

Università di Pisa



## Scuola di Dottorato di Ricerca in Biologia

DOTTORATO IN BIOLOGIA EVOLUTIVA, XX CICLO  
(CURRICULUM PROTISTOLOGIA)

*TESI*

**Invecchiamento cellulare e riparazione del danno ossidativo nel ciliato *Euplotes raikovi*: caratterizzazione dei geni specifici per le metionina-solfossido reduttasi**

**Candidata:**

**Nicoleta Dobri**

**Docenti guida:**

**Pierangelo Luporini**

**Adriana Vallesi**

**2005- 2008**

## INDICE

<b>SUMMARY</b>	<b>pag3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	
1.1. Aspetti generali	pag4
1.2. Riparazione enzimatica delle metionine ossidate mediante le metionina solfossido reduttasi	pag6
1.3. Conoscenze di base e finalità della ricerca	pag9
<b>2. PROCEDURE SPERIMENTALI</b>	
2.1. Colture cellulari	pag14
2.2. Purificazione di DNA e RNA	pag14
2.3. Condizioni standard di PCR	pag15
2.4. Amplificazione mediante primer degenerati	pag15
2.5. "RATE-PCR"	pag16
2.6. "RT-PCR"	pag16
2.7. "3'RACE-PCR"	pag17
2.8. Clonaggio e sequenziamento	pag18
2.9. Sonde di DNA e ibridazione in Southern e Northern blot	pag18
2.10. Estratti cellulari e analisi in Western blot	pag19
<b>3. RISULTATI</b>	
3.1. Problemi sperimentali incontrati	pag21
3.2. Identificazione e caratterizzazione strutturale del gene <i>Er-msrB</i>	pag22
3.3. Identificazione dei geni <i>Er-msrA</i>	pag26
3.4. Caratterizzazione parziale del gene <i>Er-msrA1</i>	pag27
3.5. Caratterizzazione parziale di tre distinte isoforme del gene <i>Er-msrA2</i>	pag28
3.6. Identificazione del gene <i>Er-msrA/B</i> , ambivalente per la sintesi di Msr di tipo A e di tipo B	pag30
3.7. Espressione dei geni <i>Er-msrA</i> e <i>Er-msrB</i>	pag32

3.8. Analisi in Northern blot dell'attività del gene <i>Er-msrB</i>	pag33
3.9. Analisi in Western blot dell'attività dei geni <i>Er-msrA</i>	pag35
<b>4. DISCUSSIONE</b>	
4.1. Caratteristiche e correlazione filogenetiche della proteina Er-MsrB1	pag38
4.2. Caratteristiche e correlazione filogenetiche della proteina Er-MsrB2	pag42
4.3. Caratteristiche e correlazione filogenetiche della proteina Er-MsrA3	pag46
4.4. Aspetti strutturali della proteina Er-MsrA1	pag50
4.5. Aspetti strutturali delle tre isoforme della proteina Er-MsrA2	pag50
4.6. Espressione dei geni <i>Er-msr</i>	pag51
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	pag53
<b>6. RINGRAZIAMENTI</b>	pag63

## SUMMARY

Ciliated protozoa represent excellent material to explore the biology of ageing and rejuvenation, since they are both "complex" organisms and "simple" cells directly exposed at the environment and natural selection. Using *Euplotes raikovi* (a protistan whose life cycle is well characterized), I investigated the molecular resources that enable cells to repair oxidative damage of their vital macromolecules. A complex of six distinct genes that encode two forms, A and B, of methionine sulphoxide reductase (Msr, the enzyme that reduces a residue of methionine sulphoxide to methionine) was identified. The complete structure of two of these genes (designated *Er-msrB* and *Er-msrA/B*) was determined including both coding and non-coding regions; the structural analysis of the other four genes (*Er-msrA1*, *Er-msrA2-A*, *Er-msrA2-B*, e *Er-msrA2-C*) was incomplete. *Er-msrB2* (specified by one of the two open reading frames of the *Er-msrA/B* gene), *Er-msrB*, and *Er-msrA1* are closely related to Msr's of other protozoa. In contrast, *Er-msrA3* (specified by the second open reading frame of the *Er-msrA/B* gene) and *Er-MsrA2* are phylogenetically related to Msr's of prokaryotic origin. A further divergence between the *Er-msr* genes was detected at the functional level. Transcription of the *Er-msrB* gene is apparently not induced by oxidative stress, whereas transcription of the genes encoding the Msr A forms is specifically enhanced in cells subjected to oxidative stress.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.2. Aspetti generali

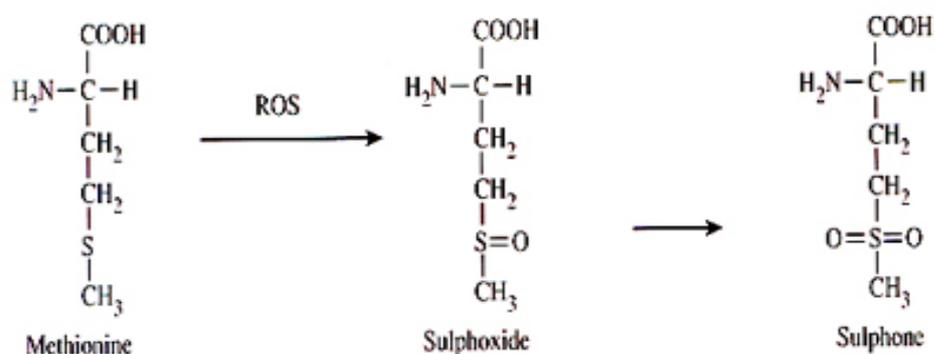
L'invecchiamento, o senescenza, cellulare è un fenomeno biologico universale cui ogni cellula va incontro con l'aumentare dell'età, scandita (e misurata), non tanto dal tempo reale, quanto dal numero di divisioni (mitosi) che ne hanno determinato l'esistenza. La cellula senescente perde progressivamente la capacità di rispondere agli stimoli mitogenetici di fattori di crescita e citochine, per cui cessa di proliferare e differenziarsi fino ad arrestare irreversibilmente le sue funzioni fisiologiche e i suoi processi metabolici (Sherr & DePinho, 2000). Sebbene l'invecchiamento cellulare sia stato studiato soprattutto negli animali, e nell'uomo in particolare per le sue correlazioni di causa-effetto con la trasformazione neoplastica, ogni organismo vivente, a partire dai batteri, ne è interessato (Nystrom, 2002; Guarente & Kenyon, 2000).

Tra le cause che determinano l'innescarsi dei processi degenerativi dell'invecchiamento, le maggiori vengono comunemente identificate con una progressiva incapacità delle cellule a riparare i danni a carico del DNA, l'accorciamento e l'alterazione strutturale dei telomeri e lo stress ossidativo (Johnson et al., 1999; Stadtman, 1992; Sohal & Weindruch, 1996; Yan et al., 1997; Stadtman & Levine, 2000). Per quanto riguarda quest'ultima causa (che è di più diretto interesse in questo contesto), ogni organismo, invecchiando, si arricchisce di forme biologicamente inattive, o meno attive, di proteine modificate per effetto delle cosiddette specie reattive dell'ossigeno (o semplicemente "ROS", da Reactive Oxygen Specis), quali l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), il radicale idrossilico ( $OH^{\cdot}$ ), l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ) e il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), tutte prodotte da ogni cellula anche in condizioni fisiologiche normali (Oliver et al., 1990; Vogt, 1995; Levine & Stadtman, 1996; Chao et al., 1997; Yan et al., 1997; Stadtman & Levine, 2000). Le proteine modificate tendono ad accumularsi sia dentro la cellula, sia fuori, e questo accumulo implica una diminuita

efficienza delle difese antiossidative e una ridotta funzionalità dei sistemi deputati alla riparazione e/o eliminazione delle molecole danneggiate (Sohal & Weindruch, 1996; Moskovitz et al., 1996).

Gli enzimi ad azione antiossidante rivestono, infatti, un ruolo di primo piano nel limitare l'insorgenza dei fenomeni degenerativi dell'invecchiamento. In una serie di studi effettuati in drosofile transgeniche, è stato dimostrato che il ciclo vitale di individui messi in grado di sovra-esprimere geni codificanti enzimi ad azione antiossidante, quali la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (che agiscono in serie per rimuovere, rispettivamente, gli anioni superossido e il perossido di idrogeno), aumenta di ben il 34% rispetto al ciclo degli individui controllo (Orr & Sohal, 1994). Inoltre individui esprimenti geni per la superossido dismutasi umana a livello dei motoneuroni presentano una durata della vita maggiore di circa il 40% rispetto al tipo selvatico (Parkes et al., 1998).

Uno dei processi ossidativi a carico delle proteine meglio caratterizzato è rappresentato dalla parziale ossidazione dei residui di metionina, con conseguente formazione, prima, di residui di metionina solfossido e, poi, di solfone (Fig. 1).



**Fig. 1.** Formazione del solfossido e del solfone di metionina da parte delle ROS

La possibilità che i residui di metionina possano subire fenomeni ossidativi dipende in modo determinante dalla loro localizzazione nella struttura tridimensionale della molecola. Quelli localizzati sulla superficie molecolare, e quindi più direttamente esposti all'ambiente idrofilico circostante, sono i residui più soggetti ad essere

modificati da ossidazione (Van Patten et al., 1999, Stadtman & Levine, 2000). La conversione di un residuo di metionina essenzialmente idrofobico in uno di solfossido prettamente idrofilico usualmente genera alterazioni più o meno estese a livello della polarità e/o struttura tridimensionale nativa delle proteine (Lu et al., 1999; Vogt, 1995). Nella generalità dei casi studiati le proteine così modificate subiscono una diminuzione di attività biologica (Brot & Weissbach, 1983, 1991), come è stato chiaramente dimostrato per la somatotropina (Teh et al., 1987), lo "human stem cell factor" (Hsu et al., 1996), il fattore di coagulazione umano VIIa (Kornfelt et al., 1999), l'ormone umano paratiroideo hPTH9 (Nabuchi et al., 1995), l'antitrombina (Van Pattern et al., 1999), la "cerebroside-sulfate activator protein" umana (Whitelegge et al., 2000).

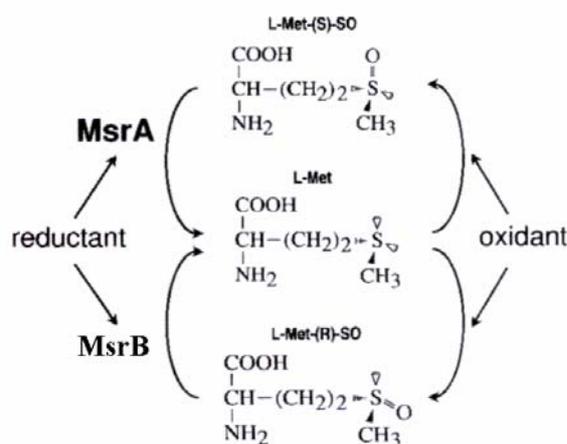
E' tuttavia necessario rimarcare che si conoscono sia proteine in cui l'ossidazione dei residui di metionina sembra essere ininfluenta sulla loro struttura e attività (Levine et al., 1996), sia casi in cui questa ossidazione viene coinvolta nel controllo di processi cellulari (Berlett & Stadtman, 1997; Moskovitz et al., 2000), come la regolazione dei canali per il potassio negli oociti di *Xenopus* (Ciorba et al., 1997, 1999; Chen et al., 2000), o il legame della "major high mobility group chromosomal protein" con il DNA in *Drosophila* (Dow et al., 1997).

## **1.2. Riparazione enzimatica delle metionine ossidate mediante le metionina-solfossido reduttasi.**

L'origine dei meccanismi di protezione e riparazione delle molecole danneggiate dalle ROS viene fatta risalire addirittura al Precambriano. Durante questa Era, infatti, tutti gli organismi hanno dovuto adattarsi a vivere esposti ad una elevatissima concentrazione di ossigeno libero sia nell'atmosfera, sia negli altri vari ambienti del pianeta (Margulis 1993; Falkowski 2006). Fatti salvi i sistemi enzimatici antiossidanti rappresentati da superossido dismutasi e catalasi che costituiscono la prima difesa cellulare contro le ROS (il primo responsabile della reazione che riduce il radicale superossido con relativa formazione del perossido d'idrogeno e ossigeno, il secondo

deputato a neutralizzare il perossido d'idrogeno altamente tossico per le cellule e generare acqua e ossigeno molecolare), gli altri sistemi enzimatici indispensabili per la vita di ogni organismo che vive in presenza di ossigeno sono rappresentati da quelli deputati alla riduzione delle cisteine e delle metionine ossidate. Essi sono quindi identificabili con la tioredossina reduttasi, glutaredossina reduttasi e metionina-solfossido reduttasi.

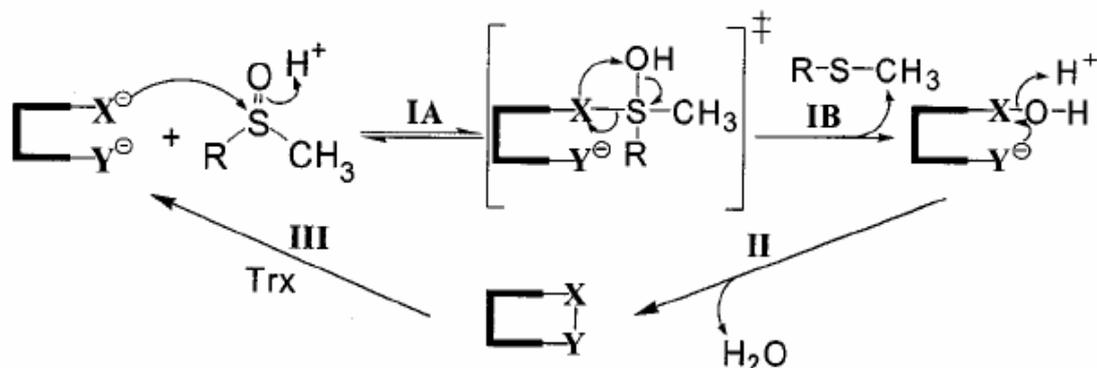
L'ossidazione delle metionine da parte delle ROS porta alla formazione di due diastereoisomeri: i solfossidi S e R di metionina, usualmente riportati sotto le abbreviazioni Met-S-O e Met-R-O (Sharov et al., 1999; Sharov & Schoneich, 2000). Il sistema enzimatico metionina-solfossido reduttasi comprende quindi due diverse proteine, che vengono usualmente indicate come MsrA e MsrB e sono, ognuna, rappresentata da più forme. Come illustrato in Fig. 2, l'enzima MsrA è in grado di ridurre specificamente il solfossido S di metionina (noto come Met-S-O), mentre quello MsrB è in grado di ridurre il solfossido R di metionina (noto come Met-R-O).



