

Università degli studi di Napoli Federico II



Facoltà di Scienze MM.FF.NN

**Dottorato di Ricerca in Biologia applicata
XXII ciclo**

“Curriculum microbiologico”

Attività microbica, localizzazione cellulare e meccanismo
d'azione di ribonucleasi isolate da pesci.

**Coordinatore:
Prof. Ezio Ricca**

**Tutore:
Prof. Mario Varcamonti**

**Dottoranda:
Dott.ssa Anna Zanfardino**

Indice

1. Introduzione:

1.1 Le Ribonucleasi: principi generali.....	pag. 9
1.2 Le Ribonucleasi isolate da pesci.....	pag. 12
1.3 Le defensine: peptici antibatterici.....	pag. 22
1.4 Patologie ittiche.....	pag. 25
1.5 Scopo della tesi.....	pag. 31

2. Materiali e metodi:

2.1 Ceppi batterici Gram negativi.....	pag. 34
2.2 Ceppi batterici Gram positivi.....	pag. 34
2.3 Mezzi di coltura.....	pag. 35
2.4 Antibiotici.....	pag. 35
2.5 Vettori.....	pag. 36
2.6 Reazione di polimerizzazione a catena (PCR).....	pag. 37
2.7 Mutagenesi sito-specifica mediante <i>GeneSOEing (Splicing by Overlap Extention)</i>	pag. 38
2.8 Elettroforesi su gel di agarosio.....	pag. 40
2.9 Tecniche di clonaggio.....	pag. 41
2.10 Preparazione di cellule batteriche competenti.....	pag. 43
2.11 Trasformazione di cellule di <i>E. coli</i>	pag. 43
2.12 Espressione in cellule procariotiche.....	pag. 44

2.13	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE)...	pag. 46
2.14	Colorazione di gel di poliacrilammide con Comassie.....	pag. 47
2.15	Tecniche cromatografiche.....	pag. 48
2.16	Inattivazione di ribonucleasi con acido iodoacetico (IAA).....	pag. 49
2.17	Inattivazione di ribonucleasi al calore.....	pag. 50
2.18	Saggi di attività microbica.....	pag. 50
2.19	Saggi di proteolisi.....	pag. 51
2.20	Estrazione delle proteine.....	pag. 52
2.21	Determinazione della concentrazione proteica.....	pag. 53
2.22	Compartimentalizzazione cellulare.....	pag. 53
2.23	Elettrotrasferimento di proteine e <i>western blot</i>	pag. 54
2.24	Marcatura della proteina zf-RNasi-3 con la molecola <i>Alexa Fluor 488</i>	pag. 55
2.25	Saggi spettrofluorimetrici.....	pag. 56

3.Risultati:

3.1	Espressione e purificazione di ribonucleasi da salmone atlantico (<i>Salmo salar</i>).....	pag. 59
3.2	Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi su batteri Gram negativi.....	pag. 61
3.3	Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi su batteri Gram positivi.....	pag. 61

Gram positivi.....	pag. 62
3.4 Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi dopo alchilazione e denaturazione al calore.....	pag. 64
3.5 Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi dopo trattamento con cloruro di sodio (NaCl).....	pag. 66
3.6 Espressione e purificazione di ribonucleasi da <i>zebrafish</i>	pag. 69
3.7 Saggi di attività microbica delle zf-RNasi su batteri Gram negativi.....	pag. 70
3.8 Saggi di attività microbica delle zf-RNasi su batteri Gram positivi.....	pag. 72
3.9 Saggi di attività microbica delle zf-RNasi su batteri Gram negativi dopo inattivazione chimica e al calore.....	pag. 73
3.10 Saggi di attività microbica della zf-RNasi-3 su batteri Gram negativi e positivi.....	pag. 76
3.11 Proteolisi della proteina zf-RNasi-3 dopo trattamento con <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	pag. 78
3.12 Processamento proteasi - dipendente in <i>E. coli</i>	pag. 80
3.13 Isolamento della proteasi di <i>E. coli</i>	pag. 81
3.14 Creazione di un mutante nel sito proteolitico di zf-RNasi-3.....	pag. 83
3.15 Proteolisi del mutante di zf-RNasi-3 dopo trattamento con <i>E. coli</i>	pag. 85

3.16 Attività microbica di zf-RNasi-3 <i>wild type</i> e mutante su <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	pag. 86
3.17 Purificazione della banda da 10.5 kDa e saggi di attività su <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	pag. 87
3.18 Sintesi in vitro del peptide iniziale di 30 aa e saggi di attività su <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	pag. 90
3.19 Saggi di attività microbica della proteina zf-RNasi-3 e di LF-zf3 dopo trattamento con cloruro di sodio (NaCl).....	pag. 93
3.20 Saggio di proteolisi su zf-RNasi-3 in presenza di NaCl.....	pag. 94
3.21 Localizzazione cellulare di zf-RNasi-3 <i>wild type</i> in cellule di <i>E. coli</i>	pag. 95
3.22 Localizzazione cellulare di zf-RNasi-3 <i>w.t.</i> in cellule di <i>S. aureus</i>	pag.97
3.23 Localizzazione cellulare della proteina di 10.5 kDa (LF-zf3) in cellule di <i>E. coli</i>	pag. 98
3.24 Localizzazione cellulare della proteina di 10.5 kDa in cellule di <i>S. aureus</i>	pag. 99
3.25 Localizzazione cellulare della proteina zf-RNasi-3 <i>w.t.</i> in cellule di <i>E. coli</i> con microscopia a fluorescenza.....	pag. 100
3.26 Meccanismo d'azione di zf-RNasi-3.....	pag. 104

4. Discussione

5. Bibliografia

1.Introduzione

1.1 Le Ribonucleasi: principi generali

Le ribonucleasi (RNasi) costituiscono una grande superfamiglia di proteine ad attività enzimatica capaci di degradare l'acido ribonucleico (RNA), il cui capostipite è rappresentato dalla ribonucleasi pancreatica bovina, la Ribonucleasi A (figura 1).

La superfamiglia delle RNasi A si può dividere in altre sottofamiglie:

- * RNasi 1, che comprende tutte le ribonucleasi di tipo pancreatico, inclusa l'RNasi A;
- * RNasi 2, che comprende le ribonucleasi di tipo neurotossico, anche conosciute come EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin) e le ECP (Eosinophil Cationic Protein), in quanto isolate inizialmente come neurotossine e solo successivamente caratterizzate come ribonucleasi;
- * RNasi 3, che comprende alcune ribonucleasi presenti nel siero e nel fegato umano;
- * RNasi 4, che comprende le ribonucleasi identificate in anfibi, rettili e negli uccelli;
- * RNasi 5, che comprende le ribonucleasi con attività angiogenica, con ridotta attività ribonucleasica, ma essenziali per la formazione di nuovi vasi sanguigni.

Molti membri di tale superfamiglia mostrano attività biologiche importanti correlate alla loro attività ribonucleasica come ad esempio l'angiogenina umana (hAng) la quale promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni.

Rappresentanti della superfamiglia sono stati trovati nei mammiferi, negli anfibi, nei rettili e negli uccelli ma mai fino ad ora nei pesci.

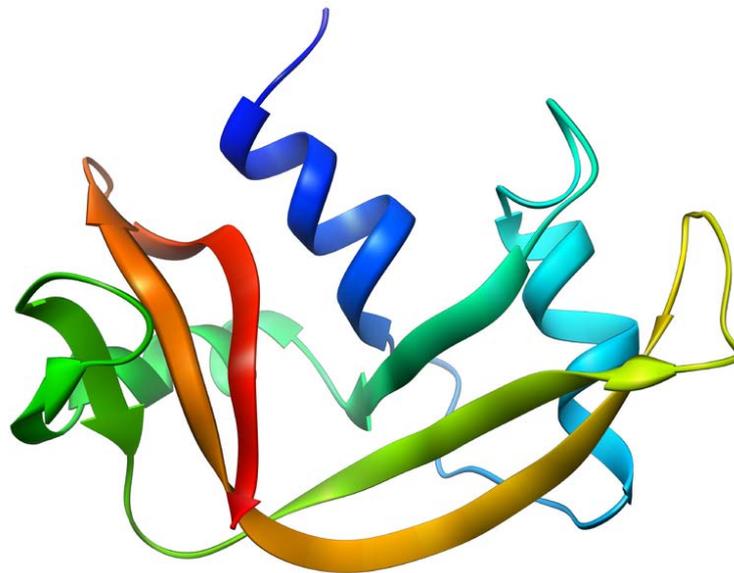


Figura 1: Rappresentazione tridimensionale dell'RNasiA .

La RNasi A, una delle prime proteine ad essere stata sequenziata e analizzata, è un piccolo enzima (124 residui, 13.7kDa), con una struttura compatta e molto stabile formata da 5 filamenti β e da 3 α -eliche (figura 1).

La sua stabilità è da imputare, oltre ai legami a idrogeno intracatena, soprattutto a quattro ponti disolfurici (figura 2) tra i residui cisteinici 40-95, 26-84, 58-110 e 65-72. Il sito catalitico delle proteine dell'intera superfamiglia, risulta essere essenzialmente costituito da due istidine e una lisina che nella Ribonucleasi A corrispondono alle istidine 12 e 119 e alla

lisina 41 (Raines, R., 1998). In base al meccanismo di reazione proposto (figura 3), l'istidina 12 funge da base strappando il protone all'ossigeno in 2' del ribosio dal lato 3' del legame suscettibile alla rottura; tale ossigeno, reso più nucleofilo dalla perdita dell'idrogenione, attacca l'atomo di fosforo del legame da tagliare; l'istidina 119 si comporta da acido donando il protone all'ossigeno in 5' del ribosio a valle del legame da rompere che in questo modo diventa un migliore gruppo uscente. La lisina 41, svolge un ruolo essenziale nella catalisi, in quanto stabilizza l'intermedio di transizione che ha la geometria di una bipyramide trigonale, con i due atomi di ossigeno (2' di un ribosio e 5' dell'altro) ai vertici.

Il prodotto di tale reazione è costituito da due frammenti di RNA di cui uno termina con il fosfato 2'-3' ciclico e l'altro con il 5'-OH.

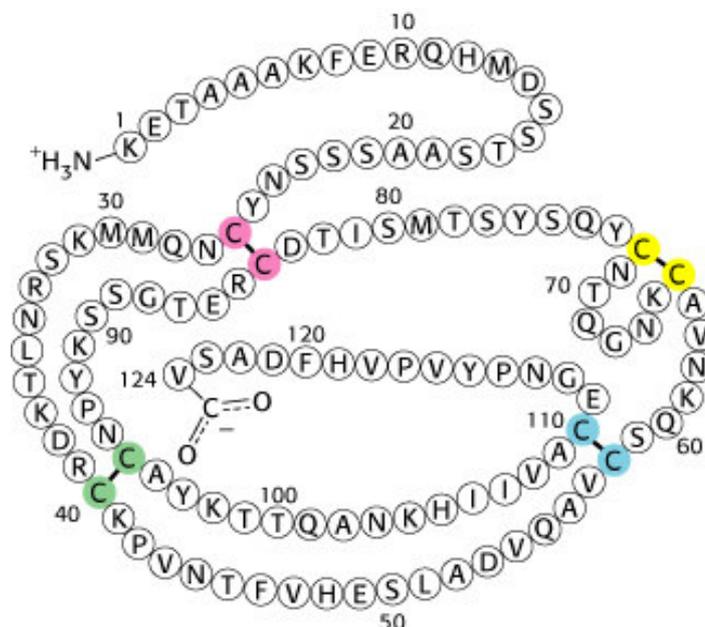


Figura 2: Struttura della ribonucleasi pancreatica bovina (RNasiA): il capostipite della superfamiglia delle ribonucleasi extracellulari dei tetrapodi; è mostrata la sua sequenza amminoacidica nella quale sono stati messi in evidenza i quattro ponti disolfurici.

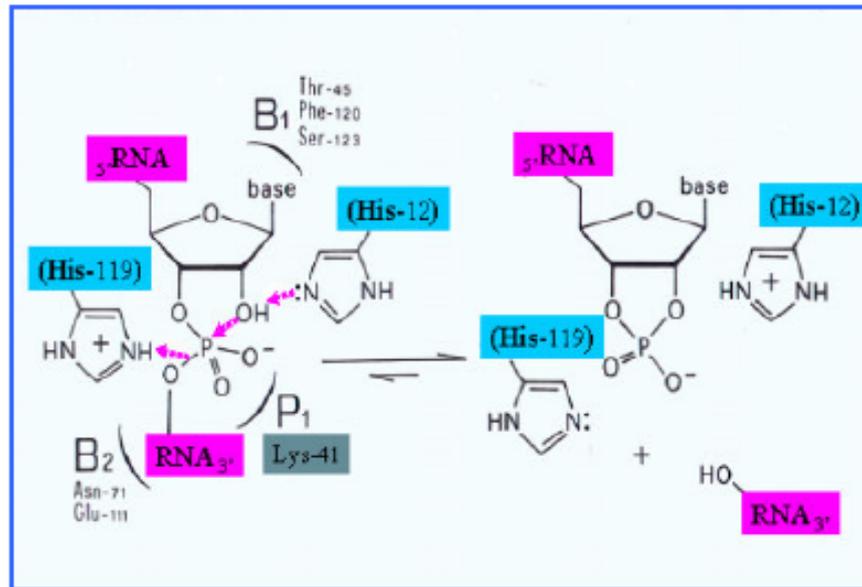


Figura 3: Meccanismo catalitico degli enzimi appartenenti alla superfamiglia della RNasi A. Il sito catalitico delle ribonucleasi è costituito da tre amminoacidi: His-12, Lys-41 e His-119.

Le ribonucleasi di tipo pancreatico, inoltre, sono capaci di idrolizzare nucleotidi ciclici prodotti dalla reazione di transesterificazione (Raines, R.,1998) con una reazione nella quale His-14 e His-119 si scambiano i ruoli fungendo in questo caso la prima da acido e la seconda da base.

1.2 Le ribonucleasi isolate da pesci

Negli ultimi anni si sono intensificati gli studi che hanno avuto come oggetto le Ribonucleasi, cercando sequenza omologhe a quelle dei mammiferi o più in generale dei tetrapodi, in altri organismi filogeneticamente più lontani quali i pesci. Da recenti lavori pubblicati su

note riviste scientifiche emergono studi che mettono in luce proprietà speciali di alcune Ribonucleasi isolate proprio da pesci, come ad esempio l'attività citotossica nei confronti di cellule procariotiche.

Sono state isolate e successivamente purificate, in questi ultimi anni, cinque proteine di *Danio rerio* (*zebrafish*), denominate zf-RNasi, che mostrano una significativa identità di sequenza con l'RNasi A e con l'hAng e altre due sono state isolate da *Salmo salar*, (salmone atlantico), denominate Ss - RNasi.

La caratterizzazione funzionale di tali proteine ne ha confermato l'attività ribonucleasica e due di esse hanno evidenziato anche una considerevole attività angiogenica mostrando così una correlazione con ribonucleasi isolate precedentemente in tetrapodi e in mammiferi. Le ribonucleasi extracellulari dei tetrapodi costituiscono una grande superfamiglia di proteine enzimatiche a rapida evoluzione che catalizzano la degradazione dell'RNA; i membri di tale superfamiglia, il cui capostipite è costituito dall'RNasi A, mostrano una identità di sequenza che va dal 30% al 90% sia all'interno della stessa specie che tra specie diverse. Tali enzimi discendono da un unico gene ancestrale attraverso un processo di evoluzione divergente, degradano l'RNA con lo stesso meccanismo catalitico e possiedono strutture tridimensionali molto simili, se non identiche (Beintema, J. J., et al., 1997; Beintema, J. J., 1998).

Come accennato precedentemente, le ribonucleasi animali extracellulari sono state isolate da vari tessuti di molte specie diverse ma, sorprendentemente, non sono mai state individuate nei pesci, unica classe di vertebrati in cui tale enzima sembrava essere assente nonostante la loro vicinanza evolutiva con i tetrapodi ed in special modo con gli anfibi.

Per quanto riguarda le ribonucleasi isolate dal salmone atlantico, è noto in letteratura che l'attività angiogenica di queste proteine è strettamente dipendente dal corretto funzionamento dell'attività RNasica, Mentre esperimenti riguardanti l'attività citossica sono stati compiuti dal nostro gruppo di lavoro. (Pizzo et al., 2008).

L'analisi conformazionale della stabilità delle due RNasi, ha mostrato la tipica stabilità della superfamiglia delle RNasi e l'enzima Ss2 risulta inoltre più resistente alla denaturazione termica e chimica.

Come appare in figura 4, le diverse RNasi isolate da pesci, mostrano la presenza di una triade catalitica costituita dalla His-12, His-119 e Lys-41 indispensabile al loro corretto funzionamento, oltre ad una sequenza consenso CKXXNTF peculiare della superfamiglia delle RNasi.

```

Ss-RNase1  ----QPANIESRYQQFLRQEVKGDMT-MQKCQGVMG---YLELTESDGKTCRKN  47
Ss-RNase2  -----DVNQYNHFLKQHV D GEMT-TLKCKSQME---ILNLNRPD-RKCR LKN  43
zf-RNase1  -----HVKERYKNFLNQHVGP DMS-VQRCNSEIGPNNRKITLSGTDNGCRKPN  47
zf-RNase2  -----DNESPYEKFLRQHVDP DMS-VQRCNSEIS--KRKITAK-AGNDCRKN  44
zf-RNase3  -----EIRRRYEHFLTQHVYGGIT-EQTCDRVMR--QRRITRFPTGNDCKEVN  45
zf-RNase4  -----QSYNDFKRKELAPAGMKEDDCTTLIVT----ERKIKEKNCCKIN  41
                                     *                               *

Ss-RNase1  TFIKANSNQVRAICTGGGT--PRGRDQVQSTNSFPVVICRHIGGDR-----YPHCYRGG  99
Ss-RNase2  TFI LANPDQVQAICTGGGT--LKGNNLVQSNKPFVVICHTHTGGES-----HPNCTYKGG  95
zf-RNase1  TFI LANKRLIKTVCGRAGS--PQG-NMVRSNQPFVVKCVLNNGER-----HPYCEYRGG  98
zf-RNase2  TFIQANKRDVNAVCGNAGNRVVDNLTLSNQPFPVVTQQLKSGER-----RPHCQYRGG  97
zf-RNase3  TFIQANGNHVRTVCTGGGTRQTDNRDLYSNNQFTVITCTLRSGER-----HPNCRYRGG  99
zf-RNase4  TFI LETEDKIKGVCNTPATD-----GKNHKGTFVINCTKIENIID-----CKYNG  88
                                     *                               *

Ss-RNase1  SPPSTRKVVIACEQE-WPVEYGGDIIVV-----  126
Ss-RNase2  S-SATKKVIIACDGK-FPVEYDGDVDIGITDGK-----  126
zf-RNase1  T-RSTRYIVLKCEEG-WPVEYHEDEVNVG-----  125
zf-RNase2  R-SSTRYIVLRCDKG-WPVEYDEGIIDVNSSG-----  127
zf-RNase3  K-ESSRKIVVACEGE-WPVEYKGVV-----  123
zf-RNase4  VKRTTD-IILTCENR-LPVEYGRSNNNS-----  113
                                     *

```

Figura 4: Allineamento amminoacidico delle sequenze omologhe di RNasi isolate da zebrafish (zf - RNasi) e dal salmone atlantico (ss - RNasi). I residui essenziali per i meccanismi catalitici e le sequenze consensus sono mostrate in bianco su uno sfondo nero; i residui di Cys sono mostrati con gli asterischi; i residui conservati in tutte le sequenze, sono evidenziati in grigio ([Pizzo et al., 2008](#)).

La mappatura dell'intero genoma di *zebrafish*, un piccolo pesce tropicale utilizzato negli studi di sviluppo embrionale, effettuata dal Sanger Institute (Cambridge, UK), ha permesso di individuare in tale organismo la presenza di quattro sequenze genomiche codificanti, caratterizzate da una significativa identità con l'RNasi A e una identità di sequenza ancora superiore con le angiogenine di mammifero. L'analisi delle sequenze delle proteine, effettuata con il software basato sull'algoritmo BLAST, in grado di identificare sequenze simili tra loro, ha confermato l'omologia di sequenza con le RNasi dei tetrapodi e, in modo particolare, ha sottolineato la loro maggiore identità di sequenza con le angiogenine umane (figura 5).

% identità	zf-RNasi 1	zf-RNasi 2	zf-RNasi 3	zf-RNasi 4
RNasi A	31.3	33.3	30.8	20.1
hANG	35.4	36.2	36.2	29

Figura 5: Similarità di sequenza delle 4 zf-RNasi nei confronti delle sequenze amminoacidiche della RNasi A e dell'angiogenina umana.

Le proteine identificate in *zebrafish* mostrano delle caratteristiche di sequenza interessanti: in esse, infatti, le regioni che consentono alle angiogenine di mammifero di esplicare la loro attività biologica sono solo parzialmente conservate come dimostra l'analisi condotta con ClustalW (un software utilizzato nell'ambito della bioinformatica, per l'allineamento multiplo di biosequenze e la costruzione di alberi filogenetici). Sulle suddette sequenze, si è rilevata l'assenza dei residui chiave per l'attività angiogenica: N61-G62 e N109-G110. Mentre risultano conservati i residui essenziali per estrinsecare l'attività ribonucleasica e cioè la triade catalitica costituita dalla His-12, His-119 e Lys-41 oltre alla sequenza consenso.

