGTTGC |
| MT Molgula RE 5'RACE | MMR | 61 | ACTGCAGCAGGAGCAACAGC |
| M13 FW (-21) | M13F | 55 | TTGTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 RE (-29) | M13R | 50 | CAGGAAACAGCTATGACC |
| Primer per sonde ISH | | | |
| Descrizione | Sigla | T melt in g | Sequenza 5'-3' |
| AC Ciona FW | AUF | 56 | CGAAGCCCAGAGCAAGAG |
| AC Ciona RE | AUR | 55 | GGATGGGCCAGACTCG |
| PC sintetasi Ciona FW | PCF2 | 58 | GGAAAGGTGTTTGCCGTTGG |
| PC sintetasi Ciona RE | PCR2 | 53 | CTATTGGTTAGTGCCTCCC |

| PCNA Ciona FW | PCCF1 | 59 | CCGATGCGACCGAAACCTC |
|----------------------------|--------------|---------------------------|----------------------------|
| PCNA Ciona RE | PCCR | 57 | TGAGAGACATACGGCACCAG |
| MT Ciona FW | MCF | 55 | GCAACCAGTCAAAGAAAACCG |
| MT Ciona RE | MCR2 | 52 | CGCGGCAATGTATAAAGC |
| GCLC Ciona FW | GammaF | 59 | TTGGGGCGATGAGGTGGA |
| GCLC Ciona RE | GammaR1 | 60 | TCCCCATTCCGAAGCCCATG |
| GS Ciona FW | GSF | 60 | GCTGCAGAAATCTCCTGGTGAACCT |
| GS Ciona RE | GSR | 60 | TGCCTCGCAGTCGTTTGACGG |
| SOD Ciona FW | SOF | 60 | CAGTGGCAGGATCTAAATACGCCC |
| SOD Ciona RE | SOR | 61 | GGGCAAAC TGGGGGGTGAAC |
| GPX7 Ciona FW | GPF | 61 | GGGAGGTTCTGCGGGT'TTTGG |
| GPX7 Ciona RE | GPR | 60 | GATTACACGGGAAAGCAAGGACTGTG |
| Primer per sqRT-PCR | | | |
| Descrizione | Sigla | T meltin g | Sequenza 5'-3' |
| AC Ciona FW | AUF2 | 55 | GAGGTTATTCCTTACCACCAC |
| AC Ciona RE | AUR | 55 | GGATGGGCCAGACTCG |
| MT Ciona FW | MCF | 55 | GCAACCAGTCAAAGAAAACCG |
| MT Ciona RE | MCR2 | 52 | CGCGGCAATGTATAAAGC |
| PC sintetasi Ciona FW | PCF1 | 53 | GGGACCACAGATAAGAACAC |
| PC sintetasi Ciona RE | PCR1 | 56 | ACCGCCTATGGGAGAAAAGT |
| PCNA Ciona FW | PCCF2 | 58 | GGATGACACCGCTGATCTGC |
| PCNA Ciona RE | PCCR | 57 | TGAGAGACATACGGCACCAG |
| GCLC Ciona FW | GammaF | 59 | TTGGGGCGATGAGGTGGA |
| GCLC Ciona RE | GammaR2 | 60 | CGGAAATCTAGGGTGGCTGGTGATA |
| GS Ciona FW | GSF | 60 | GCTGCAGAAATCTCCTGGTGAACCT |
| GS Ciona RE | GSR | 60 | TGCCTCGCAGTCGTTTGACGG |
| SOD Ciona FW | SOF | 60 | CAGTGGCAGGATCTAAATACGCCC |
| SOD Ciona RE | SOR | 61 | GGGCAAAC TGGGGGGTGAAC |
| GPX7 Ciona FW | GPF | 61 | GGGAGGTTCTGCGGGT'TTTGG |
| GPX7 Ciona RE | GPR | 60 | GATTACACGGGAAAGCAAGGACTGTG |

Tabella 2: PCR primer.

2.3 Organismi utilizzati

Ciona intestinalis, *Molgula manhattensis*, *Ascidella aspersa* e *Styela plicata* (Figura 4 a-c,e) sono tunicati solitari sessili con corpo cilindrico, più o meno tozzo, costituito da una tunica spessa di consistenza gelatinosa o coriacea. Il sifone orale, dal quale l'animale aspira l'acqua, è più lungo e terminale mentre quello cloacale, dal quale l'acqua viene espulsa, è più breve e laterale. Il cestello branchiale è molto sviluppato ed occupa gran parte del corpo dell'ascidia.

Botryllus schlosseri (Figura 4 d) è un organismo bentonico ed incrostante che forma colonie costituite da sistemi di zoidi immersi in una tunica comune (Zaniolo, 1981; Zaniolo e Trentin, 1987) amorfa percorsa da una fitta rete di vasi sanguigni che interconnettono i blastozoidi e che si immette alla periferia in un vaso marginale; da quest'ultimo si diramano delle strutture a fondo cieco denominate ampolle. Le ampolle marginali, grazie alla loro elevata capacità contrattile, permettono l'adesione della colonia al substrato (Sabbadin *et al.*, 1992).

Tutte le ascidie sono organismi filtratori: l'acqua entra dal sifone orale e attraversa la faringe, da qui viene filtrata dal cestello branchiale che presenta, in posizione ventrale, la doccia endostilare deputata alla produzione di muco. Grazie al movimento creato dal battito ciliare, l'acqua fluisce verso le camere atriali e successivamente all'esterno; il muco con annesso il particellato alimentare catturato, viene appallottolato dalla lamina dorsale e convogliato verso il tratto digestivo, composto da esofago, stomaco ed intestino. I prodotti di rifiuto vengono infine eliminati dall'ano che sbocca in prossimità del sifone esalante.

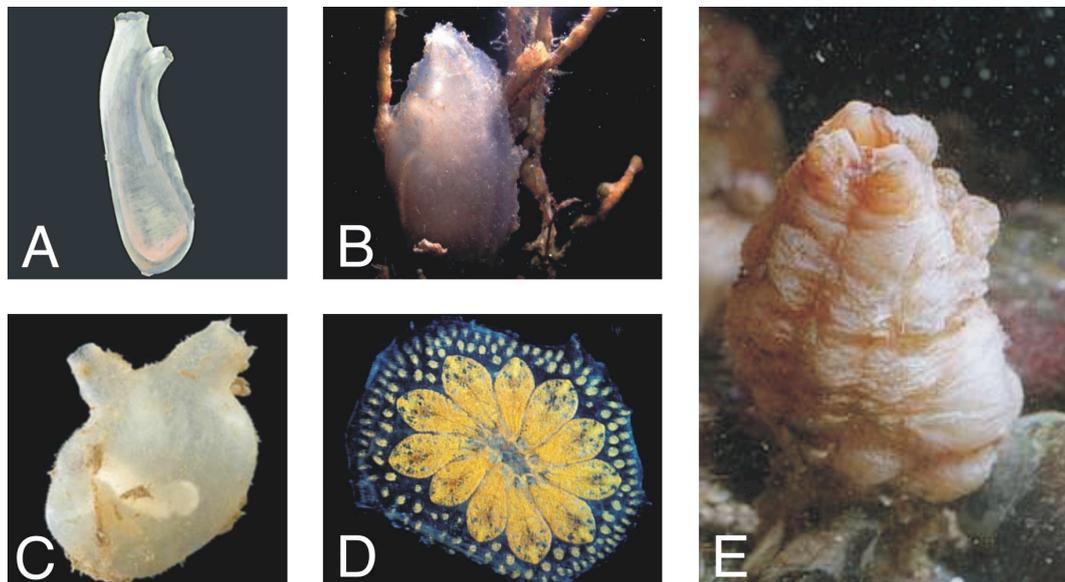


Fig. 4: tunicati utilizzati nello studio. A: *Ciona intestinalis*; B: *Ascidiella aspersa*; C: *Molgula manhattensis*; D: *Botryllus schlosseri*; E: *Styela plicata*.

2.4 Trattamenti con metalli

Tutti gli esemplari di *Ciona intestinalis* sono stati raccolti nella laguna di Venezia. Dopo i campionamenti sono stati mantenuti in acqua di mare filtrata (FSW), aerata ad una temperatura costante di 19°C, e alimentati giornalmente con Liquifry marine (Liquifry Co., Dorking, UK). Dopo 5 giorni di stabulazione in FSW, gli animali sono stati divisi in 4 vasche contenenti ciascuna 10 µM CdCl₂, 10 µM ZnCl₂, 10 µM CuCl₂ in FSW e FSW senza metalli, quest'ultima utilizzata come controllo. La concentrazione dei singoli metalli è la massima utilizzabile che non provoca la morte degli esemplari. I campioni sono stati prelevati dopo 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h.

Ad ogni intervallo di tempo è stato prelevato l'intestino per l'estrazione dell'RNA totale da 3 organismi per ogni vasca (trattamenti e controlli).

Organismi esposti a 10 µM CdCl₂ sono stati utilizzati per saggi di ibridazione *in situ* eseguiti su sezioni di stomaco, sifone orale, intestino ed ovario.

2.5 Retrotrascrizione dell'RNA ed amplificazione del DNA mediante PCR

2.5.1 Progettazione di primer degenerati ed analisi di sequenze

Al fine di individuare geni di metallotioneine in ascidie, non essendo disponibili dati certi in GenBank, si è cercato di individuare una regione conservata nelle sequenze di MT di diversi Cordati (Tabella 3). Sono state quindi allineate sequenze aminoacidiche e nucleotidiche per MT registrate in GenBank (Tabella) usando il programma ClustalX (Jeanmougin et al., '98). Gli allineamenti sono stati poi implementati manualmente utilizzando il programma Se-Al v2.0a11 Carbon (Rambaut). Sulle regioni conservate così individuate, sono stati disegnati primer degenerati (Tabella) che sono stati analizzati mediante il programma IDT Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Per gli altri geni presi in considerazione in questo studio, fitochelatina sintetasi (*PCS*), proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*), glutammato cistein ligasi subunità catalitica (*GCLC*), glutatione sintetasi (*GS*), Cu/Zn superossido dismutasi (*SOD*),

glutazione perossidasi 7 (*GPX7*) sono disponibili in GenBank sia le sequenze nucleotidiche che aminoacidiche.

Al fine di identificare gli scaffolds genomici in cui sono presenti i geni considerati, le diverse sequenze di cDNA sono state analizzate mediante BLAST nel database del genoma di *C. intestinalis* JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html>; Dehal et al., 2002). Le regioni promotrici a monte dei diversi geni individuati sono state analizzate con il programma Primer Premier 5.00 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) al fine di individuare putative sequenze regolatrici.

| Taxon | Binomio | Sequenza aminoacidica (numero di accesso GeneBank) | Sequenza nucleotidica (numero di accesso GeneBank) |
|--------------|----------------------------------|---|---|
| Mammifero | <i>Balaena mysticetus</i> | AAB72006 | AF022117 |
| Mammifero | <i>Rattus norvegicus</i> | NP_620181 | NM_138826 |
| Mammifero | <i>Sus scrofa</i> | NP_001001266 | NM_001001266 |
| Mammifero | <i>Homo sapiens</i> | NP_005942 | NM_005951 |
| Mammifero | <i>Bos taurus</i> | NP_001071602 | NM_001078134 |
| Mammifero | <i>Callithrix jacchus</i> | ABY90110 | DP000582 |
| Uccello | <i>Gallus gallus</i> | NP_990606 | NM_205275 |
| Uccello | <i>Cairina moschata</i> | AAC60047 | U34230 |
| Uccello | <i>Anas platyrhynchos</i> | AAC60048 | U34231 |
| Rettile | <i>Podarcis siculus</i> | Q708T3 | AJ609541 |
| Anfibio | <i>Ambystoma mexicanum</i> | AAB71835 | AF008583 |
| Anfibio | <i>Xenopus laevis</i> | NP_001081042 | NM_001087573 |
| Teleosteo | <i>Oreochromis mossambicus</i> | AAP14678 | AY257202 |
| Teleosteo | <i>Carassius auratus</i> | CAA65926 | X97271 |
| Teleosteo | <i>Danio rerio</i> | NP_571150 | NM_131075 |
| Teleosteo | <i>Oryzias javanicus</i> | AAW83513 | AY906860 |
| Teleosteo | <i>Salmo salar</i> | NP_001134810 | NM_001141338 |
| Teleosteo | <i>Rhabdosargus sarba</i> | ABZ03959 | EU275749 |
| Teleosteo | <i>Gambusia affinis</i> | BAG69190 | AB455145 |
| Teleosteo | <i>Gadus morhua</i> | CAA65924 | X97269 |
| Teleosteo | <i>Perca fluviatilis</i> | CAA65927 | X97272 |
| Teleosteo | <i>Gobiomorphus cotidianus</i> | AAO89258 | AY239389 |
| Teleosteo | <i>Pagrus major</i> | BAA92364 | AB039668 |
| Teleosteo | <i>Ictalurus punctatus</i> | AAC36348 | AF087935 |
| Teleosteo | <i>Pagothenia borchgrevinki</i> | CAA07557 | AJ007562 |
| Teleosteo | <i>Gymnodraco acuticeps</i> | CAA07555 | AJ007560 |
| Teleosteo | <i>Parachaenichthys charcoti</i> | CAA07785 | AJ007950 |
| Teleosteo | <i>Trematomus bernacchii</i> | CAA09715 | AJ011585 |
| Tunicato | <i>Herdmania curvata</i> | nn | AY314949 |

Tabella 3: specie utilizzate per le analisi di confronto con le metallotioneine da ascidie

2.5.2 Estrazione RNA

L'RNA totale è stato estratto da porzioni d'intestino congelato (-80° C) di tre organismi per ogni campione. Utilizzando l'SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). La quantità di RNA è stata stabilita tramite lettura spettrofotometrica a 260 nm (A_{260}), mentre la qualità tramite il rapporto tra assorbanza a 260 nm e assorbanza a 280 nm.

2.5.3 Sintesi del cDNA

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato come stampo 1 µg di RNA totale, a cui sono stati aggiunti 1 µl di *Anchor Oligo* (dT) (500 ng/ml, Invitrogen) e acqua *Rnase free* fino ad ottenere un volume finale di 5 µl. La miscela di reazione è stata posta a 70°C per 5 min e incubata in ghiaccio per almeno 5 min. Quindi, ad ogni campione, sono stati aggiunti 4 µl di *Improm II 5x Reaction Buffer* (Promega), 2,4 µl di $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl di dNTP mix (10 mM), 6,1 µl di acqua *nuclease free* e 0,5 µl di *RNasin Ribonuclease Inhibitor* (20 U/µl). Per ultimo è stato aggiunto 1 µl dell'enzima *Improm II RT* (Promega) per un volume finale di 20 µl. La sintesi è stata effettuata in un termociclatore con il seguente profilo termico:

25°C per 5 min

42°C per 1 h

70°C per 15 min

2.5.4 Amplificazione del cDNA

L'amplificazione del cDNA mediante PCR è stata effettuata usando i primer progettati *ad hoc* elencati in Tabella 2.

La miscela di reazione contiene, oltre al primo filamento di cDNA (1 µl):

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Buffer di reazione 10X | 5 µl |
| MgCl ₂ (50mM) | 2 µl |
| dNTP mix (10mM) | 1 µl |
| Primer forward (10 µM) | 1 µl |
| Primer reverse (10 µM) | 1 µl |
| Xtra-Taq (5U/µl) | 0,4 µl |
| H ₂ O nucleasi free | 38, 6 µl |
| | <hr/> 50 µl |

Essa è stata incubata in un termociclatore col seguente programma :

| | | |
|--|---|----------|
| 94°C per 2 min | } | 35 cicli |
| 94°C per 30 s | | |
| T° di <i>melting</i> ottimale per 30 s | | |
| 72°C per 60s per ogni Kb | | |
| 72 °C per 10 min | | |

2.5.5 Clonaggio del DNA amplificato

I prodotti di PCR sono stati separati elettroforeticamente in gel d'agarosio e le bande corrispondenti al cDNA amplificato sono state estratte utilizzando il kit NucleoSpin®Extract II (Macherey-Nagel), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Il DNA purificato è stato quantificato e utilizzato nella reazione di ligazione col vettore pGEM-T Easy Vector (Promega) da utilizzare per il clonaggio in *E. coli*.

Questo vettore contiene il gene *amp^r* che conferisce la resistenza all'ampicillina. In questo modo, usando per la trasformazione batteri sensibili a tale antibiotico, è possibile selezionare quelli contenenti il plasmide, in quanto saranno gli unici a crescere su terreno selettivo contenente ampicillina.

La reazione di ligazione è stata effettuata a 4°C *overnight* utilizzando i seguenti reagenti: 1µl di tampone di ligazione, 5µl vettore pGEM®-T Easy (50ng/µl), 1µl T4 DNA ligasi (3U/µl) (Promega), 1µl DNA estratto dalla banda, in quantità sufficiente ad effettuare un rapporto di almeno 3:1 tra il cDNA e il vettore, H₂O sterile deionizzata per un volume finale di 10 µl.

| | |
|------|--|
| X µl | H ₂ O sterile, |
| 5 µl | <i>Rapid Ligation Buffer 2X</i> |
| 1 µl | Vettore “pGEM®-T <i>Easy Vector</i> ” (50ng/µl), |
| 1 µl | T4 DNA <i>Ligase</i> (3U/µl). |
| X µl | Prodotto di PCR |

2.5.6 Preparazione dei batteri competenti alla trasformazione

Batteri *E. coli* XL1-BLUE sono stati resi competenti utilizzando una metodica che prevede l'uso di CaCl₂ (Tang *et al.*, 1994). Per verificare che i batteri siano effettivamente competenti, e quindi utilizzabili per la trasformazione, è stato eseguito un test di competenza che segue la normale procedura di trasformazione batterica, utilizzando come controllo il plasmide richiuso pUC18. I batteri sono conservati in aliquote da 25 µl di volume in glicerolo 50% a -80°C.

2.5.7 Trasformazione dei batteri competenti

Ad ogni aliquota di batteri (25 µl) è stato aggiunto il prodotto di ligazione e, dopo un'incubazione in ghiaccio di 30 min, è stato eseguito uno *shock* termico, ponendo il campione prima a 42°C per 30 s, poi in ghiaccio per 1 min. Quindi sono stati aggiunti 273 µl di terreno SOC e posti per 1 h a 37°C in agitazione in modo da permetterne la crescita. Successivamente, aliquote da 50 e 100 µl di batteri trasformati sono state piastrate su terreno solido selettivo contenente LB, ampicillina (concentrazione finale 0,1 mg/ml), X-Gal (2%) e IPTG (0,1 M) 0,4%; infine, le piastre vengono posizionate in stufa *overnight* a 37°C al fine di permettere la crescita e la formazione delle colonie.

2.5.8 Screening delle colonie trasformate

Sulle colonie cresciute sono stati eseguiti due tipi di *screening* che consentono di individuare le colonie positive alla trasformazione e quindi contenenti l'inserito.

Screening visivo: sfrutta il meccanismo dell' α -complementazione. Poiché tale test non risulta molto attendibile, le colonie bianche e anche alcune azzurre sono state sottoposte al secondo *screening*.

Screening mediante PCR: utilizzando i *primer* M13F e M13R (Tabella 3.4), che si appaiono alle regioni del vettore fiancheggianti il sito di policlonaggio, dopo elettroforesi del prodotto di PCR è stato possibile distinguere e selezionare le colonie che contenevano l'inserto, in quanto l'amplificato risultava avere dimensioni maggiori rispetto a quelle che non lo contengono.

2.5.9 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 *primer* M13F e M13R (Tabella 3.4), costruiti sulle sequenze delle regioni fiancheggianti il sito di policlonaggio del vettore pGEM. Il metodo utilizzato per il sequenziamento è il metodo Sanger.

2.6 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

La RACE è una procedura utilizzata per l'amplificazione di sequenze di acidi nucleici, a partire da un template di mRNA, comprese tra un determinato sito interno alla sequenza e una sequenza non conosciuta ad una delle due estremità dell'mRNA.

2.6.1 3' RACE

Questa metodica sfrutta la presenza della coda di poly(A), naturalmente presente all'estremità 3' dell'mRNA, come generico sito di attacco per un *primer Anchor Oligo(dT)* (Tabella 3.4) nella reazione di retrotrascrizione del cDNA. Per determinare la regione non tradotta al 3' terminale è stata effettuata una normale amplificazione dove sono stati usati come *primer reverse*, l'*Anchor primer*, e come *primer forward*, un oligonucleotide specifico, costruito all'interno della porzione di sequenza codificante nota (Tabella 3.4).

La reazione è stata incubata con il seguente profilo termico:

| | | |
|-----------------------|---|----------|
| 94°C per 2 min | } | |
| 94°C per 30 s | | |
| T°C ottimale per 30 s | | 35 cicli |
| 72°C per 90 s | | |
| 72°C per 5 min | | |

2.6.2 5' RACE

Questa procedura, il cui protocollo è fornito dal kit commerciale dell'Invitrogen, permette la sintesi e l'amplificazione della regione 5' terminale del cDNA mediante PCR.

- *Sintesi del primo filamento di cDNA e purificazione*

La sintesi del primo filamento di cDNA è stata effettuata utilizzando primer specifici per le sequenze di interesse (Tabella 3.4). La reazione è catalizzata da una trascrittasi inversa fornita dal kit (SuperScript™ II RT) in presenza del suo buffer (Promega)

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. 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 primer rimasti in soluzione sono stati rimossi dopo centrifugazione.

- *TdT tailing*

La procedura di TdT *tailing* permette di creare un sito di attacco per un *anchor primer* che sarà utilizzato nella successiva reazione di amplificazione. Attraverso l'utilizzo della TdT (*Terminal deoxynucleotidil Transferase*) ed in presenza di dCTP viene sintetizzata una coda omopolimerica di poly (C) all'estremità 3' del primo filamento di cDNA purificato.

• *Amplificazione del cDNA dC-tailed*

Il cDNA polyC è stato successivamente amplificato tramite una reazione di PCR usando i diversi *primer reverse* progettati in precedenza (Tabella 3.4). Come *primer forward* è stato utilizzato l'AAP (*Abridged Anchor Primer*) (Tabella 3.4.) che possiede una sequenza di ancoraggio al 3' complementare alla coda di polyC del cDNA. Questo primer viene fornito dal kit commerciale utilizzato. Le componenti della reazione sono:

- H₂O sterile
- 10x PCR buffer
- MgCl₂ 25mM
- dNTP mix 10mM
- Primer RE 10μM
- AAP 10μM
- cDNA dC-tailed
- Taq DNA polimerasi 5U/μl

Il programma di PCR impiegato è stato il seguente:

| | | |
|----------------|---|----------|
| 94°C per 2 min | } | 35 cicli |
| 94°C per 30 s | | |
| 55°C per 30 s | | |
| 72°C per 1 min | | |
| 72°C per 5 min | | |

Per controllare l'avvenuta amplificazione i campioni sono stati separati mediante elettroforesi in gel d'agarosio.

2.7 Studio di espressione

2.7.1 RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR)

La sqRT-PCR è una tecnica di analisi di espressione del messaggero, basata sull'analisi dell'intensità di bande risolte in elettroforesi, ottenute in seguito a reazione di PCR in condizioni controllate. Per mettere a punto questa tecnica è infatti necessario verificare l'andamento di espressione durante i cicli di PCR per ogni gene preso in considerazione. Una volta individuato il numero idoneo di cicli, ovvero il momento in cui l'amplicone che si va ad analizzare si trova nella fase esponenziale della propria reazione di amplificazione si procede con la co-amplificazione del trascritto di interesse e del gene housekeeping (β -actina) in reazione multiplex, ovvero con l'utilizzo contemporaneo di 4 primer nella stessa mix di PCR. La caratteristica del gene housekeeping è quella di non variare in espressione nei saggi considerati e, per questo motivo, viene utilizzato per normalizzare l'espressione del gene di interesse.

I componenti della reazione sono:

| | |
|---------------------------------------|--|
| Buffer 10X (15 mM MgCl ₂) | 3 μ l |
| primer | 0,25 μ M x 4 |
| dNTPs mix 10 mM | 1,5 μ l |
| cDNA | 100 ng |
| Xtra Taq | 2 U |
| H ₂ O nucleasi free | X |
| | <hr style="border: 1px solid black;"/> |
| | 25 μ l |

In Tabella 4 sono riportati i primer utilizzati per la sqRT-PCR, la dimensione del prodotto di amplificazione ed il numero di cicli ottimale.

I grafici presentati nei risultati sono il risultato della quantificazione dell'intensità delle bande in gel di agarosio all'1,5% contenente Etidio bromuro. Tale intensità è stata determinata con il programma ImageJ ver. 10.2 (Bethesda, MD). Il valore di intensità relativo al gene di interesse è stato normalizzato rispetto al corrispettivo valore per la β -actina (β -AC). Il dato così ottenuto viene normalizzato sul dato

ottenuto dai campioni di controllo. Il risultato di tre esperimenti indipendenti è espresso come multiplo dei valori di controllo \pm deviazione standard. I dati sono stati controllati per la distribuzione normale (Shapiro-Wilk's test) e l'omogeneità della varianza (Bartlett's test). I risultati sono stati confrontati usando il test ANOVA ad una via, seguito dal test *post hoc* (Duncan's test). I software utilizzati per l'analisi statistica sono STATISTICA 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) e SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

| Primer per sqRT-PCR | | | | |
|-----------------------|--------|-----------|------------------------|----------------|
| Descrizione | Sigla | T melting | Dimensione amplificato | Cicli ottimali |
| β -AC Ciona FW | AUF2 | 55 | 500 pb | 30 |
| β -AC Ciona RE | AUR | 55 | | |
| MT Ciona FW | MCF | 55 | 214 pb | 30 |
| MT Ciona RE | MCR2 | 52 | | |
| PC sintetasi Ciona FW | PCF1 | 53 | 380 pb | 30 |
| PC sintetasi Ciona RE | PCR1 | 56 | | |
| PCNA Ciona FW | PCCF2 | 58 | 400 pb | 30 |
| PCNA Ciona RE | PCCR | 57 | | |
| GCLC Ciona FW | GammaF | 59 | 427 pb | 30 |
| GCLC Ciona RE | GammaR | 60 | | |
| GS Ciona FW | GSF | 60 | 600 pb | 30 |
| GS Ciona RE | GSR | 60 | | |
| SOD Ciona FW | SOF | 60 | 457 pb | 30 |
| SOD Ciona RE | SOR | 61 | | |
| GPX7 Ciona FW | GPF | 61 | 267 pb | 30 |
| GPX7 Ciona RE | GPR | 60 | | |

Tabella 4: tabella riassuntiva dei primer utilizzati e delle condizioni di amplificazione per l'analisi semi-quantitativa dell'mRNA

2.7.2 Ibridazione *in situ*

L'ibridazione *in situ* è una tecnica che permette la localizzazione di uno specifico mRNA all'interno della cellula, allo scopo di identificare i siti nei quali è attiva la trascrizione del gene di interesse.

A tale scopo viene sintetizzata *in vitro* una sequenza di RNA complementare all'mRNA che si desidera localizzare. La sequenza così ottenuta, per poter essere utilizzata come sonda, deve poter essere marcata e quindi facilmente individuata.

A tal fine, per la sintesi *in vitro*, si impiegano molecole di uracile modificate a cui è legata una molecola di biotina (Biotin RNA labelin dNTPs mix, Roche). La biotina viene poi riconosciuta dal complesso streptavidina-perossidasi ed evidenziata utilizzando Diaminobenzidina (DAB) che, agendo come substrato della perossidasi, forma un precipitato di colore marrone.

Il template per la sonda ad RNA antisenso è stato generato attraverso amplificazione mediante PCR (Tabella). I frammenti sono stati poi clonati nel vettore pGEM-T Easy come precedentemente descritto.

Per produrre la sonda antisenso sono stati amplificati, attraverso PCR (utilizzando il primer M13 forward e il primer reverse specifico per il cDNA), l'inserto di interesse più il promotore della T7 RNA polimerasi. La banda ottenuta è stata purificata dal gel di agarosio e usata come template per la sintesi della sonda come da protocollo della T7 RNA polymerase (Promega).

I componenti della reazione sono:

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| Transcription optimized 5X Buffer | 4 µl |
| DTT 100 mM | 2 µl |
| RNase inhibitor | 20 unità |
| Biotin RNA labelin dNTPs mix | 2 µl |
| DNA template | 1 µl |
| T7 RNA polimerasi | 20 unità |
| H ₂ O nucleasi free | X |
| | <hr/> 20 µl |

La mix di reazione è stata incubata per 3 h a 37°C.

Per l'ibridazione *in situ* sono stati usati intestino, stomaco, sifone orale ed emociti di *C. intestinalis*. Gli emociti, prelevati dal cuore, sono stati lasciati aderire per 30 min su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Glaser) e fissati come verrà descritto in seguito.

I tessuti sono stati fissati *overnight* in tampone MOPS (0,1 M MOPS, 1 mM MgSO₄, 2mM EGTA, 0,5 M NaCl) e 4% paraformaldeide, disidratati in etanolo ed inclusi in Paraplast Plus (Sigma, St. Louis, MO). Le sezioni seriali (12 µm di

spessore), ottenute con un microtomo Jung, sono state lasciate aderire su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germania), lavate per 15 min con xilolo, reidratate e usate immediatamente. Per l'ISH le sezioni sono state incubate per 6 min in Proteinasi K 10 µg/ml (Promega) in PBS (1,37 M NaCl, 0,03M KCl, 0,015 M KH₂PO₄, pH 7,2); l'attività enzimatica è stata poi inibita con una soluzione di glicina allo 0,2% in PBS e i vetrini lavati in PBS. I campioni sono stati incubati con *Hybridization Cocktail 50% Formamide* (Amresco, Solon, OH) per 1 h a 65°C e i tessuti sono stati poi incubati nella stessa soluzione contenente 1-2 µg/ml di sonda.

Le sezioni sono state lavate due volte in SSC pH 4,5 (0,3 M NaCl, 40 mM citrato trisodico), tre volte in soluzione 50% formamide/SSC pH 4,5 per 30 min a 65°C e due volte in soluzione di Tween-20 0,1% in PBS (PBS-T). Successivamente, i vetrini sono stati incubati in una soluzione al 5% di H₂O₂ in metanolo per 30 min, al fine di inattivare la perossidasi endogena, lavati con PBS-T, trattati con Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) per 30 min a temperatura ambiente, lavati con PBS-T e colorati con 0,025% DAB in PBS per 3 min. Come controcolorazione, al fine di rendere più visibili i tessuti, è stata utilizzata la colorazione con ematossilina che prevede il trattamento dei vetrini per 1 min con il colorante ematossilina, un passaggio di 15 min in acqua di fonte e 2 lavaggi con acqua mQ. Infine, le sezioni sono state disidratate e montate in Eukitt (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) mentre gli emociti sono stati direttamente montati in Acquovitrex (Carlo Erba, Milano, Italia).

I controlli sono stati trattati in maniera analoga ed incubati con sonda senso per il gene di interesse.