**Fig. 2.** Riparazione enzimatica dei diastereoisomeri S e R di solfossido di metionina mediante l'attività delle metionina-solfossido reduttasi MsrA e MsrB.

Tutte le forme finora caratterizzate di MsrA e MsrB si presentano come proteine monometriche. Tuttavia tra le due diverse specie (o famiglie) non c'è alcuna estesa similarità di sequenza aminoacidica, pur condividendo (come mostrato in Fig. 3) un

meccanismo catalitico molto simile che comporta tre distinte fasi basate sulla chimica dell'acido solfenico: (1) formazione di acido solfenico come intermedio, con il concomitante rilascio di una mole di metionina per mole di enzima; (2) formazione di un legame disolfuro intramolecolare; (3) riduzione della metionina-solfossido reduttasi ossidata da parte della tioredossina (Boschi-Muller et al., 2005).



**Fig. 3.** Meccanismo catalitico delle metionina-solfossido reduttasi (come descritto da Olry et al., 2002).

Sia MsrA che MsrB hanno una distribuzione biologica pressoché universale. Ne sono privi, verosilmente per perdita secondaria di origine adattativa, solo organismi che vivono da anaerobi in ambienti anossici, o all'interno di cellule ospiti. E' questo il caso ben documentato di vari batteri endosimbionti come *Buchnera*, *Tropheryma*, endoparassiti come *Phytoplasma*, *Rickettsia*, e *Chlamydia*, anaerobi come *Wolinella succinogenes*, o ipertermofili come *Aquifex aeolicus* (Wiedenheft et al., 2005; Delaye et al., 2007).

La ragione principale della conservazione evolutiva di MsrA e MsrB è senz'altro da ricercarsi nel ruolo essenziale che entrambi questi enzimi giocano nella riparazione molecolare dai danni ossidativi. Comunque in alcune specie di microorganismi e in alcuni tipi di cellule animali, essi sembrano essere coinvolti anche in altre funzioni metaboliche, tra cui la regolazione della longevità cellulare (Ruan et al., 2002) e il potenziamento delle difese fisiologiche contro varie patologie (Kantorow et al., 2004).

A livello subcellulare, la distribuzione di MsrA e MsrB interessa vari compartimenti cellulari. Nelle piante, in particolare in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa*, i plastidi sembrano essere la sede largamente preferenziale, per quanto la localizzazione in altri distretti cellulari possa essere mascherata da variazioni notevoli nel livello di espressione dei relativi geni codificanti (Rouhier et al., 2006). Nei vertebrati, MsrA si presenta con diverse isoforme sintetizzate da un unico gene attraverso un processo di splicing alternativo (Kim & Gladyshev, 2006), ognuna delle quali ha una sua specifica localizzazione: MsrA1 nei mitocondri, MsrA2 nel citoplasma e MsrA3 nel nucleo (Lee et al., 2006). Anche MsrB è polimorfo, ma diversamente dal caso di MsrA ogni isoforma MsrB è sintetizzata da un suo proprio gene e la sua localizzazione subcellulare è regolata dalla posizione di uno specifico peptide-segnale. La posizione di questo segnale al terminale amminico della molecola determina le forme mitocondriali MsrB3B e MsrB2, mentre la sua posizione al terminale carbossilico determina la forma del reticolo endoplasmatico MsrB3A e, verosimilmente, anche una forma citoplasmatica e nucleare MsrB1 (Kim & Gladyshev, 2004).

### **1.3. Conoscenze di base e finalità della ricerca**

Il materiale sperimentale usato nel lavoro di ricerca per questa tesi di dottorato è rappresentato dai protozoi ciliati, organismi eucariotici unicellulari tradizionalmente etichettati come immortali, cioè ritenuti dotati della capacità di moltiplicarsi indefinitamente mediante riproduzione mitotica, o asessuale che dirsi voglia (Bell, 1990). Un contributo fenomenologico determinante per il radicarsi di questo concetto di immortalità nella biologia dei ciliati (concetto che può tradursi come capacità di colture di questi organismi a mantenere immutato nel tempo i loro ritmi riproduttivi asessuali) è legato al fatto che numerose specie (ma non tutte) possono azzerare la loro età clonale, e contestualmente iniziare un nuovo ciclo biologico, mediante il compimento di un processo sessuale, sia che questo si attui come coniugazione (in cui si ha la formazione di nuclei zigotici in seguito a scambio di pronuclei gametici tra cellule unite temporaneamente in coppie), sia come autogamia (in cui nuclei zigotici si formano da fusione di pronuclei gametici generati da cellule singole). L'inizio di un nuovo ciclo

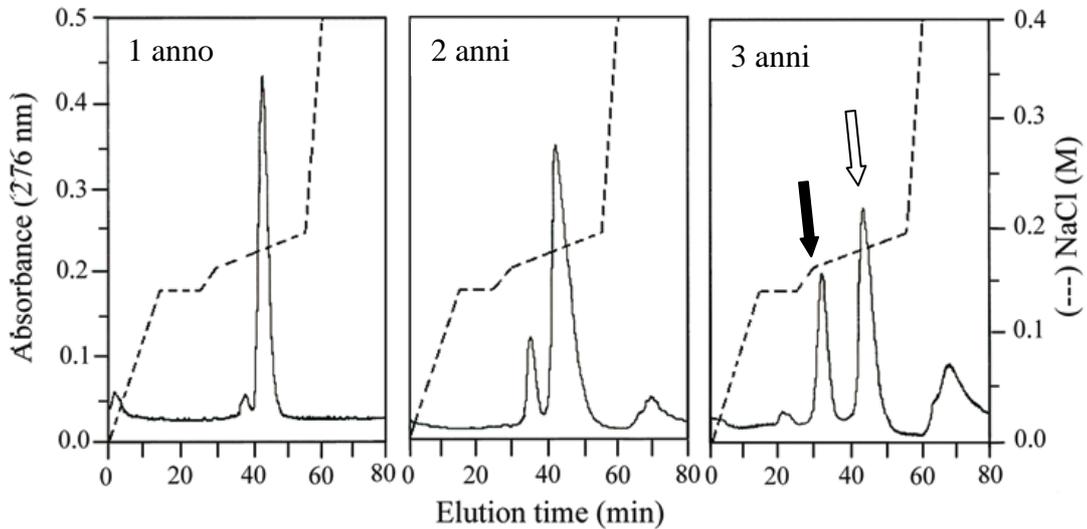
biologico è determinato dal fatto che in seguito a coniugazione e autogamia, le cellule divengono programmate a sostituire completamente il loro "vecchio" apparato nucleare -- tipicamente composto da uno o più micronuclei germinali dotati di genoma diploide sinteticamente inerte, e da uno o più macronuclei somatici dotati di genoma altamente poliploide sinteticamente attivo -- con un "nuovo" apparato nucleare che si sviluppa a partire da prodotti mitotici del synkaryon. In questo ciclo biologico l'età viene scandita non tanto dal trascorrere del tempo reale, ma dal numero delle divisioni che le cellule hanno compiuto a partire dalla loro origine, cioè dal momento in cui hanno completato un processo sessuale. Ad un primo stadio "giovanile", o di "immaturità sessuale", in cui le cellule possono solo moltiplicarsi mitoticamente e non sono in grado di compiere attività sessuale, segue un secondo stadio "adulto" o di "maturità sessuale" in cui le stesse cellule possono andare in coniugazione o autogamia, e terminare così un ciclo biologico e intraprenderne uno nuovo (Lynn & Corliss, 1991). Disattendendo questa opportunità, le cellule rischiano di entrare (ma non tutte obbligatoriamente entrano) in un terzo stadio del ciclo, usualmente designato come "senescenza" o "invecchiamento" in quanto è caratterizzato dall'insorgenza di ostacoli fisiologici di varia e non ben nota natura sia a intraprendere un processo sessuale sia, nel caso che questo processo venga comunque intrapreso, a completare la riorganizzazione del nuovo apparato nucleare. Questo stadio di senescenza una volta istaurato è di fatto irreversibile e porta alla morte cellulare. Le cellule devono (e possono) quindi anticiparlo, ringiovanendo finché è loro possibile durante lo stadio adulto mediante il compimento di un processo sessuale. Per queste peculiarità del loro ciclo biologico qui sopra delineate negli aspetti più generali, oltre che per la facilità di allevamento e mantenimento in coltura, i ciliati si presentano quindi come eccellenti modelli sperimentali per lo studio sia di tutto il complesso di fenomeni che sottendono l'invecchiamento cellulare, sia dei meccanismi molecolari che le cellule hanno evoluto per prevenirne e ripararne i danni.

In questo lavoro sono in particolare state utilizzate colture di *Euplotes raikovi*, ciliato marino ubiquitario su cui da anni si è concentrata molta attenzione per la caratterizzazione strutturale e funzionale di proteine-segnale diffusibili nell'ambiente extracellulare, e pertanto denominate "feromoni", che sono cellula-specifiche e

deputate al controllo della proliferazione cellulare e della coniugazione e, quindi, dei due processi fondamentali da cui dipende lo sviluppo del ciclo biologico. Per le conformazioni molecolari tra loro tutte strutturalmente omologhe (Luginbühl et al., 1994, 1996; Weiss et al., 1995; Liu et al., 2001) -- omologia di struttura che è anche predetta dal relativo controllo genetico dato da una serie multipla di alleli ad un singolo locus (Dini & Nyberg, 1993) -- questi feromoni possono infatti competere uno contro l'altro nelle reazioni di legame con i loro recettori cellulari e interagire sia con le stesse cellule da cui sono prodotti, sia con cellule diverse da quelle da cui hanno origine (Ortenzi & Luporini, 1995; Vallesi et al., 2005). Nel primo caso di interazione feromone/cellula di natura "self", o autocrina, la loro azione stimolatrice ormonale è del tutto paragonabile a quella dei "protein growth factors" degli organismi superiori: le cellule sono indotte a dividersi per mitosi e a mantenere così lo stadio proliferativo asessuale (Vallesi et al., 1995; Luporini et al., 2005). Nel secondo caso di interazione feromone/cellula di natura "nonself", o paracrina, il comportamento dei feromoni è invece analogo a quello dei "sexual factors" di origine gametica: le cellule sono indotte a interrompere temporaneamente la loro proliferazione e a unirsi in coppie di coniuganti (Miyake 1996).

Nell'ambito di questi studi di struttura, funzione e meccanismi d'azione dei feromoni di *E. raikovi*, è stato osservato che queste molecole sono soggette a ossidazione e che questa ossidazione (recentemente rilevata anche per i feromoni di un'altra specie di *Euplotes*, *E. nobilii*) diviene sempre più manifesta con il progredire dell'età delle colture cellulari ed è causa di una significativa diminuzione dell'attività biologica dei feromoni, sia dell'attività autocrina che promuove la proliferazione mitotica, sia di quella paracrina che induce il processo sessuale della coniugazione (Ortenzi et al., 2003). È stato verificato sperimentalmente (Alimenti et al., manoscritto in preparazione e comunicazioni personali) che il bersaglio dell'ossidazione è rappresentato dai residui di metionina che compongono la struttura della maggior parte dei feromoni finora studiati e che hanno una localizzazione esposta sulla superficie molecolare (Luporini et al., 2005, 2006). Come illustrato in Fig. 4, le forme ossidate di feromone aumentano progressivamente rispetto alle loro forme standard non ossidate di pari passo con

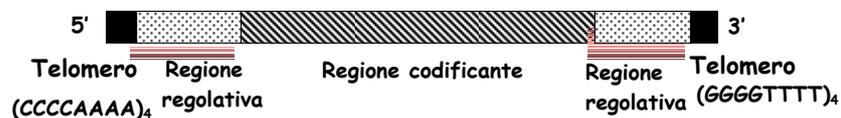
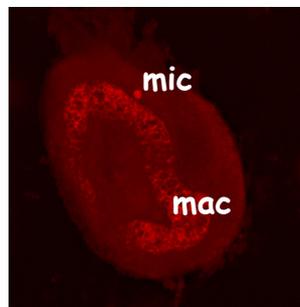
l'aumentare dell'età delle colture cellulari, fino a raggiungere livelli simili in colture sottoposte a ritmi continui di crescita per un arco di 3-4 anni, equivalenti ad un'età cellulare (clonale) di 900-1000 divisioni.



**Fig. 4.** Progressive variazioni nel tempo dei profili di eluizione di un feromone (*Er-1* nel caso illustrato) di *E. raikovi* in cromatografia su sistema HPLC. Il picco di eluizione del feromone nella sua forma standard (non ossidata) è indicato dalla freccia vuota; il picco della forma ossidata è indicato dalla freccia piena. Il tempo di 1, 2 e 3 anni si riferisce all'età delle colture cellulari usate per l'isolamento e purificazione del feromone e corrispondono, rispettivamente, a circa 300, 600 e 900 divisioni cellulari. (Questi dati sono stati estratti da un manoscritto in preparazione di Alimenti et al.).

In conclusione, è apparsa evidente una correlazione di causa-effetto tra i fenomeni di ossidazione delle metionine dei feromoni e l'invecchiamento cellulare, ed è da questa correlazione che ha preso origine il compito di ricerca su cui è stata sviluppata questa tesi di dottorato. Questo compito è stato mirato a identificare e caratterizzare strutturalmente e funzionalmente il complesso di geni specifici per le metionina-solfossido reduttasi di *E. raikovi*, cioè gli enzimi (come già sopra descritto) responsabili della riconversione dei residui di solfossido di metionina a residui di metionina e, quindi, deputati a riparare i danni ossidativi che i feromoni, e l'intero proteoma della cellula più in generale, subiscono in relazione all'avanzare dell'età.