La maggior parte delle ribonucleasi di mammifero presenta quattro ponti disolfurici che ne stabilizzano la struttura; invece le angiogenine e le ribonucleasi isolate da anfibi, rettili e uccelli ne posseggono tre; caratteristica comune anche per i pesci, infatti tale peculiarità si evince

nelle sequenze analizzate in *zebrafish*, in cui sono presenti sei cisteine che rendono possibile la formazione di tre soli ponti disolfurici.

Inoltre, nelle proteine di *zebrafish*, alcuni residui aminoacidici caratteristici delle angiogenine di mammifero sono sostituiti da altri residui che farebbero ipotizzare un maggiore potere catalitico come ribonucleasi.

Ma in effetti, analogamente alle angiogenine, tutte le zf-RNasi hanno una modesta attività degradativa, come mostrato in figura 6.

	<i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_m (M⁻¹ s⁻¹)
RNasi A	1.6 ± 0.16 · 10⁷
hAng	1.3 ± 0.12 · 10³
zf-RNasi 1	2.3 ± 0.25 · 10³
zf-RNasi 2	6.3 ± 0.5 · 10²
zf-RNasi 3	6.0 ± 0.74 · 10³
zf-RNasi 4	1.6 ± 0.16 · 10⁵

Figura 6: Efficienza catalitica delle zf-RNasi, della RNasi A e dell'angiogenina umana.

Oltre alle analisi delle proprietà funzionali, le 4 RNasi identificate in *zebrafish* sono state ampiamente caratterizzate anche dal punto di vista

strutturale, e per due di esse è stata risolta la struttura tridimensionale (Kazakou et al.) (figura 7). L'analisi strutturale di zf-RNasi 1 e zf-RNasi 3, ha evidenziato che esse condividono all'interno della superfamiglia una maggiore similarità con le angiogenine.

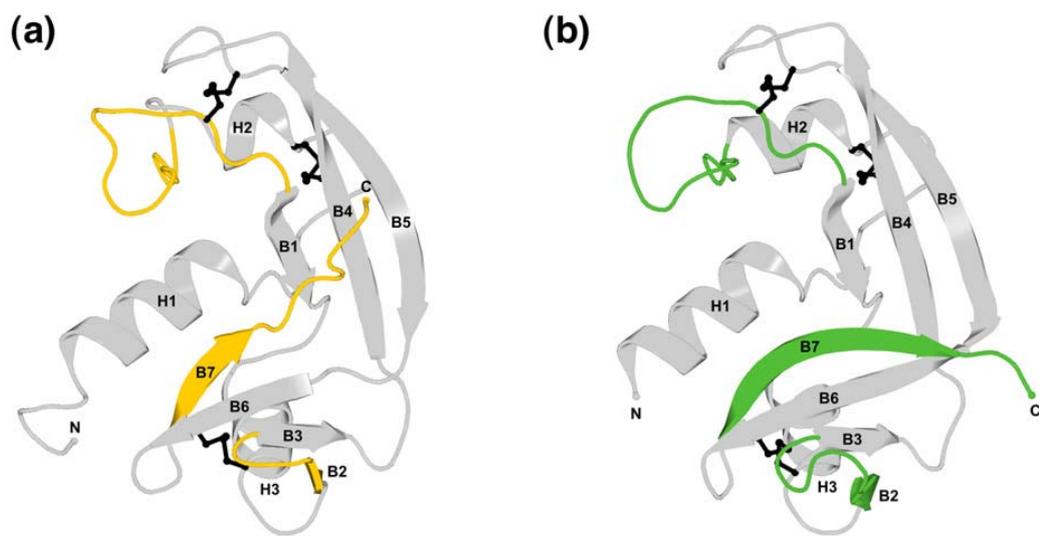


Figura 7: Struttura tridimensionale di zf-RNasi 1 (a) e zf-RNasi 3 (b). Le α -eliche sono indicate dalla lettera H, mentre i segmenti β sono evidenziati con la lettera B

Di recente, dato il continuo aggiornamento del *Database Genomico di zebrafish* in via di completamento (<http://www.ensembl.org/daniorerio>), è stata individuata una sequenza codificante un nuovo omologo delle RNasi da vertebrati (figura 8).

a)

```
aaggttccaccagacgtagatccccggttatcaaaaattcctcaggcagcatgtggatgct
gatatgagtgtgcaaaagtgtgaccgcgcaatgagcataaaaaagatcactgccggaact
ggaaacgactgcaaagaagtcaacaccttcattcaagcgactaaagaccgtattaccacc
gtttgtggtgatgcaggaactccggtgaacaacctgtttaagagcaatcagccttttcct
gtggtcacctgtaaataaaaagtgggaacagacgcccattgtcaataccgtggtac
agcagcactcgttatatgttttgggttgataaaggctggcctgtacattatgatgaa
ggcatcattgatgtaaacaggtcaggc
```

b)

```
KVPPDVDPYQKFLRQHVDADMSVQKCDRAMSIKKITAGTGNDCKEVNTFIQATKDRITTVCG
DAGTPVNNLQKSNQPFVVTCKLKSGNRRPNCQYRGTSSSTRYIVLGC DKGWVHYDEGIIDVN
RSG
```

Figura 8: Sequenza nucleotidica (a) e aminoacidica (b) di zf-RNasi 5. In verde sono evidenziati i residui catalitici, in rosso la sequenza consenso, in blu le cisteine.

La proteina corrispondente, denominata zf-RNasi 5 (figura 10), condivide circa l'80% di identità di sequenza con zf-RNasi 2 (figura 9). Le due proteine presentano pertanto estese regioni identiche tra loro separate da singole sostituzioni aminoacidiche.

```

zf5  -KVPPDVDPYQKFLRQHVDADMSVQKCDRAMSIKKITAGTGNDCKEVNTFIQATKDRIT
zf2  VKVPDNESE-YEKFLRQHVDPDMSVQKCNSEISKRKITAKAGNDCKKVNNTFIQANKRDGN

zf5  TVCGDAGTPVN--NLFKSNQFPFVVTCKLKSGNRRPNCQYRGTSSSTRYIVLGCDKGWPVH
zf2  AVCGNAGNRVVDTNLTKSNQFPFVVTQCQLKSGERRPHCQYRGRSSSTRYIVLRCDKGWPVH

zf5  YDEGIIDVNRSG
zf2  YDEGIIDVNS--

```

Figura 9 : Allineamento tra zf-RNasi 2 e zf-RNasi 5

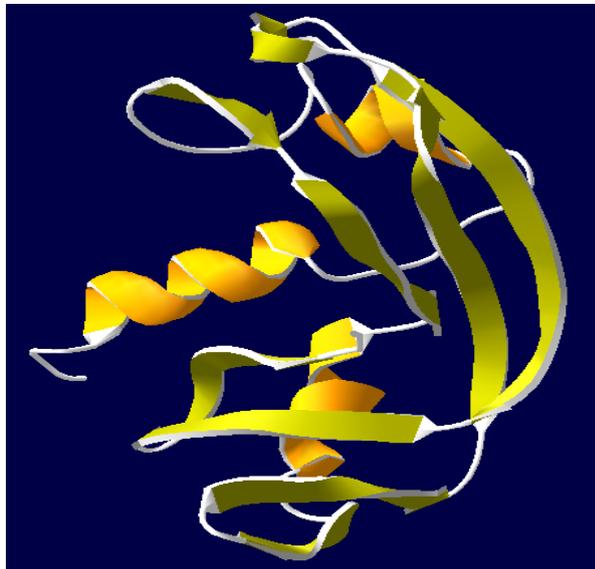


Figura 10: Modello tridimensionale di zf-RNasi 5 ottenuto utilizzando il *software* SWISSPROT (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) e come *template* la struttura nota di zf-RNasi 1

Sulla base di tali osservazioni sono state quindi proposte alcune teorie sul significato fisiologico della divergenza delle RNasi da pesci. Le principali teorie si basano sull'ipotesi che le RNasi ancestrali della superfamiglia presentavano sia proprietà angiogeniche che antipatogene e che durante l'evoluzione dei vertebrati tali caratteristiche siano state destinate a

specifiche RNasi (Pizzo et al. 2007). Ciò spiegherebbe l'elevato numero di Ribonucleasi individuate nei tetrapodi, ognuna delle quali avente specifiche proprietà funzionali.

Alla luce delle ultime scoperte possiamo dare anche qualche informazione riguardo al profilo di espressione spaziale e temporale di alcune ribonucleasi isolate in zebrafish (Pizzo et al. 2008).

Sappiamo che zf-RNasi-1 ha un pattern di espressione diverso rispetto alle zf-RNasi-2 e 3, infatti esso è unico e dinamico, ed è caratterizzato dall'espressione nello stadio di embrione, e successivamente in quello di larva, in quello giovanile ed infine anche nell'organismo adulto. Al contrario zf-RNasi-2 e 3 sono espressi solo nello stadio giovanile e nell'organismo adulto. Tuttavia le analisi dell'espressione spaziale delle ribonucleasi 1, 2 e 3 da zebrafish rilevano tre differenti trascritti nel fegato, nel cuore, nell'intestino, e nella vescica natatoria. E' molto interessante che l'unico gene ad essere espresso nel cervello dell'embrione e dell'organismo adulto è zf-RNasi-1. Tutto ciò suggerisce che le diverse ribonucleasi di *zebrafish* esplicano differenti ruoli funzionali durante lo sviluppo embrionale e più tardi nell'età giovanile, fino allo stadio di organismo adulto, rendendo così *zebrafish* un organismo modello perfetto per lo studio delle funzioni geniche. Questi studi fungono da apripista per investigare in vivo il ruolo od i ruoli funzionali delle ribonucleasi da pesci

durante lo sviluppo embrionale oppure ancora meglio durante l'organogenesi di tale modello animale.

1.3 Le defensine: peptidi antimicrobici

Le defensine fanno parte di una famiglia di peptidi evolutivamente correlati, con proprietà antimicrobiche, con una struttura β -foglietto caratteristica e sei cisteine formanti tre ponti disolfuro.

Queste molecole vengono anche definite peptidi cationici in quanto sono ricchi di arginine ed hanno un alta mobilità elettroforetica, migrando verso il polo negativo. Il loro nome è basato sull'associazione che esse hanno con il sistema immunitario contro l'ospite, infatti esse sono coinvolte nel meccanismo di difesa attraverso l'immunità innata, l'abbondanza delle defensine in natura e la similarità che esse hanno con i peptidi presenti nei leucociti umani ne hanno avvantaggiato la scoperta.

Le defensine si dividono prevalentemente in due grandi sub-famiglie le α e le β -defensine, le quali differiscono le une dalle altre per la lunghezza in aminoacidi tra un residuo di cisteina e l'altro, e per la formazione di diversi ponti disolfuro, in quanto le cisteine non si appaiano sempre allo stesso modo.

Le defensine sono state identificate in molti organismi, in mammiferi in modo particolare, sono peptidi ubiquitari, molto abbondanti nelle cellule e nei tessuti coinvolti nella difesa da infezioni provocate da procarioti patogeni (Ganz 2003).

Molte defensine mostrano una spiccata attività microbica contro cellule batteriche e funghi, specialmente se vengono saggiate in condizioni di bassa forza ionica e in presenza di limitate quantità di cationi bivalenti. Utilizzate nelle condizioni ottimali hanno un'attività antimicrobica a basse concentrazioni 1-10 µg/ml. Le defensine sono estremamente citotossiche contro batteri metabolicamente attivi. Questi peptidi hanno anche una marcata attività antivirale, per esempio in alcuni casi dopo aver diagnosticato ad un paziente l'affezione da HIV, per molti anni non vi sono manifestazioni della malattia, si pensa che in questi casi le defensine secrete dai linfociti T CD8⁺ siano responsabili della non progressione della malattia stessa. Il meccanismo d'azione con cui agiscono le defensine sembra essere ormai chiaro, esse hanno come bersaglio la membrana plasmatica, la quale viene permeabilizzata facilmente da queste molecole biologiche. La permeabilizzazione delle cellule batteriche coincide con una inibizione della replicazione, della trascrizione e della sintesi proteica, ed in generale con un decremento della sopravvivenza cellulare. In esperimenti in cui vengono usate membrane artificiali, le defensine sono in grado di permeabilizzarle, formando dei veri e propri canali quando viene applicato un potenziale negativo dal lato opposto della membrana, rispetto al punto dove avviene la somministrazione delle defensine stesse. Questo meccanismo viene confermato dal fatto che all'aumentare della forza ionica, diminuisce l'efficacia delle defensine, in quanto tendono e

destabilizzarsi i legami che si creano tra i fosfolipidi di membrana carichi negativamente e i suddetti peptidi carichi positivamente (figura 11).

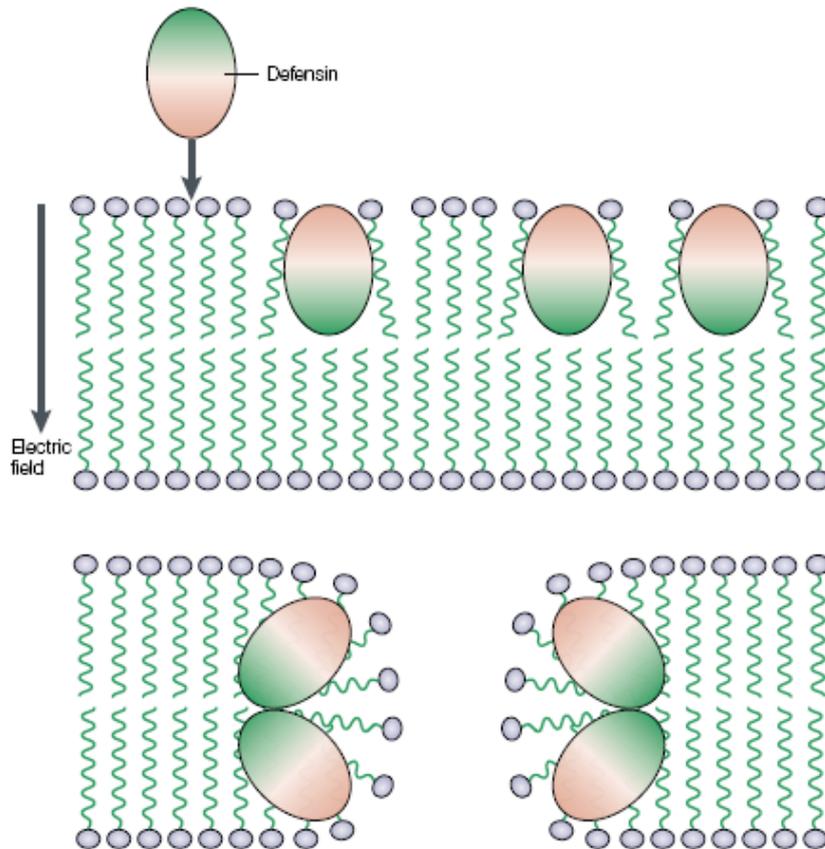


Figura 11: Meccanismo d'azione delle defensine.

Le defensine inoltre hanno attività chemotattiche per i monociti, cellule T e cellule dendritiche, alcuni tipi antagonizzano l'azione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH), legando il suo recettore senza però attivarlo. Altre defensine attivano canali per il calcio, mentre alcune altre promuovono la secrezione del cloro nelle membrane apicali delle cellule

epiteliali. Nel caso della fibrosi cistica, una malattia genetica causata da mutazioni nel gene regolatore transmembrana (CTFR), si ha un mal funzionamento dei canali del cloro, con l'aumento della concentrazione di sali nei secreti biologici, il paziente muore per complicazioni respiratorie dovute a patogeni opportunisti che ne colonizzano il suddetto tratto. In questo caso le difese vengono inattivate dall'elevata concentrazione di sali che inibiscono la permeabilizzazione della membrana dei procarioti da parte dei peptidi.

1.4 Patologie ittiche

Anche per i pesci, così come per le altre specie animali, soprattutto quelle allevate intensivamente, i batteri costituiscono l'elemento di rottura degli equilibri dell'organismo, consentendo anche il successivo verificarsi di infezioni secondarie dovute a organismi opportunisti.

Nelle acquicoltura dove vengono allevati pesci, in Italia si tratta maggiormente di trote o salmoni, i batteri patogeni rappresentano uno dei problemi più gravi alla base di danni primari quali la mortalità, la riduzione delle facoltà riproduttive e l'immunodepressione. Ma anche danni secondari derivanti dal peggioramento degli indici di conversione, disomogeneità marcata delle partite di pesce che raggiungono la pezzatura richiesta in tempi molto diversi, minore carico di pesce per metro cubo d'acqua e quindi minore redditività dell'impianto a parità di investimento,

aumento degli oneri di gestione, riconducibili ai maggiori costi per il personale, per l'alimentazione, per l'utilizzo di integrazioni alimentari e di interventi farmacologici.

Fra le malattie più frequenti e complesse da affrontare, nonché diffuse vi sono: la Flavobatteriosi di acqua fredda, la Sindrome dell'avannotto della trota iridea (RTFS), la Streptococcosi e l' *Enteric Red Mouth Disease*.

- ***Cold Water Disease***

La flavobatteriosi d'acqua fredda (*Cold Water Disease*), chiamata anche malattia del peduncolo (figura 11), si sviluppa in acque con temperature inferiori a 15°C ed è causata da *Flavobacterium psychrophilum*.



Figura 12: Classica lesione al peduncolo, causata dal microrganismo patogeno *Flavobacterium psychrophilum* in una giovane trota arcobaleno.

La flavobatteriosi evolve in forma sistemica o in forma cutanea, i segni dell'infezione sono rappresentati da letargia, anoressia, lieve melanosi, lieve anemia, notevole splenomegalia, modesto rigonfiamento renale. La sua insorgenza pare favorita dal sovraffollamento e dalla scarsa igiene ambientale.

- **Sindrome dell'avannotto della trota iridea (RTFS)**

La sindrome dell'avannotto di trota iridea (RTFS) è una malattia di recente comparsa. Il più frequente segno manifestato è l'anemia, come rivelato dalle pallide branchie e dal sangue con pochi eritrociti, se comparati con gli avannotti sani. L'intestino è tipicamente fragile e la parte caudale è infiammata perché l'ano è sporgente; la milza è allargata e con un contorno indistinto e spesso è visibile attraverso la pelle dell'addome (Figura 12). Clinicamente gli avannotti appaiono letargici, restano alla superficie dell'acqua e sono inappetenti. Altri segni sono esoftalmo e colorazione scura della pelle. Purtroppo nei confronti di tale patologia la terapia risulta spesso inefficace, a causa dell'inappetenza e dell'improvvisa comparsa degli episodi e attualmente non esistono vaccini in commercio.



Figura 13: Classica milza in condizioni emorragiche ed allargata, causata dal microrganismo patogeno *Flavobacterium psychrophilum* in una giovane trota arcobaleno.

- **Streptococcosi**

Le streptococcosi ittiche presentano una diffusione cosmopolita, colpendo un vasto numero di specie allevate e selvatiche, sia dulciacquicole che marine.

Sono coinvolti nella trasmissione di questa malattia con alcune varianti, 4 generi diversi e 7 specie di cocchi Gram positivi, schematicamente possiamo dividere le streptococcosi ittiche in "streptococcosi d'acqua calda" e "streptococcosi d'acqua fredda", a seconda che causino mortalità al di sopra o al di sotto dei 15° C.

Agenti eziologici della "streptococcosi d'acqua calda", patologia segnalata più di frequente, sono 4 specie di cocchi: *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactia* e *Streptococcus parauberis*. Per la "streptococcosi d'acqua fredda" invece, *Vagococcus salmoninarum* è la specie maggiormente implicata; seguono *Carnobacterium piscicola* e *Lactococcus piscium*. Si osserva la presenza di ano estremamente arrossato e congesto, spesso con fuoriuscita di materiale mucoso bianco-giallastro. I soggetti con patologia conclamata non si alimentano, per l'instaurarsi di una precoce anoressia e giungono ben presto a morte. Il quadro anatomopatologico è altrettanto caratteristico, in quanto si osserva evidente esoftalmo, accompagnato da opacità della cornea. All'apertura della cavità celomatica si evidenziano pericardite, emorragie sparse a tutti i visceri, soprattutto a livello di fegato, grasso periviscerale e vescica natatoria e splenomegalia. La precoce anoressia, accompagnata dai sempre più frequenti problemi di antibiotico-resistenza, rende tale patologia difficilmente trattabile con i comuni presidi terapeutici.

- ***Enteric redmounth disease***

La patologia della bocca rossa è un' infezione batterica che colpisce sia pesci di acqua dolce nonché di acqua salata, causata dal batterio *Yersinia ruckeri*. E' stata isolata per la prima volta nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), figura 13, questa malattia è caratterizzata da una serie di emorragie

presenti a livello sub cutaneo nella bocca e vicino gli occhi. Le emorragie con l'avanzare della malattia invadono gli organi interni, fino a che l'intestino non si riempie di un purulento liquido giallastro.

Alcune specie di pesci fungono da vettori, diffondendo la malattia in altre parti del mondo. Tra le specie più famose capaci di divulgare la malattia troviamo: *goldfish* (*Carassius auratus*), il salmone atlantico e pacifico (*Salmo salar*), e *Notropis atherinoides*.



Figura 14: Trota affetta da *Enteric redmouth disease*

1.5 Scopo della tesi

Negli ultimi anni sono stati compiuti molti studi sulle ribonucleasi, che hanno portato alla caratterizzazione della loro struttura molecolare e della funzione biologica di queste proteine. In tutti i lavori scientifici si parla del ruolo fondamentale di questi enzimi capaci di catalizzare reazioni di degradazione dell'acido ribonucleico, ma solo recentemente si è introdotto il termine di attività speciali di queste molecole, quali ad esempio l'attività angiogenica e quella microbica.

