



# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Facoltà di Scienze MM.FF.NN**

**Dipartimento di Biologia**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA**

**XX CICLO**

**Metallotioneine: Evoluzione molecolare e funzionale nei protozoi ciliati  
appartenenti al genere *Tetrahymena***

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

**Supervisore:** Ch.ma Prof. ssa Ester Piccinni

**Dottoranda:** Alessia Formigari

31 Gennaio 2008



## **PREFAZIONE**

Data la complessità degli approcci sperimentali effettuati durante la mia attività di ricerca e allo scopo di illustrare in modo semplice e conciso tutti i risultati che sono emersi da questi studi, ho deciso di strutturare la mia tesi di dottorato nel modo seguente: un breve abstract che riassume i punti salienti della mia ricerca; un breve capitolo dedicato all'obiettivo del lavoro; un'introduzione generale nella quale vengono messe in luce le caratteristiche fondamentali del modello sperimentale utilizzato (*Tetrahymena*) e delle metallotioneine studiate; un capitolo che descrive le strategie sperimentali utilizzate; inoltre, allo scopo di facilitare il lettore, i risultati ottenuti durante l'attività di ricerca sono stati presentati e discussi in cinque capitoli separati (capitoli 4, 5, 6, 7 e 8). All'inizio di ciascun capitolo dei risultati è presente un riassunto che ne descrive brevemente il contenuto, una brevissima introduzione che ha lo scopo di contestualizzare l'aspetto scientifico affrontato, seguita dalla descrizione e discussione dei risultati. La tesi si conclude infine con un capitolo relativo alle conclusioni cui i risultati ottenuti hanno portato.



## ABSTRACT

The ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*, has long served as a model for basic research. At the same time, its unique biological properties make it extremely attractive as practical system for the overexpression of recombinant proteins.

The scientific community has recently taken into great consideration the use of *T. thermophila* for the production of recombinant proteins for both biotechnological perspectives and as research tools, since no system (e. g., bacteria, fungi, insect and mammalian cell lines) is universally suitable for the expression of foreign genes. The utility of *T. thermophila* as an experimental model organism has been recently increased by the development of inducible expression vectors based on the *MTT1* metallothionein promoter. Metallothioneins (MT) are a group of low molecular weight proteins which bind metals through their numerous cysteine residues and which are present in many *phyla*. One of the most important properties of these proteins is their ability to be transcriptionally induced by transition metals. The research studies, made during my PhD course, focused on molecular and functional evolution of MT in *T. thermophila*.

In the present study, two new MT (*MTT-5* in *T. thermophila* and *MT-2* in *T. pyriformis*) gene isoforms have been cloned and characterized. The transcriptional activity of *MTT-2* and *MTT-5* towards heavy metals (cadmium, copper and zinc), was evaluated. Results showed that the three metals induced different *MTT-2*-mRNA and *MTT-5*-mRNA levels. Furthermore, using the coding sequence of *nrk2-GFP* gene as a reporter, I found that the upstream region of *MTT5* induced *nrk2-GFP* protein expression. The fluorescence was present in the basal bodies and at the tips of cilia within transformed cells. These results have substantially contributed to demonstrate the suitability of free-living protozoan in studies of cell tolerance to heavy metals, and they have validated the use of *Tetrahymena* as a model system to determine ecotoxicological risk. To date, only a limited number of inducible promoters for driving high-level gene expression in *T. thermophila* has been described. Furthermore, little is known about the sequence elements that regulate gene expression within the upstream

regions of ciliate genes. I described a robust new promoter from MTT-5, a *T. thermophila* cadmium-inducible MT gene of *T. thermophila* during my research studies. Using, as a reporter, the coding sequence of a gene for a candidate vaccine antigen from a parasitic protist, *Ichthyophthirius multifiliis*, I found that the upstream region of *MTT5* can induce high-level expression of the relevant gene product in its correct 3-dimensional conformation. Expression was sensitive to cadmium, and to lesser extent copper, but not to zinc. Moreover, a direct comparison between this promoter and one from a previously described Cd-inducible MT gene, namely *MTT1*, shows that *MTT5* is considerably stronger.

To begin to define the sequence elements underlying the metal-responsiveness of this promoter, I constructed a series of deletions starting with a 1777 bp fragment immediately upstream of the start codon of *MTT5*, which is fully functional. Interestingly, a fragment as short as 300 bp upstream of the start codon appears fully functional as well, while a deletion down to 290 bp essentially abolishes activity in response to cadmium. These results have been confirmed by site-specific mutagenesis. This study indicates that the *MTT5* promoter can be used as a practical tool for protein manufacture in *T. thermophila*, and sheds light on potential sequence elements responsible for metal-induced promoter control in this species. The identification of this MRE sequences in *Tetrahymena*, quite different from those previously identified in mammals, represents the first step to characterize molecular mechanisms involved in the expression of *Tetrahymena* MT isoforms.

Phylogenetic analysis performed with all *Tetrahymena* MT protein and nucleotidic sequences revealed that MTT-5 is closely related to Cd-induced isoforms and quite separate from Cu-induced ones. Our results indicate that Cd and Cu MTs diverged early in evolution, before the speciation event that separated the *Tetrahymena borealis* group and the *Tetrahymena australis* group. The mutation rate in the *Tetrahymena* MTs appears to be heterogeneous, being very low for MT-1 and MTT-1 and higher for other isoforms. The phylogenetic analysis indicates a particular evolutionary history independent from other MT isoforms, for MTT-5.

## RIASSUNTO

Il protozoo ciliato *Tetrahymena thermophila* è stato per lungo tempo utilizzato come modello per la ricerca e allo stesso tempo le sue proprietà biologiche lo hanno reso un sistema particolarmente pratico ed attraente per la sovraespressione di proteine ricombinanti. Recentemente la comunità scientifica ha posto particolare attenzione alle potenzialità di *T. thermophila* in ambito biotecnologico, quale modello ideale per l'espressione di proteine eterologhe, dal momento che nessun sistema di espressione (*E. coli*, lieviti, linee cellulari di insetto e mammifero) è universalmente utilizzabile. Recentemente, l'importanza di *T. thermophila* come organismo modello sperimentale è di gran lunga aumentata con la costruzione del primo sistema di espressione basato sul gene codificante le metallothioneina MTT-1.

Le metallothioneine (MT) sono una famiglia di proteine a basso peso molecolare che legano i metalli grazie ad un elevato contenuto di residui cisteinici. Esse sono presenti in numerosi *phyla*. Una delle più importanti proprietà di queste proteine è la loro capacità di essere trascrizionalmente indotte dai metalli di transizione.

Durante la mia attività di ricerca mi sono occupata dell'evoluzione molecolare e funzionale di queste proteine nel genere *Tetrahymena*. In particolare ho clonato e caratterizzato due nuove isoforme di MT (MTT-5 in *T. thermophila* e MT-2 in *T. pyriformis*). Inoltre allo scopo di studiare l'attività trascrizionale di MTT-2 e MTT-5 in *T. thermophila* in risposta a cadmio, rame e zinco, sono stati valutati i livelli di messaggero di queste due isoforme. I risultati ottenuti indicano che i tre metalli hanno indotto differenti livelli di trascritto di MTT-2 e MTT-5. Inoltre usando la regione codificante dell'*nrk2-GFP* come gene *reporter*, ho osservato che il promotore di *MTT-5* è in grado di indurre elevati livelli di proteina ricombinante nelle cellule trasformate. In particolare, nei trasformanti si osserva una fluorescenza marcata soprattutto per quanto riguarda le punte delle cilia, sia orali sia somatiche. Questi risultati contribuiscono sostanzialmente a dimostrare che *Tetrahymena* potrebbe essere un buon modello per lo studio dei meccanismi coinvolti nella tolleranza ai metalli pesanti, e un ottimo organismo per la determinazione del rischio ecotossicologico.

Inoltre, solamente un numero limitato di promotori inducibili sono stati descritti in *T. thermophila* per regolare l'espressione di proteine ricombinanti e pochi dati sono disponibili relativamente alle sequenze MRE responsabili dell'espressione metallo-indotta. In questo studio viene descritto il promotore di *MTT-5* inducibile da Cd. Usando come gene *reporter* la sequenza codificante di un gene che codifica per un antigene di superficie candidato per un vaccino contro *Ichthyophthirius multifiliis*, un protozoo ciliato parassita dei pesci d'acqua dolce, viene dimostrato che la regione a monte del codone d'inizio del gene *MTT-5* può indurre elevati livelli d'espressione del prodotto genico IAG52B nella sua corretta conformazione tridimensionale. L'espressione del transgene è regolata principalmente dal Cd, molto meno da Cu e per nulla dallo Zn. Un diretto confronto tra questo promotore e un altro inducibile da Cd, *MTT-1*, indica che il promotore di *MTT5* è considerevolmente più efficiente.

Allo scopo di chiarire il meccanismo che sta alla base dell'espressione metallo indotta delle MT in *Tetrahymena*, sono state costruite una serie di delezioni del promotore di *MTT-5*. L'analisi mediante delezioni e mutagenesi del promotore di *MTT-5* indica che la regione di 300 bp a monte del codone di inizio della traduzione è pienamente attiva nel regolare l'espressione del gene *reporter* IAG52B in risposta al Cd. Al contrario, l'espressione del transgene è completamente abolita nella linea cellulare contenente la delezione a -290 pb. Questo suggerisce che nella regione compresa tra 300 pb e 290 pb è presente un importante elemento del promotore che è in grado di rispondere al Cd.

Questo studio indica che il promotore di *MTT-5* potrebbe essere usato per l'espressione di proteine ricombinanti e l'identificazione delle sequenze MRE, del tutto differenti da quelle identificate nei mammiferi, rappresenta il primo passo per l'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione delle isoforme di MT in *Tetrahymena*.

Inoltre in questo studio vengono presentate delle analisi filogenetiche basate sulle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche. Dagli alberi costruiti utilizzando le sequenze amminoacidiche appare evidente che le MT Cd-inducibili sono nettamente separate da quelle Cu-inducibili. I risultati indicano inoltre che Cd- e Cu-MT divergono precocemente nell'evoluzione prima dell'evento di speciazione che ha separato il gruppo borealis a cui appartengono *T. pyriformis* e

*T. thermophila* da quello australis a cui appartiene *T. pigmentosa*. Il tasso di mutazione per le MT di *Tetrahymena* sembra essere eterogeneo essendo più basso per MT-1 e MTT-1, mentre più elevato per altre isoforme. In tutte le topologie di albero MTT-5 emerge per prima tra il gruppo delle Cd-MT, facendo presupporre per questa isoforma una peculiare storia evolutiva, indipendente dalle altre.



# INDICE

<b>1</b>	<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Tetrahymena</i>	3
2.2	Metallotioneine	5
2.2.1	Classificazione e struttura proteica delle MT	6
2.2.2	Molteplicità delle MT	8
2.2.3	Ruolo biologico delle MT	10
2.2.4	Espressione genica delle MT in risposta ai metalli	11
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>17</b>
3.1	Terreni di coltura	17
3.2	Ceppi e colture cellulari	18
3.3	Trattamenti con metalli	19
3.4	Dosaggio dei metalli nell'estratto cellulare	19
3.4.1	Preparazione dell'estratto cellulare	19
3.4.2	Dosaggio delle proteine	20
3.4.3	Dosaggio dei metalli	20
3.5	Estrazione degli acidi nucleici	20
3.5.1	Estrazione del DNA genomico	20
3.5.2	Estrazione dell'RNA totale	21
3.6	Retrotrascrizione dell'RNA e amplificazione del DNA	22
3.6.1	PCR <i>primers</i>	22
3.6.2	Sintesi del cDNA	23
3.6.3	Amplificazione del cDNA	24
3.7	Clonaggio del DNA amplificato	24
3.7.1	Preparazione dei batteri competenti alla trasformazione	25
3.7.2	Trasformazione dei batteri competenti	26
3.7.3	<i>Screening</i> delle colonie trasformate	26

3.8 Sequenziamento	27
3.9 RACE ( <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> )	28
3.9.1 3' RACE	28
3.9.2 5'RACE	28
3.10 <i>Real time</i> PCR	30
3.11 Il promotore di <i>MTT-5</i> nella costruzione di un vettore di espressione inducibile da cadmio	32
3.11.1 Clonaggio del promotore di <i>MTT-5</i> nel vettore	32
3.11.2 Trasformazione e <i>screening</i> dei batteri	34
3.11.3 Trasformazione di <i>T. thermophila</i> con MTT-5-nrk2-GFP e MTT-5-IAG52B	35
3.12 Mutagenesi sito-diretta	36
3.13 <i>Western blotting</i>	37
3.14 Immunofluorescenza	37
3.15 Test di immobilizzazione	38
3.16 Filogenesi molecolare	38
3.16.1 Allineamenti multipli	38
3.16.2 Alberi filogenetici	38
<b>4 LE METALLOTIONEINE IN <i>TETRAHYMENA</i></b>	<b>41</b>
4.1 Molteplicità delle MT in <i>Tetrahymena</i>	41
4.2 Caratterizzazione del cDNA di MTT-5 in <i>T. thermophila</i>	42
4.3 Caratterizzazione del cDNA di MT-2 in <i>T. pyriformis</i>	48
<b>5 LE METALLOTIONEINE E <i>TETRAHYMENA</i> IN UNA PROSPETTIVA ECOTOSSICOLOGICA</b>	<b>51</b>
5.1 Le MT come <i>biomarker</i> di esposizioni a metalli	51
5.2 Accumulo di metallo	53
5.3 Studio dell'espressione del gene <i>MTT-2</i> in risposta al cadmio	54
5.4 Studio dell'espressione del gene <i>MTT-5</i> in risposta a cadmio, rame e zinco	59
5.5 Il promotore di <i>MTT-5</i> in un sistema Cd-nducibile	61

<b>6</b>	<b>IL PROMOTORE DI <i>MTT-5</i> IN UNA PROSPETTIVA BIOTECNOLOGICA</b>	<b>65</b>
6.1	<i>Tetrahymena</i> e i promotori delle MT come <i>tool</i> efficiente per l'espressione di proteine ricombinanti	65
6.2	Espressione di un antigene di superficie di <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> in <i>T. thermophila</i>	67
6.3	Cinetica di accumulo della proteina IAG52B	69
6.4	Immunolocalizzazione dell'antigene di superficie di IAG52B	71
<b>7</b>	<b>CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL PROMOTORE <i>MTT-5</i></b>	<b>75</b>
7.1	Caratterizzazione del promotore <i>MTT-5</i>	75
7.2	Caratterizzazione del promotore <i>MTT-5</i> mediante analisi <i>in silico</i>	76
7.3	Caratterizzazione del promotore <i>MTT-5</i> mediante delezioni del promotore	78
<b>8</b>	<b>EVOLUZIONE MOLECOLARE DELLE METALLOTIONEINE IN <i>TETRAHYMENA</i></b>	<b>85</b>
8.1	Le relazioni filogenetiche	85
8.2	Analisi filogenetica	86
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>98</b>
➤	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	



## 1. SCOPO DELLA RICERCA

Dagli anni '40 i protozoi ciliati sono stati utilizzati come organismi modello per ricerche di tipo fisiologico e genetico. *Tetrahymena* è uno dei generi più studiati. Esso rappresenta un sistema sperimentale molto utile in fisiologia e biologia cellulare e molecolare, poiché combina la notevole complessità biologica degli eucarioti con l'accessibilità sperimentale di un organismo unicellulare. L'utilità di *T. thermophila* quale organismo sperimentale modello è stata recentemente incrementata dallo sviluppo di vettori di espressione inducibili basati sul promotore della metallotioneina MTT1. Le metallotioneine (MT) sono una classe di proteine a basso peso molecolare, inducibili, con un'elevata affinità per i metalli pesanti. Nella cellula esse intervengono nella detossificazione di metalli non essenziali come cadmio e mercurio e di elevate concentrazioni di metalli essenziali come rame e zinco. In *Tetrahymena* finora sono state descritte numerose isoforme di MT che vengono convenzionalmente divise in due gruppi: MT più efficientemente indotte da cadmio e MT più efficientemente indotte da rame.

Nell'ambito di questa tesi di dottorato si sono approfonditi alcuni aspetti delle MT in *Tetrahymena*. Lo scopo della mia ricerca può essere riassunto come segue:

- identificare nuove sequenze di MT per incrementare il database delle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche;
- studiare l'espressione metallo-indotta di alcune isoforme di MT (MTT-2 e MTT-5) in *T. thermophila* in una prospettiva ecotossicologica, al fine di proporre questo organismo quale modello per lo studio dei meccanismi coinvolti nella tolleranza ai metalli pesanti e per la determinazione del rischio ecotossicologico;
- studiare la funzionalità del promotore di *MTT-5*, identificata in *T. thermophila* durante la mia attività di ricerca, al fine di utilizzarlo in ambito biotecnologico per l'espressione di geni eterologhi;
- identificare le sequenze responsabili dell'espressione metallo-indotta nel promotore di *MTT-5* per comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nella trascrizione delle MT in *Tetrahymena*;

- formulare nuove ipotesi sull'evoluzione molecolare delle MT di *Tetrahymena* sulla base di analisi filogenetiche effettuate sulle sequenze amminoacidiche e del cDNA.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 *Tetrahymena*

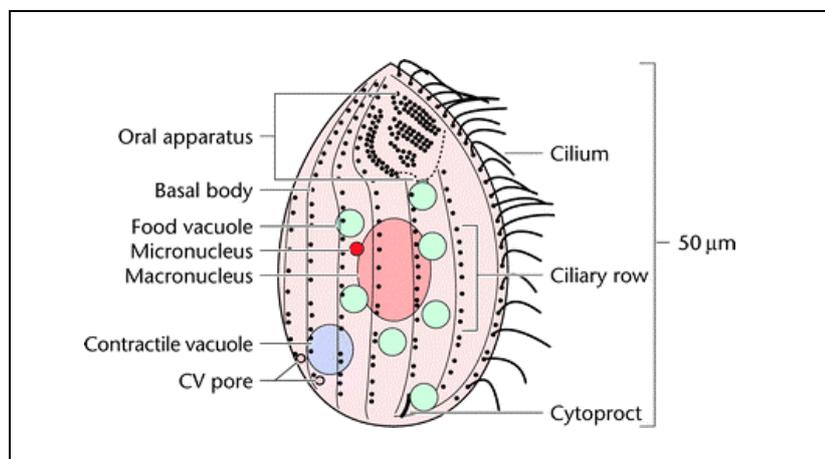
Dal 1940 i protozoi ciliati sono stati utilizzati come organismi modello per ricerche di tipo fisiologico e genetico, poiché potevano essere coltivati in terreni semplici e poco costosi e crescere rapidamente fino ad alte densità. Furgason [1] descrisse il caratteristico *pattern* di membranelle in un protozoo ciliato cui assegnò il nome di *Tetrahymena geleii* e che in seguito Corliss [2] chiamò *Tetrahymena pyriformis*. Quelli che però sembravano gli stessi organismi erano invece un gruppo di organismi diversi dal punto di vista genetico, ma morfologicamente indistinguibili. In seguito, con l'affinamento delle tecniche d'indagine, si evidenziò l'eterogeneità del gruppo con l'identificazione di un numero sempre crescente di ceppi e *mating types* con differenti caratteristiche biochimiche e genetiche. Nanney e McCoy [3] diedero il nome di “*Tetrahymena pyriformis complex*” a questo gruppo eterogeneo di specie.

*Tetrahymena* è uno dei generi più studiati tra i protozoi ciliati. Gli organismi appartenenti a questo genere rappresentano dei sistemi sperimentali molto utili in fisiologia e biologia cellulare e molecolare, poiché combinano la notevole complessità biologica degli eucarioti con l'accessibilità sperimentale dei protozoi. L'utilizzo di questi organismi ha permesso di identificare un gran numero di fenomeni fondamentali ed evolutivamente conservati, come la scoperta della dineina [4], la struttura dei telomeri [5], l'identificazione ed il funzionamento dell'enzima telomerasi, implicato nella replicazione del DNA e nei fenomeni di senescenza cellulare [6, 7], il *self-splicing* dell'RNA [8], le prime evidenze di deviazioni dal codice genetico cosiddetto “universale” in organismi eucarioti [9] e la relazione tra i fattori di trascrizione e la modificazione degli istoni [10].

Il genere *Tetrahymena* fa parte dell'ampio *Phylum* dei Ciliati, che comprende organismi eterotrofi, diffusi nelle acque dolci e marine, caratterizzati da dualismo nucleare e dalla presenza di cilia singole e/o organizzate in organelli. Si riproducono generalmente per scissione binaria e mostrano fenomeni di sessualità che si attuano mediante coniugazione.

*Tetrahymena* può essere facilmente coltivata *in vitro*, infatti cresce velocemente in opportuni *media*. Ad esempio, *Tetrahymena thermophila* ha un periodo di duplicazione di circa 2 ore a 30°C e può raggiungere densità di circa  $2 \times 10^5 / 1 \times 10^6$  cellule per millilitro di coltura. Presenta capacità di alimentazione sia per fagocitosi di materiale particolato sia per trasporto attivo di nutrienti in soluzione. Inoltre sopporta un ampio *range* di temperature, 12-41 °C [11].

Essa ha una forma ovoidale con l'asse antero-posteriore che misura circa 50 µm e il diametro di circa 20 µm (Fig. 2.1).



**Figura 2.1** Disegno schematico dell'organizzazione cellulare di *Tetrahymena*. L'estremità anteriore della cellula è orientata verso l'alto, la superficie ventrale (orale) è posta di fronte all'osservatore. Sono indicate solo sette delle 18-21 cinezie (Frankel, Nature ELS).

La superficie cellulare è rivestita da 18-21 fila di cilia disposte in strutture dette cinezie che corrono parallele all'asse maggiore della cellula, con funzione locomotoria. L'organismo possiede all'estremità anteriore un apparato orale che consiste di quattro elementi (da cui il nome *Tetra-hymena*): una cavità superficiale, citostoma, fornito di una membrana ondulante e 3 membranelle adorali che derivano dalla fusione di più cinezie. Il citoprocto, che ha funzioni escretorie, è localizzato nella parte posteriore sulla superficie ventrale. Di norma sono presenti due pori dei vacuoli contrattili che si aprono nella porzione posteriore dell'organismo, a destra dell'asse citostoma-citoprocto.

Caratteristica comune dei Ciliati è la presenza di un apparato nucleare dimorfico, strutturalmente e funzionalmente differenziato. In *Tetrahymena* sono presenti due nuclei, un micronucleo (MIC) ed un macronucleo (MAC).

Il MIC costituisce il nucleo germinale, dal momento che è attivo durante i processi sessuali, mentre è inattivo dal punto di vista trascrizionale durante la vita vegetativa della cellula. Esso è diploide e contiene cinque paia di cromosomi aventi organizzazione tipicamente eucariotica; si divide per mitosi e va incontro a meiosi nel corso del processo di coniugazione. Alcune specie di *Tetrahymena* amiconucleate, cioè prive di MIC e quindi incapaci di coniugare, si trovano frequentemente in natura. Esistono, inoltre, alcuni ceppi amiconucleati creati sperimentalmente *in vitro*.

Il MAC è il nucleo somatico, contiene cioè le informazioni genetiche trasmesse nel corso della moltiplicazione vegetativa, ed è trascrizionalmente attivo. Esso non fornisce alcun elemento genetico alla progenie durante i processi sessuali. Il MAC è costituito da circa 200-300 filamenti sub-cromosomali derivati da una serie di complessi riarrangiamenti, frammentazioni e moltiplicazioni dei cromosomi micronucleari che avvengono in seguito alla coniugazione. Tali filamenti sono presenti in un numero medio di 45 copie, rendendo quindi il MAC poliploide. Il MAC si divide attraverso un meccanismo peculiare detto “amitosi” in cui non sono presenti le strutture tipiche del normale processo mitotico, quali cinetocori e fuso mitotico. Durante la divisione cellulare, il MAC viene distribuito approssimativamente (ma raramente in modo esatto) in due metà, una per ciascuna cellula figlia. Per quanto concerne le subunità ribosomali, caratteristica è la presenza delle subunità ribosomali 17S e 26S, leggermente più piccole rispetto a quelle degli altri eucarioti (18S e 28S).

## 2.2 Metallotioneina

La prima metallotioneina (MT) fu scoperta nella corteccia renale di cavallo, mezzo secolo fa, nel 1957 [12]; fu chiamata così perchè si trattava di una proteina ad elevato contenuto in zolfo e capace di legare vari metalli [13]. 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 [14] e protisti [15]. Le caratteristiche principali che contraddistinguono le MT sono:

- Basso peso molecolare (2000-18000 Da)
- Elevato contenuto in metalli
- Composizione amminoacidica caratterizzata da un 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

### 2.2.1 Classificazione e struttura proteica delle MT

Inizialmente le diversità nella struttura primaria delle MT ha portato una suddivisione delle MT in tre classi [16]:

#### ➤ 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 [17]. 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  $\alpha$  (C-terminale), comprendente 11 cisteine, e da un dominio  $\beta$  (N-terminale), comprendente 9 cisteine, collegati da un breve segmento conservato che conferisce loro mobilità ed indipendenza al momento di legare il metallo [18, 19].

#### ➤ Classe II

Mantengono costanti i *leitmotifs* 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 le MT isolate nei cianobatteri, nei ricci di mare, nei nematodi, in alcune piante e nei 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 [20, 21]. In *Neurospora crassa*, invece, è presente una particolare MT, costituita da

solo 25 aminoacidi e avente 7 cisteine che possono essere precisamente allineate con quelle del dominio  $\beta$  della MT dei vertebrati [22].

➤ Classe III

Polipeptidi atipici, molto diversi da quelli delle classi precedenti e contengono unità di  $\gamma$ -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 connessioni filogenetiche (Tabella 2.1). In questo modo la superfamiglia delle MT è suddivisa in famiglie, sottofamiglie, sottogruppi, isoforme e clan [23]:

- 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 suo carattere monofiletico;
- isoforme/forme alleliche: membri di sottogruppi, sottofamiglie e famiglie. Per esempio MT-1E, MT-1F, ecc. sono isoforme di MT umane;
- clan: sequenze che non possono essere classificate con i criteri sopra elencati ma che mostrano caratteristiche comuni come la struttura spaziale, proprietà termodinamiche, proprietà di legame con i metalli, ecc.

<p><b>Family 1: vertebrate MTs</b>            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><b>Family 7: ciliata MTs</b>            ci: ciliata MT</p>
<p><b>Family 2: mollusc MTs</b>            mo1: mussel MT-1            mo2: mussel MT-2            mog: gastropod MT            mo: n.d. mollusc MT</p>	<p><b>Family 8: fungi-I MTs</b>            f1: fungi-I MT</p>
<p><b>Family 3: crustacean MTs</b>            c1: crustacean MT-1            c2: crustacean MT-2            c: n.d. crustacean MT</p>	<p><b>Family 9: fungi-II MTs</b>            f2: fungi-II MT</p>
<p><b>Family 4: echinodermata MTs</b>            e1: echinodermata MT type 1            e2: echinodermata MT type 2</p>	<p><b>Family 10: fungi-III MTs</b>            f3: fungi-III MT</p>
<p><b>Family 5: diptera MTs</b>            d1: diptera MT type 1            d2: diptera MT type 2</p>	<p><b>Family 11: fungi-IV MTs</b>            f4: fungi-IV MT</p>
<p><b>Family 6: nematoda MTs</b>            n1: nematoda MT type 1            n2: nematoda MT type 2</p>	<p><b>Family 12: fungi-V MTs</b>            f5: fungi-V MT</p>
	<p><b>Family 13: fungi-VI MTs</b>            f6: fungi-VI MT</p>
	<p><b>Family 14: prokaryota MTs</b>            pr: prokaryota MT</p>
	<p><b>Family 15: planta MTs</b>            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 2.1** Schema di classificazione delle MT secondo Binz e Kägi [23].

## 2.2.2 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 [24]. Solitamente sono espresse due isoforme principali, MT-1 e MT-2, codificate da geni non allelici [25]. 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 [26]. 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 [27]. L'espressione delle MT-4, invece, sembra limitarsi solamente a livello degli epitelii squamosi stratificati di vari organi [28].

Il significato dell'esistenza delle forme multiple di MT risiede probabilmente nel fatto che ciascuna di esse possa avere funzioni peculiari [25, 27]. E' 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 [29, 30].

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. E' stato ipotizzato che il gran numero di isoforme permetterebbe un'alta resistenza alla tossicità causata dalle elevate concentrazioni di metalli assunti con la filtrazione [31]. E' noto che i gasteropodi terrestri tollerano elevate concentrazioni di cadmio (Cd) e rame (Cu) accumulandoli nei tessuti molli. In *Helix pomatia* sono state identificate due isoforme di MT, una deputata alla detossificazione da Cd e l'altra implicata nell'omeostasi del Cu in relazione alla biosintesi di emocianina [32]. 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 [33]. In *Drosophila* sono state identificate quattro MT: MtnA, MtnB, MtnC e MtnD [34, 35].

Nel nematode *Caenorhabditis elegans* sono presenti CeMT1 e CeMT2 [36]. *Lumbricus rubellus*, invece, possiede due isoforme: MT-1 e MT-2, indotte dal Cd [37].

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 [38]. In *Neurospora*

*crassa* è presente una singola isoforma [39]. 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 [40]. In *Saccharomyces cerevisiae*, elevate concentrazioni di Cu inducono la sintesi di due MT denominate CUP1 e CRS5 [20, 41].

Nei tessuti vegetali sono state identificate le tre isoforme MT-1, MT-2 e MT-3 [42]; in particolare l'espressione di MT-2 è stata messa in relazione con la tolleranza delle piante al Cu [43, 44].

Nei procarioti, infine, oltre a SmtA identificata nel cianobatterio *Synechococcus*, è stata isolata BmtA in *Anabaena*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* [45].

### **2.2.3 Ruolo biologico delle MT**

E' molto difficile definire una specifica funzione per le MT, dato il loro eterogeneo coinvolgimento in varie condizioni sia fisiologiche che patologiche [46]. La loro ubiquità nei vari *phyla* indicherebbe che queste proteine svolgono un ruolo determinante negli organismi [47, 48].

Fino ad ora sono state proposte numerose funzioni per le MT, tra le quali le principali sono:

- la capacità di legare ioni metallici tossici liberi, quali Cd e mercurio (Hg) sequestrandoli nel citosol ed evitando, in questo modo, danni ai vari compartimenti cellulari;
- ruolo centrale nell'omeostasi cellulare di metalli essenziali come Zn e Cu, provvedendo anche ad un loro rilascio per la biosintesi di altre metalloproteine. Esperimenti *in vitro* hanno, infatti, evidenziato che le MT possono agire come *chaperonine* per la sintesi di altre metalloproteine costituendo una riserva di ioni metallici da rilasciare alle apo-metalloproteine neosintetizzate [49, 50]. Le MT sono coinvolte anche nella regolazione della proliferazione cellulare [27, 51]. La loro presenza è stata rilevata a livello nucleare in cellule di mammifero, durante la fase di proliferazione. Studi condotti sulle MT nucleari indicano che tali proteine hanno un ruolo fondamentale nel trasferimento di Zn ad enzimi nucleari Zn-

dipendenti coinvolti in processi come la replicazione, la trascrizione e la traduzione [46, 52, 53];

- *scavenger* delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) [54]. Si è osservato, infatti, che la sovraespressione di MT riduce la sensibilità delle cellule e dei tessuti ai danni provocati dalle ROS.

E' da sottolineare che la ricerca di un ruolo biologico delle MT è ulteriormente complicata dall'espressione di differenti isoforme e dal complesso modello di induzione di tali proteine. Infatti, la principale caratteristica delle MT è la loro inducibilità da parte di una vasta gamma di agenti e condizioni, alcuni dei quali sono elencati in Tabella 2.2 [17].