La peculiare organizzazione del genoma macronucleare trascrizionalmente attivo che contraddistingue *E. raikovi*, e i ciliati più in generale, ha largamente facilitato l'approccio sperimentale. Questo genoma è esclusivamente composto da geni liberi, non da geni fisicamente associati in cromosomi come, invece, è il caso di quelli componenti il genoma micronucleare. Ognuno di questi geni si presenta amplificato in centinaia, o migliaia di copie, tutte a loro volta formate da molecole lineari, sub-cromosomiche, di DNA (pertanto designate come "gene-size molecules") le cui dimensioni in genere restano comprese tra 500 e 20.000 coppie di basi. La loro regione interna codificante è di norma non interrotta da introni ("intron-less") e compresa tra due regioni non codificanti più brevi, le cui estremità telomeriche sono tutte uniformemente caratterizzate da quattro ripetizioni del motivo CCCCAAAA in posizione 5' e GGGGTTTT in posizione 3'. E' quindi possibile clonare geni interi applicando strategie di PCR che richiedono la sola conoscenza di pochi e limitati segmenti di sequenza della regione codificante e sfruttano la specificità delle ripetizioni di sequenza a livello dei telomeri.



**Fig. 5.** La fotografia mostra l'apparato nucleare di *E. raikovi* (dimensioni reali, circa 30 x 50  $\mu\text{m}$ ) composto da un piccolo micronucleo sferico (mic) e un grosso macronucleo falciforme (mac). Lo schema evidenzia la peculiare organizzazione dei geni che costituiscono l'intero genoma macronucleare.

## 2. PROCEDURE SPERIMENTALI

### 2.1. Colture cellulari

Le colture di *E. raikovi* utilizzate appartengono al clone 1aF<sub>13</sub> ottenuto da coppie omotipiche (selfing) del ceppo selvatico 13 (depositato con il numero 1624/19 al Centro "Culture Collection for Algae and Protozoa" di Ambleside, UK), omozigote al cosiddetto locus del mating-type (*mat*-locus) e secernente il solo feromone *Er*-1. La loro temperatura di allevamento è stata costantemente mantenuta nell'intervallo di 22-24° C, con un ciclo di 8 ore di illuminazione indiretta e 16 di buio. Per cibo è stata usata l'alga verde *Dunaliella tertiolecta*, allevata in acqua di mare (salinità, 29-30‰; pH, 8.1-8.2) previamente sterilizzata mediante filtrazione con capsule Sartorius di porosità di 0.2 µm e riscaldamento a 85° C, arricchita con il "medium Walne", in condizioni di illuminazione diretta e aerazione costante.

### 2.2. Purificazione di DNA e RNA

Le preparazioni di DNA sono state di norma ottenute partendo da colture di circa 2 litri di cellule, previamente tenute in assenza di cibo per 2-3 giorni e risospese per 6-12 ore in sola acqua di mare alla concentrazione di 10<sup>4</sup>/ml. Si è poi proceduto a concentrare queste colture per centrifugazione (800 x g, per 4 minuti). I pellet così ottenuti sono stati risospesi e incubati, a 50° C per 16 ore, in una soluzione di lisi contenente EDTA 0,5 M, Tris-HCl 10 mM e pH 9,5, 1% SDS e 0,2 mg/ml di proteinasi K. Questa miscela è stata estratta due volte con fenolo e cloroformio (in rapporto 1:1), poi con cloroformio assoluto ed infine precipitata con due volumi di etanolo e LiCl 0,4 M. Il pellet ottenuto per centrifugazione è stato risospeso in 500 µl di tampone TE (Tris-HCl 10 mM e pH 8, EDTA 1 mM), ed incubato, a 37° C per un'ora, con l'enzima RNase A (0,1 mg/ml) per eliminare l'RNA presente. Il DNA è stato infine sottoposto ad una nuova estrazione con fenolo e cloroformio prima di essere precipitato, a temperatura ambiente per 30 minuti, con metà volume di una soluzione di PEG al 40% , MgCl<sub>2</sub> 30 mM.

Per le preparazioni di RNA sono state usate colture cellulari del tutto simili a quelle allestite per le preparazioni di DNA. Dopo essere state concentrate per centrifugazione, le cellule sono state risospese con il reagente Trizol (Invitrogen) e il loro RNA è stato purificato seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

### 2.3. Condizioni standard di PCR

Ogni reazione di PCR è stata effettuata con uno strumento GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems), partendo, se non altrimenti specificato, da volumi di 50 µl di: KCl 50 mM; Tris-HCl 20 mM a pH 8.4; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 50 pM di ciascun primer; 200 µM di ognuno degli deossiribonucleotidi trifosfati dATP, dGTP, dCTP e dTTP; 1 U di Taq Polymerase (Invitrogen); 0,5 µg di DNA. Tutti gli oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di PCR sono stati sintetizzati dalla ditta MWG-The Genomic Company (M-Medical S.r.l, Milano).

### 2.4. Amplificazione mediante primer degenerati

Per l'amplificazione di segmenti di sequenza specifici dei geni *msr* di *E. raikovi*, sono stati utilizzati i seguenti primer degenerati, ciascuno sintetizzato sulla base di un motivo di sequenza aminoacidica strettamente conservato nelle strutture di Mrs note e disponibili in "GenBank/EMBL database": *msrA-FW*; *msrA-RV*; *msrA-FW1*; *msrA-RV1*; *msrA-RV2*; *msrB-FW1*; *msrB-RV1* (le sequenze dei primer si trovano nel file allegato).

Le denominazioni si riferiscono al gene (*msrA*, *msrB*) nel cui clonaggio l'oligonucleotide è stato usato, mentre "FW" o "RV" indicano se l'oligonucleotide è stato utilizzato, rispettivamente, come "forward" o "reverse" primer. N sta per uno qualsiasi dei quattro nucleotidi A, G, C, T; Y sta per C o T; R per A o G; H per A, C o T; W per A o T; D per A, G o T.

### 2.5. "RATE (da Rapid Amplification of Telomeric Ends)-PCR"

Questa procedura ha comportato l'uso combinato del primer 5'CCCCAAAACCCCAAACCCCAAACCC3', denominato "TEL" (da telomero in quanto

corrispondente alla ripetizione telomerica  $C_4A_4$ ), con i seguenti primer specifici del gene da clonare (di interesse): *Er-msrA1-RV*, *Er-msrA1-FW*, *Er-msrA2-RV*, *Er-msrA2-FW*, *Er-msrB1-RV*, *Er-msrB1-FW* (le sequenze dei primer si trovano nel file allegato).

Le condizioni di PCR sono state variate soprattutto in relazione alla fase di sintesi di ogni ciclo di amplificazione. Dopo 5' a 94 °C, ogni reazione è stata fatta procedere con 35 cicli, con condizioni variate in base alle combinazioni dei primer qui di seguito riportate:

-*Er-MsrA1-RV*/TEL: (30" 94° C, 30" 58° C, 1' 72° C);

-*Er-MsrA1-FW*/TEL: (30" 94° C, 30" 58° C, 1' 30" 72° C);

-*Er-MsrA2-RV*/TEL: (30" 94° C, 30" 58° C, 30" 72° C);

-*Er-MsrA2-FW*/TEL: (30" 94° C, 30" 58° C, 1' 72° C);

-*Er-MsrB-RV*/TEL: (30" 94° C, 30" 58° C, 30" 72° C);

-*Er-MsrB-FW*/TEL: (30" 94° C, 30" 58° C, 40" 72° C).

Alla fine dei 35 cicli, ogni reazione è stata ulteriormente incubata a 72° C per 7'.

## 2.6. "RT (da Reverse Transcriptase)-PCR"

Le reazioni di RT-PCR sono state condotte partendo da circa 2 µg di RNA. Per escludere possibili contaminazioni da DNA (controllo negativo), sono state parallelamente fatte reazioni di PCR utilizzando RNA come "template", senza però aggiungere la trascrittasi inversa. Le preparazioni di RNA rivelatesi contaminate da DNA sono state trattate, per un'ora a 37° C, con 10 U di DNasi I (RNasi free) (Fermentas) in presenza di 40 U di inibitore della RNasi (Fermentas), tampone 1X PCR e  $MgCl_2$  2 mM. La DNasi è stata successivamente inattivata a 95° C per 5'. Tutte le reazioni di RT-PCR sono state effettuate utilizzando il kit "SuperScript One-Step RT-PCR" (Invitrogen), e l'enzima "Platinum *Taq*" seguendo le modalità consigliate dalla ditta fornitrice. Alla retro-trascrizione, realizzata a 50° C per un'ora, ha fatto seguito una reazione di PCR condotta secondo un programma standard: 2' a 94° C, poi 40 cicli (30", 94° C; 30", 60° C; 30", 72° C), 7' a 72° C. I prodotti di RT-PCR sono stati infine corsi su gel di agarosio al 1,7% e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio (10 µg/ml).

## 2.7. "3'RACE (da 3' Rapid Amplification of cDNA End)-PCR"

I campioni di cDNA utilizzati per le reazioni di questa strategia di PCR sono stati ottenuti con reazioni di RT-PCR, partendo da 2 µg di RNA totale "DNA-free". Dopo essere stati denaturati per 10' a 70° C e raffreddati in ghiaccio per 60", questi campioni sono stati retrotrascritti con 200 U di SuperScript™ RT (Invitrogen) in presenza di tampone 1X PCR, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP mix 250 µM, DTT 10 mM, 20 U di "Ribonuclease Inhibitor" (Fermentas), in un volume finale di 25 µl e per 1 ora a 42° C. Come primer della retrotrascrizione è stato utilizzato un oligonucleotide per gli RNA messaggeri poliadenilati modificato, denominato "oligo(dT)-linker", con la seguente sequenza nucleotidica :

5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3'.

Dopo la sintesi del cDNA, la trascrittasi inversa è stata denaturata a 70° C per 15', e il cDNA è stato trattato con 5 U di RNasi H (Fermentas) a 37° C per altri 30'. Nella seconda fase, il cDNA (2,5 µl della reazione di RT-PCR) è stato amplificato utilizzando combinazioni tra primer gene-specifici e il primer "oligo(dT)-linker". La reazione di PCR è stata effettuata secondo il programma: 2' a 94° C, poi 35 cicli (30", 94° C; 30", 60° C; 30", 72° C), 7' a 72° C.

## 2.8. Clonaggio e sequenziamento

Il frammenti di DNA amplificato sono stati preventivamente purificati con il kit "Jetquick PCR purification spin" (Genomed) e poi clonati nel vettore "pCR 2.1 TOPO", utilizzando il kit "TOPO™ TA Cloning" (Invitrogen). Le cellule competenti di *E. coli* ("One Shot<sup>R</sup> DH5α™-T1<sup>R</sup> TOP10 F'chemical competent cells") sono state trasformate con il plasmide contenente il frammento di interesse seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Le colonie batteriche selezionate sono state inoculate in 3 ml di terreno di coltura (LB) contenente ampicillina (100 µg/ml) e incubate a 37° C con agitazione per 16 ore. I plasmidi sono stati purificati con il metodo della cosiddetta lisi veloce. Previa concentrazione per centrifugazione a 12.000 x g per 2' e risospensione in 200 µl di TE (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, e EDTA 10 mM, pH 8 ), i batteri sono stati sottoposti a lisi alcalini con 200 µl di una soluzione di NaOH 0,2 M e 1% SDS, per 3' in ghiaccio, e

questa neutralizzata con 200  $\mu$ l di acetato di potassio 3 M, pH 5,5, per 1' sempre in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 12.000 x g per 10' a 4° C, il soprannatante contenente il DNA plasmidico è stato trasferito in una provetta Eppendorf sterile e precipitato, centrifugando per altri 10' a 12.000 x g, con un volume di etanolo assoluto a 4° C. Dopo due lavaggi con etanolo al 70 %, il pellet è stato risospeso in acqua sterile contenente RNAsi A (10  $\mu$ g/ml).

L'analisi dei plasmidi è stata fatta tramite digestione enzimatica, per 2 ore a 37° C, con EcoR1. La presenza degli inserti è stata verificata mediante separazione elettroforetica su gel di agarosio al 1,7% e colorazione con bromuro di etidio (10  $\mu$ g/ml). I plasmidi selezionati in base alle dimensioni degli inserti sono stati purificati con il kit "Jetquick Plasmid Miniprep Spin" e quindi sequenziati presso il centro "CRIBI Biotechnology Center" dell'Università di Padova.

## **2.9. Sonde di DNA e ibridazione in Southern e Northern blot**

I prodotti di PCR utilizzati come sonde negli esperimenti di Southern e Northern blot sono stati marcati con  $^{32}$ P come tracciante radioattivo, seguendo la tecnica del "Random Priming". Aliquote di 100 ng di DNA risospese in 30  $\mu$ l di acqua distillata sono state mescolate con 9  $\mu$ g di esanucleotidi (Fermentas) e denaturate per ebollizione per 3'. Ad esse sono stati quindi aggiunti 7  $\mu$ l di tampone (Tris-HCl 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 0,2 M, HEPES 0,2 M a pH 6,6), 2  $\mu$ l di BSA alla concentrazione di 10 mg/ml, 1 U di Klenow DNA Polimerasi (Fermentas), 3  $\mu$ l di una miscela di dNTP contenente dGTP, dCTP e dTTP (ognuno alla concentrazione di 1 mM) e 3  $\mu$ l di  $\alpha$ dATP<sup>32</sup> (GE Healthcare). Ogni miscela è stata infine incubata per un'ora a 37° C, oppure per 3-4 ore a temperatura ambiente, prima di interromperne la reazione con l'aggiunta di 5  $\mu$ l di EDTA 0,25 M. Prima di essere utilizzata nell'ibridazione, ogni sonda è stata portata per 5 ' a 95° C e poi subito trasferita in ghiaccio.

Gli esperimenti di Southern e Northern blot sono stati condotti seguendo la tecnica descritta da Sambrook et al. (2001), usando filtri Hybond-N+ (GE Healthcare) per il trasferimento di 10-15  $\mu$ g di DNA nel primo caso e di 40  $\mu$ g di RNA nel secondo, previamente frazionati per elettroforesi su gel d'agarosio. I filtri sono stati

preibridati, per 2 ore a 65° C, in una soluzione composta da "5x Denhart's solution" (miscela di BSA + polivinilpirrolidone + Ficoll, in rapporto quantitativo di 1:1:1), EDTA 10 mM e 0,5% SDS; poi, ibridati, per una notte intera a 65° C, con la sonda marcata in 6x SSC (NaCl 1 M, citrato di sodio 0,1 M a pH 7), 5x Denhart's solution, 0,1% SDS e 100 µg/ml di DNA di salmone denaturato in seguito ad ebollizione. Al termine dell'ibridazione, i filtri sono stati lavati, una prima volta, con 6x SSC e 0,1% SDS e, altre due volte a 65° C, con 3x SSC e 0,1% SDS, prima di essere esposti e analizzati su un "Phosphorimager" (Bio-Rad). In caso di riutilizzo, i filtri sono stati preventivamente lavati per 30' a 95° C in 0,1% SDS.