Studiando attentamente la letteratura ci siamo imbattuti in una classe di molecole come le defensine, aventi una struttura molto simile alle ribonucleasi isolate da pesci, oggetto del nostro studio. Si tratta di peptici cationici, con tre ponti disolfuro che ne stabilizzano la struttura, queste molecole riescono a permeabilizzare le membrane plasmatiche, portando a morte molti microorganismi patogeni, agendo anche a basse concentrazioni.

Abbiamo deciso di studiare l'attività microbica posseduta dalle ribonucleasi isolate da pesci, sulla scorta del modello delle defensine.

Lo scopo di questo lavoro di tesi di dottorato in microbiologia è consistito nello studiare la attività antibatterica delle ribonucleasi isolate da pesci, nel localizzare il sito della cellula batterica in cui esse agiscono utilizzando come modello di riferimento la ribonucleasi 3 isolata da *zebrafish*, e nel

porre le basi per la comprensione del meccanismo d'azione con cui esse agiscono.

Applicazione ultima del mio studio potrebbe essere l'utilizzo delle ribonucleasi isolate da pesci come strumento efficace per contrastare le infezioni di origine batterica che colpiscono con elevata frequenza gli impianti dedicati all'allevamento di specie ittiche.

2. Materiali e metodi

2.1 Ceppi batterici Gram negativi

Escherichia coli ceppo **BL21(DE3)**. Il ceppo è stato utilizzato per effettuare l'espressione delle proteine ricombinanti. Nel genoma di tale ceppo è presente il gene per l'RNA polimerasi del batteriofago T7 che consente la trascrizione di sequenze clonate in vettori procariotici sotto il controllo del promotore di tale fago.

Escherichia coli ceppo **DH5α**. Il ceppo è stato utilizzato per l'amplificazione dei plasmidi, ed utilizzato per saggiare l'attività microbica delle ribonucleasi da pesci e quella proteolitica su zf-RNasi-3.

Pseudomonas fluorescens ceppo **ATCC 13525**. Il ceppo è stato utilizzato per saggiare l'attività microbica delle proteine isolate da salmone e da *zebrafish*.

2.2 Ceppi batterici Gram positivi

Staphylococcus aureus ceppo **ATCC 6538P**. Il ceppo è stato impiegato per saggiare l'attività microbica delle Ss-RNasi e delle Zf-RNasi.e quella proteolitica su zf-RNasi-3.

Lactococcus lactis ceppo **IL 1403**. Il ceppo è stato utilizzato per saggiare l'attività antimicrobica delle proteine isolate da salmone.

Bacillus subtilis ceppo **AZ56**. Il ceppo è stato usato per saggiare l'attività microbica delle ribonucleasi da *zebrafish*.

2.3 Terreni di coltura

LB (Luria-Bertani). Il terreno di coltura liquido è stato preparato sciogliendo in acqua deionizzata 10g di triptone, 5g di estratto di lievito e 10g di cloruro di sodio per litro di terreno mentre il terreno solido è stato ottenuto dal mezzo liquido attraverso l'aggiunta di agar alla concentrazione finale di 1,8% quale agente gelificante (Sambrook, et al. 1982).

M17. Il mezzo di coltura liquido è stato preparato sciogliendo in acqua deionizzata 5g di polipeptone, 5 gr di peptone, 2.5 gr di estratto di lievito, 0,5 gr di acido ascorbico, 1g MgSO₄, ed 19g β-Na₂-glicerofosfato, per litro di terreno. Dopo sterilizzazione in autoclave viene aggiunto lattosio all'1%. Il terreno solido è stato ottenuto dal mezzo liquido mediante aggiunta di agar alla concentrazione finale di 1,8% (Sambrook, et al. 1982).

2.4 Antibiotici

L'**ampicillina** (Amp) è stata acquistata dalla Sigma e usata ad una concentrazione finale, nei mezzi di coltura, di 100 µg/ml, è stata .invece, utilizzata come controllo negativo nei saggi di attività microbica ad una concentrazione di 50 µg/ml.

2.5 Vettori

Vettore di espressione pET-22 b(+). Il vettore utilizzato per il clonaggio e l'espressione delle proteine ricombinanti contiene un gene per la resistenza all'ampicillina, un'origine di replicazione batterica, necessaria per la sua propagazione nelle cellule di *E. coli*, il gene *lac I*, codificante per il repressore dell'operone del lattosio, e un *polilinker* clonato a valle del promotore di T7; all'interno del promotore è inoltre presente la sequenza *lac O* alla quale si lega il repressore (figura 14.). Il legame del repressore al promotore non consente l'attacco dell'RNA polimerasi impedendo dunque l'espressione dei geni clonati. Tale inibizione viene superata attraverso l'aggiunta di isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) al mezzo di coltura. L'IPTG è un analogo del galattosio non metabolizzabile dai batteri; una volta entrato nella cellula, esso si lega al repressore dell'operone del lattosio inducendone il distacco dal promotore del fago T7.

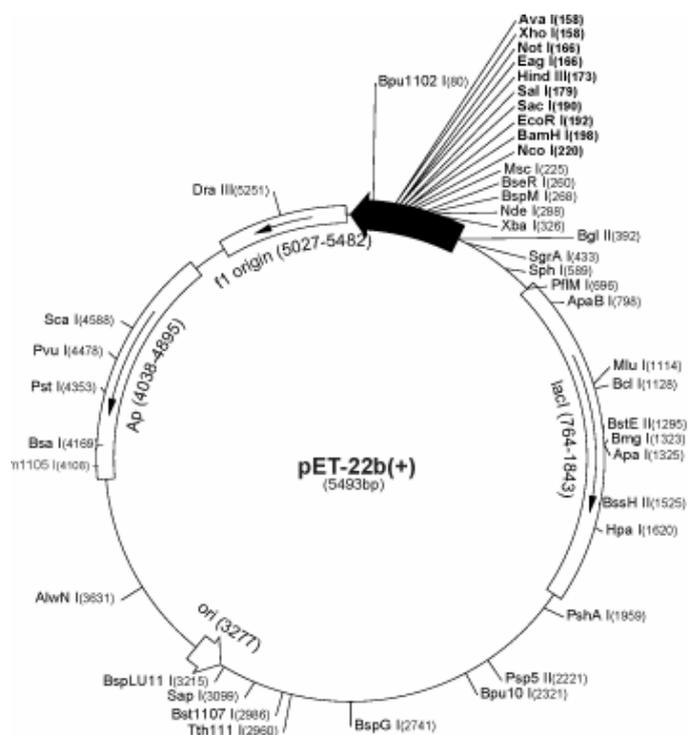


Figura 14: Vettore di espressione pET 22 b(+).

2.6 Reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

Per l'amplificazione di ciascuna sequenza di cDNA è stata allestita una reazione di PCR con opportuni *primers* (MWG, Biotech AG) usando il kit *Fast Start High Fidelity PCR System* (Roche). Ciascuna reazione è stata effettuata in un volume totale di 50µl contenente i quattro deossiribonucleosidi trifosfato ad una concentrazione di 0,2mM, ciascun *primer* (*forward* e *reverse*) alla concentrazione di 1pmol/µl, 5µL di buffer di reazione 10X fornito dalla casa produttrice e 2,5 unità di enzima DNA Taq polimerasi High Fidelity; come stampo sono stati utilizzati 10 ng di DNA.

Le amplificazioni sono state realizzate mediante una denaturazione iniziale dello stampo a 94°C per 5', seguita da 35 cicli termici ciascuno costituito da una fase di denaturazione di 30'' a 94°C, una fase di ibridazione di 30'' a 57°C (la temperature a cui viene eseguita la fase di ibridazione cambia a seconda dell'oligonucleotide utilizzato nelle tabella riportata sotto sono descritte le diverse temperatura), ed una fase di sintesi di 1' a 72°C ; infine un ciclo di 10' a 72°C.

Il DNA amplificato è stato purificato con il *kit* Roche (*High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche, IN, USA), secondo protocollo. Il DNA purificato è stato quindi analizzato su gel di agarosio 1,2%. Le reazioni descritte sono state condotte con lo strumento *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystem).

2.7 Mutagenesi sito-specifica mediante *GeneSOEing* (*Splicing by Overlap Extention*)

Abbiamo utilizzato questa tecnica per mutagenizzare il gene codificante per zf-RNasi-3 introducendo al posto di due arginine consecutive rispettivamente, una serina ed una glicina. Essa consiste in due reazioni di PCR simultanee ed una terza reazione successiva. La prima reazione di PCR è stata effettuata in un volume totale di 50 µl contenente i quattro deossiribonucleosidi trifosfato ad una concentrazione di 0,2 mM, i *primer*

zf-RNasi-3 mut *Forward* (interno al gene) e zf-RNasi-3 *Reverse* (esterno al gene) alla concentrazione di 1pmol/ μ l, 5 μ L di buffer di reazione 10X fornito dalla casa produttrice e 2,5 unità di enzima DNA Taq polimerasi High Fidelity; come stampo sono stati utilizzati 10 ng di DNA. La seconda reazione è stata effettuata nelle stesse condizioni utilizzando come *primers* zf-RNasi-3 *Forward* (esterno al gene) e zf-RNasi-3 mut *Reverse* (interno al gene), secondo lo stesso programma che prevedeva 30'' a 94°C , 50'' a 57°C, necessari, rispettivamente, per la denaturazione del DNA e l'ibridazione degli oligonucleotidi col filamento complementare, quindi, 1' a 72°C, durante il quale avviene la reazione di polimerizzazione, ed un ciclo finale di 5' a 72°C.

L'ultima reazione di PCR è stata effettuata aggiungendo i quattro deossiribonucleosidi trifosfato ad una concentrazione doppia di 0,4 mM, 5 μ L di buffer di reazione 10X fornito dalla casa produttrice e 2,5 unità di enzima DNA Taq polimerasi High Fidelity; come stampo sono stati utilizzati 10 ng di DNA proveniente dalla prima reazione di PCR (ossia la parte 5' del gene zf-RNasi-3 mutagenizzato) e 10 ng .di DNA proveniente dalla seconda reazione di PCR (ossia la parte 3' del gene zf-RNasi-3 mutagenizzato). Solo dopo 7 cicli di reazione sono stati aggiunti i due *primers* esterni (zf-RNasi-3 Forward e Reverse).

Oligonucleotidi	Temperatura di melting	Temperatura di ibridazione usata
Ss-RNasi-1 Forward 5'-gaaattccatatgcaaccggccaattg-3'	60°C	60°C
Ss-RNasi-1 Reverse 5'-cccaagcttagacaacaataatcgccc-3'	60°C	60°C
Ss-RNasi 2 Forward 5'-tccatatggacgtcaaccaacaatataatcac-3'	59°C	59°C
Ss-RNasi 2 Reverse 5'-cccaagctttcactttccatccgtgatgcc-3'	65°C	59°C
zf-RNasi-3 Forward 5'-ggaattccatatggaataaggcgccgt-3'	62°C	57°C
zf-RNasi-3 Reverse 5'-cccaagcttaaataacaccttttcatagt-3'	57°C	57°C
zf-RNasi-3 Mut. Forward 5'-gcgtcagagcggcatcacacg -3'	64°C	57°C
zf-RNasi-3 Mut. Reverse 5'-cgtgtgatgccgctctgacgc-3'	64°C	57°C
LF-zf3 Forward 5'-ttccatatgcgcatcacacgatttc-3'	59°C	57°C

2.8 Elettroforesi su gel di agarosio

Il gel di agarosio all'1,2% viene preparato sciogliendo 1,2 g di agarosio (BIO-RAD) in 100 ml di TAE 1X, a cui viene aggiunto bromuro di etidio 0,1µg/ml. I campioni di DNA vengono caricati nei pozzetti del gel e fatti migrare a 100 Volts insieme ad uno *standard* di peso molecolare (1 Kb ladder); ai campioni, prima della corsa, viene aggiunto 1/10 dell'intero volume di una soluzione di loading buffer: 0.5% blu di bromofenolo, che dà colore blu ai campioni per seguire la corsa ad occhio nudo, e 30% glicerolo, per appesantire il DNA ed evitare che fuoriesca dal pozzetto.

Dopo la migrazione le bande vengono visualizzate al transilluminatore mediante raggi U.V, sfruttando la proprietà del bromuro di etidio di intercalarsi tra le basi del DNA stesso.

2.9 Tecniche di clonaggio

Tutti gli enzimi di restrizione ed i relativi tamponi sono stati acquistati dalla Novagen, Madison, WI, USA ed utilizzati secondo i dettagli sperimentali indicati dalle case produttrici.

I cDNA delle ribonucleasi di zebrafish, di salmone nonché la proteina tronca zf-RNasi-3 da 10.5 kDa e il mutante, sono stati amplificati mediante *PCR* e digeriti utilizzando gli enzimi di restrizione NdeI ed HindIII, mentre solo per zf-RNasi 2 sono stati utilizzati gli enzimi NcoI e EcoRI. Per ogni digestione sono stati utilizzati 3 unità di enzima di restrizione per microgrammo di DNA. Dopo digestione enzimatica, a 37°C *over night*, i frammenti sono stati analizzati e purificati, secondo protocollo, da gel d'agarosio *low melting* 1% (Gaur et al., 2001) utilizzando il kit *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) e quindi clonati nel vettore d'espressione pET-22b(+). Tale vettore è stato preventivamente digerito con gli stessi enzimi di restrizione utilizzati per la digestione di ciascun cDNA. La linearizzazione del vettore è stata verificata su gel di agarosio all'1% su cui è stata visualizzata un'unica banda corrispondente a 5493 bp. Sono stati defosforilati 150 ng di plasmide digerito utilizzando 1U di *SAP* (*Alcaline*

Phosphatase Shrimp) (Roche) per 10' a 37°C. L'enzima è stato poi inattivato lasciando la miscela di reazione per 15' a 65°C. È stata quindi effettuata un'estrazione con un volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico nel rapporto volumetrico di 24:25:1. Il DNA è stato quindi sottoposto a precipitazione in etanolo e risospeso in acqua. Sono state allestite due reazioni di *ligation* con T4 DNA ligasi utilizzando due diversi rapporti molarali vettore:inserto e cioè 1:5 e 1:10. La reazione di *ligation* è stata effettuata utilizzando la T4 DNA ligasi e il *buffer* 10X della Roche seguendo il protocollo della ditta. La miscela di reazione della ligasi è stata utilizzata per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo DH5 α . Le colonie trasformate ottenute, sono state cresciute singolarmente in terreno liquido contenente ampicillina e il DNA plasmidico è stato estratto con il *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen). La presenza nel vettore ricombinante dei cDNA clonati è stata analizzata mediante digestione enzimatica con gli stessi enzimi utilizzati per il clonaggio.

I prodotti della *PCR* sono stati quindi analizzati su gel di agarosio all'1,2% e si sono rivelati del peso molecolare atteso; la conferma del clonaggio dei cDNA è stata ottenuta mediante sequenziamento del DNA effettuata dalla *MWG* secondo metodo Sanger.

2.10 Preparazione di cellule batteriche competenti

Le cellule di *E. coli* (*DH5 α*) utilizzate per la suddetta trasformazione sono state preparate secondo il seguente protocollo.

Cellule di *E. coli* (*DH5 α*), cresciute o.n. a 37°C in terreno LB, vengono diluite 1:100 in terreno LB (40ml) preriscaldato a 37°C e incubate alla stessa temperatura, con agitazione fino a O.D.₆₀₀= 0.5. Dopo una permanenza di 15' in ghiaccio, vengono centrifugate a 3500 rpm per 7-10' a 4°C, ed il *pellet* risospeso in un volume (20 ml) di CaCl₂ (50mM) preraffreddato, pari alla metà di quello iniziale. Dopo incubazione in ghiaccio per 30'-60', viene centrifugato come descritto in precedenza, quindi, il *pellet* risospeso in CaCl₂ (50mM), questa volta, 1/10 del volume iniziale. Dopo aver lasciato la sospensione in ghiaccio per un'ora, viene aggiunto glicerolo ad una concentrazione finale del 15% (600 μ l glicerolo 100%). Aliquote delle cellule sono congelate a -80°C. Anche le cellule di *E. coli* (*BL21*) sono state rese competenti con lo stesso protocollo sperimentale.

2.11 Trasformazione di cellule di *E. coli*

La trasformazione viene effettuata aggiungendo 5 μ l della miscela di ligasi a 100 μ l di cellule di *E. coli* (*BL21*) competenti. I tubi riposti in ghiaccio per 30'- 60' in ghiaccio. Quindi, per 2' a 40°C, con successiva aggiunta di

terreno LB (1 ml). Infine, incubate a 37°C per 50-60', piastrate su LB agar contenente ampicillina ad una concentrazione finale di 100 µg/µl e, quindi, incubate nuovamente a 37°C o. n.

2.12 Espressione in cellule procariotiche

I plasmidi contenenti i geni amplificati di zf-RNasi-1, 2, 3, 4 e 5 e quelli delle proteine Ss-RNasi-1 e 2, nonché zf-RNasi-3 mutante e LF-zf3 da 10.5 kDa, sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti di *E. coli* del ceppo BL21(DE3). E' stato effettuato un inoculo di 1 colonia di cellule trasformate in 50 ml di LB contenente ampicillina (100µg/ml) e lasciato in agitazione a 37°C *over night*. L'inoculo è stato versato in 1L di LB-ampicillina e lasciato crescere in agitazione a 37°C monitorando la crescita per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza a 600nm. L'espressione è stata indotta aggiungendo 20 µl di isopropil-β-D-tiogalattopiranoside (IPTG) 0,1 mM per litro di coltura, quando la crescita ha raggiunto un valore di $OD_{600nm} \approx 1$. Prima dell'aggiunta dell'induttore, è stato prelevato 1ml di cellule, centrifugato a 6000rpm per 15' a 4°C e risospeso in 50µl di *cracking buffer* 2X (100mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerolo). Dopo una notte di crescita è stato prelevato 1mL di cellule indotte, centrifugato a 6000rpm per 15' a 4°C e risospeso in 50µl di *cracking buffer* 2X. Queste aliquote sono servite per controllare l'espressione delle proteine ricombinanti su gel di poliacrilammide al 15%. Dopo verifica

dell'espressione, le cellule batteriche sono state centrifugate a 6000 rpm per 20' a 4°C. Il pellet batterico è stato lavato due volte in 20ml di Tris·HCl 50mM pH 7,4, EDTA 20mM e centrifugato a 6000 rpm per 15' a 4°C e quindi risospeso in 20ml di Tris HCl 0,1M pH 7,4, EDTA 5mM e di nuovo centrifugato a 6000 rpm per 15' a 4°C. Il pellet è stato poi risospeso in 20ml di Tris HCl 0,1M pH 7,4, EDTA 1mM, in presenza di inibitori delle proteasi (*PMSF*) *EDTA free* (Roche). La sospensione batterica è stata trasferita in tubi da centrifuga da 35ml e sonicata per 10' effettivi (20'totali) 30''*on* e 30''*off* con *Ultrasonic sonicator* (*Heat System Ultrasonic*) ad una potenza di 20kHz. Il lisato cellulare è stato centrifugato a 12000rpm per 1h a 4°C. Analisi mediante *SDS-PAGE* hanno rivelato che le RNasi da salmone e da *zebrafish* erano completamente sequestrate nei corpi di inclusione perciò si è proceduto al recupero della proteina da questi ultimi. I corpi di inclusione sono stati dunque lavati due volte risospendendoli in 20ml di Urea 2M, TritonX 100 2%, TrisHCl 0,1M pH 7,4, EDTA 5mM e sonicandoli ciascuna volta per 2' effettivi (4' totali) 30''*on* e 30''*off* ad una potenza di 20kHz e centrifugati a 12000 rpm per 20' a 4°C. Il pellet è stato lavato con 20ml di TrisHCl 0,1M pH 7,4, EDTA 5mM e centrifugato a 12000rpm per 20' a 4°C.

Per la denaturazione, il pellet è stato risospeso in 10ml di Guanidina HCl 7M, Tris HCl 0,1M pH 7,4 e sonicato per 10' effettivi (20'totali) 30''*on* e 30''*off* come precedentemente descritto. Alla soluzione di denaturazione

sono stati aggiunti anche 70 μ l di β -mercaptoetanolo (7 μ l per millilitro di sospensione) ed è stata effettuata un' incubazione di 3h a 37°C, in agitazione, fino alla completa risospensione del pellet. La sospensione è stata aggiunta goccia a goccia a 50 volumi (500mL) di soluzione di rinaturazione (TrisHCl 50mM pH7,4) preraffreddata a 4°C e lasciata rinaturare a 4°C *over night*. La soluzione di rinaturazione è stata centrifugata a 14000 rpm per 1h a 4°C. Il surnatante, contenente la proteina ricombinante è stato filtrato con filtri da 0,45 μ m e conservato a 4°C per essere poi sottoposto a purificazione mediante metodi cromatografici. Ad ogni passaggio della purificazione è stata prelevata un'aliquota di pellet e di surnatante ed è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 15% in *SDS*.

2.13 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS

(SDS-PAGE)

I campioni proteici (10 μ g) sono analizzati mediante SDS-PAGE, adoperando l'apparecchio Protean II (BIORAD).

Lower gel al 15%: 2,5 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide mix (37.5:1); 1,3 ml di 1.5 M Tris/HCl pH 8.8; 0.05 ml di 10% sodio dodecilsolfato (SDS); 0.05 ml di 10% ammonio persolfato (APS); 5 μ l di TEMED; acqua fino a 5 ml.

Upper gel al 5%: 330 µl di 30% acrilammide-bisacrilammide mix (37.5:1); 250 µl di 1.5 M Tris/HCl pH 6.8; 20 µl di 10% SDS; 20 µl di 10% APS; 2 µl di TEMED; acqua fino a 2 ml.