2.8 Allineamenti multipli e analisi di sequenza

Gli allineamenti multipli utilizzati per inferire le relazioni filogenetiche sono stati effettuati impiegando il programma Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Tutti gli allineamenti sono stati controllati ed eventualmente modificati manualmente.

Le analisi sulle sequenze sono stati condotti utilizzando i software gratuiti disponibili agli indirizzi internet:

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>: analisi BLAST
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>: individuazione di *open reading frame* (ORF)
- <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>: traduzione delle sei ORF possibili
- http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html: creazione di sequenze complementari-invertite
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>: allineamenti con clustal
- http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html: allineamenti tra due sequenze
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>: comparazione sequenze cDNA/genomiche

2.9 Alberi filogenetici

Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando il programma Mega 5 (Kumar *et al.*, 2004). Per ottenere il maggior numero di informazioni, sono stati utilizzati quattro diversi metodi per la costruzione degli alberi: UPGMA (Sneath e Sokal, 1973), Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), Minimum Evolution (Rzhetsky e Nei, 1992) e Maximum Parsimony (Fitch, 1971). Questi differiscono tra loro per algoritmi e parametri considerati.

2.10 Saggio TUNEL e conta emocitaria

Al fine di individuare DNA frammentato all'interno di sezioni istologiche sono stati utilizzati frammenti di tunica da organismi trattati con CdCl₂ 10 µM e non trattati. Le sezioni seriali sono state ottenute come descritto in precedenza per la tecnica dell'ibridazione *in situ*. Brevemente, le sezioni sono state reidratate in passaggi seriali di etanolo a gradazioni decrescenti, lavate in PBS, permeabilizzate con una soluzione di TritonX all'1% in PBS ed è stato effettuato il blocco della perossidasi endogena con una soluzione di H₂O₂ al 5% in metanolo. A questo punto i vetrini sono stati incubati con una soluzione *terminal dUTP nick-end labelling* (TUNEL) (in situ cell death detection kit, Roche) per 60 min a 37°C. Successivamente i preparati sono stati incubati con un anticorpo anti-FITC coniugato a perossidasi (Converter-POD da kit Roche) per 30 min a 37°C e

colorati con DAB 0,63 mM in PBS contenente 4% H₂O₂, disidratati e montati in Eukitt.

Per la conta delle cellule sono stati considerati 10 campi ottici a 1250x. La percentuale ottenuta si riferisce al numero di cellule positive al saggio sul numero totale di cellule.

3. Risultati MT, PCS, PCNA

3.1 Metallotioneine

L'indagine per l'individuazione di un trascritto per MT è stata condotta su 5 ascidie della laguna di Venezia: *C. intestinalis*, *M. manahattensis*, *A. aspersa*, *S. plicata* e *B. schlosseri*. Per i primi 4 organismi il cDNA è stato ottenuto tramite retrotrascrizione da RNA estratto da intestino, per *B. schlosseri* da colonia intera.

I primer utilizzati sono stati MTH come forward e Anchor come reverse (Tabella 2), usando la tecnica 3'RACE.

Da *C. intestinalis* si è ottenuto un amplificato di 201 pb che, sequenziato e completato con reazione di 5' RACE, rivela un mRNA completo di 265 pb. Di queste, 64 pb compongono la 5' UTR, 120 pb la regione codificante (CDS) e 81 la 3' UTR.

Da *M. manahattensis* si è ottenuto un amplificato di 246 pb che, sequenziato e completato con reazione di 5'RACE, rivela un mRNA completo di 323 pb. Di queste, 77 pb compongono la 5' UTR, 119 pb la CDS e 127 pb la 3' UTR.

In *A. aspersa* si è ottenuto un amplificato di 280 pb che, sequenziato e completato con reazione di 5' RACE, rivela un mRNA completo di 346 pb. Di queste, 66 pb compongono la 5' UTR, 120 pb compongono la CDS e 160 pb la 3' UTR.

In *S. plicata* e *B. schlosseri* le reazioni di PCR non hanno restituito alcun amplificato.

Utilizzando le sequenze ottenute, ho individuato in GeneBank una EST dell'ascidia *Herdmania curvata* che contiene l'mRNA completo per una MT. Questa mostra una 5' UTR di 90 pb, una CDS di 126 pb e una 3' UTR di 216 pb.

L'allineamento condotto con ClustalW delle regioni codificanti mostra un buon livello di conservazione della regione al 5'(Fig. 5).

Risultati MT. PCS, PCNA

```

M. curvata      ATGGATCCTTGCAATTGCGCTGAAACCGGAGGATCCTGCAATGCTCTGATTGTAGTGAT 60
A. aspersa     ATGGATCCATGCAAGTGCCTGAGACTG---GAAATGTACATGCCTGGAATGCACGGAC 57
H. curvata     ATGGATCCTTGCAATTGTGCTGAAACCG---GTGTCTGCAGATGTGTTGGATGCACTGAC 57
C. intestinalis ATGGACCCATGTAACGTGTGAGAACTG---GTGTGTGTAACGCGTCGATTGCTCCAAC 57
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** * ** * **

M. curvata      TGTTCCCAGTGCAAAATGTAATGCTGAATCGTGCAAATGCTGTTGCTCCTGCTGCAGTAAG 120
A. aspersa     TGCAGCAAATGCAAGTGTAAATCCAGAGAATGCAAATGCAACCGGCCGTGCTGCAAGAAG 117
H. curvata     TGCAGCAAATGCAACTGCAACCCCTAGTACGTGCAAGTGTAGTT---CTGGAGGCAAGAAA 114
C. intestinalis TGCAGCTCGTGAATGCGATCCCAAAATTTGCAACTGCGCTAAGGTTGCTGCCCAAAA 117
** * ** ** ** * * ***** ** * * ** **

M. curvata      AAAT--AG---- 126
A. aspersa     TAA----- 120
H. curvata     TGTTCAGCTAA 126
C. intestinalis TAA----- 120

```

Fig 5. Allineamento delle sequenze nucleotidiche corrispondenti alle regioni codificanti delle MT di *Ciona intestinalis*, *Molgula manahattensis*, *Ascidella aspersa* e *Herdmania curvata*. * totale conservazione.

La traduzione *in silico* delle regioni codificanti mostra una sequenza proteica di 39 aminoacidi per *A. aspersa* e *C. intestinalis* e di 41 aminoacidi per *M. manahattensis* e *H. curvata*. L'allineamento condotto con ClustalW riporta un elevato livello di conservazione soprattutto nella regione N-terminale e nella disposizione dei cluster di cisteine (Fig. 6).

```

A. aspersa      MDPCKCAETG-NCTCLRCTDCSKCKCNPENCKCN---RPCCKK- 39
M. curvata      MDPCNCAETGGSCKSDCSQCKCNAESCKCC---CSCCSKK 41
C. intestinalis MDPCNCAETG-VCNVDCSNCSNCNDPKICNCA---KACCPK- 39
H. curvata      MDPCNCAETG-VCRCVGTDCSKCNCNPSTCKCSSGGKKCCS-- 41
****:***** * * *::*.*.*:..*: * **

```

Fig. 6 Allineamento delle sequenze aminoacidiche dedotte delle MT di *Ciona intestinalis*, *Molgula manahattensis*, *Ascidella aspersa* e *Herdmania curvata*. In grigio le cisteine conservate.

* = completamente conservato (amminoacidi identici)

:= altamente conservato (amminoacidi molto simili)

. = sostituzione conservata (amminoacidi simili)

Il confronto a coppie con le sequenze proteiche delle MT1 dei deuterostomi presi in esame mostra una maggiore percentuale di identità con le MT dei vertebrati rispetto a quelle degli echinodermi con valori intorno al 35% per i primi e 20% per i secondi (Tabella 5).

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Balaena mysticetus</i> | 32,8 | 47,5 |
| <i>Homo sapiens</i> | 31,1 | 44,3 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | 31,2 | 45,3 |
| <i>Sus scrofa</i> | 31,1 | 44,3 |
| <i>Bos taurus</i> | 31,1 | 45,9 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 32,8 | 47,5 |
| <i>Gallus gallus</i> | 34,9 | 46 |
| <i>Cairina moschata</i> | 34,9 | 46 |
| <i>Anas platyrhynchos</i> | 34,9 | 46 |
| <i>Podarcis sicula</i> | 33,3 | 44,4 |
| <i>Xenopus laevis</i> | 30,6 | 46,8 |
| <i>Ambystoma mexicanum</i> | 31,1 | 45,9 |
| <i>Perca fluviatilis</i> | 31,7 | 45 |
| <i>Pagrus major</i> | 36,7 | 55 |
| <i>Rhabdosargus sarba</i> | 36,7 | 53,3 |
| <i>Gobiomorphus cotidianus</i> | 35,0 | 53,3 |
| <i>Oreochromis mossambicus</i> | 36,7 | 56,7 |
| <i>Gambusia affinis</i> | 36,7 | 53,3 |
| <i>Gadus morhua</i> | 38,3 | 55 |
| <i>Oryzias javanicus</i> | 36,7 | 51,7 |
| <i>Salmo salar</i> | 35,6 | 52,5 |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | 38,3 | 55 |
| <i>Carassius auratus</i> | 38,3 | 53,3 |
| <i>Danio rerio</i> | 38,3 | 55 |
| <i>Pagothenia borchgrevinki</i> | 35,0 | 53,3 |
| <i>Gymnodraco acuticeps</i> | 35,0 | 53,3 |
| <i>Parachaenichthys charcoti</i> | 35,0 | 53,3 |
| <i>Trematomus bernacchii</i> | 35,0 | 53,3 |
| <i>Herdmania curvata</i> | 61,9 | 80,9 |
| <i>Ascidella aspersa</i> | 56,4 | 84,6 |
| <i>Molgula manahattensis</i> | 58,5 | 78 |
| <i>Branchiostoma floridae</i> | 22,6 | 34,5 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 21,5 | 35,4 |
| <i>Sterechinus neumayeri</i> | 18,8 | 31,2 |
| <i>L. pictus</i> | 22,1 | 30,9 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 24,2 | 36,5 |

Tabella 5: Comparazione della sequenza amminoacidica della MT di *C. intestinalis* con quelle di altri deuterostomi mediante l'utilizzo del programma ALIGN. Bianco: mammiferi; arancione: uccelli; giallo: rettili; rosso: anfibi; blu: teleostei; grigio: urocordati; verde: cefalocordati; rosa: echinodermi.

Inoltre l'allineamento delle sequenze proteiche mostra come le MT degli urocordati manchino del motivo KKS tipico dei vertebrati. Questa corta sequenza costituisce il legame tra i domini alfa e beta delle MT dei vertebrati (Fig. 7).

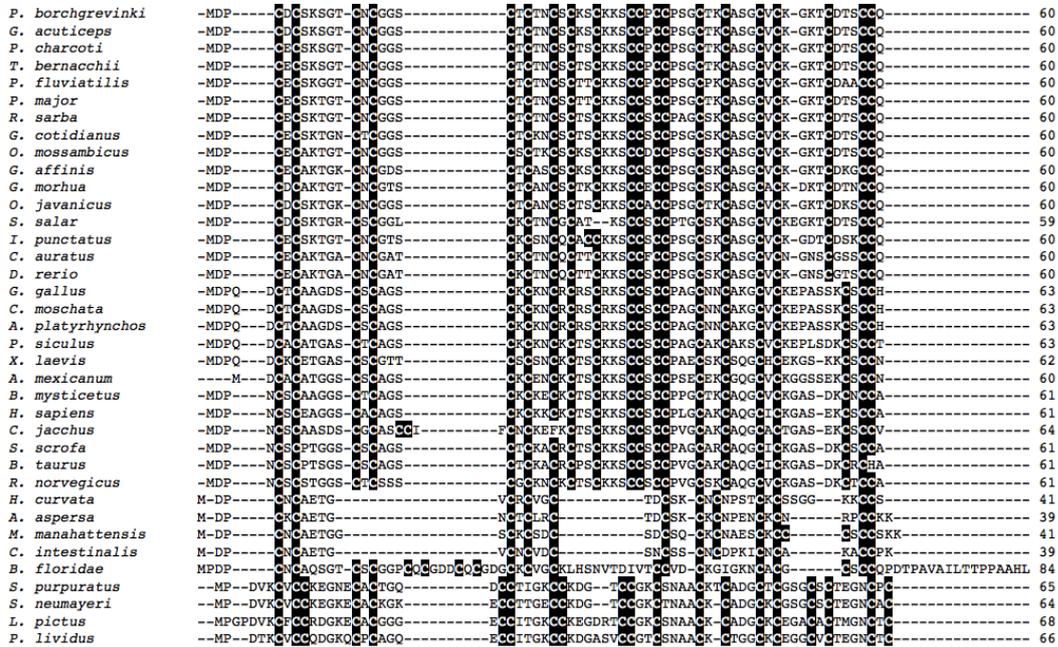


Fig 7. allineamento, ottenuto con *CLUSTALW*, delle 35 sequenze amminoacidiche indicate in tabella 1. I residui cisteinici sono evidenziati in nero. (modificata da Franchi *et al.*, 2010)

Nella ricostruzione filogenetica condotta utilizzando i metodi del neighbour joining, massima parsimonia, minima evoluzione ed UPGMA, le MT dei deuterostomi si separano in 4 cluster: tetrapodi, teleostei, cordati invertebrati ed echinodermi (Fig. 8).

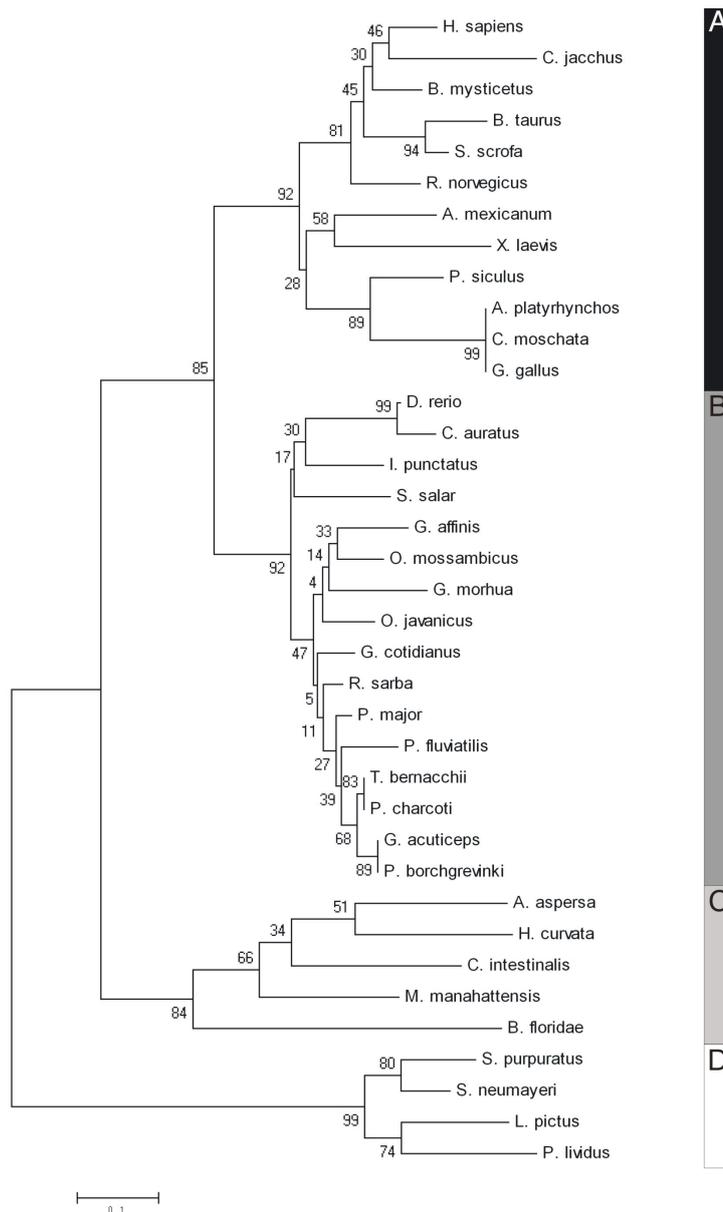


Fig. 8 Relazioni filogenetiche tra le MT di deuterostomi ottenute con il metodo del Neighbor-joining. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. (A) tetrapodi, (B) teleostei, (C) Cordati invertebrati, (D) echinodermi. (da Franchi *et al.*, 2010)

L'indagine sulla struttura introni-esoni del gene per le MT dei tunicati è stata condotta su *C. intestinalis*. Il confronto tra l'mRNA e il genoma ha evidenziato la presenza del gene *CiMT1* solo in uno scaffold (186). Il gene in questione risulta tripartito, composto cioè di 3 esoni e due introni lunghi rispettivamente 87 pb (esone 1), 103 pb (esone 2), 76 pb (esone 3), 356 pb (introne 1) e 57 pb (introne 2). In fig. è rappresentato il confronto della struttura genica di *CiMT1* con la

struttura genica di MT1 da *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Salmo salar* e di MTA da *Strongylocentrotus purpuratus*. La stretta somiglianza con l'isoforma 1 delle MT dei vertebrati è il motivo per cui al gene di *Ciona* è stato dato il numero 1.

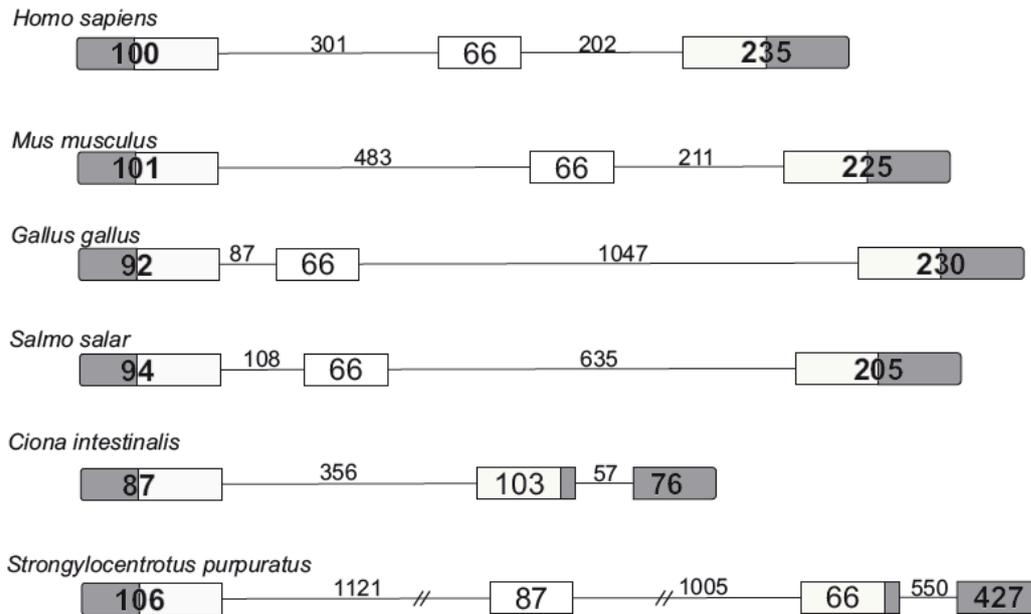


Fig. 9 Organizzazione dei geni per MT da alcuni deuterostomi. Gli esoni sono rappresentati da rettangoli dove in bianco è la regione codificante e in grigio le regioni UTR. Gli introni sono indicati dalle linee. I numeri si riferiscono alla lunghezza della sequenza espressa in pb. (da Franchi *et al.*, 2010)

L'individuazione della sequenza di *CiMT1* ha permesso anche di risalire alla regione promotrice a monte del gene. L'analisi informatica con il programma Primer Premier 5.00 ha evidenziato la presenza di 4 MRE, 1 ARE, 3 half-ARE, 1 GATA, 1 Ap1 e 5 STAT (Fig. 10).

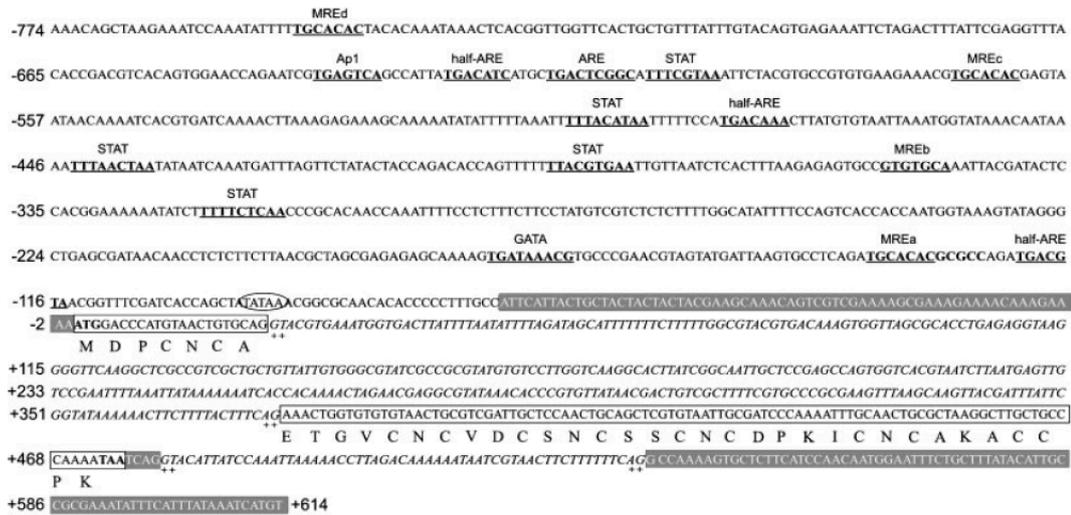


Fig. 10 Il gene per *CiMTI* con la regione promotrice al 5' e la traduzione *in silico*. La regione riconosciuta dai fattori di trascrizione è in grassetto e sottolineata. Il TATA box è circondato, gli esoni sono nei riquadri (bianchi: CDS, grigi: UTR) e gli introni sono in corsivo. Le sequenze consenso di splicing sono contrassegnate da ++. La sequenza aminoacidica è specificata sotto la regione codificante. I numeri si riferiscono alla posizione nucleotidica a partire dal codone di START. (da Franchi *et al.*, 2010)

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiMTI* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di *C. intestinalis* trattata con Cd, Zn e Cu.

In presenza di Cd si ha un abbassamento significativo di espressione alle 24 h seguito da un graduale aumento del messaggero fino ad un picco massimo alle 96 h e quindi un'ulteriore abbassamento alle 120h. In presenza di Zn non si riscontrano variazioni significative fino alle 48 h a cui segue un incremento alle 72 e 96 h e quindi un abbassamento alle 120 h. In presenza di Cu si osserva un graduale aumento nel tempo con i valori più elevati alle 96 e 120 h (Fig. 11).

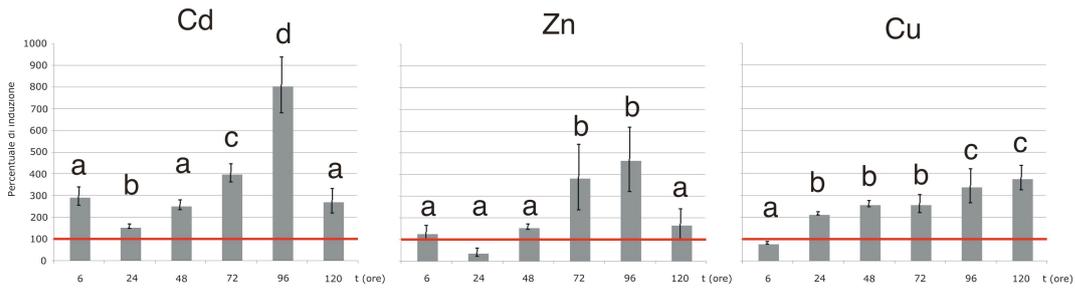


Fig. 11: espressione dell'mRNA per *CiMTI* in presenza di Cd, Zn e Cu 10 μ M. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$). La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiMTI* in organismi di controllo non trattati (100%).

La localizzazione del messaggero per *CiMTI* è stata condotta per mezzo di ISH su sezioni istologiche e colture di emociti da animali trattati con Cd.

Le cellule maggiormente coinvolte nella trascrizione del gene appaiono essere gli emociti nelle lacune emolinfatiche e le cellule follicolari che circondano gli ovociti. ISH mirata sulle colture emocitarie rivela che i granulociti sono l'unica popolazione responsabile della sintesi di MT (Fig. 12).

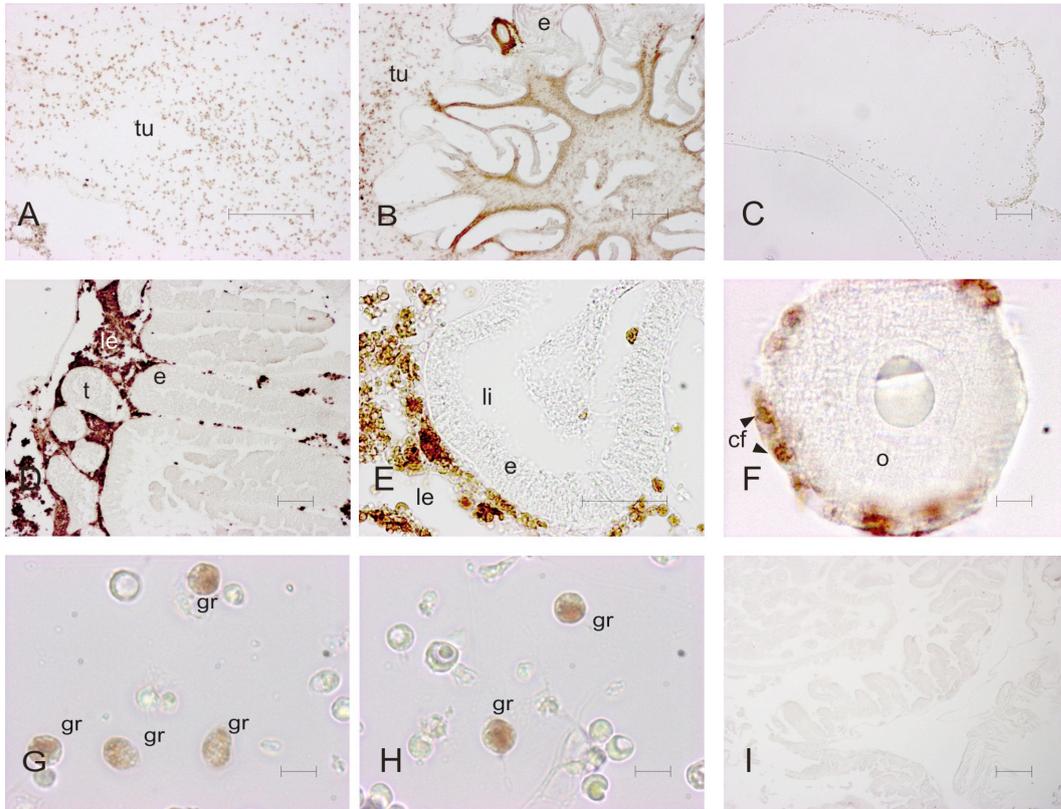


Fig. 12: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiPCS* su sezioni istologiche ed emociti. A-E: sezioni in paraffina di tessuti. A: sezione di tunica trattata con Cd; B: sezione di sifone orale trattato con Cd; C: sezione di tunica non trattata; D: sezione di stomaco trattato con

Cd; E: sezione di intestino trattato con Cd; F: sezione di cellula uovo trattata con Cd; G,H: emociti prelevati da organismi trattati con Cd; I: sezione di intestino con ribosondasonda senso per *CiMT-1*. Barra: A-E 100 μ M, F-H 10 μ M, I 100 μ M. Colorazione marrone: ribosonda. le: lacune emolinfatiche; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente; tu: tunica; o: ovocita; cf: cellule follicolari; gr: granulociti. (modificata da Franchi *et al.*, 2010)

Dall'analisi delle sezioni istologiche si evidenzia un aumento significativo ($P<0,01$) di emociti nella tunica dopo 24 h di trattamento con Cd.

Il saggio TUNEL rivela inoltre un aumento significativo ($P<0,01$) della percentuale di cellule con DNA frammentato (Fig. 13).

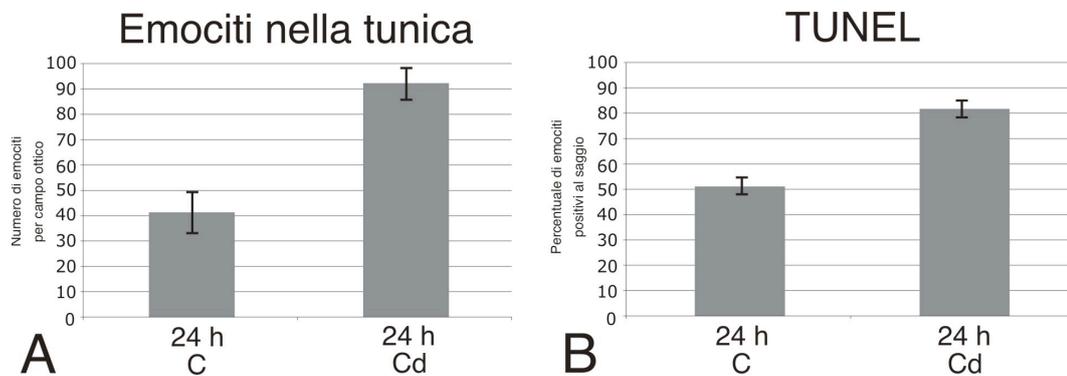


Fig. 13: conte emocitarie effettuate su campioni di tunica da organismi trattati con Cd e non trattati (C). **A:** numero di emociti presenti; **B:** percentuale di emociti positivi al saggio di frammentazione del DNA TUNEL.

3.2 Fitochelatina sintetasi

In GeneBank (a.n. XM_002128336, XM_002128563) sono disponibili due sequenze di mRNA registrate come “Predicted: *Ciona intestinalis* similar to phytochelatin synthase” di lunghezza 1.616 pb e 1.338 pb. L’allineamento di queste sequenze ha consentito di rilevare una regione conservata, sulla quale sono stati costruiti 4 primer specifici (Tabella primer) per l’amplificazione.

L’utilizzo della coppia di primer PCF2/PCR2 in reazione di PCR ha dato, come atteso, un amplificato di 781 pb che sequenziato ha confermato la presenza di una sequenza mRNA identico alla fitochelatina sintetasi predetta di *Ciona intestinalis*.

Le sequenze registrate in GeneBank sono state quindi analizzate *in silico* e sono state individuate le regioni UTR e CDS. L’mRNA completo per la fitochelatina sintetasi di *C. intestinalis* (*CiPCS*) è lungo 1616 pb di cui 56 pb compongono la 5’ UTR, 1401 pb compongono la CDS e 159 pb compongono la 3’ UTR. La CDS codifica per una proteina lunga 466 aminoacidiche, nella porzione N-terminale, contiene l’intero dominio conservato *Phytochelatin*.

Il confronto tra la *CiPCS* e le fitochelatino sintetasi di altri organismi è riportato in Tab. 6.