## **2.10. Estratti cellulari e analisi in Western blot**

Gli estratti cellulari sono stati ottenuti partendo da pellet di cellule direttamente risospese in tampone "Laemmli" 2x (10% β-mercaptoetanol, Tris-HCl 0,125 M a pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerolo e 0,004% blu-bromofenolo). Dopo bollitura per 5', ogni preparazione è stata centrifugata a 12.000 x g a temperatura ambiente, e il soprannatante trasferito in provette Eppendorf. Aliquote equivalenti a circa 10<sup>4</sup> cellule sono state frazionate per elettroforesi corse in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 12,5%, e i gel lavati per 10' nel tampone di trasferimento (CAPS 10 mM a pH 11 e metanolo al 10%). Il materiale frazionato è stato trasferito a 240 mA su membrane Hybond-P (GE Healthcare), preattivate in metanolo assoluto, per 35' a temperatura ambiente. Dopo il trasferimento, le membrane sono state saturate, per un'ora a temperatura ambiente, in TBS-T (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e Tween-20 a 0,05%) contenente latte in polvere al 5%; quindi, previo un breve lavaggio in TBS-T con latte in polvere a 0,1%, sono state incubate, per 14 ore a 4° C, con anticorpi primari anti-MsrA bovina (prodotti da Upstate), usati alla diluizione 1:1000 in TBS con latte in polvere al 1%. Dopo alcuni lavaggi con TBS-T, le membrane sono state infine incubate, per un'ora a temperatura ambiente e in costante agitazione, con anti-immunoglobuline di coniglio (secondo anticorpo) coniugate a perossidasi e usate alla diluizione di 1:5000 in TBS con latte in polvere al 1%. L'immunoriconoscimento è stato evidenziato per chemiluminescenza ECL (Enhanced Chemi-Luminescence, Amersham).

### 3. RISULTATI

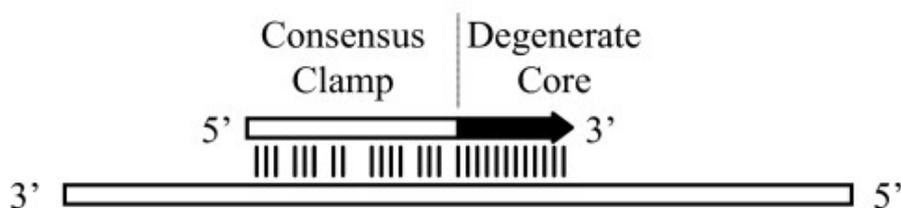
#### 3.1. Problemi sperimentali incontrati

L'approccio sperimentale al clonaggio dei geni *msr* di *E. raikovi* è stato inizialmente basato sull'uso di primer degenerati sintetizzati in relazione alle sequenze Ala-Gly-Cys-Phe-Trp e Tyr-His-Gln-Gln-Tyr-Arg universalmente conservate, dai batteri all'uomo, nelle regioni, rispettivamente, amino- e carbossi-terminale delle strutture delle Msr di tipo A. Questa scelta si è rivelata fallimentare. Le reazioni di PCR condotte con questi primer hanno generato prodotti di amplificazione (di particolare interesse ne è apparso uno di 423 nucleotidi), specifici per sequenze aminoacidiche nuove e con elevate percentuali di equivalenza con le sequenze di Msr di altri organismi. Tuttavia, nessuno di questi prodotti, una volta impiegati come sonda in esperimenti di Southern blot su preparazioni di DNA, ha rivelato significative bande di ibridazione; né vari tentativi di una loro utilizzazione in RATE-PCR hanno dato alcun risultato. Si è dovuto concludere che i prodotti in questione non avevano origine dal DNA di *E. raikovi*, bensì, molto verosimilmente, dal DNA dei batteri che vivono da endosimbionti nel citoplasma di *E. raikovi*, così come in molti altri ciliati (Vannini et al., 2005), o dal DNA di altri batteri presenti nelle colture cellulari (che non sono sterili).

Absolutamente appropriata si è invece rivelata la decisione di utilizzare primer sintetizzati basandoci sul metodo "CODEHOP" (da "Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers") (Rose et al., 2003), specificamente sviluppato per identificare e clonare i geni di famiglie proteiche aventi basse percentuali di similarità di sequenza (Rose, 2005). Questo metodo suggerisce di costruire primer dotati di una corta regione (chiamata "core region") con sequenza degenerata al 3', che contenga tutti i possibili codoni per un tri- o tetra-peptide assolutamente conservato nelle proteine d'interesse. La regione 5' di questi primer deve invece essere più lunga e con sequenza non-degenerata ("consensus clamp region"). Come schematizzato in Fig. 6, l'"annealing" iniziale della "core region" sul substrato di DNA viene stabilizzato dalla "consensus clamp region". Durante i successivi cicli di amplificazione, l'"annealing" di ciascun primer sui prodotti della PCR è poi fortemente favorito dalla completa

complementarietà della "consensus clamp region" con i primer incorporati nei frammenti amplificati.

Primer-to-template annealing (1/degeneracy):



Primer-to-product annealing (all primers):



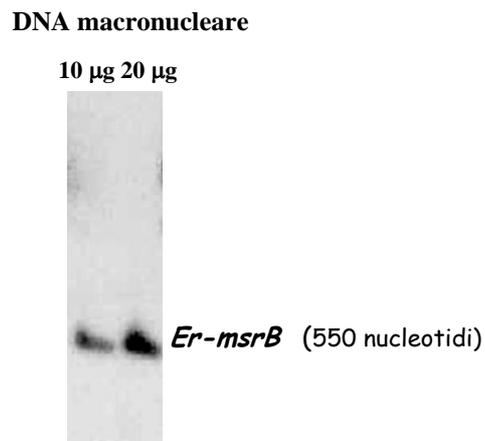
**Fig. 6.** Rappresentazione schematica del metodo CODEHOP. (A) L'"annealing" al substrato di DNA da parte della regione 3' degenerata del primer (degenerate core) è stabilizzato dalla regione 5' non-degenerata (consensus clamp). (B) Nei successivi cicli di amplificazione l'"annealing" tra primer e prodotti della PCR è guidato dall'identità di sequenza tra i primer incorporati nei prodotti della PCR e quelli presenti nella miscela di reazione (Da Rose et al., 2003).

### 3.2. Identificazione e caratterizzazione strutturale del gene *Er-msrB*

Il primo del complesso dei geni *msr* di *E. raikovi* ad essere stato identificato è un gene specifico per una forma B di Msr, e quindi è stato denominato *Er-msrB*. L'identificazione ha comportato una prima reazione di PCR su DNA macronucleare innescata con la coppia di primer degenerati *msrB-FW1* e *msrB-RV1* le cui sequenze (riportate al precedente paragrafo 2.4) corrispondono, rispettivamente, alle sequenze Lys-Phe-Asn-Ala-Gly-Cys-Gly-Trp-Pro e Gly-His-Val-Phe-Asn-Asp-Gly-Pro-Lys-Pro-Thr, strettamente conservate nelle MsrB di *Tetrahymena*, *Paramecium* e altri protisti. Questa reazione ha generato un unico prodotto di amplificazione di 158 nucleotidi,

specifico per una sequenza aminoacidica di 52 residui con chiara equivalenza a sequenze di MsrB di altri organismi.

Questo prodotto è stato marcato con fosforo radioattivo e usato come sonda in esperimenti di Southern blot su preparazioni di DNA macronucleare frazionate in elettroforesi e trasferite su membrana. Come mostrato in Fig. 7, il risultato è stato un'unica banda di ibridazione di circa 550 nucleotidi.



**Fig. 7.** Ibridazione in Southern blot tra DNA di *E. raikovi* e sonda *msrB*-specifica.

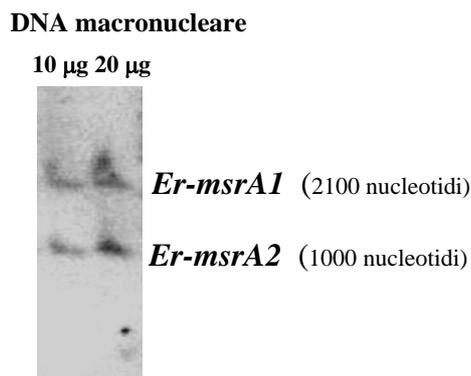
Il clonaggio dell'intero gene *Er-msrB* è stato ottenuto mediante RATE-PCR, utilizzando in due distinte reazioni le seguenti combinazioni di primer: *Er-msrB*-RV/TEL e *Er-msrB*-FW/TEL (vedasi sezione 2.5). Come riportato in Fig. 8 (si trova nel file allegato), la sua sequenza non mostra interruzioni da introni e si estende per 547 nucleotidi, di cui 384, a partire da un ATG in posizione 77, formano la regione codificante specifica per una proteina di 127 aminoacidi. Il codone stop è rappresentato, in posizione 461, da una tripletta TAG, che *Euplotes* utilizza solo nel 9% dei casi, preferendogli nei rimanenti casi la tripletta TAA (Salas-Marco et al., 2006). Anche la regione codificante presenta una peculiarità nell'uso del codice genetico rappresentata dalla presenza di due triplette TGA codificanti residui di cisteina, peculiarità questa che è stata originariamente descritta in *E. octocarinatus* in relazione alla struttura dei geni dei feromoni (Meyer et al., 1991).

Le regioni non codificanti sono brevi, di 49 nucleotidi all'estremità 5' e di 59 a quella 3'. L'estremità 5' è ricca di AT, non vi si riscontrano sequenze regolatrici canoniche, ma contiene un motivo GAAAA come elemento regolativo dell'inizio della trascrizione.

Per quanto riguarda l'organizzazione dell'estremità 3', si è fatto ricorso a una RACE-PCR per individuare il sito di poliadenilazione e il nucleotide di fine trascrizione. Come mostrato in Fig. 9 (si trova nel file allegato), il segnale di poliadenilazione appare rappresentato dal motivo AATTTT, ben diverso dai canonici AATAAA usato dagli altri organismi (Ghosh et al., 1994), mentre il nucleotide della terminazione della trascrizione coincide la guanina in posizione 476.

### **3.3. Identificazione dei geni *Er-msrA***

Per l'identificazione dei geni *msr* di *E. raikovi* specifici per la forma A delle Msr, sono stati utilizzati i seguenti tre primer degenerati *msrA-FW1*, *msrA-RV1* e *msrA-RV2* (sezione 2.4 delle procedure sperimentali). Essi corrispondono, rispettivamente, alle sequenze Ala-Thr-Leu-Ala-Gly-Gly-Cys, His-Ala-Glu-Val-Val-Gln-Val-Thr-Tyr-Asp-Pro e His-Asp-Pro-Thr-Thr-Leu-Asn-Arg-Gln-Gly, la prima delle quali è parzialmente conservata a livello del terminale amminico e le altre due altrettanto parzialmente conservate a livello del terminale carbossilico delle MsrA dei vari organismi finora studiati a questo riguardo, tra cui i ciliati *Paramecium* e *Tetrahymena*. Le combinazioni *msrA-FW1/msrA-RV1* e *msrA-FW1/msrA-RV2* applicate a preparazioni di DNA macronucleare hanno generato due prodotti di amplificazione, uno di 236 nucleotidi e l'altro di 173 nucleotidi, il cui sequenziamento ha rivelato la presenza di almeno due distinte sequenze MsrA-specifiche. Per identificarne i rispettivi geni, i due prodotti di amplificazione sono stati marcati con un tracciante radioattivo e congiuntamente utilizzati in esperimenti di Southern blot su DNA macronucleare previamente frazionato sul gel di agarosio e trasferito su membrana. Come mostrato in Fig. 10, si sono evidenziate due bande di ibridazione, una di circa 2100 basi e l'altra di circa 1000 basi, e il clonaggio dei loro geni corrispondenti, designati *Er-msrA1* e *Er-msrA2*, è stato affrontato mediante RATE-PCR.



**Fig. 10.** Identificazione dei geni *Er-msrA1* e *Er-msrA2* mediante ibridazione, in Southern blot, di una preparazione di DNA macronucleare con sonde radioattive allestite con loro prodotti di amplificazione.

### 3.4. Caratterizzazione (parziale) del gene *Er-msrA1*

Di questo gene al momento è stata determinata solo una sequenza parziale, limitata alla porzione che si estende per 404 nucleotidi ad iniziare dall'estremità 5'. L'amplificazione mediante RATE-PCR di regioni geniche relativamente estese, superiori a 1200-1400 nucleotidi, presenta intrinseche difficoltà operative. Il clonaggio dell'intero gene *Er-msrA1*, che si estende per 2100 nucleotidi, pertanto richiederà un allestimento e screening di nuovi primer sintetizzati in relazione a segmenti di sequenze di *MsrA* caratterizzati da un livello medio-basso di conservazione. Ad ogni modo è stato possibile verificare che la sua amplificazione è specificamente legata all'impiego della coppia di primer *msrA-FW1/msrA-RV1* sul DNA estratto dal gel del Southern blot in corrispondenza della banda di ibridazione di 2100 basi.

Come riportata in Fig. 11 (si trova nel file allegato), la regione non codificante al 5' si estende per 177 nucleotidi e contiene un motivo *GAAAA* e un TATA-box come iniziatori della trascrizione. Vi si identificano, inoltre, due presunti "stress-response elements" rappresentati dai motivi *AGGTG* e *CCTCT* che richiamano quelli canonici *AGGGG* e *CCCCT* (Schmitt & Mcentee, 1996). La regione codificante inizia dall'ATG in posizione 222, e vi si riconoscono i motivi di sequenza *MsrA*-specifici che sono stati utilizzati per la costruzione dei primer *msrA-FW1* e *msrA-RV1*.