<p><b>Ioni metallici</b> Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Pb</p> <p><b>Ormoni e messaggeri secondari</b> Glucocorticoidi, Idrocortisone, Dexametasone, Adrecorticotropo, Progesterone, Corticosterone, Cortisolo, Estrogeni, Catecolamine, Glucagone, Angiotensina II, Arg-Vasopressina, Adenosina, cAMP, Diacilglicerolo, Ca<sup>++</sup></p>	<p><b>Antibiotici</b> Streptomicina, Cicloesimide, Mitocina</p> <p><b>Agenti citotossici</b> Idrossicarboni, Etanolo, Isopropanolo, Acidi grassi, Butirrato, Cloroformio, Carbonio tetracloruro, Bromobenzene, Iodioacetato, Uretano, Etionina</p>
<p><b>Fattori di crescita</b> Fattori sierici, Insulina, IGF-1, EGF</p>	<p><b>Condizioni stressanti</b> Inedia, Infezione, Infiammazione, Laparotomia, Stress fisici, Stress ossidativi, Raggi-X, Elevata tensione di O<sub>2</sub>, Radiazioni UV</p>

**Tabella 2.2** Fattori inducenti la sintesi di MT in colture cellulari o *in vivo* (modificato da Kägi, [17]).

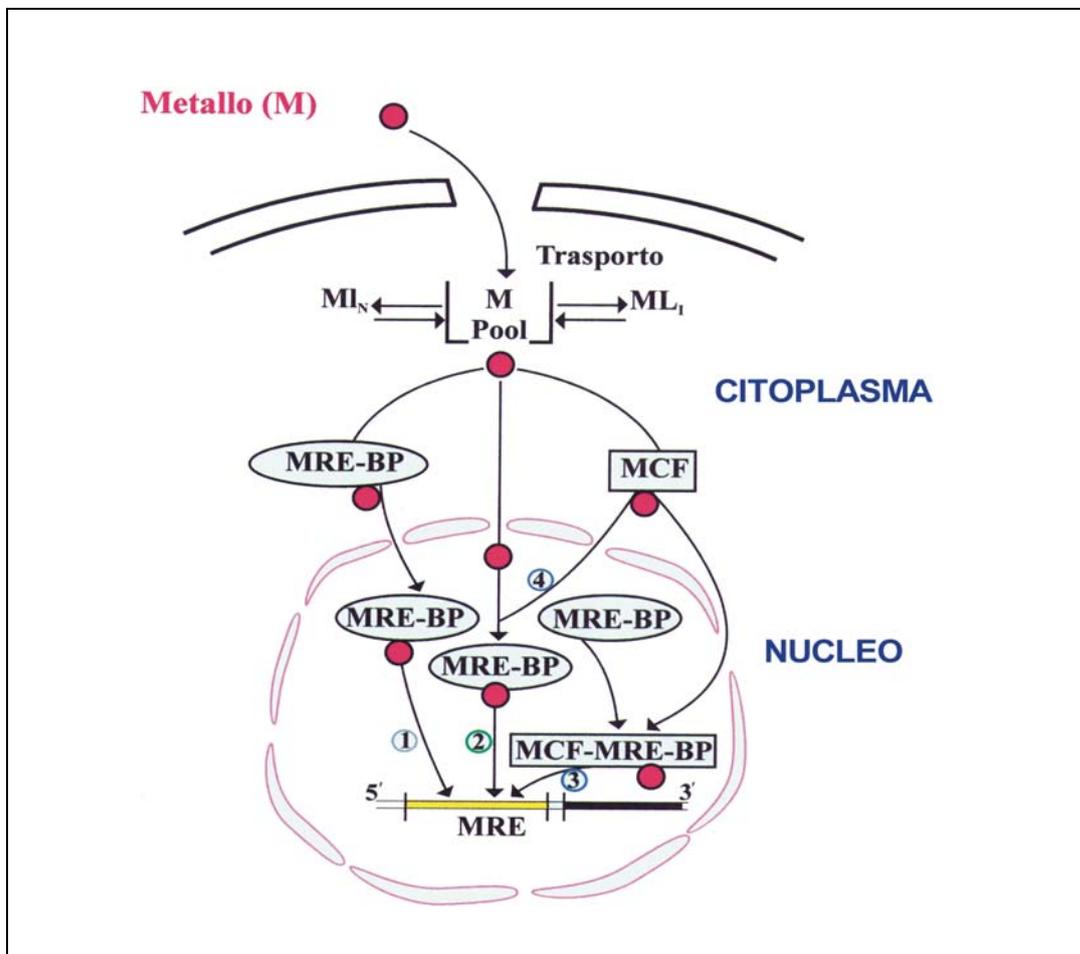
#### 2.2.4 Espressione Genica delle MT in risposta ai metalli

Nei vertebrati l'attivazione della trascrizione genica delle MT da parte dei metalli di transizione necessita della presenza di tre componenti minime [55]:

- 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 2.2.



**Figura 2.2** 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 [17]. 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 [18]. 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 [56].

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 [18]. 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 superiori la situazione si presenta più complessa, poiché le MT sono indotte da vari metalli di transizione essenziali (come Zn e Cu) e non essenziali (come Cd e Hg) [18].

Come detto, la trascrizione metallo-indotta è mediata da particolari sequenze presenti nei promotori dei geni delle MT chiamate MRE (*Metal Responsive Element*) [21, 57]. Esse sono presenti in multiple copie in entrambi gli orientamenti (*forward* e *reverse*) e sono costituite da sequenze consenso di 15 pb ricche in GC, caratterizzate da una regione *core* TGCRCNC molto conservata e da due porzioni fiancheggianti più variabili [58, 59]. E' stato visto che le varie copie degli MRE agiscono in modo sinergico nell'attivazione della trascrizione [57]. MTF-1 (*Metal Transcription Factor-1*) è il fattore che, legandosi specificatamente agli MRE, determina la trascrizione genica indotta dai metalli [60]. Questa

proteina è un fattore di trascrizione a sei dita di Zn della famiglia Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, 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. E' 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 [61, 62].

Sono stati proposti vari modelli per spiegare la modalità d'azione dell'MTF-1, tutti contemplano il ruolo essenziale dello Zn [63, 64, 65, 66]. 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) spiazzano lo Zn dai vari ligandi citoplasmatici rendendolo disponibile per interagire con MTI [64]. Inoltre è stato proposto anche un altro modello che prevede che l'MTF-1, presentando molteplici potenziali siti di fosforilazione, i quali vengono fosforilati in seguito al trattamento con svariati agenti venga traslocato dal citoplasma al nucleo, in ragione della presenza di un NLS (*Nuclear Localization Signal*) [61, 62]. Condizioni stressorie quali un eccesso di metalli (Zn, Cd e Cu), agenti ossidativi (ROS), radiazioni ionizzanti e ipossia potrebbero attivare *pathways* di trasduzione del segnale che causano la fosforilazione di MTF-1 che viene attivato. L'MTF-1 così attivato viene traslocato, grazie alla presenza di un NLS, dal citoplasma al nucleo; una volta entrato nel nucleo, MTF-1 si lega agli MRE, determinando l'inizio della trascrizione genica delle MT.

Altri elementi regolativi riscontrati nei promotori dei geni delle MT sono le 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 [57].

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 [56].



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Terreni di coltura

Nella Tabella 3.1 sono elencate le composizioni dei terreni di coltura utilizzati in questo studio.

	<i>Proteoso peptone</i>	<i>estratto lievito</i>	<i>glucosio</i>	<i>Fe-EDTA</i>	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	<i>bacto triptone</i>	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>MgSO<sub>4</sub></i>
<i>Tetrahymena</i>									
<b>SPP</b>	2%	0,1%	0,2%	0,003%	-	-	-	-	-
<b>NEFF</b>	0,25%	0,25%	0,55%	-	0,033 mM	-	-	-	-
<b>Batteri</b>									
<b>LB</b>	-	0,5%	-	-	-	1%	10mM	-	-
<b>SOB</b>	-	0,5%	-	-	-	1%	10mM	2,5mM	-
<b>SOC</b>	-	0,5%	20mM	-	-	1%	10mM	2,5mM	20mM
<b>2xYT</b>	-	1%	-	-	-	1,6%	10mM	-	-

Tabella 3.1 Terreni di coltura.

### 3.2 Ceppi e colture cellulari

I ceppi cellulari di *Tetrahymena* utilizzati in questo studio sono elencati in Tabella 3.2.

<b><i>Ceppo di Tetrahymena</i></b>	<b><i>Provenienza</i></b>
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Laboratorio di Protistologia di Padova
<i>Tetrahymena thermophila</i> CU428.1	Dr. J. Gaertig, University of Georgia
<i>Tetrahymena thermophila</i> CU522	Dr. P. Burns, Cornell University
<i>Tetrahymena thermophila</i> FLG52B	T.G. Clark, Cornell University
<i>Tetrahymena thermophila</i> MTT-2-nrk2-GFP	Dr. J. Gaertig (University of Georgia)
<i>Tetrahymena thermophila</i> MTT-5-nrk2-GFP	Università di Padova/ Cornell University
<i>Tetrahymena thermophila</i> MTT5 mutanti (1777/1200/825/453/420/386/361/338/318 /300/294/290/285/270/255/199/136/m294- 274/ m294-290)	Università di Padova/ Cornell University

**Tabella 3.2** Ceppi cellulari di *Tetrahymena*.

*Tetrahymena thermophila* CU428.1 e CU522 sono state coltivate a 30° C in agitazione a 170 rpm, in terreno liquido SPP [67]. I mutanti di *Tetrahymena thermophila* (FLG52B, MTT5, MTT-2-nrk2-GFP e MTT-5-nrk2-GFP) sono stati coltivati a 30° C in agitazione a 170 rpm, in terreno liquido Neff [68].

L'allestimento delle colture per il trattamento con i metalli è stata condotta inoculando le cellule in fase logaritmica di crescita ad una concentrazione di circa  $5 \times 10^5$  cellule per millilitro di terreno. La densità cellulare è stata valutata mediante l'utilizzo di un emocitometro (camera di Bürker).

### 3.3 Trattamenti con metalli

I trattamenti con i metalli sono stati sempre condotti utilizzando una concentrazione sub-tossica. Le dosi impiegate negli esperimenti sono state stabilite da curve di crescita precedentemente allestite di colture cellulari di controllo e trattate per tempi diversi. Nel caso del trattamento con cadmio (Cd), rame (Cu) e zinco (Zn) erano già disponibili dati che avevano individuato le dosi ottimali [69, 70]. Le dosi di metalli utilizzate in questo studio sono elencate in Tabella 3.3.

Soluzione di metallo	Concentrazione [ $\mu\text{M}$ ]
Cd Cl <sub>2</sub>	11
CuCl <sub>2</sub>	630
ZnCl <sub>2</sub>	229

**Tabella 3.3.** Concentrazioni di metalli

### 3.4 Dosaggio dei metalli nell'estratto cellulare

#### 3.4.1 Preparazione dell'estratto cellulare

Le colture cellulari sono state centrifugate a  $2500 \times g$  per 15 min a temperatura ambiente e lavate due volte in tampone Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Il pellet è stato poi risospeso in tampone di omogeneizzazione e rotte a freddo mediante un omogenizzatore Polytron. L'omogenato è stato centrifugato a  $48000 \times g$  per 50 min a 4°C ed il supernatante risultante è stato separato accuratamente dal pellet e tenuto in ghiaccio per effettuare i successivi dosaggi delle proteine e dei metalli.

### 3.4.2 Dosaggio delle proteine

Il contenuto proteico dell'estratto cellulare è stato determinato utilizzando il reagente fenolico Folin-Ciocalteu [71], che consente di determinare una quantità proteica compresa tra 5 e 100 µg in 0,2 ml di campione. La concentrazione proteica di ciascun campione, espressa in mg/ml, è stata calcolata mediante regressione lineare tra quantità note e crescenti di standard (BSA 1 mg/ml in tampone di omogeneizzazione) e relativi valori di densità ottica (DO) a 750 nm.

### 3.4.3 Dosaggio dei metalli

La quantità di metalli presente nell'estratto cellulare, diluito opportunamente con H<sub>2</sub>O Milli-Q, è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro ad assorbimento atomico a fiamma (Perkin Elmer 4000). I valori di concentrazione ottenuti, espressi in µg/ml, sono stati normalizzati con quelli delle proteine totali misurati nei medesimi campioni, e quindi riportati come µg di metallo/mg di proteine totali.

## 3.5 Estrazione degli acidi nucleici

### 3.5.1 Estrazione del DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico è stata seguita la metodica di Gaertig e collaboratori [72]. Sono state utilizzate circa  $8 \times 10^6$  cellule in fase logaritmica di crescita. Le colture cellulari sono state fatte sedimentare mediante centrifugazione a  $2500 \times g$  per 4 min a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate e risospese in *starvation buffer* (Tris-HCl 10 mM pH 7,5) nel quale sono state mantenute per 18-24 h a 30° C senza agitazione. In seguito le colture sono state centrifugate a  $1400 \times g$  per 5 min e il supernatante è stato rimosso. Il pellet così ottenuto è stato risospeso nel tampone di lisi (UREA 42%, NaCl 0,35 M, Tris-HCl 0,01M pH 7,4, EDTA 0,01 M, SDS 1%) e mescolato per 5 min. L'estrazione del DNA dal lisato cellulare è stata effettuata due volte mediante la miscela

fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1) ed una volta con cloroformio:alcool isoamilico (24:1). E' seguita poi la precipitazione mediante NaOAc, 3 M pH 5,2 ed alcool isopropilico. Il DNA è stato lavato con etanolo 70% e risospeso in H<sub>2</sub>O sterile *overnight* su piastra agitante. Il giorno seguente il campione è stato trattato con RNasi DNase-free a 37°C per 30 min, aliquotato e conservato a 4°C.

Per determinare la quantità di DNA estratto, ne è stata misurata la DO<sub>260</sub>. Il valore ottenuto è stato moltiplicato per 50 in quanto una DO corrisponde ad 50µg/ml. Il rapporto DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> ha permesso inoltre di valutare la presenza di eventuali contaminazioni di proteine; valori compresi tra 1,8 e 2,0 sono indice di un buon livello di purezza.

Per controllare l'integrità del DNA è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,5% in tampone TAE 1X.

### **3.5.2 Estrazione dell'RNA totale**

Le cellule sono state centrifugate e lavate come per l'estrazione del DNA. Al pellet è stato aggiunto 1 ml di TRIzol (Invitrogen) per  $5-6 \times 10^6$  cellule. Dopo il trattamento con cloroformio e successiva centrifugazione, l'RNA è stato recuperato dalla fase acquosa, fatto precipitare con alcool isopropilico, lavato con etanolo al 75% e quindi seccato; infine è stato risospeso in H<sub>2</sub>O trattata DEPC (di-etil-pirocarbonato).

La concentrazione dei campioni è stata calcolata come per il DNA, ma il valore di DO<sub>260</sub> è stato moltiplicato per 40. La purezza è stata valutata mediante il valore del rapporto DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> e l'integrità mediante un'elettroforesi in gel d'agarosio/formaldeide all'1%.

### 3.6 Retrotrascrizione dell'RNA ed amplificazione del DNA mediante PCR

#### 3.6.1 PCR primers

Tutti i primers utilizzati in questo studio sono elencati in Tabella 3.4.

<i>Primer</i>	<i>Sequenza primer 5'-3'</i>
Anchor-oligodT	GTTTTCCCACGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG
Anchor primer	GTTTTCCCACGAC
MTT5-FW	CCCTAGTGAGACCCAAAATTGC
MTT5-RE	CTACCTCCAGGGCAGCATTCC
MT-2 Fw	ATGGATACTCAAACCTCAAACC
MT-2 Re	TCATTGCTTTTTGGCAACAAGA
MTT5 5'-RACE	CTCCAGGGCAGCATTCTTTA
MTT5 3'-RACE	TGCTGCAAGTGTTTGTAAGGT
MTT3 5' RACE	CAAGCACAATTACATTGTCTATT
MTT3 3' RACE	ATGGAAAAAATTAATAACAGTTGC
MTT-1 5' RACE	CTCCAGGGCAGCATTCTTTA
MTT4 5' RACE	CCAACAGTGACCTTAGTTTTGAGTTT
MTT4 3' RACE	ATTGCGGTTCTACTTCCAACGTGA
G5II Fw	TGGCACTGCTATTCAAGACG
G5II Re	AAGCAGCAGTAGCAGCATCA
17S r-RNA- RE	CCTGAGAAACGGCTACTACAACCTAC
17S r-RNA	AAATGTTTACTCCCTAAGTCGAACC
pMTT5 RE	cgcaagcttgCCATATTTTAAATCTGATATATTATATTG
pMTT5 (136) FW	cgcgggatcc TCTTGAATACAATCATGAGTTCACC
pMTT5 (199) FW	cgcgggatccGAGTCTAGCTTTAGTCAATAGTCACCAATTATAT
pMTT5 (233) FW	cgcgggatccCATGATTCACATAAAAATATAAAAATTTA
pMTT5 (255) FW	cgcgggatccCTTTAACCTAAAATTAGTTACTC
pMTT5 (270) FW	cgcgggatccTATAAAAATGAATGCCTTTAACCTA
pMTT5 (285) FW	cgcgggatccTCAAAGATACTCATCAAGTACGCAA
pMTT5 (290) FW	cgcgggatccCTCATCAAGTACGCAACAA
pMTT5 (294) FW	cgcgggatccCAAAGATACTCATCAAGTACGCAAC
MTT5 (300) FW	cgcgggatccTCAAAGATACTCATCAAGTACG
pMTT5 (318) FW	cgcgggatccAAATATATTTAATCTTTTTCAAAGATAC
pMTT5 (338) FW	cgcgggatccATGATTCACACAAGATTTCA
pMTT5 (361) FW	cgcgggatccGCTACAAATTTGAATTAATACTCA
pMTT5 (386) FW	cgcgggatccCACTCAACAAAAGTAAGTAAGAAA
pMTT5 (420) FW	cgcgggatccAAAATATCAAATTTGAATATTTACTC
pMTT5 (453) FW	cgcgggatccTAATCCCTCATGATTCAC
pMTT5 (825) FW	cgcgggatccAATTGAATATTTACTCATGATTCAC
pMTT5 (1200) FW	cgcgggatccAGGTCAAAAAAGCAAAGTAAC
pMTT5 (1177) FW	cgcgggatccCCACCAATTTTCATTGTAAC
MTT5 (290-274) Fw	GATAAAATCAAATATAAAAATGAATGC

MTT5 (290-274) Fw	GATAAAATCAAATATAAAATGAATGC
MTT5 (mGATA)Fw	TCAAGTACGCAACAAATATAAAATG
MTT5 (mGATA)Re	TGAGGGGGT'TTTGAAAAAG
BTU1 FW	AGTTAGCCCATTTTTGATCTTCC
G5II(1) RE	AAGCAGCAGTAGCAGCATCA
T27	CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC
T30	CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

**Tabella 3.4** PCR primers.

### 3.6.2 Sintesi del cDNA

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato come stampo circa 1 µg di RNA totale, cui è stato aggiunto 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<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl di dNTP mix (10 mM), 6,1 µl di acqua *nuclease free* e 0,5 µl di RNasin *Ribonuclease Inibitor* (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 programma:

- 25°C per 5 min
- 42°C per 1 h
- 70°C per 15 min

### 3.6.3 Amplificazione del cDNA

L'amplificazione del cDNA mediante PCR è stata effettuata usando i *primers* progettati *ad hoc* elencati in Tabella 3.4.

La miscela di reazione contiene, oltre al primo filamento di cDNA (1  $\mu$ l):

- ✓ *Buffer* di reazione 10x
- ✓ MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2  $\mu$ l
- ✓ dNTP mix (10mM), 1  $\mu$ l
- ✓ *Primer forward* (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l
- ✓ *Primer reverse* (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l
- ✓ EuroTaq (5U/ $\mu$ l), 0,25 U
- ✓ H<sub>2</sub>O sterile deionizzata per un volume finale di 50  $\mu$ l

Essa è stata incubata nel termociclatore col seguente programma :

94°C per 2 min	}	(25 cicli)
94°C per 30 s		
Temperatura di <i>melting</i> dei <i>primers</i> -5 °C per 30 s		
72°C per 30 s per ogni Kb		

### 3.7 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<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. La procedura prevede la lisi del gel e la purificazione del DNA grazie ad una colonna NucleoSpin<sup>®</sup> Extract. Il DNA purificato è stato quantificato e utilizzato nella reazione di ligazione col vettore pGEM-T Easy (kit pGEM<sup>®</sup>-T e pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vectors Systems I, Promega) da utilizzare per il clonaggio in *E. coli*.

Questo vettore contiene un gene *amp<sup>r</sup>* 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. Tuttavia, poiché c'è la possibilità che i batteri internalizzino un plasmide richiuso, quindi

privo di inserto, il vettore pGEM è stato progettato anche per permettere la selezione dei batteri contenenti plasmide e inserto, sfruttando l' $\alpha$ -complementazione. Il sito di policlonaggio si trova, infatti, all'interno del gene *lacZ'*, codificante la regione N-terminale della  $\beta$ -galattosidasi, la quale è in grado di interagire con la porzione di  $\beta$ -galattosidasi codificata dal ceppo di *E. coli* usato per la trasformazione, complementandone la funzione. Se nel terreno di coltura sono aggiunti IPTG (isopropiltiogalattoside, per indurre l'espressione della  $\beta$ -galattosidasi) e X-gal (un substrato cromogenico che viene convertito in un prodotto blu dall'enzima), le colonie contenenti l'inserto risulteranno di colore bianco mentre quelle contenenti solo il plasmide richiuso saranno di colore blu.

La reazione di ligazione è stata effettuata a 4°C *overnight* utilizzando i seguenti reagenti:

- ✓ tampone di ligazione a base di Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> e ATP, 5µl
- ✓ vettore pGEM®-T Easy (50ng/µl), 1µl
- ✓ T4 DNA ligasi (3U/µl), 1µl
- ✓ DNA estratto dalla banda in quantità sufficiente ad effettuare un rapporto di almeno 3:1 tra il cDNA e il vettore
- ✓ H<sub>2</sub>O sterile deionizzata per un volume finale di 10 µl

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

$$\left( \frac{\text{ng di vettore} * \text{Kbasi dell'inserto}}{\text{Kbasi vettore}} \right) * \text{rapporto} \frac{\text{inserto}}{\text{vettore}} = \text{ng di inserto}$$

### 3.7.1 Preparazione dei batteri competenti alla trasformazione

Batteri *E. coli* XL1-BLUE sono stati resi competenti utilizzando una metodica che prevede l'uso di CaCl<sub>2</sub> [73]. 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 di 80 µl di volume in glicerolo 50% v/v, a -80°C.

### 3.7.2 Trasformazione dei batteri competenti

Ad ogni aliquota di batteri (80  $\mu$ l) è stato aggiunto il prodotto di ligazione e, dopo un'incubazione in ghiaccio di 30 min, viene eseguito uno *shock* termico, ponendola prima a 42°C per 90 s, poi in ghiaccio per 3 min. Quindi sono stati aggiunti 920  $\mu$ l di terreno SOC e posti per 1 h a 37°C in agitazione in modo da permetterne la crescita. Infine, dopo aver centrifugato i campioni per eliminare circa 800  $\mu$ l di terreno ed averli risospesi, questi sono stati piastrati su terreno solido contenente LB, ampicillina alla concentrazione finale di 0,1 mg/ml, X-Gal (2%) e IPTG (0,1 M) 0,4%, e lasciati crescere *overnight* a 37°C.

### 3.7.3 Screening delle colonie trasformate

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

Screening visivo: sfrutta il meccanismo dell' $\alpha$ -complementazione. Poiché tale test non risulta molto attendibile, le colonie bianche e anche alcune azzurre sono state sottoposte ad ulteriori analisi.

Screening mediante PCR: utilizzando i *primers* T27 e T30 (Tabella 3.4), che si appaiono alle regioni del vettore fiancheggianti il sito di policlونaggio, 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 contenevano (controlli).

Il programma utilizzato per l'amplificazione è stato il seguente:

92°C per 2 min	} (25 cicli)
94°C per 30 s	
70°C per 4 min	

Screening mediante digestione con EcoRI: le colonie risultate positive ai due precedenti *screening* sono state fatte crescere a 37°C *overnight* in terreno liquido

LB con ampicillina. Successivamente si è proceduto con l'estrazione del plasmide mediante il kit commerciale Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid (Machery-Nagel). Tale protocollo prevede la purificazione del DNA plasmidico grazie all'utilizzo della colonnina Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid.

Il plasmide estratto è stato quantificato allo spettrofotometro e per ogni campione plasmidico è stata effettuata una digestione enzimatica con EcoRI, enzima di restrizione che taglia in corrispondenza del sito di policlonaggio del pGEM, permettendo così di excidere l'inserto (DNA) dal vettore. Per la digestione enzimatica sono stati utilizzati 500 ng di plasmide che sono stati digeriti con l'enzima di restrizione EcoRI. La soluzione è stata incubata a 37°C per 1 h e successivamente analizzata tramite corsa elettroforetica sul gel di agarosio.

I campioni risultati positivi sono stati liofilizzati e mandati a sequenziare.

### 3.8 Sequenziamento

Il sequenziamento è stato eseguito presso un centro BMR Genomics, dotato di un sequenziatore automatico modello ABI 3730XL a 96 capillari. Per determinare la sequenza viene eseguita una PCR, che utilizza i *primers* SP6 e T7 (Tabella 3.4), costruiti sulle sequenze delle regioni fiancheggianti il sito di policlonaggio del vettore pGEM. Oltre ai comuni dNTP, la miscela contiene 4 dideossinucleotidi (ddNTP) marcati con diversi fluorofori; questi ddNTP hanno un 3'-H invece di 3'-OH nello zucchero deossiribosio e per questo motivo se vengono inseriti in una catena in via di allungamento, impediscono la formazione del legame fosfodiesterico bloccando la reazione di sintesi. Si ottengono così vari prodotti di PCR di diversa lunghezza, ognuno terminante con un nucleotide marcato con un diverso colore. Questi frammenti di DNA vengono sottoposti ad elettroforesi capillare su gel fluido di poliacrilammide e durante la corsa un laser eccita i gruppi fluorescenti permettendo di determinare quale particolare nucleotide è presente in ogni posizione. Le informazioni vengono quindi inviate ad un computer che le rielabora in un elettroferogramma e quindi in sequenza nucleotidica.

### 3.9 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.

#### 3.9.1 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 programma:

94°C per 2 min	} 35 cicli
94°C per 30 s	
51-55°C per 30 s	
72°C per 90 s	
72°C per 5 min	

#### 3.9.2 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 *primers* 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 di PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs e DTT. 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*) e 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 *primers forward* progettati in precedenza (Tabella 3.4). Come *primer reverse* 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. I componenti della reazione sono:

- ✓ H<sub>2</sub>O sterile
- ✓ 10x PCR buffer
- ✓ MgCl<sub>2</sub> 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.

Nei casi in cui non sono stati generati prodotti specifici, si è ricorsi ad una successiva amplificazione *nested* utilizzando *primers reverse* più interni.

### 3.10 Real time-PCR

La *real time* PCR quantitativa è utilizzata per determinare la quantità iniziale di uno specifico gene *target* nel campione in esame e si basa sulla misurazione di un segnale di fluorescenza generato durante una reazione di PCR, come conseguenza della sintesi dell'*amplicon*. La quantità di fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione risulta proporzionale alla quantità di prodotto sintetizzato.

Per ogni esperimento sono preparate 3 diluizioni scalari del cDNA, in modo da ottenere concentrazioni finali comprese fra 1-10 ng/μl, calcolate rispetto all'RNA usato come stampo. Un μl di ciascuna diluzione è amplificato in triplo utilizzando la chimica del SYBR Green I (un intercalante fluorescente che lega con elevata affinità il DNA a doppia elica) e seguendo il protocollo consigliato dalla ditta fornitrice del *kit* di amplificazione (Finnzymes). Nel *buffer* di reazione 10x del *kit* è presente il ROX, un colorante che si utilizza come riferimento passivo interno per normalizzare le fluttuazioni nel segnale di fluorescenza che non sono legate alla reazione di PCR, ma che sono legate a variazioni di concentrazione o volume.

Le reazioni sono condotte in uno strumento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem).

Il cDNA è amplificato mediante reazione di PCR utilizzando gli oligonucleotidi specifici per i geni *target* (Tabella 3.4).

Parallelamente il cDNA viene amplificato con i *primers* 17S Fw e 17S Re (Tabella 3.4) specifici per RNA ribosomale 17S, usato come gene *housekeeping*.

La reazione di amplificazione è stata ottenuta con la seguente cinetica:

- 95°C per 15 min
  - 95°C per 30 s
  - 55-60°C per 30 s
  - 72°C per 35 s
  - 72°C per 2 min
- } 40 cicli

Al termine della reazione di amplificazione lo strumento effettua il “protocollo di dissociazione”, grazie al quale è possibile verificare la specificità del prodotto amplificato calcolando la sua temperatura di *melting*. In pratica, la temperatura nei pozzetti del termociclatore è aumentata gradualmente a partire da 60°C, effettuando *step* di 0,5°C ogni 30 secondi, fino a raggiungere i 95°C. Riportando in grafico il logaritmo dell’intensità di fluorescenza emessa contro la temperatura, si ricava la “curva di *melting*” del prodotto amplificato. Il grafico mostra un picco di intensità in corrispondenza della temperatura di *melting* del prodotto amplificato. La presenza di altri picchi nella curva sta ad indicare la presenza di prodotti aspecifici. Infine la specificità dell’*amplicon* è controllata mediante una corsa elettroforetica dei prodotti di PCR in gel d’agarosio 1,5% in tampone TAE1X.

I livelli di espressione relativa dei geni considerati sono stati analizzati con il metodo Pfaffl [74]. I valori medi dei livelli di espressione dei geni *target* derivano da tre esperimenti indipendenti.

### 3.11 Il promotore di MTT-5 nella costruzione di un vettore di espressione inducibile dal cadmio

Allo scopo di costruire dei vettori di espressione inducibili dal cadmio, sono stati utilizzati:

- il plasmide MTT1-Nrk2-GFP, che deriva da un pBlueScript KS(+) (Stratagene), e gentilmente fornito dalla Dr.ssa Dorota Wloga (University of Georgia). Il gene *reporter* è costituito dalla regione codificante di Nrk2 (*Nima Related Kinase*) di *T. thermophila* unita a quella per la GFP (*Green Fluorescent Protein*), in modo che venga espressa una proteina chimerica, fluorescente sotto la stimolazione dei raggi ultravioletti. Il sistema risulta inducibile dal Cd, in quanto sotto il controllo di una porzione di circa 1.9 Kbp del promotore di MTT1[75]. A valle ed a monte di queste regioni sono situate le sequenze 5' e 3'-fiancheggianti la regione codificante la  $\beta$ -tubulina1 (BTU1) di *T. thermophila*.
- il plasmide FLG5II, che deriva da un pBlueScript KS(+) (Stratagene), e gentilmente fornito dal Dott. Theodore Clark (Cornell University). Il gene *reporter* è *IAG52B*, che codifica per uno degli antigeni di superficie (52KD) di *Ichthyophthirius multifiliis*, un protozoo ciliato parassita di pesci d'acqua dolce. Anche in questo caso il sistema risulta inducibile dal Cd, in quanto sotto il controllo della stessa porzione di circa 1.9 Kbp del promotore di MTT1 [75].

#### 3.11.1 Clonaggio del promotore di MTT5 nel vettore

Differenti porzioni di 1777, 1200, 825, 453, 420, 386, 361, 338, 318, 300, 294, 285, 270, 255, 233, 199, 136 bp del promotore di MTT5, la cui sequenza è stata ottenuta dalla sequenza genica depositata nel *Tetrahymena* Genome Database, TGD, (<http://www.ciliate.org>), sono state amplificate a partire da DNA genomico estratto da cellule di *T. thermophila* CU428.1, mediante la *Phusion* DNA *Polymerase* (Finnzymes). Tale enzima assicura un'altissima fedeltà nel processo di sintesi del DNA, poiché dotata di attività *proofreading*. Sono stati utilizzati

*primers* (Tabella 3.4) che hanno introdotto i siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione BamHI ed HindIII rispettivamente, in modo da inserire il prodotto di amplificazione nel vettore di espressione, sostituendo il promotore di MTT1.

Il programma di PCR utilizzato è stato il seguente:

98° C	30 s	} 30 cicli
98° C	10 s	
56° C	25 s	
72° C	30 s per ogni kb	
72° C	10 min	

Il prodotto di amplificazione è stato purificato dall'eccesso di *primers* e dalla polimerasi, utilizzando il kit NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II (Macherey-Nagel), e successivamente digerito con gli enzimi di restrizione BamHI e HindIII a 37 °C per 2 h. In seguito è stato fatto correre in elettroforesi in gel di agarosio all'1% ed estratto mediante il kit NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II (Macherey-Nagel).

Parallelamente, anche i vettori MTT1-Nrk2-GFP e FLG5II sono stati ristretti con gli stessi enzimi e purificati dal gel, in modo da eliminare la regione del promotore di *MTT1*.

La reazione di ligazione tra vettore ed inserto è stata effettuata secondo il seguente schema:

- 10x Ligase Buffer (NEB)
- Vettore (100 ng)
- pMTT5 (ng = ng vettore × Kb inserto/ (Kb vettore+ Kb inserto))
- T4 DNA Ligase (3 U/μl)

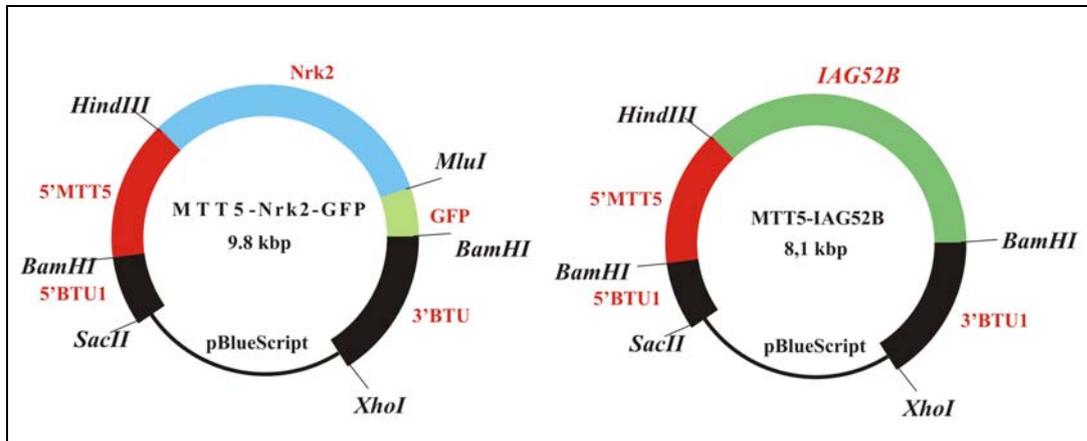
La reazione è stata incubata *overnight* a 16° C.