Dopo aggiunta di *sample buffer* addensante e denaturante (10% glicerolo; 50 mM Tris/HCl pH 6.8; 0.1% blu di bromofenolo; 2% SDS; 4% β-mercaptoetanol in acqua) i campioni vengono denaturati per bollitura per 5', raffreddati in ghiaccio e caricati su gel. Il marker *Precision Protein Standards Plus* (BIO-RAD) è stato usato come mix di proteine di peso molecolare noto.

Tampone di corsa: 25 mM Tris, pH 8.3; 192 mM glicina e 0.1% SDS.

La separazione delle proteine si effettua a 180 Volt per circa 2 ore.

2.14 Colorazione di gel di poliacrilammide con Comassie

Il gel viene fissato e colorato con una soluzione colorante (625mM Comassie Brilliant Blue; 25% metanolo; 10% acido acetico) per circa 40', quindi decolorato con una soluzione 25% metanolo-10% acido acetico e seccato a 80°C sotto vuoto per 2 ore.

2.15 Tecniche cromatografiche

Le ribonucleasi da *zebrafish* e quelle da salmone sono state purificate eseguendo una cromatografia a scambio ionico seguita da una cromatografia a fase inversa.

Cromatografia a scambio ionico : è stata eseguita sul sistema *Akta Purifier* (*Amersham Biosciences*) utilizzando la colonna a scambio cationico *Resource S* (*Amersham Biosciences*). Le proteine in analisi sono state caricate su tale colonna, equilibrata con tampone A (Tris HCl 50 mM pH 7,4), ed eluite applicando il seguente schema di eluizione ad un flusso pari ad 1ml/min :

- a) 0 - 10% tampone (TrisHCl 50mM pH 7,4, NaCl 1M) in 5'
- b) isocratica al 10% tampone B per 30'
- c) 10 - 100% tampone B (TrisHCl 50mM pH 7,4, NaCl 1M) in 30'

In tal modo si viene a creare un gradiente di forza ionica nella fase mobile che consente il distacco differenziale delle proteine legate alla colonna in base alla loro carica. Le frazioni contenenti le proteine di interesse, non essendo ancora omogenee, sono state sottoposte ad un ulteriore cromatografia a fase inversa.

Cromatografia a fase inversa : è stata effettuata su una colonna *Resource RPC* (*Amersham Biosciences*). Il campione in analisi, una volta caricato sulla colonna equilibrata con il tampone A (acetonitrile 5% contenente acido trifluoroacetico (TFA))

0,1% (v/v)) è stato eluito secondo il seguente gradiente lineare:

5-60% tampone B (acetonitrile 90% contenente TFA 0,1% (v/v)) in 60' ad un flusso di 1mL/min.

2.16 Inattivazione di ribonucleasi con acido iodoacetico (IAA)

Allo scopo di verificare l'eventuale correlazione esistente tra le funzioni speciali della proteina zf-RNasi-3 e la sua capacità degradativa, si è deciso di allestire saggi di attività battericida in presenza di zf-RNasi-3 il cui sito catalitico era stato preventivamente alterato.

Tale alterazione è stata ottenuta mediante alchilazione selettiva dei due residui catalitici di istidina. aggiungendo a 200 microgrammi di zf-RNasi-3, in tampone MES NaOH 0.1M pH 6.0, un eccesso molare di acido iodoacetico pari a 70 volte. La soluzione così composta è stata poi lasciata in incubazione 5 ore a 37°C.

Al termine dell'incubazione, l'eccesso di acido iodoacetico è stato allontanato mediante una cromatografia per gel filtrazione utilizzando una colonna PD10 (GE Healthcare, Milano, Italia) equilibrata in acetato di ammonio 0.1 M a pH 5.0. Infine, per verificare l'effettiva alterazione del sito catalitico è stato allestito un saggio di precipitazione in seguito al quale è stato evidenziato che l'attività degradativa di zf-RNasi-3 risultava quasi

nulla Lo stesso protocollo è stato utilizzato per le ribonucleasi isolate da salmone.

2.17 Inattivazione di ribonucleasi al calore

Circa 500 ng di proteina sono stati inattivati al calore, dopo che essa era stata purificata, e liofilizzata per una notte sottovuoto ad una temperatura di 0°C, per eliminare i solventi organici provenienti dall'ultimo passaggio di purificazione per HPLC. La proteina d'interesse veniva risospesa in acqua milliQ, quantizzata e incubata ad una temperatura di 85°C, per 30 minuti e successivamente posta in ghiaccio.

2.18 Saggi di attività microbica

In 5 ml di terreno LB si risospendeva una colonia singola dei diversi batteri, quest'ultima veniva incubata a 37°C o. n. a 150 r.p.m. di agitazione per una notte.

In 15 ml di terreno M17 si risospendeva una colonia singola di *Lactococcus lactis*, quest'ultima veniva incubata a 37°C o.n. in condizioni statiche e di anaerobiosi.

Una volta giunta la coltura batterica a 1 O.D, si diluiva di 1000 volte in *Buffer* fosfato 20 mM, pH 7.0.

Si preparavano campioni dal volume finale di 1 ml, contenenti cellule batteriche per 1/25 del volume finale, la varie proteine d'interesse a diverse

concentrazioni e Buffer fosfato 20 mM, pH 7.0 fino a volume. Il controllo negativo era rappresentato da cellule incubate in assenza di proteine, e da cellule incubate in presenza di BSA somministrata alle stesse concentrazioni delle proteine, mentre il controllo positivo era rappresentato da cellule incubate in presenza di ampicillina (50 µg/ml)

I campioni venivano incubati alla temperatura di 37°C, in agitazione a 150 r.p.m per 6 ore.

Successivamente si preparavano diluizioni seriali (1:100, 1:1000) di tutti i campioni e si piastravano insieme al tal quale su terreno solido LB-AGAR, le capsule petri venivano poi, incubate alla temperatura di 37°C o.n.

Si è proceduto a stimare la percentuale di cellule sopravvissute, contando su ciascuna piastra il numero di CFU e rapportandole ai controlli.

I saggi sono stati eseguiti utilizzando ribonucleasi inattivate al calore, inattivate con acido iodoacetico, con DTT, in presenza di NaCl ad una concentrazione di 250 mM e di 500 mM, e con l'aggiunta di Saccarosio al 17%.

2.19 Saggi di proteolisi

Un volume di cellule batteriche pari a 10 ml, cresciute o.n. ad una temperatura di 37° C, in agitazione (150 rpm), sono state centrifugate a 7000 rpm, per 5 minuti a 4°C.

Il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 10 ml di Buffer fosfato 20 mM a pH 7, pari al volume iniziale, in seguito è stata aggiunta la proteina zf-RNasi-3 ad una concentrazione di 3 μ M, come controllo negativo non viene aggiunta alcuna proteina alle cellule una volta risospese nel *buffer*.

I campioni vengono incubati a 37°C per 6 ore in agitazione costante a 150 rpm. Successivamente vengono estratte le proteine totali, quantizzate, visualizzate su di un gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti, e trasferite su un filtro di PVDF. Su di esso veniva effettuato un *Western blotting*.

2.20 Estrazione delle proteine

Le cellule batteriche vengono centrifugate a 6000 rpm per 5', ed il *pellet* viene risospeso in PBS 1X (NaCl; KCl; Na₂HPO₄; H₂O distillata) pre-raffreddato in ghiaccio allo scopo di effettuare un lavaggio dei *pellet*. In seguito all'ulteriore lavaggio, si trasferisce in tubi *FastPROTEIN-BLUE (Bio-101)* contenenti una matrice di lisi e si omogeneizza utilizzando il *FastPrep (Resnova)* per un tempo di 20'' a velocità 4. I tubi sono quindi centrifugati per 1' a 10000 rpm, si preleva il sopranatante e lo si conserva a -20°C.

2.21 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica viene determinata mediante saggio colorimetrico con il reattivo *Bio-Rad protein assay*, prodotto dalla *BIO-RAD*. I campioni sono preparati aggiungendo 200µl di reattivo, 800µl di H₂O e una opportuna diluizione delle diverse soluzioni proteiche. La lettura spettrofotometrica viene effettuata a 595nm azzerando contro il bianco contenente solo 200 µl di reattivo e 800 µl di H₂O. Dopo aver costruito una retta di taratura, utilizzando 3 diverse diluizioni di una soluzione a concentrazione nota di BSA (albumina di siero bovino), viene ricavata la concentrazione proteica dei vari campioni per interpolazione.

2.22 Compartimentalizzazione cellulare

Un volume di coltura cellulare pari a 10 ml, cresciuta o.n. a 37°C , in agitazione costante a 150 rpm, è stata centrifugata a 6000g per 5 minuti a 4°C. Il *pellet* batterico è stato risospeso in 0,5 ml di *periplasting buffer* (20% saccarosio, 1mM EDTA, 30000 U/ml lisozima). Il campione viene incubato 5 minuti in ghiaccio, e centrifugato 12000 rpm per 5 minuti. Il sopranatante rappresenta la frazione periplasmatica, mentre il *pellet* è costituito dall'insieme degli sferoplasti. Il pellet viene risospeso in 0,5 ml di *buffer* di lisi (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 1mM EDTA, e

0,1% Triton X-100), incubato a temperatura ambiente per 5 minuti e sonicato per 10 minuti effettivi (30'' on, 30''off) al 50% del potere di amplificazione.

Una volta sonicato il campione viene centrifugato a 6000 rpm, il soprannatante recuperato contiene sia la frazione citoplasmatica che quella membranaria, mentre il *pellet* rappresenta le cellule non completamente lisate. Il surnatante viene centrifugato a 30000 rpm, per 1 ora, a 4°C, mediante ultracentrifuga (*Beckman*).

Alla fine dell'ultracentrifugazione il soprannatante contiene le proteine del cytosol, mentre il *pellet* contiene le membrane plasmatiche, quest'ultimo viene risospeso in un volume minimo di *buffer* solubilizzante (0,5% sarkosyl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA). Le varie frazioni vengono controllate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti, dopo previa quantizzazione.

2.23 Elettrotrasferimento di proteine e *western blot*

Il gel di poliacrilammide veniva trasferito su una membrana PVDF (*Millipore*), utilizzando l'apparecchio *trans-blot-cell* (*BIO-RAD*). Il trasferimento veniva eseguito a 420 mA (31 Volts) per 45 minuti utilizzando come tampone per elettrotrasferimento: 1X CAPS (10X CAPS:

22.13 g di CAPS; 20 ml 2N NaOH; acqua bidistillata fino a 1 l.); 10% metanolo.

Per verificare l'esito dell'elettrotrasferimento, la membrana veniva colorata con una soluzione di Ponceau S (*Sigma*) e quindi decolorata con acqua bidistillata fino alla completa scomparsa del colore rosso. La membrana veniva poi incubata in 100 ml di soluzione di saturazione (1X PBS; 0,1% Tween 20; 6 gr di bovalbumina) a 4°C per tutta la notte. Dopo lavaggi con 0.1X PBS (10X PBS (*Phosphate buffered saline*), pH 7,2: 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; 100 mM NaCl) e 0.1% Tween 20 (*Sigma*), la membrana veniva incubata con l'anticorpo primario specifico a temperatura ambiente per 2-3 ore, nuovamente lavata con la soluzione PBS-Tween 20 ed incubata con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato con perossidasi, *Sigma*) a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-Tween 20 venivano visualizzate le proteine riconosciute dall'anticorpo con il metodo ECL (*Amersham*), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

2.24 Marcatura della proteina zf-RNasi-3 con la molecola *Alexa Fluor 488*

Venivano risospesi 10 mg di proteina pura, dopo liofilizzazione, in 1 ml di *Buffer* sodio bicarbonato 0,1 M pH 8.3, si dissolveva contemporaneamente

1 mg di molecola fluorescente *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) in 100 µl di DMSO (dimetilsolfossido).

Dopo aver *vortexato* vigorosamente la soluzione proteica, ad essa si aggiungevano 50-100 µl di reattivo *Alexa Fluor 488* precedentemente risospeso. Il campione è stato incubato 1 ora a temperatura ambiente in agitazione costante a 150 rpm. Al termine dell'incubazione, l'eccesso di reattivo fluorescente è stato allontanato mediante una cromatografia per gel filtrazione utilizzando una colonna PD10 (GE Healthcare, Milano, Italia) equilibrata in *buffer* fosfato 20 mM pH 7.4.

2.25 Saggi spettrofluorimetrici

Le miscele di reazione per effettuare i saggi spettrofluorimetrici (Kelemen et al. 1999) erano composte da NaCl 0.1 M, Mes 0.1 M a pH 6.0, concentrazioni variabili di substrato fluorogenico (20-60 nM) e quantità variabili di proteina.

Sono stati utilizzati due substrati diversi il 6-carbossifluoresceina-dArUdAdA-6-carbossi-tetrametilrodamina e il 6-carbossifluoresceina-dArCdAdA-6-carbossi-tetrametilrodamina (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA).

Lo spettrofluorimetro utilizzato è prodotto da Perkin Elmer e la variazione della fluorescenza è stata seguita mediante l'utilizzo del programma

informatico *FLWIN LAB*. I valori di efficienza catalitica sono stati ricavati attraverso la seguente formula:

$$\mathbf{K_{cat/kM}} = \frac{dF/dT}{F_{max}-F_0} \cdot \frac{1}{[E]}$$

3. Risultati

3.1 Espressione e purificazione di ribonucleasi da salmone atlantico (*Salmo salar*).

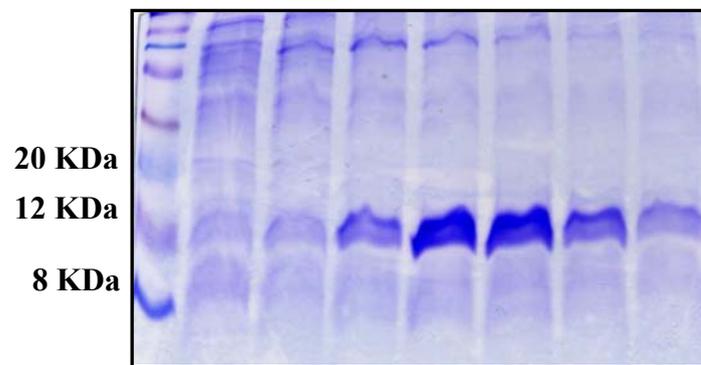
In collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. D'Alessio, sono state isolate due sequenze di DNA, omologhe a sequenze già conosciute codificanti per ribonucleasi, all'interno del genoma di salmone atlantico (*Salmo salar*), esse sono state chiamate Ss-RNasi-1 e Ss-RNasi-2.

Successivamente le sequenze di Ss-RNasi-1 e 2 sono state comparate con la sequenza della ribonucleasi A, ed è stata riscontrata un'identità di sequenza rispettivamente del 23% e del 32%, inoltre sono state comparate alla sequenza della angiogenina umana (hANG) e sono risultate simili ad essa, la prima per il 33% e la seconda per il 34%. Le due sequenze sono state amplificate mediante PCR, clonate in un vettore d'espressione (pET22 b+) ed espresse nel ceppo di *E. coli* BL21(DE3).

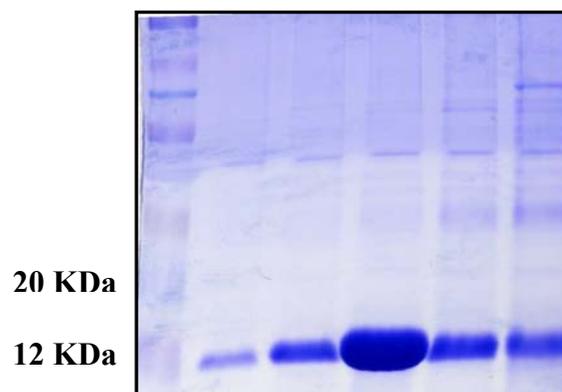
Le proteine risultano espresse esclusivamente nei corpi di inclusione, sono state isolate con un protocollo standard di denaturazione/rinaturazione, a seguire è stata operata una cromatografia a scambio cationico, ed infine per aumentarne la purezza una *RP-HPLC* (*reverse phase high pressure liquid chromatography*).

Dopo aver controllato mediante SDS-PAGE l'integrità e l'omogeneità delle due ribonucleasi da salmone (figura 16), abbiamo confrontato le loro sequenze con quelle di RNasi isolate da pesci finora conosciute, ed esse posseggono le caratteristiche peculiari delle Ribonucleasi, come già

descritto nell'introduzione. Dall'analisi delle masse effettuate sulle due proteine di salmone, mediante spettrometria di massa è risultato che Ss-RNasi-1 è una proteina di 14.252Da e Ss-RNasi-2 di 13.924 Da.



(a)



(b)

Figura 16: SDS-PAGE al 15% eseguito sulle frazioni contenenti rispettivamente Ss-RNasi 1 (a) e Ss-RNasi 2 (b).

3.2 Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi su batteri Gram negativi.

Un saggio per valutare l'attività microbica delle ribonucleasi isolate da salmone è stato effettuato su ceppi batterici Gram negativi: in particolare *Pseudomonas fluorescens* ed *Escherichia coli*. L'albumina di siero bovino (BSA) è stata utilizzata come opportuno controllo negativo, essendo tale proteina priva di attività citotossica verso cellule procariotiche.

L'aggiunta alle cellule di ampicillina ad una concentrazione di 50 µg/ml, che non consente la crescita, rappresentava il controllo positivo dell'esperimento.

Come è possibile osservare in figura 17 entrambe le proteine Ss hanno un'elevata attività antibatterica, si può notare che all'aumentare della concentrazione delle Ss-RNasi, diminuisce la sopravvivenza dei batteri. La proteina Ss-RNasi-1 ha un'attività antimicrobica più marcata rispetto alla proteina Ss-RNasi-2, il valore di LD₅₀ (concentrazione richiesta per esplicare il 50% dell'attività) per ss-RNasi-1 è circa di 0.08 µM su *P. fluorescens* e 0.25 µM nei confronti di *E. coli*. Per quanto riguarda invece la ss-RNasi-2, il valore di LD₅₀ su *P. fluorescens* è di 0.5 µM, mentre su *E. coli* aumenta a circa 3 µM.

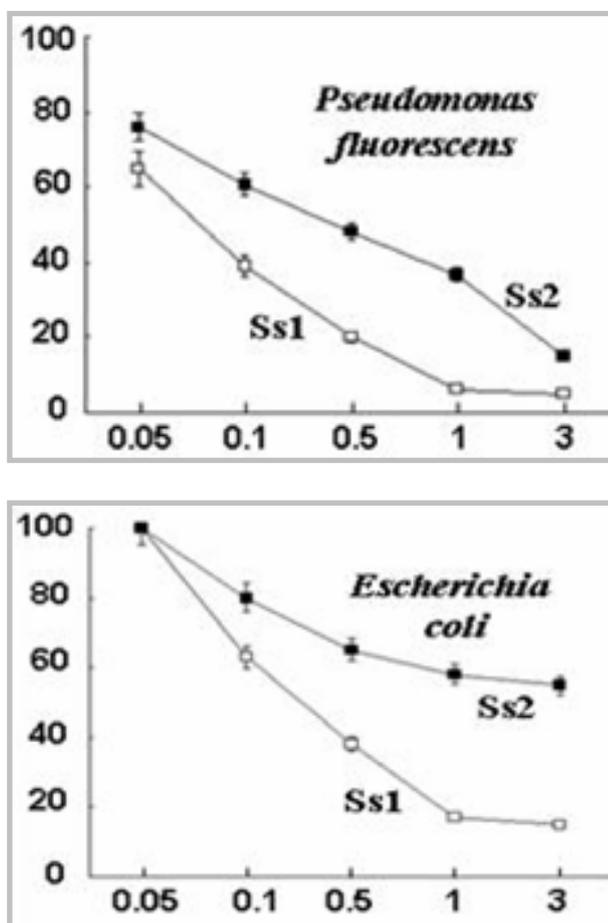


Figura 17: Saggi di attività microbicida che riportano la sopravvivenza di *P. fluorescens* ed *E. coli*, le proteine vengono somministrate ad una concentrazione che va da 0.05 a 3 μM.

3.3 Saggi di attività microbicida delle Ss-RNasi su batteri Gram positivi.

L'attività microbicida delle ribonucleasi isolate da salmone è stata, poi, saggiata su ceppi batterici Gram positivi in particolare: *Staphylococcus aureus* e *Lactococcus lactis*. Anche in questo caso ho realizzato delle curve dose-risposta, riportate in figura 18.

Oltre ad aver effettuato i controlli con BSA e ampicillina, le cellule batteriche sono state sottoposte ad una quantità crescente di Ss-RNasi-1 e 2 (da una concentrazione di 0.05 μM ad una concentrazione di 3 μM). Anche in questo caso si può osservare una certa proporzionalità tra l'aumento della concentrazione di proteine somministrate e la diminuzione della sopravvivenza delle cellule procariotiche. Anche su batteri Gram positivi la ss-RNasi-1 risulta maggiormente attiva rispetto alla ss-RNasi-2, di conseguenza anche il valore di LD_{50} è minore per la Ss-RNasi-1 ossia 0.05 μM sia nei confronti di *S. aureus* che di *L. lactis*, mentre per la ribonucleasi 2 di salmone il valore di LD_{50} è di circa 0.5 μM su *S. aureus* e di circa 0.1 μM su *L. lactis*.