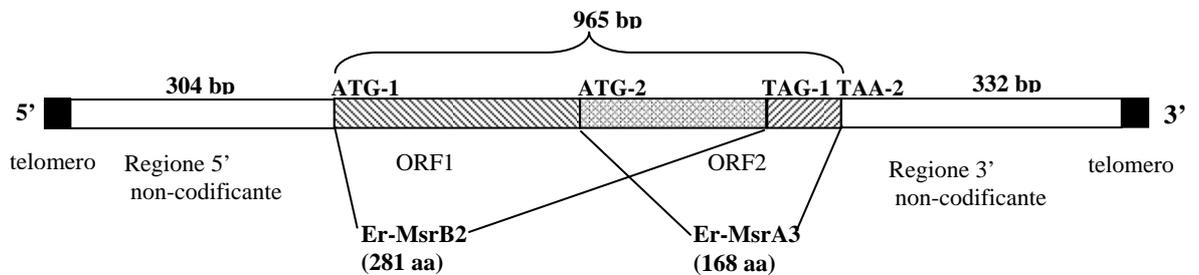
### **3.5. Caratterizzazione (parziale) di tre distinte isoforme del gene *Er-msrA2***

Nell'ambito della sperimentazione finalizzata alla determinazione della struttura del gene *Er-msrA2*, condotta utilizzando la combinazione di primer *Er-MsrA2-RV/TEL* in reazioni di RATE-PCR, non è stata ottenuta (come atteso) un'unica sequenza; ne sono state bensì ottenute tre distinte, a denotare che in effetti il clonaggio e sequenziamento aveva interessato frammenti di tre diverse isoforme del gene *Er-msrA2*, che sono state tra loro formalmente distinte con le denominazioni *Er-msrA2-A*, *Er-msrA2-B* e *Er-msrA2-C*. Di ognuna sono finora state ottenute solo sequenze parziali che coprono la regione 5' non codificante e circa un terzo della regione codificante. Come mostrato in Fig. 12, l'allineamento di queste sequenze denota variazioni significative solo a livello delle loro brevi (da 21 a 99 nucleotidi) regioni non codificanti. Pur essendo tutte e tre ricche di AT e contengano i soliti elementi TATA- e CAAT-box come iniziatori della trascrizione, nelle isoforme *Er-msrA2-A* e *Er-msrA2-C* presenta corti motivi AGGGA, AGGAG e AGTGG, che molto verosimilmente rappresentano "stress response elements", simili a quelli precedentemente identificati nel gene *Er-msrA1*. Diversamente dalle regioni non codificanti, quelle codificanti presentano un alto grado di similarità.

### **3.6. Identificazione del gene *Er-msrA/B*, ambivalente per la sintesi di Msr di tipo A e di tipo B**

Partendo dallo stesso pool di frammenti genici amplificati combinando i primer "Er-msrA2-FW e Er-msrA2-RV", disegnati sulle sequenze nucleotidiche del gene *Er-msrA2*, con il primer "TEL" specifico per la ripetizione telomerica  $C_4A_4$ , è stato clonato un gene intero di 1601 basi la cui sequenza nucleotidica ha rivelato la presenza di due possibili "Open Reading Frame", ORF1 e ORF2. Come rappresentato in Fig. 13, ORF1 inizia da un ATG in posizione 305 e termina con il codone stop TAG in posizione 1150, mentre ORF2 inizia con un ATG in posizione 763 e termina con una tripletta stop TAA in posizione 1269. La regione codificante del primo è specifica per una Msr di tipo B di 281 aminoacidi, che è stata denominata Er-MsrB2, ben diversa dalla sequenza della proteina Er-MsrB (di 127 residui) precedentemente caratterizzata. La regione

codificante del secondo appare, invece, specifica per una Msr di tipo A di 168 residui, designata come Er-MsrA3, che si allinea con le sequenze aminoacidiche delle isoforme del gene *Er-msrA2* prima parzialmente caratterizzate. Per affermarne una piena identità è tuttavia necessario conoscere la struttura completa di queste ultime.



**Fig. 13.** Rappresentazione schematica dell'organizzazione del gene *Er-msrA/B*.

Per quanto riguarda le caratteristiche delle regioni 5' e 3' non-codificanti, come mostrato in Fig. 14 (si trova nel file allegato), la prima si estende per 304 basi e contiene l'usuale TATA-box e il motivo GAAAA per l'inizio della trascrizione. La seconda, di 332 basi, è ricca di CG e contiene presunti "cis-acting elements", cioè elementi deputati all'interazione con i "trans-acting factors" coinvolti nella regolazione dell'espressione genica, nella localizzazione cellulare post-trascrizionale e nella stabilità degli mRNA (Mickleburgh. et al., 2006; De Luca et al., 2007). [Questi cis-acting element con localizzazione al 3' sono stati evidenziati attraverso software di bioinformatica disponibili su web, come TRANSFAC Database (<http://www.gene-regulation.com>) e TESS (Transcription Element Search System) sul sito <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess.>]

### 3.7. Espressione dei geni *Er-msrA* e *Er-msrB*

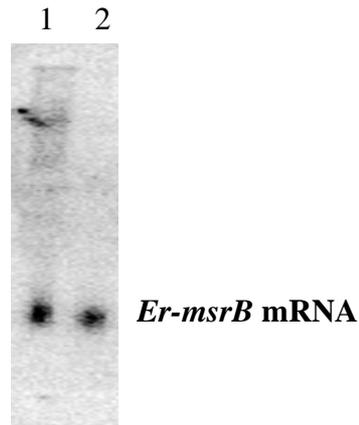
Congiuntamente allo studio strutturale, è stata intrapresa anche un'analisi comparativa dei livelli di espressione dei geni *msr* di *E. raikovi*. Inizialmente queste analisi sono state condotte su colture di cellule il cui stress ossidativo veniva correlato con il loro grado di invecchiamento, a sua volta misurato in numero di divisioni cellulari e valutato

sulla base delle quantità di feromone ossidato prodotto (purificato) rispetto alla forma standard, non ossidata. I tempi molto lunghi (mesi) necessari per far "invecchiare" le colture cellulari e il fatto di dover ricorrere ogni volta alla purificazione per cromatografia dei feromoni per stimarne il rapporto tra quantità ossidata e quantità non ossidata, ha poi consigliato di usare, come materiale sperimentale, colture di cellule esposte a stress ossidativi causati dall'aggiunta alle colture di concentrazioni crescenti, comunque sempre sub letali, di acqua ossigenata.

Nel caso dell'espressione dei geni *Er-msrB* si è fatto ricorso a esperimenti di Northern blot su preparazioni di RNA messaggero. L'analisi dell'espressione dei geni *Er-msrA* è stata invece essenzialmente basata su esperimenti di Western blot, essendo disponibili anticorpi commerciali molto efficienti prodotti contro una proteina MsrA ricombinante bovina.

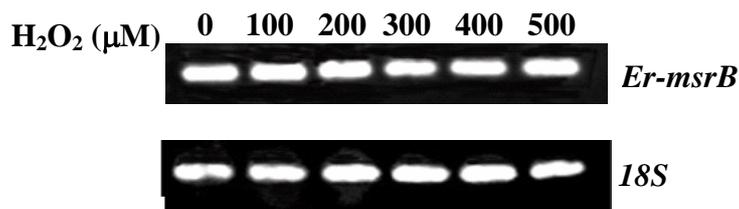
### **3.8. Analisi in Northern-blot dell'attività del gene *Er-msrB***

In un primo esperimento sono stati confrontati i livelli di espressione del gene *Er-msrB* tra colture cellulari mantenute in condizioni normali e colture mantenute per 30' in presenza di  $H_2O_2$ , immessa direttamente nell'ambiente extracellulare alla concentrazione finale di 200  $\mu M$ . Da queste colture è stato estratto l'RNA totale e ibridato in Northern blot con una sonda specifica della regione codificante del gene *Er-msrB*. Come mostrato in Fig. 15, l'intensità del segnale di ibridazione è risultata del tutto confrontabile tra cellule trattate e non trattate.



**Fig. 15.** Analisi in Northern blot di RNA totale (40  $\mu\text{g}$ /corsia) estratto da cellule mantenute in condizioni standard (corsia 1) e cellule trattate con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (corsia 2), e incubato con un oligonucleotide corrispondente ad un segmento di sequenza del gene *Er-msrB*.

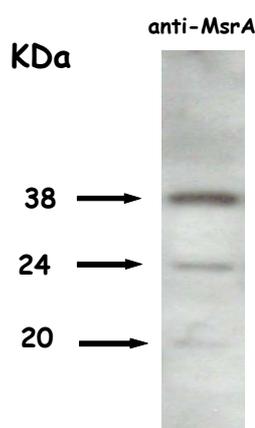
Per rafforzare questo risultato e produrre un'evidenza sperimentale più stringente che l'espressione del gene *Er-msrB* non aumenta (almeno a livelli apprezzabili) in cellule chiamate a fronteggiare uno stress ossidativo, sono state analizzate colture cellulari trattate con concentrazioni crescenti (da 0 a 500  $\mu\text{M}$ ) di  $\text{H}_2\text{O}_2$  aggiunte al mezzo di cultura insieme a una soluzione 20  $\mu\text{M}$  di  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . [Come descritto da Spear & Aust (1995), in presenza di un metallo il perossido d'idrogeno genera radicali idrossilici ("Fenton-like reaction") che agiscono da agenti ossidanti molto più forti rispetto alle stesse molecole di  $\text{H}_2\text{O}_2$ ]. Dopo 30 minuti di trattamento, sono state poi confrontate le quantità di messaggero *Er-msrB*-specifico amplificate mediante RT-PCR da estratti di RNA totale di ciascuna coltura cellulare, avendo cura di amplificarne parallelamente anche l'RNA ribosomale 18S al fine di utilizzarlo come controllo. Come mostrato in Fig. 16, l'intensità delle bande di amplificazione, visualizzate mediante colorazione con bromuro di etidio, è praticamente uniforme in ogni caso. Pertanto il livello di espressione del gene *Er-msrB* sembra non risentire delle variazioni d'intensità dello stress ossidativo a cui vengono esposte le cellule.



**Fig. 16.** Analisi mediante RT-PCR dell'RNA messaggero *Er-msrB*-specifico sintetizzato da cellule esposte a stress ossidativo di intensità crescente. Per ogni corsia del gel di agarosio (1,7%) sono stati caricati uguali volumi di ciascun prodotto di amplificazione, utilizzando aliquote di RNA ribosomale 18S per controllo quantitativo.

### 3.9. Analisi in Western-blot dell'attività dei geni *Er-msrA*

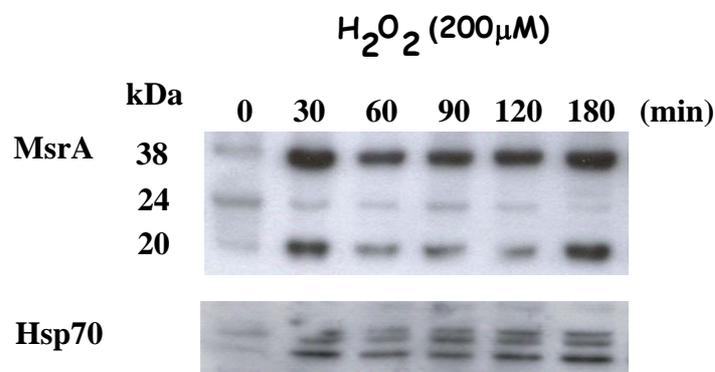
Preliminarmente è stato saggiato l'effettivo riconoscimento da parte dell'anticorpo anti-MsrA bovina di proteine in estratti proteici totali di *E. raikovi*. Come mostrato in Fig. 17, tre distinte bande di 20, 24 e 38 kDa vengono usualmente evidenziate da questo anticorpo. La conoscenza non ancora completa della struttura di tutti i geni *Er-MsrA* identificati ne ha, tuttavia, impedito la specifica attribuzione di ognuna ai prodotti di questi geni. Solo la banda di 20 kDa può ragionevolmente essere attribuita alla proteina Er-MsrA3 codificata dal gene *Er-msrA/B*, poiché la sequenza di 168 residui di questa proteina in effetti predice una massa di circa 20 kDa.



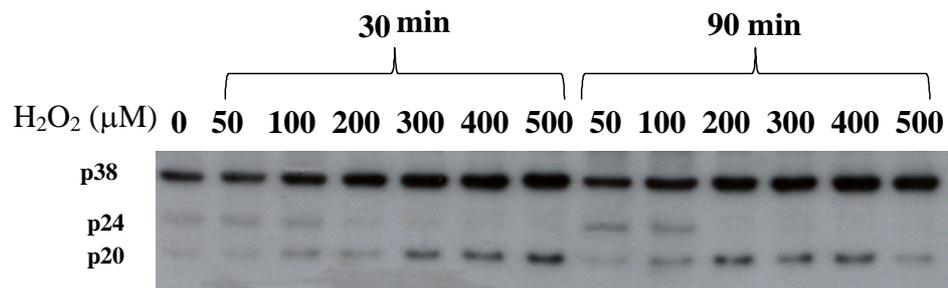
**Fig. 17.** Identificazione in Western blot di tre Er-MsrA, di 20, 24 e 38 kDa, in estratti cellulari di *E. raikovi*.

L'anticorpo anti-MsrA bovina è stato quindi utilizzato in analisi di Western-blot di estratti proteici preparati da colture cellulari trattate sia a tempi crescenti (da 30 minuti a 3 ore) con una stessa concentrazione di  $H_2O_2$  (200  $\mu M$ ), sia per uno stesso tempo (30 minuti) a concentrazioni crescenti di  $H_2O_2$  (da 0 a 500  $\mu M$ ). Come mostrato nelle Fig. 18 e 19, le cellule esposte a stress ossidativo producono bande di 20 e 38 kDa di intensità ben maggiore rispetto alle cellule non trattate, denotando così un'attivazione specifica della sintesi delle relative proteine. Di maggiore interesse sembra la banda di 20 kDa (reputata relativa alla proteina Er-MsrA3), perché l'aumento della sua intensità sembra essere sia dose-, sia tempo-dipendente. Delle tre bande, solo quella di 24 kDa sembra mantenere un'intensità più o meno uniforme tra cellule esposte e non esposte allo stress ossidativo.