### 3.11.2 Trasformazione e *screening* dei batteri

I batteri *E. coli* DH5 $\alpha$  sono stati resi competenti secondo la metodica di Tang e collaboratori [73] e conservati a  $-80^{\circ}$  C in aliquote al 50% di glicerolo. Al momento della trasformazione, circa 25 ng del prodotto di ligazione è stato aggiunto ai batteri che sono stati trasformati secondo la metodica descritta nel paragrafo 3.7.2. In seguito, 100  $\mu$ l di sospensione batterica sono stati piastrati su terreno LB-agar contenente 100  $\mu$ g/ml di ampicillina ed incubati per circa 16-18 h a  $30^{\circ}$  C.

Lo *screening* per verificare la presenza del plasmide contenente l'inserto, è stata effettuata mediante analisi di restrizione dei plasmidi estratti dalle colonie batteriche mediante il kit commerciale Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid (Machery-Nagel).

I vettori di espressione così costruiti, MTT5-Nrk2-GFP e MTT5-IAG52B, in cui l'espressione dei geni *reporter* risultano sotto il controllo del promotore di MTT5, presentano la seguente mappa (Fig.3.1):



**Figura 3.1** Mappa schematica dei vettori d'espressione MTT-5-nrk2-GFP e MTT5-IAG52B.

### 3.11.3 Trasformazione di *T. thermophila* con i vettori MTT5-Nrk2-GFP e MTT5-IAG52B

Allo scopo di fare sovraesprimere Nrk2-GFP e IAG52B in *T. thermophila* è stato utilizzato il ceppo CU522, che presenta una mutazione a carico della regione codificante del gene della  $\beta$ -tubulina 1 (BTU1): il residuo lisina in posizione 350 è infatti sostituito da una metionina. Questo conferisce alle cellule una particolare sensibilità al taxolo, una sostanza stabilizzatrice dei microtubuli, che quindi viene utilizzato come agente selettivo per i trasformanti.

I batteri contenenti i plasmidi di espressione sono stati inoculati in 5 ml di terreno liquido LB contenente ampicillina alla concentrazione finale di 100  $\mu\text{g/ml}$  e fatti crescere in agitazione per 16-18 h a 30°C. In seguito, i plasmidi sono stati estratti mediante il kit Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid (Machery-Nagel). Il DNA plasmidico (circa 30  $\mu\text{g}$ ) è stato digerito con gli enzimi di restrizione SacII e XhoI per 3 h a 37° C, in modo da separare la porzione 5'BTU1-MTT5-Nrk2-GFP-3'BTU1 o la porzione 5'BTU1-MTT5-IAG52B-3'BTU1 dal resto del vettore. Dopo avere verificato la restrizione mediante elettroforesi, il DNA è stato purificato dagli enzimi mediante fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1), cloroformio:alcool isoamilico (24:1) e precipitato *overnight* a -20°C mediante NaOAc 3 M pH 5,2 ed alcool isopropilico. Il giorno seguente il DNA è stato centrifugato a 13000  $\times g$  per 30 min a 4°C, il pellet è stato lavato con etanolo 70% e risospeso in acqua sterile ad un concentrazione finale di circa 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Le cellule di *T. thermophila* CU522 sono state fatte crescere sino ad ottenere una concentrazione di circa  $3 \times 10^5$  cellule/ml, centrifugate a 1400  $\times g$  per 3 min, lavate in *starvation* buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7,5), centrifugate nuovamente e risospese nel medesimo *buffer*, nel quale sono state mantenute per circa 24 h a 30° C.

Al momento della trasformazione, ad 1  $\mu\text{g}$  di DNA plasmidico digerito e purificato sono stati aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di una sospensione (al 50% di glicerolo) di particelle di oro colloidale (60 mg/ml) del diametro di 0,6  $\mu\text{m}$ . Sono stati quindi aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di  $\text{CaCl}_2$  (2,5 M), 4  $\mu\text{l}$  di spermidina (0,1M) e la sospensione è stata

lavata con 200 µl di etanolo 70%, poi con 100 µl di etanolo 100% ed infine risospesa in 15 µl di etanolo 100% mediante breve sonicazione.

La trasformazione è stata effettuata mediante bombardamento biolistico, utilizzando il Biolistic Particle Delivery System, PDS-1000/He (BioRad). In breve, 50 ml di cellule lasciate in *starvation* buffer sono state fatte adsorbire su carta Whatman n.1 e sottoposte alla trasformazione, che è avvenuta ad una pressione di 900 psi. In seguito sono state poste in una fiasca con 50 ml di terreno Neff a 30° C senza agitazione per circa 3 h. E' stato quindi aggiunto il taxolo alla concentrazione finale di 20 µM, e 100 µl di cellule sono state suddivise in piastre da 96 pozzetti e poste a 30°C. Dopo 5-6 giorni è stata verificata la presenza dei trasformanti mediante PCR *screening*.

### 3.12 Mutagenesi sito-diretta

A partire dal vettore d'espressione MTT5-IAG52B contenente il promotore "full lenght" (1777bp) sono stati disegnati dei *primers* FW e RE (Tabella 3.4) in modo tale da introdurre una mutazione in specifiche regioni. La sequenza specifica è stata sostituita con una sequenza casuale e l'intero plasmide è stato amplificato mediante PCR inversa con la *Phusion DNA Polymerase* (Finnzymes). Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

98° C	30 s	} 30 cicli
98° C	10 s	
56° C	25 s	
72° C	3 min	
72° C	10 min	

Il prodotto di amplificazione è stato purificato dall'eccesso di *primers* e dalla polimerasi, utilizzando il kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel), e successivamente fosforilato con una T4PNK a 37°C per 30 min. Il prodotto fosforilato è stato purificato e la ligazione è avvenuta a 16°C *overnight*. Successivamente il prodotto di ligazione purificato è stato digerito per 4 h a 37°C con l'enzima DpnI [76].

La trasformazione e lo *screening* dei batteri è avvenuto secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.12.3.

### 3.13 Western blotting

Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a  $3400 \times g$  per 4 min e i *pellets* cellulari sono stati risospesi in una soluzione al 4% di iodoacetamide e dissolti in SDS *loading* buffer (50mM Tris-HCl pH 6,8; 100mM ditiotreitolo, 2% SDS, 0,1% blu di bromofenolo, 10% glicerolo), prima di essere frazionati mediante SDS-PAGE. Le proteine sono state separate in gel di poliacrilammide al 12% e trasferite mediante *electroblotting* su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata poi incubata a 4°C *overnight* in *blocking buffer* contenente il 10% *non-fat milk* in PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Un anticorpo policlonale IAG52B primario *anti-rabbit* è stato aggiunto alla diluizione 1:2000 in *blocking buffer* e la membrana è stata incubata a temperatura ambiente in agitazione per 1 h. Dopo tre lavaggi in PBS-T (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween, pH 7,4) da 10 min ciascuno, la membrana è stata incubata per 1 h con l'anticorpo secondario HRP *labeled secondary goat anti-rabbit* IgG alla diluizione 1:10.000 in *blocking buffer*. Successivamente la membrana è stata lavata come precedentemente descritto e incubata con 10 ml di soluzione contenente un uguale volume di Supersignals West Pico Luminol/Enhancer solution e Stable Peroxide solution in agitazione per 5 min. Il segnale è stato poi acquisito usando una CCD *camera* (Chemigenius Bio Imaging System; SYNGENE) e l'intensità di fluorescenza è stata analizzata mediante densitometria.

### 3.14 Immunofluorescenza

L'espressione dell'antigene ricombinante in *Tetrahymena* è stata rilevata mediante immunomarcatura con un anticorpo monoclonale G3-61. Le cellule in fase esponenziale di crescita ( $5,0 \times 10^5$  cellule/ml) sono state trattate con una soluzione 11µM di CdCl<sub>2</sub>, sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate con 10 ml di Tris 10 mM a pH 7,5 e risospese in 0,5 ml. Le cellule sono poi state

fissate in paraformaldeide al 2% in PHEM *buffer* (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,9) per 1 h a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state lavate tre volte con 3 ml di PHEM *buffer* e incubate con anticorpo primario monoclonale G3-61 alla diluizione 1:500 in BSA-PBS 1% per 1 h. Dopo i lavaggi con PHEM *buffer*, le cellule sono state incubate con un anticorpo anti-mouse coniugato con FITC alla diluizione 1:500 per 1 h. Le cellule marcate sono state lavate tre volte e concentrate in 0,1 ml di PBS. Esse sono state montate su un vetrino con 0,005 ml di DABCO *medium* e sono state esaminate con un microscopio confocale Olympus IX70.

### **3.15 Test di immobilizzazione**

Le cellule trasformate in fase esponenziale di crescita sono state trattate con una soluzione di CdCl<sub>2</sub> 11 μM per 16 h. Sono state poi trasferite in una piastra a 96 pozzetti alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/ml cui è stato aggiunto l'anticorpo monoclonale G3-61 alla diluizione 1:100. Le cellule sono state osservate con uno stereoscopio Olympus SZ-PT e le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale Panasonic GP-KS162HD.

### **3.16 Filogenesi molecolare**

#### **3.16.1 Allineamenti multipli**

Gli allineamenti multipli utilizzati per inferire le relazioni filogenetiche sono stati effettuati impiegando il programma Clustal W [77]. Questi allineamenti sono stati poi controllati ed eventualmente modificati manualmente.

#### **3.16.2 Alberi filogenetici**

Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando il programma Mega 3.1 [78]. Per ottenere il maggior numero di informazioni, sono stati utilizzati quattro diversi metodi per la costruzione degli alberi: UPGMA [79], Neighbor-Joining

[80], Minimum Evolution [81] e Maximum Parsimony [82]. Questi differiscono tra loro per algoritmi e parametri considerati.



#### **4. LE METALLOTIONEINE IN *TETRAHYMENA***

Oggetto del presente capitolo è la caratterizzazione di due nuove isoforme inducibili di MT in *Tetrahymena thermophila* e in *Tetrahymena pyriformis*, chiamate rispettivamente MTT-5 e MT-2. Le sequenze dei cDNA sono state determinate utilizzando tecniche di RT-PCR e RACE. Il cDNA di MTT-5 codifica per una proteina di 99 aminoacidi di cui il 24% sono cisteine. Dall'allineamento di tutte le sequenze amminoacidiche di *Tetrahymena* si evidenzia un'elevata similarità con le isoforme indotte da Cd e una scarsa somiglianza con quelle indotte da Cu. MTT-5 presenta il maggior grado di identità con Cd-MT-1 di *T. pyriformis* e di *T. pigmentosa* (47%) e con MTT-1 di *T. thermophila* (37%). Il cDNA di MT-2 codifica per una proteina di 96 aminoacidi identica alla MT-2 di *T. pigmentosa*. Essa presenta una scarsa similarità rispetto alle isoforme indotte dal Cd, mentre un'elevata somiglianza con quelle indotte da Cu.

##### **4.1 Molteplicità delle MT in *Tetrahymena***

Da *Tetrahymena* erano state finora complessivamente sequenziate otto MT, quattro delle quali solo da *T. thermophila*. Quelle appartenenti al gruppo MT-1 sono indotte principalmente da Cd. Le prime MT purificate erano state MT-1 di *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* [15]; le loro sequenze amminoacidiche sono uguali ed inusualmente lunghe, se confrontate con le MT di altri organismi, e contengono una ripetizione strutturale interna derivata probabilmente da una duplicazione genica. Tali sequenze sono state in seguito confermate dalla risoluzione della struttura dei relativi cDNA. Anche l'organizzazione di geni che le codificano differiscono da quelle degli altri geni di MT strutturalmente caratterizzati, indicando una bassa correlazione filogenetica con le MT note [83].

Al gruppo MT-2, indotto principalmente da Cu, appartiene la MT-2 identificata in *T. pigmentosa*, la quale è stata caratterizzata in seguito a clonaggio molecolare [84, 85].

Queste proteine sono state studiate anche dal punto di vista dell'induzione, attraverso analisi di espressione in risposta a Cd e/o Cu [70, 84, 86]. In *T.*

*pyriformis* è stata recentemente identificata anche una seconda isoforma TpMT-2 [87], la quale sembra essere indotta da entrambi i metalli.

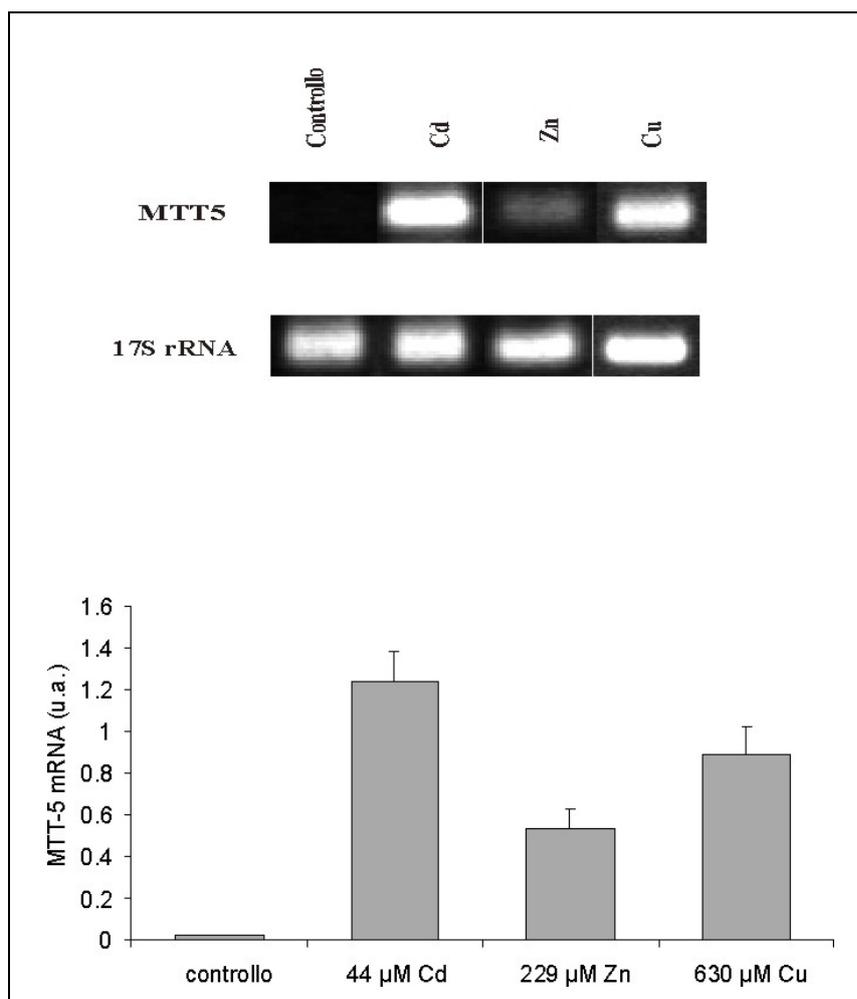
Delle isoforme di MT finora descritte in *T. thermophila*, alcune sono indotte prevalentemente da Cd -MTT-1- [75, 88] e -MTT-3- [89], e altre da Cu, -MTT-2- [85, 90] e -MTT-4- (GenBank AY660008). Anche queste MT presentano una sequenza inusualmente lunga e contengono ripetizioni strutturali interne.

## **4.2 Caratterizzazione del cDNA di MTT-5 in *Tetrahymena thermophila***

Considerata la disponibilità della sequenza dell'intero genoma macronucleare di *T. thermophila*, recentemente pubblicata nel database del *Tetrahymena Genome Project*, sono state preliminarmente ricercate, eventuali nuove sequenze MT-simili rispetto a quelle già individuate.

Nel genoma di *T. thermophila* (sequenza n. 1173228) è stata identificata mediante BLAST una porzione potenzialmente codificante per una proteina simile a MTT-1, denominata MTT-5. Per escludere che questa sequenza nucleotidica fosse relativa ad uno pseudogene, ne è stato testato l'accumulo del relativo messaggero per mezzo di indagini di espressione in cellule esposte a metalli, noti come i maggiori induttori delle MT (Cd, Cu e Zn). A questo scopo colture di *T. thermophila* CU528.1 sono state esposte al trattamento con Cd (44  $\mu$ M), Cu (630  $\mu$ M) e Zn (229  $\mu$ M) per 1 h. L'espressione del messaggero è stata studiata usando il metodo della RT-PCR semiquantitativa (Fig. 4.1). I segnali di amplificazione di *MTT-5* sono stati normalizzati rispetto a quelli dell'RNA ribosomale 17S.

Dall'analisi preliminare effettuata mediante RT-PCR si è osservato un netto aumento del trascritto nelle cellule trattate con Cd, Cu e Zn, rispettivamente di 58, 41 e 24 volte rispetto alle cellule di controllo (Fig.4.1). Pertanto il cDNA ricavato a partire dall'RNA totale estratto da cellule di *T. thermophila* CU428.1 trattate con Cd è stato amplificato per il clonaggio e il sequenziamento.



**Figura 4.1** Accumulo di mRNA determinato mediante RT-PCR in cellule di *T. thermophila* esposte a Cd, Zn e Cu per 1 h. I valori espressi come unità arbitrarie (u.a.) sono normalizzati rispetto a quelli di 17S-rRNA.

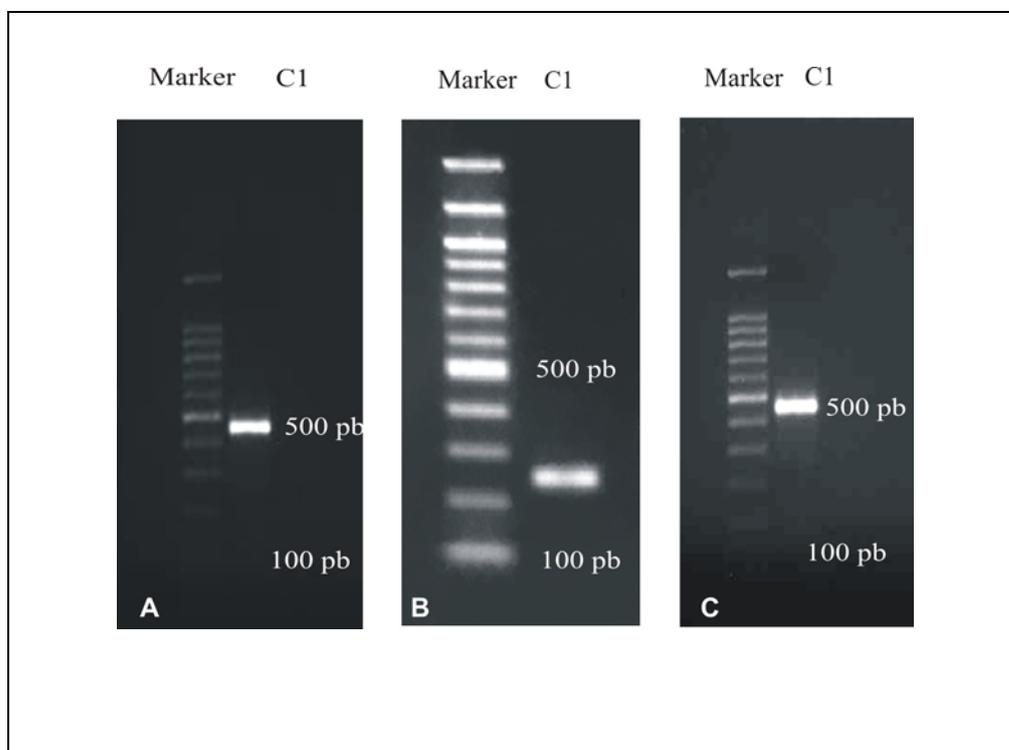
Dall'amplificazione è stato ottenuto un prodotto specifico di circa 250 bp (Fig. 4.2 B) che, clonato e sequenziato, ha permesso di ottenere la porzione del cDNA corrispondente ad una parte della regione codificante.

Si è, quindi, proceduto all'identificazione delle porzioni 5' e 3'-terminali del cDNA.

Per la caratterizzazione della 5'UTR (5' *untranslated region*), l'mRNA è stato retrotrascritto con il *primer* MTT5 5'RACE (Tabella 3.4 in Materiali e Metodi) specifico per l'isoforma di MT considerata. Lo stesso *primer* è stato utilizzato, in coppia con il *primer* AAP (Anchor Ambrided Primer) (Tabella 3.4), anche per la successiva amplificazione, a seguito della quale è stato ottenuto un prodotto di

circa 500 pb (Fig. 4.2 A) che, clonato e sequenziato, ha permesso di identificare la regione 5' terminale non tradotta.

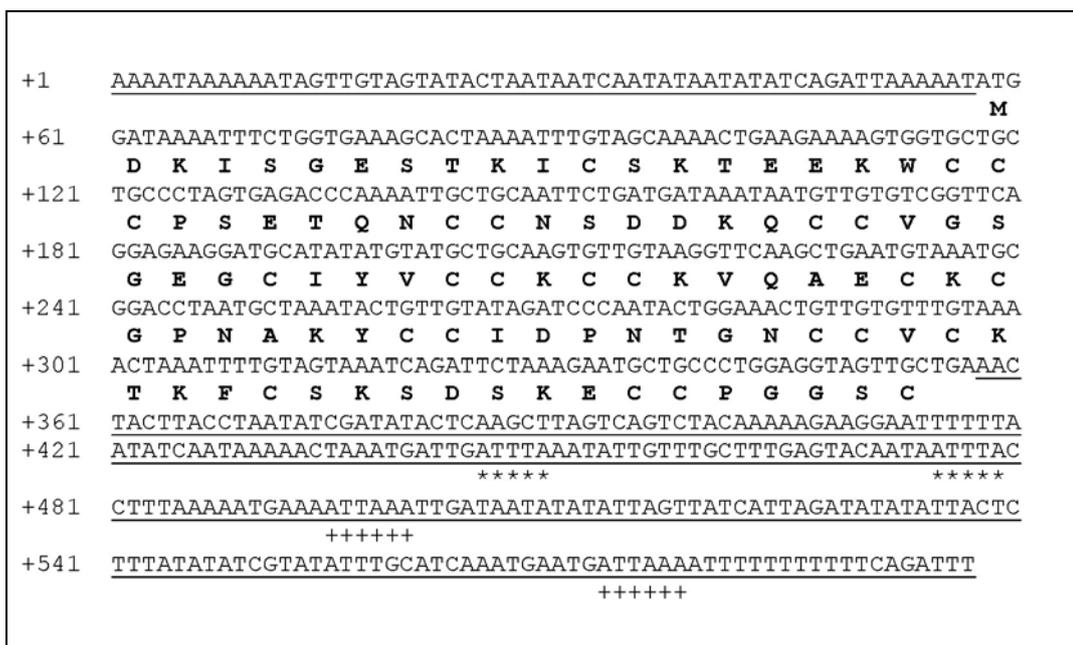
Per la caratterizzazione della 3' UTR è stata effettuata una 3' RACE, mediante l'amplificazione della porzione del cDNA compresa tra la coda di poli-A<sup>+</sup> del messaggero e la regione corrispondente ad una porzione della codificante. A tale scopo sono stati utilizzati il *primer* antisense oligodT-Anchor e il *primer* senso MTT5 3'RACE (Tabella 3.4). Dall'amplificazione è stato ottenuto un prodotto di circa 500 pb (Fig. 4.2 C) che, clonato e sequenziato, ha permesso di identificare la regione 3' terminale non tradotta.



**Figura 4.2** Elettroforesi del prodotto di PCR relativo all'amplificazione che ha permesso di identificare la regione 5'UTR (A), la regione codificante (B) e la regione 3'UTR (C) di MTT-5.

La sequenza del cDNA (GenBank accession n. AY884209) così ottenuta di questa nuova isoforma di MT è lunga 597 pb e contiene una regione codificante di 300 pb, una 5' UTR di 57 pb e una 3'UTR di 240 bp (Fig. 4.3).

La regione codificante contiene 100 codoni e termina con UGA, il solo codone di arresto della traduzione in *Tetrahymena* [91].



**Figura 4.3** Sequenza genica di *MTT-5* di *T. thermophila* e sequenza amminoacidica dedotta. Le regioni 5'UTR e 3'UTR sono sottolineate. I segnali putativi di degradazione e poliadenilazione del messaggero sono indicati rispettivamente dai simboli (\*\*\*) e (+++).

E' interessante notare che studi compiuti sul gene dell'istone H3 in *T. thermophila* hanno fornito le prime evidenze di deviazione dal codice genetico cosiddetto "universale" [9]. Tali deviazioni all'interno del *taxon* dei Ciliati non sembrano essere correlate con la classificazione tassonomica del gruppo [92]. Per esempio, nei ciliati ipotrichi *Stylonychia* e *Oxytricha* [93, 94] come del resto negli olotrichi *Tetrahymena* e *Paramecium* [9, 95, 96] il codone UAA (uno dei codoni di stop del codice "universale") codifica per la glutammina, ed essi utilizzano UGA come sola tripletta di stop. D'altro canto in *Euplotes*, un altro ipotricho, UAA viene utilizzato come segnale d'arresto e UGA sarebbe presente solamente in pochi geni nei quali codifica per la cisteina [97, 98]. La tripletta "universale" di stop UAG è presente raramente nei Ciliati e mai come segnale di arresto; codifica per la glutammina negli ipotrichi e non è mai stata riscontrata nei geni di *Euplotes*.

La sequenza della regione 5'UTR è ricca in A, una caratteristica riscontrata anche in altri geni di *Tetrahymena* o dei ciliati in generale [91, 99]. Il significato di un così alto contenuto in adenine non è chiaro, ma sembra che questa caratteristica si possa riflettere nell'assenza di strutture secondarie [100], che sembrano invece impedire la traduzione nei lieviti [101].

Nella 3'UTR sono presenti due putativi segnali di degradazione rapida del messaggero ATTTA (nt 445-449 e nt 475-479), identificati in vari mRNA eucariotici [102] e riscontrati anche in *MT-1* di *T. pyriformis* [83], *MT-1* e *MT-2* di *T. pigmentosa* [85] e in *MTT-2* di *T. thermophila* [90]. Inoltre questa regione contiene anche due putativi segnali di poliadenilazione ATTAAA (nt 485-490 e nt 573-578) già documentati in altri geni di *Tetrahymena* quali *MT-1* e *MT-2* di *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* [83, 85], *MTT-2* di *T. thermophila* [90], ubiquitina [103],  $\alpha$ -tubulina [104],  $\gamma$ -tubulina [75], tetrine [105], e *TWII* (omologo alla proteina Piwi di *Drosophila*) [106]. Tale segnale differisce per un singolo residuo da quello canonico (AATAAA).

La regione codificante di *MTT-5* codifica per una proteina di 99 residui amminoacidici, con un peso molecolare calcolato di 10.597 Da. La sequenza amminoacidica dedotta contiene 24 cisteine (24% degli amminoacidici totali) che sono distribuite secondo i motivi caratteristici delle MT. Inoltre, oltre ai motivi Cys-Cys e Cys-X-Cys tipici delle MT dei vertebrati, in *MTT-5* c'è il motivo Cys-Cys-Cys tipico delle Cd-MT di *Tetrahymena* [15, 75].

*MTT-5*, come del resto le altre MT identificate sino ad oggi in *Tetrahymena*, è una proteina costituita da una catena polipeptidica più lunga rispetto a quelle isolate negli altri organismi. Tra i vertebrati, la più lunga risulta l'isoforma *MT-3* (63 aa) dei mammiferi [107], mentre negli invertebrati sono *MT-1* e *MT-2* identificate in *Lumbricus rubellus* ed aventi rispettivamente 79 aa e 77 aa [37]. Tra gli organismi eucarioti unicellulari, *CRS5* presente in *Saccharomyces cerevisiae* è composta da 69 aa [20].

Allineamenti del cDNA di *MTT-5* con l'intera sequenza genica confermano che, come le altre MT identificate nel genere *Tetrahymena* [75, 83, 84, 85], anche la regione codificante di *MTT-5* è priva d'introni. Come ipotizzato per alcuni geni privi di introni, quali le MT identificate nei mitili [108], questa particolarità potrebbe indicare un adattamento genetico tale da poter permettere una rapida trascrizione genica in risposta ad un rapido aumento del livello di metallo nella cellula. E' però interessante sottolineare che Diaz e collaboratori [89] in uno studio parallelo a quello da me effettuato, mediante allineamento dell'intero cDNA di *MTT-5* con la relativa sequenza genica hanno individuato l'esistenza di un introne di 63 bp, al di fuori della sequenza codificante la proteina, a 30 bp a

valle del codone di stop. Secondo gli autori, l'introne localizzato nella 3'UTR di MTT-5 potrebbe giocare un ruolo nel regolare l'espressione genica. In particolare l'esistenza di MTT-5 mRNA con o senza introne rappresenterebbe il primo caso di *splicing* alternativo riportato in *T. thermophila*. Solamente un altro caso di *splicing* alternativo è stato riportato nei Ciliati, in *Euplotes raikovi*. In questo organismo l'evento di *splicing* potrebbe determinare o l'ancoraggio alla superficie cellulare di un feromone responsabile del *mating* che in tal caso funzionerebbe da recettore, oppure il rilascio della proteina solubile nel mezzo di coltura funzionando in tal caso come chemioattraente [109, 110]. Inoltre, la rimozione dell'introne in MTT-5 porta all'eliminazione di due putativi segnali di degradazione rapida del messaggero, lasciandone però altri due intatti [89]. Gli autori ipotizzano anche che la rimozione dell'introne possa determinare la formazione di una particolare struttura secondaria nella 3'UTR che potrebbe influenzare la localizzazione cellulare del trascritto [89].

Dall'allineamento di MTT-5 con tutte le sequenze amminoacidiche di *Tetrahymena* si evidenzia una chiara similarità con le isoforme indotte da Cd e una scarsa omologia con quelle indotte da Cu. MTT-5 presenta il maggior grado di identità con Cd-MT-1 di *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* (47%) e con MTT-1 di *T. thermophila* (37%) (Tabella 4.1).

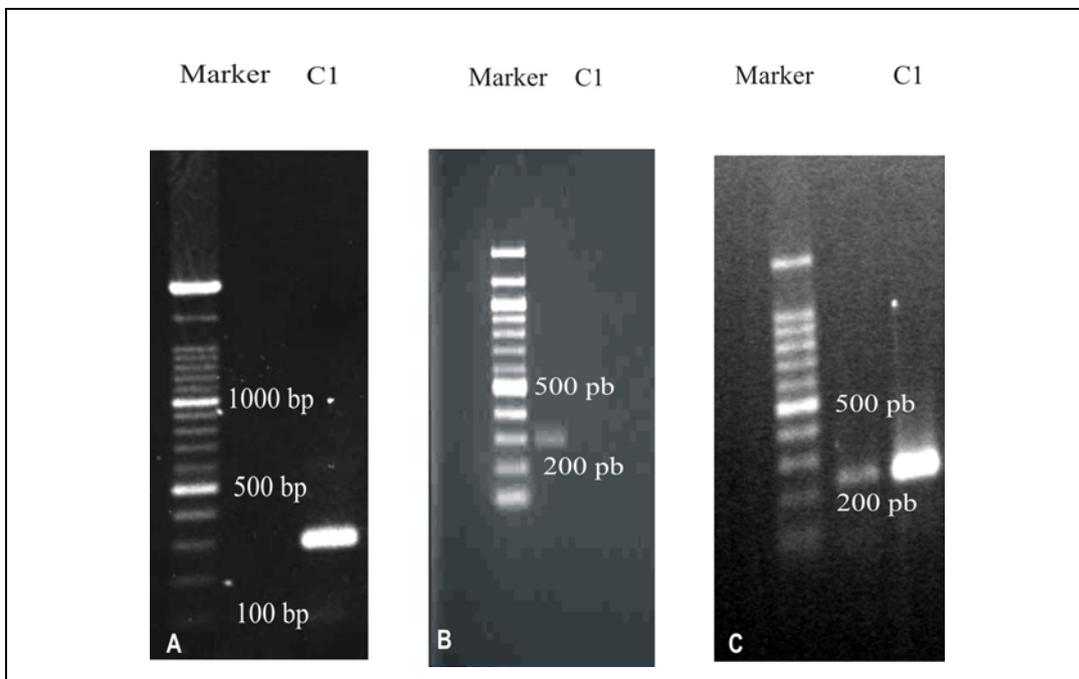
Specie	Isoforma	Identità (%)	Similarità (%)	Global score
<i>T. pyriformis</i>	MT-1	46,7	65,4	366
<i>T. pigmentosa</i>	MT-1	46,7	65,4	366
<i>T. thermophila</i>	MTT-1	37,0	47,5	224
<i>T. thermophila</i>	MTT-3	32,1	44,4	122
<i>T. thermophila</i>	MTT-2	28,2	46,3	103
<i>T. thermophila</i>	MTT-4	28,2	46,3	103
<i>T. pigmentosa</i>	MT-2	24,3	42,4	64
<i>T. pyriformis</i>	MT-2	24,3	42,4	64
<i>T. pyriformis</i>	TpMT-2	29,3	39,2	34

**Tabella 4.1** Confronto tra la sequenza amminoacidica di MTT-5 di *T. thermophila* con quella delle altre MT indicate mediante il programma bioinformatico L-ALIGN.