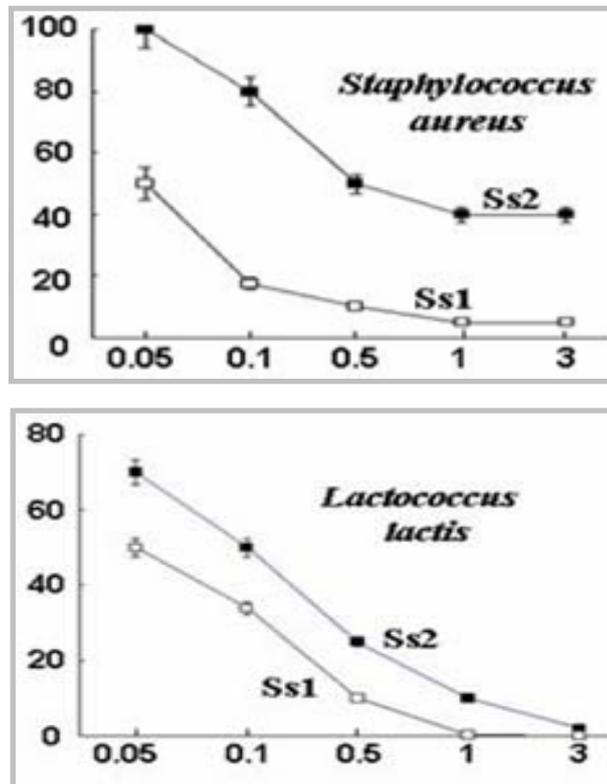


Figura 18: Saggi di attività microbica che riportano la sopravvivenza di *S. aureus* e *L. lactis*, le proteine sono state somministrate ad una concentrazione da 0.05 a 3 μM.

3.4 Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi dopo alchilazione e denaturazione al calore.

Un altro importante risultato ottenuto riguarda l'attività microbica delle ribonucleasi di salmone dopo l'alchilazione delle istidine catalitiche (12 e 119). Come riportato in letteratura (Pizzo et al., 2008), al momento dell'inattivazione delle istidine catalitiche le proteine enzimatiche isolate da salmone perdono l'attività ribonucleasica ed anche quella angiogenica, questo dato conferma che le due attività dipendono da un dominio comune. Nello stesso esperimento abbiamo deciso di inattivare al calore e quindi denaturare le Ss-RNasi-1 e 2 ad una temperatura di 85°C.

In entrambi i casi la struttura secondaria viene destabilizzata e questo è stato confermato da dati di dicromismo circolare eseguiti con la collaborazione della Professoressa Giancola del dipartimento di chimica organica dell'Università degli studi di Napoli Federico II.

Come è possibile osservare in figura 19 e 20 entrambe le ribonucleasi da salmone non perdono dopo alchilazione o denaturazione al calore le loro proprietà antimicrobiche nei confronti sia di batteri Gram negativi che positivi. Questo dato testimonia anche che l'attività microbica di queste proteine è completamente indipendente dall'attività ribonucleasica e da quella angiogenica.

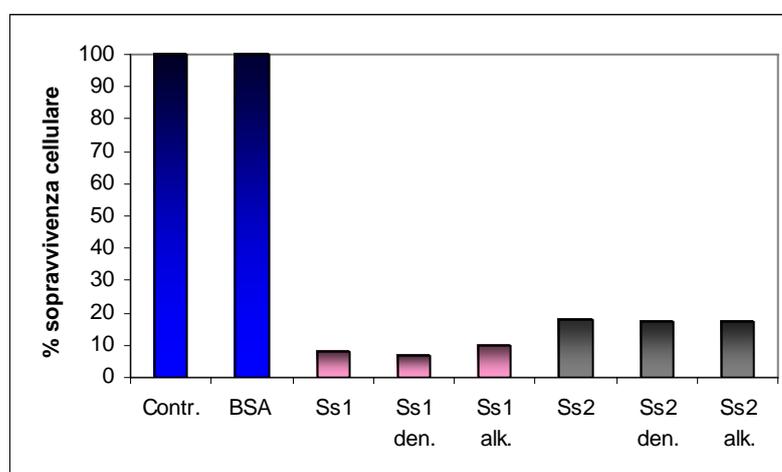


Figura 19: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *P. fluorescens* in funzione delle proteine somministrate. Sia Ss1 che 2 sono somministrate ad una concentrazione di 3 μ M, den=denaturata al calore, alk=alchilata.

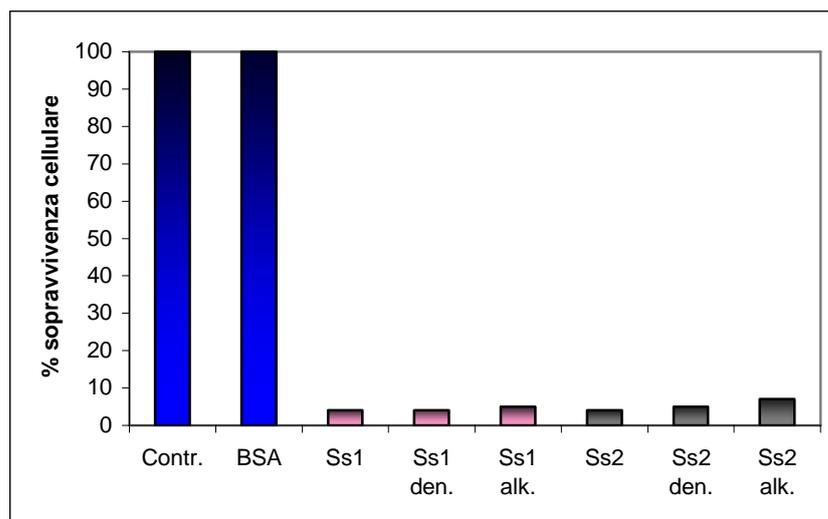


Figura 20: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *L. lactis* in funzione delle proteine somministrate. Sia Ss1 che 2 sono somministrate ad una concentrazione di 3 μ M, den=denaturata al calore, alk=alchilata.

3.5 Saggi di attività microbica delle Ss-RNasi dopo trattamento con cloruro di sodio (NaCl).

Il salmone atlantico è un pesce che vive per gran parte della sua vita nell'oceano, quindi in un habitat con una concentrazione di sali abbastanza elevata, per questo motivo abbiamo deciso di saggiare l'attività citotossica delle due ribonucleasi isolate da salmone aumentando la concentrazione di NaCl, dati di letteratura riportano che l'attività antimicrobica di alcune RNasi conosciute, viene fortemente inibita dalla presenza di elevate concentrazioni saline.

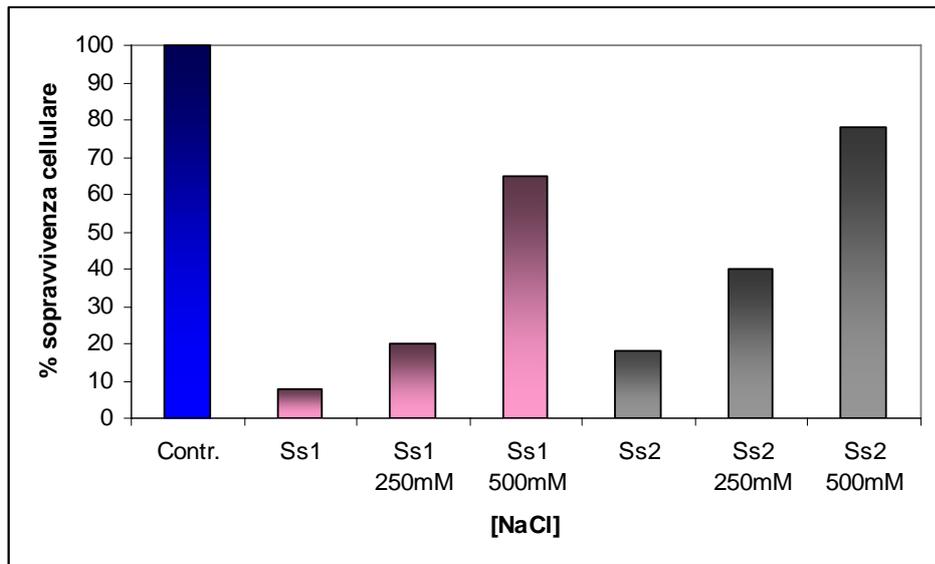
Come è evidenziato in figura 21 abbiamo somministrato alle cellule di batteri Gram negativi come *P. fluorescens* e positivi come *L. lactis*, le Ss-

RNasi-1 e 2 ad una concentrazione fissa di 3 μM , e ad esse abbiamo aggiunto NaCl in due crescenti concentrazioni 250 mM e 500 mM.

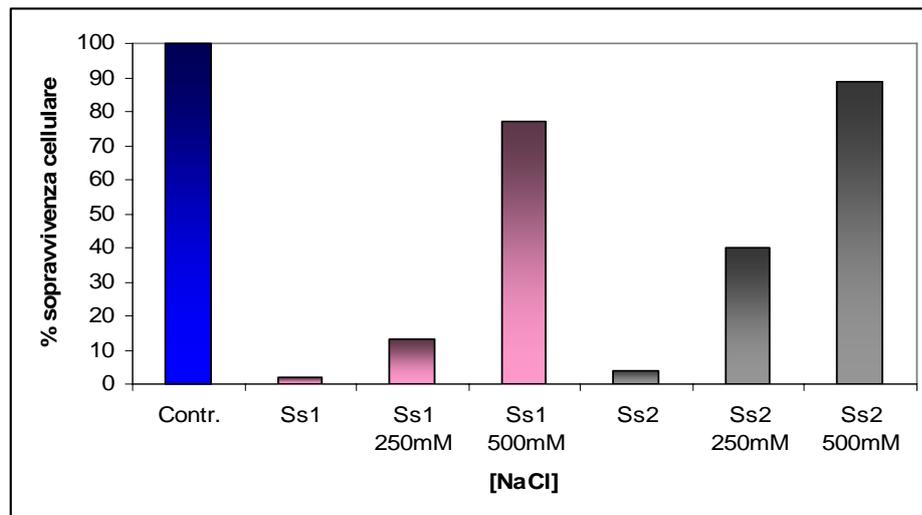
Le attività antibatteriche delle proteine risultano dimezzate già ad una concentrazione di 250 mM di NaCl, mentre esse vengono perse completamente ad una concentrazione di 500 mM.

Questo dato indica che il cloruro di sodio è sicuramente un inibitore dell'attività microbica delle ribonucleasi da salmone.

Probabilmente, in vivo, la proprietà antimicrobica di queste proteine è espressa prevalentemente nel periodo di permanenza nelle acque dolci, oppure esse in condizioni fisiologiche non esprimono l'attività antimicrobica.



(a)



(b)

Figura 21: Saggi di attività microbica: (a) Sopravvivenza di *P. fluorescens* in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl. (Ss1 ed Ss2 sono somministrate ad una concentrazione di 3 μ M). (b) Sopravvivenza di *L. lactis* in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl., (Ss1 ed Ss2 sono somministrate ad una concentrazione di 3 μ M).

3.6 Espressione e purificazione di ribonucleasi da *zebrafish* (*Danio rerio*).

Nel 2006 il gruppo del prof. D'Alessio ha dato inizio a un ampio progetto di lavoro iniziando con l'isolamento delle prime tre sequenze geniche dal genoma di *zebrafish*, codificanti per ribonucleasi, queste proteine furono chiamate zf-RNasi-1, 2 e 3. Successivamente, grazie al lavoro del dottor Pizzo, le sequenze di altri due geni codificanti le ribonucleasi da *zebrafish*, sono state isolate e amplificate mediante *PCR*. I geni amplificati sono stati clonati in vettori di espressione pET22-b(+) e con i vari costrutti sono state trasformate cellule di *E. coli* del ceppo BL21 (DE3). Per ottimizzare i livelli di espressione, sono state condotte alcune prove variando parametri critici quali la temperatura e la durata dell'induzione. La temperatura ottimale è risultata essere di 37°C. Livelli massimi di espressione sono stati ottenuti prolungando l'induzione *over-night*. Le proteine erano presenti solo all'interno dei corpi di inclusione pertanto si è operato un protocollo che prevedeva una fase di denaturazione e una successiva rinaturazione. La soluzione di rinaturazione, contenente la proteina di interesse, è stata sottoposta ad una cromatografia a scambio cationico per una prima purificazione da specie contaminanti, ed un'ulteriore purificazione attraverso *RP-HPLC* (*reverse phase high pressure liquid chromatography*).

L'analisi mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 15% in presenza di SDS ha evidenziato inoltre che le proteine ricombinanti di zebrafish avevano una mobilità elettroforetica compatibile con il peso molecolare atteso (figura 22).

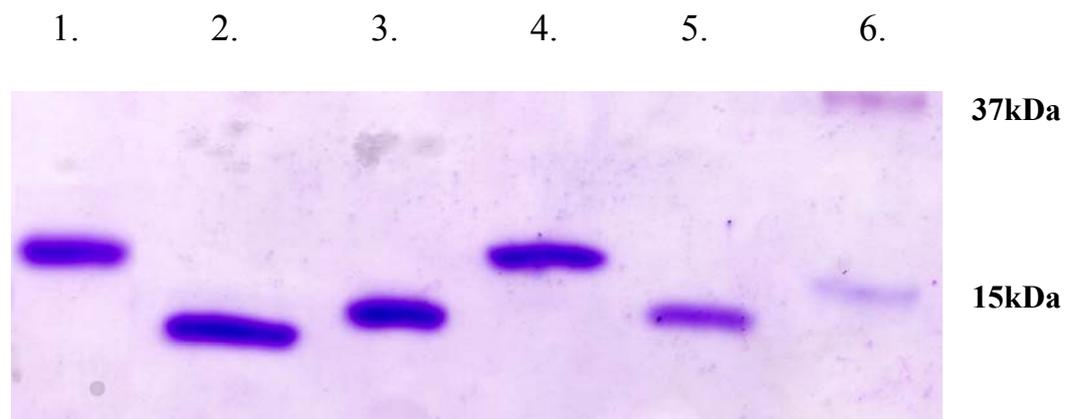


Figura 22: SDS-PAGE al 15%. 1. zf-RNasi-5, 2. zf-RNasi-4, 3. zf-RNasi-3, 4. zf-RNasi-2, 5. zf-RNasi-1, 6. Standard di peso molecolare.

3.7 Saggi di attività microbica delle zf-RNasi su batteri Gram negativi.

Le zf-Rnasi purificate sono state utilizzate per effettuare dei saggi di citotossicità su due ceppi batterici Gram negativi: *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. La concentrazione utilizzata per ciascuna ribonucleasi è di 3 μ M, abbiamo inoltre utilizzato la BSA come controllo negativo, e l'ampicillina come controllo positivo dell'esperimento. Come riportato in figura 23, le proteine che mostrano la maggior attività

microbica contro *E. coli* sono la zf-RNasi-1 e 4, ma notevole è anche l'attività antibatterica mostrata dalle zf-RNasi-3 e 5.

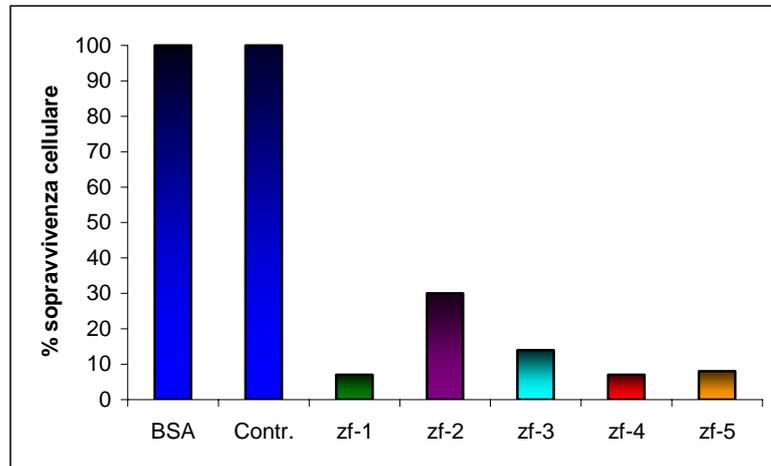


Figura 23: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *E. coli* in funzione delle proteine somministrate, tutte ad una concentrazione di 3 μ M.

Nella figura 24 si può notare che le proteine zf-RNasi-2 e 3 risultano molto attive contro *P. fluorescens*, la percentuale di sopravvivenza è estremamente bassa, stimata intorno al 4%.

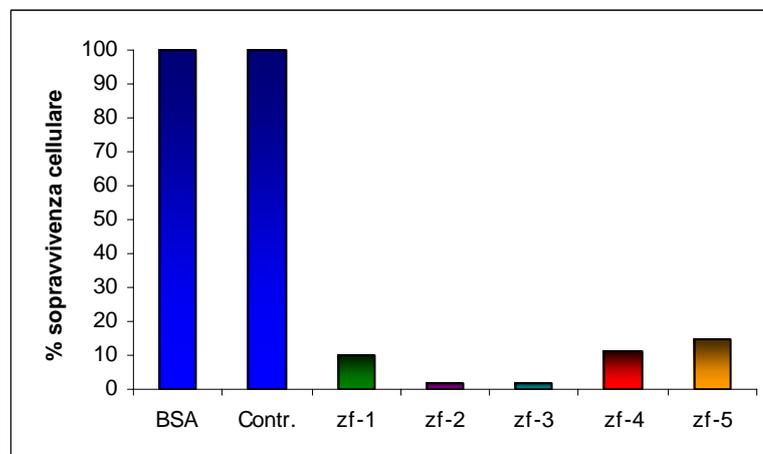


Figura 24: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *P. fluorescens* in funzione delle proteine somministrate, tutte ad una concentrazione di 3 μ M.

3.8 Saggi di attività microbica delle zf-RNasi su batteri Gram positivi.

Gli stessi saggi di attività antimicrobica sono stati condotti su due ceppi batterici Gram positivi: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Come è possibile osservare nei due grafici riportati successivamente (figure 25 e 26) le ribonucleasi isolate da *zebrafish* sembrano perdere la propria attività microbica nei confronti di batteri Gram positivi. Probabilmente a causa della differente struttura di questi ultimi, che si compone di una ben più spesso strato di peptidoglicano rispetto ai batteri Gram negativi. Nel caso particolare di *B. subtilis* (figura 25), soltanto la zf-RNasi-2 e la zf-RNasi-3 conservano una discreta attività antimicrobica.

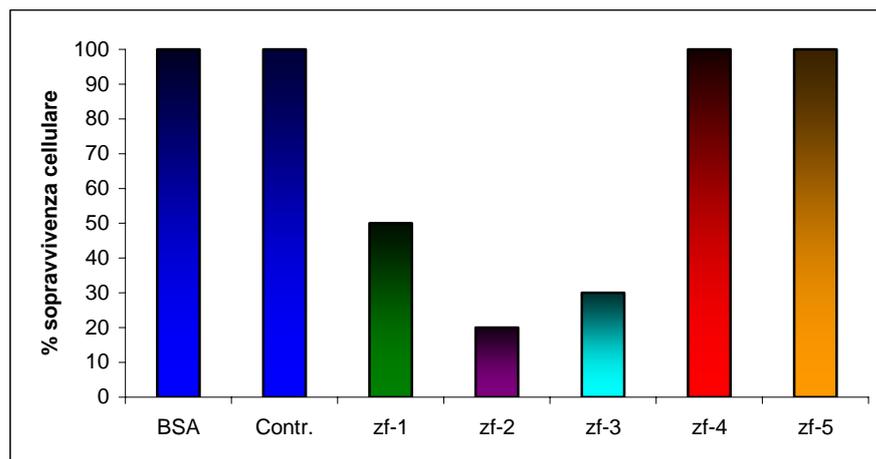


Figura 25: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *B. subtilis* in funzione delle proteine somministrate, tutte ad una concentrazione di 3 µM.

Nella figura 26 è mostrata l'attività antibatterica delle ribonucleasi isolate da *zebrafish*, rivelatesi quasi del tutto inattive su *S. aureus*, dato questo interpretabile considerando la particolare struttura della parete cellulare di questo ceppo patogeno in cui è presente un pentapeptide formato da residui di glicina.

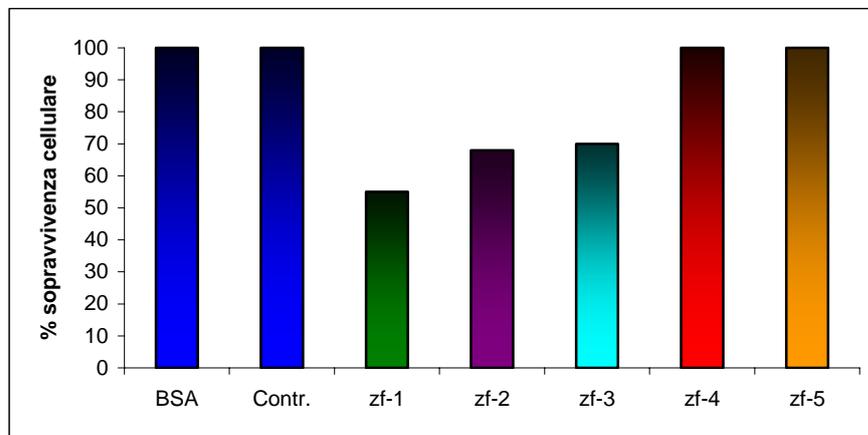


Figura 26: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *S. aureus* in funzione delle proteine somministrate, tutte ad una concentrazione di 3 µM.