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Microcoleus chthonoplastes</i> | 14,8 | 29,3 |
| <i>Anabaena variabilis</i> | 14,4 | 31 |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> | 14,3 | 27,9 |
| <i>Nostoc punctiforme</i> | 14,0 | 30,6 |
| <i>Trichodesmium erythraeum</i> | 13,6 | 28,1 |
| <i>Chlorella variabilis</i> | 20,4 | 31,6 |
| <i>Allium sativum</i> | 32,6 | 61,1 |
| <i>Oryza sativa</i> | 30,8 | 58,7 |
| <i>Zea mays</i> | 30,3 | 58,5 |
| <i>Sorghum bicolor</i> | 29,3 | 58,1 |
| <i>Cynodon dactylon</i> | 28,7 | 57,5 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | 32,6 | 55,7 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | 32,5 | 56,3 |
| <i>Lactuca sativa</i> | 32,2 | 59,1 |
| <i>Ricinus comunis</i> | 32,0 | 57,5 |

| | | |
|-------------------------------|------|------|
| <i>Populus trichocarpa</i> | 31,4 | 59,8 |
| <i>Sesbania rostrata</i> | 31,3 | 58,5 |
| <i>Brassica juncea</i> | 29,7 | 59,5 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 29,6 | 59,8 |
| <i>Vitis vinifera</i> | 29,3 | 56,8 |
| <i>Eisenia fetida</i> | 33,9 | 61,9 |
| <i>Hydra magnipapillata</i> | 32,9 | 61,1 |
| <i>Brugia malayi</i> | 32,6 | 57,9 |
| <i>Caenorhabditis remanei</i> | 30,8 | 59,6 |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | 25,3 | 49,7 |
| <i>Loa loa</i> | 23,2 | 37,3 |
| <i>Nematostella vectensis</i> | 18,7 | 33,1 |

Tabella 6: Comparazione della sequenza amminoacidica della PCS di *C. intestinalis* con quelle di altri organismi mediante l'utilizzo del programma ALIGN. Grigio: cianobatteri; verde: alghe verdi; arancione: monocotiledoni; rosa: dicotiledoni; bianco: metazoi.

In particolare risultano conservate le Cys (in posizione 56, 63, 64, 82 e 86) deputate al riconoscimento del metallo e l' His (in posizione 163) fondamentale per la sintesi delle fitochelatine (84 da Pal 2010). L'Asp fondamentale per la sintesi delle PC, in *Ciona* è sostituito da acido glutammico (E, in posizione 181) (Fig. 14).

| | | |
|-----------------------------------|--|-----|
| <i>Schistosoma mansoni</i> | MESYFSLASQFCTQEEPSYCGLASL-----VMILNALG---LDPGRVWKGPWRWY | 162 |
| <i>Nematostella vectensis</i> | AVPFLSLSSCFNTOAEPAYCGLSTL-----AIVLNALR---IDPQRIWKTPWRWF | 83 |
| <i>Brugia malayi</i> | ANIYFRLASHFLTQDEPSYCGSLTLGQSLTYGDYLVMLNALE---VDPGRVWKSPPWRFY | 97 |
| <i>Loa loa</i> | ANIYFRLASHFLTQGEPSYCGSLSTL-----VMVLNALE---VDPGRVWKSPPWRFY | 90 |
| <i>Caenorhabditis remanei</i> | ANIYFKLASQFRTQDEPAYCGLSTL-----VMVLNALE---VDPKRVWKAPWRFY | 92 |
| <i>Hydra magnipapillata</i> | ANIYFPLAEQFRTQAEPAYCGLSTL-----VMILNSLA---VDPKRVWKGPWRWF | 140 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Lactuca sativa</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Ricinus communis</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Populus trichocarpa</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Vitis vinifera</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLATL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 62 |
| <i>Sesbania rostrata</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Brassica juncea</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALS---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | MEGFFKLLISYFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALS---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Allium sativum</i> | MEGFFKLLISCFQTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 83 |
| <i>Sorghum bicolor</i> | MEGFFPLVSVFQTQSEPAYCGLASL-----AVVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 85 |
| <i>Zea mays</i> | MEGFFPLVSVFQTQSEPAYCGLASL-----AVVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 85 |
| <i>Cynodon dactylon</i> | MEGFFSLISCFQTQSEPAYCGLASL-----AAVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 85 |
| <i>Oryza sativa</i> | LQGFNLLISVFTQSEPAYCGLASL-----SMVLNALA---IDPGRKWKGPWRWF | 84 |
| <i>Chlorella variabilis</i> | VNFFKLLIEQFRTQDEPAYCGLASL-----AMTLNLTN---IDPRTWKGPWRWF | 92 |
| <i>Ciona intestinalis</i> | MEIFHFLGPIRTQDEPAYCGLSSL-----VIVLNGLA---VDPGRVWKGVRWRY | 83 |
| <i>Eisenia fetida</i> | MENFFPLASQFRTQEEPAFCGLSTL-----VMVLNLTLE---VDPKRVWKGPWRWF | 92 |
| <i>Nostoc punctiforme</i> | NQDFFLSMQFVTQNNQAYCGVASM-----VMVLNQLG---IPAPEASQYKPYRVF | 100 |
| <i>Anabaena variabilis</i> | REDFFPLSMQFVTQNNQAYCGVASI-----IMVLNSLG---IDAPETAQYSPYRVF | 95 |
| <i>Microcoleus chthonoplastes</i> | RRDYFPLSIHFETQENLAYCGVASI-----VMVLNALS---IPAPPTANFGDHHIF | 104 |
| <i>Trichodesmium erythraeum</i> | QTDYIPLMSQFVTQVNGAFQGVASA-----VMVLNALE---VPSTAPSPW-PQRYF | 103 |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> | VSDYGLMEAFLTQSNLAYCGVASA-----VMVLNSLA---IPAPPVDFGRNYHFV | 109 |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | HENMLTCC-----PRDLVTK-GITLDDFVKIARCYGLDVLDRH-VSPDTSLSYFQDVVIRKMSG | 220 |
| <i>Nematostella vectensis</i> | TEDLLDCCR-----PLDVVKKVGI-TMDEFLLAKKONGAVCTLTRPEDNEQSYQLFRKSLFYTHG | 143 |
| <i>Brugia malayi</i> | HESMLDCCV-----PLDDIKKTGITLSQFAFLAECNKLTYEVKYANSKSEFLNLLRENKQCMVA | 157 |
| <i>Loa loa</i> | HESMLDCCI-----PLDVIKKTGITLSQFAFLAECNKLSTELKYAESKSEFLSIFRENKRSMTV | 150 |
| <i>Caenorhabditis remanei</i> | HESMLDCCV-----PLEHIRKSGITTLQFSLATCNRLKSAVSYGETNPDLQKFRKSLVNSVRS | 152 |
| <i>Hydra magnipapillata</i> | HEEMLDCC-----SLDLVQQNGITLQDFVCLATCNLLDLNVVTRTDDN-ENIKSFRDVEEICAG | 199 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | DESMLDCC-----PLEKVKAKGISFGKVVCLAHACAGAKVEAFRSNH---STIDDFRKHVMACCTS | 141 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | DESMLDCC-----PLEKVKAKGISFGKVVCLAHACAGAKVEAFRSNL---STIDDFRKHVMACCTS | 141 |
| <i>Lactuca sativa</i> | DESMLDCC-----PLEKVKAKGISFGKVVCLAHACAGAKVEAFRTNQ---SNIDDFRKHVIACSTS | 141 |
| <i>Ricinus communis</i> | DESMLDCC-----PLETVKAKGISFGKLVCLAHACAGAKVEAYRTNQ---STIDDFRKHVIKCTTT | 141 |
| <i>Populus trichocarpa</i> | DESMLDCC-----PLEQVKAKGISFGKLVCLAHACAGKVEAYRTNQ---STIDDFRKHVMACSTS | 141 |
| <i>Vitis vinifera</i> | DETMLDCC-----PLEKVKADGISFGKLVCLAHACAGAKVDAFRNTQ---STIEEFRKHVMACSTS | 120 |
| <i>Sesbania rostrata</i> | DESMLDRC-----PLEKIKVRGISFGKLVCLAHACAGAKVEAFHASH---SSIDDFRKHVMACSTS | 141 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------|--------|----------|--------|--------------|---------|----------------|--------|-------------------|------------------|------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Brassica juncea</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLEVVK | KEKGISFGKVV | CLAH | CSGAKVEAFRTNQ | -- | TTIDDFRKLVMKCSTS | 141 | | | | | | | | |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLEVVK | KEKGISFGKVV | CLAH | CSGAKVEAFRTSQ | -- | STIDDFRKFVVKCTSS | 141 | | | | | | | | |
| <i>Allium sativum</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLEKVK | EEGITFGKVA | CLAH | CAGANVQAIRTSQ | -- | GSLEDFRQHIIRCTSS | 141 | | | | | | | | |
| <i>Sorghum bicolor</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLDKVK | DQGITFGKVA | CLAH | CSGADVQSFRTNR | -- | VTIDDLRRHLIRCVSS | 143 | | | | | | | | |
| <i>Zea mays</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLDKVK | AEGITFGKVA | CLAH | CSGADVQSFRTNR | -- | VTIDDLRRHLIRCVSS | 143 | | | | | | | | |
| <i>Cynodon dactylon</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLDKVK | AQGITFGKVA | CLAH | CAGADVQTFRTNR | -- | ITLEDLRRHLVRCASS | 143 | | | | | | | | |
| <i>Oryza sativa</i> | DESMLD | CCE | ----- | PLDKVK | AEGITFAKLA | CLAH | CAGANSQSFRTADQ | -- | STIHDFRHHLVRSSASS | 142 | | | | | | | | |
| <i>Chlorella variabilis</i> | HEEMLD | CCH | ----- | PLPKV | REEGITLTAQAA | CLAR | CNGARVELYPYGA | -- | VSLLEFRGMVAEVCSS | 151 | | | | | | | | |
| <i>Ciona intestinalis</i> | HESMLE | CC | ----- | SLEDV | QRQGVTTIEQLA | CLAK | CNQLNADVVDH | -- | ASIDDFRELVKQSCRG | 141 | | | | | | | | |
| <i>Eisenia fetida</i> | HENMLD | CCV | ----- | PINVI | EKSGITFDQFS | CLAV | CNTLNVRVSRADAS | -- | ASEDEFRQLVKRVSKG | 150 | | | | | | | | |
| <i>Nostoc punctiforme</i> | TQENFF | SNDNTK | KKVLTPEV | VSRRQ | GMTLDELG | KLSSY | GKVVNVYHATD | -- | TSLEQFRKQAAENLKQ | 164 | | | | | | | | |
| <i>Anabaena variabilis</i> | TQDNFF | SNEKTK | AVIAPEV | VASQ | GMTLDELG | LGLIASY | GVEKVVHASN | -- | TNIEEFRKQVAENLKQ | 159 | | | | | | | | |
| <i>Microcoleus chthonoplastes</i> | TQENVL | NEQTEK | LIPAAI | IARQ | GMTLNL | ELGQL | LETYP | LNAEV | HASE--- | VTLDKFRQMVVENLQD | 167 | | | | | | | |
| <i>Trichodesmium erythraeum</i> | TQDNIF | NEKTE | EVIPRS | VITRR | GMTLA | QLSDF | IATYS | VEVKTF | YGS--- | ISLEQFRGLIRENLVN | 166 | | | | | | | |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> | TQDNIF | NSDSS | QVVISPA | KTRR | QGMTL | QELQ | NLLSH | GVSSK | RHLHGD | --- | LSLQAFRSLIKANLDD | 173 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | SSEG--- | YLVVC | YSRSAL | GQTGT | GHFAP | VGGYH | PDREL | VFL | FDTA | 262 | | | | | | | | |
| <i>Nematostella vectensis</i> | DEENPN- | EFLVIS | YDRKK | LQQT | GTFH | SPVAA | FDQET | DSV | LL | FDTA | 188 | | | | | | | |
| <i>Brugia malayi</i> | DDTI---- | LVSYN | RQVL | GQTG | ACHF | SPLG | AYHEES | DQ | L | IMDVA | 198 | | | | | | | |
| <i>Loa loa</i> | DDTI---- | LVVNY | RQVL | GQTG | CHFS | SPLG | AYHEES | DQ | V | LIMDIA | 191 | | | | | | | |
| <i>Caenorhabditis remanei</i> | DDQV---- | LVASY | DRSV | LGGT | GSGHF | SPLAA | YHAD | SD | Q | V | LIMDVA | 193 | | | | | | |
| <i>Hydra magnipapillata</i> | QDKV---- | LTCYS | YRSRV | LNTQ | TGGGH | FSP | IGAYH | PKK | D | M | V | LIFDVA | 240 | | | | | |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | DNCH---- | LISYH | RGLFK | QTG | SCHF | SPIGG | YHVK | D | M | A | L | L | L | DVA | 182 | | | |
| <i>Solanum tuberosum</i> | DDCH---- | LISYH | RGLFK | QTG | SCHF | SPIGG | YHAE | K | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | |
| <i>Lactuca sativa</i> | DDCH---- | LISYH | RATFK | QTG | SCHF | SPIGG | YHAG | R | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | |
| <i>Ricinus communis</i> | DDCH---- | LISYH | RGTFF | KTGT | GHF | SPIGG | YHAG | R | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | |
| <i>Populus trichocarpa</i> | DDCH---- | LISYH | RGTFF | KTGT | GHF | SPIGG | YHAG | R | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | |
| <i>Vitis vinifera</i> | DDCH---- | LISYH | RGTFF | KTGT | GHF | SPIGG | YHAG | R | D | M | A | L | L | DVA | 161 | | | |
| <i>Sesbania rostrata</i> | DDCH---- | LISYH | RGALK | QTGT | GHF | SPIGG | YHVK | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | | |
| <i>Brassica juncea</i> | ENCH---- | MISTY | HRRV | FKQT | GSGHF | SPIGG | YNAER | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | | |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | ENCH---- | MISTY | HRRV | FKQT | GSGHF | SPIGG | YNAER | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | | | |
| <i>Allium sativum</i> | DDCH---- | VITSY | NKAF | QGTGT | GHF | SPIGG | YHK | G | S | D | M | A | L | L | DVA | 182 | | |
| <i>Sorghum bicolor</i> | QDCH---- | LIASY | HRRK | AFKQT | GTFH | SPIGG | YHAG | Q | D | M | A | L | L | DVA | 184 | | | |
| <i>Zea mays</i> | QDCH---- | LIASY | HRRR | PFQGT | GTFH | SPIGG | YHAG | Q | D | M | A | L | L | DVA | 184 | | | |
| <i>Cynodon dactylon</i> | QDCH---- | LIASY | HRRK | AFKQT | GTFH | SPIGG | YHAG | Q | D | M | A | L | L | DVA | 184 | | | |
| <i>Oryza sativa</i> | QDCH---- | LIASY | HRRK | PFKQT | GTFH | SPIGG | YHAG | Q | D | M | A | L | L | DVA | 183 | | | |
| <i>Chlorella variabilis</i> | AEEH---- | IIVSY | RQEF | RQTD | GCHF | SPIGG | YSARE | D | L | A | L | L | DVA | 191 | | | | |
| <i>Ciona intestinalis</i> | SSMA---- | VICSP | GRREL | QGTG | SCHF | SPIGG | YHPG | K | D | V | V | L | L | DVA | 183 | | | |
| <i>Eisenia fetida</i> | SEEV---- | IVASY | SRKGL | DQTD | GCHF | SPIAG | YHPGR | D | V | L | L | L | DVA | 192 | | | | |
| <i>Nostoc punctiforme</i> | PQ---- | NFIL | INYL | RKEI | GQEK | GGHIS | PVAA | YNE | Q | T | R | F | L | L | DVS | 205 | | |
| <i>Anabaena variabilis</i> | DG---- | NFVI | VN | YL | RKEI | GQER | GGHIS | PVAA | YNE | Q | T | R | F | L | L | DVS | 200 | |
| <i>Microcoleus chthonoplastes</i> | PN---- | NFVL | VN | YL | RK | TMG | ERG | GHIS | PVAA | YNE | Q | S | R | F | L | L | DVS | 208 |
| <i>Trichodesmium erythraeum</i> | DN---- | NFVL | VN | YL | QAI | GQK | RG | GHIS | PVAA | YNE | E | S | D | F | L | L | DVS | 207 |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> | SS---- | DRLI | VN | YDR | KVIG | QKGG | HF | SPLAA | YDA | V | T | D | K | V | L | L | DVA | 214 |

Fig 14. allineamento parziale, ottenuto con *CLUSTALW*, delle 27 sequenze amminoacidiche indicate in tabella 1. I cinque residui cisteinici coinvolti nel riconoscimento del metallo sono evidenziati in rosso. L'istidina (H) e l'acido aspartico (D) fondamentali nell'attività catalitica sono evidenziati rispettivamente in azzurro e viola.

Nella ricostruzione filogenetica condotta utilizzando i metodi del neighbour joining, *maximum parsimony*, *minimum evolution* ed UPGMA, le PCS considerate si separano in 5 cluster ben risolti: metazoi, cianobatteri, alghe verdi, monocotiledoni e dicotiledoni (Fig. 15).

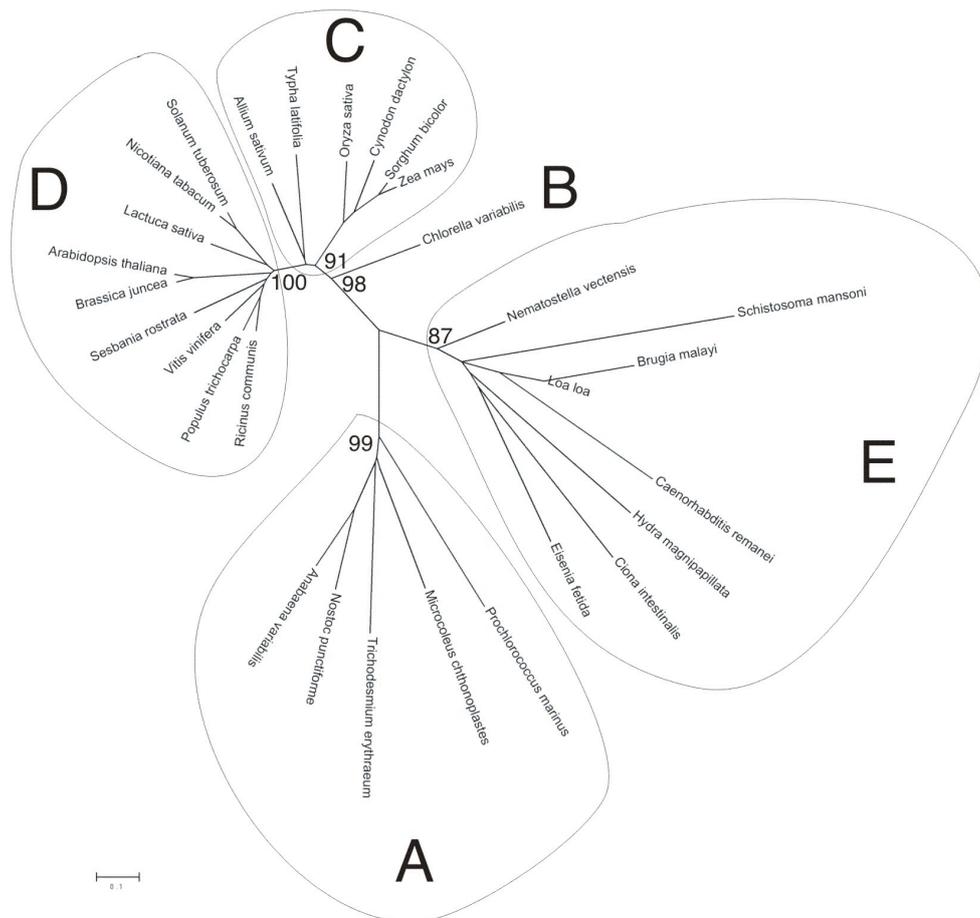


Fig 15. filogramma ottenuto con il metodo del Neighbour joining considerando le sequenze dalla tabella 1. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. A: cianobatteri; B: alga verde; C: monocotiledoni; D: dicotiledoni; E: metazoi

Al fine di individuare il gene per la fitochelatina sintetasi è stata fatta una ricerca blast contro il genoma di *Ciona*. L'esito ha confermato la presenza del gene in una sola regione, appartenente al cromosoma 7. *CiPCS* è composto di 2 esoni (lunghi rispettivamente 273 pb e 1343 pb) e 1 introne (lungo 417 pb) (Fig. 16). I siti di splicing sono del tipo canonico: GT e AG.

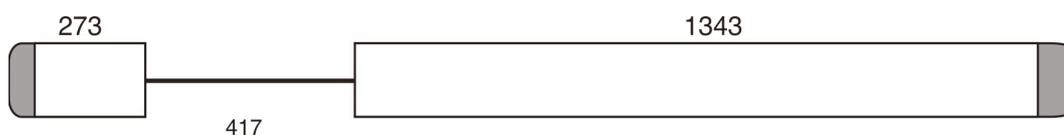


Fig. 16: rappresentazione schematica dell'organizzazione introne/esone di *CiPCS*. I rettangoli rappresentano gli esoni, le linee gli introni. In grigio le regioni UTR degli esoni. I numeri si riferiscono alle lunghezze in paia di basi (pb).

Risultati MT. PCS, PCNA

AAGACCATTGGTTTCAACAAAGATGTAGTTTTCTTACTTAAGTAGGGATTATTATC
1 M A T K T N F Y R R I L P E I C I N F S
1 ATGGCAACTAAGACAAACTTCTATCGGAGAATCTTCCAGAAATTTGCATCAACTTTTCT

21 S D D G K L I F K E A L D N G G M E I F
61 TCTGATGACGGGAAACTAATTTTAAAGAAGCTTTGGATAATGGGGCATGGAATCTTC

41 F H L G P Q I R T Q D E P A Y C G L S S
121 TTTTACTTGGGACCAGATAAAGAACACAAGATGAACCTGCTTATTGTGGTTTGTCTCG

61 L V I V L N G L A V D P G R V W K G V W
181 CTGGAATCGTACTTAATGGTCTAGCAGTTGATCCAGGTCGAGTTTGAAAGGTGTTTGG

81 R W Y H E S M L E C C T S L E D V Q R Q
241 CGTTGGTACCATGAGAGCATGTTGGAGTGTGTACTTCACTGAAGACGTACAGAGGCAA

101 G V T I E Q L A C I A K C N Q L N A D V
301 GGAGTTACCATCGAACAGCTGGCTTGTATTGCAAAATGTAATCAACTTAATGCTGATGTT

121 V Y V D D H A S I D D F R E L V K Q S C
361 GTTTATGTTGATGACCATGCAAGTATTGACGACTTCAGAGAACTTGTAAGCAATCTTGT

141 R G S S M A V I C S F G R R E L G Q T G
421 AGGGGAAGTTCTATGGCTGTTATTTGCTCGTTGGGAGAAGAGAACTAGGCCAGACTGGT

161 S G H F S P I G G Y H P G K D V V L V L
481 TCTGGACACTTTTCTCCCATAGGCGGTTACCATCCTGGGAAAGATGTTGTTTTAGTTCTC

181 E P A R F K Y P P Y W L S L E A L W N A
541 GAACCTGCAAGGTTTAAATATCCGCATATTGGCTTTCCTAGAAAGCATTATGGAATGCC

201 M N T K D P T N G D S P R G Y M I L E K
601 ATGAACACAAAAGATCCAACAAATGGGGATTCCTCAAGGGGTACATGATATTGAAAAA

221 S N S Q P T L L F R I S R Y F N A I N P
661 TCCAATCCCAACTACATTACTGTTTCCAGAAATATCAGGATTTTAAATGCTATCAACCCA

241 L H E D A A D F L Q K A V K F L K E K P
721 TTACATGAAGATGCTGCAGATTTCTTGCAAAAGCTGTTAAGTTCCTAAAGGAAAAGCCA

261 E K P N N S H Q V I K D V A E N L L K I
781 GAAAAGCCAAACAAATCTCATCAAGTGATAAAAAGACGTGCAGAAAATTTACTTAAAATA

281 S A E H K L N H E K G I L F N T F K K S
841 TCAGCAGAGCACAAAGCTAAACCATGAAAAAGGAATACTTTTAAACACCTTCAAGAAATCA

301 Q L E S M S P E H Q T A M F S L V E E I
901 CAACTTGAATCTATGTCACCTGAACATCAAACCTGCAATGTTTTCTCTGGTGAAGAAAT

321 E S L E L Y Q Y L R D A L T N R S C C S
961 GAGTCATTGGAATTATATCAATATTTAAGGACGCACTAACCAATAGATCATGCTGTAGT

341 E A L F D L K K E E Q V L V N E C G L P
1021 GAAGCTTTGTTGATTTAAAAAAGAAGAACAAGTCTGGTGAATGAATGTGGCTTACCA

361 C V L C L P H Y M V I L L H M L P L F G
1081 TGTGTGTTATGCTTGCCACATTACATGGTCATCTTGCTTCACATGCTCCACTTTTGGG

381 P N F S T E L N Q F S L T E E E F K G S
1141 CCAATTTTCCACAGAGTTGAACCAGTTTAGTTTAACTGAAGAGGAATTTAAAGGATCG

401 Y L E A I Q V L T R D N N E S N C S K S
1201 TATTTAGAAGCTATTTCAAGTGTGACTAGGGATAACAATGAGTCCAATTTGTTCAAAGAGT

421 N C C E E K T N G N T E S N K R G K H L
1261 AACTGCTGCGAAGAAAAACAATGGAACACTGAAAGTAATAAAGAGGAAAACATTTG

441 L K N E I K E L R K Q M L S V L N K D A
1321 CTTAAAAATGAAATCAAAGAACTTAGAAAAGCAAATGTTATCAGTTCTTAATAAAGACGCC

461 Q V S C C I -
1381 CAAGTTTCATGCTGTATATAATACGGATGTTTTACTGCAAAATTTTACTCAATATTCATT
TCATACTTTATTATTTATCTCGTACAACCAAGTTGCTATAATATTGTTTGTAAATTATC
CAATTTTAGAAGTTGCTACAACCTTAATTAAGAAATAAATAGGAATGTTTCACTTTAAA

Fig. 17: Il mRNA per *CiPCS* con la traduzione *in silico* della CDS. 5' e 3' UTR sono sottolineati. La numerazione si riferisce alla CDS e alla proteina dedotta.

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiPCS* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di esemplari di *C. intestinalis* trattati con Cd, Zn e Cu rispettivamente 10 μ M. In presenza di Cd si ha, durante tutto il periodo di trattamento, un unico picco di espressione alle 96 h. In presenza di Zn non si riscontrano variazioni significative di accumulo del messaggero per tutto il periodo di trattamento. In presenza di Cu si osserva un lieve aumento di espressione a partire dalle 48 h che permane fino alla fine del trattamento (Fig. 18).

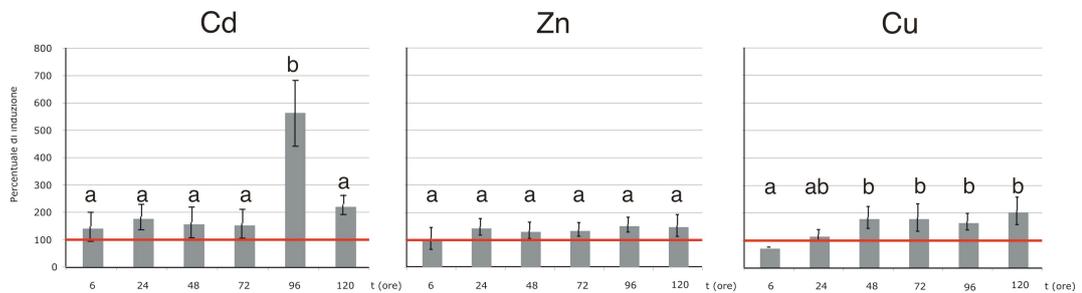


Fig. 18: espressione dell'mRNA per *CiPCS* in presenza di Cd, Zn e Cu 10 μ M. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$). La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiPCS* in organismi di controllo non trattati (100%).

La localizzazione del messaggero per *CiPCS* è stata condotta per mezzo di ISH su sezioni istologiche e colture di emociti da animali trattati con Cd 10 μ M.

Il cellule maggiormente coinvolte nella trascrizione del gene sembrano essere gli emociti nelle lacune emolinfatiche e le cellule follicolari che circondano gli ovociti. Dall'analisi mirata sulle colture emocitarie sembrano essere esclusivamente i granulociti l'unica tipologia emocitaria responsabile della sintesi di PCS (Fig. 19).

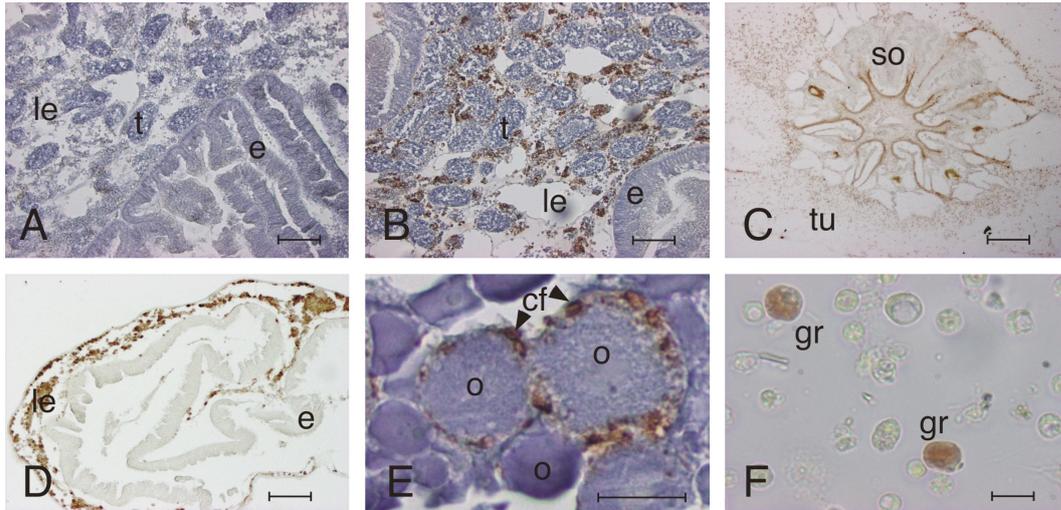


Fig. 19: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiPCS* su sezioni istologiche ed emociti. A-E: sezioni in paraffina di tessuti. A: sezione di stomaco non trattato B: sezione di stomaco trattato con Cd; C: sifone orale trattato con Cd; D: intestino trattato con Cd; E: ovario trattato con Cd; F: emociti prelevati da animali trattati con Cd. Barra: A-E 100 μ M, F 10 μ M. Colorazione blu: ematossilina; colorazione marrone: ribosonda. le: lacune emolinfatice; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente; tu: tunica; so: sifone orale; o: ovocita; cf: cellule follicolari; gr: granulociti

3.3 Antigene nucleare di proliferazione cellulare

In GeneBank (a.c. XM_002131825) è disponibile una sequenza di mRNA registrata come “PREDICTED: *Ciona intestinalis* similar to proliferating cell nuclear antigen” lunga 1698 pb. Su questa sequenza sono stati costruiti 2 primer specifici (Tabella 2) per l’amplificazione.