Per quanto questi risultati siano nel complesso chiaramente indicativi di un'attivazione dell'espressione dei geni *Er-msrA* in cellule esposte a stress ossidativo, l'identificazione di quali geni e di quali loro prodotti sono in gioco richiede l'allestimento di anticorpi specifici per ognuno di questi prodotti.



**Fig. 18.** Western blot con anticorpo anti-MsrA di lisati di cellule (circa  $10^4$ /campione) esposte per tempi crescenti a uno stress ossidativo di uguale intensità ( $H_2O_2$ , 200 $\mu M$ ). Per ogni corsia del gel è stato caricato un ugual volume di ciascun lisato, utilizzando per un controllo quantitativo l'anticorpo anti-HSP(Heat-Shock Protein)-70.



**Fig. 19.** Western blot con anticorpo anti-MsrA di lisati di cellule (circa  $10^4$ /campione) esposte per tempi costanti (30' e 90') a stress ossidativo di crescente intensità. Per ogni corsia del gel è stato caricato un uguale volume di ciascun lisato.

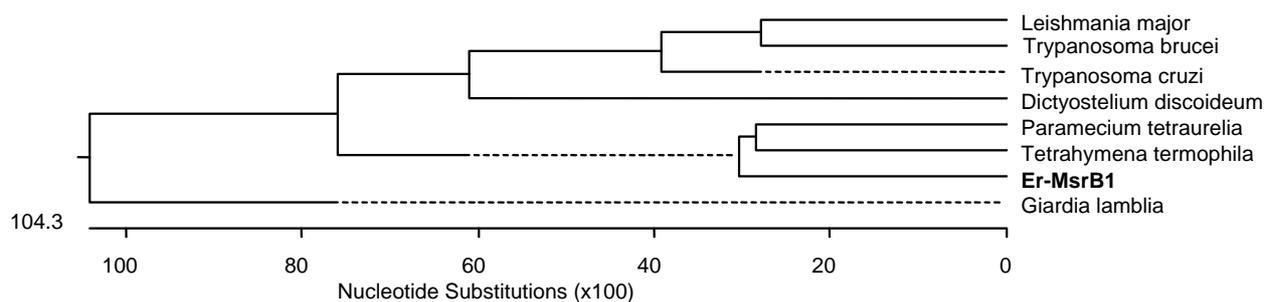
## 4. DISCUSSIONE

In premessa a questa sezione della tesi è necessario specificare che l'attenzione è stata primariamente rivolta a discutere sia le possibili correlazioni di struttura e funzione, sia le correlazioni filogenetiche, delle Msr di tipo A e B di *E. raikovi* di cui è stato possibile conoscere le sequenze aminoacidiche complete sulla base delle relative sequenze nucleotidiche codificanti. Delle altre forme di Msr per le quali sono state determinate solo sequenze parziali, l'attenzione è stata necessariamente ristretta a prospettarne le correlazioni filogenetiche. In ultimo sono state delineate alcune considerazioni sul possibile significato dei risultati, ancora molto preliminari, ottenuti sull'espressione dei geni *Er-msr*.

### 4.1. Caratteristiche e correlazioni filogenetiche della proteina Er-MsrB1

Come riportato in Fig. 20 (si trova nel file allegato), la sequenza aminoacidica di Er-MsrB1 predetta da quella codificante del gene *Er-msrB* (paragrafo 3.2) si allinea bene con le molte altre sequenze di Msr di tipo B note, soprattutto con quelle caratterizzate in invertebrati e protozoi. In relazione a questi ultimi, come mostrato in Fig. 21, le sue correlazioni filogenetiche sono chiaramente più strette con le Msr di tipo B sia dei ciliati (*Tetrahymena* e *Paramecium*), sia di altri protozoi a vita libera, piuttosto che con quelle di protozoi parassiti.

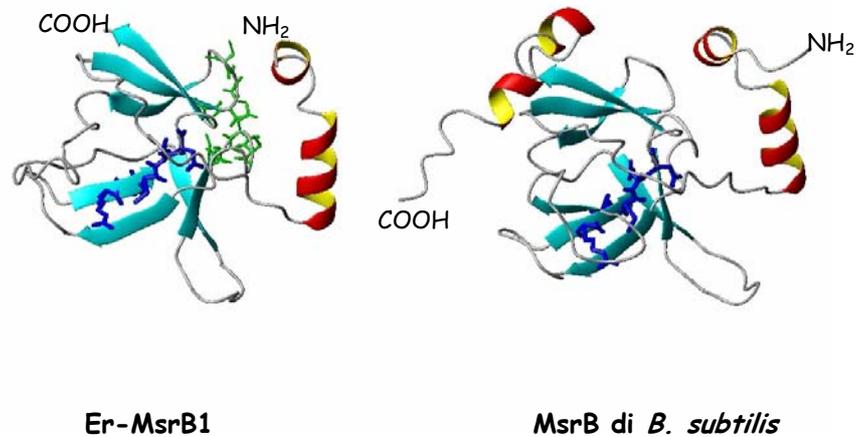
Nelle posizioni 45-48 e 92-95 delle sequenze di *Er-msrB* si identificano due motivi Cys-Xxx-Xxx-Cys presenti, in direzione opposta al sito catalitico, in quasi il 50% delle MsrB finora studiate (Boschi-Muller et al., 2005). Questi motivi formano uno specifico sito di legame per uno ione metallo, dello zinco in particolare; pur non essendo direttamente coinvolto nella reazione catalitica, il metallo aumenta l'efficienza dell'attività enzimatica poiché svolge un ruolo strutturale nella molecola (Kumar et al., 2002). Il sito catalitico è localizzato al carbossi-terminale e rappresentato dal pentapeptide Arg<sub>113</sub>-Tyr-Cys-Ile-Asn-Ser<sub>118</sub>. Al carbossi-terminale è presente il motivo Lys<sub>124</sub>-Pro-Lys-Glu<sub>127</sub>, equivalente ai motivi Lys-Asp-Glu-Leu e Lys-Ala-Glu-Leu della MsrB3A umana, riconosciuti come specifici segnali per la ritenzione della molecola nel reticolo endoplasmatico (Kim & Gladyshev, 2004, 2006).



**Fig. 21.** Albero filogenetico ottenuto d'allineamento della sequenza di Er-MsrB1 con quelle di altri protozoi, utilizzando il programma MegAlign, metodo CLUSTALW (Gonnet, 2007). I numeri di accesso in GenBank/EMBL database delle MsrB utilizzate sono: *Paramecium tetraurelia*, XP\_001426263; *Tetrahymena termophila*, XP\_001019714; *Dictyostelium discoideum*, XP\_635358; *Leishmania major*, CAJ05724; *Trypanosoma brucei*, XP\_829255; *Trypanosoma cruzi*, XP\_817746; *Giardia lamblia*, XP\_779636.

Con l'applicazione del software "Swissmodel.expasy.org/workspace" è stato ottenuto un modello di struttura tridimensionale di Er-MsrB1, basato sul confronto con la struttura nota della MsrB di *Bacillus subtilis*. Le Fig. 22 (si trova nel file allegato) e 23 mettono rispettivamente in rilievo i residui che nelle due molecole dovrebbero essere analogamente responsabili dell'organizzazione di eliche  $\alpha$  e foglietti  $\beta$ , nonché l'architettura largamente sovrapponibile del nucleo centrale ("molecular core") che costituisce il sito catalitico.

Le principali differenze tra le due proteine sono rappresentate dall'assenza, in Er-MsrB1, di un corto foglietto  $\beta$  e un'elica  $\alpha$  al carbossi-terminale, che invece caratterizzano l'architettura della MsrB di *B. subtilis*. Inoltre in Er-MsrB1 ci sono i motivi Cys-Xxx-Xxx-Cys di legame del metallo, che invece sono assenti nella MsrB di *Bacillus*.



**Fig. 23.** Modello della struttura tridimensionale di Er-MsrB1, dedotto dal confronto con la struttura tridimensionale nota di MsrB di *Bacillus subtilis*. I residui coinvolti nel sito catalitico sono rappresentati in blu; i due motivi Cys-Xxx-Xxx-Cys del sito di legame in Er-MsrB1 per il metallo sono in verde; le eliche  $\alpha$  sono in rosso e giallo, mentre i foglietti  $\beta$  sono in celeste.

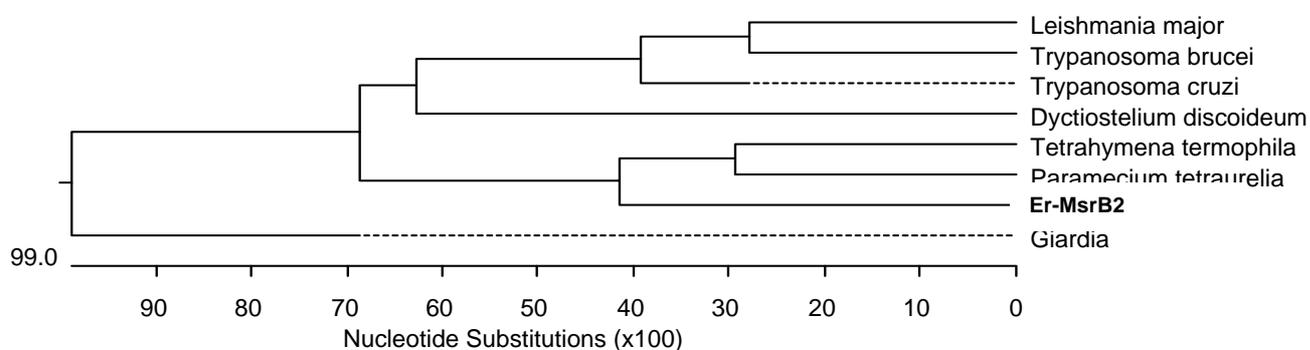
#### 4.2. Caratteristiche e correlazioni filogenetiche della proteina Er-MsrB2

La sequenza aminoacidica di Er-MsrB2 specificata dall'ORF1 del gene *Er-msrA/B* (paragrafo 3.6) si allinea estesamente, come mostrato in Fig. 24 (si trova nel file allegato), con le sequenze di Msr di tipo B di altri organismi, di protozoi in particolare, a livello della regione amino-terminale di 150 residui corrispondente al sito catalitico della molecola. Tuttavia, come mostrato in Fig. 25 (si trova nel file allegato), una restrizione del confronto con la sequenza di Er-MsrB1 mette in rilievo come, pur non verificandosi variazioni significative nei siti deputati all'attività enzimatica e, in primis, a livello della sequenza Arg<sub>121</sub>-Tyr-Cys-Ile-Asn-Ser<sub>126</sub>, vengano a mancare i motivi Cys-Xxx-Xxx-Cys deputati al legame del metallo.

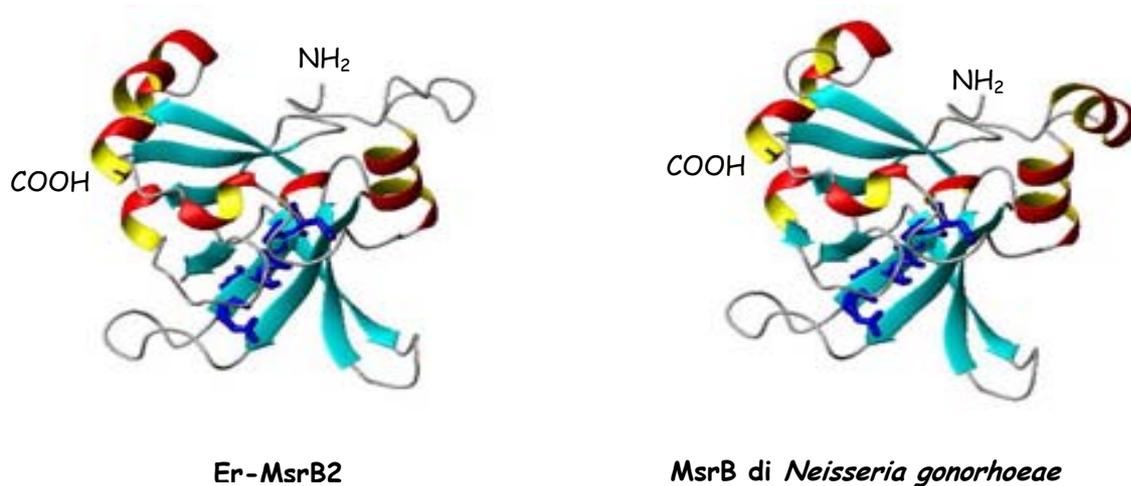
Diversamente dalla regione amino-terminale, quella rimanente di 131 residui al carbossi-terminale appare nuova e non allineabile con altre proteine presenti in banca

dati. In relazione a questo fatto, la posizione di Er-MsrB2 appare ben divergente rispetto alle MsrB di *Tetrahymena* e *Paramecium* con le quali aveva, invece, mostrato di confluire Er-MsrB1. Come appare in Fig. 26, Er-MsrB2 va a costituire un ramo a se stante e separato in prossimità della base dell'albero filogenetico, suggerendo in tal modo di rappresentare una forma ancestrale rispetto a Er-MsrB1.

Per la ricostruzione della struttura tridimensionale della regione amino-terminale di Er-MsrB2, il programma "Swissmodel.expasy.org/workspace" ha individuato, come modello di riferimento, una MsrB di *Neisseria gonorrhoeae* che sostanzialmente rappresenta la regione carbossi-terminale di una molecola più grande, la cui regione amino-terminale è invece formata da una Msr di tipo A. Come mostrato nelle Fig. 27 (si trova nel file allegato) e 28, dal confronto emerge una forte sovrapposizione strutturale tra le due molecole. La variazione più evidente riguarda l'assenza di una struttura ad elica  $\alpha$  a livello dell'amino terminale di Er-MsrB2, struttura che invece caratterizza l'amino-terminale della MsrB di *N. gonorrhoeae*.



**Fig. 26.** Inserimento della sequenza di Er-MsrB2 in un albero filogenetico basato sulle sequenze di MsrB di altri protozoi e sul programma MegAlign, metodo CLUSTALW (Gonnet, 2007). I numeri di accesso in GenBank/EMBL database delle MsrB utilizzate sono: *Paramecium tetraurelia*, XP\_001426263; *Tetrahymena termophila*, XP\_001019714; *Dictyostelium discoideum*, XP\_635358; *Leishmania major*, CAJ05724; *Trypanosoma brucei*, XP\_829255; *Trypanosoma cruzi*, XP\_817746; *Giardia lamblia*, XP\_779636.