### 4.3 Caratterizzazione del cDNA di MT-2 in *Tetrahymena pyriformis*

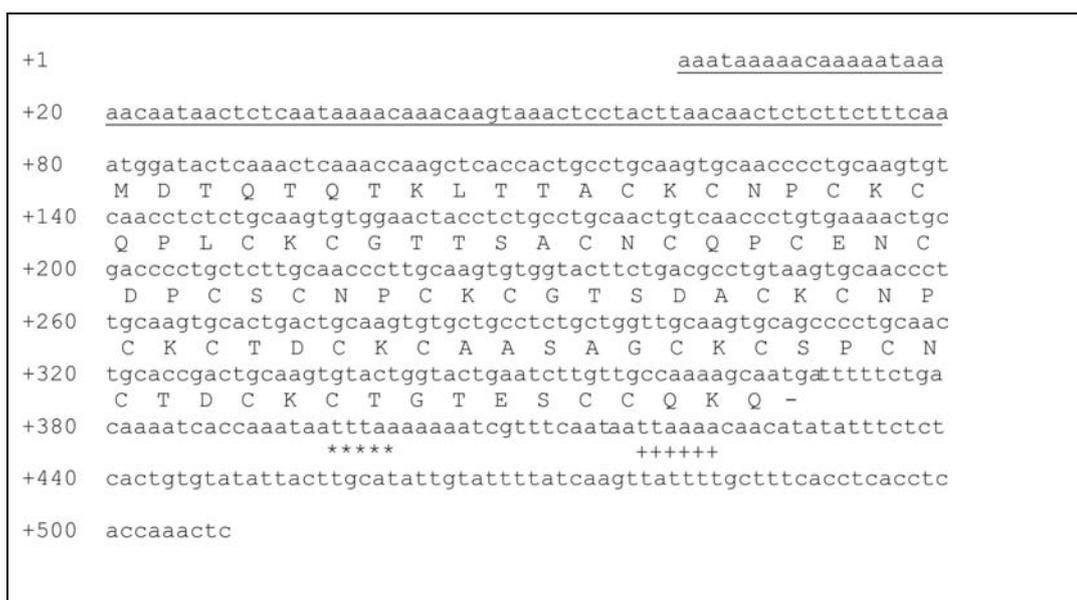
La strategia utilizzata per la caratterizzazione del cDNA di MT-2 in *T. pyriformis* ha previsto innanzitutto l'amplificazione della regione codificante di MT-2 utilizzando due *primers* specifici costruiti dall'*open reading frame* dell'isoforma ortologa di *T. pigmentosa*, MT-2Fw e MT-2Re (Tabella 3.4). Il prodotto della PCR è una banda di circa 300 pb (Fig. 4.4 B) corrispondente all'intera regione codificante. Al fine di identificare la porzione 5'-terminale, è stata effettuata una 5'RACE utilizzando i *primers* GSP1-MT2Fw e MT-2 Re. Il prodotto di amplificazione ha fornito un prodotto di circa 300 pb (Fig. 4.4 A) che clonato e sequenziato ha permesso di ottenere la sequenza relativa alla regione 5' terminale.

A questo punto si è proceduto alla determinazione della regione posta in posizione 3'-terminale, mediante una 3' RACE utilizzando i *primers* MT-2 FW e OligoT-Anchor (Tabella 3.4).



**Figura 4.4** Elettroforesi del prodotto di PCR relativo all'amplificazione che ha permesso di identificare la regione 5'UTR (A), la regione codificante (B) e la regione 3'UTR (C) di MT-2 di *T. pyriformis*.

Il cDNA della MT-2 risulta di 508 bp e comprende una regione codificante di 291 bp, una 5'UTR di 79 bp ed una 3'UTR di 138 bp (Fig.4.5). La regione codificante di *T. pyriformis* è identica a quella presente in *T. pigmentosa* eccetto che per i codoni 29, 31, 32, 79, 83, 84 dove la terza base citosina è sostituita dalla timina, e per il codone 30 dove la timina è sostituita dalla adenina. Tuttavia le proteine codificate sono identiche, con un peso molecolare calcolato di 10094,28 Da; esse contengono 28 residui di cisteina, organizzati nei motivi classici delle MT: 24 residui cisteinici secondo il *pattern* Cys-X-Cys, e 4 secondo Cys-X-Y-Cys e Cys-Cys. Sorprendentemente anche le regioni non tradotte hanno un elevato grado di identità nelle due specie; nella 3'UTR è presente il putativo segnale di poliadenilazione ATTAAG e quello di degradazione rapida del messaggero ATTTA.



**Figura 4.5** Sequenza genica di *MT-2* di *T. pyriformis* e sequenza amminoacidica dedotta. Le regioni 5'UTR e 3'UTR sono sottolineate. I segnali putativi di degradazione e poliadenilazione del messaggero sono indicati rispettivamente dai simboli (\*\*\*) e (+++).

L'isoforma MT-2 presenta una scarsa somiglianza rispetto alle isoforme indotte dal Cd, mentre un'elevata similarità con quelle indotte da Cu (Tabella 4.2). Inoltre, anche la posizione dei residui cisteinici è solo parzialmente conservata, ed in MT-2 mancano i motivi Cys-Cys-Cys tipici delle MT indotte da Cd [111].

Specie	Isoforma	Identità (%)	Similarità (%)	Global score
<i>T. pigmentosa</i>	MT-2	100	100	805
<i>T. thermophila</i>	MTT-2	24,7	55,5	185
<i>T. thermophila</i>	MTT-4	24,7	55,5	185
<i>T. pyriformis</i>	TpMT-2	19,9	32,6	209
<i>T. pyriformis</i>	MT-1	23	30,6	173
<i>T. pigmentosa</i>	MT-1	23	30,6	173
<i>T. thermophila</i>	MTT-1	19,4	31	170
<i>T. thermophila</i>	MTT-3	17,6	29,6	157
<i>T. thermophila</i>	MTT-5	14,2	29	96

**Tabella 4.2** Confronto tra la sequenza amminoacidica di MT-2 di *T. pyriformis* con quella delle altre MT indicate mediante il programma bioinformatico L-ALIGN. L'identità indica il valore in percentuale dei residui identici.

## **5. LE METALLOTIONEINE E *TETRAHYMENA* IN UNA PROSPETTIVA ECOTOSSICOLOGICA**

In questo capitolo particolare attenzione viene data all'espressione genica di due isoforme di MT, *MTT-2* e *MTT-5*, in *T. thermophila* in relazione ad un accumulo di metallo. I risultati mostrano che i *patterns* d'espressione differiscono in risposta al metallo induttore, suggerendo che *MTT-2* potrebbe essere coinvolta nella detossificazione del Cu, rappresentando un rapido e robusto sistema di difesa cellulare contro i livelli tossici di Cu, mentre *MTT-5* potrebbe intervenire nel regolare l'omeostasi del Cu e nel proteggere la cellula contro l'accumulo di Cd. Questi risultati contribuiscono sostanzialmente a dimostrare che *Tetrahymena* potrebbe essere un buon modello per lo studio dei meccanismi coinvolti nella tolleranza ai metalli pesanti, e un ottimo organismo per la determinazione del rischio ecotossicologico.

### **5.1 Le MT come *biomarker* di esposizione a metalli**

Il monitoraggio della presenza e degli effetti sugli organismi dell'inquinamento da metalli nell'ambiente acquatico ha acquisito notevole interesse. A questo riguardo sono stati proposti ed estensivamente studiati una gran varietà di *biomarkers* e le loro relative applicazioni [112].

Gli organismi acquatici sono molto sensibili all'esposizione e alla tossicità degli inquinanti: i pesci, ad esempio, sono stati largamente utilizzati nella valutazione della qualità del sistema acquatico come indicatori degli inquinanti ambientali [113].

In molte specie acquatiche (anellidi, molluschi, crostacei e pesci) è stato dimostrato che i metalli presenti nell'ambiente sono responsabili dell'induzione della sintesi di MT, suggerendone l'uso potenziale come *biomarkers* di esposizione a metalli [114, 115].

L'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare ha aperto un nuovo campo nelle ricerche di ecotossicologia. Tali ricerche si basano su modificazioni dell'espressione di particolari geni scelti come *biomarkers* [116]. Le

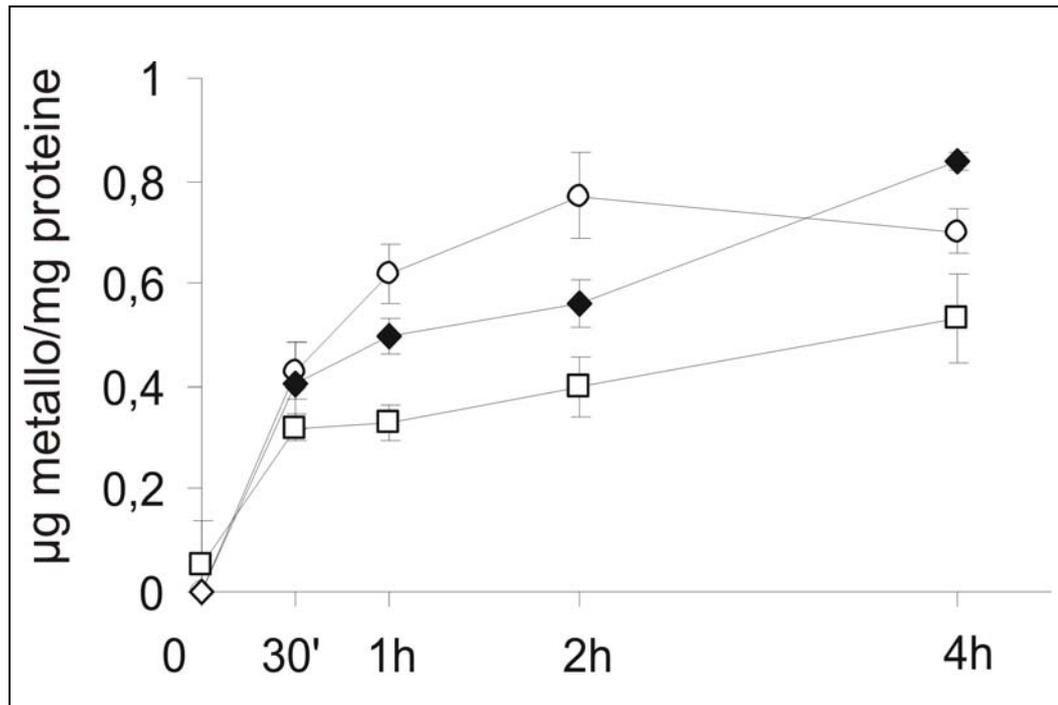
modificazioni dell'espressione genica, infatti, sono considerate la più precoce risposta degli organismi alle variazioni ambientali [117]. Quindi, l'espressione genica delle MT è attualmente considerato un sensibile ed efficiente *biomarker* per valutare gli effetti biologici cumulativi dell'esposizione a metalli [118].

La ricerca sui meccanismi cellulari coinvolti nell'adattamento e nella tolleranza ai metalli pesanti, ha posto particolare attenzione all'induzione di MT anche nei protozoi. In particolare da due flagellati, *Euglena* e *Ochromonas*, sono state isolate proteine chelanti, fisiologicamente analoghe (per quanto diverse strutturalmente) alle classiche MT che sono in grado di conferire una migliore tolleranza dell'organismo sia a metalli non essenziali sia ad un eccesso di quelli essenziali [119]. Il lavoro di ricerca ha interessato anche e soprattutto i protozoi ciliati. In *Stylonychia* e *Oxytricha* sono state identificate molecole chelanti differenti dalle MT [119], mentre in *Tetrahymena* sono state identificate e caratterizzate diverse isoforme di MT [15, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 111, 120]. Questi risultati hanno contribuito sostanzialmente a dimostrare che anche i protozoi sono un buon modello per lo studio dei meccanismi coinvolti nella tolleranza ai metalli pesanti e hanno stimolato in particolare l'uso di *Tetrahymena* come organismo modello per la determinazione del rischio ecotossicologico.

Tra le diverse isoforme di MT finora identificate in *T. thermophila*, ho voluto studiare l'espressione genica di MTT-2 [121] e di MTT-5 [111] in risposta all'esposizione a metalli diversi. A questo scopo colture di *T. thermophila* CU428.1 in fase esponenziale di crescita sono state trattate con concentrazioni diverse di Cd, Cu e Zn per indurre la trascrizione dei geni delle MT. Da queste colture è stato isolato l'RNA totale e la successiva quantificazione dei messaggeri specifici per le diverse isoforme di MT è stata determinata mediante tecniche di *Northern blotting* e/o *RealTime-PCR*. Inoltre, allo scopo di mettere a punto un rapido e dinamico sistema bioindicatore sensibile all'esposizione a metalli, particolare attenzione è stata rivolta al promotore di *MTT-5*, un sistema altamente inducibile. La sequenza di tale promotore è stata clonata a monte di un gene *reporter* in un vettore di espressione, il quale è stato utilizzato per trasformare cellule di *T. thermophila*.

## 5.2 Accumulo di metallo

L'analisi dell'accumulo dei metalli è stata effettuata nell'estratto di cellule di *T. thermophila* CU428.1 di controllo e trattate con dosi non tossiche di Cd (44 $\mu$ M), Cu (630  $\mu$ M) e Zn (229  $\mu$ M) per tempi di esposizione diversi (Fig. 5.1).



**Figura 5.1** Cinetica dell'accumulo di metallo in *T. thermophila* CU428.1 esposte a 44  $\mu$ M Cd ( $\circ$ ), 630  $\mu$ M Cu ( $\blacklozenge$ ) and 229  $\mu$ M Zn ( $\square$ ). Le cellule sono state raccolte dopo 30 min, 1, 2, 4 h di trattamento.

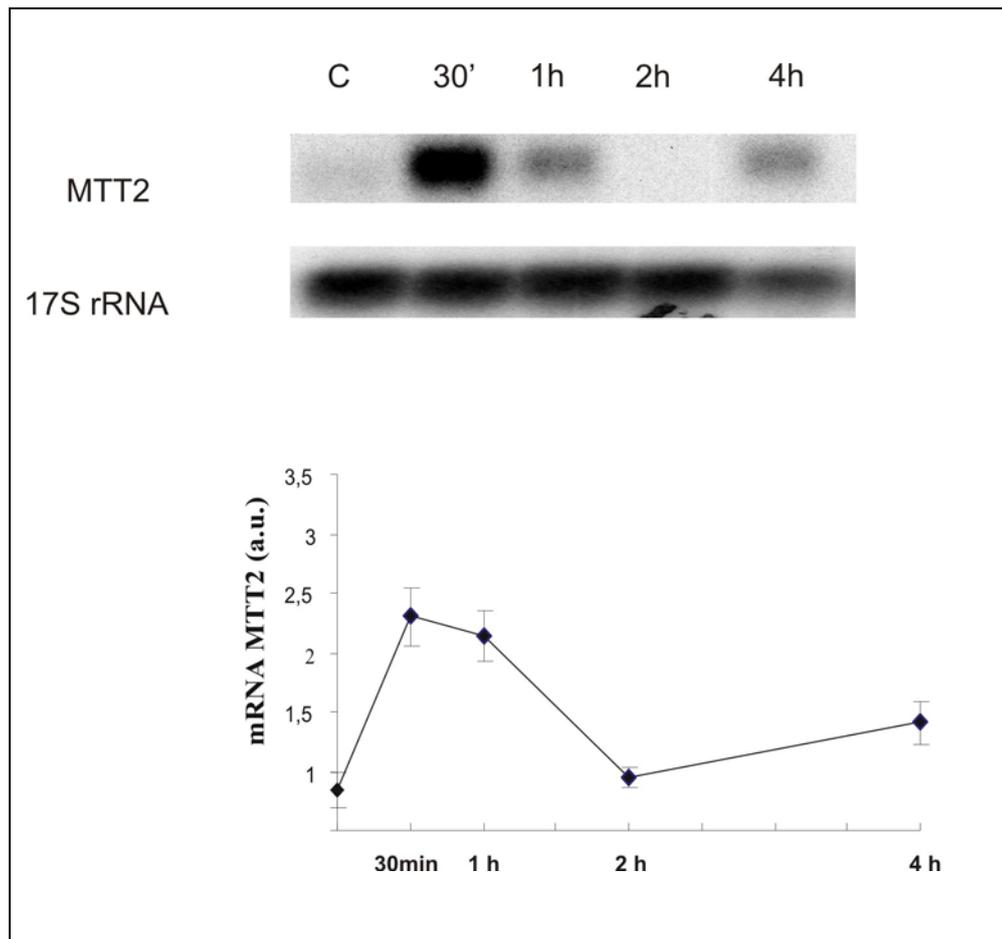
Come atteso, la quantità di Cu e Zn presente nei ciliati non sottoposti al trattamento è molto bassa, al di sotto dei limiti di sensibilità dello strumento utilizzato. Un'elevata velocità di accumulo è stata osservata in tutti i trattamenti durante i primi 30 min di esposizione al metallo. Come si osserva nella figura 5.1, la pendenza della curva è simile per l'accumulo di Cd e Cu ( $m=0,86$  e  $m=0,80$  rispettivamente), mentre è più bassa per lo Zn ( $m=0,54$ ). Nelle due ore successive, il tasso di accumulo diminuisce per tutti i metalli e la pendenza della curva è 0,06 per lo Zn, 0,12 per il Cu e 0,22 per il Cd. Questa velocità viene mantenuta fino alla fine dell'esperimento (4h) per il Cu e lo Zn, mentre l'accumulo di Cd raggiunge una fase di *plateau* circa dopo 2 h di trattamento.

### **5.3 Studio dell'espressione del gene *MTT-2* in risposta al cadmio**

Poiché l'espressione del gene *MTT-2* in risposta al Cu era già stata analizzata in ricerche precedenti [121], qui verranno presentati i risultati ottenuti in risposta all'esposizione al Cd. Inoltre in seguito al trattamento con Zn i livelli di trascritto di *MTT-2* sono risultati simili ai valori di controllo.

I valori ottenuti dai segnali d'ibridazione relativi alla sonda di *MTT-2* sono stati normalizzati riferendoli ai segnali d'ibridazione per il *17S* rRNA. Nelle cellule di controllo non esposte al trattamento, si è riscontrato un debolissimo segnale d'ibridazione, indice di un livello d'espressione basale del messaggero molto basso in assenza del Cd nel terreno di coltura. Il rapido aumento del Cd all'interno delle cellule ha determinato un'immediata attivazione della trascrizione del gene *MTT-2* (Fig. 5.2) in accordo con l'osservazione che questo metallo è uno dei più comuni e potenti induttori delle MT [17]. L'esposizione al metallo, già dopo 30 min, ha, infatti, prodotto una buona sintesi di messaggero (2,7 volte rispetto al controllo). Nei successivi 90 min si assiste ad una diminuzione progressiva del trascritto maturo. In seguito e fino alle 4 h i livelli di messaggero si sono stabilizzati a valori inferiori anche se comunque più alti rispetto ai valori di controllo.

La rapidità di risposta potrebbe essere in relazione con l'unicellularità dell'organismo. Infatti, un risultato simile è stato ottenuto precedentemente per altri organismi unicellulari, come ad esempio *Saccharomyces cerevesiae* [18, 122] e *Neurospora crassa* [39], mentre per gli organismi pluricellulari la risposta trascrizionale avviene in tempi più lunghi, come ad esempio per *Mytilus edulis* in cui avviene in un tempo di circa 10 h [123]. La successiva riduzione della sintesi del messaggero potrebbe essere messa in relazione con una possibile diminuzione di Cd libero a livello citoplasmatico, in quanto legato alle MT neosintetizzate [86].



**Figura 5.2** Analisi dell'espressione genica di *MTT-2* mediante *Northern blotting* in cellule di controllo e trattate con Cd per tempi diversi. Autoradiografia di una membrana ibridata con le sonde specifiche per l'mRNA di *MTT-2* e rRNA 17S. Il diagramma rappresenta il *time course* di *MTT-2*-mRNA. I valori indicati in unità arbitrarie (a.u.) corrispondono ai segnali di ibridazione di *MTT-2*, normalizzati rispetto a quelli dell'rRNA 17S.

Per testare l'inducibilità del promotore di *MTT-2* da parte del Cd è stato utilizzato anche un ceppo di *T. thermophila* mutato, *MTT2-Nrk2-GFP*, che presenta nel suo genoma due geni la cui trascrizione è sotto il controllo di questo promotore: il gene *MTT-2* nativo ed un gene che esprime una proteina chimerica data dalla fusione della chinasi *Nrk2* e dalla *green fluorescence protein*.

Lo scopo di questa analisi è stata quella di discriminare l'espressione del promotore del gene *MTT-2* da quella di un altro gene, *MTT-4*.

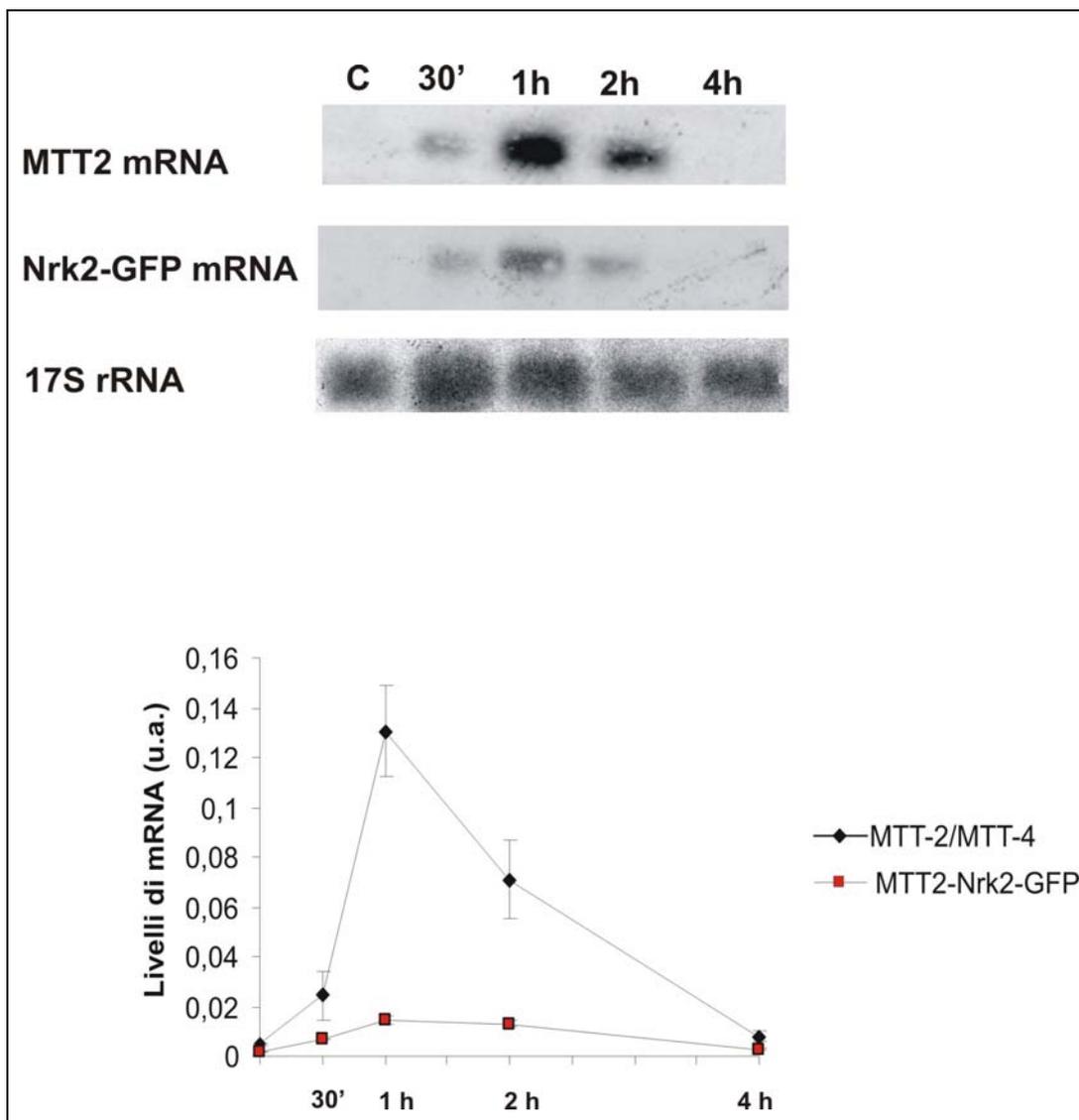
E' noto [121] infatti che a monte del gene *MTT-2* esiste il gene *MTT-4* che codifica per un messaggero molto simile (98,5%) a quello codificato da *MTT-2*. L'accumulo dell'uno risulta perciò indistinguibile da quello dell'altro con una

semplice analisi *Northern*, e così il dato derivabile dalla quantificazione dell'mRNA di MTT-2 potrebbe in realtà rendere conto della somma dei messaggeri di MTT-2 e MTT-4.

I livelli del trascritto della NrK2-GFP sono invece solo a carico del promotore di *MTT-2*.

In figura 5.3 sono mostrati i profili di espressione di questi due trascritti. Risulta evidente che nelle cellule non esposte al trattamento è presente solo un debole segnale, mentre, in presenza del metallo nel terreno di coltura, la trascrizione dell'mRNA di MTT-2/MTT-4 aumenta in un tempo relativamente breve. Infatti, si osserva un'attivazione del gene già dopo 30 min (circa 5 volte rispetto ai valori di controllo) con un picco massimo dei suoi livelli intorno ad un'ora (circa 27 volte rispetto ai controlli). Successivamente si osserva una graduale diminuzione dell'espressione del messaggero sino al termine del trattamento (4 h) dove il livello del trascritto è circa uguale a quello basale.

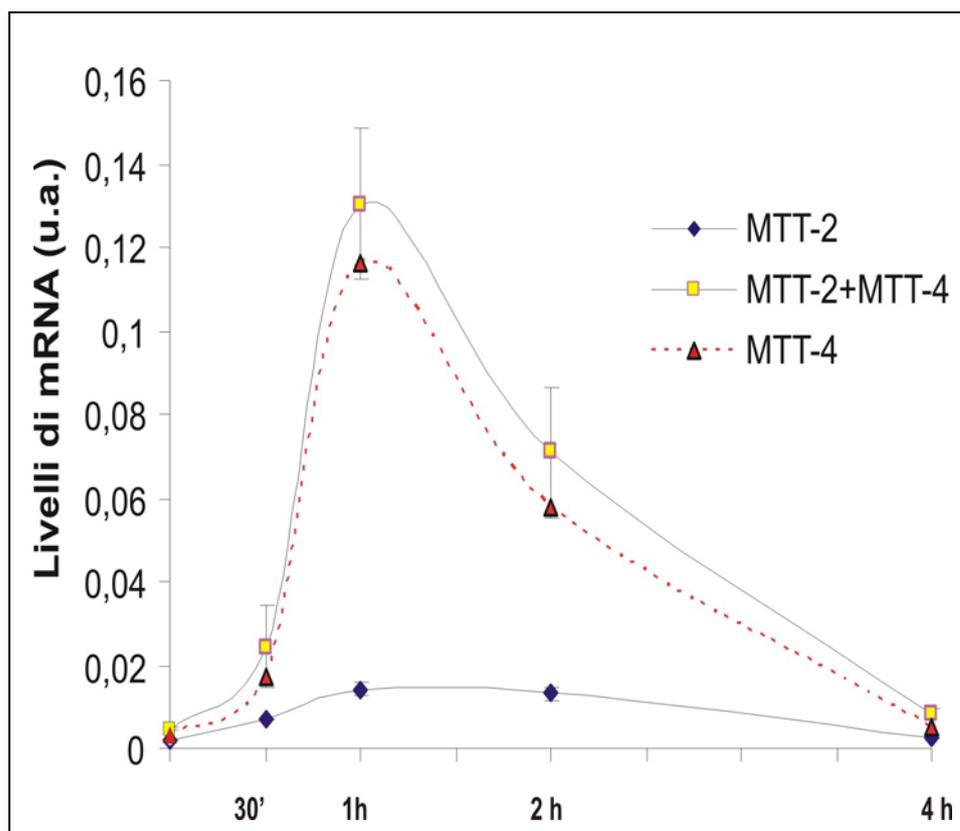
La trascrizione del gene chimerico è molto meno marcata. Comunque anche in questo caso i livelli massimi di trascritto si raggiungono dopo 1 h di trattamento con metallo e successivamente si assiste ad una diminuzione lenta e graduale sino al termine del trattamento (4 h).



**Figura 5.3** Analisi dell'espressione genica di *MTT-2* e *MTT-2-nrk2-GFP* mediante *Northern blotting* in cellule di controllo e trattate con Cd per tempi diversi. Autoradiografia di una membrana ibridata con le sonde specifiche per l'mRNA di *MTT-2*, l'*nrk2-GFP* e rRNA 17S. Il diagramma rappresenta il *time course* di *MTT-2-mRNA* e di *MTT-2-nrk2-mRNA*. I valori indicati in unità arbitrarie (u.a.) corrispondono ai segnali d'ibridazione di *MTT-2*, normalizzati rispetto a quelli dell'rRNA 17S.

Confrontando le due espressioni si osserva che pur essendo le due cinetiche sovrapponibili, i livelli di mRNA di *MTT-2/MTT-4* sono nettamente superiori rispetto a quelli di *Nrk2-GFP*.

A questo punto operando una semplice elaborazione matematica è possibile descrivere lo scenario rappresentato in figura 5.4.



**Figura 5.4** Ipotetico andamento temporale dell'espressione genica di *MTT-2* e *MTT-4* sulla base dei risultati riportati in fig 5.3..

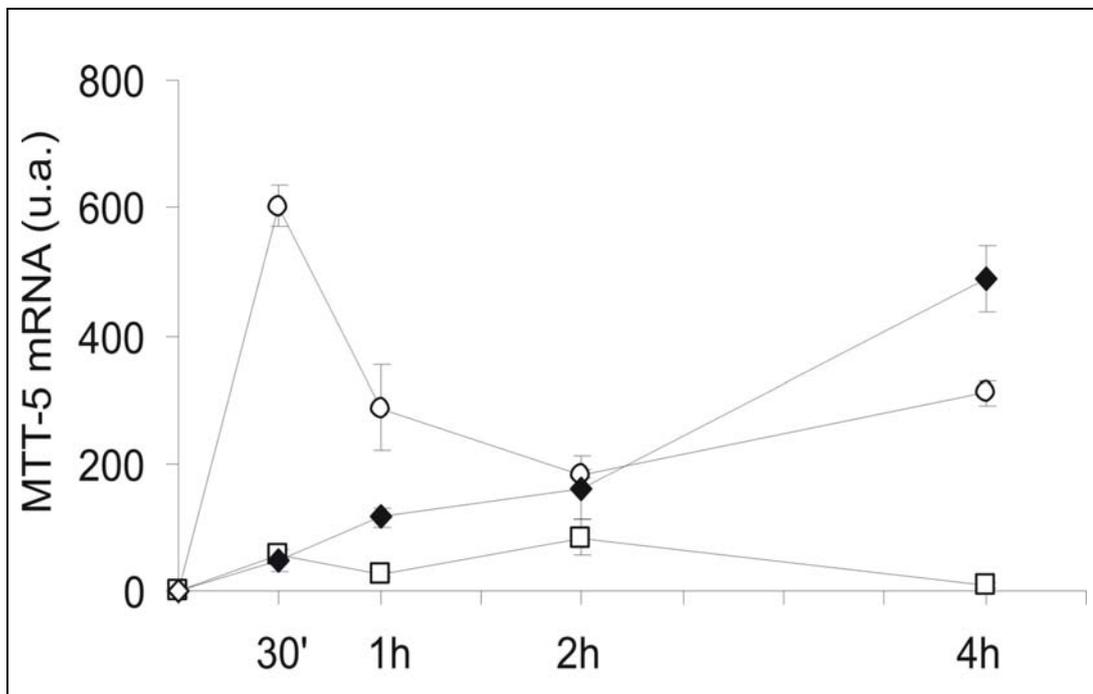
Il gene *MTT-4* sarebbe caratterizzato da un'attivazione precoce e rapida che porta ad avere un picco massimo dopo un'ora d'esposizione, mentre il gene *MTT-2* sembra essere attivato molto meno dal Cd, pur avendo anch'esso un picco massimo d'espressione intorno ad un'ora. È presumibile, quindi, che il gene *MTT-4* sia maggiormente attivato dal Cd rispetto al gene *MTT-2*, il quale è invece fortemente attivato dal Cu [121]. Ovviamente tale scenario è puramente teorico e le ipotesi fatte potrebbero essere confermate solo con uno studio specifico del *pattern* d'espressione di *MTT-4*. Questo non è facilmente realizzabile con una semplice analisi del trascritto in quanto, come già detto, i cDNA per *MTT-2* e *MTT-4* presentano un'elevata identità.

In conclusione, le analisi effettuate dimostrano come il gene *MTT-2* sia indotto anche dal Cd, anche se tale induzione è molto inferiore rispetto a quella stimolata dal Cu.