L’utilizzo della coppia di primer PCCF1/PCCR ha dato, come atteso, un amplificato in reazione di PCR di 505 pb che sequenziato ha confermato la presenza di una sequenza identica all’antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) predetto di *C. intestinalis*.

La sequenza registrata in GeneBank è stata quindi analizzata *in silico* e sono state individuate le regioni UTR e CDS. L’mRNA completo per la GPX7 di *C. intestinalis* è lungo 1698 pb di cui 429 pb compongono la 5’ UTR, 789 pb compongono la CDS e 480 pb compongono la 3’ UTR. La CDS codifica per una proteina lunga 262 aminoacidi che compongono l’intero dominio conservato *PCNA superfamily* tipico delle PCNA.

Il confronto tra la CiPCNA e i PCNA da altri organismi è riportato in Tab. 7.

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Homo sapiens</i> | 74,0 | 93,5 |
| <i>Ailuropoda melanoleuca</i> | 74,0 | 93,1 |
| <i>Equus caballus</i> | 74,0 | 93,1 |
| <i>Bos taurus</i> | 73,7 | 93,1 |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 73,7 | 93,1 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 72,9 | 93,1 |
| <i>Gallus gallus</i> | 72,1 | 93,1 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> | 71,8 | 93,1 |
| <i>Xenopus tropicalis</i> | 74,0 | 92,7 |
| <i>Salmo salar</i> | 73,7 | 92,0 |
| <i>Esox lucius</i> | 72,9 | 92,0 |
| <i>Osmerus mordax</i> | 72,9 | 92,0 |
| <i>Danio rerio</i> | 71,4 | 90,5 |
| <i>Styela clava</i> | 79,2 | 95,8 |
| <i>Polyandrocarpa misakiensis</i> | 78,4 | 93,9 |
| <i>Botryllus primigenus</i> | 77,9 | 94,3 |

| | | |
|--------------------------------------|------|------|
| <i>Branchiostoma floridae</i> | 69,8 | 92,4 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 36,3 | 62,6 |

Tabella 7: Comparazione della sequenza amminoacidica di PCNA di *C.intestinalis* con quelle di altri deuterostomi mediante l'utilizzo del programma ALIGN. Bianco: mammiferi; arancione: uccelli; rosso: anfibi; blu: teleostei; grigio: urocordati; verde: cefalocordati; rosa: echinodermi.

Nella ricostruzione filogenetica condotta utilizzando i metodi del neighbour joining, *maximum parsimony*, *minimum evolution* ed UPGMA, le PCNA degli urocordati (Fig. 20 C) si separano nettamente dagli altri organismi (Fig. 20).

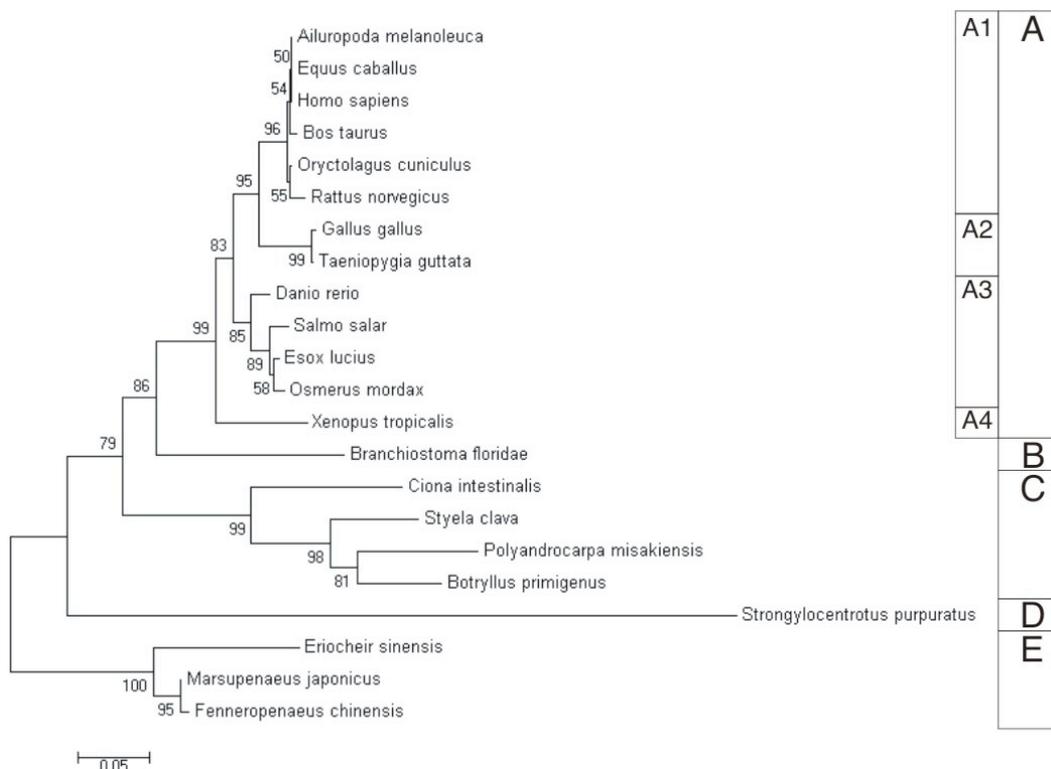


Fig 20. filogramma ottenuto con il metodo del NJ considerando le sequenza dalla tabella 1. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. A: vertebrati; B: cefalocordati; C: urocordati; D: echinodermi; E: crostacei (outgroup); A1: mammiferi; A2: uccelli; A3: teleostei; A4: anfibi

Al fine di individuare il gene per PCNA è stata fatta una ricerca blast contro il genoma di *Ciona*. L'esito ha confermato la presenza del gene in una sola regione,

appartenente al cromosoma 12. Il gene *CiPCNA* è composto di 1 unico esone (lungo 1698 pb) (Fig. 21).

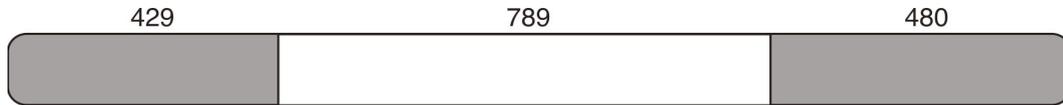


Fig. 21: rappresentazione schematica dell'organizzazione introne/esone di *CiPCNA*. I rettangoli rappresentano gli esoni, le linee gli introni. In grigio le regioni UTR degli esoni. I numeri si riferiscono alle lunghezze in paia di basi (pb).

ACAGCTTGC

AGTAAACTTAGGCTGGCGTTGTATATTGTTGTGTAAGGATATAGGGATTGGTAAATAT
 AAACCTAATGTAGCCAGGTATATTTATGTTACGTATATTTAAACAAACATTAGAGATTTA
 CGGTGGGAAAGATTATAGTTTGGCGGGCTATAGTTTTGGAAATAAAAACCTTGAATGTT
 ATTTTATCTAAATTGAGTAAATTAACCAATAACAATAAATGTAATACTCATBAACAATTT
 TGATAAGATGTGATTGAGACTTACACAGTAAAAAAATTAATTTTGTCTTCTATATT
 ACCTTTATTTGCCAACATTTGTGTTGTTGCCGTTTAAATTTAATCCATGTTTTGTAAAA
 TATGTTCTTTATAGTTTCTTCAGGTGTTTTGTAATTATTCCTTAAAGTTCATTTAAA
 1 M F E A R L V Q G S L L K K V Q E A L K
 1 ATGTTTGAAGCACGCTTGTCCAAGGAAGTCTGCTAAAAAAGTCCAAGAAGCGTTGAAA

21 D I V N E A S W D C T S S G L S L Q A M
 61 GATATCGTGAACGAGCGTCATGGGATTGCACGTCATCTGGATTGAGCTTGCAAGCCATG

41 D S S H V S L V Q L T L R A D G F E K Y
 121 GACAGCTCCACGTCCTTGTGCAACTTACTCTGC GCGCTGACGGCTTCGAGAAATAC

61 R C D R N L A M G I N M T S M S K I L R
 181 CGATGCGACCGAAACCTCGCCATGGGCATCAACATGACAAGCATGTCGAAGATTTTGCGA

81 C A G N E D V I T L R A D D T A D L L E
 241 TGCGCTGGAAATGAAGCGTGATCACTCTTAGAGCGGATGACACCGCTGATCTGCTGGAA

101 M V F E S P K G E K I S N Y D M K L M D
 301 ATGGTCTTCGAATCCCGAAGGGTAAAAAATTTCCAACATGACATGAAGCTGATGGAC

121 I D C E Q L G I P D Q E Y S C T I K M P
 361 ATAGACTGTGAGCAGCTTGGGATTCCTGACCAGGAGTATAGCTGTACCATCAAGATGCCT

141 S H E F A R I C R D L S Q I G E C V I I
 421 TCTCATGAGTTTGC AAGGATTTGCGTGATTTGAGTCAAATTTGGTGAGTGCCTCATCATC

161 T C T K D G V Q F S A K G D L G S G T I
 481 ACATGCACTAAGGACGGGTTCAATTCACGCAAGGGAGATCTTGGAAAGCGGTACGATC

181 K L S Q N S A A E K E D D Q V T I E M T
 541 AAGCTTTCGCAAAACAGCGCAGCAGAAAAAGAGATGACCAAGTCACGATCGAGATGACC

201 E P V Q L T F A I K Y L N L F T K A T P
 601 GAGCCAGTTCAACTAACCTTTGCGATCAAGTATCTCAACCTTTTCACCAAAGCTACTCCT

221 L S G A V C L S M S N D I P L V V E Y K
 661 CTTTCTGTTGCGTATGCTCTCAATGTCCAACGACATCCCTCTTGTGGTAGAGTACAAG

241 I E D M G H I K Y F L A P K I E D E E E
 721 ATAGAGGACATGGGACACATCAAGTACTTCCCTTGTCTCAAAGATCGAAGATGAAGAGGAG

261 A E -
 781 GCAGAATAAACTCCAACCTAAACACACGACTCTCACTGCCTTTTGTGACGCTTTTAGTTCAA
 CACATCATGAACCTCTCTATATGCCCTCACACAACCTGTACATTAAGCAAACGCTGCTAAAT
 TTTAAATCAAACCTTGTATTTTTTCTCACAACCTGCTGGTATTTAGCTTAGTTGTGTTGC
 TGTGATATTACCAGTAATACTATAACACCTACTTGTAGTATGGATTGCTTTTGAGTACA
 TTTTCAATGCTAGACATAGTTCTAATGTAAACTAATGCTTATATTTTGAACATATGTT
 AAATTTCCACCTTGTAAAGTTTCTGGGCTGTTGGTAACATTTCTAGGTGATAGGTCACCA
 TGCATAAGCTGATTAACCTCTGCTGTTTGTCTGTTATTTGTTTCAATGATTTATGCGCT
 CAGCGACTTATCTCAAACCTAAAAAGAAGAAATCAAAAAAGAAAAGATAACAAGGCTCT
 GAAATATCT

Fig. 22: l' mRNA per *CiGS* con la traduzione *in silico* della CDS. 5' e 3' UTR sono sottolineati. La numerazione si riferisce alla CDS e alla proteina dedotta.

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiPCNA* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di esemplari di *C. intestinalis* trattati con Cd 10 μ M. In presenza di Cd si evidenzia un picco di espressione alle 96 h. (Fig. 23).

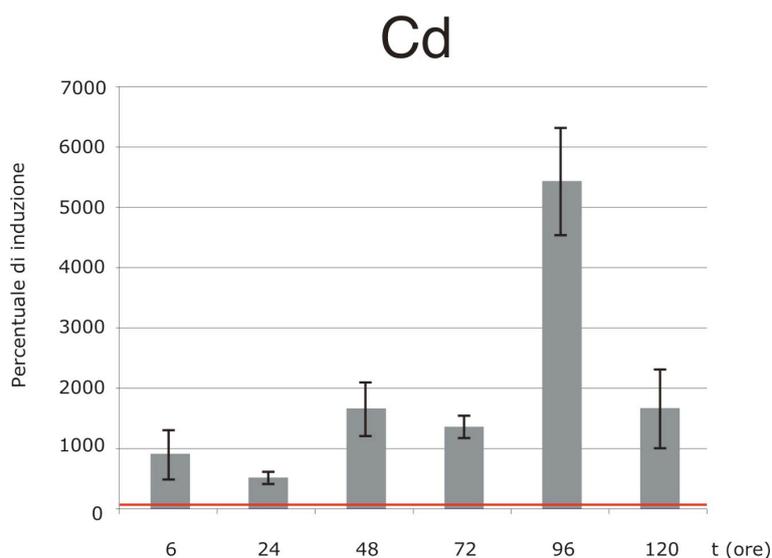


Fig. 23: espressione dell'mRNA per *CiPCNA* in presenza di Cd 10 μ M. La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiPCNA* in organismi di controllo non trattati (100%).

La localizzazione del messaggero per *CiPCNA* è stata condotta tramite ISH su sezioni istologiche da animali trattati con Cd 10 μ M.

Il cellule maggiormente coinvolte nella trascrizione del gene sembrano essere gli emociti nelle lacune emolinfatice (Fig. 24).

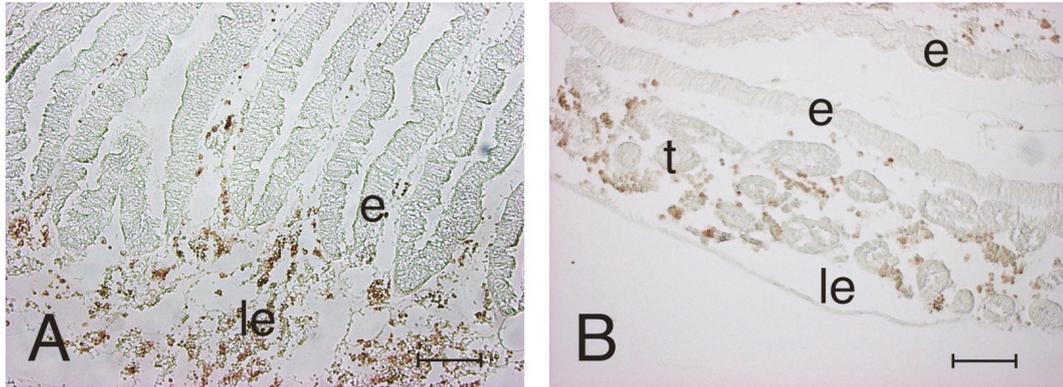


Fig. 24: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiPCNA* su sezioni istologiche in paraffina. A: sezione di stomaco trattato con Cd B: sezione di intestino trattato con Cd. Barra 100 µM. Colorazione marrone: ribosonda. le: lacune emolinfatiche; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente;

4. Discussione metallothioneine

La prima metallothioneina è stata isolata dal rene di cavallo circa 50 anni fa e descritta come una inusuale proteina legante alte percentuali di cadmio (Margoshes and Vallee, 1957). Da allora queste proteine ricche in cisteine sono state isolate da svariati animali, piante, microorganismi unicellulari eucarioti e cianobatteri e sono state classificate in diverse famiglie (Binz e Kagi, 1999).

In questo lavoro, per la prima volta, vengono descritte MT di urocordati, organismi invertebrati marini, appartenenti al phylum dei Cordati e, secondo le più recenti indagini filogenetiche, *sister-group* dei vertebrati (Delsuc *et al.*, 2006). In particolare sono state isolate le sequenze di mRNA codificante per MT da *Ciona intestinalis*, *Molgula manhattensis* e *Asciidiella aspersa*. Un'altra sequenza dall'urocordato *Herdmania curvata* è annotata in GeneBank come sequenza parziale per MT. La comparazione con le sequenze isolate dagli altri tunicati ha rivelato essere l'intera sequenza codificante con le regioni 3' e 5' UTR.

L'allineamento di queste 4 sequenze dimostra un elevato grado di conservazione all'interno del subphylum Tunicata sia a livello di sequenza nucleotidica che di sequenza aminoacidica. Non solo la posizione dei residui cisteinici, che formano i tipici cluster delle MT, è perfettamente conservata, ma anche la lunghezza della sequenza è molto simile, tra 39 e 41 aminoacidi. Questa caratteristica sembra essere prerogativa delle MT dei tunicati che risultano le più corte fino ad ora descritte nell'ambito dei deuterostomi, dove solitamente si riscontrano lunghezze dell'ordine di 65 aminoacidi. Questa differenza in lunghezza, insieme al fatto che solo il 30% circa degli aminoacidi (i residui cisteinici) sono conservati, spiega i bassi livelli di identità e similarità di sequenza riscontrati tra i deuterostomi.

Una indagine approfondita è stata condotta sulla MT di *C. intestinalis*, unico urocordato per cui è disponibile la sequenza dell'intero genoma.

Attraverso una ricerca BLAST, utilizzando cDNA da me prodotto, ho individuato un unico gene per MT (*CiMT-1*) all'interno dello scaffold 186. La struttura

introne/esone del gene mantiene la caratteristica organizzazione tripartita (tre esoni e due introni) del gene per MT dei vertebrati. In questi la lunghezza degli introni è variabile, ma mantengono la posizione relativa di questi ultimi: il primo introne interrompe la sequenza all'aminoacido 9, mentre il secondo la interrompe all'aminoacido 31 o 32 dove c'è la congiunzione tra dominio α e β (Hamer, 1986). Come detto, in *CiMT-1* viene mantenuta la struttura, ma il primo introne interrompe la sequenza aminoacidica alla posizione 8, mentre il secondo introne cade all'interno della regione 3'UTR. Questa situazione ricorda quella degli echinodermi dove l'ultimo (terzo) introne cade nella regione 3'UTR (Nemer *et al.*, 1985). Sempre dal genoma ho considerato le prime 1000 pb a monte del gene come possibile regione promotrice e su questa sono riuscito ad individuare le sequenze putative riconosciute da diversi fattori di trascrizione tipicamente coinvolti nella trascrizione delle MT. La trascrizione indotta da metalli nei metazoi è normalmente regolata dal legame dei *metal transcription factor* con particolari sequenze presenti nelle regione promotrici dei geni per le MT chiamate *Metal responsive elements* (MRE). Gli MRE, solitamente, sono presenti in copie multiple orientati sia in direzione 3'-5' che 5'-3' (Coyle *et al.*, 2002). La sequenza TGCRNC è conservata, mentre i nucleotidi che la fiancheggiano possono mostrare differenze marcate (Imbert *et al.*, 1990; Samson and Gedamu, 1998). Nella regione promotrice di *CiMT-1* sono presenti 4 MRE putativi con la sequenza canonica conservata; tre di questi orientati 5'-3' (indicati come MREa, c, d in Fig. 10) e uno orientato 3'-5' (indicato come MREb in Fig. 10).

Anche gli *antioxidant responsive element* (ARE) sono comuni nelle regioni promotrici delle MT dei vertebrati e degli invertebrati (Rushmore *et al.*, 1991; Dalton *et al.*, 1994). La sequenza conservata (TGACNNNGC) si ritrova anche nella regione promotrice di *CiMT-1* alla posizione -600. Per di più, in *C. intestinalis*, si ritrovano tre sequenze addizionali chiamate *half-ARE* (TGAC) in posizione -112, -472 e -611 assenti nei mammiferi, ma individuate nei pesci e negli echinodermi. In particolare nei pesci è stato suggerito che possano essere responsabili della modulazione della trascrizione in risposta a stress ossidativo (Samson e Gedamu, '98). Altre sequenze riconosciute da fattori di trascrizione

sono presenti nel promotore di *CiMT-1*: un sito di legame per AP-1, TGASTCA, e una sequenza putativa di legame di GATA. Il primo è presente nei promotori di MT da molti organismi, in particolare è stato dimostrato che AP-1, nei mammiferi, è coinvolto nella proliferazione cellulare e nei processi di morte (Shaulian e Karin, 2002), mentre in *Saccharomyces cerevisiae* è coinvolto nella risposta allo stress ossidativo e nella resistenza ai metalli (Wu *et al.*, 1993). E' risaputo che i fattori leganti GATA sono coinvolti nella regolazione di geni specifici in diversi organismi (Suzuki *et al.*, 1996). In *Caenorhabditis elegans* è stato dimostrato che gli elementi GATA nel promotore delle MT (*mtl-1* e *mtl-2*) sono essenziali per la trascrizione indotta da Cd (Moilanen *et al.*, 1999). Nel protozoo ciliato *Tetrahymena thermophila* GATA è coinvolto nell'espressione di MTT5 (Formigari *et al.*, 2010).

Nel promotore di *CiMT-1*, in posizione -305, -377, -430, -487 e -589 pb, sono presenti 5 sequenze consenso per STAT. Nel 1999 un sito di legame per STAT è stato descritto per la prima volta nella regione promotrice di MT-1 di topo da Lee e collaboratori. Gli autori hanno dimostrato che esso è coinvolto nell'induzione di questa proteina da parte di citochine (IL-6).

CiMT-1 codifica per una proteina dedotta di 39 aminoacidi con una Mr calcolata di 4051 Da e 12 residui cisteinici (30,8% degli aminoacidi totali) arrangiati in quattro motivi Cys-X-Cys, un motivo Cys-X-Y-Cys e un motivo Cys-Cys. La sequenza aminoacidica oltre a differire in lunghezza rispetto alle altre MT dei deuterostomi differisce anche per la mancanza del motivo KKS che nei vertebrati unisce il dominio alfa e quello beta (Kagi, 1993). Nell'analisi filogenetica, queste differenze hanno restituito un albero che rispecchia la filogenesi universalmente accettata per i deuterostomi con gli urocordati *sister group* dei vertebrati staccati da cefalocrodati ed echinodermi.

Al fine di studiare le dinamiche di espressione genica di *CiMT-1* in presenza di metalli, ho esposto esemplari di *C. intestinalis* a CdCl₂, ZnCl₂ e CuCl₂ 10 µM. Il valore più elevato di mRNA si ottiene in presenza di Cd con livelli di trascrizione 8 volte maggiori rispetto al controllo a 96 h. In presenza di Zn e Cu invece, i valori massimi si attestano sull'ordine di 4 volte rispetto ai controlli, ma in tempi

diversi, infatti in presenza di Zn i valori massimi si raggiungono alle 72 e 96 h, in presenza di Cu i valori crescono gradualmente fino alle 120 h.

5. Discussione fitochelatino sintetasi

Le fitochelatine, e l'enzima che le sintetizza a partire dal GSH, fino a non molto tempo fa erano conosciute solo nelle piante.

Solo nel 2001 i gruppi di ricerca di Clemens e di Vatamaniuk hanno dimostrato che la fitochelatina sintetasi di *C. elegans* è un gene espresso e che l'enzima è effettivamente in grado di assemblare fitochelatine a partire da glutatione. Da allora, pochi gruppi di ricerca nel mondo si sono occupati di questo enzima e del suo prodotto in organismi che non fossero fotosintetici e fino ad ora nulla si sapeva per quel che concerne il phylum dei Cordati. La fitochelatino sintetasi di *C. intestinalis* rappresenta quindi il primo gene descritto e studiato non solo nell'ambito dei Cordati, ma anche in quello di tutti i deuterostomi.

L'analisi BLAST, contro il genoma di *Ciona*, della sequenza di mRNA ha restituito un gene composto da due soli esoni. Tale situazione è dissimile da quella di *C. elegans* che ne possiede 5 e da quella di *A. thaliana* che ne possiede 9. Il gene *CiPCS* è localizzato nel cromosoma 7 e la regione promotrice a monte non possiede MRE, ma possiede una sequenza ARE e 3 sequenze *half-ARE*. Questo assetto risulta anomalo rispetto a quelli delle piante e dei nematodi.

Infatti nel promotore della PCS di *A. thaliana* non sono presenti sequenze MRE o ARE. Il gene non è inducibile ed infatti non vi è aumento trascrizionale in seguito ad incubazione di metalli o altra forma di stress. E' necessario notare che le sequenze MRE e ARE sono presenti nelle regioni promotrici di alcune piante (Dong *et al.*, 2010).

Nel promotore di *C. elegans* ho individuato una sequenza MRE putativa, ma nessun dato è presente in letteratura sui livelli di espressione della PCS in questo nematode. C'è da considerare che Brulle e collaboratori (2008) hanno evidenziato un aumento di trascritto per la fitochelatino sintetasi di *Eisenia fetida* in risposta a

Cd, ma non essendoci sequenze di genoma disponibili per questo organismo o per altri anellidi, non ho potuto verificare l'eventuale presenza di sequenze MRE nella regione promotrice. Di conseguenza rimane aperta la questione se nei metazoi, a differenza delle piante, la PCS possa avere anche una regolazione a livello trascrizionale e non solo post traduzionale.

Il gene *CiPCS* codifica per una proteina dedotta di 466 aminoacidi che nel complesso mostra valori di identità di sequenza del 30% circa con le PCS delle piante e dei metazoi mantenendo conservata, come di prassi per le piante, la regione N-terminale (contenente il dominio *phytochelatin*) e variabile la parte C-terminale. Fondamentali per il corretto funzionamento dell'enzima sembrano essere 5 residui cisteinici deputati al riconoscimento e al legame dello ione metallico e la coppia His-Asp fondamentale per la sintesi delle fitochelatine. In *Ciona*, i 5 residui cisteinici sono conservati, ma l'Asp è sostituito dall'Glu.

Nell'analisi filogenetica le PCS si separano nettamente nei gruppi dei cianobatteri, alghe verdi, dicotiledoni, monocotiledoni e metazoi a dimostrare una storia evolutiva divergente dei diversi cluster.

Al fine di dimostrare che *CiPCS* fosse un gene espresso e per capire le dinamiche di espressione genica in presenza di metalli, ho esposto esemplari di *C. intestinalis* a CdCl_2 , ZnCl_2 e CuCl_2 10 μM . In presenza di Zn i valori di trascritto non si separano significativamente dai valori di controllo il che farebbe pensare ad una mancata induzione in presenza di questo metallo. In presenza di Cu i livelli di trascritto aumentano alle 48 h attestandosi su valori doppi rispetto ai controlli fino a fine trattamento. In presenza di Cd i valori di PCS restano vicini a quelli dei controlli con la sola eccezione del campione alle 96 h che spicca con un valore 6 volte superiore a quello dei controlli.

6. Detossificazione in *C. intestinalis*

E' noto che in *C. intestinalis* sono assenti organi deputati alla detossificazione come reni e fegato nei vertebrati. Oramai però si concorda sul fatto che in questi organismi siano gli emociti i maggiori responsabili della detossificazione (Shida *et al.*, 2003).

Per capire quali tessuti fossero responsabili della trascrizione dei geni *CiMT-1* e *CiPCS* ho condotto esperimenti di ibridazione *in situ* su sezioni istologiche dell'apparato digerente e degli ovari. Questa scelta è motivata dal fatto che, essendo questi organismi filtratori, gli epiteli del sifone orale, dello stomaco e dell'intestino sono i primi a venire in contatto con il flusso d'acqua inquinata. Inoltre un lavoro del 2005 di Erk e collaboratori sull'accumulo di Cd in *Ciona* mostra come la tunica ed il tratto digerente siano i siti maggiormente interessati. L'ovario è stato preso in considerazione per ampliare le indagini sull'accumulo in un organo specifico.

I dati hanno rivelato che le uniche cellule che mostrano marcatura alle ribosonde per *CiMT-1* e *CiPCS* sono le cellule follicolari che circondano gli ovociti all'interno dell'ovario e gli emociti nelle lacune emolinfatich. Un'analisi più approfondita di ISH sui soli emociti estratti da organismi trattati con Cd ha evidenziato come siano solo i granulociti i responsabili della trascrizione di *CiMT-1* e *CiPCS*. Un dato emerso dall'analisi istologica è che, in seguito a trattamento con Cd, il numero di emociti presenti nella tunica è triplicato rispetto agli organismi di controllo. Inoltre è aumentato anche il numero degli emociti marcati. Tale dato suggerisce l'ipotesi che vi sia un reclutamento di queste cellule responsabili della detossificazione, dalle lacune emolinfatich alla tunica. Questa osservazione messa in relazione all'andamento di espressione per *CiMT-1* e *CiPCS*, in seguito a trattamento con Cd, permette di ipotizzare un meccanismo complesso di risposta allo stress che coinvolge delocalizzazione e proliferazione cellulare.

Per verificare questa ipotesi ho isolato e studiato l'andamento di espressione del gene per l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA). Per prima cosa ho controllato l'effettiva trascrizione del gene, trattandosi, anche in questo caso, di sequenze annotate automaticamente e del quale non esistono studi in letteratura. *CiPCNA* è un gene localizzato nel cromosoma 12 composto di un singolo esone che codifica per una proteina di 262 aminoacidi. I valori di identità di sequenza si attestano su circa il 72% paragonata con le sequenze di PCNA da vertebrati (tabella), valori che salgono a circa 78% con PCNA da altri urocordati, ma crollano a circa 36% se confrontata con PCNA da *S. purpuratus*. Dall'analisi filogenetica emerge che la sequenza di *Ciona* si posiziona con quelle degli altri urocordati e ben separata non solo dagli echinodermi, ma anche dal gruppo dei vertebrati e cefalocordati. Questo ultimo dato è in disaccordo con la nuova e accreditata teoria che vede gli urocordati come *sister group* dei vertebrati e non i cefalocordati, come invece ritenuto fino a pochi anni fa. Va sottolineato però che questo tipo di analisi si riferisce ad una sola sequenza e quindi non può essere considerato valido per discussioni più ampie sulla filogenesi dei Cordati.

I livelli di trascrizione in organismi di controllo sono molto bassi, ma crescono enormemente in presenza di Cd con un massimo alle 96 h e con valore di circa 55 volte superiore ai controlli. L'ibridazione *in situ* con sonda antisense per *CiPCNA* su organismi trattati con Cd rivela come il segnale è localizzato solo a livello degli emociti nelle lacune emolinfatiche. L'evidenza riportata, di un forte aumento di emociti nella tunica dopo 24 h di trattamento con Cd, ci induce a supporre che essi migrino dalle lacune emolinfatiche alla tunica.

L'aumento di espressione di *CiPCNA* a 96 h induce a pensare che tale migrazione sia seguita da proliferazione cellulare degli emociti in circolo. A quello stesso tempo corrisponde anche il massimo di trascrizione di *CiMT-1* e *CiPCS* nei granulociti.

Pertanto la risposta del trattamento a Cd in *Ciona* suggerisce una sequenza di fasi che portano alla detossificazione e che vengono di seguito riassunte.