**Fig. 28.** Modello di struttura tridimensionale della regione amino-terminale di Er-MsrB2 dedotto dal confronto con la struttura nota di MsrB di *Neisseria gonorrhoeae*. I residui coinvolti nel sito catalitico sono in blu, le eliche  $\alpha$  sono in rosso e giallo, mentre i foglietti  $\beta$  sono in celeste.

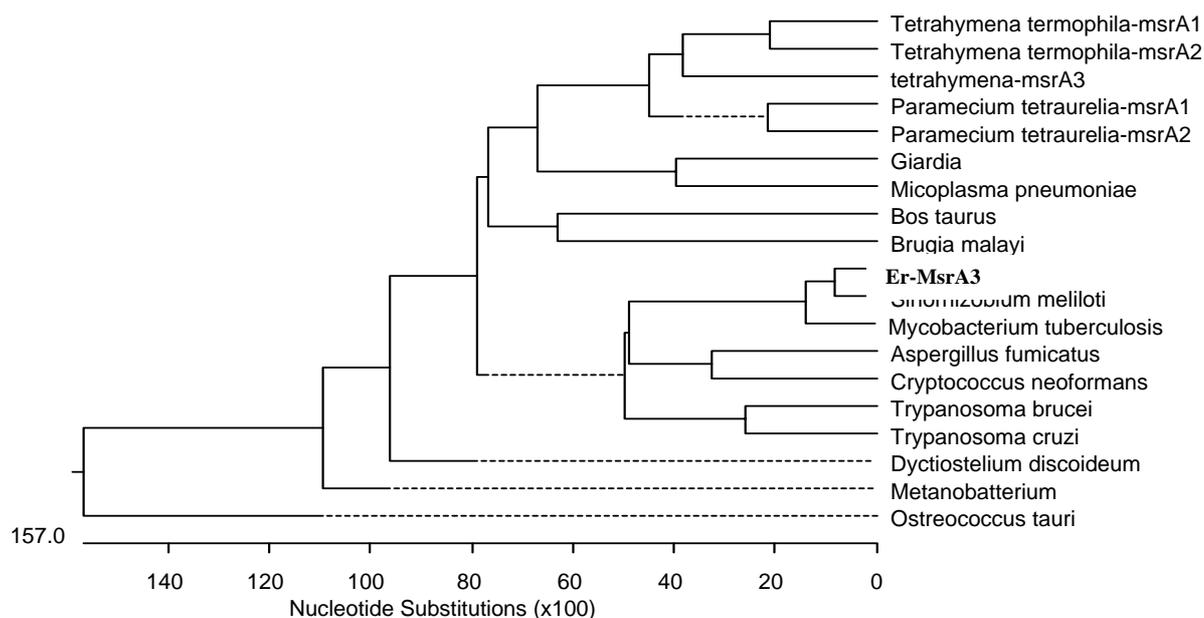
#### 4.3. Caratteristiche e correlazioni filogenetiche della proteina Er-MsrA3

La proteina Er-MsrA3 specificata dall'ORF2 del gene *Er-msrA/B* (paragrafo 3.6) comprende 168 residui e contiene, al terminale amminico, il sito catalitico tipico delle Msr di tipo A rappresentato dal motivo Gly<sub>9</sub>-Gly-Cys-Phe-Trp<sub>13</sub> (Moskovitz & al., 2000). Né al terminale aminico, né a quello carbossilico, la sua sequenza mostra motivi canonici distintivi di segnali di inserimento in membrana, motivi che sono invece presenti nelle MsrA caratterizzate nell'uomo (Lee J.W et al., 2006). E' pertanto verosimile che la sua localizzazione sia citoplasmatica.

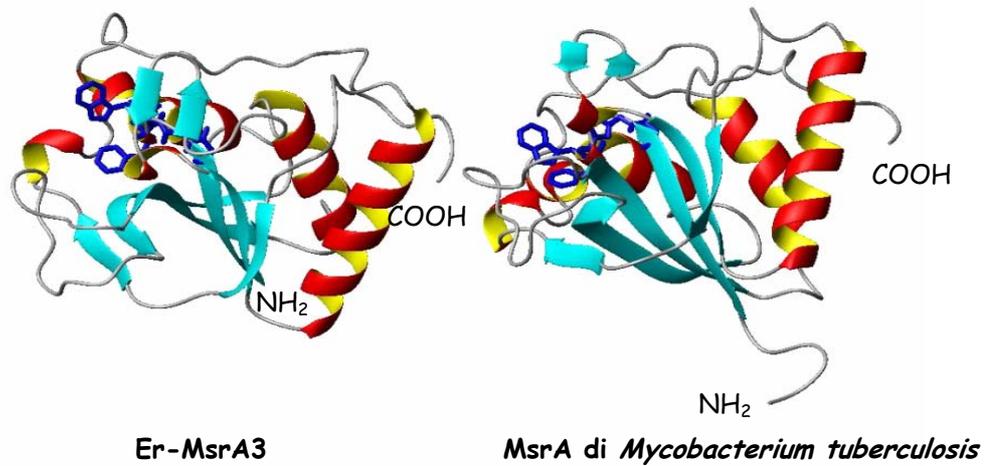
Come mostra il suo allineamento in Fig. 29 (si trova nel file allegato) con le altre MsrA note, le sue somiglianze più strette (anche dell'ordine di 87%) sono con MsrA di origine procariotica, in particolare di protobatteri. In relazione alle MsrA di eucarioti, come evidenzia anche l'albero filogenetico riportato in Fig. 30, le sue maggiori correlazioni sono con le sequenze determinate in invertebrati piuttosto che con quelle dei protozoi (nonostante che cinque appartengano a *Paramecium* e *Tetrahymena*).

Anche per Er-MsrA3 è stato delineato un modello di struttura tridimensionale dal confronto con la struttura nota di una MsrA di *Mycobacterium tuberculosis*. Come si può

evincere dalle Fig. 31 e 32, ad una stretta corrispondenza tra i residui direttamente coinvolti nell'organizzazione di strutture secondarie e ad una similarità a livello del sito catalitico, si contrappone una diversa disposizione topologica delle strutture secondarie, soprattutto dei foglietti  $\beta$ .



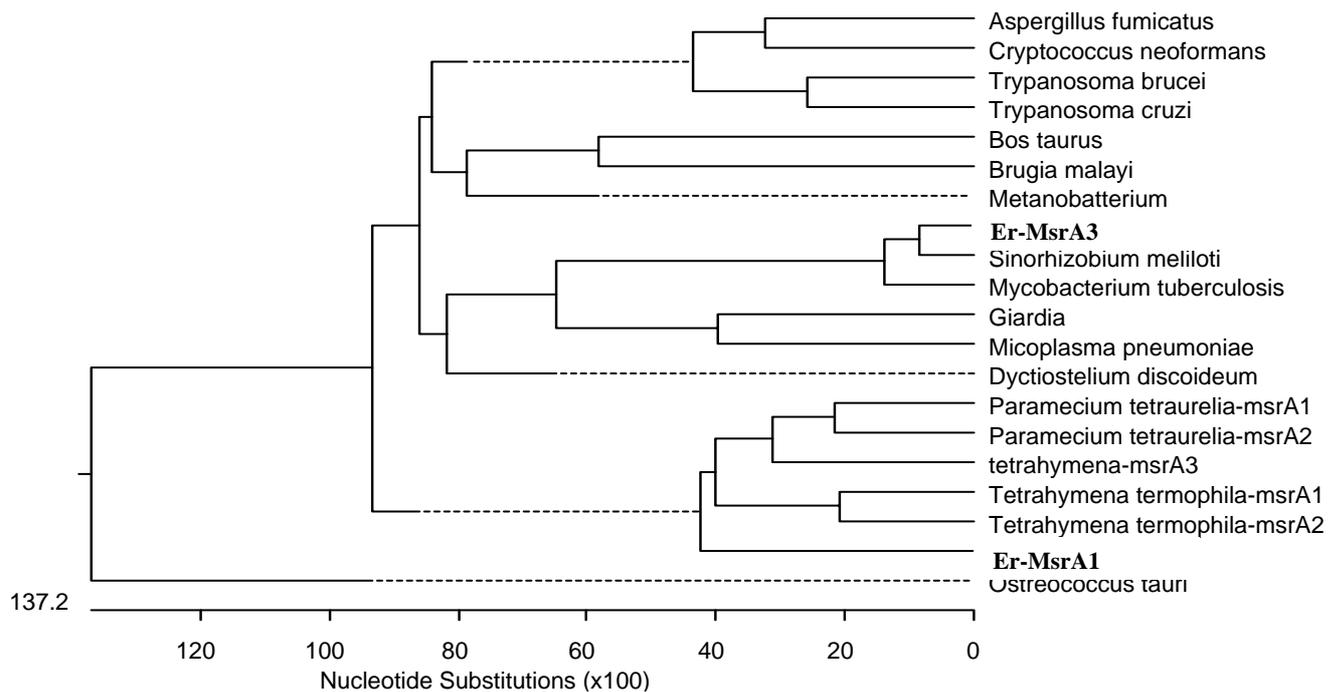
**Fig. 30.** Correlazioni filogenetiche di Er-MsrA3 con MsrA di vari organismi. I numeri di accesso nel GenBank/EMBL database delle sequenze utilizzate sono i seguenti: *Mycobacterium tuberculosis*, 1NWA\_A; *Trypanosoma cruzi*, XP\_805228; *Bos taurus*, P54149; *Aspergillus fumigatus*, XP\_749449; *Tetrahymena thermophila*, 4510703; *Tetrahymena thermophila*, 4511337 ; *Tetrahymena thermophila*, XP\_001029816; *Paramecium tetraurelia*, XP\_001446908; *Paramecium tetraurelia*, XP\_001447106; *Sinorhizobium meliloti*, NP\_436289; *Giardia lamblia*, XP\_001707631; *Mycoplasma pneumoniae*, NP\_110296; *Brugia malayi*, EDP37529; *Aspergillus fumigatus*, XP\_749449; *Cryptococcus neoformans*, XP\_572086; *Trypanosoma cruzi*, XP\_805228; *Trypanosoma brucei*, XP\_846892 ; *Dyctiostelium discoideum*, XP\_643161; *Methanothermobacter thermautotrophicus*, NP\_275678; *Ostreococcus tauri*, CAL57132.



**Fig. 32.** Modello della conformazione tridimensionale di Er-MsrA3 dedotto dal confronto con la struttura nota di una MsrA di *Mycobacterium tuberculosis*. I residui coinvolti nel sito catalitico sono in blu, le eliche  $\alpha$  in rosso e giallo, e i foglietti  $\beta$  in celeste.

#### 4.4. Aspetti strutturali della proteina Er-MsrA1

Sebbene la conoscenza ancora incompleta della sequenza aminoacidica di Er-MsrA1 imponga una nota di cautela sul significato da dare al suo confronto con le altre MsrA note, è comunque da rilevare il fatto che le sue correlazioni filogenetiche non riflettono quelle di Er-MsrA3. Diversamente da quest'ultima, che (come riportato nel paragrafo precedente) si associa più strettamente alle MsrA procariotiche, Er-MsrA1 denota l'esistenza di correlazioni più strette, come mostrato in Fig. 33, con le sequenze di *Tetrahymena* e *Paramecium*. E' quindi probabile che ci sia una divergenza evolutiva (e verosimilmente anche funzionale) piuttosto precoce tra Er-MsrA1 e Er-MsrA3.



**Fig. 33.** Correlazioni filogenetiche di Er-MsrA1 e Er-MsrA3 con MsrA di altri organismi.

#### 4.5. Aspetti strutturali delle tre isoforme della proteina Er-MsrA2

Dal confronto tra le tre sequenze aminoacidiche finora ricavate dalla parziale caratterizzazione dei geni *Er-MsrA2* (paragrafo 3.5) emergono variazioni strutturali strettamente limitate al distretto amino-terminale. Le porzioni rimanenti delle tre molecole sembrano, invece, caratterizzate da una pressoché assoluta identità di sequenza, e questa identità sembra estendersi anche alla proteina Er-MsrA3. La variazione all'amino-terminale che sembra funzionalmente più rilevante interessa l'isoforma Er-MsrA2-A. Come evidenziato in Fig. 34 (si trova nel file allegato), vi si riconosce un potenziale "peptide segnale" di 51 residui, particolarmente ricco di arginine e glicine, organizzate anche in cosiddetti "RGG-box", che rappresentano siti di metilazione da parte di metil-arginin-trasferasi. Questo peptide, per le sue caratteristiche di forte basicità, fa supporre una localizzazione nucleare della proteina Er-MsrA2-A (Mears et al., 1995).

#### 4.6. Espressione dei geni *Er-msr*

Le osservazioni condotte in *E. raikovi* sull'attività dei geni *msr* di cellule esposte a uno stress ossidativo hanno messo in evidenza un'apprezzabile divergenza nella risposta trascrizionale tra quelli che codificano le forme A delle Msr e quelli che codificano le forme B. L'espressione del gene *Er-msrB* si manifesta come costitutiva, non inducibile da stress ossidativo; l'espressione dei geni codificanti le forme A appare, invece, essere inducibile, in modo sia dose- sia tempo-dipendente. Una ragione di questa divergenza sembra risiedere nella diversa organizzazione delle regioni 5' non codificanti di questi geni.

Per quanto riguarda la regione 5' del gene *Er-msrB*, va notato che questa regione si estende per soli 49 nucleotidi e non vi si notano né elementi regolativi a sequenza nota, né sequenze che richiamino quelle degli "Sp1-binding elements" identificati nel gene codificante la MsrB1 nell'uomo (De Luca et al., 2007). Questa apparente mancanza di elementi regolativi della trascrizione nel promotore del gene *Er-msrB* porta a supporre che le concentrazioni di Er-MsrB in *Euplotes* dipendano in maggior misura dal numero di copie (grado di amplificazione) che il gene *Er-msrB* presenta nel genoma (trascritto) macronucleare e/o dalla stabilità del suo RNA messaggero. La prima possibilità riceve sostegno da quanto è noto, sempre in *E. raikovi*, per i geni dei feromoni: ad alleli più amplificati (cioè rappresentati da un più alto numero di copie) corrispondono maggiori quantità di RNA trascritto e di proteina espressa (La Terza et al., 1995). La seconda possibilità è sostenuta dal fatto che la regione 3' non codificante non contiene motivi del tipo UAAAU che in vari organismi, *Euplotes* compreso, costituiscono segnali di controllo per una rapida degradazione dell'RNA messaggero (Chen et al., 1993; Lagnado et al., 1994; La Terza et al., 2007 ).