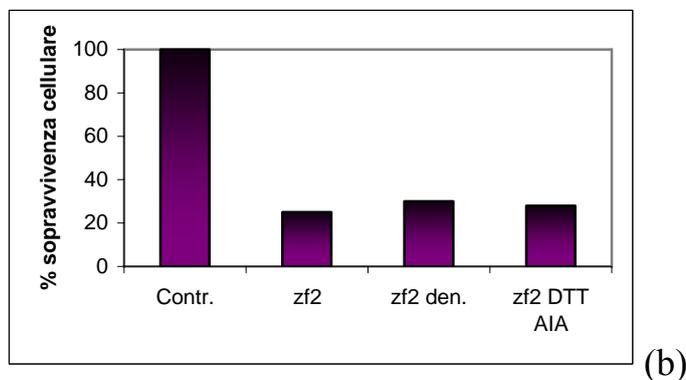
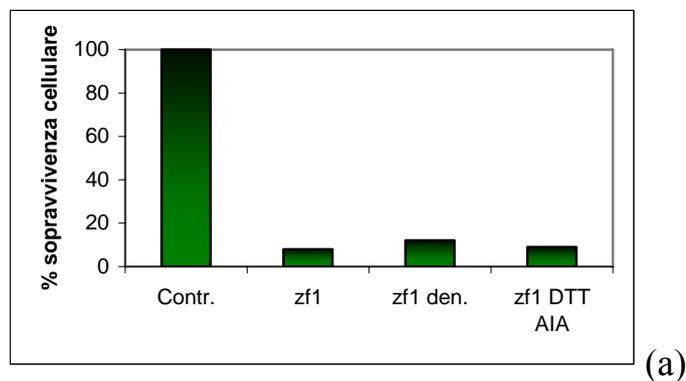
3.9 Saggi di attività microbica delle zf-RNasi su batteri Gram negativi dopo inattivazione chimica e al calore.

Abbiamo eseguito i saggi di attività microbica in diverse condizioni: denaturando le ribonucleasi di *zebrafish* a 85°C, inattivandone il sito

catalitico con acido iodoacetico (IAA), ed infine effettuando un trattamento con ditionitrotolo (DTT), un'agente riducente al fine di ridurre i ponti disolfuro presenti.

Questo esperimento è stato condotto esclusivamente su organismi Gram negativi come *E. coli*, in quanto come abbiamo visto precedentemente, l'attività delle zf-ribonucleasi, è già molto bassa su ceppi Gram positivi.

Possiamo evincere dalla figura 27 che tutte le zf-RNasi conservano invariate le proprie attività antimicrobiche, anche dopo aver subito i trattamenti sopra descritti.



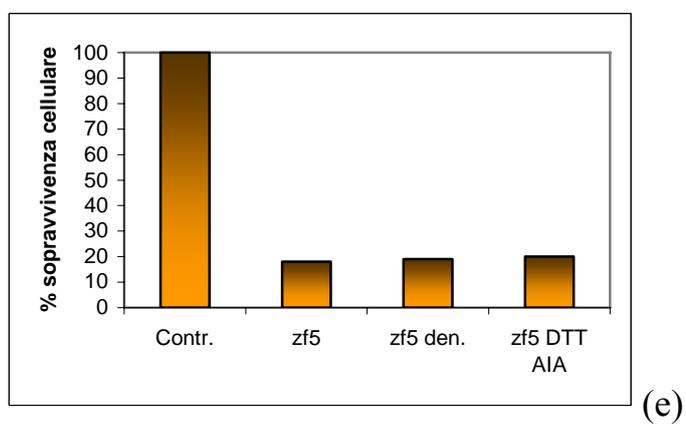
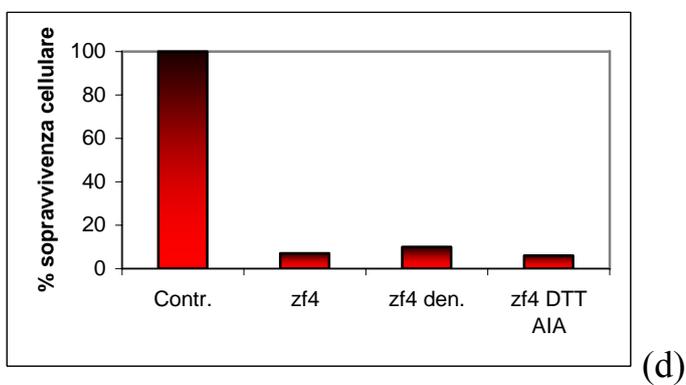
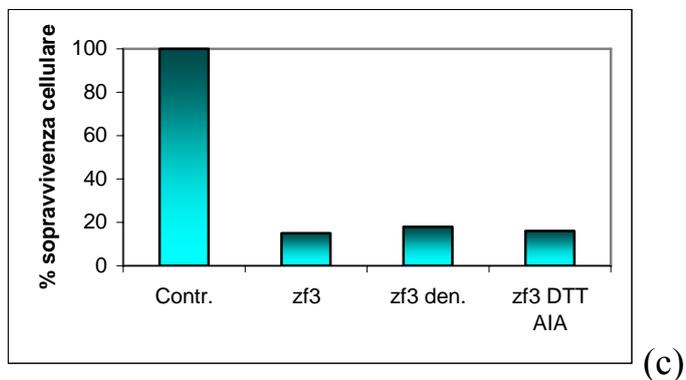


Figura 27: Saggi di attività microbicida che riportano la sopravvivenza di *E. coli* in funzione delle proteine somministrate, a=zf1, b=zf2, c=zf3, d=zf4 ed e=zf5, tutte ad una concentrazione di 3 μ M.

3.10 Saggi di attività microbica della zf-RNasi-3 su batteri Gram negativi e positivi.

Dopo aver delineato un quadro d'insieme sulla attività microbica di tutte le ribonucleasi isolate da Salmone atlantico e da *zebrafish* finora isolate, abbiamo posto la nostra attenzione sulla zf-RNasi-3.

E' stata scelta questa particolare proteina in quanto essa ha mostrato una buona attività sia sui Gram negativi *E. coli* (14% di sopravvivenza) e *P. fluorescens* (4% di sopravvivenza), che sul batterio Gram positivo *B. subtilis* (30% di sopravvivenza).

zf-RNasi-3 è stata quindi presa a modello per studiarne la localizzazione cellulare, ed il possibile meccanismo di azione.

Nella figura 28 è stata saggiata in concentrazioni crescenti (0.1- 3 μM) la suddetta proteina zf-RNasi-3 su *E. coli*, mostrando una corrispondenza tra l'aumento della concentrazione proteica e la diminuzione della sopravvivenza batterica, con un valore di LD_{50} pari a 0.75 μM .

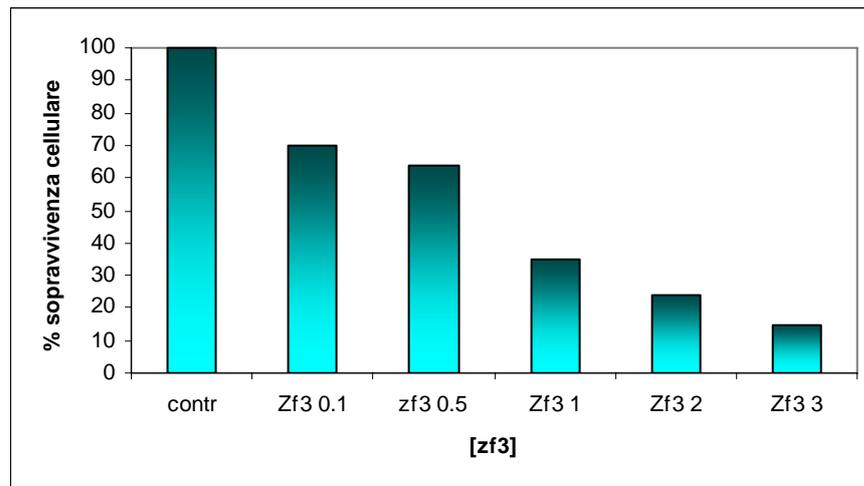


Figura 28: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *E. coli* in funzione della concentrazione di zf-RNasi-3 somministrata, espressa in μM .

I risultati ottenuti su *S. aureus* confermano la mancanza di attività su questo ceppo (figura 29).

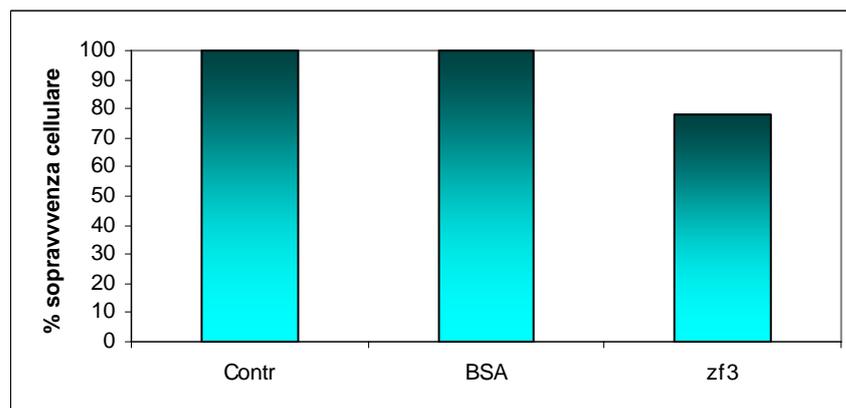


Figura 29: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *S. aureus* in funzione di zf-RNasi-3 e BSA somministrate ad una concentrazione di $3 \mu\text{M}$.

3.11 Proteolisi della proteina zf-RNasi-3 dopo trattamento con *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Per poter studiare in maggior dettaglio la modalità con cui zf-RNasi-3 interagisce con le cellule batteriche, un anticorpo policlonale in coniglio specifico per la proteina zf-RNasi-3 è stato prodotto. Dopo aver somministrato a cellule di *E. coli* la ribonucleasi suddetta alla concentrazione di 3 μM , sono state prelevate aliquote 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ore dopo il trattamento. Da ciascuna aliquota sono state estratte le proteine totali ed effettuato un *western blotting* su di esse. Come riportato in figura 30, in ogni corsia si nota la presenza di due segnali specifici per zf3, in quanto non ritrovati nel controllo negativo rappresentato da cellule di *E. coli* non trattate con la zf-RNasi-3.

Il segnale più alto corrispondente al peso molecolare di circa 14 kDa corrisponde a quello del controllo positivo (zf-RNasi-3 purificata), anche il segnale più basso equivalente al peso di circa 10.5 kDa, è assente nel controllo negativo.

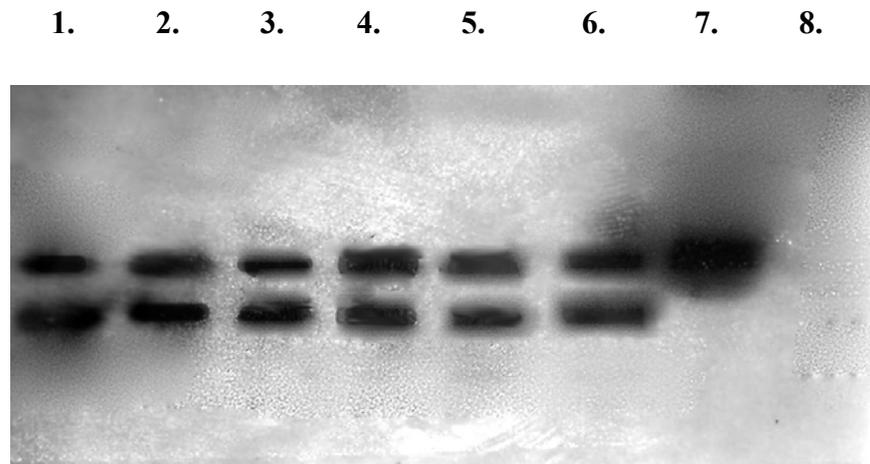


Figura 30: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: **1.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 3 μ M dopo 1 ora d'incubazione, **2.** Dopo 2 ore, **3.** Dopo 3 ore, **4.** Dopo 4 ore, **5.** Dopo 5 ore, **6.** Dopo 6 ore, **7.** zf3 purificata (controllo positivo), **8.** Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 (controllo negativo).

Lo stesso esperimento è stato eseguito nelle medesime condizioni su un ceppo di *S. aureus*, e nonostante alle cellule sia stata somministrata la stessa quantità di zf-RNasi-3, si può osservare chiaramente la presenza sul filtro dopo *western blotting*, di un unico segnale corrispondente al controllo positivo, rappresentato dalla proteina zf-RNasi-3 pura, anche dopo 6 ore dall'incubazione con la zf- ribonucleasi-3 (figura 31).

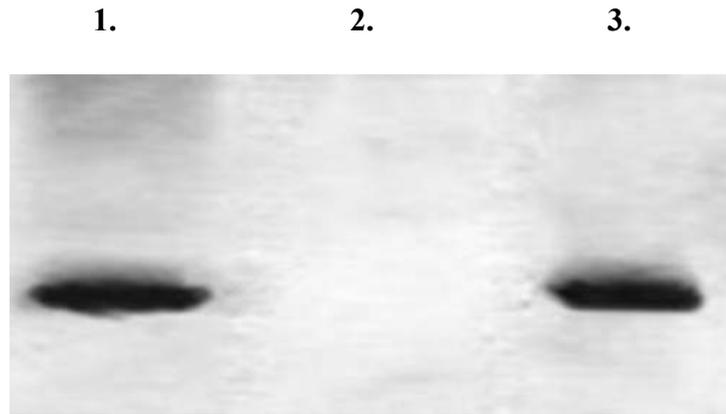


Figura 31: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: **1.** Estratto proteico totale + zf3 3 μ M dopo 6 ore d'incubazione, **2.** Estratto totale di *S. aureus* senza zf3 (controllo negativo), **3.** zf3 purificata (controllo positivo).

Alla luce di questi risultati abbiamo ipotizzato che il segnale equivalente al peso di 10.5 kDa presente solo dopo l'interazione con le cellule di tipo Gram negativo potesse essere un prodotto di proteolisi generato da un'eventuale proteasi presente nelle cellule di *E. coli*.

3.12 Processamento proteasi - dipendente in *E. coli*.

Per confermare la nostra ipotesi sul taglio proteolitico effettuato dalle cellule di *E. coli* nei confronti della proteina zf-RNasi-3 abbiamo deciso di ripetere l'esperimento precedente somministrando alle cellule batteriche oltre alla proteina nella concentrazione di 3 μ M, anche un inibitore di diverse proteasi (*Cocktail Sigma*). Prelevando le aliquote ogni ora, per sei ore, ed estraendo le proteine totali, abbiamo effettuato un esperimento di

western blotting, riportato in figura 32. In questo esperimento è possibile osservare la presenza di un unico segnale delle dimensioni di circa 14 kDa. Questo risultato dimostra che nelle cellule di *E. coli* è presente una proteasi che taglia in un sito interno della proteina zf-RNasi-3.

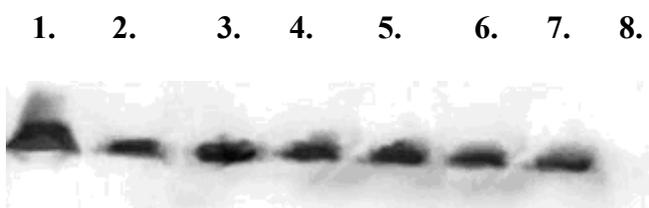


Figura 32: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: 1. zf3 purificata (controllo positivo), 2. Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 3 μ M+ inibitore di proteasi, dopo 1 ora d'incubazione, 3. Dopo 2 ore, 4. Dopo 3 ore, 5. Dopo 4 ore, 6. Dopo 5 ore, 7. Dopo 6 ore, 8. Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 (controllo negativo).

3.13 Isolamento della proteasi di *E. coli*

Per identificare la natura della proteasi attiva sulla ribonucleasi 3 di *zebrafish*, ho effettuato alcuni esperimenti di *western blotting*.

Mediante ultracentrifugazione delle cellule batteriche lisate ho ottenuto tre frazioni proteiche associate alla componente citoplasmatica, a quella membranaria ed al periplasma; la frazione membranaria è stata scelta per gli ulteriori esperimenti in quanto somministrando zf-RNasi-3 alle proteine presenti in membrana il taglio proteolitico, precedentemente osservato somministrando la proteina alle cellule intere di *E. coli*, veniva conservato.

Allo scopo di verificare la natura della proteasi coinvolta nel taglio su zf3 ho saggiato l'eventuale effetto inibitorio di alcune molecole. In particolare ho utilizzato PMSF ad una concentrazione di 2 mM ed EDTA alla medesima concentrazione, inoltre ho anche saggiato l'effetto di alcuni cationi bivalenti: calcio, rame, magnesio, manganese e zinco alla concentrazione finale di 2 mM. Le proteine della frazione membranaria trattate o meno con zf3 costituivano il controllo positivo e negativo dell'esperimento.

Il PMSF è stato utilizzato in quanto è capace di inibire l'azione di serin-proteasi, mentre l' EDTA è in grado di chelare i cationi bivalenti che vengono utilizzati come cofattori dalle metallo-proteasi. L'utilizzo dei diversi cationi bivalenti è servito a fornire ulteriori informazioni sulla natura della proteasi, visto che alcuni di essi sono descritti in letteratura per essere inibitori di alcune proteasi di *E. coli* mentre altri ne potenziano l'effetto. Come è possibile osservare in figura 33, nel campione a cui è stato aggiunto zinco non è presente il segnale da 10.5 kDa, tale risultato suggerisce che il taglio proteolitico sulla proteina zf-RNasi-3 possa essere effettuato da una proteasi inattivata da una concentrazione eccessiva di tale ione, anche il campione contenente rame sembra inibire il taglio proteolitico di zf-RNasi-3 da parte della proteasi di *E. coli*. I risultati ottenuti con l'esperimento appena descritto permettono di farci ipotizzare che la proteasi di membrana esterna Omp T, nota per essere inibita dallo

zinco ed in misura minore dal rame, possa essere la proteasi specifica per zf3.

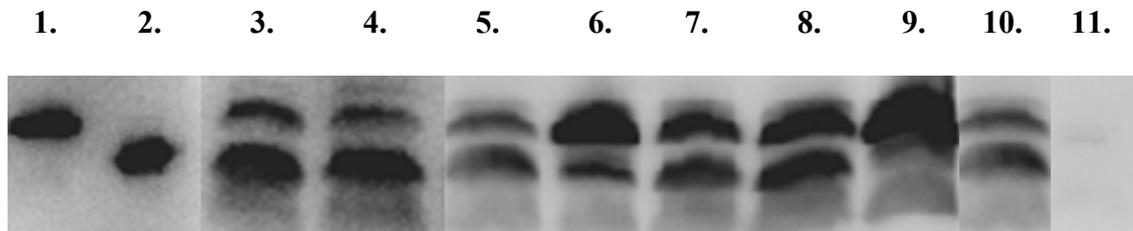


Figura 33: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: **1.** zf3 purificata (controllo positivo), **2.** LF-zf3 purificata, **3.** Frazione membranaria + zf3, **4.** Frazione membranaria + zf3, ed EDTA, **5.** Frazione membranaria + zf3 + calcio, **6.** Frazione membranaria + zf3 + rame, **7.** Frazione membranaria + zf3 + magnesio, **8.** Frazione membranaria + zf3 + manganese, **9.** Frazione membranaria + zf3 + zinco, **10.** Frazione membranaria + zf3 e PMSF, **11.** Frazione membranaria senza zf3 (controllo negativo).

3.14 Creazione di un mutante nel sito proteolitico di zf-RNasi-3

Per avere la conferma che la banda da 10.5 kDa fosse effettivamente un prodotto di proteolisi della proteina zf-RNasi-3, abbiamo sottoposto la suddetta banda proteica, (equivalente al segnale specifico di minor peso molecolare presente nel *western blotting* di figura 30), alla determinazione dell’N-terminale mediante degradazione di Edman, grazie alla collaborazione del Dottor. Antimo Di Maro.

Il risultato ottenuto rappresenta la conferma alla nostra ipotesi precedente, in quanto è risultato che la proteina zf-RNasi-3 viene proteolizzata in

corrispondenza di due arginine consecutive, site in posizione 30 e 31 della sequenza aminoacidica della suddetta ribonucleasi.

Studiando la sequenza aminoacidica (riportata qui di seguito), nonché quella nucleotidica della ribonucleasi d'interesse, abbiamo deciso di creare un mutante missenso in cui le due arginine (R) 30 e 31 venivano sostituite rispettivamente da una serina (S) e da una glicina (G), inserendo quindi soltanto 2 sostituzioni nucleotidiche nei due codoni codificanti per le due arginine adiacenti, mediante la tecnica del *GeneSOEing*.

Con tale tecnica due frammenti dello stesso gene vengono amplificati separatamente mediante PCR, e poi fusi insieme in una successiva reazione di polimerizzazione. Le mutazioni vengono introdotte disegnando una coppia di *primers* interni che contengono dei *mismatch* nucleotidici e posseggono anche una certa zona di complementarietà. Poiché i *primers* interni sono complementari tra loro, ognuno di essi viene usato in una diversa reazione di PCR ed accoppiato ad un oligonucleotide esterno, i prodotti che si generano da queste due reazioni indipendenti, sono complementari tra loro ad una delle due estremità. I singoli prodotti delle prime due PCR vengono uniti in una miscela di reazione in cui essi si appaiano tra loro, ed infine la polimerasi estende il gene contenente le mutazioni desiderate grazie all'aggiunta dopo alcuni cicli dei *primers* esterni.

Sequenza nucleotidica di zf-RNasi-3 w.t.