Il metallo già dopo 6 h induce la MT. Dopo 24 h molti granulociti si sono spostati nella tunica con conseguente impoverimento di questa popolazione emocitaria

nelle lacune emolinfatiche e questo spiegherebbe l'abbassamento dei valori di mRNA per *CiMT-1*. L'aumento alle 48 h della trascrizione di *CiPCNA* indica proliferazione degli emociti nelle lacune emolinfatiche, come dimostra l'ISH. Questa proliferazione culmina alle 96 h dove si osservano i massimi di espressione non solo per *CiPCNA*, ma anche per *CiPCS* e *CiMT-1*. Alle 120 h è possibile che si verifichi una nuova ondata di migrazione emocitaria nella tunica o un collasso del sistema che non sarebbe più in grado di far fronte alla tossicità del metallo. Entrambi le ipotesi spiegherebbero il repentino abbassamento dei valori di espressione di *CiMT-1* e *CiPCS*, mentre solo la seconda spiegherebbe anche l'abbassamento di *CiPCNA*.

Questo andamento è confermato dal saggio TUNEL che dimostra che gli emociti presenti nella tunica sono in un avanzato stato di senescenza. Possiamo con buona approssimazione supporre che essi abbiano accumulato il Cd. L'evidenza del saggio TUNEL conferma che la migrazione emocitaria nella tunica rappresenta un sistema di eliminazione degli ioni metallici in un sito di accumulo.

7. Risultati SOD, GCLC, GS, GPX7

7.1 Cu/Zn superossido dismutasi

In GeneBank (a.n. XM_002121064) è disponibile una sequenza registrata come “PREDICTED: *Ciona intestinalis* similar to copper/zinc superoxide dismutase” lunga 896 pb. Su questa sequenza sono stati costruiti 2 primer specifici (Tabella 2) per l’amplificazione.

L’utilizzo della coppia di primer SOF/SOR ha dato, come atteso, un amplificato in reazione di PCR di 457 pb che, sequenziato ha confermato la presenza di un mRNA identico alla Cu/Zn superossido dismutasi (SOD) predetta per *C. intestinalis*.

La sequenza registrata in GeneBank è stata quindi analizzata *in silico* e sono state individuate le regioni UTR e CDS. L’mRNA completo per la SOD di *C. intestinalis* è lungo 896 pb di cui 301 pb compongono la 5’ UTR, 504 pb compongono la CDS e 91 pb compongono la 3’ UTR. La CDS codifica per una proteina lunga 167 aminoacidi che, nella porzione centrale, contiene l’intero dominio conservato *Cu-Zn_Superoxide_Dismutase superfamily*.

Il confronto tra la CiSOD e le SOD da altri organismi è riportato in Tab. 8.

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|--------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 25,7 | 53,1 |
| <i>Cavia porcellus</i> | 24,7 | 52,3 |
| <i>Ailuropoda melanoleuca</i> | 24,1 | 52,3 |
| <i>Canis lupus</i> | 22,7 | 47,1 |
| <i>Melopsittacus undulatus</i> | 25,1 | 47,4 |
| <i>Gallus gallus</i> | 24,0 | 49,1 |
| <i>Bufo gargarizans</i> | 21,1 | 46,8 |
| <i>Xenopus laevis</i> | 19,9 | 44,4 |
| <i>Branchiostoma floridae</i> | 24,6 | 50,3 |

| | | |
|--------------------------------------|------|------|
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 16,2 | 40,1 |
|--------------------------------------|------|------|

Tabella 8: Comparazione della sequenza amminoacidica della SOD di *C. intestinalis* con quelle di altri deuterostomi mediante l'utilizzo del programma ALIGN. Bianco: mammiferi; arancione: uccelli; rosso: anfi; verde: cefalocordati; rosa: echinodermi.

Dall'allineamento condotto con ClustalW delle 11 sequenze amminoacidiche è possibile notare che nella Cu/Zn-SOD di *C. intestinalis* mancano due residui di istidina implicati nella coordinazione dello Zn, ma risultano conservati i residui responsabili della coordinazione del Cu e l'aggancio allo ione superossido (Figura 25).

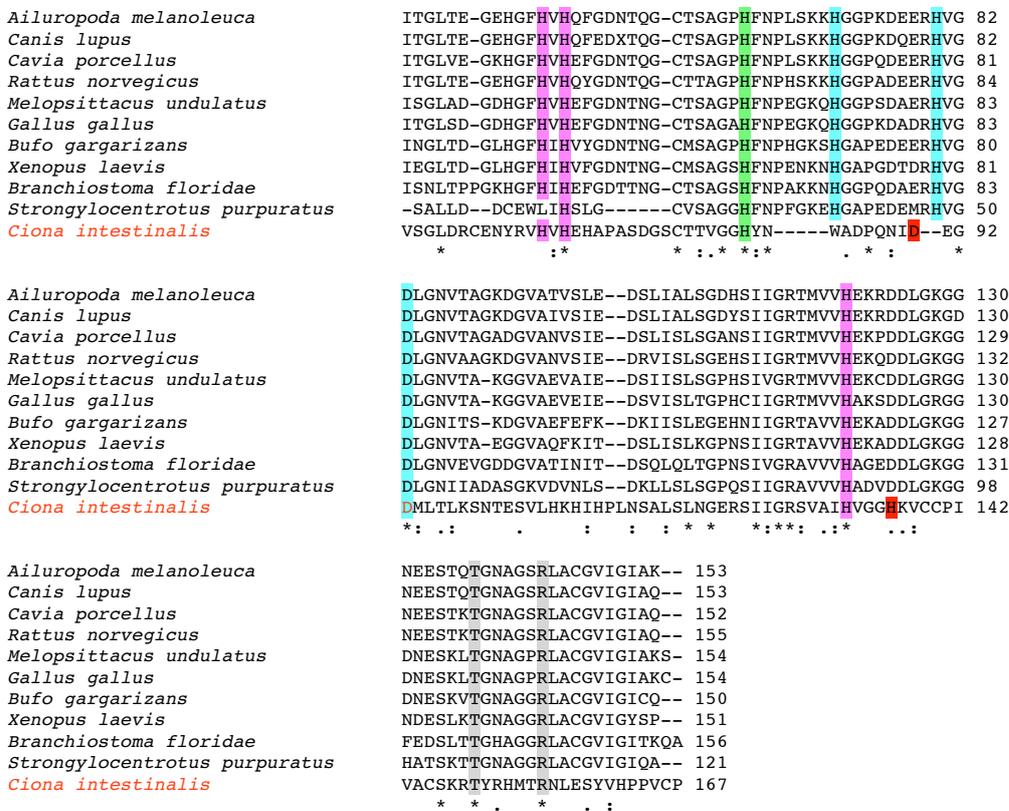


Figura 25: parziale allineamento di 11 sequenze amminoacidiche delle Cu/Zn-SOD di deuterostomi, ottenuto con CLUSTALW. Gli aminoacidi evidenziati in fucsia coordinano lo ione rame nel sito catalitico, quelli in azzurro lo ione zinco. In rosso i due probabili coordinatori dello zinco in *C. intestinalis*. L'istidina evidenziata in verde funge da ponte fra i due ioni metallici negli altri deuterostomi. Gli aminoacidi in grigio guidano l'anione superossido verso il sito catalitico.

- * = completamente conservato (amminoacidi identici)
- := altamente conservato (amminoacidi molto simili)
- . = sostituzione conservata (amminoacidi simili)

Nella ricostruzione filogenetica condotta utilizzando i metodi del neighbour joining, *maximum parsimony*, *minimum evolution* ed UPGMA, solo le SOD dei vertebrati risultano separate dalle altre prese in esame (Fig. 26).

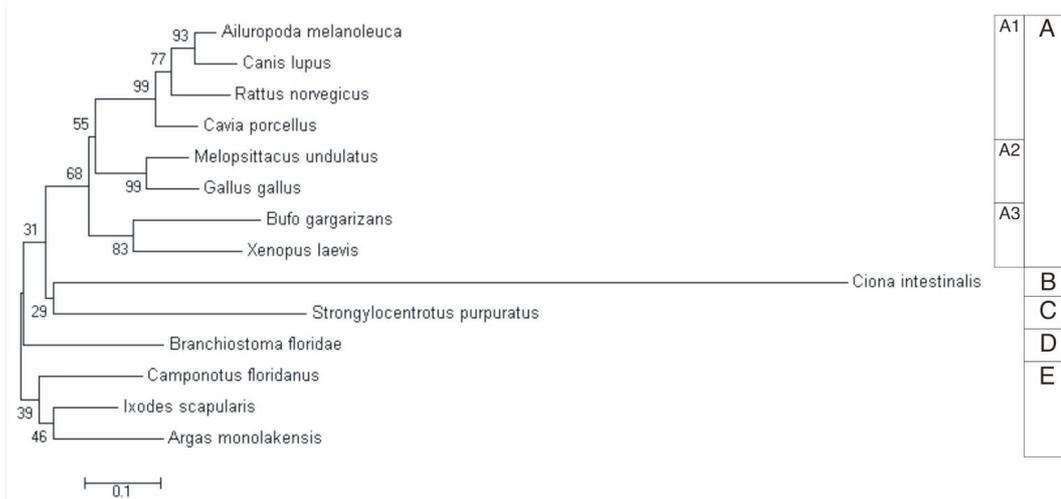


Fig 26. filogramma ottenuto con il metodo del neighbour joining considerando le sequenze dalla tabella 1. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. A: vertebrati; B: urocordati; C: echinodermi; D: cefalocordati; E: insetti (outgroup); A1: mammiferi; A2: uccelli; A3: anfibi

Al fine di individuare il gene per la SOD è stata fatta una ricerca blast contro il genoma di *Ciona*. L'esito ha confermato la presenza del gene in una sola regione, appartenente al cromosoma 14. Il gene *CiSOD* è composto di 6 esoni (lunghi rispettivamente 276, 71, 74, 146, 124 e 205 pb) e 5 introni (lunghi rispettivamente 3549, 325, 410, 440 e 210 pb) (Fig. 27). I siti di splicing sono del tipo canonico: GT e AG.

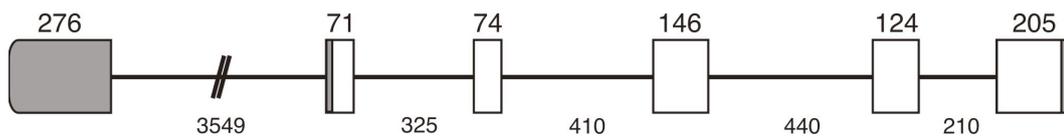


Fig. 27: rappresentazione schematica dell'organizzazione introne/esone di *CiSOD*. I rettangoli rappresentano gli esoni, le linee gli introni. In grigio le regioni UTR degli esoni. I numeri si riferiscono alle lunghezze in paia di basi (pb).

```

C
CGCGTTATGCTTATTATGCTTTCACCCACACATTGCAAAGGCGGAAAAGTTTTGTTGGAAC
AACGAGGGTCTACGGTTC AATTCATACCGAAGGTGGTTATTGGACTATACGCCAGGTCA
CAAGACGTCGCCCGCTGTAAAAAGTCATGCATACAGAATACAGTGCCTTACATTGAAACA
GCTTTAATTTGACAATGAGCATGGGAGGCAACCATGGATAAGTCGCTCAAGTTGCACCC
ACGAGGATATAAATGACCAAACGAAATTAAGGTTTTGAATTGCACCGCATTAGAA
1 M K L F F L F T L F V A S V A G S K Y A
1 ATGAAATTGTTTTTTCACGCTTTTCGTTGCTTCAGTGCAGGATCTAAATACGCC

21 H C M F K Q Q E P V S G H I C F T E K H
61 CATTGTATGTTCAAACAACAAGAACCAGTGTGGGCCATATCTGCTTTACTGAGAAACAT

41 G G Q V E A H V Q V S G L D R C E N Y R
121 GGTGTTCAGGTCAAGCTCACGTTCAAGTAAGTGGTTGGATCGTTGTGAGAATTACAGG

61 V H V H E H A P A S D G S C T T V G G H
181 GTTCATGTGCACGAACATGCGCCAGCTAGCGACGGCTTGTACGACGGTGGGCGGCAT

81 Y N W A D P Q N I D E G D M L T L K S N
241 TATAACTGGGCGGATCCACAAAATATAGACGAAGGCGACATGTTAACACTTAAGACAAAC

101 T E S V L H K H I H P L N S A L S L N G
301 ACTGAGTCGGTGTGCATAAACATATTCACCCGTTGAATAGTGCCTGTCTTAAATGGG

121 E R S I I G R S V A I H V G G H K V C C
361 GAAAGATCTATTATTGGAAGATCGGTTGCTATCCAGTCGGTGGTACAAAAGTTTGTCTG

141 P I V A C S K R T Y R H M T R N L E S Y
421 CCAATAGTCGCTGACGTAAGCGGACATATCGACACATGACCCGAAATTTGGAGAGTTAC

161 V H P P V C P -
481 GTTCACCCCGAGTTTGCCCATAAAGACAAAATCAACCGTTAATTCAGCAGCATTTCATTA
CATCTATCTCAATTATACAATTTGCGATAAAAAAATATAAGTTTAAACGATTA

```

Fig. 28: Il mRNA per *CiSOD* con la traduzione *in silico* della CDS. 5' e 3' UTR sono sottolineati. La numerazione si riferisce alla CDS e alla proteina dedotta.

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiSOD* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di esemplari di *C. intestinalis* trattati con Cd, Zn e Cu rispettivamente 10 µM. In presenza di Cd si osserva un aumento di espressione significativo solo alle 120 h. In presenza di Zn non si riscontrano variazioni significative fino alle 48 h a cui segue un incremento alle 72 e 96 h e quindi un abbassamento ai valori di controllo a fine trattamento. In presenza di Cu vi è un aumento di espressione alle 48 h, una diminuzione alle 72 h e 96 h e di nuovo un incremento significativo alle 120 h (Fig. 29).

La localizzazione del messaggero per *CiSOD* è stata condotta per mezzo di ISH su sezioni istologiche da animali trattati con Cd 10 µM.

Le cellule maggiormente coinvolte nella trascrizione del gene appaiono essere gli emociti nelle lacune emolinfatiche e le cellule follicolari che circondano gli ovociti (Fig. 30).

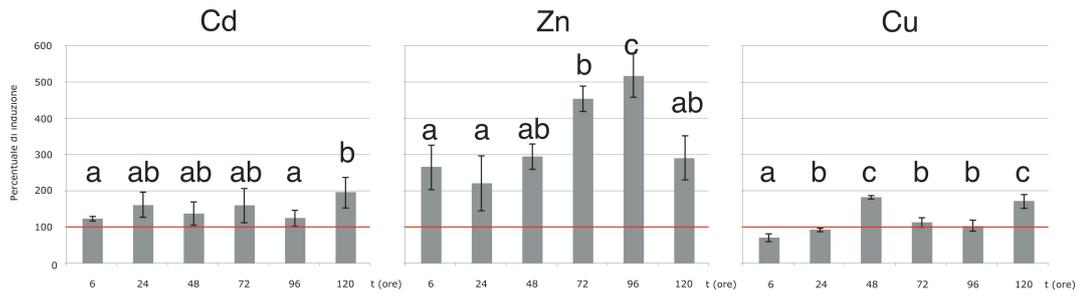


Fig. 29: espressione dell'mRNA per *CiSOD* in presenza di Cd, Zn e Cu 10 μ M. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$). La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiSOD* in organismi di controllo non trattati (100%).

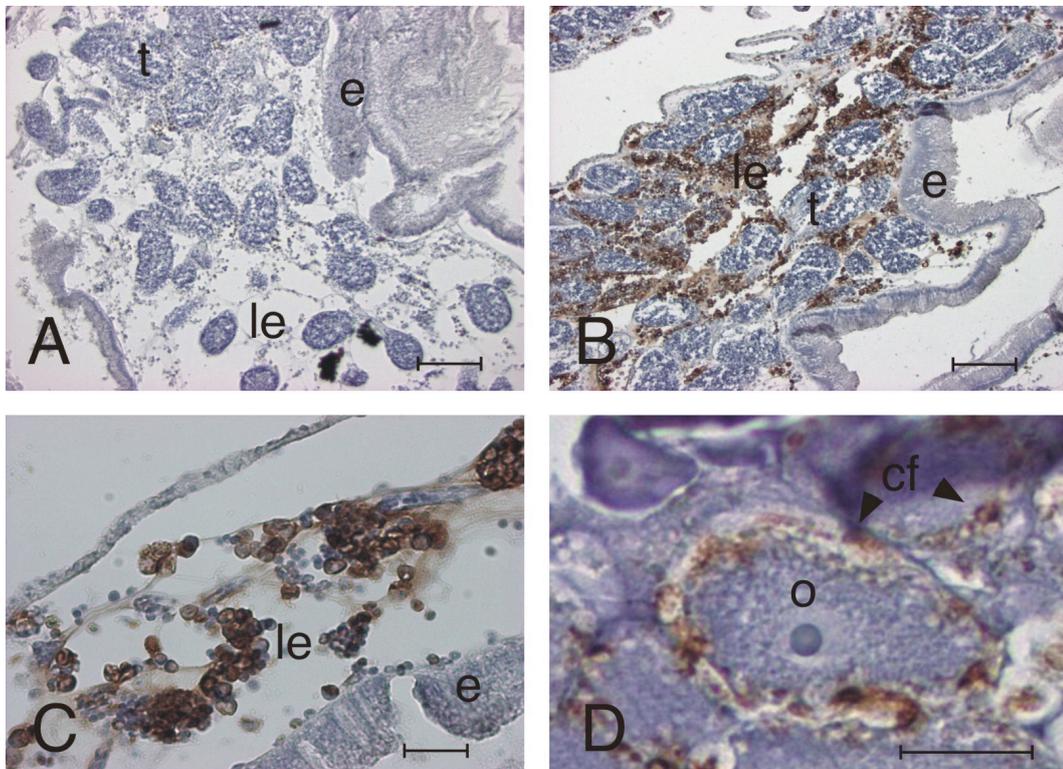


Fig. 30: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiSOD* su sezioni istologiche in paraffina. A: sezione di stomaco non trattato B: sezione di stomaco trattato con Cd; C: intestino trattato con Cd; D: ovario trattato con Cd. Barra 100 μ M. Colorazione blu: ematossilina; colorazione marrone: ribosonda. le: lacune emolinfatice; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente; o: ovocita; cf: cellule follicolari.

7.2 Glutammato cistein ligasi subunità catalitica

In GeneBank (a.n. XM_002126507) è disponibile una sequenza di mRNA registrata come “PREDICTED: *Ciona intestinalis* similar to glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit” lunga 2964 pb. Su questa sequenza sono stati costruiti 2 primer specifici (Tabella 2) per l’amplificazione.

L’utilizzo della coppia di primer GammaF/GammaR1 ha dato, come atteso, un amplificato in reazione di PCR di 602 pb che sequenziato ha confermato la presenza di una sequenza identica alla glutammato-cistein ligasi catalitica predetta di *C. intestinalis*.

La sequenza registrata in GeneBank è stata quindi analizzata *in silico* e sono state individuate le regioni UTR e CDS. L’mRNA completo per la glutammato-cistein ligasi catalitica di *C. intestinalis* è lungo 2964 pb di cui 35 pb compongono la 5’ UTR, 1941 pb compongono la CDS e 988 pb compongono la 3’ UTR. La CDS codifica per una proteina lunga 646 aminoacidi che mantiene nella porzione C-terminale il dominio conservato *GCS superfamily* tipico delle GCL.

Il confronto tra la CiGCLC e le GCLC da altri organismi è riportato in Tab. 9.

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Sus scrofa</i> | 59,8 | 80,7 |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 59,5 | 81,4 |
| <i>Canis familiaris</i> | 59,1 | 81,0 |
| <i>Ailuropoda melanoleuca</i> | 59,0 | 81,0 |
| <i>Pongo abelii</i> | 58,9 | 81,7 |
| <i>Mus musculus</i> | 58,9 | 81,6 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> | 59,4 | 81,8 |
| <i>Xenopus laevis</i> | 59,4 | 82,4 |
| <i>Danio rerio</i> | 60,1 | 82,7 |
| <i>Salmo salar</i> | 59,9 | 81,8 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 45,5 | 70,0 |

Tabella 9: Comparazione della sequenza amminoacidica della GCLC di *C. intestinalis* con quelle di altri deuterostomi mediante l’utilizzo del programma ALIGN. Bianco: mammiferi; arancione: uccelli; rosso: anfibi; blu: teleostei; rosa: echinodermi.

In particolare risulta conservata nella sequenza aminoacidica la Cys (in posizione 559) responsabile dell'attività catalitica dell'enzima (Fig. 31).

```

Canis familiaris          PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCSILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 580
Ailuropoda melanoleuca  PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCSILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 580
Oryctolagus cuniculus   PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCSILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 580
Pongo abelii            PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCSILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 580
Sus scrofa              PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCSILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 584
Mus musculus            PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCSILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 580
Taeniopygia guttata     PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCTILNYLKLKIKKRASGELMTVARWMREF 581
Xenopus laevis          PGLIPILNSYLENME-VDVDTRCTILNYLKLKIKKRASGELMTCARWMREF 581
Danio rerio             HGLIPMLNSYLENME-VDVDTRCTILNYLKLKIKKRASGDLMTMAKWMREF 584
Salmo salar             QGLIPILNSYLENME-VDVDTRCTILNYLKLKIKKRASGELMTMAKWMREF 580
Ciona intestinalis      PGFIPLIRRYLDSVE-VGVEARCSISEYLNLIKRASGEYMSAAQWIRHF 587
Strongylocentrotus purpuratus PGLIPLVYQYINTVEGVDVDTRCTISHYLKLIISDRAAGRLKTTARWIRDF 518
    *::*: : *:::* *::*:**:* .**:* **:* : *::*.*
    
```

Fig 31. allineamento parziale, ottenuto con *CLUSTALW*, delle 12 sequenze aminoacidiche per GCLC dagli organismi della tabella 1. Il residuo cisteinico fondamentale per l'attività enzimatica è evidenziato in giallo.

Nella ricostruzione filogenetica condotta utilizzando i metodi del neighbour joining, *maximum parsimony*, *minimum evolution* ed UPGMA, il cluster dei deuterostomi invertebrati si separa nettamente da quello dei vertebrati (Fig. 32).

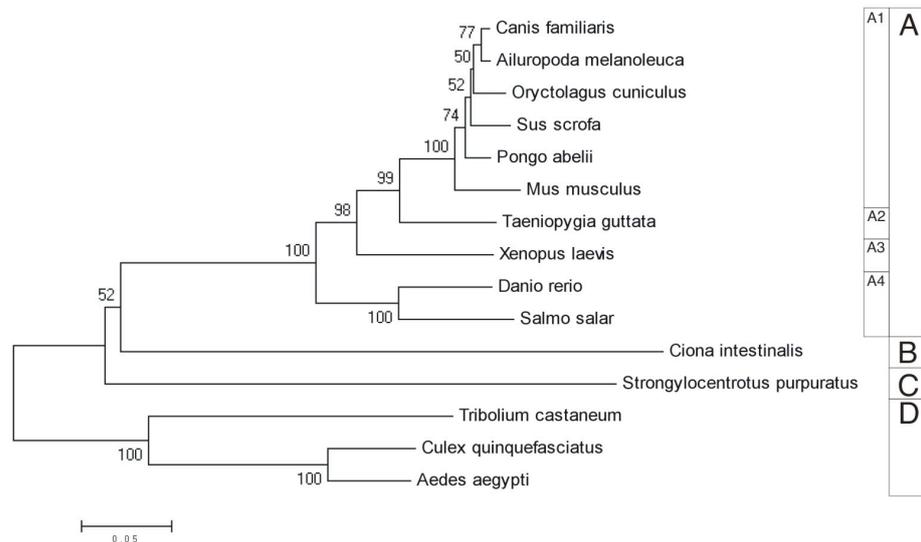


Fig 32. filogramma ottenuto con il metodo del neighbour joining considerando le sequenze dalla tabella 1. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. A: vertebrati; B: urocordati; C: echinodermi; D: insetti (outgroup); A1: mammiferi; A2: uccelli; A3: anfibi; A4: teleostei

Al fine di individuare il gene per la glutammato cistein ligasi catalitica è stata fatta una ricerca blast contro il genoma di *Ciona*. L'esito ha confermato la presenza del gene in una sola regione, appartenente al cromosoma 2. Il gene *CiGCLC* è composto di 15 esoni (lunghi rispettivamente 188, 113, 117, 63, 117, 59, 206, 134, 122, 113, 198, 145, 59, 121, 1205 pb) e 14 introni (lunghi rispettivamente 631, 451, 640, 421, 508, 510, 380, 1508, 405, 426, 499, 376, 754, 318 pb) (Fig. 33). I siti di splicing sono del tipo canonico: GT e AG.

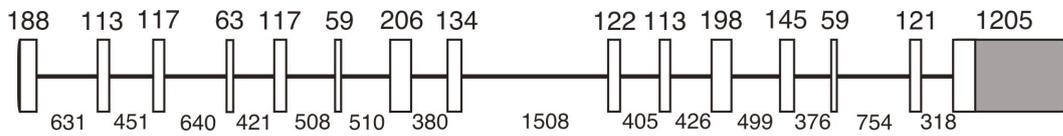


Fig. 33: rappresentazione schematica dell'organizzazione introne/esone di *CiGCLC*. I rettangoli rappresentano gli esoni, le linee gli introni. In grigio le regioni UTR degli esoni. I numeri si riferiscono alle lunghezze in paia di basi (pb).

```

CTAGACTGTGCTTGTAGTAAATTTATTATTGA
1  M G L L E F D G E P L S W Q Q L Q P Y V
1  ATGGGGTTACTTGTAGTTCGACGGTGAACCTTTATCATGGCAGCAGTTGCAGCCTTATGTA

21  E H V K S H G I Q Q F L H N Y N R L M K
61  GAACATGTAAAATCACATGGAATTC AACAGTTCTTGCACAAC TACAACCGTCTTATGAAA

41  R P G D M L K W G D E V E Y M I L K F D
121 CGACCAGGTGATATGTTGAAATGGGGTGATGAGGTGGAATACATGATTC TAAAGTTTGAC

61  H K N K K V Q L S L R G E E L C E I L Q
181 CACAAGAATAAAAAGGTCCAACCTTTCACCTCGAGGGGAAGAACTGTGTGAAATACTGCAG

81  E K E R K K M K N L T S L W R P E Y A S
241 GAAAAGGAGAGAAAAAATGAAAAATCTAACATCACTGTGGAGACCTGAATATGCAAGT

101 Y M V E G T P G V P Y L G Y M A Q F N V
301 TATATGGTGGAGGGTACGCCTGGTGTCCATACCTTGGTTATATGGCTCAGTTTAATGTG

121 V E G N M R M R R K E V Q E L L N E D E
361 GTTGAGGGCAACATGAGGATGAGGAGAAAAGAAGTTCAGGAACCTTTAAACGAGGATGAA

141 Q I M S L T V F P R L G C V N F T H P A
421 CAGATAATGAGCCTCACTGTATTTCCAAGTTGGGCTGCGTTAACCTCACCCACCCGCA

161 Y D I T G P E S N P V S R S L Y F P D Q
481 TATGACATCACGGGGCCGGAATCGAACCTGTGTCGATCTTTATATTTCCAGACCAA

181 A I T S H P R F P S L T R N I R L R R G
541 GCTATCACAGCCACCTAGATTTCCGTCTTTAACAGCAACATTCTGTTGCGAAGAGGA

201 K K V A I N I P I F K D K N T P S P F I
601 AAGAAAGTGGCAATCAACATTCCAATTTTCAAAGCAAAAACACACCTTCCCCTTCATC

221 E Q I N D P E S A A G A K P D H I Y M D
661 GAGCAAATAAATGACCCAGAGTCTGCAGTGGTGCCAAACAGACCACATATACATGGAT

241 C M G F G M G N S C L Q L T F Q A C N I
721 TGCATGGGCTTCGGAATGGGCAACTCCTGCCTTCAGCTTACTTTCAAGCTTGTAACATA

261 E E A K L L Y D H L A P V C P I M L A L
781 GAGGAGGCTAAACTTCTTTATGACCATCTCGCCCCGTTTGTCCATTATGTTGGCCCTG
    
```

281 S A A S P L Y K G Y I A D I D A R W Q V
841 AGTGCAGCATCCCCATTATACAAAAGGATATATAGCCGACATCGATGCACGATGGCAAGTT

301 I A G S V D D R T S E E L G L E P L K H
901 ATCGCGGAAGTGTTCGATGACAGAAGTACGGAAGAGTTGGGCTTGGAAACCACTTAAGCAT

321 N K Q V I R K S R Y D S I D S Y L S S N
961 AACAAACAAAGTTATCCGCAAGTCAAGATATGATTCAATTGATAGTTACCTTTCTTCAAAT

341 S K I F N D I N V E V N Q E A K S T L L
1021 TCAAAAATATTTAACGATATTAATGTGGAGGTAAATCAAGAGGCAAAGTCAACTTTACTCT

361 N A G I D E L L A Q H I A H L W I R D P
1081 AATGCAGGTATCGACGAACTTCTCGCGCAACACATCGCCCACTTGTGGATACGCGACCCG

381 L T L F S K K I D L D D E N E A D H F E
1141 TTAACCTTTGTTCTCGAAAAGATCGACCTCGACGACGAGAACGAGGCAGATCACTTTGAG

401 N I Q S T N W Q S M R F K P P P P G S S
1201 AACATCCAGTCCACCAACTGGCAGTCGATGCGGTTCAAACCTCCTCCTCCGGGATCTTCT

421 I G W R V E F R V C E A Q L T D F E N A
1261 ATTGGGTGGAGAGTCGAGTTCCGAGTTTGTGAAGCTCAACTCACCGACTTCGAAAACGCA

441 A F V V F I V L L T R V I L T Y K L D F
1321 GCATTTGTTGTTTTCATCGTTCTTCTAACTCGTGCATTTCTTACTTATAAACTTGACTTT

461 L M P L S H V D S N M E K S Q K N N A I
1381 CTAATGCCACTCTCATGTTGACAGTAACATGGAGAAGTCACAGAAAATAATGCGATC

481 L K E K F Y F R K N V N T S R S P A C C
1441 CTTAAAGAAAAGTTTACTTCAGAAAAGATGTAATACGAGTCGATCCCTTCATGTTGC

501 T Q L C S F N G K S N D N N Q N D H S D
1501 ACACAGCTTTGCTCTTTCAATGGGAAGTCTAATGATAATAACCAAAATGATCATTTCTGAT

521 C C A E M T I D T I I N G K E D V F P G
1561 TGC'TGTGAGAAAATGACCATAGACACCATTAATGAAAAGGAAGACGTGTTCCCGGGA

541 F I P L I R R Y L D S V E V G V E A R C
1621 TTCATCCCGCTCATCCGAAGATACCTTGATAGTGTGGAGGTTGGAGTGGAAAGCAAGATGC

561 S I S E Y L N L I G K R A S G E Y M S A
1681 AGCATCTCTGAGTATCTTAACCTCATAGGGAAGAGAGCATCTGGAGAATACATGAGTGCA

581 A Q W I R H F V T N H P E Y K Q D S V V
1741 GCCAGTGGATTCGACACTTTGTCACTAACCAACCTGAGTATAAACAGACTCCGTCGTC

601 T D S I A Y D L L V R C D Q I E K G E V
1801 ACTGATTCATCGCTTACGACCTTCTTGTTCGCTGTGACCAGATTGAGAAAAGGAGAAGTG

621 K C H Q L F G M P R H K S E Y I Q A N K
1861 AAATGCCACAGCTGTTTCGGCATGCCGCGCCACAAGAGCGAATACATCCAGGCAAAACAAA

641 D P M N G S -
1921 GATCCCATGAACGGTTCCTGAAACCTTTTGTCTTAAGTTTCACTTGCACTTACAAAAA
TGTTCTTTTACCGACAATTTTTAGAAATCATGATATTACCCCTAGCTCCCCCCACATG
CAATATAGGTAATTAATTTATATCTCACACCAGCCGCTAATTAGTTTGCATGGTTAGC
GTAGCACTGAAAAAGTGGTCAAGCATTAAAGTTACCCCAAAAACATTTTTTCTGACATA
TCTGGTATATAAAACACACTTTTGTTCAGTGTTTATCAGAAATTTAAAGTCTTGCAAAT
GGCAAAGGAAACATTTGGAAAAAATAACTTTTATTAATCAGATAAGCCGAAAAAATA
TTATTTACATTATGCCTGGTAGAAGAAAGTGAGAGACGATCTCTTGACAAAACACGAAATG
CAAAATACGATTGTGTATGCCTTCGTGTTTGTCTCAATCAACTTCAAGATGTAAAATAA
TCAATTTGCCAGATAGTTATGCATGACTGCCGCTCATCTGTTTCTTGTAGTATATCTGC
ATTCCAAACTAAGTGTATTTACAAAAATTTACAAATATTTGAAATATTACAAAAATCTCC
ACAATTAATACTTTTTTAAACCGTTACTTAATAAACTTTTTGGCTGTAATTTAACCACTTT
AAAAAAATTAATTTAATACTTTCTGGCTTTGTGCTTATACTTCATTAGTTTTTTGCGG
TCTTCCATATAGTGTAAACAGTAACTGTGTCCTATCTGGTGGTAGCAATGACGATGTAT
GACCTCAATTTGTAAGAACATTTGGAAGAAAACAATGTTCTGGCGTTTTATTTAAATTC
ACAGTTATTTGGGAATTAACACTACAGCGAGAGCACTCCAGATGAAAAGTGTTCATTC
AAAATGTAACCATCAAAAGGCTGTAGGCTTACTTATATATATGTTGCATTAATGCATTC
TGAAGTTAAGTTTTGTGGTAAGCAGTATTCACATAAATCGTTCAATGGC

Fig. 34: Il mRNA per CiGCLC con la traduzione *in silico* della CDS. 5' e 3' UTR sono sottolineati. La numerazione si riferisce alla CDS e alla proteina dedotta.