Questo ha un'importanza rilevante in quanto fornisce nuovi dati sui *patterns* di omeostasi e detossificazione dei metalli che coinvolgono la MT di *T. thermophila*.

#### 5.4 Studio dell'espressione del gene *MTT-5* in risposta a Cd, Cu e Zn

La cinetica di accumulo dei livelli di trascritto di *MTT-5* in risposta a Cd, Cu e Zn è stata studiata mediante *real time* PCR quantitativa e i risultati ottenuti sono riportati in figura 5.5.



**Figura 5.5** Time course dell'accumulo di *MTT-5* mRNA determinato mediante *real-time*-PCR in cellule di *T. thermophila* CU428.1 esposte a Cd (○), Cu (◆) e Zn (□). I valori, espressi come unità arbitrarie (u.a.) sono normalizzati rispetto a quelli dell'rRNA 17S. Le cellule sono raccolte a 30 min, 1, 2 e 4 h.

Sorprendentemente, lo Zn che è uno dei più comuni e potenti induttori della trascrizione delle MT nei mammiferi [14], determina solo una debole trascrizione del gene *MTT-5* per tutti i tempi considerati.

L'esposizione a Cd determina una rapida attivazione del gene *MTT-5* già dopo 30 min, quando i livelli del messaggero raggiungono il picco massimo (600 volte

rispetto ai valori di controllo). Nei successivi 30 min si assiste ad una *down regulation* transitoria che continua fino alle 2 h. Dopo tale periodo i valori di messaggero tendono a crescere nuovamente, anche se in maniera poco evidente.

L'efficienza con la quale viene trascritto il messaggero è in accordo con l'osservazione che il Cd rappresenta il più comune e potente induttore delle MT in *Tetrahymena* [70, 83, 86].

Il *pattern* di espressione osservato per MTT-5 in risposta al Cd, cioè un'attivazione iniziale massima molto rapida, seguita da una riduzione dei livelli di messaggero, a cui corrisponde una concomitante stabilizzazione della concentrazione intracellulare di Cd, è stata evidenziata anche per altre isoforme di MT nelle specie del genere *Tetrahymena* [70, 83, 86].

In particolare, come visto precedentemente per l'isoforma MTT-2, la presenza di una *down regulation* che segue il picco di espressione è correlabile con una possibile diminuzione del metallo libero. Infatti, quantità molto basse di Cd intracellulare sono sufficienti ad indurre una forte risposta trascrizionale risultante in livelli molto elevati di messaggero. E' quindi ipotizzabile che un presunto aumento della sintesi di MT, secondo un meccanismo di *feedback* negativo, vada a chelare il metallo in eccesso, che in tal modo non sarebbe più disponibile per indurre la trascrizione genica [86].

Lo studio della cinetica dell'accumulo dell'mRNA di *MTT-5* in risposta al Cu evidenzia, invece, un andamento lineare tra livelli di mRNA e tempo d'esposizione (Fig.5.5). Il livello di espressione basale è piuttosto basso, mentre in presenza del metallo la trascrizione del gene *MTT-5* si realizza in un tempo relativamente breve; tuttavia i livelli più elevati di trascritto si osservano dopo 4 h di esposizione (circa 500 volte più elevati rispetto ai valori di controllo). Tale cinetica di accumulo di trascritto in risposta al Cu è completamente diversa da quella osservata per MTT-2 [121]. Infatti, MTT-2 mostra una rapida attivazione della trascrizione nei primi 30 minuti seguita da una *down-regulation* che segue il picco di espressione nei successivi 30 min. Quindi, il fatto che i livelli di messaggero dell'*MTT-5* continuino ad aumentare fino alle 4 h, pur essendoci un rallentamento dell'accumulo del metallo fra le 2 e 4 ore, potrebbe essere interpretato in termini di omeostasi del Cu.

Da questi risultati appare evidente che i *patterns* d'espressione differiscono in risposta al metallo induttore. Questo suggerisce che MTT-2 potrebbe essere coinvolta nella detossificazione del Cu, rappresentando un rapido e robusto sistema di difesa cellulare contro i livelli tossici di questo metallo, mentre MTT-5 potrebbe avere una duplice funzione, e cioè potrebbe intervenire nel regolare l'omeostasi del Cu e nel proteggere la cellula contro l'accumulo di Cd.

## **5.5 Il promotore di *MTT5* in un sistema Cd-inducibile**

Allo scopo di mettere a punto un rapido e dinamico sistema bioindicatore sensibile all'esposizione a metalli, particolare attenzione è stata rivolta al promotore di *MTT-5*.

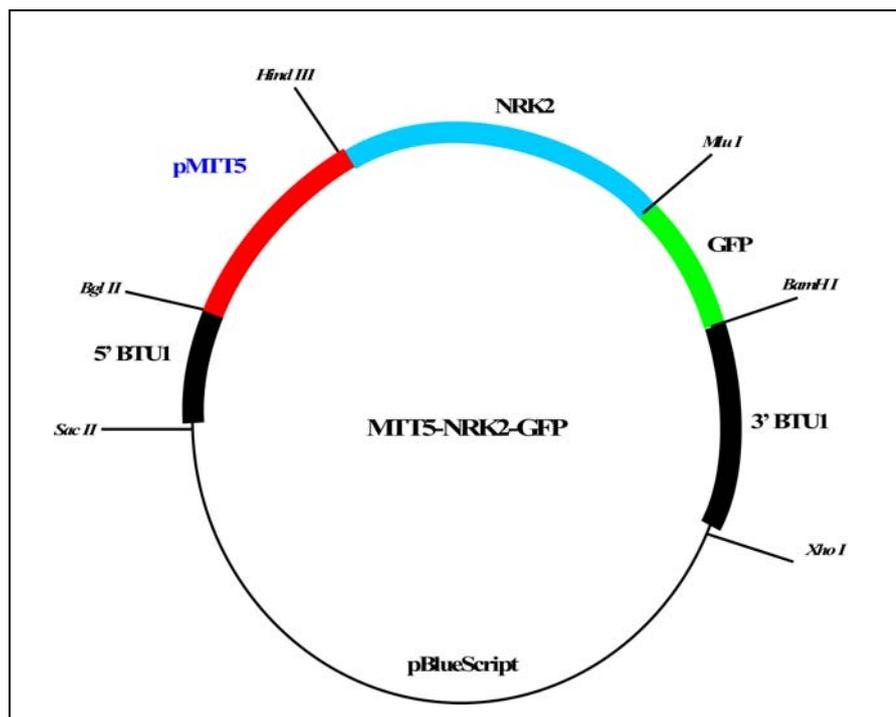
In particolare, da colture di *T. thermophila* in fase esponenziale di crescita è stato estratto il DNA genomico per essere utilizzato come *template* per l'amplificazione del promotore del gene *MTT-5*.

Una porzione di 1777 bp del promotore di *MTT5* è stata amplificata mediante i *primers* pMTT5(1777) Fw e pMTT5 Re (Tabella 3.4) che introducono i siti di restrizione per gli enzimi BamH1 e HindIII rispettivamente. La regione così amplificata è stata clonata all'interno di un vettore di espressione costruito in modo tale da consentirne l'integrazione all'interno del genoma di *T. thermophila*, nel *locus* per la  $\beta$ -tubulina1 (BTU1).

Per testare la funzionalità del promotore clonato è stato utilizzato un gene *reporter*, costituito dal gene chimerico *Nrk2-GFP*, posto sotto il controllo trascrizionale del promotore di *MTT5*. *Nrk2* è un gene della famiglia delle *NIMA-related kinases* (**Never In Mitosis gene A**), un gruppo di chinasi scoperte nel fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*, che giocano un ruolo chiave come regolatori del ciclo cellulare, in particolare nella transizione dalla fase G<sub>2</sub> a quella M [124]. Nella costruzione del gene chimerico (*Nrk2-GFP*), è stato eliminato il codone di stop dalla regione codificante, che è stata quindi unita all'ORF della *GFP* (**Green Fluorescens Protein**), in modo che fosse tradotta una proteina chimerica, fluorescente sotto l'eccitazione dei raggi ultravioletti (UV).

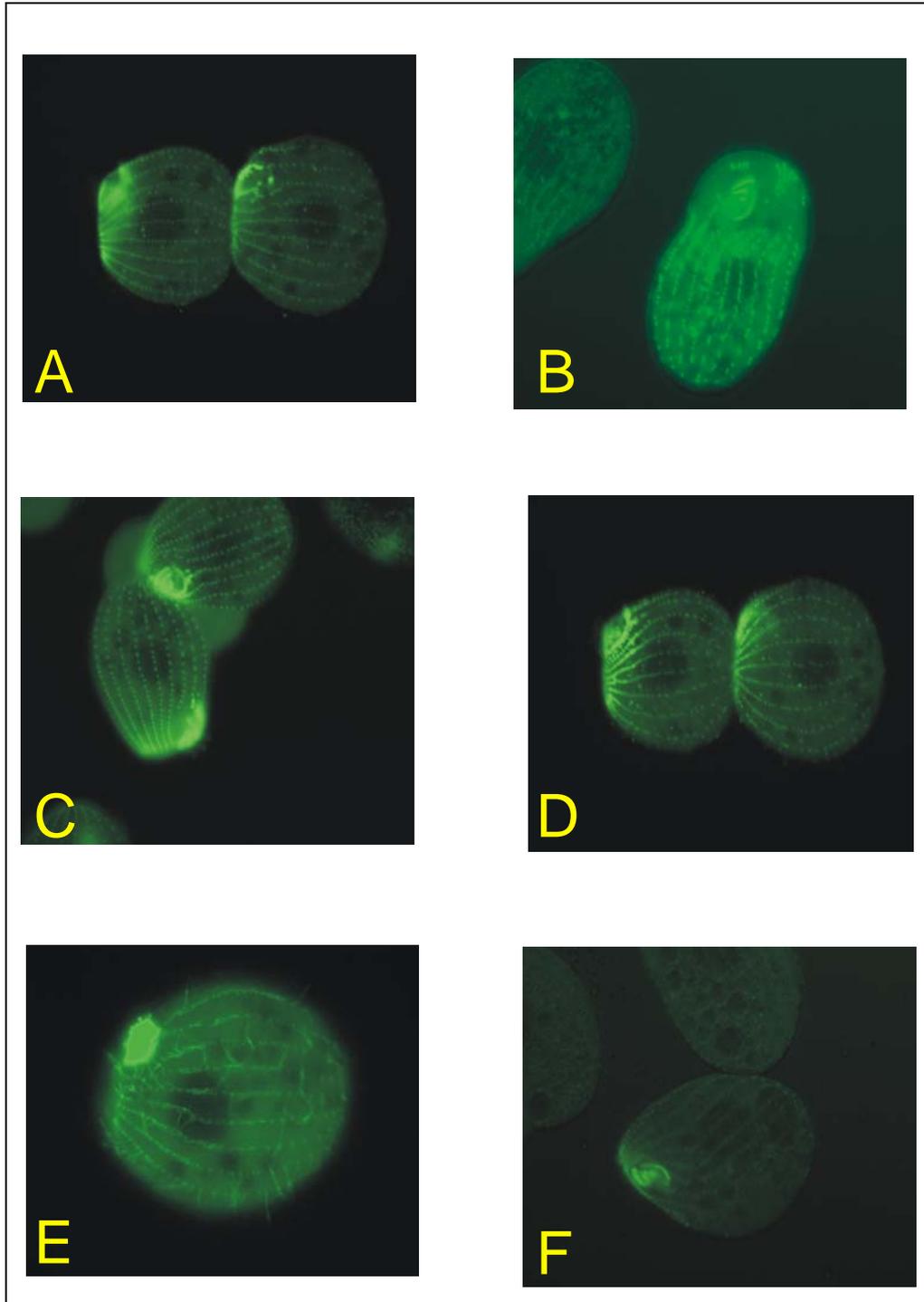
A monte e a valle di queste due porzioni (promotore + gene *reporter*) sono state inserite le regioni 5'- e 3'-terminali del gene BTU1 (Fig. 5.6).

La trasformazione è stata effettuata mediante bombardamento biologico ed il gene esogeno è stato introdotto nel *locus* di BTU1 mediante ricombinazione omologa. Per la trasformazione è stato utilizzato il ceppo CU522 di *T. thermophila*. Questo ceppo presenta una mutazione nel *locus* di BTU1 capace di conferire alle cellule una maggiore sensibilità al taxolo, che può quindi essere utilizzato come agente selezionante delle cellule trasformate.



**Figura 5.6** Mappa del vettore di espressione MTT5-Nrk2-GFP, in cui l'espressione del gene chimerico *Nrk2-GFP* risulta sotto il controllo del promotore di *MTT5*.

Le cellule così trasformate sono state trattate con Cd per 24 h e osservate al microscopio a fluorescenza. Nei trasformanti si osserva una fluorescenza marcata soprattutto per quanto riguarda le punte delle cilia, sia orali sia somatiche (Fig. 5.7 A, B, C, D, E). Per contro, nelle cellule di controllo, non trattate con Cd, si assiste a fenomeni di debole autofluorescenza a livello dei granuli e vacuoli citoplasmatici e, in minor misura, anche dell'apparato orale (Fig 5.7 F).



**Figura 5.7** Cellule di *T. thermophila* CU522 trasformate con il plasmide MTT5-Nrk2-GFP, trattate con Cd (A, B, C, D, E) e non trattate (F) per 24 ore. Microfotografie di cellule *in vivo*, effettuate in fluorescenza Ingr. 1100 ×

L'osservazione *in vivo* delle cellule mediante microscopia a fluorescenza, ha permesso di evidenziare i siti di accumulo della proteina (Nrk2-GFP). Risultati positivi si sono rivelati particolarmente evidenti nelle cellule in fase di divisione.

Questo è in accordo con i dati di letteratura in cui è dimostrato che l'attività delle chinasi *NIMA-related* raggiungono i massimi livelli durante il termine della fase G<sub>2</sub> e l'inizio della mitosi [125, 126].

La presenza di fluorescenza intensa sulla punta delle cilia somatiche e nell'apparato orale (quest'ultimo è costituito da una complessa struttura ciliare tetra-partita) nonché nei corpi basali, corrisponde al *pattern* osservato da Boldrin e collaboratori [121] durante la sovraespressione di *Nrk2-GFP* posto sotto il controllo del promotore *MTT-2*, in cellule trattate con Cu (utilizzando il plasmide *MTT2-Nrk2-GFP*).

Quindi i risultati ottenuti, insieme a quelli presentati da Boldrin *et al.* [121] indicano che, data la rapidità di risposta all'esposizione al metallo, i livelli di messaggero di *MTT-2* e *MTT-5* di *T. thermophila* potrebbero essere utilizzati rispettivamente come *biomarker* dell'inquinamento da Cu e da Cd. Inoltre *Tetrahymena* opportunamente ingegnerizzata potrebbe costituire un ottimo organismo bioindicatore, utile per studi di monitoraggio ambientale ed in ecotossicologia.

## **6. IL PROMOTORE DI *MTT-5* IN UNA PROSPETTIVA BIOTECNOLOGICA**

Le proprietà biologiche di *Tetrahymena thermophila* rendono questo organismo un sistema estremamente attraente e pratico per la sovra-espressione di proteine ricombinanti. In questo capitolo viene descritto il promotore di *MTT-5* inducibile da Cd. Usando come gene *reporter* la sequenza codificante di un gene che codifica per un antigene di superficie candidato per un vaccino contro *Ichthyophthirius multifiliis*, un protozoo ciliato parassita dei pesci d'acqua dolce, viene dimostrato che la regione a monte del codone d'inizio del gene *MTT-5* può indurre elevati livelli d'espressione del prodotto genico IAG52B nella sua corretta conformazione tridimensionale. Un diretto confronto tra questo promotore e un altro inducibile da Cd, *MTT-1*, indica che il promotore di *MTT5* è considerevolmente più efficiente.

### **6.1 *Tetrahymena* e i promotori delle MT come *tool* efficiente per l'espressione di proteine ricombinanti**

Recentemente la comunità scientifica ha posto particolare attenzione alle potenzialità di *T. thermophila* in ambito biotecnologico, quale modello ideale per l'espressione di proteine eterologhe, dal momento che nessun sistema di espressione (*E. coli*, lieviti, linee cellulari di insetto e mammifero) è universalmente utilizzabile [127]. In particolare *T. thermophila* appare un buon sistema di produzione di antigeni di superficie e proteine di protozoi parassiti, quali *Ichthyophthirius multifiliis* (che parassitizza i pesci d'acqua dolce) e *Plasmodium falciparum* (l'agente eziologico della malaria), dal momento che questi parassiti condividono lo stesso codice genetico [127, 128]. Inoltre molti organismi patogeni dell'uomo (quali i plasmodi) presentano, al pari di *T. thermophila*, genomi con tratti particolarmente ricchi di AT, instabili nei sistemi di espressione convenzionali. *T. thermophila* è stata quindi proposta come sistema

sperimentale di elezione per la caratterizzazione delle funzioni di proteine, per studi strutturali e per la produzione di vaccini.

Negli ultimi tempi, le tecniche d'indagine di tipo biochimico-molecolare hanno subito un notevole progresso allorché è stato possibile introdurre DNA nel genoma di *T. thermophila*. Le prime due tecniche utilizzate consentivano di agire solamente nel MAC quindi nelle cellule in fase vegetativa. La prima, peraltro dispendiosa in termini di tempo, è stata la microiniezione di DNA mediante micromanipolazione [129]. In seguito è stata utilizzata l'elettroporazione di cellule in coniugazione [130]. Infine, mediante bombardamento biolistico, è stato possibile agire sia sulla linea somatica sia su quella germinale, consentendo quindi la creazione di organismi *knock out* [68].

Recentemente, l'importanza di *T. thermophila* come organismo modello sperimentale è di gran lunga aumentato con la costruzione del primo sistema di espressione basato sui geni codificanti le MT [75].

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha posto l'attenzione in particolare su due classi di promotori per l'espressione di proteine eterologhe: i promotori che controllano l'espressione delle *heat shock proteins* [131] e quelli che controllano l'espressione delle MT [75, 121].

Riguardo ai promotori delle MT, Shang e collaboratori [75] hanno dimostrato che una regione di circa 1,9 Kb del promotore di *MTT-1* inducibile da Cd, era in grado di far esprimere elevati livelli del gene di *MTT-1* in *T. thermophila*. Tale promotore è stato quindi utilizzato per far esprimere una varietà di geni eterologhi fra cui la GFP e un antigene di superficie (IAG2B) di *Ichthyophthirius multifiliis*.

Più recentemente un frammento di circa 1,2 Kb del promotore di *MTT-2*, inducibile da Cu è stato utilizzato per far esprimere alti livelli di *IAG52B* a livelli pressoché equivalenti a quelli ottenuti con il promotore *MTT-1* [90].

Obiettivo della sperimentazione descritta qui di seguito è stato quello di testare il promotore *MTT-5*, un altro sistema inducibile, alternativo al promotore *MTT-1*, da utilizzare in campo biotecnologico per l'espressione di geni omologhi ed eterologhi.

## **6.2. Espressione di un antigene di superficie di *Ichthyophthirius multifiliis* in *T. thermophila***

Allo scopo di verificare se la regione 5'UT di *MTT-5* è in grado di regolare l'espressione del gene *IAG52B*, una porzione di 1,777 Kb a monte del codone d'inizio è stata amplificata partendo da DNA genomico estratto da cellule di *T. thermophila* CU428.1 in fase esponenziale di crescita. Tale frammento è stato clonato in un vettore di espressione ed è stato sequenziato per verificare l'esattezza delle sequenze amplificate per confronto con la sequenza genomica corrispondente disponibile in GenBank. Il frammento è stato poi clonato nel vettore di espressione plasmidico pMTT-FLG5 progettato e realizzato dal gruppo di ricerca del Dr. Clark (Cornell University, USA). Questo vettore è un derivato di pBlueScript e contiene la porzione codificante del gene *IAG52B* del protozoo ciliato *Ichthyophthirius multifiliis*, parassita di pesci d'acquario. Questo gene codifica per un antigene di superficie *GPI-anchored* della famiglia degli *immobilization antigens* (o *i-antigens*). Il ceppo CU522 *T. thermophila* è stato quindi trasformato con tale vettore d'espressione mediante bombardamento biolistico come precedentemente descritto. La presenza del transgene all'interno del genoma è stata confermata mediante PCR.

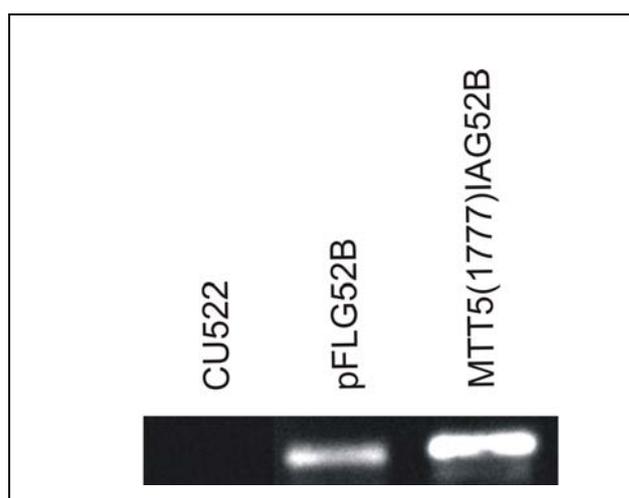
La scelta di *IAG52B* è basata essenzialmente su due criteri. Il primo è che tale proteina è un ottimo candidato per lo sviluppo di un vaccino contro *Ichthyophthirius* [75, 127]. *I. multifiliis* è infatti il più importante protozoo parassita di pesci d'acqua dolce e ha un grande impatto sull'acquacoltura commerciale mondiale [132, 133]. Il pesce, infatti, può sviluppare un'immunità in seguito all'esposizione a infezioni sub-letali e c'è una sostanziale evidenza che correla la produzione di anticorpi contro l'antigene di superficie con la resistenza dell'ospite. Infatti, gli antigeni di superficie possono essere riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite e determinare una risposta anticorpale protettiva nel pesce [75, 127]. Tuttavia, poiché *Ichthyophthirius* non può crescere in coltura, ma solo in associazione con il suo ospite, un vaccino basato su questo antigene richiederebbe la produzione di antigeni a basso costo in forma ricombinante. *T. thermophila* potrebbe, quindi, essere un ottimo organismo in grado di permettere l'espressione degli antigeni di immobilizzazione nella loro corretta conformazione

tridimensionale [90]. Quindi, la sovra-espressione di queste proteine in *Tetrahymena* usando un promotore robusto e inducibile potrebbe ridurre significativamente i costi di produzione.

Il secondo criterio che ha portato alla scelta di *IAG52B* è legato al fatto che lo stesso gene è stato utilizzato per studiare la capacità dei promotori *MTT-1* [75] e *MTT-2* [90] di regolare l'espressione di geni eterologhi. L'utilizzo dello stesso gene ha quindi permesso di confrontare le differenti attività dei tre promotori.

Per verificare la funzionalità del promotore *MTT-5*, i trasformanti *MTT5(1777)IAG52B* così ottenuti sono stati trattati per 16 h con una soluzione di  $\text{CdCl}_2$ . L'espressione del prodotto genico di *IAG52B* è stata valutata mediante *Western blotting* usando un anticorpo monospecifico policlonale contro I-Ag 52 KDa di *I. multifiliis*. Come mostrato in figura 6.1, I-Ag 52 KDa è abbondantemente espresso nei trasformanti trattati con Cd.

Inoltre per determinare l'efficienza di tale promotore, i livelli di espressione di *IAG52B* regolato dal promotore di *MTT-5* sono stati confrontati con quelli di *IAG52B* regolato dal promotore di *MTT-1*. Mentre studi precedenti [75] avevano mostrato che il promotore di *MTT-1* è estremamente robusto, il confronto dei livelli di espressione sotto il controllo di entrambi i promotori ha indicato che il promotore *MTT-5* è approssimativamente 2 volte più attivo (Fig. 6.1).



**Figura 6.1** Analisi mediante *Western Blot* dell'espressione di *IAG52B* sotto il controllo dei due promotori *MTT-1* (pFLG52B) e *MTT-5* (MTT5(1777)IAG52B) in cellule di *T. thermophila* cresciute in terreno Neff a cui è stato aggiunto Cd. CU522: controllo.

### **6.3. Cinetica di accumulo della proteina IAG52B**

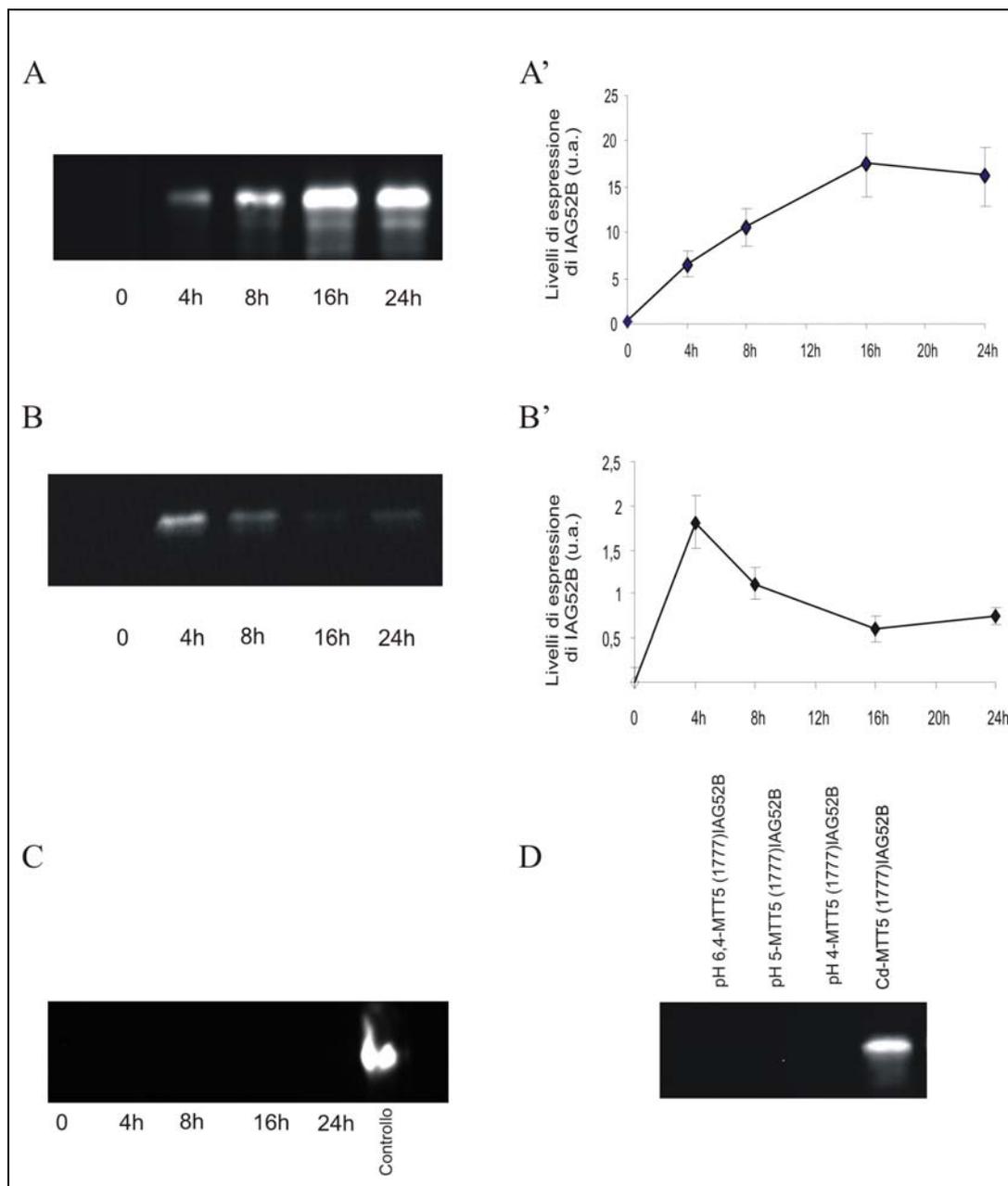
Per determinare la cinetica di accumulo dell'antigene di superficie IAG52B e verificare se, oltre al Cd, altri metalli possono attivare il promotore di *MTT-5*, le cellule trasformate MTT5(1777)IAG52B sono state trattate con CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> e ZnCl<sub>2</sub>.

L'accumulo della proteina è stato determinato a tempi diversi mediante *Western Blotting* (Fig. 6.2). Inoltre, poiché in uno studio recente [89] è stato suggerito che anche un pH acido è in grado di indurre la sintesi di *MTT-5* mRNA, le cellule trasformate sono state fatte crescere in terreno Neff a pH 4, a pH 5 e pH 6,4 (controllo), e l'accumulo di proteina è stato valutato dopo un intervallo di tempo di 16 h. I risultati ottenuti sono illustrati in figura 6.2.

L'espressione dell'antigene IAG2B non è rilevabile in assenza di metallo, mentre è indotta ad alti livelli, quando il Cd viene aggiunto al terreno di coltura (Fig. 6.2 A, A'). Dopo 4 h l'aggiunta del metallo, i livelli di proteina sono aumentati di circa 5 volte rispetto ai valori di controllo e continuano ad aumentare fino alle 16 h dove si riscontrano livelli ancora più elevati (circa 16 volte rispetto al controllo). Tali livelli sono mantenuti pressoché costanti nelle successive 4 h.

In presenza di Cu, i livelli d'espressione di IAG2B sono più bassi rispetto a quelli osservati in cellule trattate con Cd. Anche la cinetica di accumulo è completamente differente. Come mostrato in figura 6.2 B e B', i livelli più elevati di espressione si manifestano dopo 4 h di trattamento. Si assiste poi ad una progressiva *down-regulation* nelle successive 12 h e tra le 16 e 24 h di trattamento il contenuto proteico di IAG2B rimane pressoché costante.

In presenza di Zn o di pH acido l'espressione di IAG2B non è rilevabile (Fig. 6.2 C e D).



**Figura 6.2** Analisi mediante *Western Blot* della cinetica di accumulo di IAG52B in A) cellule trattate con Cd 11 $\mu$ M, B) con Cu 630 $\mu$ M, C) con Zn 229 $\mu$ M. Le cellule sono state raccolte a 4, 8, 16 e 24 h. Nei diagrammi relativi alla cinetica di accumulo di IAG52B in presenza di Cd (A') e Cu (B') la quantità di proteina è espressa in unità arbitrarie (u.a.). D) Analisi mediante *Western Blot* dell'accumulo di IAG52B in cellule cresciute in Neff a pH 4, pH 5 e pH 6,4 e in cellule tratte con Cd (controllo).

I risultati ottenuti indicano che essendo il promotore *MTT-5* più efficiente del promotore *MTT-1*, potrebbe ora sostituire quest'ultimo nel regolare l'espressione di proteine eterologhe. Tuttavia l'utilizzo del Cd nell'indurre i promotori delle MT per la produzione di proteine è un potenziale svantaggio, in quanto molto tossico; problemi legati allo smaltimento ambientale potrebbero costituire un potenziale

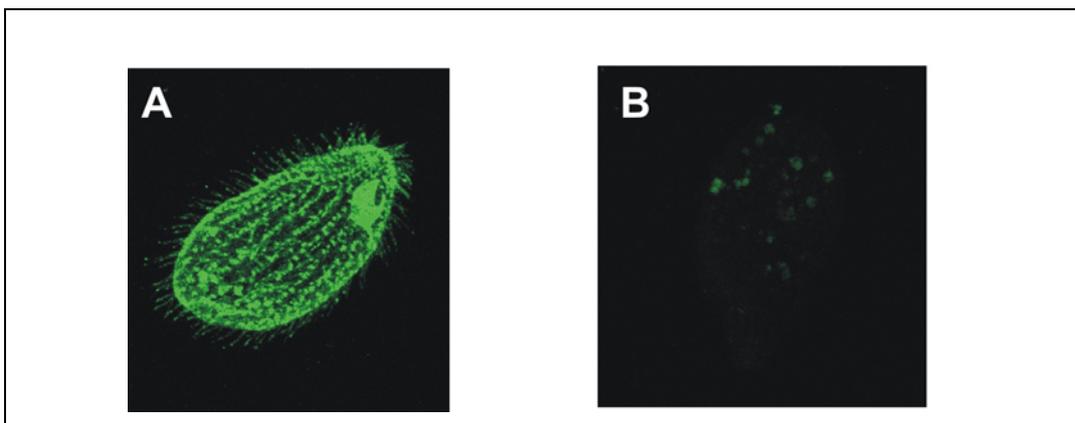
limite al suo utilizzo [121]. Quindi data la loro minore tossicità, sarebbero preferibili lo Zn e/o Cu per regolare l'espressione di proteine ricombinanti. Il Cu, tuttavia, ha dato dei livelli d'espressione del prodotto genico IAG52B più bassi rispetto al Cd (Fig. 6.2 B). Allo stesso modo, anche lo Zn, uno dei più comuni e potenti induttori della trascrizione delle MT in altri organismi [14], non ha portato all'espressione di *IAG52B*. D'altra parte, Diaz e collaboratori [89] hanno dimostrato che concentrazioni di Zn approssimativamente 4 volte più elevate rispetto a quelle usate in questo studio (870 $\mu$ M *versus* 229 $\mu$ M), hanno portato ad una forte induzione dei trascritti di *MTT-5*. Allo stesso modo, anche in questo studio ho osservato che l'espressione del gene *MTT-5* può essere indotta dallo Zn (Fig. 5.5, capitolo 5), anche se a livelli più bassi rispetto al Cd e al Cu [111]. La discrepanza tra livelli di messaggero e sintesi proteica è stata dimostrata anche in altri sistemi [134].