EIRRRYEHFLTQHVYGGITEQTCDRVMRQRRITRFPTGNDCKEVNTFIQAN
GNHVRTVCTGGGTRQTDNRDLYMSNNQFTVITCTLRSGERHPNCRYRGK
ESSRKIVVACEGEWPTHYEKGI

Sequenza nucleotidica di zf-RNasi-3 mutante

EIRRRYEHFLTQHVYGGITEQTCDRVMRQSGITRFPTGNDCKEVNTFIQAN
GNHVRTVCTGGGTRQTDNRDLYMSNNQFTVITCTLRSGERHPNCRYRGK
ESSRKIVVACEGEWPTHYEKGI

3.15 Proteolisi del mutante di zf-RNasi-3 dopo trattamento con *E. coli*.

Dopo aver ottenuto un mutante missenso mediante la tecnica del *GeneSOEing*, abbiamo trasformato con il nostro costrutto cellule di *E. coli* (BL21) per esprimere la proteina zf-RNasi-3 mutante (S30-G31) e successivamente la abbiamo purificata e saggiata su cellule di *E. coli* ad una concentrazione di 3 μ M, effettuando poi un *western blotting* sull'estratto proteico totale con anticorpo anti-zf-RNasi-3. Dalla figura 33 si può notare che sia dopo trattamento delle cellule con la proteina mutante, sia con quella *wild type* è presente un segnale all'altezza di 14 kDa corrispondente al controllo positivo, ed un secondo di 10.5 kDa; si può notare che il pattern di proteolisi pur simile in apparenza, nel campione a cui viene aggiunta la proteina mutante presenta uno *smear* di bande a significare che la specificità di taglio è stata alterata. Possiamo quindi

concludere che la proteina zf-RNasi-3 mutante viene tagliata ugualmente dalla proteasi batterica ma con una specificità ridotta.

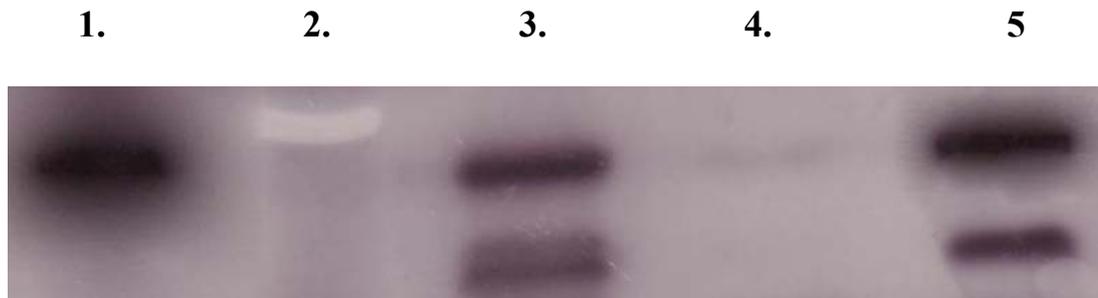


Figura 34: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: **1.** zf3 purificata (controllo positivo), **2.** Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 mutante (controllo negativo) **3.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 mutante 3 μ M dopo 6 ore d'incubazione, **4.** Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 w.t. (controllo negativo) dopo 6 ore, **5.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 w.t. 3 μ M dopo 6 ore d'incubazione.

3.16 Attività microbica di zf-RNasi-3 *wild type* e mutante su *E. coli* e *S. aureus*.

Sulle due proteine zf3 (selvatica e mutante) sono poi stati effettuati i saggi di attività microbica. Le ribonucleasi sono state usate alla medesima concentrazione di 3 μ M, utilizzando come controllo la BSA alla stessa concentrazione. Questo esperimento ha confermato che la proteina zf-RNasi-3 mutante conserva la sua attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram negativi come *E. coli*, e si comporta come la ribonucleasi *wild type* anche su batteri Gram positivi come *S. aureus*.

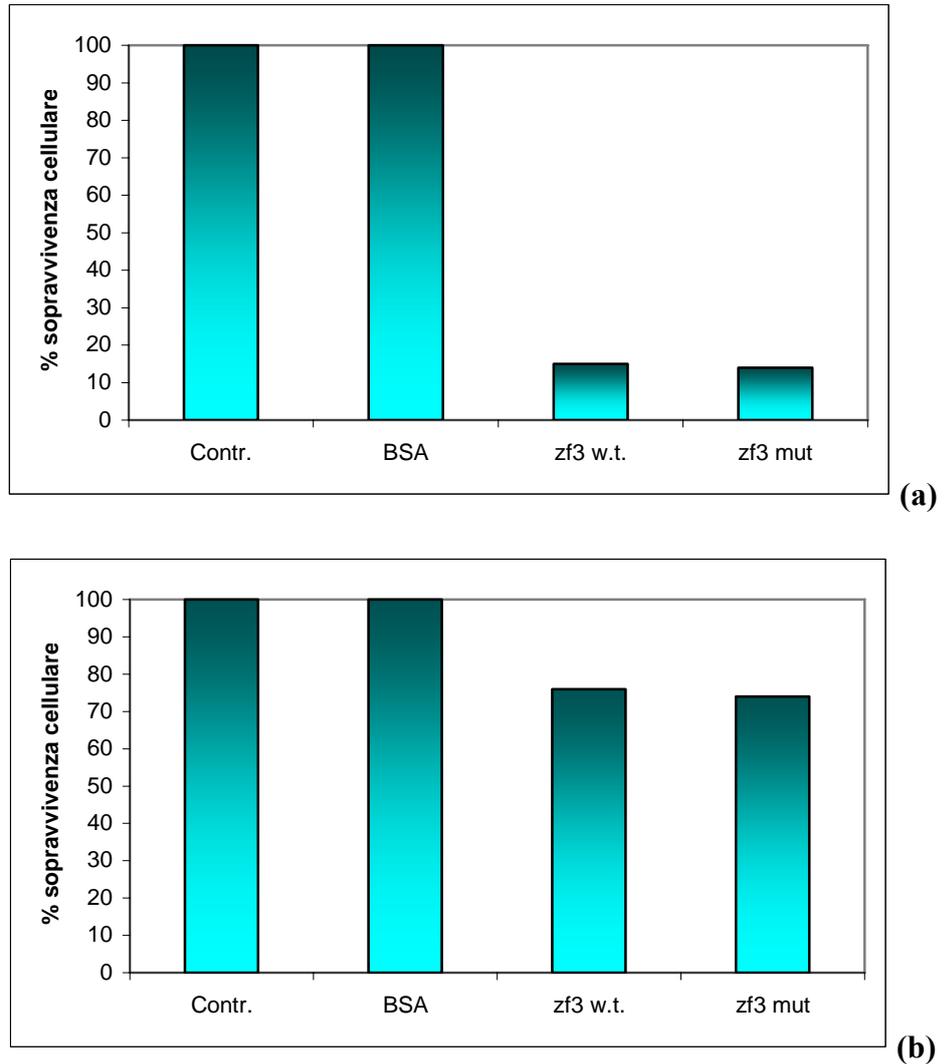


Figura 35: Saggio di attività microbica (a) su *E. coli*, (b) su *S. aureus*, che riporta la sopravvivenza batterica in funzione della presenza di zf-RNasi-3 w.t. e mutante somministrate a 3 μ M.

3.17 Purificazione della banda da 10.5 kDa e saggi di attività su *E. coli* e *S. aureus*.

Il successivo esperimento è stato effettuato con lo scopo di capire se l'attività microbica fosse posseduta dalla proteina zf3 intera o dal frammento derivante dalla proteasi di *E. coli*. E' quindi stato amplificato mediante PCR il gene codificante per la di proteina di 10.5 kDa, è stato poi

clonato in un vettore di espressione, e purificato mediante una cromatografia a scambio cationico. Sono stati effettuati diversi esperimenti per saggiare l'attività antimicrobica della proteina tronca di 10.5 kDa, comparandone l'attività alla *zf-RNasi-3 wild type*. Entrambe le proteine sono state usate ad una concentrazione di 3 μ M, con l'aggiunta degli opportuni controlli. Come mostrato in figura 35 sulle cellule di *E. coli* la *zf-RNasi-3* tronca di 10.5 kDa presenta la stessa attività della proteina *wild type*.

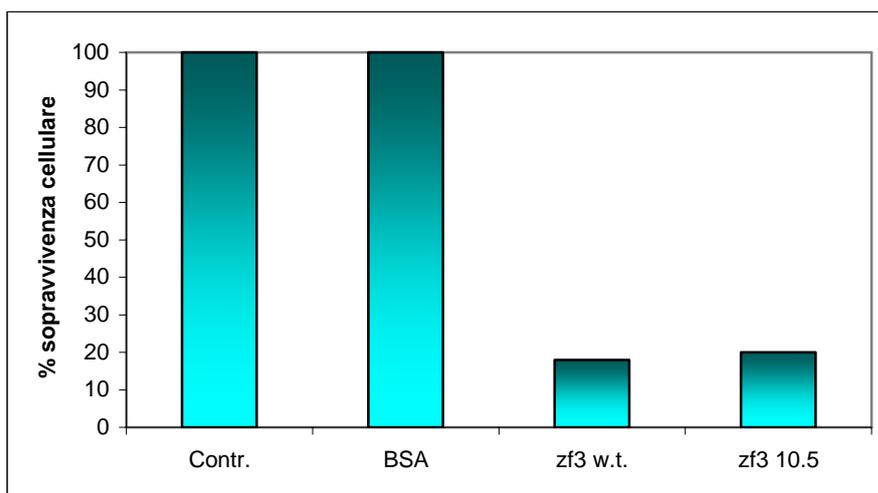


Figura 36: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *E. coli* in funzione della presenza di *zf-RNasi-3* w.t. e 10.5 kDa somministrate a 3 μ M.

Osservando i dati riportati in figura 37, possiamo notare che la proteina *zf-RNasi-3* tronca di 10.5 kDa possiede, diversamente da *zf3* una significativa attività antibatterica anche su batteri Gram positivi come *S. aureus*.

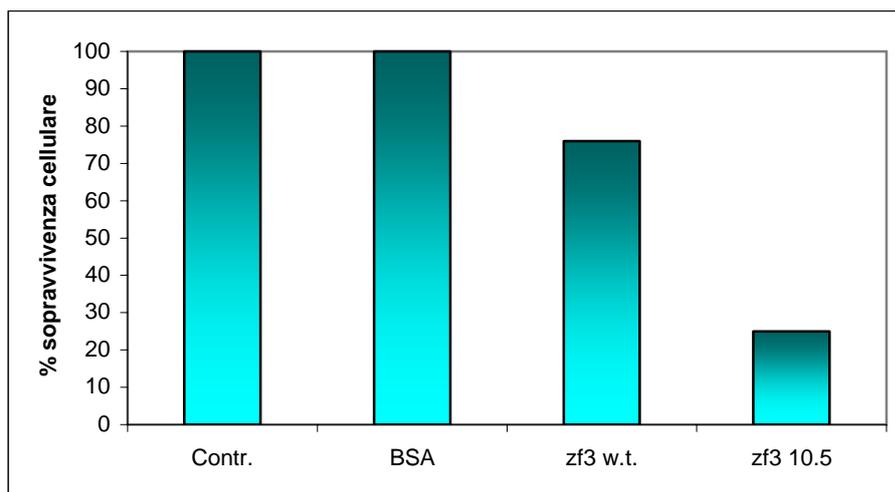


Figura 37: Saggio di attività microbica che riporta la sopravvivenza di *S. aureus* in funzione della presenza di zf-RNasi-3 w.t. e 10.5 kDa somministrate a 3 μ M.

Questo risultato mostra chiaramente che la proteina zf-RNasi-3 che non è dotata di attività antimicrobica contro i Gram positivi, dopo il taglio proteolitico acquista attività nei confronti dei batteri Gram positivi a cui viene somministrata. La presenza nei Gram negativi di una putativa proteasi rende, in vivo, possibile la maturazione della proteina in una forma attiva. Per quanto riguarda, invece, le cellule Gram positive, esse hanno una struttura cellulare diversa dai Gram negativi, con una parete più spessa, che quindi ostruisce la penetrazione della proteina intera all'interno della cellula, oppure esse potrebbero semplicemente non possedere una proteasi capace di tagliare la zf-RNasi-3.

3.18 Sintesi in vitro del peptide N-terminale di 30 aa e saggi di attività su *E. coli* e *S. aureus*.

Dal taglio proteolitico della proteina zf-RNasi-3 effettuato dalle cellule di *E. coli*, oltre a generarsi il frammento di 10.5 kDa, si libera anche un peptide molto più piccolo di soli 30 a.a. dal peso di circa 3.8 kDa. Abbiamo deciso di far sintetizzare in vitro (*Thinks peptides*) il peptide di 3.8 kDa per poter saggiare la sua capacità microbica nei confronti. Abbiamo effettuato questi saggi utilizzando il peptide, la zf-RNasi-3 *wild type*, la proteina tronca di 10.5 kDa, denominata Large Fragment of zf-RNasi-3 (LF-zf3), e l'insieme del peptide più LF-zf3, tutte le proteine sono state usate ad una concentrazione di 3 μ M.

Quest'ultima prova è stata effettuata per capire se il peptide possiede anch'esso un'attività antimicrobica, ma soprattutto se può inibire l'attività microbica propria di LF-zf3.

Compiendo un esperimento di *western blotting*, riportato in figura 38, risulta che, in condizioni non riducenti, il peptide e la proteina tronca restano uniti grazie ad un ponte disulfuro, formato da una cisteina posta all'interno della sequenza aminoacidica del peptide ed una delle altre 5 cisteine presenti nella proteina tronca da 10.5 kDa.

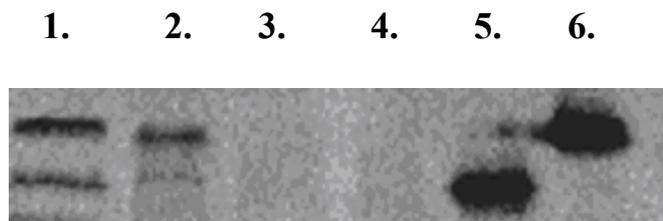


Figura 38: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: **1.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 in condizioni riducenti., **2.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 in condizioni non riducenti , **3.** Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 in condizioni riducenti (controllo negativo). **4.** Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 in condizioni non riducenti, **5.** LF-zf3 purificata (controllo positivo), **6.** zf3 purificata (controllo positivo).

Dai saggi di attività microbica risulta che il peptide di 3.8 kDa non è attivo contro *E. coli* e nemmeno contro *S. aureus*. La proteina zf-RNasi-3 *wild type* conferma la sua attività esclusivamente su batteri Gram negativi mentre LF-zf3 mostra un'attività antibatterica sia contro batteri Gram negativi che positivi. Interessante è il dato del peptide somministrato alle cellule insieme alla proteina tronca di 10.5 kDa, che non sembra inibire la capacità microbica di LF-zf3 (dati riportati in figura 38).

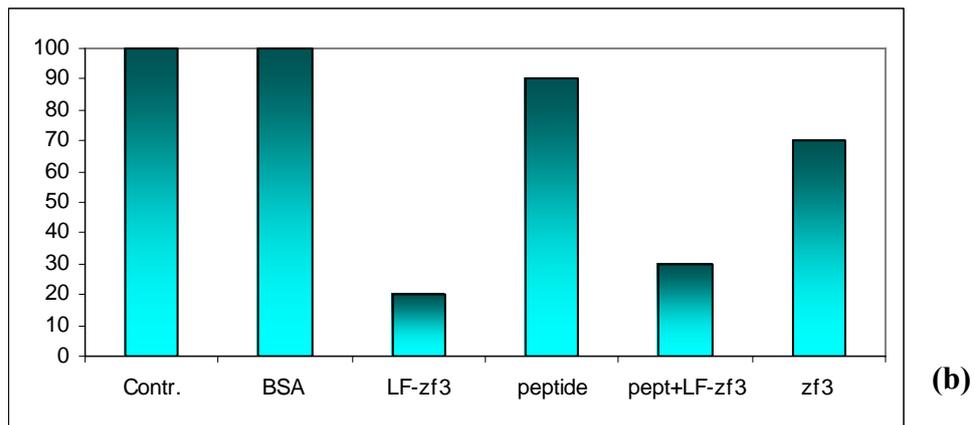
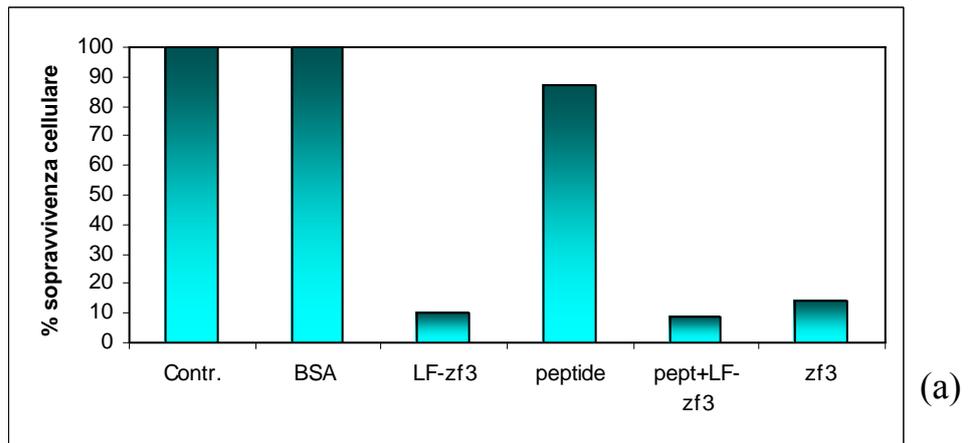


Figura 39: Saggi di attività microbica (a) su *E. coli*, (b) su *S. aureus*, che riportano la sopravvivenza cellulare in funzione della presenza di zf-RNasi-3 w.t, LF-zf3, peptide e LF-zf3+ peptide somministrate a 3 μ M.

3.19 Saggi di attività microbica della proteina zf-RNasi-3 e di LF-zf3 dopo trattamento con cloruro di sodio (NaCl).

Abbiamo deciso di effettuare saggi di attività microbica della proteina zf-RNasi-3 in presenza di cloruro sodico, su cellule di *E. coli*.

Oltre ai controlli effettuati utilizzando BSA ad una concentrazione di 3 μ M ed ampicillina ad una concentrazione di 50 μ g/ μ l, è stato aggiunto anche NaCl in due differenti concentrazioni 250 mM e 500 mM.

La proteina zf-RNasi-3 si comporta allo stesso modo delle ribonucleasi isolate da salmone: la concentrazione della proteina è fissa a 3 μ M, senza l'aggiunta di sale si nota una percentuale di sopravvivenza intorno al 14%, a 250 mM di NaCl la percentuale di sopravvivenza cellulare aumenta al 55%, mentre l'attività citotossica alla concentrazione di cloruro di sodio di 500 mM, si perde completamente (figura 40).

L'esperimento in modo analogo è stato condotto utilizzando la proteina zf-RNasi-3 da 10.5kDa, su cellule di *E. coli*. La percentuale di sopravvivenza generale di LF-zf3 è completamente assimilabile a quello della proteina zf-RNasi-3 *wild type*.

Una conclamata diminuzione dell'attività antimicrobica in presenza di sali da parte di queste proteine, potrebbe significare che all'interno della soluzione cambia l'osmolarità ed aumenta la difficoltà da parte delle

proteine stesse di entrare in contatto con la superficie cellulare per effettuare l'ingresso all'interno dei batteri provocandone la morte.

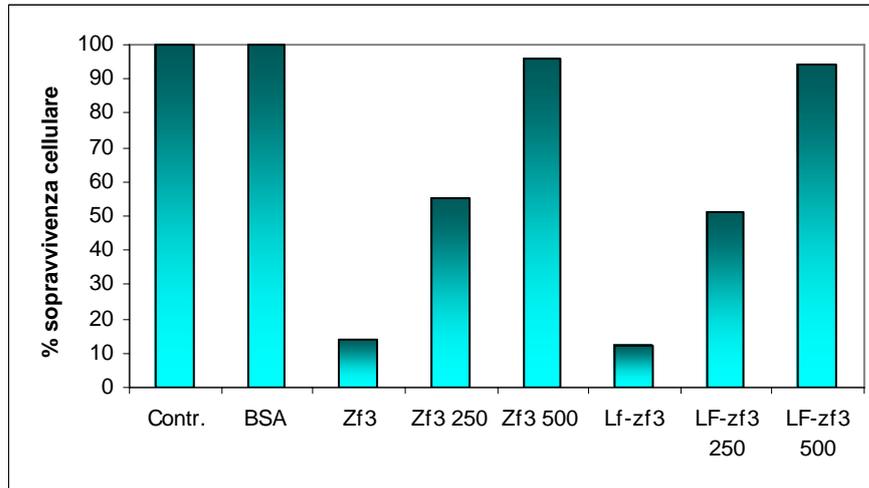


Figura 40: Saggio di attività microbicida che riporta la sopravvivenza di *E. coli* in funzione della concentrazione di zf-RNasi-3 w.t e LF-zf3 somministrate a 3 μ M, con l'aggiunta di sale a 250 mM e 500mM.

3.20 Saggio di proteolisi su zf-RNasi-3 in presenza di NaCl.

Per verificare se il cloruro di sodio influenzasse il taglio proteolitico di zf3 da parte della proteasi di *E. coli*, ho effettuato un saggio di proteolisi somministrando a cellule di *E. coli* la proteina zf-RNasi-3 insieme al cloruro di sodio (500 mM).

Le cellule dopo un'incubazione di 6-8 ore a 37°C venivano sonicate e da esse estratte le proteine. Sulle proteine totali veniva eseguito un *western blotting* riportato in figura 41.

Come possiamo notare dalla figura 41, nel campione trattato con il sale vi è la presenza di un unico segnale specifico di 14 kDa. Questo dato indica non solo che la proteina non viene processata, ma anche che a parità di zf-RNasi-3 aggiunta alle cellule di *E. coli*, il segnale corrispondente a 14 kDa, presente nel campione a cui vengono aggiunti sale e zf-RNasi-3 ha un'intensità di gran lunga minore rispetto al controllo positivo.