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiGCLC* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di esemplari di *C. intestinalis* trattati con Cd, Zn e Cu rispettivamente 10 μ M. In presenza di Cd si osserva un lieve aumento di espressione a partire dalle 72 h che permane fino alla fine del trattamento. In presenza di Zn si riscontra un incremento graduale che diventa statisticamente significativo dalle 96 h. In presenza di Cu i valori rimangono simili a quelli dei controlli senza alcuna variazione significativa (Fig. 35).

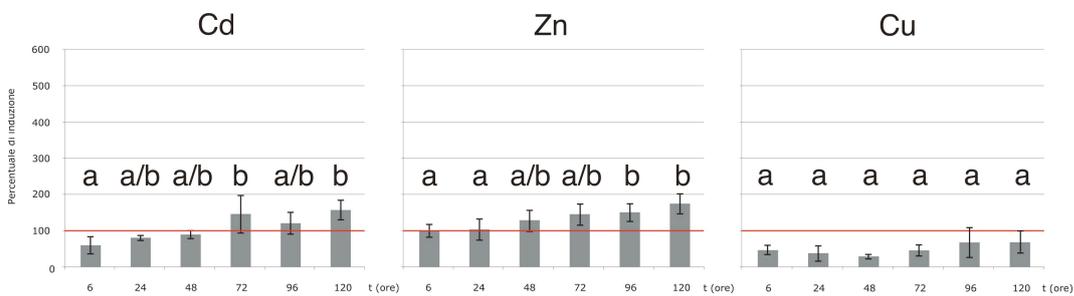


Fig. 35: espressione dell'mRNA per *CiGCLC* in presenza di Cd, Zn e Cu 10 μ M. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$). La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiGCLC* in organismi di controllo non trattati (100%).

La localizzazione del messaggero per *CiGCLC* è stata condotta tramite ISH su sezioni istologiche e colture di emociti da animali trattati con Cd 10 μ M.

Il cellule maggiormente coinvolte nella trascrizione del gene sembrano essere gli emociti nelle lacune emolinfatice e le cellule follicolari che circondano gli ovociti (Fig. 36).

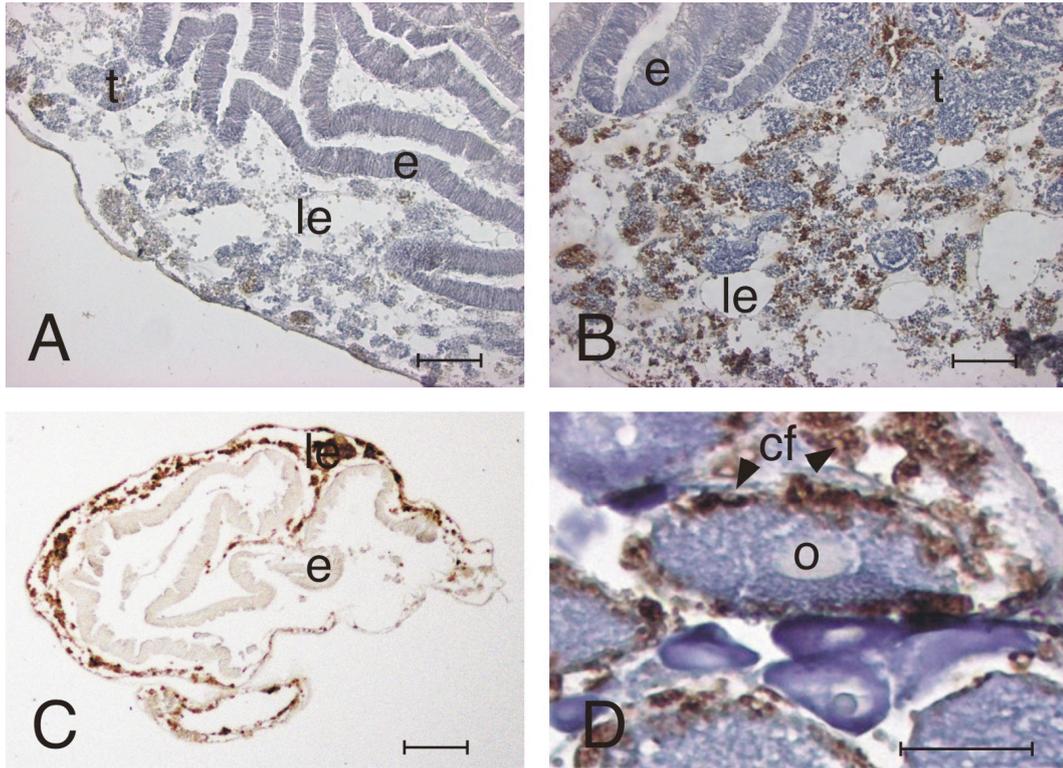


Fig. 36: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiGCLC* su sezioni istologiche in paraffina. A: sezione di stomaco non trattato B: sezione di stomaco trattato con Cd; C: intestino trattato con Cd; D: ovario trattato con Cd. Barra 100 μM. Colorazione blu: ematossilina; colorazione marrone: ribosonda. le: lacune emolinfatiche; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente; o: ovocita; cf: cellule follicolari.

7.3 Glutathione sintetasi

In GeneBank (a.n. XM_002125287) è disponibile una sequenza di mRNA registrata come “PREDICTED: *Ciona intestinalis* similar to Glutathione synthetase” lunga 1987 pb. Su questa sequenza sono stati costruiti 2 primer specifici (Tabella 2) per l’amplificazione.

L’utilizzo della coppia di primer GSF/GSR ha dato, come atteso, un amplificato in reazione di PCR di 629 pb che sequenziato ha confermato la presenza di un mRNA identico alla glutathione sintetasi (GSH) predetta di *C. intestinalis*.

La sequenza registrata in GeneBank è stata quindi analizzata *in silico* e sono state individuate le regioni UTR e CDS. L’mRNA completo per la glutathione sintetasi di *C. intestinalis* è lungo 1987 pb di cui 11 pb compongono la 5’ UTR, 1431 pb compongono la CDS e 546 pb compongono la 3’ UTR. La CDS codifica per una proteina lunga 476 aminoacidi che compongono l’intero dominio conservato *eu-GS superfamily* tipico delle GS.

Il confronto tra la CiGS e le GS da altri organismi è riportato in Tab. 9.

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Bos taurus</i> | 41,3 | 69,1 |
| <i>Homo sapiens</i> | 41,2 | 69,4 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 40,9 | 69,1 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | 40,7 | 68,7 |
| <i>Gallus gallus</i> | 40,1 | 68,8 |
| <i>Xenopus laevis</i> | 41,4 | 70,6 |
| <i>Danio rerio</i> | 36,4 | 66,9 |
| <i>Branchiostoma floridae</i> | 39,7 | 70,4 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 34,6 | 64,7 |

Tabella 9: Comparazione della sequenza amminoacidica della GSH di *C. intestinalis* con quelle di altri deuterostomi mediante l’utilizzo del programma ALIGN. Bianco: mammiferi; arancione: uccelli; rosso: anfibi; blu: teleostei; verde: cefalocordati; rosa: echinodermi.

In particolare risultano conservati nella sequenza amminoacidica i siti attivi (come M¹²⁵, I¹⁴³, K³⁰⁹, G³⁶⁵, N³⁶⁸, Y³⁷⁰, il gruppo di residui MEKI in posizione 401, E⁴²⁷,

K⁴⁵⁴), gli amminoacidi per il legame dell'ATP (M¹³⁰, I¹⁴³, K³⁰⁹, V³⁶⁵, K³⁶⁷, gruppo MEKI in posizione 401, E¹²⁷, K⁴⁵⁴) e i siti di legame per il magnesio (E¹⁴⁴, N¹⁴⁶, E³⁷¹), oltre i siti di legame per il GSH (R¹²³, A¹⁴⁸, S¹⁵⁰, E²¹⁵, N²¹⁷, Q²²¹, R⁴⁵², V⁴⁶³, A⁴⁶⁴) (Fig. 37).

```

Homo sapiens          KQDDFTARLFDIHKQVLKEGIAQTVFLGLNRSSDYMFQRSA-----DGSP- 138
Callithrix jacchus    KRDDFTARLFDIHKQVLKEGIAQTVFLGLNRSSDYMFQCCSA-----DGSP- 138
Bos taurus            KRDSFTARLFDIHKQVLKEGIAQTVFLGLNRSSDYMFQCNP-----DGSA- 138
Rattus norvegicus     KKDEYARLFDIYKQVLKEGIAQTVFLGLNRSSDYMFQCCSA-----DGSK- 138
Gallus gallus        KVDDFTARLFKIHQVLEEGLAQSVFLGINRSSDYMFQDCGA-----GSLP- 140
Xenopus laevis        KVDDFIRLFAIHKVQVQEDCTQEVFLGINRSSDYMFQDCRD-----DGTP- 138
Danio rerio           KVDDFTARLFNIYKQVQEGHAQKIVVGLNRSSDYMLDHSP-----DGRT- 138
Branchiostoma floridae QVDDFTCLRFRIYEQVRRREGVAQTVCLGLHRSSDYMLDDPSRTGQENGEPE 143
Strongylocentrotus purpuratus EGGDFTGKLFKIYQVHDEKLSKDIELGLLRTDYMLDTAR-----GESG 142
Ciona intestinalis    AVDSFVKNLFEIYKATLGNEFAQKVEIGIYRSSDYMLQKSP-----GEP- 135
    *.: .** *:. . : : : :*: *:*:*:

```

```

Homo sapiens          -----ALKQIEINTISASFGGLAS--RTPAVHRHVLSVLSSKT--KEA 176
Callithrix jacchus    -----ALKQIEINTISASFGGLAS--RTPAVHRHVLSVLSSKT--KEA 176
Bos taurus            -----ALKQIEINTVSASFGGLAS--RTPAVHRHVLSVLSGKT--KEA 176
Rattus norvegicus     -----ALKQIEINTISASFGGLAS--RTPAVHRHVLNVNLNKT--NEA 176
Gallus gallus        -----ALKQIEINTIAASFGGLAS--RTAAVHGRVLRVLGKP--EEA 178
Xenopus laevis        -----ALKQIEINTIAASFGGLAS--RTPAVHQHVLKFLRKS--EES 176
Danio rerio           -----SLKQIEINTIAASFGGLAS--RTPDVHRHILKVNLP--DEC 176
Branchiostoma floridae AKQPRLLDLQLKQIEINCIASFGGLGT--QMPGLHRHVLRLCGVSRFTAD 192
Strongylocentrotus purpuratus N-----LALSMVEMNTMAASFAALAT--NVTPLHRYVLGLCRKE--FEP 182
Ciona intestinalis    -----AVFLPKQIEINTMAASFFGIGTNKVKRLQYNLRNAGIS--FDN 177
    . : * : * : * : * : * : * :

```

```

Homo sapiens          GKILSNNPSKGLALGIAKAWELYGSPNALVLLIAQEKERNIFDRAIENE 226
Callithrix jacchus    AKILSNNPSKGLALGIAKAWELYGSANALVLLIAQEKERDIFDRAIENE 226
Bos taurus            AKILSNNPSKGLAMGIAKAWELYGSANAQVLLIAQEKERNIFDRAIENE 226
Rattus norvegicus     SKILSNNPSKGLALGIAKAWELYGSANAVLLIAQEKERNIFDRAIENE 226
Gallus gallus        ARLLPNDPARGLAMGIAKAWELYGSPSAVVMFLVKEAQRNIFDRKRCVK 228
Xenopus laevis        SSILTNDAVEGIGWGIAHAWALYGSVDATVMFLVENEQRNILDRFIEAE 226
Danio rerio           SLVLDNNPAAGLAKGLAKAWELYGSKRAVVLFVENVORNIDHYVENE 226
Branchiostoma floridae QQLPQNRAMSSLADGLAAAWELYGQSAVIVFVVQEERNAMDHWLEFA 242
Strongylocentrotus purpuratus SCIPDNQANKGLAQAIVKAFHLYGQP----- 208
Ciona intestinalis    LNMPENGALGGIARVMVEGWKKYGNPEALFVFMINKSETNIDRAIEYA 227
    : * . .: . : . : * .

```

```

Homo sapiens          LLARN--IHVIRRTFEDISEKGSLDQRRLFVDGQEIAVVYFRDGMPRQ 274
Callithrix jacchus    LLARN--IHVIRRRFEAISEKGSLDQRRLFVDGQEIAVVYFRDGMPCQ 274
Bos taurus            LLARN--IHVIRRRFEDVSEKGSLDQRRLFMDGQEIAVVYFRDGMPGH 274
Rattus norvegicus     LLDRK--IHVIRRRFEDVSEKGSLDQNRRLFMEDQEVAVVYFRDGMPSQ 274
Gallus gallus        TCHRN--IRVIRRRFRDVEQSLDSRRLYVDGQEVAVVYREGVPSN 276
Xenopus laevis        LCKRN--VRVIRRRRLADVFERGTLDEERHLFIDGYEVAVAVYFRTGVPDQ 274
Danio rerio           LWKRN--IPVIRRRQFEDVFRTGSLDESKRLFVDGHEVAIVYFRNGMPQN 274
Branchiostoma floridae AMDRNPSIRVRRYTLTQIHDRGELRPDKTLLVDGEEVAVAYFRAGIPAD 292
Strongylocentrotus purpuratus -----RDGTEVAVVLYRSCMTPHQ 227
Ciona intestinalis    MYEYDPAVKRRKVDNCISTRTRTQDGKLFIDDEEVAVVYFRTCMPDQ 277
    : . * : * : * : * : * :

```

```

Homo sapiens          YS-LQNWEARLLERSHAAKCPDIATQLAGTKKVQQELSRPGMLEMLLPG 323
Callithrix jacchus    YS-LQNWEARLLERSCAVKCPDIATQLAGTKKVQQELSRAGLMLEMLLPG 323
Bos taurus            YS-LQNWEARLLERSCAVKCPDIATQLAGTKKVQQELSRVGVLESFLPG 323
Rattus norvegicus     YN-AQNWEARLLERSCAAKCPDIATQLAGTKKVQQELSRVGLLEALLPG 323
Gallus gallus        YN-QQNWEARLLERSRAVKCPDIATQLAGTKKVQQELSCPTLEKLLPG 325
Xenopus laevis        YT-EQDWEARLMLERSRAVKCPDVPTQLVGTKKVQQELSRPQILEKFLPD 323
Danio rerio           YTSEQSWEVRLMERSVAVKCPDISTHLAGTKEVQQELARPGVLECFFPD 324
Branchiostoma floridae YPTEQEWTARLKIEQSKAIKCPCISYHLAGTKKVQQELAQPGVLEKFLD 342
Strongylocentrotus purpuratus FPTEFEWKGKLMGEQSRAVSPSISWHLVGTKKIQQELAKPGVLEQFVED 277
Ciona intestinalis    FPTNKHWEVRKLIELSSAIKSPSIAHQLVGSKKIQQVLAKPGVLEKFIKD 327
    : * : * * * . * : . : * : * : * : * :

```

```

Homo sapiens          QPEAVARLRATFAGLYSLDVGEEGDQAIAEALAAPSRFVLKPQREGGGN 373
Callithrix jacchus    QPEAVARLRATFAGLYSLNMGEEGDQAIAEALAAPSRFVLKPQREGGGN 373
Bos taurus            QPEAVARLRATFAGLYSLDLGEEGDQAITKAIAAPSCFVLKPQREGGGN 373
Rattus norvegicus     QPEAVARLRATFAGLYSLDMGEEGDQAVAEALAAPSHFVLKPQREGGGN 373
Gallus gallus        HAEAVKIRATFAGLYSLDVGEEGDQIATASPERFVLKPQREGGGN 375
Xenopus laevis        KPEAVARIRETFTGLYSLDIGEEGDEAVRVALANPDQFVLKPQREGGGN 373
Danio rerio           EPETVSQIRATFAGLYTLDMGEEGDNTVAMALANPDQYVLKPQREGGGN 374
Branchiostoma floridae -AEAVKVRATFAGQYTLELGAEGDRTVQMVTSDPGRFVMKPQREGGGN 391
Strongylocentrotus purpuratus -QEVTDFIRSSFAGQYSLDLTPEGDEAARRGIENPRRYVMKPQREGGGN 326
Ciona intestinalis    -EDAVKRLRGTFADLYSLDMNAAGDAAVKLAIEKPEGFVLKPQREGGGN 376
    : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Risultati SOD, GCLC, GS, GPX7

```

Homo sapiens          LYGEEMVQALKQLKDSEERASYILMEKIEPEPFENCLLRPG--SPARVVQ 421
Callithrix jacchus   LYGEEMVQALKQLKDSEERASYILMEKIEPEPFENCLLRPG--SPVQVVQ 421
Bos taurus           LYGEEMVQALERLKDSEERASYILMEKIEPEPFRNCLLRPG--SPARVIQ 421
Rattus norvegicus    FYGEEMVHALEQLKDSEERASYILMEKIEPEPFRNCLLRPG--SPAQVVQ 421
Gallus gallus        LYGEELRQVLERIKDSPERTSYILMDKIEPQPAVNYLLRAR--SPLKASK 423
Xenopus laevis       LYGEELKEKLQECKDSEERTSYILMDKINPKPLKNCLLRAG--GRVQISE 421
Danio rerio          IYGEICEVLEKLNSSERTAYILMDKIQPVPVQNILLRPG--APLKVSS 422
Branchiostoma floridae IFGEDIPAALNNMADVKTERTAYIVMDRIRPAVVSNYAVRPG--REPALTE 439
Strongylocentrotus purpuratus IYDDEVRTMLEKLAGNQEREGFILMDRILPPIHQNYLQPCGVFDDLKLSK 376
Ciona intestinalis   LYDSEMVEQLTEIGGDERRCAYILMEKIIPPVQKNYIIYDH---ACSMAN 423
:~::~: * . . . * . :~::~: * * * * * .

Homo sapiens          CISELGFVGVYVROEKTLMVNKHVGHLLRTKAIEHADGGVAAGVAVL DNP 471
Callithrix jacchus   CISELGFVGVYVROGKTLVMNKHVGHLLRTKAIEHADGGVAAGVAVL DNP 471
Bos taurus           CISELGFVGVYVREGKTLVMNKHVGHLLRTKAIEHADGGVAAGVAVL DNP 471
Rattus norvegicus    CISELGFVGVYVROGTTLMVNKHVGHLLRTKAIEHADGGVAAGVAVL DNP 471
Gallus gallus        CISELGFVGVYVROGTELVNAAAGHLLRTKAVEHADGGVAAGVAVL DTP 473
Xenopus laevis       CISELGMFVYVRRHQMIYYDQVGHLLRTKAIEHSDGGVAAGVAVL DNP 471
Danio rerio          CLSELGAFGAYVRKGSSELVNECVGHLLRTKSSEHADGGVAAGVAVL DNP 472
Branchiostoma floridae AVSELGIFGVFIGGDEVILNQEGGHLLRTKPSSTEDGGVAAGNALL DSP 489
Strongylocentrotus purpuratus VMSELGIYGTIIISHNGEVVLNESEGHLLRTKHTDENEGGVAAGASCVD SP 426
Ciona intestinalis   TVSELGIFGAFITNGDEVTDSTVGHLLRSKSDKHKDGGVAAGVAVL DSP 473
:**** :. : . : . : . *****: * . :***** : :~::~:

```

Fig 37: allineamento parziale di 10 sequenze amminoacidiche delle GSH di deuterostomi, ottenuto con *CLUSTALW*. Evidenziati in verde i siti catalitici, in fucsia i siti di probabile legame dell'ATP, in giallo i siti di legame per il magnesio e in rosso i siti di legame per il GSH. In grigio i siti che hanno sia attività catalitica sia di legame per l'ATP.

* = completamente conservato (amminoacidi identici)

: = altamente conservato (amminoacidi molto simili)

. = sostituzione conservata (amminoacidi simili)

Nella ricostruzione filogenetica condotta utilizzando i metodi del neighbour joining, *maximum parsimony*, *minimum evolution* ed UPGMA, le GS dei deuterostomi invertebrati si separano da quelle dei vertebrati (Fig. 38).

Al fine di individuare il gene per la glutatione sitetasi è stata fatta una ricerca blast contro il genoma di *Ciona*. L'esito ha confermato la presenza del gene in una sola regione, appartenente al cromosoma 3. Il gene *CiGS* è composto di 9 esoni (lunghi rispettivamente 133, 146, 76, 424, 70, 185, 82, 180 e 663 pb) e 8 introni (lunghi rispettivamente 164, 89, 65, 120, 373, 64, 63 e 198 pb) (Fig. 39). I siti di splicing sono del tipo canonico: GT e AG.

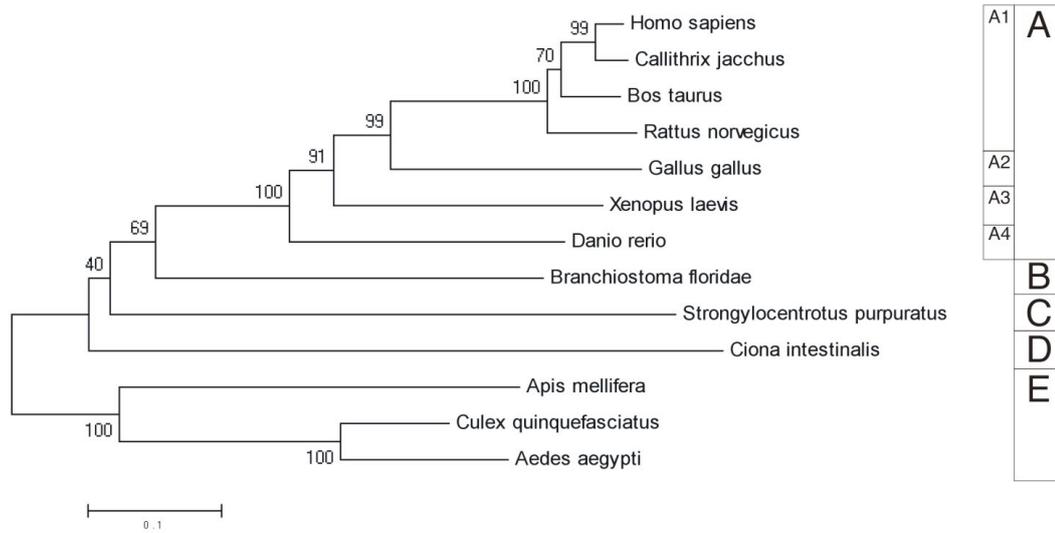


Fig 38. filogramma ottenuto con il metodo del neighbour joining considerando le sequenze dalla tabella 1. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. A: vertebrati; B: cefalocordati; C: echinodermi; D: urocordati; E: insetti (outgroup); A1: mammiferi; A2: uccelli; A3: anfibi; A4: teleostei

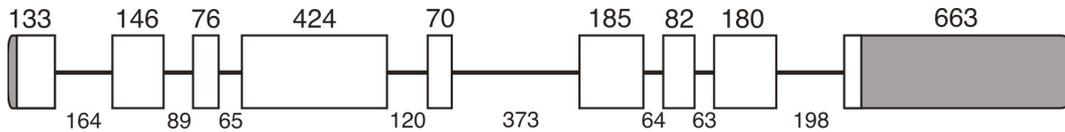


Fig. 39: rappresentazione schematica dell'organizzazione introne/esone di *CiGS*. I rettangoli rappresentano gli esoni, le linee gli introni. In grigio le regioni UTR degli esoni. I numeri si riferiscono alle lunghezze in paia di basi (pb).

ATTTAAATA