Diaz e collaboratori [89] hanno dimostrato che il gene *MTT-5* è fortemente indotto da un pH acido. Nelle mie condizioni sperimentali a vari pH acidi non ho riscontrato nessuna induzione di *IAG52B*. La ragione di questa discrepanza non è chiara; le ipotesi che potrebbero spiegare queste differenze possono essere o le differenti condizioni sperimentali utilizzate o il fatto che il transgene risiedendo nel *locus* della BTU1 potrebbe essere sottoposto a delle fini differenze nel controllo trascrizionale in quanto esso si trova ad essere posto anche sotto il controllo di parte della regione 5' UT del gene che codifica BTU1.

#### **6.4. Immunolocalizzazione dell'antigene di superficie IAG2B**

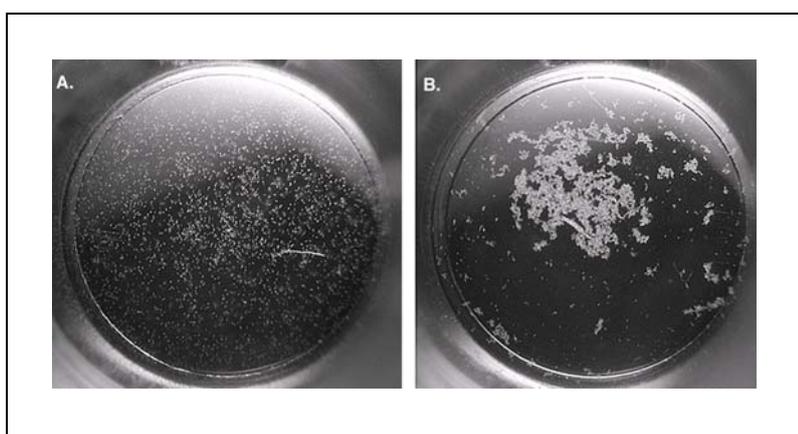
Allo scopo di confermare la corretta espressione dell'antigene ricombinante in *Tetrahymena*, è stata allestita una coltura cellulare MTT5(1777)IAG52B in terreno Neff contenente Cd. Dopo 16 h le cellule sono state immunomarcate con un anticorpo monoclonale G3-61 e osservate al microscopio a fluorescenza.

Come si vede dalla figura 6.3 A, è presente una fluorescenza marcata, localizzata soprattutto a livello della ciliatura orale e somatica. Al contrario, nelle cellule non trattate con Cd (Fig.6.3 B) si osservano solo fenomeni di debole autofluorescenza dei granuli e vacuoli citoplasmatici.



**Figura 6.3** Cellule di *T. thermophila* MTT5(1777)IAG52B trattate con Cd (A), non trattate (B)

Per confermare che la proteina ricombinante fosse correttamente ripiegata e ancorata alla membrana plasmatica, dopo l'induzione con Cd, è stato aggiunto al terreno di coltura l'anticorpo monoclonale mAb G3-61. Tale anticorpo, riconoscendo gli epitopi conformazionali sulla proteina è in grado di indurre una rapida immobilizzazione delle cellule attraverso la sua interazione con l'antigene di superficie sulla membrana delle cilia. Come si osserva in figura 6.4, entro 5 min dall'aggiunta dell'anticorpo al terreno di coltura, circa il 95% delle cellule hanno perso la loro mobilità e sono precipitate sul fondo della piastra.



**Figura 6.4** Cellule di *T.thermophila* MTT5(1777)IAG52B trattate con Cd 11 $\mu$ M (A), non trattate (B) per 16 h.

Concludendo possiamo affermare che:

- il promotore di *MTT-5* è in grado di far esprimere elevati livelli di antigene di superficie IAG52B di *Ichthyophthirius multifiliis* nella sua corretta conformazione tridimensionale;
- il promotore *MTT-5* è significativamente più efficiente rispetto ad altri promotori di MT e in particolare rispetto al promotore *MTT-1*;
- tale promotore potrebbe quindi divenire un promotore di uso generale per la sovra-espressione di proteine eterologhe in *Tetrahymena* e sostituire il promotore *MTT-1*, attualmente utilizzato.



## 7. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL PROMOTORE *MTT-5*

In questo capitolo è descritta l'attività di ricerca volta ad individuare le sequenze MRE nel promotore *MTT-5* in *T. thermophila*. L'analisi *in silico* del promotore di *MTT-5* ha permesso di identificare numerose putative sequenze *core* caratteristiche degli MRE, che mostrano un'identità dell'85,7% rispetto agli MRE ritrovati nei vertebrati. Inoltre dall'analisi *in silico* è emersa la presenza di una duplicazione di 416 pb, di cui la prima copia è localizzata tra -212 e -628 pb a monte del primo codone di *MTT-5*, mentre la seconda (più corta di 3 pb), è contigua alla prima ed è localizzata tra -629 e -1042 pb. Tuttavia l'analisi mediante delezioni e mutagenesi del promotore di *MTT-5* indica che la regione di 300 pb a monte del codone di inizio della traduzione è pienamente attiva nel regolare l'espressione del gene *reporter IAG52B* in risposta al Cd. Al contrario, l'espressione del transgene è completamente abolita nella linea cellulare contenente la delezione a -290 pb. Questo suggerisce che nella regione compresa tra -300 pb e -290 pb è presente un importante elemento del promotore che è in grado di rispondere al Cd.

### 7.1 Caratterizzazione del promotore *MTT-5*

Un importante e generale aspetto, sia strutturale che funzionale, dei geni delle MT è la presenza, nei promotori, di elementi che ne controllano la trascrizione in risposta ai metalli. Questi elementi, chiamati *Metal Responsive Element* (MRE), sono costituiti da specifiche sequenze conservate dagli invertebrati ai mammiferi [27, 59]. Nei geni delle MT sino ad ora caratterizzati in *Tetrahymena* sono state identificate sequenze MRE putative, solo parzialmente simili a quelle descritte negli altri organismi [85].

In *Tetrahymena* l'effettiva funzione di queste sequenze e soprattutto l'interazione con particolari sequenze *enhancer* non sono state ancora verificate. Nonostante da tempo sia disponibile il genoma di *T. thermophila* al quale ora tutti gli studi di genomica e proteomica si riferiscono, per i protozoi non esistono dati certi, relativi a queste sequenze. A questa carenza contribuisce anche l'estrema

ricchezza in A e T del genoma di *T. thermophila*, che rende difficili le analisi bioinformatiche volte alla ricerca di elementi regolatori.

In questo capitolo è descritta l'attività di ricerca volta ad individuare le sequenze MRE nel promotore *MTT-5* in *T. thermophila* allo scopo di chiarire il meccanismo di regolazione dell'espressione genica delle MT in un gruppo di organismi che occupano un posto di rilevante interesse dal punto di vista filogenetico e biotecnologico, quale i protozoi.

La sequenza del promotore *MTT-5*, isolata e clonata precedentemente, è stata analizzata mediante programmi bioinformatici allo scopo di individuare sequenze simili alle sequenze MRE di altri organismi. Successivamente sono state generate delle delezioni nel promotore con relativa verifica dell'espressione di un gene *reporter* mediante *Western blotting* e *real time PCR*. Sulle regioni del promotore positive allo *screening* di espressione, è stata effettuata una mutagenesi sito-diretta attraverso l'utilizzo della PCR inversa, una tecnica che permette la creazione di precise inserzioni e delezioni.

L'identificazione delle sequenze MRE costituisce il primo passo per l'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione delle isoforme di MT in *Tetrahymena*. Ciò potrebbe permettere interessanti applicazioni biotecnologiche. Infatti, sarebbe auspicabile creare dei promotori *ad hoc* costituiti da più copie di MRE artificialmente assemblate in modo da ottenere un'elevata capacità trascrizionale, in analogia a quanto descritto nel caso degli MRE delle MT di mammifero e *Drosophila* [34, 60].

## **7.2 Caratterizzazione del promotore di *MTT-5* mediante analisi *in silico***

Allo scopo di identificare le sequenze regolatrici coinvolte nell'induzione di *MTT-5* in risposta a metalli (MRE), la sequenza del promotore *MTT-5*, isolata e clonata come precedentemente descritto, è stata analizzata mediante programmi bioinformatici (TRANSFAC-Gene Transcription Factor Database).

L'analisi *in silico* del promotore di *MTT-5* ha permesso di identificare numerose sequenze che mostrano un'identità fino all'85,7% rispetto agli MRE ritrovati nei vertebrati (TGCRCNC) (Fig.7.1), ma che differiscono da tutte le

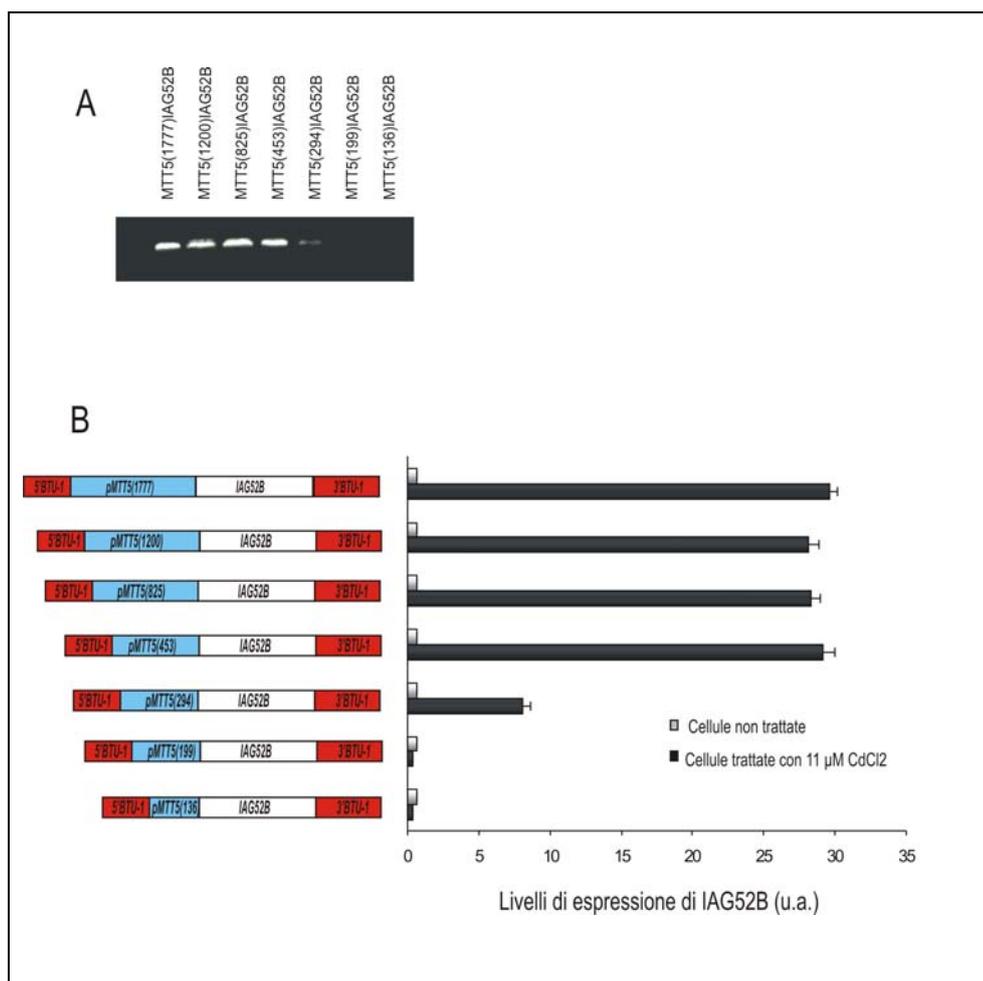


### 7.3 Caratterizzazione del promotore di *MTT-5* mediante delezioni e mutagenesi sito-specifica

Allo scopo di verificare l'effettiva funzionalità di queste sequenze individuate dall'analisi bioinformatica e inoltre identificare la sequenza più breve richiesta per regolare l'espressione del transgene, sono state generate delle delezioni del promotore. In una prima fase, l'espressione dell'antigene IAG52B nelle linee cellulari trasformate è stata verificata mediante analisi *Western Blot*. La strategia utilizzata nella realizzazione dei costrutti e nella trasformazione delle linee cellulari è la stessa riportata nel capitolo 5.

Inizialmente è stata effettuata una serie di ampie delezioni a -1200, -825, -453, -294, -199 e -136 pb a monte della sequenza codificante. Le linee cellulari trasformate con i costrutti contenenti le diverse delezioni sono state trattate per 16 h con una soluzione di CdCl<sub>2</sub> 11 µM e i lisati cellulari derivati sono stati analizzati mediante *Western blotting*. Come mostrato in figura 7.2, dall'analisi è risultato che:

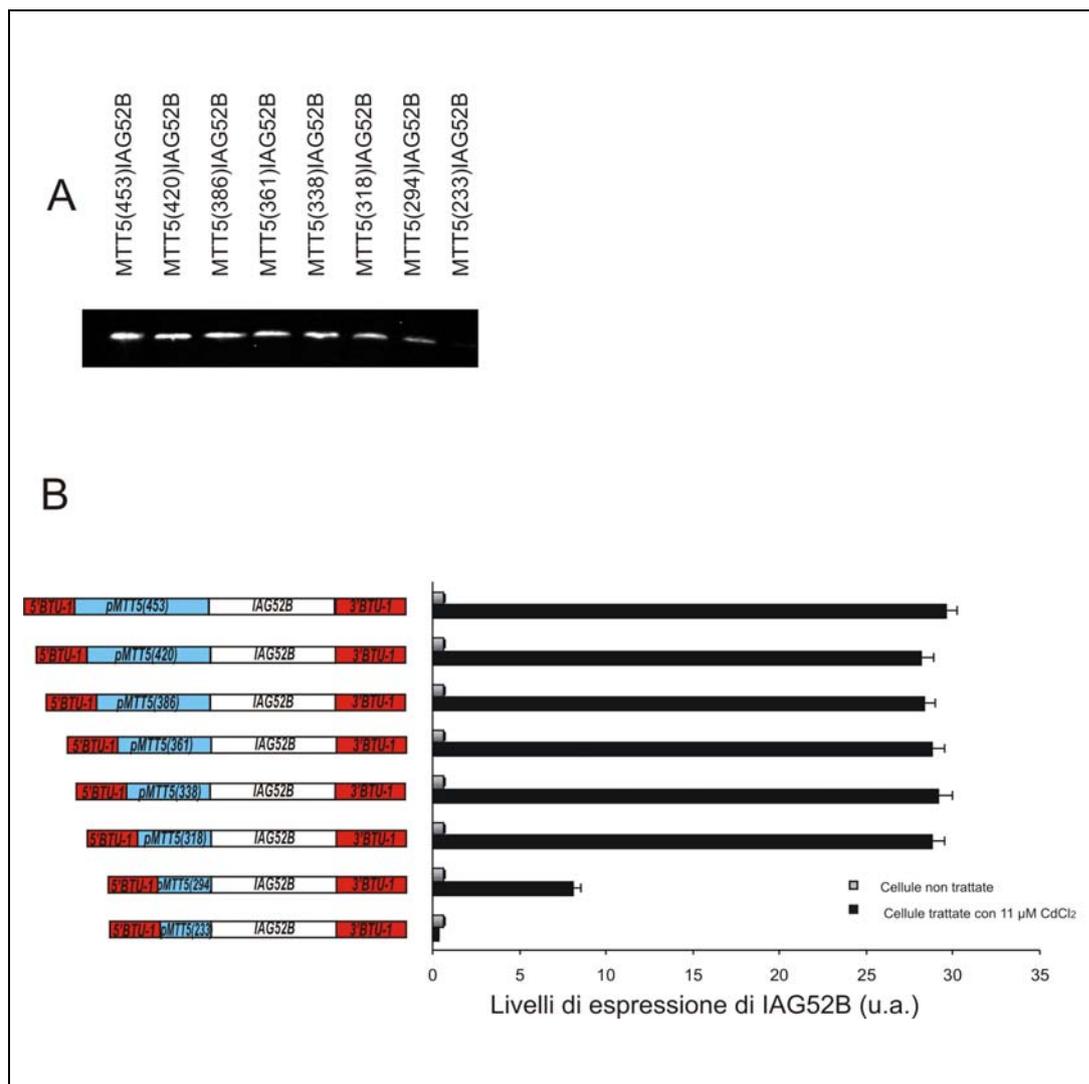
- in assenza di Cd nel terreno di coltura non vi è espressione di antigene IAG52B;
- le linee cellulari trasformate con i costrutti contenente delezioni a 1200, 825 e 453 pb del promotore *MTT-5* presentano elevati livelli di espressione di antigene IAG52B, paragonabili a quelli prodotti dall'intera porzione genica clonata in origine (1777 pb);
- non ci sono differenze d'espressione fra le quattro linee cellulari;
- c'è una drastica riduzione dell'espressione tra la linea cellulare *MTT5(453)IAG52B* e quella *MTT5(294)IAG52B*;
- nelle linee cellulari *MTT5(199) IAG52B* e *MTT5(136) IAG52B* non è rilevabile espressione dell'antigene di superficie.



**Figura 7.2** **A)** Analisi mediante *Western blot* dell'espressione di *IAG52B* di *I. multifiliis* regolata da differenti porzioni del promotore di *MTT-5*; **B)** diagramma rappresentante i differenti livelli d'espressione di *IAG52B* espressi in unità arbitrarie (u.a.).

Poichè da questa prima analisi mediante delezioni del promotore appare chiaro che tutta l'informazione necessaria perché la trascrizione del gene possa venire indotta dal Cd è compresa tra le 453 pb e le 199 pb a monte del codone d'inizio, si sono effettuate ulteriori delezioni all'interno di questa regione. In particolare sono state delete piccole regioni di circa 20-30 pb. Le linee cellulari trasformate ottenute con i vettori d'espressione contenenti le delezioni sono: MTT5(420)IAG52B, MTT5(386)IAG52B, MTT5(361)IAG52B, MTT5(338)IAG52B, MTT5(318)IAG52B e MTT5(233)IAG52B.

Come precedentemente descritto, le linee cellulari trasformate sono state trattate per 16 h con Cd e le analisi mediante *Western Blot* sono presentate in figura. 7.3.

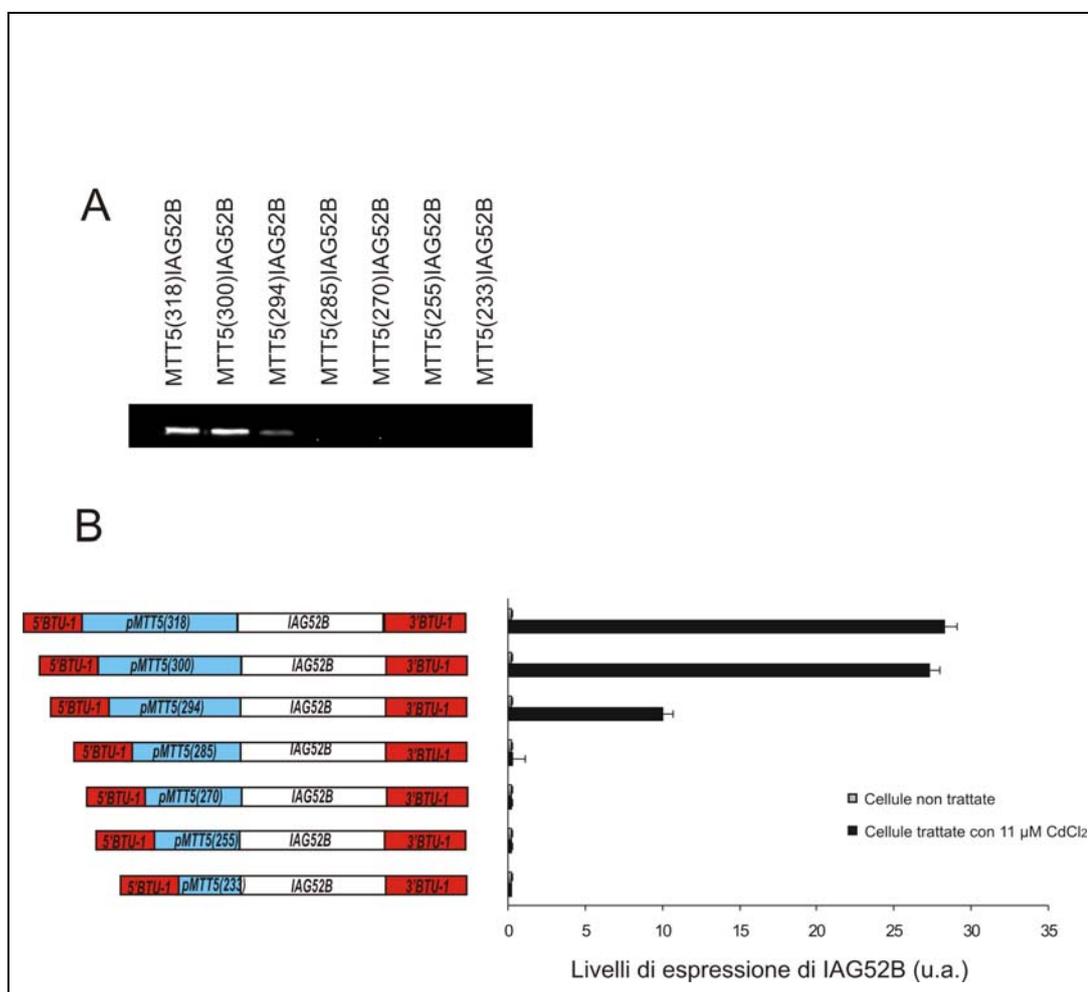


**Figura 7.3** **A)** Analisi mediante *Western blot* dell'espressione di *IAG52B* di *I. multifiliis* regolata da differenti porzioni del promotore di *MTT-5*; **B)** diagramma rappresentante i differenti livelli d'espressione di *IAG52B* espressi in unità arbitrarie (u.a.).

Si osserva una netta riduzione dell'espressione di *IAG52B* nella linea cellulare contenente la delezione a -294 pb e l'espressione è completamente abolita nella linea cellulare contenente la delezione a -233 pb. Le linee cellulari che contengono le delezioni a -453, -420, -386, -361, -338 e -318 pb non mostrano variazioni nell'espressione del prodotto genico *IAG52B*. I risultati ottenuti suggeriscono che la sequenza richiesta per regolare l'espressione metallo-indotta del transgene possa trovarsi nelle 85 pb comprese tra 318 e 233 pb a monte del sito di inizio della traduzione.

Sulla base di questi risultati si è ritenuto opportuno effettuare ulteriori delezioni all'interno di questa regione e in particolare sono stati allestiti i seguenti

costrutti: MTT5(300)IAG52B, MTT5(285)IAG52B, MTT5(270)IAG52B, MTT5(255)IAG52B. Le linee cellulari trasformate con i costrutti suddetti sono state trattate come in precedenza e i risultati ottenuti sono illustrati in figura 7.4.



**Figura 7.4** A) Analisi mediante *Western blot* dell'espressione di *IAG52B* di *I. multifiliis* regolata da differenti porzioni del promotore di *MTT-5*; B) diagramma rappresentante i differenti livelli d'espressione di *IAG52B* espressi in unità arbitrarie (u.a.).

Si osserva una riduzione dell'espressione di circa il 60% tra la linea cellulare trasformata con il costrutto MTT5(300)IAG52B e quella trasformata con MTT5(294)IAG52B. Inoltre l'espressione del transgene è del tutto abolita nella linea cellulare trasformata MTT5(285)IAG52B. Questi risultati indicano che le 15 pb comprese tra 300 e 285 pb del promotore di *MTT-5* sono importanti per l'espressione metallo-indotta del transgene.

Ulteriori indagini all'interno di questa regione sono state effettuate allestendo altri tre costrutti. Uno di questi contiene una delezione a -290 pb, mentre gli altri due

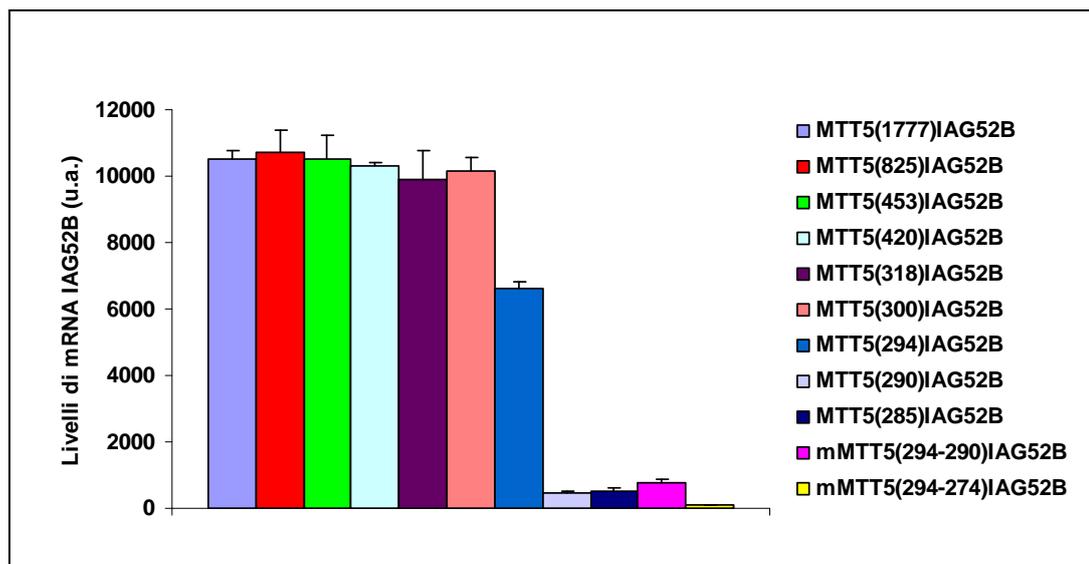
contengono l'intera porzione genica di 1777 pb, all'interno della quale sono state però mutate mediante PCR inversa le regioni comprese tra 294 e 274 pb e tra 294 pb e 290 pb. I ceppi mutanti così ottenuti sono MTT5(290)IAG52B, mMTT5(294-274) e mMTT5(294-290).

L'attività trascrizionale di questi ceppi è stata confrontata con quella di alcuni mutanti precedentemente prodotti (1777 pb e delezioni a -825, -453, -420, -318, -300, -294 e -285 pb) analizzando i livelli di messaggero del gene *IAG52B* mediante *real time* PCR quantitativa, con la chimica del SYBR Green I. L'utilizzo della tecnica di *real time* PCR, notevolmente più sensibile rispetto all'analisi mediante *Western blot*, permette di rilevare meglio eventuali differenze d'espressione fra i vari ceppi trasformati presi in esame. Il livello di trascritto del gene *IAG52B*, in ogni campione, è stato confrontato con un campione di controllo, costituito dalle cellule non trattate con il metallo ed utilizzato come riferimento. I valori ottenuti dal segnale di fluorescenza di ciascun campione sono stati normalizzati riferendoli a quelli relativi al gene per l'rRNA della subunità 17S.

Le culture cellulari mutanti sono state trattate con Cd per 1 h poiché in questa fase temporale *MTT-5* presenta i massimi livelli di accumulo di messaggero.

I risultati illustrati in Figura 7.5 indicano che:

- non vi è differenza di espressione fra le -1777 pb e le -300 pb a monte del sito d'inizio della traduzione, confermando i risultati ottenuti con l'analisi *Western*;
- viene confermata anche la riduzione dei livelli di espressione nella linea cellulare trasformata con il costrutto MTT5(294)IAG52B;
- nelle linee cellulari trasformate con i vettori di espressione mMTT5(294-274)IAG52B, mMTT5(294-290)IAG52B, MTT5(290) e MTT5(285)IAG52B vi è un netto decremento del segnale d'espressione.



**Figura 7.5** Analisi mediante *real time* PCR dell'espressione di *IAG52B* di *I. multifiliis* regolata da differenti porzioni mutagenizzate del promotore di *MTT-5*; i differenti livelli d'espressione di *IAG52B* espressi in unità arbitrarie (u.a.).

L'analisi sperimentale da me effettuata mediante le delezioni e mutagenesi del promotore sembra suggerire che le putative sequenze MRE, simili a quelle caratterizzate nei mammiferi ed identificate con l'analisi *in silico* nel promotore di *MTT-5*, non giochino un ruolo importante nella trascrizione metallo-indotta. Nei mammiferi, fattori di trascrizione a sei dita di zinco che rispondono alla presenza del metallo (MTF-1) si legano alle sequenze MRE, la cui sequenza *core* è TGCRNC [66], per dare inizio alla trascrizione. Anche nei promotori dei geni delle MT di *Drosophila* sono presenti delle sequenze MRE simili a quelle dei mammiferi e una proteina simile all'MTF-1 attiva la loro trascrizione in presenza di metalli pesanti [34]. Invece, in *Saccharomyces cerevisiae*, l'espressione genica di CPU1 che codifica per una Cu-MT è regolata da una proteina *trans-acting* detta ACE1, che in presenza di Cu si lega ad una specifica sequenza di attivazione a monte del promotore del gene CUP1 detta UAS<sub>CUP1</sub> (*upstream activator sequences*) attivando la trascrizione del gene [18]. In *T. thermophila* pur essendoci nel genoma numerose proteine a dita di Zn, nessuna di esse sembra essere simile all'MTF-1 identificato nei vertebrati [89], facendo presupporre che il meccanismo di regolazione dell'espressione genica dei geni delle MT in *Tetrahymena* differisce da quello dei vertebrati.

Anche le porzioni ripetute di 416 pb da noi identificate con l'analisi *in silico*

non sembrano essere essenziali per la trascrizione genica. Infatti, il frammento di 300 pb sembra essere pienamente attivo nel regolare l'espressione di *IAG52B* in risposta al Cd, pur mancando sia della porzione ripetuta distale compresa tra -629 e -1042 pb sia di buona parte di quella prossimale -212 e -628 pb.

Diaz e collaboratori [89], mediante analisi *in silico*, hanno individuato nelle 5'UT di *MTT-1*, *MTT-3* e *MTT-5* di *T. thermophila* e di *MT-1* di *T. pyriformis* un motivo conservato e ripetuto MTCM1 (*metallothionein conserved motif 1*), al quale gli autori attribuiscono un ruolo funzionale nel regolare l'espressione genica, pur non effettuando verifiche sperimentali sull'effettiva funzionalità. Questo motivo conservato è presente sei volte in *MTT-1*, 5 volte in *MT-1*, 2 volte in *MTT-3* e ben 13 volte in *MTT-5*. È interessante notare che questi motivi conservati contengono un dominio di 7 pb (TGANTCA) che è simile al sito di legame del fattore di trascrizione AP-1 (TGA[G/C]TCA) presente nei promotori dei metazoi. In *Saccharomyces cerevisiae* il fattore di trascrizione AP-1 sembra essere coinvolto nelle risposte allo stress ossidativo e alla resistenza ai metalli; infatti, Wu e collaboratori [135] hanno dimostrato che mutanti contenenti delezioni del gene che codifica questo fattore di trascrizione sono ipersensibili alla presenza di Cd nel terreno. Ciononostante, dei 13 MTCM1 identificati in *MTT-5* solo 2 sono presenti nel frammento di 300 pb che dalle nostre analisi risultata importante per l'attivazione genica. Inoltre è interessante osservare che la riduzione dell'espressione nella linea cellulare contenente la delezione a -294 pb e il netto decremento dell'espressione nella linea cellulare contenente la delezione a -290 pb, suggerisce che nella regione compresa tra le 300 pb e le 290 pb è presente un importante elemento regolatore che risponde al Cd. È importante sottolineare che in questa regione (5'-TCAAAAGGATACTCATC-3') è presente un potenziale elemento GATA. È noto che le sequenze GATA sono coinvolte nella regolazione dell'espressione di specifici geni in molti organismi. È stato dimostrato che gli elementi GATA sono richiesti per la trascrizione dei geni *mtl-1* e *mtl-2* delle MT nelle cellule intestinali di *C. elegans* [126]. La mutazione dell'elemento GATA compreso tra le -294 e le -290 pb nel promotore di *MTT-5* determina un netto decremento dei livelli di messaggero del transgene indicando che tale elemento è essenziale per l'espressione di *MTT-5* in *T. thermophila*.

## **8. EVOLUZIONE MOLECOLARE DELLE MT IN *TETRAHYMENA***

In questo capitolo vengono presentate delle analisi filogenetiche basate sulle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche. Per la ricostruzione filogenetica sono stati usati i metodi UPGMA, *neighbour-joining* (NJ), *minimum evolution* (ME) and *maximum parsimony* (MP). Dagli alberi costruiti utilizzando le sequenze amminoacidiche appare evidente che le MT Cd-inducibili (MT-1, TpMT-2, MTT-1, MTT-3 e MTT-5) sono nettamente separate da quelle Cu-inducibili (MT-2, MTT-2 e MTT-4). Il *cluster* delle Cu-MT è sempre risolto, favorendo una relazione di ortologia fra le MTT-2 /MTT-4 di *T. thermophila* e le MT-2 di *T. pyriformis* e *T. pigmentosa*, mentre una relazione di paralogia fra MTT-2 e MTT-4 di *T. thermophila*. Il *cluster* delle Cd-MT è risolto negli alberi costruiti con i metodi NJ, ME e UPGMA, favorendo una relazione ortologa fra le MT-1 di *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* e una relazione paralogica tra MTT-1 e MTT-3 di *T. thermophila*. In tutte le topologie di albero MTT-5 emerge per prima tra il gruppo delle Cd-MT, facendo presupporre una peculiare storia evolutiva per questa isoforma, indipendente dalle altre.