Nel caso dei geni responsabili della sintesi delle diverse forme di Er-MsrA, le regioni 5' non codificanti sono, invece, tutte relativamente lunghe e apparentemente dotate di vari elementi strutturali (identificati, come precedentemente rilevato nella sezione dei

Risultati, sulla base dei loro motivi di sequenza) per la regolazione dell'espressione in condizioni di stress. Sembra quindi lecito concludere che *E. raikovi* si affidi all'espressione costitutiva del gene *Er-msrB* per riparare i danni ossidativi che si accumulano fisiologicamente e costantemente con l'età, e all'espressione indotta dei geni *Er-msrA* per fronteggiare i danni ossidativi che, in modo più contingente e temporaneo, possono essere causati dall'ambiente.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Berlett BS and Stadtman ER, 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.

Boschi-Muller S, Olry A, Antoine M, Branlant G, 2005. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703: 231-238

Brot N and Weissbach H, 1983. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 271-281.

Brot N and Weissbach H, 1991. Biochemistry of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Biofactors.* 3: 91-96.

Chao CC, Ma YS and Stadtman ER, 1997. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2969-2974.

Chen CA and Shyu A, 1993. AU-rich elements: characterisation and importance in mRNA degradation. *TRENDS in Biol. Sci.* 20: 465-470.

Chen JC, Advonin V, Ciorba MA, Heinemann SH, Hoshi T, 2000. Acceleration of P/Q-type inactivation in voltage-gated K<sup>+</sup> channels by methionine oxidation. *J. Biophys.* 78: 174-187.

Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N and Toshinori H, 1997. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9932-9937.

Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N, Toshinori H, 1999. Regulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett.* 442: 48-52.

De Luca A, Sacchetta P, Di Ilio C and Favalaro B, 2006. Identification and analysis of the promoter region of the human methionine sulfoxide reductase A gene. *J. Biochem.* 393: 321-329.

De Luca A, Sacchetta P, Nieddu M, Di Ilio C, Favalaro B, 2007. Important roles of multiple Sp1 binding sites and epigenetic modifications in the regulation of the methionine sulfoxide reductase B1 (MsrB1) promoter. *B.M.C. Mol. Biol.* 8: 39.

Delaye L, Becerra A, Orgel L, Lazcano A, 2007. Molecular evolution of peptide methionine sulfoxide reductases (MsrA and MsrB): on the early development of a mechanism that protects against oxidative damage. *J. Mol. Evol.* 64: 15-32.

Dini F and Nyberg D, 1992. Development of sexual maturity in the ciliate *Euplotes crassus*: sources of variation in the timing of maturity. *Dev Genet.* 13: 41-46.

Dow LK, Changela A, Hefner HE, Churchill MEA, 1997. Oxidation of a critical methionine modulates DNA binding of the *Drosophila melanogaster* high mobility group protein, HMG-D. *FEBS Lett.* 414: 514-520.

Falkowski PG, 2006. Tracing oxygen's imprint on Earth's metabolic evolution. *Science* 311: 1724-1725.

Guarente L and Kenyon C, 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408: 255-262.

Gonnet P, 2007. A simple algorithm to accelerate the computation of non-bonded interactions in cell-based molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 28: 570-573.

Ghosh S, Jaraczewski JW, Klobutcher LA and Jahn CL, 1994. Characterization of transcription initiation, translation initiation, and poly(A) addition sites in the gene-sized macronuclear DNA molecules of *Euplotes*. *Nucleic Acids Res.* 22: 214-221.

Johnson FB, Sinclair DA and Guarente L, 1999. Molecular biology of aging. *Cell* 96: 291-302.

Kantorow M, Hawse JR, Cowell TL, Benhamed S, Pizarro GO, Redd VN, Hejtmancik JF, 2004. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9654-9659.

Kim HY, Fomenko DE, Yoon YE, and Ladyshev VN, 2006. Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-S-sulfoxide reductases. *Biochemistry* 45: 13697-13704.

Kim HY, Gladyshev VN, 2004. Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol. Biol. Cell.* 15: 1055-1064.

Kim HY, Gladyshev VN, 2006. Alternative first exon splicing regulates subcellular distribution of methionine sulfoxide reductases. *B.M.C. Mol. Biol.* 16: 7-11.

Kornfelt T, Person E, Palm L, 1999. Oxidation of methionine residues in coagulation factor VIIa. *Arch. Biochem. Biophys.* 363: 43-54.

Kumar RA, Koc A, Cerny RL, Gladyshev VN, 2002. Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.* 277: 37527-37535.

Hsu Y, Narhi L, Spahr C, Langle YK, Lu H, 1996. In vitro methionine oxidation of *Escherichia coli*-derived human stem cell factor: effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization. *Protein Sci.* 5: 1165-1173.

Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ, 1994. AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol. Cell. Biol.* 14: 7984-7995.

La Terza A, Miceli C, Luporini P, 1995. Differential amplification of pheromone genes of the ciliate *Euplotes raikovi*. *Dev. Genet.* 17: 272-279.

La Terza A, Passini, V, Barchetta, S, Luporini, P, 2007: Adaptive evolution of the heat-shock response in the Antarctic psychrophilic ciliate, *Euplotes focardii*: hints from a comparative determination of the *hsp70* gene structure. *Antarctic Sci.* 19: 239-244.

Lee JW, Gordiyenko NV, Marchetti M, Tserentsoodol N, Sagher D, Alam S, Weissbach H, Kantorow M, Rodriguez IR, 2006. Gene structure, localization and role in oxidative stress of methionine sulfoxide reductase A (MSRA) in the monkey retina. *Exp. Eye Res.* 82: 816-827.

Levine RL and Stadtman ER, 1996. Protein modifications with aging. In: *Handbook of the Biology of Aging*. Schneider EL and Rowe JW, eds., Academic Press, pp. 184-197.

Liu A, Luginbühl P, Zerbe O, Ortenzi C, Luporini P, Wüthrich K, 2001. NMR structure of the pheromone Er-22 from *Euplotes raikovi*. *J. Biomol. NMR* 19: 75-78.

Lu HS, Fausset PR, Narhi LO, Horan T, Shinagawa K, Shinamoto G, Boone TC, 1999. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity. *Archiv. Biochem. Biophys.* 362: 1-11.

Luginbühl P, Ottiger M, Mronga S, Wüthrich K, 1994. Structure comparison of the NMR structures of the pheromones Er-1, Er-10, and Er-2 from *Euplotes raikovi*. *Protein Sci.* 3: 1537-1546.

Luginbühl P, Wu J, Zerbe O, Ortenzi C, Luporini P, Wüthrich K, 1996. The NMR solution structure of the pheromone Er-11 from the ciliated protozoan *Euplotes raikovi*. *Protein Sci.* 5: 1512-1522.

Luporini P, Alimenti C, Ortenzi C, Vallesi A, 2005. Ciliate mating types and their specific protein pheromones. *Acta Protozool.* 44:89-101.

Luporini P, Vallesi A, Alimenti C, Ortenzi C, 2006. The cell-type specific signal proteins (pheromones) of protozoan ciliates. *Curr. Pharm. Des.* 12: 3015-3024.

Lynn DH and Corliss JO, 1991. Protozoa. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol 1, Wiley-Liss, pp. 333-467.

Marchetti MA, Pizarro GO, Sagher D, DeAmicis C, Brot N, Hejtmancik JF, Weissbach F, Kantorow M, 2005. Methionine sulfoxide reductases B1, B2, and B3 are present in the human lens and confer oxidative stress resistance to lens cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:2107-2112.

Margulis L, 1993. *Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the archaean and proterozoic eons.* Freeman.

Mears WE, Lam V, Rice SA, 1995. Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J. Virol.* 69: 935-947.

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

Mickleburgh I, Chabanon H, Nury D, Fan K, Burtle B, Chrzanowska-Lightowlers Z, Hesketh J, 2006: Elongation factor 1a binds to the region of the metallothionein-1 mRNA implicated in perinuclear localization—importance of an internal stem-loop. *RNA* 12: 1397-1407.

Miyake A, 1996. Fertilization and sexuality in ciliates. In: *Cell as organisms* Hausmann K, Bradbury PC, (Eds) , *Ciliates* , Gustav Fischer, pp:243-290.

Moskovitz J, 2005. Roles of methionine sulfoxide reductases in antioxidant defense, protein regulation and survival. *Curr. Pharm. Des.* 11: 1451-1457.

Moskovitz J, 2005. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1703: 213-219.

Moskovitz J, Weissbach H, Brot N, 1996. Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2095-2099.

Moskovitz J, Poston JM, Berlett BS, Nosworthy NJ, Szczepanowski R, Stadtman ER, 2000. Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J. Biol. Chem.*, 275: 14167-14172.

Nabuchi Y, Fujiwara E, Ueno K, Kuboniwa H, Asoh Y, Hidetoshi U, 1995. Oxidation of recombinant human parathyroid hormone: effect of oxidized position on the biological activity. *Pharma. Res.* 12: 2049-2052.

Nystrom T, 2002. Translational fidelity, protein oxidation, and senescence: lessons from bacteria. *Ageing Res. Rev.* 1: 693-703.

Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA, 1990. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamin synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5144-5147.

Olry A, Boschi-Muller S, Marraud M, Sanglier-Cianferani S, Van Dorsselaar A, Branlant G, 2002. Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 277: 12016-12022.

Ortenzi C and Luporini P, 1995. Competition among homologous polypeptide pheromones of the ciliated *Euplotes raikovi* for binding to each other's cell receptors. *J. Euk. Microbiol.* 42: 242-248.

Ortenzi C, Alimenti C, Luporini P, 2003. Cell aging and pheromone oxidation in *Euplotes*. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Congress of Protistology*. P 57 (Abstract).

Orr WC and Sohal RS, 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-1130.

Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL, 1998. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* 19: 171-174.

Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S, 2003 : CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res.* 31: 3763-3766.

Rose TM, 2005: CODEHOP-mediated PCR - a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *J. Virol.* 2:20.

Rouhier N, Vieira Dos Santos C, Tarrago L, Rey P, 2006. Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynth. Res.* 89: 247-262.

Ruan H, Tang XD, Chen ML, Joiner ML, Sun G, Brot N, Weissbach H, Heinemann SH, Iverson L, Wu CF, Toshinori H, 2002. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2748-2753.

Salas-Marco J, Fan-Minogue H, Kallmeyer AK, Klobutcher LA, Farabaugh PJ, Bedwell DM, 2006. Distinct paths to stop codon reassignment by the variant-code organisms *Tetrahymena* and *Euplotes*. *Mol. Cell. Biol.* 26: 438-447.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schmitt AP and McEntee K, 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5777-5782.

Sherr CJ and DePinho RA, 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102: 407-410.

Sharov VS, Ferrington DA, Squier TC, Schoneich C, 1999. Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* 455: 247-250.

Sharov VS and Schoneich C, 2000. Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 986-994.

Sohal ER and Weindruch R, 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63.

Spear N and Aust SD, 1995: Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 317: 142-148.

Stadtman ER, 1992. Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224.

Stadtman ER and Levine RL, 2000. Protein oxidation. *Ann. N Y Acad. Sci.* 899: 191-208.

Teh LC, Murphy LJ, Hug NL, Surus SA, Friesen HG, Lazarus L, Chapman GE, 1987. Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomammotropin. Effects on receptor binding and biological activities. *J. Biol. Chem.* 262: 6472-6477.

Vallesi A, Ballarini P, Di Pretoro B, Alimenti C, Miceli C, Luporini P, 2005: Autocrine, mitogenic pheromone receptor loop of the ciliate *Euplotes raikovi*: pheromone-induced receptor internalization. *Eukaryot. Cell.* 4: 1221-1227.

Vallesi A, Giuli G, Bradshaw RA, Luporini P, 1995. Autocrine mitogenic activity of pheromone produced by the protozoan ciliate *Euplotes raikovi*. *Nature* 376: 522-524.

Vannini C, Rosati G, Verni F, Petroni G, 2004. Identification of the bacterial endosymbionts of the marine ciliate *Euplotes magnicirratu*s (Ciliophora, Hypotrichia) and proposal of '*Candidatus Devosia euplotis*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1151-1156.

Van Pattern SM, Hanson E, Asconi R, Zhang K, Manavalan P, Cole ES, McPherson JM, Edmunds T, 1999. Oxidation of methionine residues in antithrombin- effects on biological activity and heparin binding. *J. Biol. Chem.* 274: 10268-10276.

Vogt W, 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 93-105.

Yan JE, Levine RL, Sohal RS, 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11168-11172.

Weiss MS, Anderson DH, Raffioni S, Bradshaw RA, Ortenzi C, Luporini P, Eisenberg D, 1995. A cooperative model for ligand recognition and cell adhesion: evidence from the molecular packing in the 1.6 Å crystal structure of the pheromone Er-1 from the ciliate protozoan *Euplotes raikovi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10172-10176.

Wheitelegge JP, Penn B, To T, Johnson J, Waing A, Shermann M, Stevens RL, Fluharty CB, Faull KF, Fluharty AL, 2000. Methionine oxidation within the cerebroside-sulfate activator protein (CSAct or Saposin B). *Pro. Sci.* 9: 1618-1630.

Wiedenheft B, Mosolf J, Willits D, Yeager M, Dryden KA, Young M, Douglas T, 2005. An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10551-10556.

## 6. RINGRAZIAMENTI

Dedico tutti gli sforzi ed il lavoro di questi tre anni di Dottorato alle persone che mi vogliono bene e che mi sono sempre state accanto, sostenendomi ed incoraggiandomi; per questo, non smetterò mai di amarle e ringraziarle!

Un ringraziamento particolare desidero rivolgerlo anche ai Professori Claudio Alimenti, Paola Bagnoli, Fernando Dini, Antonietta La Terza, Piero Luporini, Giulio Petroni, Adriana Vallesi e Franco Verni per i loro preziosi suggerimenti e critiche costruttive che mi hanno molto aiutato nello svolgimento e la preparazione di questa tesi.