```

1  M Q N I A T D V C V T K H M V N D A V D
1  ATGCAGAACATGCAACTGATGATGTGTTACCAAGCACATGGTTAATGATGCTGTTGAT

21  F S H A T G I V M L N K P D E S S G D R
61  TTTTCTCATGCAACTGGTATTGTAATGTTAAATAAACAGATGAAAGCTCAGGGGATAGA

41  Q K S S H A P F T M Y P S S F S K S A F
121 CAAAAGAGCAGTCATGCACCGTTCACAATGTATCCATCCTCATTTCGAAAAGTCTTTT

61  S Q T Q S V Q D D I H S L F H K V S R D
181 AGTCAAACACAAAGTTCAGATGATATCCATTCCTTTCCATAAAGTCAGTAGAGAT

81  V V F L E E V L R S T I A V D S F V K N
241 GTGGTTTTTCTGGAAGAAGTCTTCGTAGTACAATGCAGTTGACAGTTTTGTGAAAAAT

101 L F E I Y K A T L G N E F A Q K V E I G
301 CTTTTGAAATTTACAAGGCAACTCTGGTAATGAATTTGCACAGAAAGTTGAAATGGT

121 I Y R S D Y M L Q K S P G E P A V F L P
361 ATTTATCGTTCTGATTACATGCTGCAGAAATCTCCTGGTGAACCTGCAGTATTTTACCC

141 K Q I E I N T M A A S F F G I G T N K V
421 AAGCAAAATGAAATAACACAATGGCAGCATCTTTTTTGGGATTGGAACAAACAAAGTT

161 K R L Q Q Y N L R N A G I S F D N L N M
481 AAAAGACTTCAACAATACAACCTAAGAAATGCAGGCATATCATTGACAATTTAAACATG
    
```

```

181 P E N G A L G G I A R V M V E G W K K Y
541 CCTGAAAATGGTGCCTTGGGTGGTATAGCAAGAGTAAATGGTAGAAGGGTGAAAAAATAT

201 G N P E A L F V F M I N K S E T N I Y D
601 GGGAATCCTGAGGCTTTATTTGTATTTATGATTAATAAAAGTGAGACAAATATATATGAC

221 Q R A I E Y A M Y E Y D P A V K V R R K
661 CAGCGTGCCATAGAATATGCAATGTATGAATACGATCCCTGCTGTTAAAGTTAGAAGAAAA

241 V F D N C I S T T R T D Q D G K L F I D
721 GTATTTGATAAATGTATATCAACAACAAGAACTGATCAAGATGGAAAACTTTTATAGAT

261 D E E V A V V Y F R T C Y M P D Q F P T
781 GATGAAAGAGTGGCAGTGGTATATTTCCGAACCTGCTATATGCCTGATCAGTTCCCAACA

281 N K H W E V R K L I E L S S A I K S P S
841 AACCAAGCACTGGGAAGTTAGGAAATGATCGAATTGAGTTCTGCAATTAATCTCCAAGC

301 I A H Q L V G S K K I Q Q V L A K P G V
901 ATTGCCCACTGCTGGTTGGTTCTAAAAAAATCCAACAAGTCTTAGCAAAACCTGGTGTCT

321 L E K F I K D E D A V K R L R G T F A D
961 TTGGAAGAGTTTATTAAGATGAGGATGCCGTCAAACGACTGCGAGGCACATTTGCAGAT

341 L Y S L D M N A A G D A A V K L A I E K
1021 CTATATTCACCTTGACATGAATGCTGCAGGTGATGCTGCTGTTAAACTTGCAATTGAAAAG

361 P E G F V L K P Q R E G G G N N L Y D S
1081 CCAGAGGGTTTTGTTTTAAACCACACGTAAGGAGGGGGAAACAATCTCTATGACTCC

381 E M V E Q L T E I G G D E R R C A Y I L
1141 GAAAATGGTTGAACAGCTTACTGAGATAGGAGGTGATGAAAGAAGATGCGCTTACATTCCTT

401 M E K I I P P V Q K N Y I I Y D H A C S
1201 ATGGAGAAAATCATACCACAGTTCAAAAAATTTATATTTATGATCATGCTTGTTCAT

421 M A N T V S E L G I F G A F L T N G D E
1261 ATGGCAAACTACTGTTAGTGAACCTGGCATTGTTGGCGCCTTTTTAACTAATGGAGATGAG

441 V T D S H T V G H L L R S K S D K H K D
1321 GTCACATGATAGCCACACTGTTGGTCAATTTATTCGATCCAAATCTGATAAACACAAAGAT

461 G G V A A G V A V L D S P I L I -
1381 GGTGGCGTTGCTGCAGGTGTAGCTGTGCTGGATTCTCCTATTTAATTTAATTTGTTTAT
TTTGTTCACAAAATAAATATAGATGTTAATGTTTTAAATAAACCCACTCAGTTTTTCAGC
TGAATAACCGCTGGACTTACAAGTACTTAATTTATGCAACCAAGGTATGTACTATTTAGA
TCAAATTTATTTGCTTTGATGTAATTTATATTTGTACCAAAATAGTTTTATATCCTATATAGT
CTATTGTAATAAATATATGGTTTACAAGTTTCAAACCTAATGTTTGTGCGTGATGATTTT
ATTCACAAATGGGTAATAAATTTAATTTTATGCAATATCTAAGTTTTGTAAATTTCC
TTAATTCAGCTTAATTTATTTGTCACCGACCATAAATACCACAATGGGTGATCTTTCTTTTC
GCAACTGTTTATTTGGTGGCAGTGTTTAACCTGTCAGTTTACATTCCTGTCACATTTA
GTTTGTAAACAATCTTTGTTTTCTTCTATTTGTTTTACTTTGACTGGCAACTTTATAT
TTAATAACAGTATTGTGATATTTATACAAATTTAGCTAATAAACAATGCTGCGTATGT

```

Fig. 40: Il mRNA per *CiGS* con la traduzione *in silico* della CDS. 5' e 3' UTR sono sottolineati. La numerazione si riferisce alla CDS e alla proteina dedotta.

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiGS* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di esemplari di *C. intestinalis* trattati con Cd, Zn e Cu rispettivamente 10 µM. In presenza di Cd si osserva un lieve aumento di espressione già alle 24 h che permane per tutta la durata del trattamento. In presenza di Zn si riscontra un picco di espressione alle 72 h seguito da un abbassamento ai valori di controllo. Anche in presenza di Cu vi è un singolo picco di espressione alle 72 h mentre agli altri tempi i valori non si discostano significativamente da quelli di controllo (Fig. 41).

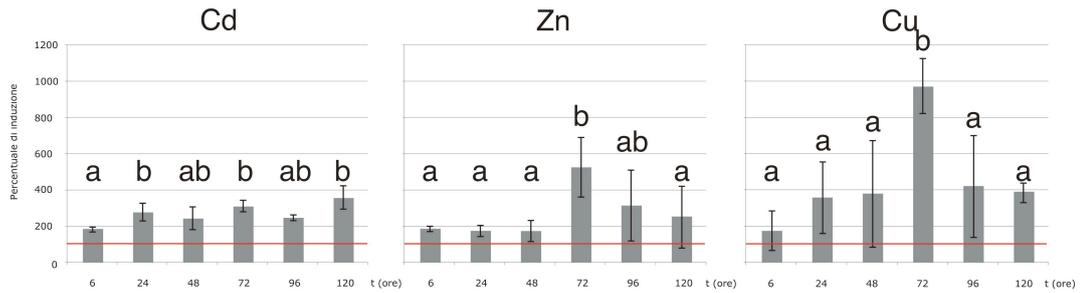


Fig. 41: espressione dell'mRNA per *CiGS* in presenza di Cd, Zn e Cu 10 μ M. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$). La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiGS* in organismi di controllo non trattati (100%).

La localizzazione del messaggero per *CiGCLC* è stata condotta tramite ISH su sezioni istologiche e colture di emociti da animali trattati con Cd 10 μ M.

Il cellule maggiormente coinvolte nella trascrizione del gene sembrano essere gli emociti nelle lacune emolinfatiche e le cellule follicolari che circondano gli ovociti (Fig. 42).

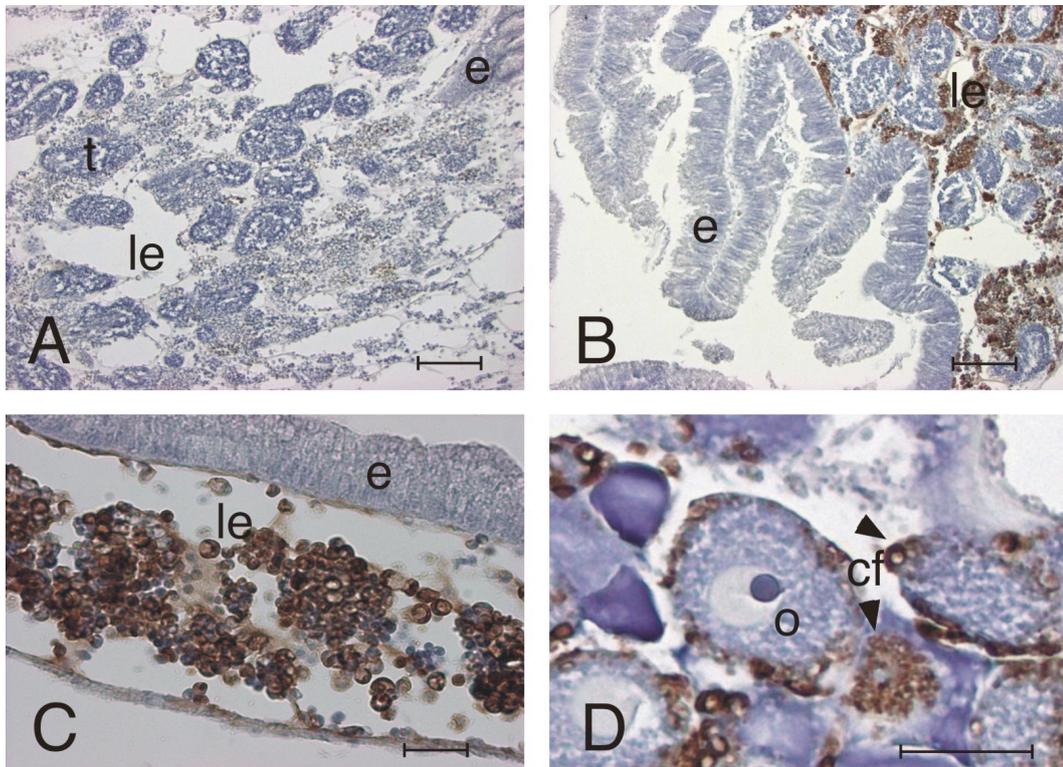


Fig. 42: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiGS* su sezioni istologiche in paraffina. A: sezione di stomaco non trattato B: sezione di stomaco trattato con Cd; C: intestino trattato con Cd; D: ovario trattato con Cd. Barra 100 μ M. Colorazione blu: ematosilina; colorazione marrone: ribosonda. le: lacune emolinfatiche; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente; o: ovocita; cf: cellule follicolari.

7.4 Glutathione perossidasi 7

In GeneBank (a.n. NM_001190351) è disponibile una sequenza di mRNA registrata come “*Ciona intestinalis* glutathione peroxidase 7” lunga 1434 pb. Su questa sequenza sono stati costruiti 2 primer specifici (Tabella 2) per l’amplificazione.

L’utilizzo della coppia di primer GPF/GPR ha dato, come atteso, un amplificato in reazione di PCR di 267 pb che sequenziato ha confermato la presenza di una sequenza identica alla glutathione peroxidase 7 (GPX7) predetta di *C. intestinalis*.

La sequenza registrata in GeneBank è stata quindi analizzata *in silico* e sono state individuate le regioni UTR e CDS. L’mRNA completo per la GPX7 di *C. intestinalis* è lungo 1434 pb di cui 58 pb compongono la 5’ UTR, 573 pb compongono la CDS e 803 pb compongono la 3’ UTR. La CDS codifica per una proteina lunga 190 aminoacidi che, nella porzione centrale, contiene l’intero dominio conservato *GSH peroxidase* tipico delle GPX.

Il confronto tra la CiGPX7 e le GPX7 da altri organismi è riportato in Tab. 10

| Specie | <i>Ciona intestinalis</i> | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|
| | % identità | % similarità |
| <i>Homo sapiens</i> | 45,5 | 73,3 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | 45,0 | 73,3 |
| <i>Bos taurus</i> | 45,0 | 72,2 |
| <i>Mus musculus</i> | 45,0 | 73,8 |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 44,0 | 72,8 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> | 47,1 | 71,2 |
| <i>Gallus gallus</i> | 42,0 | 65,6 |
| <i>Xenopus laevis</i> | 46,1 | 74,9 |
| <i>Danio rerio</i> | 46,6 | 73,8 |
| <i>Salmo salar</i> | 44,5 | 74,9 |
| <i>Branchiostoma floridae</i> | 49,0 | 72,2 |

Tabella 10: Comparazione della sequenza amminoacidica della GPX7 di *C. intestinalis* con quelle di altri deuterostomi mediante l’utilizzo del programma ALIGN. Bianco: mammiferi; arancione: uccelli; rosso: anfibi; blu: teleostei; rosa: echinodermi.

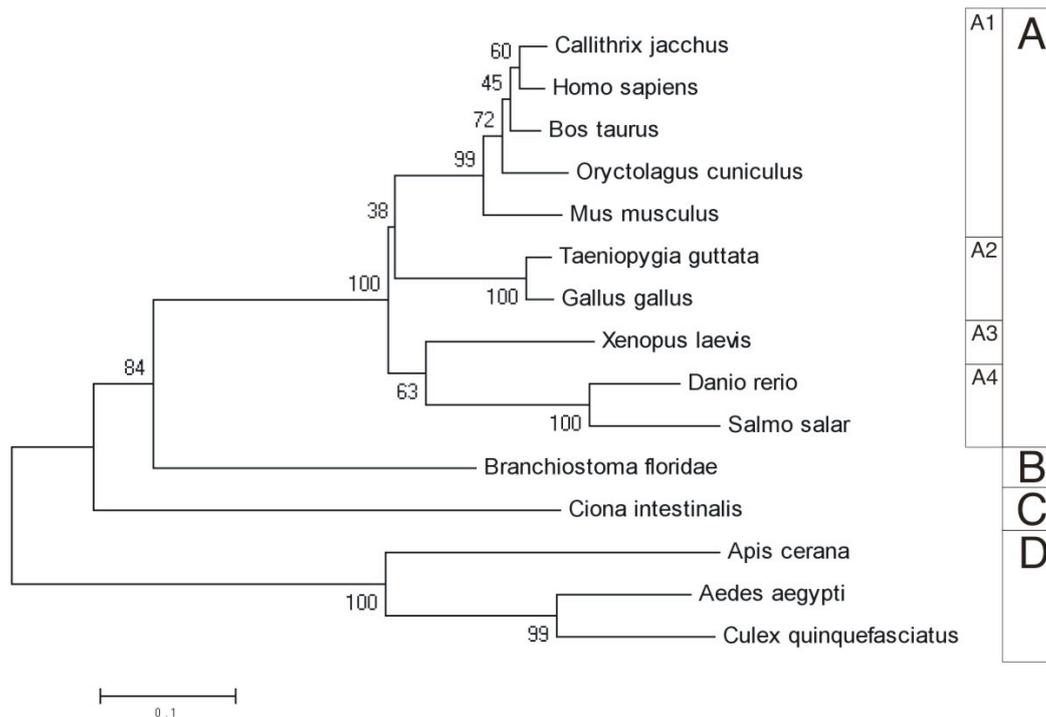


Fig 44. filogramma ottenuto con il metodo del neighbour joining considerando le sequenze dalla tabella 1. Le distanze evolutive sono calcolate con il metodo di Poisson. I numeri rappresentano i valori di bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10.000 repliche. A: vertebrati; B: cefalocordati; C: urocordati; D: insetti (outgroup); A1: mammiferi; A2: uccelli; A3: anfibi; A4: teleostei

Al fine di individuare il gene per la GPX7 è stata fatta una ricerca blast contro il genoma di *Ciona*. L'esito ha confermato la presenza del gene in una sola regione, appartenente al cromosoma 9. Il gene *CiGPX7* è composto di 3 esoni (lunghe rispettivamente 202, 268 e 911 pb) e 2 introni (lunghe rispettivamente 488 e 417pb) (Fig. 45). I siti di splicing sono del tipo canonico: GT e AG.



Fig.45: rappresentazione schematica dell'organizzazione introne/esone di *CiGPX7*. I rettangoli rappresentano gli esoni, le linee gli introni. In grigio le regioni UTR degli esoni. I numeri si riferiscono alle lunghezze in paia di basi (pb).

GTAGTGCCTCAGTAAGATTCTTGATTGGTGTGTGACAACATGGCGTAATTCAGA
1 M A R E V L R V L V L L A P L F G V F S
1 ATGGCAAGGGAGGTTCTGCGGGTTTTGGTTTTGTTGGCCCCACTGTTTGGTGTGTTTAGT
21 E N K H N G F Y D Y N V K T F D G E T V
61 GAGAAATAGCACAATGGATTTTACGATTACAATGTAAAAACTTTTGACGGGAAACAGTT
41 S L K K Y I G K V S L V V N V A S E C G
121 TCCTTGAAGAATACATCGAAAGGTTTCACTCGTGTTAATGTTGCCAGCGAGTCCGGG
61 Y T D E H Y K E L T A L Q N E L V Q K E
181 TACACAGACGAACATTACAAGGAACAACTGCACAGCAGAAATGAGCTTGTGCAAAAGGAA
81 Q P F T V L A F P C N Q F G E Q E P H D
241 CAGCGTTTACAGTCTTGTCTTCCCGTGAATCAGTTCCGGAGAACAAGAACACACAGC
101 N H Y I Q E F A S S E Y K A S F P I F A
301 AACCATTTATATACAGGAGTTTGAAGCAGCGAATACAAGCTAGCTTTCTATTTTCGGC
121 K I D V R D R D A H P A Y E F L R R S T
361 AAGATAGACGTGAGAGACAGAGACCGCATCTGCATACGAATTCCTTGAGAAGAACAGC
141 G Q E P Q W N F W K Y L L D G S G N V I
421 GGGCAAGAACCTCAGTGAACCTTCTGGAAATATTGCTGGACGGATCGGGCAACGTGATA
161 N E W G P S I S V S Q V K D E I L K A I
481 AATGAGTGGGGCCATCCATAAGTGTAGCCAAGTGAAGGACGAAATCTAAAAGCAATT
181 Q K L K N T H A E L -
541 CAAAAATGAAGAACACTCACGCGGAGTTATAAATGCTACAAAGTCAACCAAGGAATTAT
AATGAACGAAAGTTGTTCATTCGGCAGCGGAGACGTGTGTTTTGTGGCGGTGATTTACGGA
AGTGTATTATCCCGCTTATTGCATGCAGTTTTAACGGTTATTGTAACCAAAAGATATGGC
GTGTACGTGTAATAATATATGCAAAACGTAAGCATAACAGAGAAATAAAGATTGCGATATATA
TACATACGTGTTTAGAGTACATGTAGTAACCTTGGTATAAGCGTTGTCCACAGCTTACTCT
TTATAAAAACGCCCTGTTTTGTACGGTGGGGTAAGATGAGACATTATAGTTCTGTGTACAG
TATATATAGACGAAACCGTGTACCATTTAAATGAATAGCGTGATACATAGCGAATATGTT
TTATACAGTTGCCCTCTGTTTGGCCAGTTTCAACTTAAAGCGACAGGCGGAAATAATA
AGATAAAAATTTAAAAATGCATCAAGAATAGCAACCATAAAAACTATAACTCGTTCAAAC
TCGATCTTTACAGTGTCTAAATTAAGGATTTATTTTCGCTAACCACTATATCATGCTAAAA
TTGTACGAAATTCATAATAAAAAACATACACACTGCGTGTGTTAGTGTTCACATAATAT
TAGATGCGTTGAAACTGCTTGACGCTGTTGGTGTTTATACTCGCTACGTTAAGTATATAT
CTGAGCATCTAGCTTGTGCGAACAAAGAATTCGCTCAGTACGACAGGATTAATTTAT
ATCCGGTGTTTTTCATTTCTTTTGCACATAAGTTTGTGAACTGTTGTTGTGCTTCT

Fig. 46: Il mRNA per *CiGS* con la traduzione *in silico* della CDS. 5' e 3' UTR sono sottolineati. La numerazione si riferisce alla CDS e alla proteina dedotta.

L'espressione nel tempo del messaggero per *CiGPX7* è stata valutata tramite sqRT-PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto da intestini di esemplari di *C. intestinalis* trattati con Cd, Zn e Cu rispettivamente 10 μ M. In presenza di Cd e Zn non si osserva alcun aumento di espressione rispetto ai controlli. In presenza di Cu vi è un lieve aumento di espressione alla fine del trattamento, alle 120 h (Fig. 47). La localizzazione del messaggero per *CiGPX7* è stata condotta tramite ISH su sezioni istologiche da animali trattati con Cd 10 μ M.

Nessuno dei tessuto saggiati risulta positivo al saggio (Fig. 48).

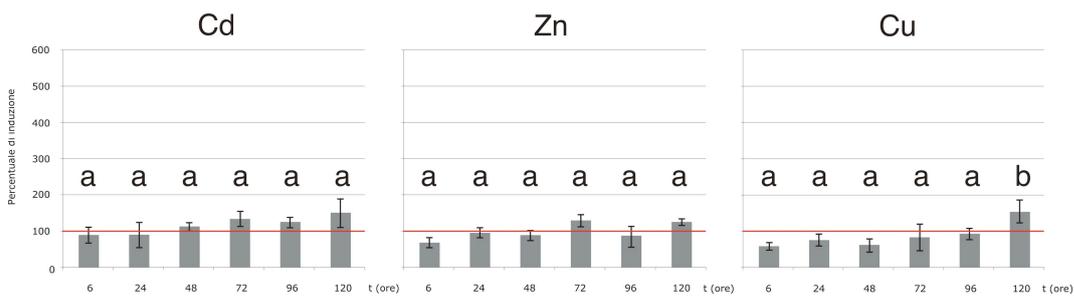


Fig. 47: espressione dell'mRNA per *CiGPX7* in presenza di Cd, Zn e Cu 10 μ M. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$). La linea rossa si riferisce ai valori di espressione dell'mRNA per *CiGPX7* in organismi di controllo non trattati (100%).

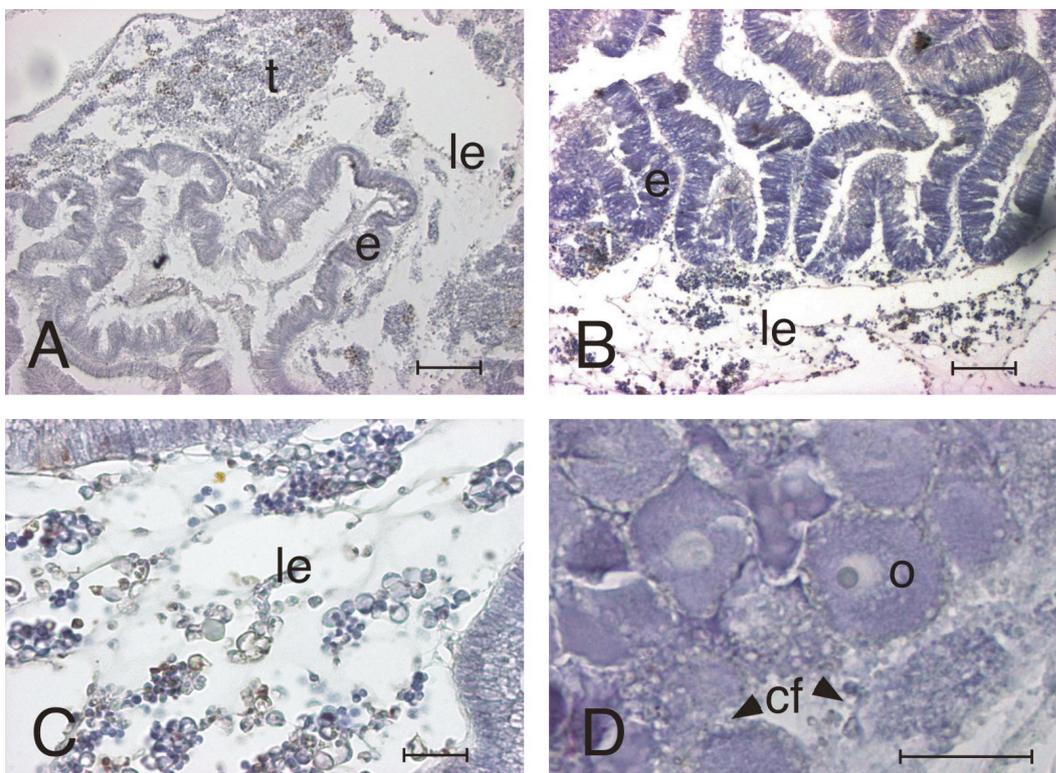


Fig. 48: Ibridazione *in situ* con sonda ad RNA antisenso per *CiGPX7* su sezioni istologiche in paraffina. A: sezione di stomaco non trattato B: sezione di stomaco trattato con Cd; C: intestino trattato con Cd; D: ovario trattato con Cd. Barra 100 μ m. Colorazione blu: ematossilina. le: lacune emolinfatiche; t: testicolo; e: epitelio del tratto digerente; o: ovocita; cf: cellule follicolari.

8. Discussione SOD, GS, GCLC, GPX7

8.1 Sequenze geniche e filogenesi

La SOD di *C. intestinalis* presenta una struttura primaria, dedotta dalla sequenza genica depositata in GeneBank, diversa rispetto alle Cu/Zn-SOD degli altri metazoi. Come è visibile dall'allineamento, la Cu/Zn-SOD mostra una dimensione pari a 167 aa superiore a quella di ratto (155 aa), e a quella di *Branchiostoma floridae*, un altro cordato invertebrato (156 aa). La diversa dimensione comporta anche una diversa disposizione dei residui amminoacidici importanti per l'attività catalitica dell'enzima i quali peraltro non sono tutti conservati. Ad esempio ritroviamo conservati la Thr in posizione 149 e l'Arg in posizione 155 che guidano l'anione superossido verso il sito catalitico nel corretto orientamento. È inoltre conservata l'His in posizione 80 che fa da ponte tra il Cu e lo Zn, con le His in posizione 71, 73 e 136 che coordinano lo ione Cu. Non sono invece conservate le due His e l'Asp che normalmente coordina lo ione Zn. Questa differenza è comunque notevole, perché i residui importanti per l'attività catalitica sono conservati sia in vertebrati che invertebrati. Lo strumento di BlastP di NCBI mostra come possibili residui responsabili della coordinazione i due Asp in posizione (D90) e (D93) e l'His in posizione (H¹³¹). Appare quindi giustificata la distanza filogenetica della sequenza di *C. intestinalis* nell'albero filogenetico costruito con diverse sequenze di Cu/Zn-SOD considerando anche il fatto che tale albero risulta ben risolto solo a livello delle classi dei vertebrati. Questo fatto è giustificato dall'effettivo alto grado di conservazione delle Cu/Zn SOD nell'evoluzione. Poco chiaro è il fatto che nella regione promotrice manchino le sequenze MRE o ARE, le quali come è noto regolano la trascrizione genica in risposta a metalli o ad un aumento della produzione delle ROS (Trachootham *et al.*, 2008) e che normalmente sono presenti nei promotori dei geni degli enzimi

antiossidanti come la Cu/Zn-SOD. Tale assenza ovviamente non è spiegabile sulla base dei dati di letteratura, ma posso supporre che tale enzima sia espresso a livelli basali tali da poter assicurare un'adeguata risposta antiossidante in presenza di Cd e Cu. Qualora vi dovesse essere aumento di ROS, queste sarebbero sotto il controllo di altri geni, come ad esempio *CiMT-1* e *CiPCS*. Per quanto riguarda gli aumenti di espressione in presenza di Zn, posso supporre che vi siano fattori di trascrizione coinvolti che riconoscono sequenze non canoniche.

La sequenza proteica della GS consta di 476 aa, ed è di lunghezza simile alle GS degli altri metazoi. Ad esempio la GS di *Danio rerio* consta di 475 aa e quella di *Homo sapiens* di 474 aa. I siti che formano interazioni polari con ATP, Mg²⁺, e GSH sono conservate nelle GS eucariotiche. È stato dimostrato che la posizione di questi residui è essenziale per la funzionalità in quanto impediscono l'introduzione di solvente durante l'attività catalitica in modo da proteggere l'intermedio fosfato dalla decomposizione idrolitica (Polekhina *et al.*, 1999). La disposizione dei residui non deve solo chiudere il sito attivo, ma deve permettere l'uscita del prodotto di reazione e mantenere il sito attivo disponibile al cofattore e al substrato. A livello del promotore sono presenti sia le sequenze regolatrici ARE sia MRE, questo indicherebbe che l'espressione della GS può essere regolata non solo dalle ROS, ma anche dalla presenza dei metalli pesanti. La duplice regolazione della GS può spiegare l'assenza di sequenze regolatrici ARE nel promotore della *Cu/Zn-SOD*, ovvero potrebbe essere la GS a rispondere ad un'aumentata produzione delle ROS attraverso l'aumento della biosintesi del GSH, una molecola di cui sono note le capacità antiossidanti (Meister, 1983). Un altro dato interessante ci viene offerto dall'analisi filogenetica. La GS di *C. intestinalis* si pone distante dalle sequenze dei vertebrati, mentre i rapporti filogenetici tra le sequenze dei deuterostomi non vertebrati non si possono considerare risolti visti i bassi valori di bootstrap e questo potrebbe porre le basi per studi evolutivi futuri per meglio comprendere l'evoluzione delle difese antiossidanti nel passaggio dagli invertebrati ai vertebrati.

La GCLC è costituita da una sequenza proteica di 646 aa ed è leggermente più lunga delle sequenze primarie dei vertebrati analizzati. Nonostante questo, la

struttura è molto conservata soprattutto nella parte terminale. In letteratura non sono molte le informazioni riguardo gli aminoacidi che hanno importanza rilevante per l'attività di tale enzima. Lo strumento *NCBI's Conserved Domain Database* (CDD), trova nella parte terminale un dominio conservato nell'evoluzione molecolare definito come *GCS domain*, quindi la GCLC di *C. intestinalis* fa parte della superfamiglia delle GCS. Zhongheng e Anders (1998), hanno identificato nella struttura proteica di questo enzima, alcuni residui conservati nei mammiferi e hanno investigato la loro importanza nella funzionalità durante l'attività di catalisi. Di questi residui conservati sarebbero le cisteine ad avere un'attività principale in quanto esperimenti di mutagenesi hanno dimostrato che l'alterazione di questi aminoacidi, e in particolare della cisteina in posizione 553 nella GCLC umana, provoca effetti sull'attività dell'enzima poiché altera la formazione del legame disolfuro tra questa proteina e la subunità regolatrice, chiamata anche modulatrice, i cui geni, nell'uomo e nella maggior parte dei vertebrati, vengono a trovarsi in cromosomi diversi e quindi trascritti indipendentemente l'uno dall'altro. Il legame tra le subunità è importante in quanto sembra che da esso dipenda l'attività della GCL. Un aumento dello stato ossidativo della cellula è associato all'ossidazione del legame disolfuro, questa ossidazione sembra corrispondere a un aumento dell'attività dell'enzima.

In *C. intestinalis* la regione promotrice però non porta al suo interno sequenze regolatrici ARE. È possibile che le sequenze regolatrici siano presenti nel gene della subunità modulatrice, mentre la GCLC potrebbe essere espressa solo a livello costitutivo. Sarebbe necessario quindi analizzare non solo le sequenze di GCLC ma anche di GCLM nell'organismo in esame.

Per quanto riguarda la filogenesi molecolare la GCLC di *C. intestinalis* si pone come *sister group* delle proteine dei vertebrati, ma nettamente separata anche da queste. Tuttavia il valore di bootstrap, al limite della tolleranza, non chiarisce i rapporti filogenetici tra le sequenze dei deuterostomi invertebrati.

L'analisi cladistica con lo strumento BlastP, compiuta sulla sequenza della GPx di *C. intestinalis* (CiGPx), ha permesso di stabilire la somiglianza di tale proteina con le GPx-7. La filogenesi molecolare condotta su questa GPX di *Ciona*

evidenzia una netta separazione di questa proteina con le sequenze degli altri deuterostomi presi in esame. Interessante risulta la posizione, nell'albero, di *B. floridae* come *sister-group* dei vertebrati in accordo con quanto ottenuto per PCNA e con la precedente teoria sui rapporti filogenetici dei Cordati.

Oltre alla CiGPx, in GeneBank, sono stati recentemente annotati altri 4 geni che potenzialmente codificano per proteine simili a GPx. Un'analisi preliminare delle sequenze aminoacidiche dedotte rivela che esse sono delle Se-GPx in quanto è presente la selenocisteina (codificata dal TGA) ed altri aminoacidi della triade catalitica (Gln e Trp). Rimane da verificare se questi geni sono effettivamente trascritti o se siano degli pseudogeni, ma appare plausibile che almeno uno di essi possa effettivamente codificare per una Se-GPx, in quanto tale tipo di enzima si ritrova in tutti i metazoi (Tosatto *et al.*, 2008). Anche nel promotore di *CiGPX7* mancano le sequenze regolatrici coinvolte nella risposta canonica a metalli o ROS. In questo caso, il dato non sorprende, vista l'assenza di induzione di questo gene nei diversi trattamenti.

8.2 Espressione

Nell'ambito degli studi di espressione abbiamo cercato di individuare tessuti coinvolti nella trascrizione degli enzimi presi in considerazione. Si è visto che tutte le sonde costruite marcano gli emociti nelle lacune emolinfatice. Questo dato concorda con quanto osservato per le metallotioneine e la fitochelatino sintetasi. L'attività cruciale degli emociti durante la difesa antiossidante è stata dimostrata nel bivalve *Venerupis philippinarum* da Li e collaboratori (2010). Questi ricercatori hanno riscontrato, successivamente all'inoculo di un patogeno, un conseguente aumento di produzione delle ROS, e quindi un aumento nell'espressione della SOD negli emociti prelevati dagli organismi infettati. La SOD e la GS e la GCLC sono espresse anche dalle cellule follicolari presenti negli ovari di *C. intestinalis*. La necessità di una difesa antiossidante degli organi attivi nella riproduzione è stata dimostrata nell'uomo, dove si è registrato un aumento della produzione di enzimi antiossidanti, come la Cu/Zn-SOD e catalasi,

nell'ovario, in presenza di stress ossidativo. Ciò probabilmente previene i danni dovuti alle ROS che possono provocare infertilità o compromettere il corretto sviluppo dell'embrione (Agarwal *et al.*, 2006). La probabile presenza della SOD, della GS e della GCLC negli ovari di *C. intestinalis* fa presupporre che le cellule follicolari svolgano funzione protettiva nei confronti della produzione di ROS indotta da stress ossidativo.

Il trattamento con Cd e Cu porta ad un lieve incremento della trascrizione del gene per la SOD, mentre in seguito ad esposizione a Zn vi è una più marcata induzione della trascrizione di questo gene. Probabilmente questa sovraespressione dipende dall'azione di fattori di trascrizione in grado di rispondere a fattori diversi da quelli considerati o in grado di riconoscere sequenze non canoniche.

L'esposizione ai metalli porta ad una variazione nell'espressione anche della GS specialmente in presenza di Cu.

Non vi è invece un accumulo di mRNA tempo-dipendente per la GCLC. È possibile, essendoci un accumulo tempo-dipendente del messaggero della GS (seconda reazione di biosintesi del GSH) che l'intermedio prodotto dal primo *step* di reazione regoli effettivamente la produzione di GSH o che la resa enzimatica del complesso glutammato cistein-ligasi sia più efficiente dell'enzima glutatione sintetasi e quindi fornisca più intermedio di quanto non sembri. Il promotore della GCLC non ci fornisce informazioni utili sulla regolazione trascrizionale il che farebbe appunto pensare che venga espresso esclusivamente a livello basale.

La GPx contribuisce alla formazione di GSSG a livello citoplasmatico, in quanto la sua principale funzione è la rimozione di perossidi utilizzando come substrato il GSH. Dai miei dati in *C. intestinalis* questo enzima risulta essere ininfluenza durante l'esposizione ai metalli. In presenza di Cd e Zn i valori non si spostano dai valori di controllo che comunque sono estremamente bassi (dati non riportati). Solo in presenza di Cu sembra esserci un lieve aumento trascrizionale alle 120 h e questo potrebbe portare a supportare un intervento estremamente tardivo dell'enzima. Tale ipotesi è supportata dal fatto che le GPX selenio dipendenti agiscono per contrastare la perossidazione lipidica delle membrane, evento che avverrebbe solo tardivamente in condizioni di buona risposta antiossidante.

9. Conclusioni

I dati emersi sulla risposta allo stress indotto da Cd, Zn e Cu in *C. intestinalis*, suggeriscono tre scenari differenti e specifici. In presenza di Cd si osservano effetti che ricordano quanto descritto da Cherian e Kang (2009) relativo agli andamenti di MT in fegato di topo dopo parziale asportazione. I loro risultati indicano che queste proteine possono fungere da segnale precoce per la proliferazione delle cellule epatiche, come confermato dal successivo aumento trascrizionale di PCNA. Analogamente in *Ciona*, dopo la somministrazione di Cd, vi è sovraespressione di MT ed, in seguito, di PCNA. Questo indica induzione di proliferazione e differenziamento delle cellule in grado di esprimere sia MT che PCS: i granulociti. Inoltre si deduce che sono le MT, insieme alle fitochelatine, le molecole maggiormente coinvolte nella risposta al Cd. Il GSH, probabilmente, entra solo parzialmente nella risposta poiché i livelli di GS si mantengono bassi e questo suggerisce che gli intermedi prodotti da GCL vengano assemblati a formare PC e non GSH.

Al contrario, in presenza di Zn, sembra che MT, GSH e SOD siano le molecole maggiormente coinvolte nella risposta allo stress. Questo porta a supporre che anche in *Ciona* si possa realizzare il controllo dello stato redox teorizzato da Kang (2006) che prevede l'equilibrio omeostatico dello stato redox della cellula mantenuto da interazioni MT-GSH. In seguito a trattamento con Cu, invece, è ipotizzabile che le MT non siano coinvolte in attività detossificante, buona parte della quale appare essere a carico di GSH, SOD (assieme a proteine *chaperone*) così come descritto per i vertebrati.

I dati sulla localizzazione non lasciano dubbio sul fatto che la detossificazione da metalli sia a carico degli emociti. Questo confermerebbe quanto proposto da Shida e collaboratori (2003) che, in librerie di mRNA estratto da soli emociti di *C. intestinalis*, hanno individuato trascritti generalmente espressi in organi di detossificazione come il fegato dei vertebrati.

Conclusioni

Risulta inoltre interessante che tutti i geni considerati (ad esclusione della sola *GPX7*) vengono espressi anche dalle cellule follicolari interne. Questo porta a supporre che tali cellule, non solo abbiano funzione trofica, ma che siano altresì coinvolte nella difesa delle cellule della linea germinale femminile, formando una sorta di barriera ad attività detossificanti, sia da metalli che da ROS.

Per quanto riguarda la linea germinale maschile delle ascidie, è stata dimostrata la presenza di cellule accessorie. Queste, a differenza delle cellule del Sertoli dei vertebrati, sembra che manchino di attività di supporto alla linea germinale, ma che siano prevalentemente coinvolte nei processi di maturazione e riassorbimento dell'organo nei vari stadi di sviluppo (Burighel e Martinucci, 2000). L'assenza di marcatura nei testicoli, si può giustificare con il fatto che le gonadi maschili nelle ascidie sono immerse all'interno delle lacune emolinfatiche e questa loro localizzazione le pone in condizione di essere protette direttamente dagli emociti.

10. Bibliografia

- Abel J, de Ruiter N** - 1989 - Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein *Toxicol Lett* 47:191–196
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S** - 2006 – The role of free radicals and antioxidant in reproduction *Curr Opin Gynecol* 18: 325-332
- Andrews GK** - 1990 - Regulation of metallothionein expression *Prog Food Nutr Sci*, 14: 193-258
- Andrews GK, Adamson ED, and Gedamu L** - 1984 - The ontogeny of expression of murine metallothionein: Comparison with the alpha-fetoprotein gene *Dev Biol* 103, 294–303
- Andrews GK, Huet-Hudson YM, Paria BC, McMaster MT, De SK and Dey SK** - 1991 - Metallothionein gene expression and metal regulation during preimplantation mouse embryo development (MT mRNA during early development) *Dev Biol* 145, 13–27
- Andrews GK, Huet YM, Lehman LD and Dey SK** - 1987 - Metallothionein gene regulation in the preimplantation rabbit blastocyst *Development* 100, 463–469
- Anke C, Klaus W** - 1994 - The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *FEMS Microbiology Reviews* 14-4 pp 303–308
- Arthur JR** - 2000 - The glutathione peroxidase *Cell Mol Life Sci* 57: 1825-1835
- Atli G, Canli M** - 2008 - Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures *Environ Toxicol Pharmacol* 25: 33–38
- Bao Y, Li L, Xu F, Zhang G** - 2009 - Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: its gene structure, mRNA expression and recombinant protein *Fish Shellfish Immunol* 27:210-220
- Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED** - 2004 - Nickel superoxide dismutase structure and mechanism *Biochemistry* 43: 8038–8047

Barra D, Schinina ME, Bossa F, Bannister JV - 1985 - Identity of the metal ligands in the manganese- and iron-containing superoxide dismutases *FEBS Lett* 179: 329-331