### **8.1 Le relazioni filogenetiche**

Le relazioni filogenetiche tra le specie appartenenti al genere *Tetrahymena* sono state ampiamente studiate. Anche se i risultati ottenuti sono a volte ambigui a causa dell'elevata divergenza delle caratteristiche molecolari a fronte di una morfologia cellulare molto simile, le prime analisi filogenetiche si sono basate su dati morfologici (ad esempio come la presenza/assenza di un ciglio caudale) ed ecologici (come la nicchia ecologica). Successivamente, analisi comparative sulle sequenze di entrambe le subunità dell'rRNA [137], del DNA mitocondriale [138], della regione intergenica agli istoni H3II/H4II [139], e della porzione ad RNA dell'enzima telomerasi [140], hanno permesso la costruzione delle basi della filogenesi molecolare di *Tetrahymena*. In particolare, sulla base delle analisi condotte sull'rRNA [137], è stato possibile separare le specie di *Tetrahymena* in

due gruppi: il gruppo australe a cui appartiene *T. pigmentosa* e il gruppo boreale a cui appartengono *T. pyriformis* e *T. thermophila*.

Per quanto riguarda la storia evolutiva del MT all'interno del genere *Tetrahymena*, le relazioni filogenetiche tra le diverse isoforme sono state poco studiate. Obiettivo di questo capitolo è stato quello di formulare nuove ipotesi sull'evoluzione molecolare delle MT di *Tetrahymena*, sulla base dei risultati ottenuti da analisi filogenetiche effettuate sulle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche. Si è cercato di estendere l'analisi filogenetica anche sulle sequenze nucleotidiche delle regioni 5' e 3' terminali non tradotte, poiché:

- le sequenze geniche possono avere un numero di elementi potenzialmente legati alle proprietà funzionali delle MT;
- generalmente la composizione amminoacidica è piuttosto conservata tra i vari *taxa*;
- la sequenza amminoacidica in generale esibisce livelli più bassi di variabilità se confrontata con la sequenza nucleotidica a causa di mutazioni silenti.

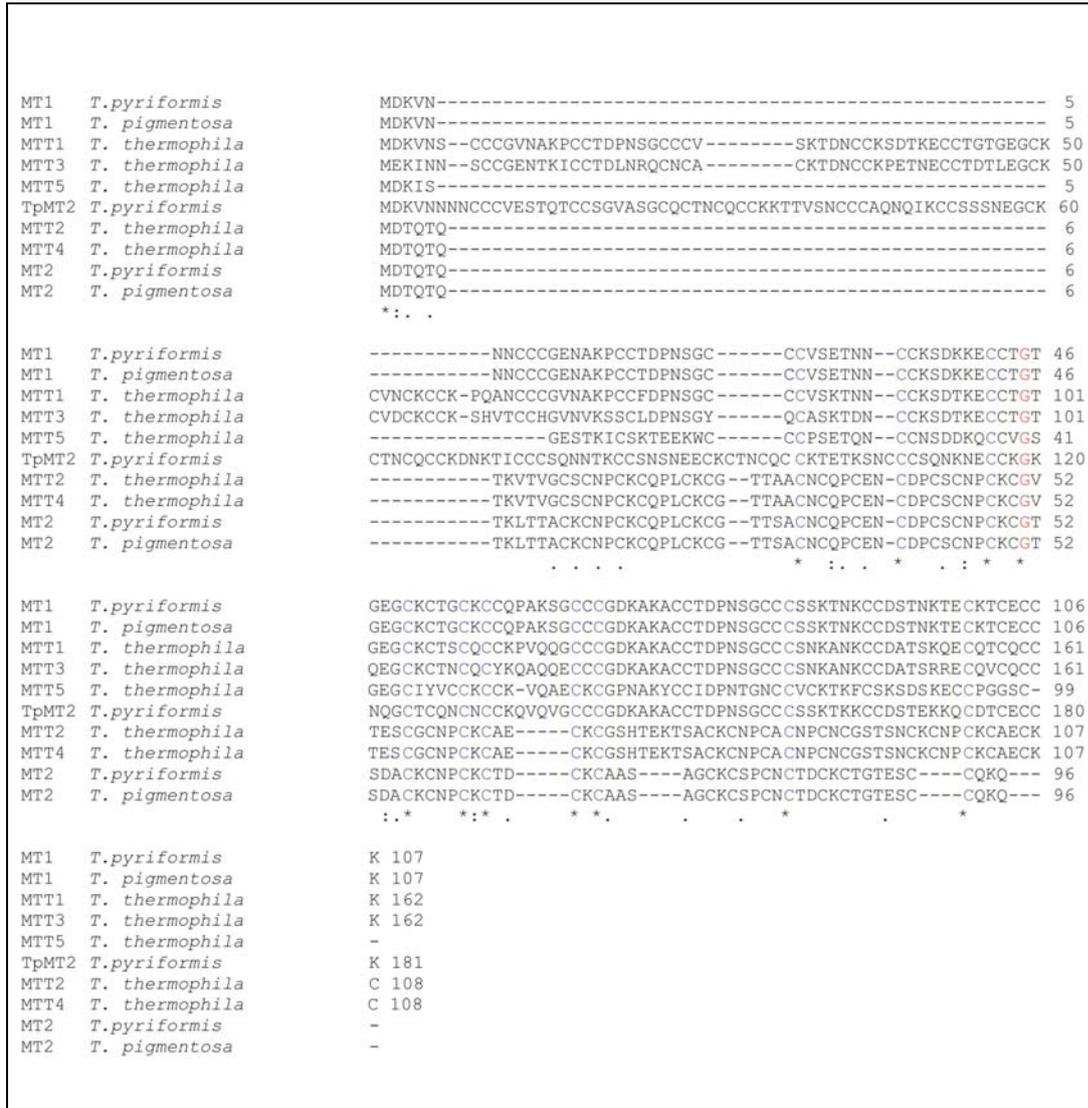
## **8.2 Analisi filogenetica**

Avendo implementato, con la caratterizzazione di MTT-5 di *T. thermophila* e di MT-2 di *T. pyriformis*, il numero di sequenze di MT nel genere *Tetrahymena*, sono state effettuate delle analisi filogenetiche, utilizzando inizialmente le sequenze amminoacidiche. In Tabella 8.1 sono elencate le 10 isoforme di MT identificate nel genere *Tetrahymena* e i rispettivi *accession number* scaricati dal NCBI GenBank database.

Specie	Isoforma	Accession number
<i>T. pyriformis</i>	MT-1	<a href="#">AJ005080</a>
<i>T. pyriformis</i>	MT-2	<a href="#">DQ518910</a>
<i>T. pyriformis</i>	TpMT-2	<a href="#">AY765220</a>
<i>T. pigmentosa</i>	MT-1	<a href="#">AF509328.</a>
<i>T. pigmentosa</i>	MT-2	<a href="#">AF479586</a>
<i>T. thermohila</i>	MTT-1	<a href="#">AY061892</a>
<i>T. thermohila</i>	MTT-2	<a href="#">AY350738</a>
<i>T. thermohila</i>	MTT-3	<a href="#">AF537326</a>
<i>T. thermohila</i>	MTT-4	<a href="#">AY660008</a>
<i>T. thermohila</i>	MTT-5	<a href="#">AY884209.</a>

**Tabella 8.1** Isoforme di MT identificate nel genere *Tetrahymena*.

Le sequenze amminoacidiche sono state allineate usando il programma Clustal W [141] per valutare il grado di conservazione di amminoacidi funzionalmente importanti. L'allineamento è stato poi utilizzato per inferire le relazioni filogenetiche. In generale si può notare un basso grado di conservazione delle sequenze amminoacidiche delle MT. In particolare sono conservati solo alcuni residui cisteinici e una glicina. Sono però generalmente conservati i caratteristici *patterns* di distribuzione delle cisterne, C-x-C e C-C (Fig. 8.1).



**Figura 8.1** Allineamento mediante CLUSTAL W delle sequenze amminoacidiche delle MT identificate in *Tetrahymena*. Residui amminoacidici (\*) identici, (.) molto simili, (: ) simili.

Sulla base del multi-allineamento delle sequenze amminoacidiche delle MT sono stati costruiti, tramite il programma MEGA 3.1, alcuni alberi filogenetici che differiscono tra loro per i metodi di costruzione. In particolare, sono stati utilizzati i metodi UPGMA, *neighbour-joining* (NJ), minima evoluzione (ME) e massima parsimonia (MP).

Le distanze tra le sequenze di MT calcolate con la correzione di Poisson sono indicate in Tabella 8.2.

Specie e isoforme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>T. pyriformis</i> MT-1		0.00	0.18	0.18	0.07	0.04	0.17	0.06	0.17	0.10
2 <i>T. pigmentosa</i> MT-1	0.00		0.18	0.18	0.07	0.04	0.17	0.06	0.17	0.10
3 <i>T. pigmentosa</i> MT-2	1.32	1.32		0.00	0.19	0.19	0.07	0.21	0.07	0.22
4 <i>T. pyriformis</i> MT-2	1.32	1.32	0.00		0.19	0.19	0.07	0.21	0.07	0.22
5 <i>T. pyriformis</i> TpMT-2	0.44	0.44	1.47	1.47		0.07	0.18	0.08	0.18	0.11
6 <i>T. thermophila</i> MTT-1	0.18	0.18	1.38	1.38	0.60		0.18	0.05	0.18	0.10
7 <i>T. thermophila</i> MTT-2	1.37	1.37	0.36	0.36	1.55	1.50		0.21	0.00	0.18
8 <i>T. thermophila</i> MTT-3	0.38	0.38	1.57	1.57	0.72	0.29	1.69		0.21	0.11
9 <i>T. thermophila</i> MTT-4	1.37	1.37	0.36	0.36	1.55	1.50	0.00	1.69		0.18
10 <i>T. thermophila</i> MTT-5	0.68	0.68	1.55	1.55	0.83	0.70	1.46	0.83	1.46	

**Tabella 8.2** Distanze calcolate mediante la correzione di Poisson tra le sequenze di MT (triangolo sotto) e errori standard (triangolo sopra).

L'analisi di *bootstrap* è stata effettuata su 5000 repliche. Consideriamo elevati i valori di *bootstrap* uguali o superiori al 70%.

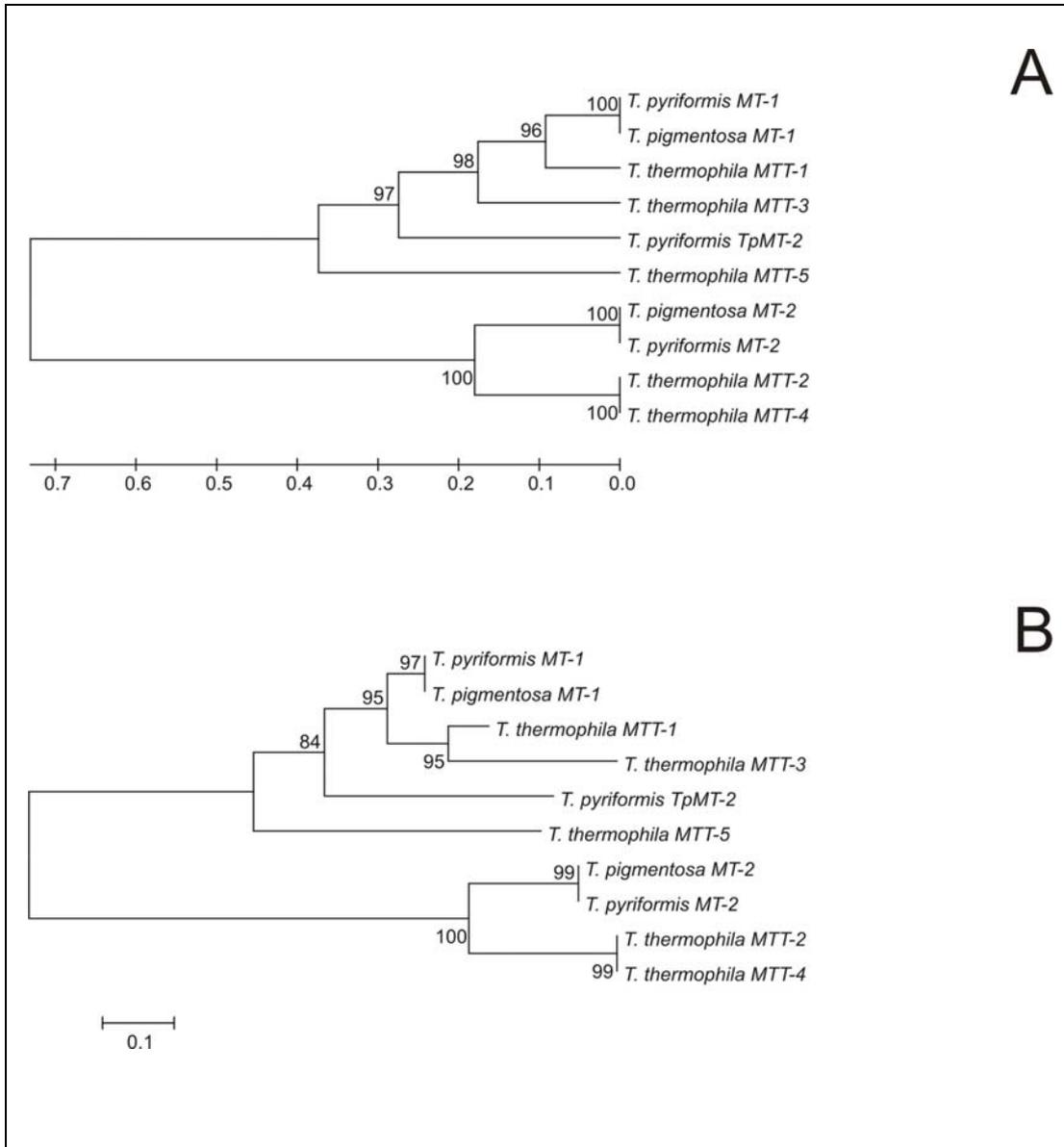
Le analisi effettuate con metodi diversi hanno portato a risultati molto simili e nonostante gli alberi filogenetici non siano sempre completamente risolti, alcuni *clusters* presentano valori di *bootstrap* elevati.

Appare evidente che MT indotte dal Cu (MT-2, MTT-2 e MTT-4) sono strettamente legate fra di loro e chiaramente separate dalle Cd-MT (Fig. 8.2 e Fig. 8.3). I nodi che indicano le relazioni fra questi due gruppi sono supportati da alti valori di *bootstrap* (99-100%) in tutti e quattro gli alberi. Il *cluster* delle Cu-MT è sempre risolto, favorendo una relazione di paralogia tra MTT-2 e MTT-4 in *T. thermophila*. Ciascuna di tali proteine risulta ortologa rispetto alle Cu-MT delle altre specie.

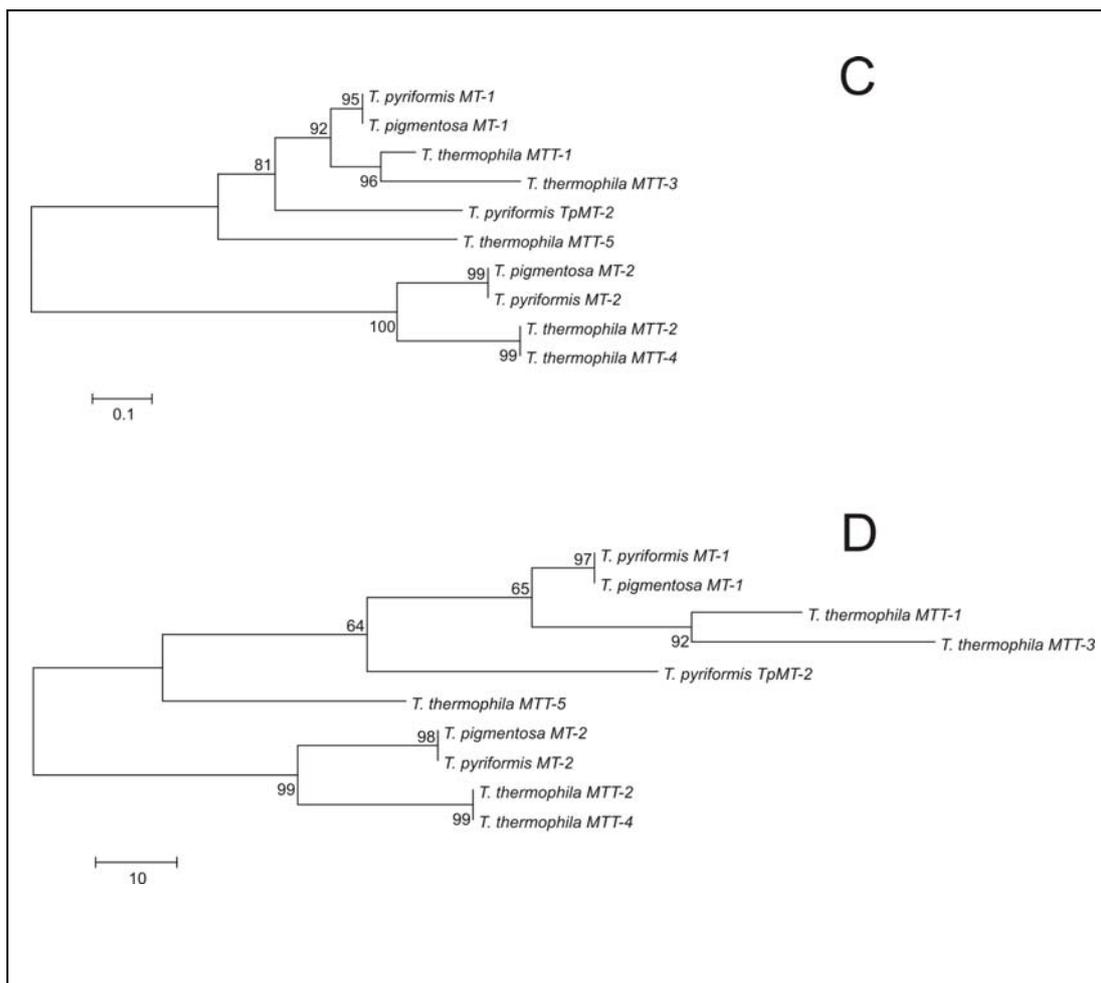
Il *cluster* delle Cd-MT è risolto negli alberi costruiti con i metodi NJ, ME e UPGMA, favorendo una relazione ortologa fra le MT-1 di *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* e l'MTT-1 di *T. thermophila* e una relazione paralogica tra MTT-1 e MTT-3 di *T. thermophila*.

MTT-5 di *T. thermophila* emerge per prima tra il gruppo delle Cd-MT con valori di *bootstrap* elevati (dall'81 al 97%) in tutti gli alberi, fatta eccezione per l'albero costruito con il metodo della massima parsimonia dove il nodo presenta

un valore di *bootstrap* del 64%. Le altre due Cd-MT di *T. thermophila* emergono insieme e più tardi. Anche in questo caso i valori di *bootstrap* sono elevati.



**Figura 8.2** Relazioni filogenetiche tra le MT di *Tetrahymena*. Gli alberi costruiti con i metodi A) UPGMA, B) NJ sono stati ottenuti con il programma MEGA 3.1.



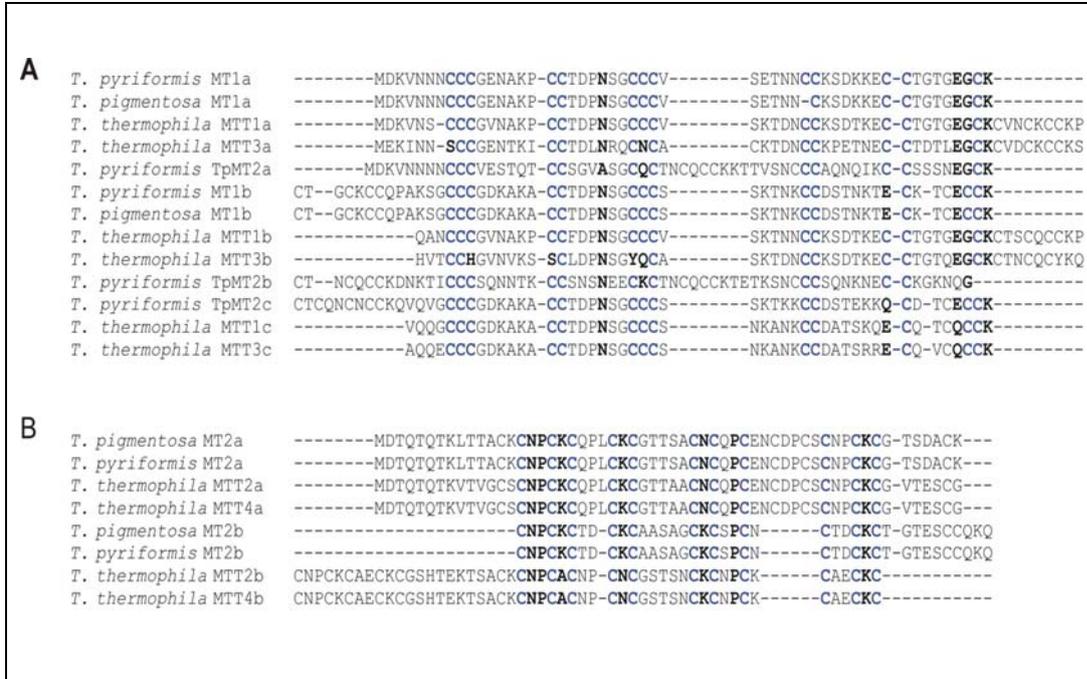
**Figura 8.3** Relazioni filogenetiche tra le MT di *Tetrahymena*. Gli alberi costruiti con i metodi C) ME e D) MP sono stati ottenuti con il programma MEGA 3.1.

Sulla base dei risultati ottenuti è stato quindi possibile formulare ipotesi sull'evoluzione molecolare delle MT in *Tetrahymena*.

In particolare, poiché la Cd-MT e le Cu-MT formano dei *clusters* nettamente separati è presumibile che un evento di duplicazione genica e di successiva differenziazione abbia dato origine a queste due sub-famiglie.

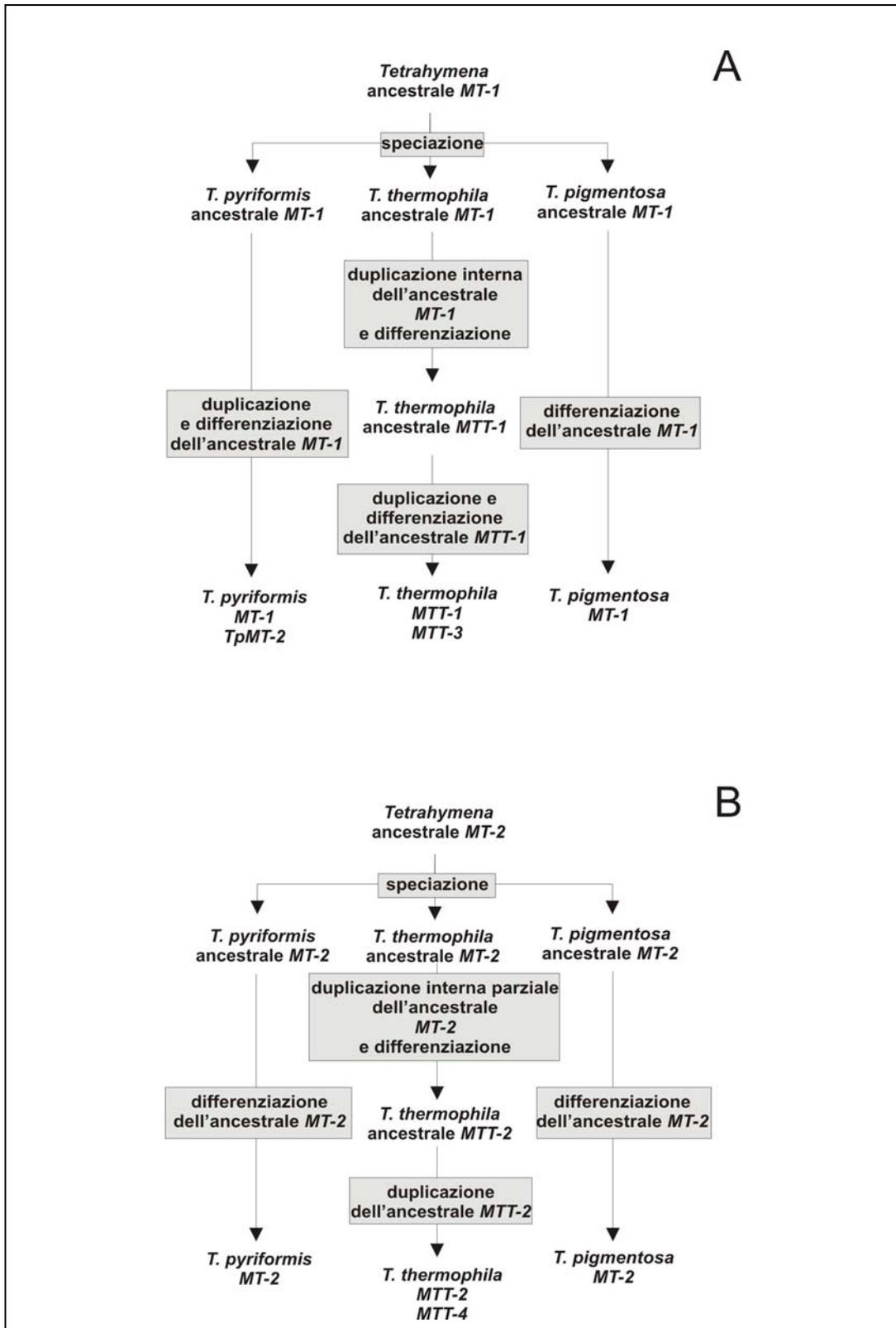
Dall'analisi delle similarità intracatena, effettuando allineamenti di differenti porzioni della sequenza amminoacidica, appare chiaro che le isoforme indotte dal Cd si sono evolute attraverso processi di duplicazione di un comune segmento ancestrale (Fig. 8.4). La stessa affermazione può essere valida anche per Cu-MT. Per quanto detto in precedenza si può ipotizzare che si siano verificati due eventi indipendenti di duplicazione per questi due gruppi di proteine. Questo processo evolutivo di duplicazione intragenica spiegherebbe anche l'inusuale dimensione

delle MT di *Tetrahymena*, le cui sequenze primarie sono le più lunghe tra tutte le MT studiate finora [85].



**Figura 8.4** Allineamento mediante CLUSTAL W delle differenti porzioni delle sequenze amminoacidiche delle Cd-MT (A) e delle Cu-MT (B) identificate in *Tetrahymena*.

In figura 8.5. è rappresentato un possibile scenario evolutivo per le MT indotte da Cd e per le MT indotte da Cu.



**Figura 8.5** Rappresentazione schematica delle ipotesi formulate sull'evoluzione molecolare delle MT in *Tetrahymena*.

Secondo questo scenario, l'isoforma MT-1 di *T. pigmentosa* sarebbe stata ereditata attraverso la differenziazione genica di un'isoforma ancestrale MT-1, mentre in *T. pyriformis*, dove vi è anche la presenza di TpMT-2, è presumibile che un evento di duplicazione genica e successiva differenziazione abbia portato alla comparsa di queste due Cd-MT (MT-1 e TpMT-2). La situazione appare più complessa in *T. thermophila*, dove un primo evento di duplicazione intragenica potrebbe aver dato origine all'ancestrale MTT-1 dal quale, in seguito ad un evento di duplicazione genica e successiva differenziazione, sono derivate le attuali isoforme MTT-1 e MTT-3. Inoltre poiché MTT-3 è presente solo in *T. thermophila* e TpMT-2 è presente solo in *T. pyriformis*, e poiché queste isoforme sono molto diverse, è presumibile che l'evento di duplicazione genica sia avvenuto dopo l'evento di speciazione.

Una situazione analoga si riscontra anche per le Cu-MT. In particolare si può ipotizzare che l'isoforma MT-2 di *T. pigmentosa* e di *T. pyriformis* sia stata ereditata attraverso la differenziazione genica dell'isoforma ancestrale MT-2. In *T. thermophila* un primo evento di duplicazione intragenica e differenziazione ha dato origine all'ancestrale MTT-2, il quale, in seguito ad un evento di duplicazione genica, ha portato alla comparsa di MTT-2 e MTT-4 in questa specie. E' importante sottolineare che, poiché le sequenze amminoacidiche di MTT-2 e MTT-4 presentano un'identità del 100%, è probabile che l'evento di duplicazione genica si sia verificato in tempi relativamente "recenti".

Si può inoltre ipotizzare che le Cu-MT e Cd-MT siano comparse precocemente, prima dell'evento di speciazione che ha separato il gruppo borealis, a cui appartengono *T. pyriformis* e *T. thermophila*, dal gruppo australis a cui appartiene *T. pigmentosa* [137]. Possiamo anche supporre che il tasso di mutazione per le MT di *Tetrahymena* sia eterogeneo, essendo più basso per MT-1 e MTT-1 e più elevato per altre isoforme.

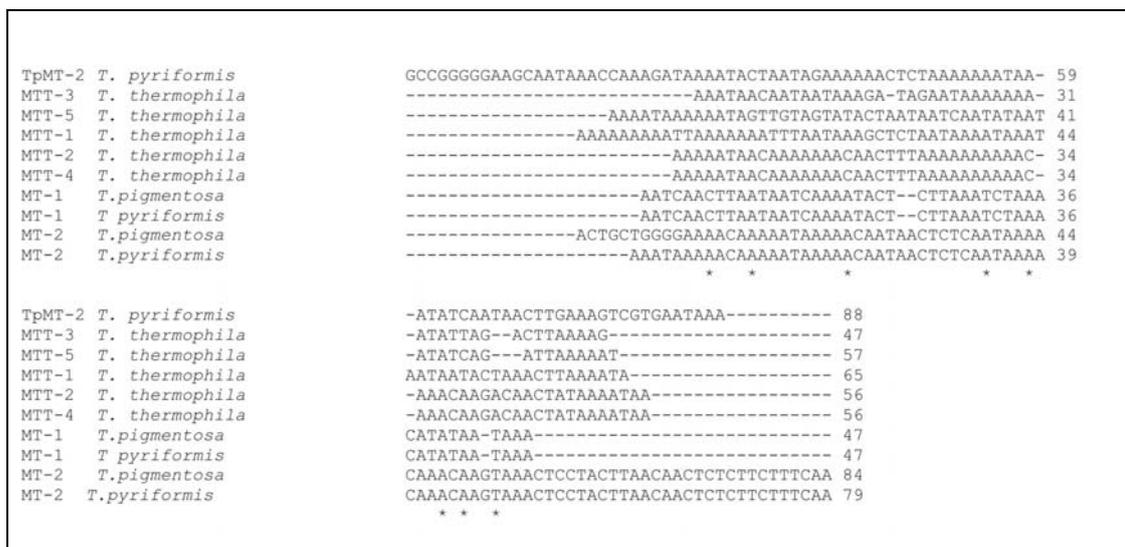
Poiché dall'analisi filogenetica sembra che MTT-5 abbia avuto una storia evolutiva indipendente dalle altre isoforme, confermata anche dal fatto che il gene si trova su un cromosoma diverso rispetto ai geni delle altre MT di *T. thermophila* [89], tale isoforma non è stata considerata nelle precedenti ipotesi.

Un fenomeno di convergenza funzionale potrebbe essere l'ipotesi evolutiva più probabile per questa isoforma.

Per ottenere informazioni filogenetiche più dettagliate, ho esteso l'analisi filogenetica anche alle regioni 5' e 3' terminali non tradotte del cDNA per tutte le isoforme identificate in *T. thermophila*. Infatti, la selezione naturale potrebbe aver agito diversamente sulle regioni non codificanti, a livello delle quali possono venire conservate mutazioni che, se comparissero nella codificante, potrebbero essere perse in quanto renderebbero la proteina non funzionale.

Prima di effettuare l'analisi filogenetica sulle sequenze 5' e 3' terminali non tradotte, si è proceduto alla caratterizzazione delle UTR non ancora identificate; in particolare sono state identificate le 5'UTR di MTT-1, MTT-3 e MTT-4 di *T. thermophila* e le 3'UTR di MTT-3 e MTT-4 mediante la tecnica RACE.

Per valutare il grado di identità che caratterizza le diverse isoforme a livello di 5'- e 3'-UTR, è stato effettuato un allineamento multiplo tra le sequenze disponibili mediante il programma Clustal W. Gli allineamenti sono mostrati nelle figure 8.6 e 8.7.