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 IM, Fisher ML, Wu ZP, Hilvert D - 1993 - Kinetic studies on the peroxidase activity of selosubtilisin *Biochem* 32: 3754-3762

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 SL, 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

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 Micro*, 45: 1421-1432

Borghesi LA, Youn J, Olson EA and Lynes MA - 1996 - Interactions of metallothionein with murine lymphocytes: Plasma membrane binding and proliferation *Toxicology* 108, 129-140

Borrelly GP, Harrison MD, Robinson AK, Cox SG, Robinson NJ, Whitehall SK - 2002 - Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe* *J Biol Chem*, 277: 30394-30400

Boveris A, Cadenas E - 1982 - Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide in Mitochondria *CRC Press*, 159-168

Brouwer M, Brouwer-Hoexum T, Cashion R - 1993 - Crustaceans as models for metal metabolism III Interaction of lobster and mammalian metallothionein with glutathione *Mar Environ Res* 35:13-17

Brouwer M, Hoexum-brouwer T, Cashion RE - 1993 - A putative glutathione-binding site in CdZn-metallothionein identified by equilibrium binding and molecular-modelling studies *Biochem J* 294: 219-225

Brulle F, Cocquerelle C, Wamalah AN, Morgan AJ, Kille P, Leprêtre A, Vandebulcke F - 2008 - cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure *Ecotoxicol Environ Saf Sep*;71(1):47-55 Epub 2008 Feb 20

Burighel P e Cloney A - 1997 - Urochordata: ascidiacea Microscopic anatomy of invertebrate, Volume 15: Hemichordata, Chaetognatha, and the invertebrate Chordates Wiley-Liss, Inc 221-347

Cadenas E - 1989 - Biochemistry of oxygen toxicity *Ann Rev Biochem* 58: 79–110

Cai L, Klein JB, Kang YJ - 2000 - Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage *J Biol Chem* 275:38957–38960

Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra de Philippis R, Ascencio F - 2002 - Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of 62 American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide *Fish & Shellfish Im* 12: 353-366

Cano-Gauci DF and Sarkar B - 1996 - Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger *FEBS Lett* 386, 1–4

Chance B, Sies H, Boveris A - 1979 - Hydroperoxide metabolism in mammalian organs *Physiol Rev* 59: 527–605

Chen Y, Maret W - 2001 - Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione *Eur J Biochem* 268:3346–3353

Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB - 1997 - Characterization of phytochelatin synthase from tomato *Physiologia Plantarum*, 101(1), 165-172

Chen L, Guo Y, Yang L, Wang Q - 2008 - Synergistic defensive mechanism of phytochelatin and antioxidative enzymes in *Brassica chinensis* L against Cd stress *Chinese Science Bulletin*, 53(10), 1503-1511

Cheng W, Tung Y, Liu C, Chen J - 2006 - Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* *Fish & Shellfish Im* 20:438-449

Cherian MG, Kang YJ - 2006 - Metallothionein and liver cell regeneration *Exp Biol Med* Feb;231(2):138-44

Chvapil M, Ryan JN, Zukoski CF - 1972 - Effect of zinc on lipid peroxidation in liver microsomes and mitochondria *Proc Soc Exp Biol Med* 141: 150–153

Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T - 2001 - *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase *Eur J Biochem* 268, 3640–3643

Cobbett CS - 2000 - Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification *Plant Physiology*, 123(3), 825-832

Collin-Hansen C, Pedersen SA, Andersen RA, Steinnes E - 2007 - First report of phytochelatins in a mushroom: induction of phytochelatins by metal exposure in *Boletus edulis* *Mycologia*, 99(2), 161-174

Cousins RJ - 1994 - Metal elements and gene expression *Ann Rev Nutr*, 14: 449-469

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

Crowthers KC, Kline V, Giardina C, Lynes MA - 2000 - Augmented humoral immune function in metallothionein-null mice *Toxicol Appl Pharmacol* 1;166(3): 161-72

Culotta VC, Howard WR, Liu XF - 1994 - CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *S cerevisiae* *J Biol Chem*, 269: 26295-2630

Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD - 1997 - The copper chaperone for superoxide dismutase *J Biol Chem* 272: 23469–23472

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

Dalton T, Palmiter RD, Andrews GK - 1994 - Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/ antioxidant response element and metal response promoter elements *Nucleic Acids Res* 22:5016–5023

De SK, McMaster MT and Andrews GK - 1990 - Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression *J Biol Chem* 265, 15267–15274

Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H - 2006 - Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates *Nature* Feb 23;439 (7079):965-8

Deneke SM, Gershoff SN, Fanburg BL - 1983 - Changes in O₂ toxicity and glutathione peroxidase levels in selenium deficient rats *Chest*; 83(5 Suppl): 39S-40S

Dhaunsi GS, Gulati S, Singh AK, Orak JK, Asayama K, Singh, I - 1992 - Antioxidants attenuate diabetes-induced activation of peroxisomal functions in the rat kidney *J Biol Chem* 267: 6870– 6873

Dickinson DA, Forman HJ - 2002 - Cellular glutathione and thiols metabolism *Biochem Pharmacol* 64: 1019–1026

Dong CJ, Wang Y, Yu SS, Liu JY - 2010 - Characterization of a novel rice metallothionein gene promoter: its tissue specificity and heavy metal responsiveness *J Integr Plant Biol* 52(10):914-24

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

Erk M, Ruus A, Ingebrigtsen K, Hylland K - 2005 - Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in marine invertebrates a radiotracer study *Chemosphere* 61:1651–1664

Fabisiak JP, Pearce LL, Borisenko GG, Tyhurina YY, Tyurin VA, Razzack J, Lazo JS, Pitt BR, Kagan VE - 1999 - Bifunctional anti/prooxidant potential of metallothionein: redox signaling of copper binding and release *Antioxid Redox Signal* 1:349–364

Fitch WM - 1971 - Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology *Sys Zool*, 20: 406-416

Formigari A, Boldrin F, Santovito G, Cassidy-Hanley D, Clark TG, Piccinni E - 2010 - Functional characterization of the 50-upstream region of MTT5 metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila* *Protist* 161:71–77

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

Franchi N, Boldrin F, Ballarin L, Piccinni E - 2010 - CiMT-1, an unusual chordate metallothionein gene in *Ciona intestinalis* genome: structure and expression studies *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* Nov 10

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

Fridovich I - 1995 - Superoxide radical and superoxide dismutases *Annu Rev Biochem* 64:97-112

Gamalei IA & Klyubin IV - 1996 - Hydrogen Dioxide as Signal Molecule *Tsitologiya*, 38: 1233–1247

Gambe S, Wiseman A, Goldfarb PS - 1997 - Selenium-dipendent glutathione peroxydase and other selenoproteins: their synthesis and biochemical roles *J Biochem Biotec* 68: 123-124

Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH - 1989 - Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 44(5-6), 361-9

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

Giovannini C, Filesi C, D'Archivio M; Scazzocchio B; Santangelo C; Masella, R - 2006 - Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati, *Ann Ist Super Sanità* 3:336-347

Glaeser H, Coblenz A, Kruczek R, Ruttke I, Ebert-Jung A, Wolf K - 1991 - Glutathione metabolism and heavy metal detoxification in *Schizosaccharomyces pombe* Isolation and characterization of glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutants *Current Genetics*, 19(3), 207-13

Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A - 1996 - Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase *J Biol Chem* 271:14504–14509

Gogos A & Shapiro L - 2002 - Large conformational changes in the catalytic cycle of glutathione synthase *Structure* 10: 1669-1676

Gordeeva V, Nagler L G, and Yu A - 2006 - Labas Production of Reactive Oxygen Forms by Marine Invertebrates: Mechanisms and Probable Biological Role *J Evol BiochemPhysiol*,42: 253—260

Griffith OW - 1999 - Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis *Free Radic Biol Med* 27: 922–935

Grill E, Loeffler S, Winnacker EL, Zenk MH - 1989 - Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 86(18), 6838-42

Ha S, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS - 1999 - Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Plant Cell*, 11(6), 1153-1163

Hamer DH - 1986 - Metallothionein *Ann Rev Biochem*, 55: 913-951

Hansen BH, Romma S, Garmo OA, Pedersen SA, Olsvik PA, Andersen RA - 2007 - Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn exposure in brown trout (*Salmo trutta*) *Chemosphere* 67: 2241–2249

Haq F, Mahoney M, Koropatnick - 2003 - Signaling events for metallothionein induction *Mutation Research*, 533:211-226

Hara T, Kato H, Katsube Y, Oda J - 1996 - A Pseudo-Michaelis Quaternary Complex in the Reverse Reaction of a Ligase: Structure of *Escherichia coli* B Glutathione Synthetase Complexed with ADP, Glutathione, and Sulfate at 20 Å Resolution *Biochem* 35: 11967-11974

Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vâsák M - 2001 - Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system *Brain Res Bull*, 55: 133-45

Homblad T & Söderhäll K - 1999 - Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity *Aquaculture* 172: 111-123

Huber KL and Cousins RJ - 1993a - Metallothionein expression in rat bone marrow is dependent on dietary zinc but not dependent on interleukin-1 or interleukin-6 *J Nutr* 123, 642–648

Huber KL and Cousins RJ - 1993b - Zinc metabolism and metallothionein expression in bone marrow during erythropoiesis *Am J Physiol* 264, E770–E775

Hughes S, Sturzenbaum SR - 2007 - Single and double metallothionein knockout in the nematode *C elegans* reveals cadmium dependent and independent toxic effects on life history traits *Environ Pollut* 145, 395–400

Imbert J, Culotta V, Furst P, Gedamu L, Hamer D - 1990 - Regulation of metallothionein gene transcription by metals *Adv Inorg Biochem* 8:139–164

Jacob C, Maret W, Vallee BL - 1998 - Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3489–3494

Jaroslawn G, Edward AG - 2005 - Selection in vitro and accumulation of phytochelatin in cadmium tolerant cell line of cucumber (*Cucumis sativus*) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 59–67

Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ - 1998 - Multiple sequence alignment with Clustal X *Trends Biochem Sci* 23:403–405

Jian-Hong Z, Zhang X, Roneker CA, McClung JP, Zhang S, Thannhauser TW, et al - 2008 - Role of copper, zinc-superoxide dismutase in catalyzing nitrotyrosine formation in murine liver *Free Radic Biol Med* 45:611-618

Jiang LJ, Maret W, Vallee BL -1998 - The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3483–3488

Jiang Y, Kang YJ - 2004 - Metallothionein gene therapy for chemical-induced liver fibrosis in mice *Mole Therapy* 10:1130–1139

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 - 1987 - Chemistry and biochemistry of metallothionein *Experientia*, 52: 25-61

Kägi JHR, Valle BL - 1960 - Metallothionein, a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex *J Biol Chem*, 235: 3460-3465

Kang YJ - 2006 - Metallothionein redox cycle and function *Exp Biol Med (Maywood)* 231(9):1459-67

Karin M, Najarian R, Haslinger A, Valenzuela P, Welsch J, Fogel S - 1984 - Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the CUP 1 locus of yeast *Proc Natl Acad Sci*, 81: 337-341

Karin M - 1985 - Metallothionein: Proteins in search of function *Cell* 41, 9–10

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

- Klaassen CD, Liu JE Choudhuri S** - 1999 - Metallothionein: an intracellular protein against cadmium toxicity *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 267-294
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L** - 1995 - Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L *Plant Physiology*, 107(2), 515-21
- Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolbbachofen V** - 1994 - Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9 *Biochem Biophys Res Commun* 200:1105–1110
- Kumar S, Tamura K, Nei M** - 2004 - MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment *Briefings in Bioinform*, 5: 150-163(14)
- Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS** - 2003 - Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress *Plant Physiology*, 131(2), 656-663
- Leibbrandt ME and Koropatnick J** - 1994 - Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and is diminished by zinc *Toxicol Appl Pharmacol* 124, 72–81
- Lerch K** - 1980 - Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa* *Nature*, 284: 368-370
- Li C, Sun H, Chen A, Ning X, Wu H, Qin S, Xue Q, Zhao J** - 2010 - Identification and characterization of an intracellular Cu, Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum* *Fish Shellfish Immunol* 28(3):499-503
- Liang G, Liao Xianyan, Du G, Chen J** - 2008 - A new strategy to enhance glutathione production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis* *Bioresource Technology*, 100(1), 350-355
- Lide´n M, Wile´n B, Ljunghall S and Melhus H** - 1998 - Polymorphism at the Sp 1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in sweden *Calcif Tissue Int* 63, 293–295
- Lin Y, Vaseeharan B, Chen J** - 2008 - Identification of the extracellular copperzincsuperoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following b-glucan and peptidoglycan injections *Mol Immunol* 45:1346-1355

Liu Y, Liu J, Iszard MB, Andrews GK, Palmiter RD, Klaassen CD - 1995 - Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity *Toxicol Appl Pharmacol* 135: 222–228

Lynes MA, Borghesi LA, Youn J and Olson EA - 1993 - Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein I Metallothionein effects on antibody production *Toxicology* 85, 161–177

Lynes MA, Garvey JS and Lawrence DA - 1990 - Extracellular metallothionein effects on lymphocyte activities *Mol Immunol* 27, 211–219

Malaiyandi LM, Dineley KE, Reynolds IJ - 2004 - Divergent consequences arise from metallothionein overexpression in astrocytes: zinc buffering and oxidant-induced zinc release *Glia* 45:346–353

Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F - 2004 - Rocher B Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn superoxide dismutase and of glutathione S-transferase *Aquat Toxicol* 7: 83-93

Maret W, Larsen KS, Vallee BL - 1997 - Coordination dynamics of biological zinc “clusters” in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4 *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2233–2237

Maret W, Vallee BL - 1998 - Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3478–3482

Maret W - 1994 - Oxidative metal release from metallothionein via zinc thiol/disulfide interchange *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:237–241

Maret W - 1995 - Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc *Neurochem Int* 27:111–117

Margoshes M, Vallee BL - 1957 - A cadmium protein from equine imaging hyperintensity in Alzheimer's disease: correlation with kidney cortex *J Am Chem Soc* 79: 4813-4814

Marklund SL, Westman NG, Lundgren E & Roos G - 1982 - Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues *Cancer Research* 42: 1955-1961

Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD - 1994 - Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:584–588

McClure RF, Heppelmann CJ and Paya CV - 1999 - Constitutive Fas ligand gene transcription in Sertoli cells is regulated by Sp1 *J Biol Chem* 274, 7756–7762

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

Dolphin D, Poulson R, Avramovic O - 1989 - Meister A Metabolism and function of glutathione In: Eds Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects-Part A New York: John Wiley & Sons, Inc, pp367–474

Mendoza-Cozatl DG, Butko E, Springer F, Torpey JW, Komives EA, Kehr J, Schroeder JI - 2008 - Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus* A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation *Plant Journal* 54(2), 249-259

Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD - 1996 - Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway *Cell* Feb 9;84(3):431-42

Michalska AE, Choo KH - 1993 - Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8088–8092

Mididotti S, McGuirt JP, Sens MA, Todd JH, Sens DA - 1996 - Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney *Toxicol Lett* 85: 17-27

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

Moilanen LH, Fukushige T, Freedman JH - 1999 - Regulation of metallothionein gene transcription Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans* *J Biol Chem* 274:29655–29665

Morey M, Serras F, Bagunà J, Hafen E, Corominas M - 2001 - Modulation of the Ras/ MAPK signaling pathway by the redox function of selenoproteins in *Drosophila melanogaster* *Dev Biol* 238: 145-156

Münger K, German UA, Lerch K - 1987 - The *Neurospora 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

Nemer M, Wilkinson DG, Travaglini EC, Sternberg EJ, Butt TR - 1985 - Sea urchin metallothionein sequence: key to an evolutionary diversity *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4992-4994

Ni D, Song Li, Gao Qi, Wu L, Yu Y, Zhao J, et al - 2007 - The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri* *Fish Shellfish Immunol* 23:1032-1042

Oberley LW - 1982 - Superoxide dismutase *CRC Press* 6: 127

Oliver JR, Jiang S, Cherian MG - 2005 - Augmented hepatic injury followed by impaired regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after treatment with thioacetamide *Toxicol Appl Pharmacol* 210(3):190-9

Oliver JR, Mara TW, Cherian MG - 2005 - Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy *Exp Biol Med* 230:61-67

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

Pantano C, Reynaert NL, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM - 2006 - Redoxsensitive kinases of the nuclear factor kappaB signaling pathway *Antioxid Redox Signal* 8: 1791-1806

Pena MM, Lee J, Thiele DJ - 1999 - A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution *J Nutr* 129:1251–1260

Piccinni E, Staudenmann W, Albergoni V, De Gabrieli R, James P - 1994 - Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis* *Eur J Biochem* 226: 853-859

Polekhina G, Board P G, Gali RR, Rossjohn J, Parker MW - 1999 - Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event *The EMBO J* 18:3204–3213

Potter DW, Tran TB - 1993 - Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues *Toxicol Appl Pharmacol* 120:186–192

Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelik GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD - 1994 - Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia *Biochem* 33: 7250-7259

Quesada AR, Byrnes RW, Krezoski SO, Petering DH - 1996 - Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites *Arch Biochem Biophys* 334:241–250

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

Ramos J, Clemente MR, Naya L, Loscos J, Perez-Rontome C, Sato S, Tabata S, Becana M - 2007 - Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*: A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants *Plant Physiology* 143(3), 1110-1118

Rausser WE - 1995 - Phytochelatins and related peptides: Structure, biosynthesis and function *Plant Physiology* 109(4), 1141-49

Reed DJ - 1990 - Glutathione: toxicological implications *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:603–631

Roesijadi G - 1992 - Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals *Aquat Toxicol* 22: 81-114

Roesijadi G - 1996 - Metallothionein and its role in toxic metal regulation *Comp Biochem Physio* 113C: 117-123

- Rushmore TH, Morton MM, Pickett CB** - 1991 - The antioxidant responsive element: activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity *J Biol Chem* 266:11632–11639
- Rzhetsky A, Nei M** - 1992 - A simple method for estimating and testing minimum- evolution trees *Mol Biol Evol* 9:945-967
- Sabbadin, A, Zaniolo, G e Ballarin, L** - 1992 - Genetic and cytological aspects of histocompatibility in ascidians *Bool Zool* 59: 167-173
- Saitou N, Nei M** - 1987 - The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Samson SL, Gedamu L** - 1998 - Molecular analyses of metallothionein gene regulation *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59:257-288
- Sandrini J Laurino J, Hatanaka T, Monserrat J M , Marins L F** - 2006 - cDNA cloning and expression analysis of the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase gene in an annelid polychaete after cadmium exposure: A potential tool for pollution biomonitoring *Comp Biochem and Physio* 143: 410–415
- Sato, M, Sasaki, M, and Hojo, H** - 1992 - Tissue specific induction of metallothionein synthesis by tumor necrosis factor-alpha *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 75, 159–172
- 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
- Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S** - 2003 - Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) *Ecotox Environ Saf* 56: 295–301
- Schmid, K W, Ellis, I O, Gee, J M, Darke, B M, Lees, W E, Kay, J, Cryer, A, Stark, J M, Hittmair, A, Ofner, D, Du"nser, M, Margreiter, R, Daxenblictier, G, Nicholson, R I, Bier, B, Bo"cker, W, and Jasani, B** - 1993 - Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422, 153–159
- Schroeder, J J, and Cousins, R J** - 1990 - Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3137–3141

- Shaulian E, Karin M** - 2002 - AP-1 as a regulator of cell life and death *Nat Cell Biol* 4E:131–136
- Shaw CF 3rd, Savas MM, Petering DH** - 1991 - Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein *Methods Enzymol* 205:401–414
- Shaw, S, Jayatilleke, E**, - 1990 - Ethanol-induced iron mobilization: role of acetaldehyde– aldehyde oxidase generated superoxide *Free Radic Biol Med* 9: 11–17
- Shida K, Terajima D, Uchino R, Ikawa S, Ikeda M, Asano K, Watanabe T, Azumi K, Nonaka M, Satou Y, Satoh N, Satake M, Kawazoe Y, Kasuya A** - 2003 - Hemocytes of *Ciona intestinalis* express multiple genes involved in innate immune host defense *Biochem Biophys Res Commun* 302:207–218
- 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
- Sneath PHA, Sokal RR** - 1973 - Numerical Taxonomy, WH Freeman, San Francisco
- Sobocinski, G L Knutsen, W J Canterbury, Jr and E C** - 1979 - Hauer Altered zinc homeostasis and hepatic accumulation of metallothionein in indomethacin-induced enteropathy *Toxicology and Applied Pharmacology* 50(3): 557-564
- Spahl DU, Berendji-Grun D, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, Kroncke KD** - 2003 - Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn²⁺ release *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13952–13957
- St Croix CM, Wasserloos KJ, Dineley KE, Reynolds IJ, Levitan ES, Pitt BR** - 2002 - Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L185–L192
- Staats DA, Lohr DP, Colby, HD** - 1988 - Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism *Endocrinology* 123: 975– 980
- Stallings WC, Pattridge KA, Strong RK, Ludwig ML** - 1984 - Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs *J Biol Chem* 10: 10695-10699

Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M - 2000 - Oxidativ mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19: 201–213

Storey KB - 1996 - Oxidative stress: animal adaptations in nature *Braz J Med Biol Res* 29: 1715–1733

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

Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K - 1996 - The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals *Genomics* 38:283–290

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

Tanaka T, Kato H, Nishioka T, Oda J - 1992 - Mutational and proteolytic studies on a flexible loop in glutathione synthetase from *Escherichia coli* B: the loop and arginine 233 are critical for the catalytic reaction *Biochemistry* 31: 2259-2265

Tang X, Nakata Y, Li HO, Zhang M, Gao H, Fujita A, Sakatsume O, Ohta T, Yokoyama K - 1994 - The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E coli* *Nucleic Acids Res* 22: 2857-2858

Tarchevskii IA - 2002 - Signal'nye sistemy kletok rastenii (Signal Systems of Plant Cells), Moscow

Thomas JP, Bachowski GJ, Girotti AW - 1986 - Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metlothioneins *Biochim Biophys Acta* 884:448–461

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ - 1994 - CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680

Thornalley PJ, Vasak 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

- Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohé L, Ursini F, Maiorino M** - 2008 - The catalytic site of glutathione peroxidases
Antioxid Redox Signal 9: 1515-1526
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera Del Valle N, Huang P** - 2008 -
Redox Regulation of Cell Survival *Antiox Redox Signaling* 10: 1343-1374
- Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA** - 2001 - A new pathway for
heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for
cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans* *J Biol Chem* 276, 20817–20820
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y, Rea Philip A** - 1999 - AtPCS1, a phytochelatin
synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution *Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12), 7110-7115
- Wei DY, Andrews GK** - 1988 - Molecular cloning of chicken metallothionein:
Deduction of the complete amino acid sequence and analysis of expression using
cloned cDNA *Nucleic Acids Res* 25;16(2):537–553
- Winge DR** - 1998 - Copper-regulatory domain involved in gene expression *Prog
Nucleic Acid Res Mol Biol* 58: 165-195
- Winterbourn CC** - 1993 - Superoxide as an intracellular radical sink *Free Radic
Biol Med* 14: 85-90
- Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL, Moye-Rowley WS**
- 1993 - Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance *J Biol
Chem* 268:18850–18858
- Xiang C, Oliver DJ** - 1998 - Glutathione metabolic genes coordinately respond to
heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis* *Plant Cell* 10(9), 1539-1550
- Yang XE, & Yang MJ** - 2001 - In W J Horst, et al (Ed), Plant nutrition-food
security and sustainability of agro-ecosystems, some mechanisms of zinc and
cadmium detoxification in a zinc and cadmium hyperaccumulating plant species
(*Thlaspi*) pp 444–445
- Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M and Pagano JS** - 1998 - The expression of
matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein–Barr virus latent membrane
protein 1 *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3621–3626
- Youn J and Lynes MA** - 1999 - Metallothionein-induced suppression of
cytotoxic T lymphocyte function: An important immunoregulatory control *Toxicol
Sci* 52, 199–208

Youn J, Borghesi LA, Olson EA and Lynes MA - 1995 - Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein II: Effects on macrophage functions *J Toxicol Environ Health* 45, 397–413

Zaniolo G - 1981 - Histology of the ascidian *Botryllus schlosseri* tunic: in particular, the test cells *Bool Zool* 48: 169-178

Zaniolo G, Trentin P - 1987 - Regeneration of the tunic in the colonial ascidian, *Botryllus schlosseri* *Acta Embryol Morphol Exper* 8: 173-180

Zeng J, Heuchel R, Schaffner W, Kagi JH - 1991 - Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1 *FEBS Lett* 279:310–312

Zeng J, Vallee BL, Kagi JH - 1991 - Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9984–9988

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

Zheng H, Berman NE, Klaassen CD - 1995 - Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain *Neurochem Int* 27: 43-58

Zhongheng TU & Anders MW - 1998 - Identification of an important cysteine residue in human glutamate–cysteinylase catalytic subunit by site-directed mutagenesis *Biochem J* 336: 675-680