**Figura 8.6** Allineamento mediante CLUSTAL W delle sequenze 5'UTR delle MT identificate in *Tetrahymena*.

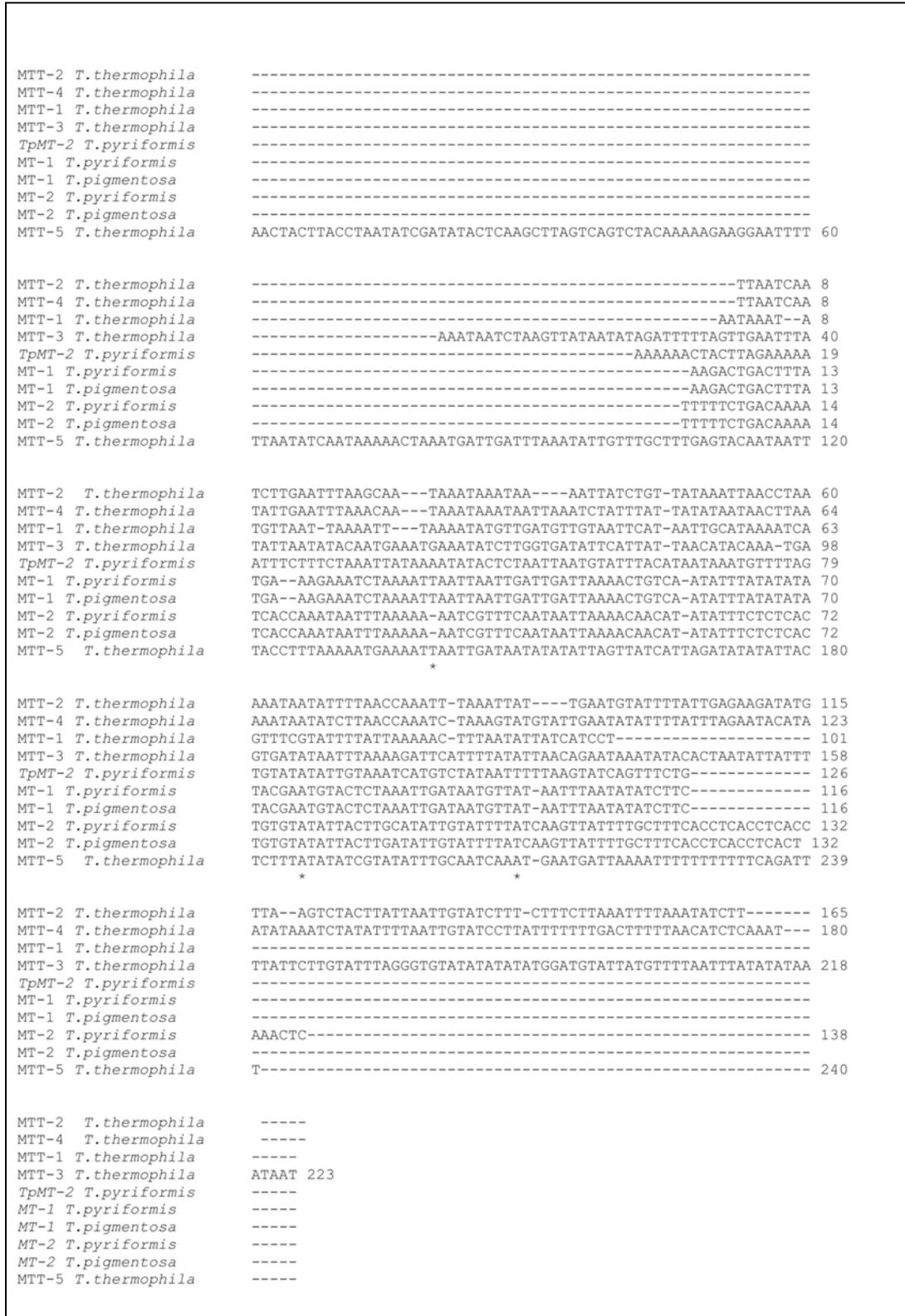
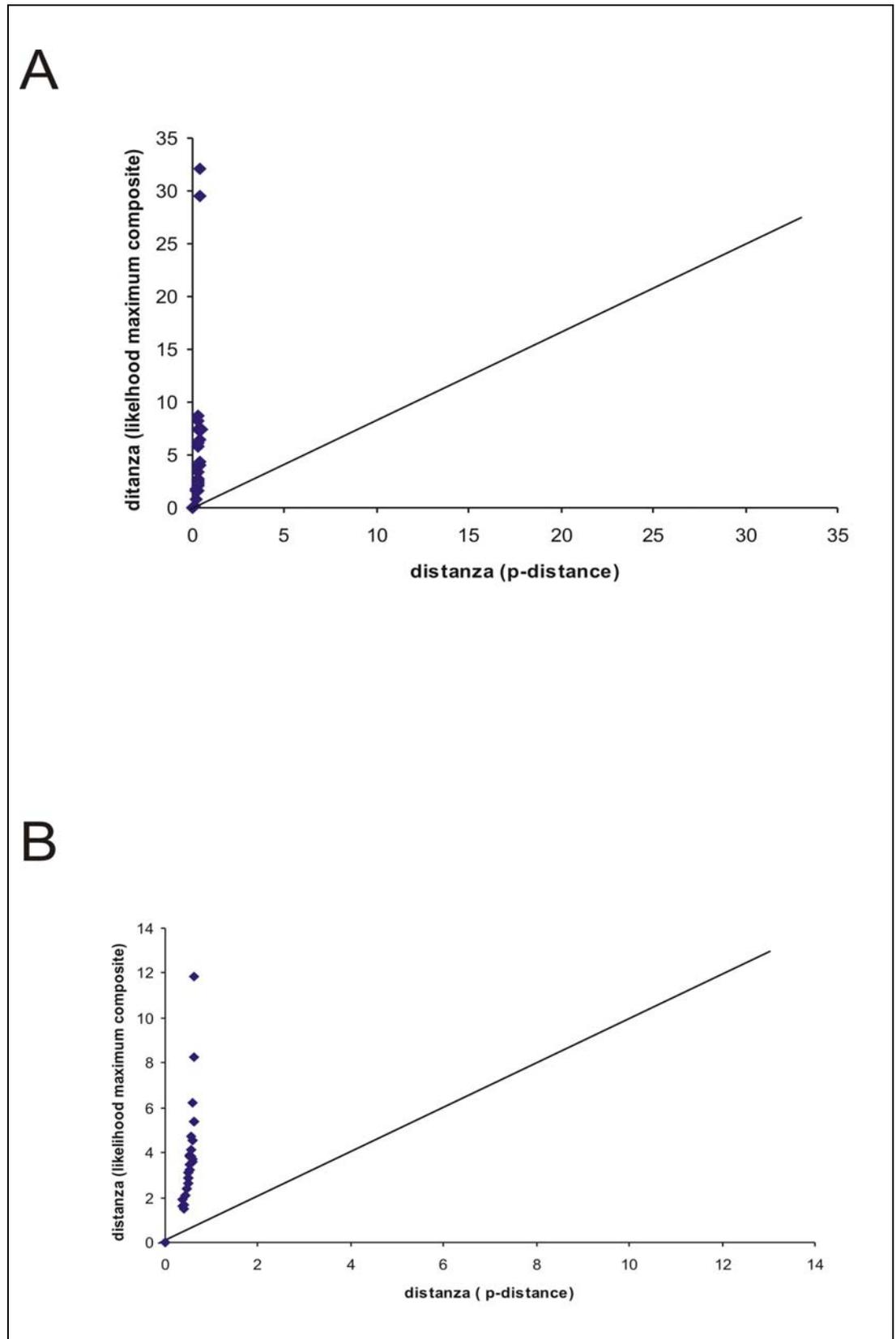


Figura 8.7 Allineamento mediante CLUSTAL W delle sequenze 3'UTR delle MT identificate in *Tetrahymena*

Gli allineamenti delle regioni 5' e 3'UTR dei geni delle MT di *T. thermophila* evidenziano un basso grado d'identità fra le varie isoforme. Inoltre dagli allineamenti appare evidente che le regioni non tradotte hanno lunghezza e sequenze diverse e sono tutte abbondanti in AT.

La costruzione di alberi filogenetici tramite il programma MEGA 3.1 è risultata inadeguata in quanto gli alberi erano del tutto irrisolti, con valori di *bootstrap* notevolmente al di sotto del 70%. A conferma di ciò, "plottando" su un piano cartesiano (Fig. 8.8) le distanze, per tutte le sequenze considerate, calcolate con il modello semplice *p-distance* e quelle calcolate con il modello complesso *likelihood maximum composite*, risulta evidente che sia nelle 5'UTR sia nelle 3'UTR non vi è erosione del segnale filogenetico. Infatti, appare evidente dalla figura 8.8 che i punti che corrispondono alle distanze calcolate con i due modelli sopracitati non si distribuiscono su una retta  $m=x$ . E' quindi plausibile affermare che queste regioni risultano essere poco informative per formulare ipotesi sull'evoluzione molecolare delle MT in *Tetrahymena*.



**Figura 8.8** Plot tra le distanze di tutte le 5'UTR (A) e le 3'UTR (B) di tutte le sequenze considerate nell'analisi calcolate con il modello più semplice (*p-distance*) e con il modello più complesso (*Likelihood maximum composite*).

## 9. CONCLUSIONI

Questa tesi contribuisce ad approfondire l'evoluzione sia molecolare che funzionale delle MT in *Tetrahymena*. In relazione ai diversi aspetti che ho affrontato, la mia attività ricerca ha permesso di mettere in luce le potenzialità di *Tetrahymena* quale organismo sperimentale modello e l'utilità delle MT in ambito ecotossicologico e biotecnologico.

In particolare, dagli studi d'espressione di MTT-2 e MTT-5 di *T. thermophila* in seguito a trattamento delle cellule con diversi metalli, è risultato che i livelli di messaggero di queste due isoforme potrebbero essere proposti rispettivamente come potenziali *biomarkers* dell'inquinamento da Cu e da Cd. Inoltre, dall'analisi della funzionalità del promotore MTT-5 nel regolare l'espressione della nrk2-GFP in seguito al trattamento con Cd, *Tetrahymena*, opportunamente ingegnerizzata, potrebbe essere un buon biosensore per la presenza dei metalli e costituire un potenziale sistema da impiegare in studi di ecotossicologia e di monitoraggio ambientale.

Lo studio della funzionalità del promotore di MTT-5 ha anche messo in evidenza che tale componente genica rappresenta un valido *tool* per l'espressione di proteine ricombinanti di interesse biotecnologico. In particolare questo promotore può essere proposto come sostituto del promotore di MTT-1 che è estensivamente utilizzato ma meno efficiente, nel regolare l'espressione di un antigene di superficie di *Ichthyophthirius multifiliis*, un protozoo ciliato parassita dei pesci d'acqua dolce. Tale antigene è un potenziale candidato per un vaccino contro la malattia "white spot" causata da tale parassita; il promotore di MTT-5 potrebbe quindi essere utilizzato per la produzione di un vaccino ricombinante a basso costo.

L'identificazione, nel promotore MTT-5, di una breve sequenza MRE di 15 pb compresa tra le -300 e le -290 pb a monte del sito di inizio della traduzione, responsabile dell'espressione genica Cd-indotta, rappresenta un passo importante per l'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione delle isoforme delle MT in *Tetrahymena*. Tale sequenza MRE differisce completamente dalle sequenze MRE identificate nei vertebrati, facendo presupporre che anche il

meccanismo molecolare che sta alla base della regolazione metallo-indotta delle MT in *Tetrahymena* sia completamente diverso da quello proposto per altri gruppi di organismi.

Inoltre, dall'analisi filogenetica condotta sia sulle sequenze amminoacidiche sia sulle sequenze nucleotidiche identificate finora nel genere *Tetrahymena* è possibile ipotizzare che il tasso di mutazione delle diverse isoforme sia eterogeneo, essendo più basso per le MT-1 e MTT-1 mentre più elevato per altre isoforme. Inoltre è apparso altresì evidente che MTT-5 sembra avere avuto una storia evolutiva indipendente dalle altre isoforme. Un fenomeno di convergenza funzionale potrebbe essere l'ipotesi evolutiva più probabile per questa isoforma.

I risultati ottenuti pertanto confermano la versatilità di *Tetrahymena* come organismo sperimentale da impiegare in numerosi ambiti e l'utilità del MT nella ricerca ecotossicologica e biotecnologica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] **Furgason W.H. (1940).** The significant cytosomal pattern of the “Glaucoma-Colpidium” group and a new proposed new genus and species, *Tetrahymena geleii*. *Arch Protistenkd*, 94: 224-266.
- [2] **Corliss J.O. (1952).** The autogamic cycle of *Tetrahymena rostrata*. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 235: 399-402.
- [3] **Nanney D.L., McCoy J.W. (1976).** Characterization of the species of the *Tetrahymena pyriformis* complex. *Trans Am Microsc Soc*, 95: 664-682.
- [4] **Gibbons I.R. (1963).** Studies on the Protein Components of Cilia from *Tetrahymena pyriformis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 50: 1002-1010.
- [5] **Blackburn E.H., Gall J.G. (1978).** A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, 120: 33-53.
- [6] **Greider C.W., Blackburn E.H. (1987).** The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 51: 887-898.
- [7] **Blackburn E.H. (1991).** Telomeres. *Trends Biochem Sci*, 16: 378-381.
- [8] **Zaug A.J., Cech T.R. (1986).** Self-splicing RNA and an RNA enzyme in *Tetrahymena*. *J Protozool*, 34: 416-417.
- [9] **Horowitz S., Gorovsky M.A. (1985).** An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 2452-2455.
- [10] **Brownell J.E., Zhou J.X., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondos D.G., Roth S.Y., Allis C.D. (1996).** *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 84: 843-851.
- [11] **Frankel J. (2000).** Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. *Method Cell Biol*, 62: 27-125.
- [12] **Margoshes M., Vallee B.L. (1957).** A cadmium protein from equine imaging hyperintensity in Alzheimer's disease: correlation with kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 79: 4813-4814.

- [13] **Kägi J.H.R., Valle B.L. (1960).** Metallothionein, a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, 235: 3460-3465.
- [14] **Kägi J.H.R. (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.
- [15] **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.
- [16] **Fowler B.A., Hildebrand C.E., 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.
- [17] **Kägi J.H.R. (1991).** Overview of metallothionein. *Methods Enzymol*, 205: 613-626.
- [18] **Hamer D.H. (1986).** Metallothionein. *Ann Rev Biochem*, 55: 913-951.
- [19] **Kille P., Hemmings A., Lunney E.A. (1994).** Memories of metallothionein. *Biochim Biophys Acta*, 1205: 151-161.
- [20] **Culotta V.C., Howard W.R., Liu X.F. (1994).** CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269: 26295-2630.
- [21] **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.
- [22] **Lerch K. (1980).** Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature*, 284: 368-370.
- [23] **Binz P.A., Kägi J.H.R. (1999).** Metallothioneins: molecular evolution and classification. In Klaasen CD (ed) Metallothionein IV. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 7-13.
- [24] **Kägi J.H.R., Kojima Y. (1987).** Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia*, 52: 25-61.
- [25] **Roesijadi G. (1992).** Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol*, 22: 81-114.

- [26] **Mididotti S., McGuirt J.P., Sens M.A., Todd J.H., Sens D.A. (1996).** Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney. *Toxicol Lett*, 85: 17-27.
- [27] **Miles A.T., Hawksworth G.M., Beattie J.H., Rodilla V. (2000).** Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35: 35-70.
- [28] **Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C., Froelik G.J., Kelly E.J., Zambrowicz B.P., Palmiter R.D. (1994).** Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochem*, 33: 7250-7259.
- [29] **Zheng H., Berman N.E., Klaassen C.D. (1995).** Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem. Int.*, 27: 43-58.
- [30] **Hidalgo J., Aschner M., Zatta P., Vâsàk M. (2001).** Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*, 55: 133-45.
- [31] **Barsyte D., White K.N., Lovejoy D.A. (1999).** Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. *Comp Biochem Physiol*, 122C: 287-296.
- [32] **Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kägi J.H.R. (1997).** Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature*, 388: 237-238.
- [33] **Syring R.A., Brouwer T.H., 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.
- [34] **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.
- [35] **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.

- [36] Freedman J.H., Slice L.W., Dixon D., Fire A., Rubin C.S. (1993). The novel metallothionein genes of *Caenorabdtis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. *J Biol Chem*, 268: 2554-2564.
- [37] Stürzenbaum S.R., Kille P., Morgan A.J. (1998.) The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett*, 431: 437-442.
- [38] Borrelly G.P., Harrison M.D., Robinson A.K., Cox S.G., Robinson N.J., Whitehall S.K. (2002). Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, 277: 30394-30400.
- [39] Münger K., German U.A., Lerch K. (1987). The *Neurospora crassa* metallothionein gene. Regulation of expression and chromosomal location. *J Biol Chem*, 25: 7363-7367.
- [40] Winge D.R. (1998). Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 58: 165-195.
- [41] Mehra R.K., Gaery J.R., Butt T.R., Gray W.R., Winge D.R. (1989). *Candida glabrata* metallothioneins. Cloning and sequence of the genes and characterization of proteins. *J Biol Chem*, 264: 19747-19753.
- [42] Murphy A., Zhou J., Goldsbrough B.P., Taiz L. (1997). Purification and immunological identification of metallothionein 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 113: 1293-1301.
- [43] 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.
- [44] Murphy A., Taiz L. (1997). Correlation between long term K<sup>+</sup> leakage and copper tolerance in ten *Arabidopsis* ecotypes. *New Phytol*, 136: 211-222.
- [45] Blindauer C., Harrison M.D, Robinson A.K., Parkinson J.A., Bowness P.W., Sadler P.J., Robinson N.J. (2002). Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc finger. *Molec Micro*, 45: 1421-1432.
- [46] Karin M. (1985). Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell*, 41: 9-10.
- [47] Kägi J.H.R., Schäffer A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27: 8509-8515.

- [48] **Albergoni V., Piccinni E. (1998).** Copper and zinc metallothioneins. In : “*Copper and zinc in inflammatory and degenerative diseases*”, (ed. Rainsford K.D., Milanino R., Soreson J.R.J., Velo G.P.), Kluwer Academic Publishers, London, 61-78.
- [49] **Palmiter R.D. (1998).** The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 8428-8430.
- [50] **Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. (2002).** Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59: 627-647.
- [51] **Cherian M. G. (1994).** The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ. Health. Persp.*, 102: 131-135.
- [52] **Kägi J.H.R., Kojima Y., Kissling M.M., Leach K. (1980).** Metallothionein: an exceptional metal thiolate protein. *Excerpta Medica*, 72: 223-237.
- [53] **Formigari A., Santon A., Irato P. (2007).** Efficacy of Zn treatment against iron-induced toxicity in rat hepatoma cell line H4-II-E-C3. *Liver International*, 27(1):120-7.
- [54] **Thornalley P.J., Vàsàk 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.
- [55] **Cousins R.J. (1994).** Metal elements and gene expression. *Ann Rev Nutr*, 14: 449-469.
- [56] **Andrews G.K. (1990).** Regulation of metallothionein expression. *Prog Food Nutr Sci*, 14: 193-258.
- [57] **Samson S.L., Gedamu L. (1998).** Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 59:257-288.
- [58] **Klaassen C.D., Liu J.E. Choudhuri S. (1999).** Metallothionein: an intracellular protein against cadmium toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 267-294.
- [59] **Ghoshal K., Jacob S.T. (2001).** Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, 66: 357-84.

- [60] 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.
- [61] Smirnova I.V., Bittel D.C., Ravindra R., Jiang H., Andrews G.K. (2000). Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem*, 275: 9377-9384.
- [62] Saydam N., Adams T.K., Steiner F., Schaffner W., Freedman J.H. (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.
- [63] Palmiter R.D. (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.
- [64] Roesijadi G. (1996). Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp Biochem Physiol.*, 113C: 117-123.
- [65] Bittel D., Dalton T., Samson S.L., Gedamu L., Andrews G.K. (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.
- [66] Haq F., Mahoney M., Koropatnick (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research*, 533:211-226.
- [67] Gorovsky M.A., Yao M.C., Keevert J.B., Pleger G.L (1975). Isolation of micro- and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Methods Cell Biol*, 9: 311-327.
- [68] Cassidy-Hanley D., Bowen J., Lee J.H., Cole E., VerPlank L.A., Gaertig J., Gorovsky M.A., Bruns P.J. (1997). Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. *Genetics*, 146: 135-147.
- [69] De Gabrieli R., Piccinni E. (1995). Copper thionein in *Tetrahymena pigmentosa*. *J Eukariot Microbiol*, 42: 21-A.
- [70] Boldrin F., Santovito G., Irato P., Piccinni E. (2002). Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist*, 153: 283-291.

- [71] **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- [72] **Gaertig J., Thatcher T.H., Gu L., Gorovsky M.A. (1994).** Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable beta-tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4549-4553.
- [73] **Tang X., Nakata Y., Li H.O., 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.
- [74] **Pfaffl M.W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29: 2002-2007.
- [75] **Shang Y., Song X., Bowen J., Corstanje R., Gao Y., Gaertig J., Gorovsky M.A. (2002).** A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 3734-3739.
- [76] **Chen G., Courey A.J. (1999).** Generation of epitope-tagged proteins by inverse PCR mutagenesis. *Biotechniques*, 26:814-816.
- [77] **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (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.
- [78] **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).
- [79] **Sneath P.H.A., Sokal R.R. (1973).** *Numerical Taxonomy*, W.H. Freeman, San Francisco.
- [80] **Saitou N., Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425.
- [81] **Rzhetsky A., Nei M. (1992).** A simple method for estimating and testing minimum- evolution trees. *Mol Biol Evol*, 9:945-967.
- [82] **Fitch W.M. (1971)-** Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Sys Zool*, 20: 406-416.

- [83] **Piccinni E., Bertaggia D., Santovito G., Miceli C., Kraev A. (1999).** Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. *Gene*, 234: 51-59.
- [84] **Santovito G., Irato P., Palermo S., Boldrin F., Sack R., Hunziker P., Piccinni E. (2001).** Identification, cloning and characterisation of a novel copper-metallothionein in *Tetrahymena pigmentosa*. Sequencing of cDNA and expression. *Protist*, 152: 219-229.
- [85] **Boldrin F., Santovito G., Negrisolo E., Piccinni E. (2003).** Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *Tetrahymena pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. *Protist*, 154: 431-442.
- [86] **Santovito G., Irato P., Piccinni E. (2000).** Regulation of metallothionein in *Tetrahymena*: induction of MT-mRNA and protein by cadmium exposure. *Eur J Protistol*, 36: 437-442.
- [87] **Fu C., Miao W. (2006)** Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist*, 157: 193-203.
- [88] **Dondero F., Cavaletto M., Grezzi A.R., La Terza A., Banni M., Viarengo A. (2004).** Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, 155:157-168.
- [89] **Diaz S., Amaro F., Rico D., Campos V., Benitez L., Martin-Gonzales A., Hamilton E.P., Orias E., Gutierrez J.C. (2007).** *Tetrahymena* Metallothioneins Fall into Two Discrete Subfamilies. *PLoS ONE*, 2: e291.
- [90] **Boldrin F., Santovito G., Formigari A., Bisharyan Y., Cassidy-Hanley D., Clark T.G., Piccinni E. (2007).** *MTT2*, a copper-inducible metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila*. *Comp Biochem Phys C*, In press
- [91] **Wuitschick J.D., Karrer K.M. (1999).** Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol*, 46: 239-247
- [92] **Schmidt H.J. (1996).** Molecular Biology of Ciliates. In Hausmann K, Bradbury PC (eds) Ciliates: cells as organisms. Gustav Fischer, pp 325-353.
- [93] **Helftenbein E. (1985).** Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for alpha-tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. *Special*

codon usage: TAA is not a translation termination codon. *Nucleic Acids Res*, 13: 415-433.

[94] Herrick G., Hunter D., Williams K., Kotter K. (1987). Alternative processing during development of a macronuclear chromosome family in *Oxytricha fallax*. *Genes Dev*, 1: 1047-1058.

[95] Preer J.R. Jr, Preer L.B., Rudman B.M., Barnett A.J. (1985). Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. *Nature*, 314: 188-190.

[96] Caron F., Meyer E. (1985). Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus? *Nature*, 314: 185-188.

[97] Meyer F., Schmidt H.J., Plumper E., Hasilik A., Mersmann G., Meyer H.E., Engstrom A., Heckmann K. (1991). UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 3758-3761.

[98] Liang A., Heckmann K. (1993) The macronuclear gamma-tubulin-encoding gene of *Euplotes octocarinatus* contains two introns and an in-frame TGA. *Gene*, 136: 319-322.

[99] Brunk C.F., Sadler L.A. (1990). Characterization of the promoter region of *Tetrahymena* genes. *Nucleic Acids Res*, 18: 323-329.

[100] Kozak M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J*, 16: 2482-2492.

[101] Baim S.B., Sherman F. (1988). mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 8: 1591-1601.

[102] Jacobson A., Peltz S.W. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 65: 693-739.

[103] Neves A.M., Barahona I., Galego L., Rodrigues-Pousada C. (1988). Ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis* and their expression during heat shock. *Gene*, 73: 87-96.

[104] Barahona I., Soares H., Cyrne L., Penque D., Denoulet P., Rodrigues-Pousada C. (1988). Sequence of one  $\alpha$ - and two  $\beta$ -tubulin genes of *Tetrahymena pyriformis*. Structural and functional relationships with other eukaryotic tubulin genes. *J Mol Biol*, 202: 365-382.

- [105] **Brimmer A., Weber K. (2000).** The cDNA sequences of three tetrins, the structural proteins of the *Tetrahymena* oral filaments, show that they are novel cytoskeletal proteins. *Protist*, 151: 171-180.
- [106] **Mochizuki K., Fine N.A., Fujisawa T., Gorovsky M.A. (2002).** Analysis of a iwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell*, 110: 689-699.
- [107] **Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. (1991).** The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7: 337-347.
- [108] **Leignel V., Hardivillier Y., Laulier M. (2005).** Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal mussels. *Mar Biotechnol*, 7(3): 236-44.
- [109] **Miceli C., La Terza A., Bradshaw R.A., Luporini P. (1992).** Identification and structural characterization of a cDNA clone encoding a membrane-bound form of the polypeptide pheromone Er-1 in the ciliate protozoan *Euplotes raikovi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:1988-1992.
- [110] **Luporini P., Alimenti C., Ortenzi C., Vallesi A. (2005).** Ciliate Mating Types and their Specific Protein Pheromones. *Acta Protozool*, 44: 89-101.
- [111] **Santovito G., Formigari A, Boldrin F., Piccinni E. (2007).** Molecular and functional evolution of *Tetrahymena* metallothioneins: New insights into the gene family of *Tetrahymena thermophila*. *Comp Biochem Physiol C*, 144: 391-7.
- [112] **Knapen D., Reynders H., Bervoets L., Verheyen E., Blust R. (2007).** Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. *Aquat Toxicol*, 82(3): 163-172.
- [113] **Kock K. H., Everson I. (1998).** Age, growth and maximum size of Antarctic notothenioid fish - revisited - in "Fish Of Antarctica, A Biological Overview", Di Prisco G., Pisano E., Clarke A. Eds. *Springer-Verlag Italia*.
- [114] **Linde A.R., Sánchez-Galàn S., Vallès-Mota P., García-Vásquez E. (2001).** Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotox Environ Saf*, 49: 60-63.
- [115] **Cosson R.P., Amiard J.C. (2000).** Use of metallothioneins as *biomarkers* of exposure to metals. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F., Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. Science Publishers Inc., 79-111.

- [116] **Roberts A.P., Oris J.T., Burton G.A.Jr, Clements W.H. (2005).** Gene expression in caged fish as a first-tier method for exposure assessment. *Environ Toxicol Chem*, 24: 3092-3098.
- [117] **Tom M., Chen N., Segev M., Herut B., Rinkevich B. (2004).** Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilisation as an environmental biomarker. *Mar Pollut Bull*, 48: 705-710.
- [118] **George S., Gubbins M., MacIntosh A., Reynolds W., Sabine V., Scott A., Thain J. (2004).** A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution. *Mar Environ Res*, 58: 571-575.
- [119] **Irato P., Piccinni E., James P., Ammermann D. (1995).** Evidence of a cadmium-thionein and the glycine cleavage system in *Oxytricha granulifera*. *J. Euk Microbiol*, 42 : 376-378.
- [120] **Piccinni E., Irato P., Guidolin L. (1990).** Cadmium-thionein in *Tetrahymena thermophila* and *Tetrahymena pyriformis*. *Eur J Protistol*, 26: 176-181.
- [121] **Boldrin F., Santovito G., Gaertig J., Wloga D., Cassidy-Hanley D., Clark T.G., Piccinni E. (2006).** Metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila* with a copper-inducible-repressible promoter. *Eukaryotic Cell*, 5: 422-425.
- [122] **Peña M.A., Koch K.A., Thiele D.J. (1998) .** Dynamic regulation of copper uptake and detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 18: 2514-2523.
- [123] **Soazig L., Marc L. (2003).** Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar Pollut Bull*, 46:1450-1455.
- [124] **Tanaka K., Nigg E.A. (1999).** Cloning and characterization of the murine Nek3 protein, a novel member of the NIMA family of putative cell cycle regulators. *J Biol Chem*, 274: 13491-13497.
- [125] **Osmani A.H., O'Donnell K., Pu R.T., Osmani S.A. (1991).** Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the bimE checkpoint. *EMBO J*,10: 2669-2679.

- [126] **Osmani S.A., Ye S.X. (1996).** Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem J*, 317: 633-641.
- [127] **Gaertig J, Gao Y, Tishgarten T, Clark TG, Dickerson HW (1999).** Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nat Biotechnol*, 17: 462-465.
- [128] **Peterson D.S., Gao Y., Asokan K., Gaertig J. (2002).** The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Mol Biochem Parasitol*, 122:119-26.
- [129] **Tondravi M.M., Yao M.C. (1986).** Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4369-4373.
- [130] **Gaertig J., Thatcher T.H., Gu L., Gorovsky M.A. (1994).** Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable beta-tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4549-4553.
- [131] **Barchetta S., La Terza A., Ballarini P., Pucciarelli S., Miceli C. (2007).** A combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation. *Eukaryot Cell*. In press
- [132] **Matthews R.A. (1994).** *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876: Infection and protective responses within the fish host. In *Parasitic Diseases of Fish* Edited by A.W. Pike & J. W. Lewis. Samara Publishing, Dyfed, U.K. pp. 17-42.
- [133] **Clark T.G., Dickerson H.W. (1997).** Antibody-mediated effects on parasite behavior: evidence of a novel mechanism of immunity against a parasitic protist. *Parasitology Today*, 13: 477-480.
- [134] **Vasconcelos M.H., Tam S.C., Beattie J.H., Hesketh J.E. (1996).** Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms. *Biochem J*, 315: 665-671.
- [135] **Wu A., Wemmie J.A., Edgington N.P., Goebel M., Guevara J.L., Moye-Rowley W.S. (1993).** Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem*, 268:18850–18858.

- [136] Moilanen L.H., Tetsunari F., Freedman J.H. (1999). Regulation of Metallothionein Gene Transcription. *J Biol Chem*, 274: 29655-29665.
- [137] Srüder-Kypke M.C., Wright A.-D.G., Jerome C.A., Lynn D.H. (2001). Parallel evolution of histophagy in ciliates of the genus *Tetrahymena*. *BMC Evol Biol*, 1:5.
- [138] Morin G.B., Cech T.R. (1988). Phylogenetic relationships and altered genome structures among *Tetrahymena* mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res*, 16: 327-346.
- [139] Sadler L.A., Brunk C.F. (1992). Phylogenetic relationships and unusual diversity in histone H4 proteins within the *Tetrahymena pyriformis* complex. *Mol Biol Evol*, 9(1): 70-84.
- [140] Ye A.J., Romero D.P. (2002). Phylogenetic relationships amongst tetrahymenine ciliates inferred by a comparison of telomerase RNAs. *Int J System Evol Microbiol*, 52: 2297-2302.
- [141] Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1997). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680.



## *Ringraziamenti*

Ringrazio la mia tutor, la **prof.ssa Ester Piccinni**; il **Dr Gianfranco Santovito**, come sempre, per il suo prezioso supporto e incoraggiamento durante la progettazione della sperimentazione; la **Dr Paola Irato**, il **Dr Francesco Boldrin**, e il **Sig. Franco Cattalini** per la collaborazione; il **Dr Theodore Clark** e la **Dr Donna Cassidy Hanley** per l'ospitalità nel loro laboratorio alla Cornell University e per la loro collaborazione; il **prof. Gerolamo Lanfranchi** per la costante revisione critica dei risultati; il **Dr Enrico Negrisolo** per il supporto nell'elaborazione dell'analisi filogenetica; la **Dr Barbara Celegato** per il supporto nell'esecuzione degli esperimenti di *Real-time* PCR.

Questa tesi è anche frutto del sostegno affettuoso, della bontà d'animo e della professionalità del **Dr Alessandro Santon** che ha seguito passo a passo il mio approccio alla ricerca trasmettendomi l'interesse e l'entusiasmo, fornendomi preziosi consigli e sostenendomi nelle mie piccole crisi di sfiducia. Lo ringrazio di cuore.