L'ipotesi che l'alterazione della osmolarità influenzi il contatto tra la cellula e la proteina potrebbe essere valida.

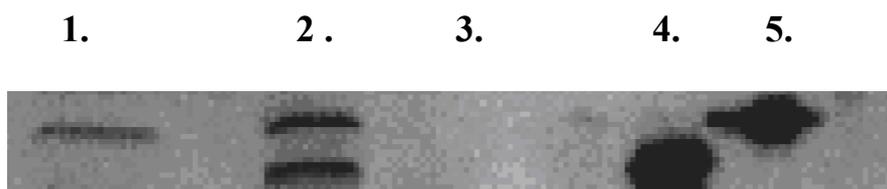


Figura 41: *Western blot* con anticorpo anti-zf3: **1.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3 in presenza di NaCl., **2.** Estratto proteico totale di *E. coli* + zf3, **3.** Estratto proteico totale di *E. coli* senza zf3 (controllo negativo), **4.** LF-zf3 pura (controllo positivo), **5.** zf3 pura (controllo positivo).

3.21 Localizzazione cellulare di zf-RNasi-3 *wild type* in cellule di *E. coli*.

Negli esperimenti successivi si è cercato di capire quale fosse la localizzazione cellulare della proteina zf-RNasi-3 e della sua forma processata da 10.5 kDa.

Ho effettuato esperimenti di compartimentalizzazione cellulare, frazionando le cellule batteriche di *E. coli* mediante l'utilizzo dell'ultracentrifuga, dopo la somministrazione a quest'ultime di zf-RNasi-3 ad una concentrazione finale di 3 μ M, ottenendo tre diverse frazioni: la frazione periplasmatica, formata per lisi della membrana esterna mediante shock osmotico, la frazione citoplasmatica, ed infine la frazione membranaria. Come è possibile osservare, dopo *western blotting* sulle varie frazioni (figura 42), nella frazione citoplasmatica si assiste alla presenza di un unico segnale corrispondente al peso di 10.5 kDa. Nella frazione membranaria, invece, vi sono due distinti segnali uno corrispondente al peso molecolare della zf-RNasi-3 intera (14 kDa) e l'altro alla ribonucleasi processata dal peso molecolare di 10.5 kDa.

Questo esperimento ci ha permesso di ipotizzare che la zf-RNasi-3 subisce il taglio proteolitico in membrana plasmatica, una parte resta ancora integrata, mentre la proteina ormai processata, riesce a penetrare all'interno del citoplasma.

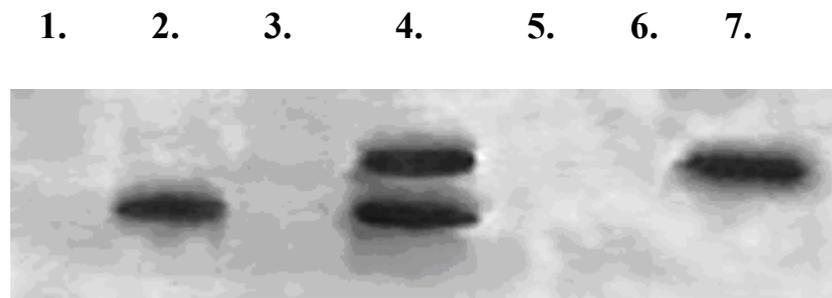


Figura 42: *Western blot* con anticorpo anti-zf3 eseguito su proteine di *E. coli*: **1.** Proteine della frazione citoplasmatica senza zf3 (controllo negativo), **2.** Proteine della frazione citoplasmatica con zf3, **3.** Proteine della frazione membranaria senza zf3 (controllo negativo), **4.** Proteine della frazione membranaria con zf3, **5.** Proteine del periplasma senza zf3 (controllo negativo), **6.** Proteine del periplasma con zf3, **7.** zf3 purificata (controllo positivo).

3.22 Localizzazione cellulare di zf-RNasi-3 *w.t.* in cellule di *S. aureus*.

La stessa tipologia di esperimento è stato ripetuto frazionando cellule di *S. aureus*, dopo somministrazione della proteina zf-RNasi-3 ad una concentrazione di 3 μ M. Sono stati ripetuti gli stessi controlli dell'esperimento precedente, frazionando cellule di *S. aureus* a cui non era stata aggiunta la ribonucleasi 3 di *zebrafish*. Dopo aver effettuato un *western blotting* su tali estratti proteici provenienti dai tre diversi compartimenti cellulari (figura 43), si nota la presenza di un segnale da 14 kDa corrispondente alla zf-RNasi-3 solo nella frazione membranaria, mentre non vi è alcun segnale nella frazione citoplasmatica. Questo risultato ci mostra come in cellule di *S. aureus* la proteina non venga

processata e resti in membrana plasmatica, questo si riflette sulla mancata attività da parte della ribonucleasi 3 di *zebrafish* su batteri Gram positivi.

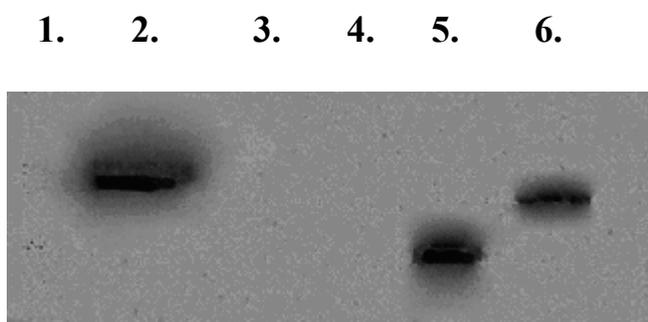


Figura 43: *Western blot* con anticorpo anti-zf3, eseguito su proteine di *S. aureus*: **1.** Proteine della frazione membranaria senza zf3 (controllo negativo), **2.** Proteine della frazione membranaria con zf3, **3.** Proteine della frazione citoplasmatica senza zf3 (controllo negativo), **4.** Proteine della frazione citoplasmatica con zf3, **5.** Proteina LF-zf3 pura (controllo positivo), **6.** zf3 pura (controllo positivo).

3.23 Localizzazione cellulare della proteina di 10.5 kDa (LF-zf3) in cellule di *E. coli*.

Dopo aver somministrato a cellule di *E. coli* la proteina ricombinante da 10.5 kDa, come nel precedente esperimento le proteine cellulari sono state separate nelle tre diverse frazioni e su queste ultime è stato operato un esperimento di *western blotting*.

Come vediamo in figura 44 sia nell'estratto citoplasmatico, sia nella frazione membranaria è presente un unico segnale, corrispondente al peso di 10.5 kDa.

Questo esperimento conferma il dato ottenuto somministrando la proteina zf-RNasi-3 selvatica, ossia una parte di LF-zf3 resta nella membrana plasmatica, ma la maggior parte di essa penetra all'interno del citoplasma.

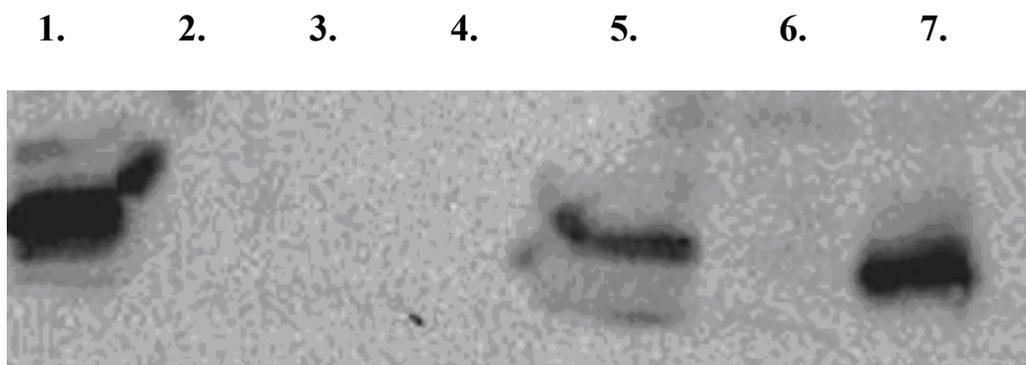


Figura 44: *Western blot* con anticorpo anti-zf3 eseguito su proteine di *E. coli*: **1.** LF- zf3 purificata (controllo positivo), **2.** Proteine del periplasma senza LF-zf3 (controllo negativo), **3.** Proteine del periplasma con LF-zf3, **4.** Proteine della frazione membranaria senza LF-zf3 (controllo negativo), **5.** Proteine della frazione membranaria con LF-zf3, **6.** Proteine della frazione citoplasmatica senza LF-zf3 (controllo negativo), **7.** Proteine della frazione citoplasmatica con LF-zf3.

3.24 Localizzazione cellulare della proteina di 10.5 kDa in cellule di *S. aureus*

Abbiamo ripetuto l'esperimento precedente somministrando la proteina ricombinante LF-zf3 ad una concentrazione di 3 μ M a cellule di *S. aureus*. Dall'immunoblot riportato in figura 44 risulta evidente la presenza di un unico segnale di 10.5 kDa equivalente ad uno dei controlli positivi rappresentati dalla proteina LF-zf3 purificata. Il segnale è presente sia nella frazione citoplasmatica che in quella membranaria, questa osservazione risulta compatibile con i dati di attività microbica posseduta dalla

proteina LF-zf3 nei confronti dei batteri Gram positivi. Questo esperimento sembra confermare l'ipotesi che la proteina zf-RNasi-3 venga proteolizzata in due frammenti uno più piccolo di 3.8 kDa e l'altro di 10.5 kDa, solo quest'ultimo possiede attività microbica e si localizza sia a livello membranario che citosolico.

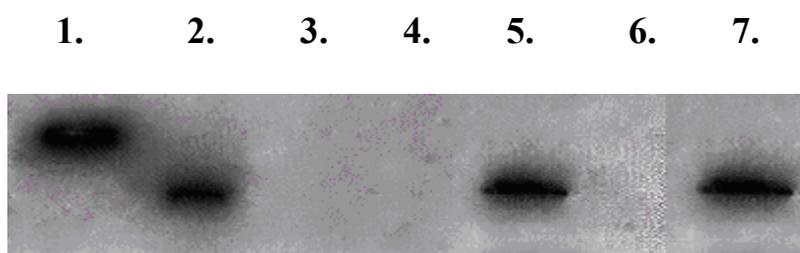


Figura 45: *Western blot* con anticorpo anti-zf3 eseguito su proteine di *S. aureus*: **1.** zF3 purificata (controllo positivo). **2.** LF-zf3 purificata (controllo positivo) **3.** vuoto **4.** proteine della frazione membranaria senza LF-zf3 (controllo negativo). **5.** proteine della frazione membranaria con LF-zf3. **6.** proteine della frazione citoplasmatica senza LF-zf3 (controllo negativo) **7.** proteine della frazione citoplasmatica con LF-zf3.

3.25 Localizzazione cellulare della proteina zf-RNasi-3

w.t. in cellule di *E. coli* con microscopia a fluorescenza.

Al fine di confermare gli esperimenti di localizzazione cellulare effettuati mediante compartimentalizzazione, ho deciso di coniugare la proteina zf-RNasi-3 ad una molecola fluorescente chiamata *Alexa Fluor 488*.

Si tratta di una miscela di isomeri: molecole di acido carbossilico e molecole di esteri succinimidilici, che riesce a legarsi alle ammine primarie presenti nelle proteine e nei peptidi, o alle ammine modificate presenti

negli acidi nucleici. Questa miscela ha un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 495 nm, ed un massimo di emissione intorno a 519 nm, lunghezza d'onda rilevabile in microscopia a fluorescenza.

Dopo aver controllato che fosse avvenuto il legame tra la proteina zf-RNasi-3 e la molecola di *Alexa Fluor 488*, abbiamo somministrato il coniugato ad una concentrazione di 3 μ M, a cellule di *E. coli* per capire, mediante il segnale fluorescente, dove si andava a localizzare la ribonucleasi 3 di *zebrafish*.

Con un'osservazione al microscopio a contrasto di fase si poteva notare la presenza di tre diversi stati per le cellule batteriche: alcune apparivano integre, di colore grigio scuro e con contorni regolari; altre invece, sembravano lisate, in quanto avevano un colore molto più chiaro e contorni irregolari, tipico aspetto di strutture dette *ghosts*. La terza tipologia cellulare risultava la più interessante, si trattava di cellule batteriche dal colore grigio chiaro ma che all'interno presentavano una sorta di granuli di colore grigio più scuro (figura 46).



Figura 46: Fotografia al microscopio a contrasto di fase, di cellule di *E. coli*, dopo somministrazione di *zf3-Alexa Fluor 488*.

Subito dopo abbiamo osservato lo stesso preparato in fluorescenza, facendo attenzione a paragonare il medesimo campo dell'osservazione precedente. Come si può notare dalla figura 47 soltanto il terzo tipo di cellule è rilevabile, in quanto fluorescente. Sono stati eseguiti due controlli, ossia abbiamo somministrato alle cellule solo il reattivo *Alexa Fluor 488*, osservando una fluorescenza diffusa su tutto il vetrino, ed abbiamo poi, osservato cellule batteriche trattate solo con *zf-RNasi-3*, non osservando alcun segnale fluorescente.

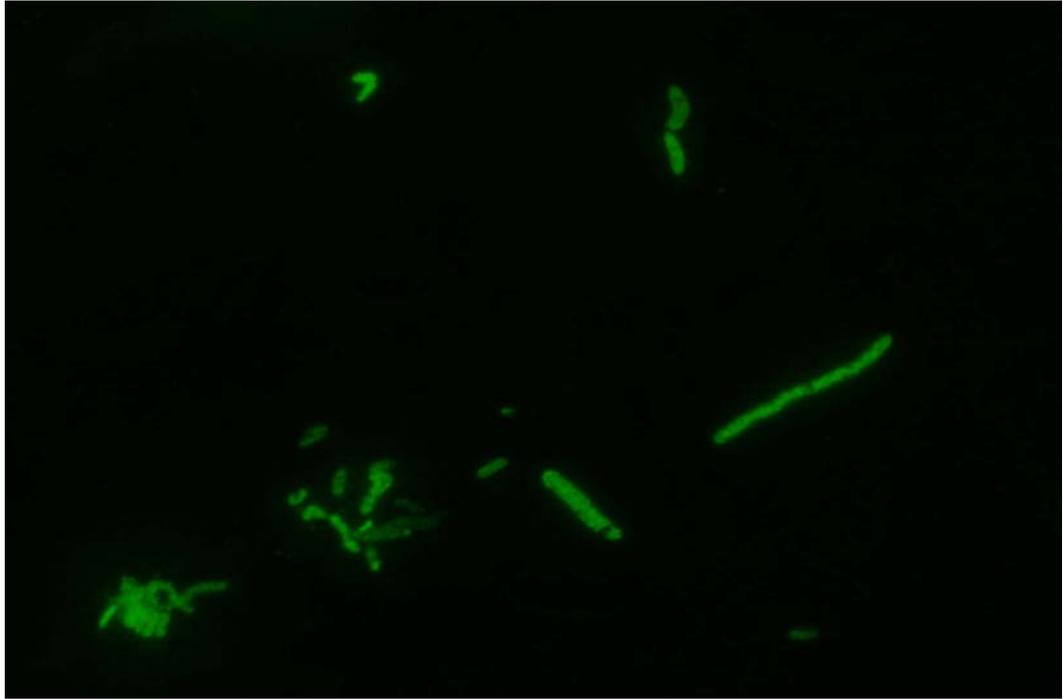


Figura 47: Fotografia al microscopio a fluorescenza, di cellule di *E. coli*, dopo somministrazione di zf3-*Alexa Fluor 488*.

Da questo esperimento possiamo concludere che la proteina zf-RNasi-3 penetra all'interno delle cellule conferendo loro la fluorescenza, e successivamente le conduce a morte. Le cellule di colore grigio chiaro dopo essere state sottoposte all'azione della proteina zf-RNasi-3 sono lisate, riversando il loro contenuto fluorescente all'esterno che è stato rimosso con lavaggi successivi. Invece le cellule integre non sono state ancora contattate dalla proteina fluorescente, e di conseguenza non emettono alcun segnale rilevabile in microscopia a fluorescenza.

L'ingresso della nostra proteina d'interesse all'interno della cellula, come visto precedentemente già con gli esperimenti di frazionamento cellulare, sembra essere confermato con l'ausilio della microscopia a fluorescenza.

3.26 Meccanismo d'azione di zf-RNasi-3

Abbiamo ottenuto molte informazioni su zf-RNasi-3, sia sulla attività microbica che sulla localizzazione cellulare, ma l'ultima parte del nostro lavoro si è concentrata su come questa proteina potesse agire sulla cellula batterica, provocandone la morte.

Dagli esperimenti in microscopia a fluorescenza è chiaramente visibile che la proteina viene in contatto con la cellula batterica, nel caso di *E. coli* essa subisce un taglio proteolitico e la sua forma troncata da 10.5 kDa conserva l'attività microbica. Il meccanismo con cui essa esplica la sua funzione è stato oggetto di nostri recenti esperimenti.

In un primo momento pensavamo che la zf-RNasi-3 mediante la sua attività ribonucleasica riuscisse ad uccidere le cellule batteriche, proprio attraverso la degradazione dell'acido ribonucleico.

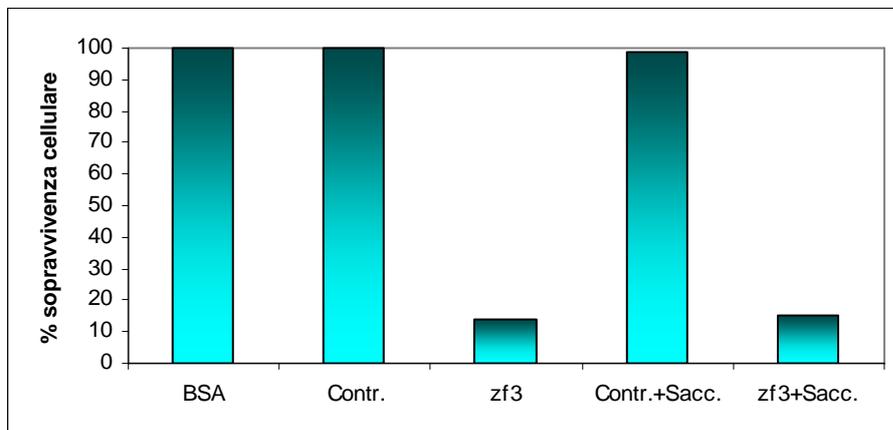
Quando nel corso dei nostri esperimenti abbiamo scoperto che era la proteina troncata da 10.5 kDa a conservare l'attività microbica, abbiamo effettuato dei saggi spettrofluorimetrici su di essa, arrivando alla conclusione che FL-zf3 perde completamente l'attività RNasica.

Infatti LF-zf3 è una proteina troncata che manca dei primi 30 aminoacidi, e manca soprattutto dell'istidina in posizione 12, residuo indispensabile della triade catalitica dell'enzima.

Negli esperimenti successivi abbiamo ipotizzato che la proteina zf-RNasi-3 possa mandare in lisi osmotica la cellula procariotica, in quanto rende il

compartimento citoplasmatico fortemente iperosmotico, portando all'ingresso di acqua nella cellula,

Per confermare questa ipotesi abbiamo effettuato dei saggi di attività microbica in presenza di un osmo-protettore quale il saccarosio ad una concentrazione del 17%. Se il meccanismo con cui LF-zf3 uccide le cellule è quello della lisi osmotica aggiungendo saccarosio, si dovrebbe contrastare questo fenomeno impedendo l'entrata dell'acqua e di conseguenza la lisi osmotica.



(a)

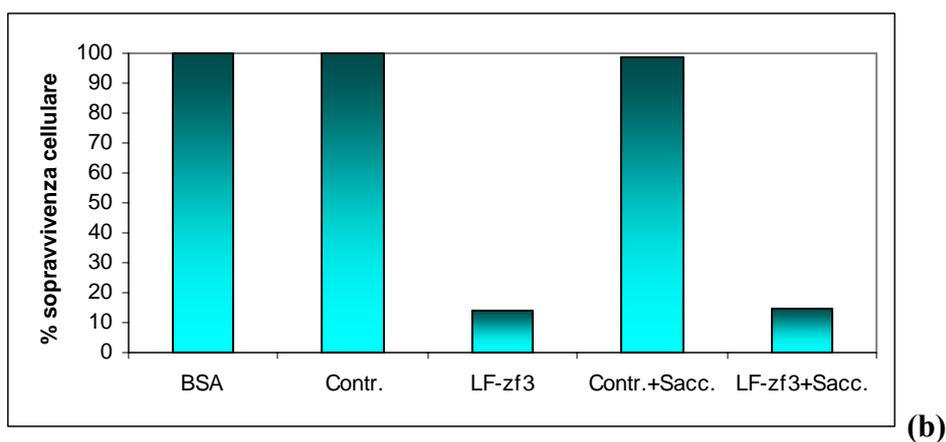


Figura 48: Saggi di attività microbica che riportano la sopravvivenza di *E. coli* in funzione della presenza di zf-RNasi-3 w.t e LF-zf3 somministrate a 3 μ M, con l'aggiunta di saccarosio.

Dalla figura 48 si può notare che il comportamento di entrambe le proteine zf-RNasi-3 e LF-zf3 si mantiene costante, esse conservano l'attività antibatterica nonostante l'aggiunta del saccarosio.

4. Discussione

L'interesse scientifico per l'evoluzione dei pesci è diventato negli ultimi anni un argomento di grande interesse, molti studi sono stati compiuti ed il genoma di diverse specie è stato sequenziato, ciò è stato sicuramente importante per comprendere più in generale l'evoluzione dei vertebrati.

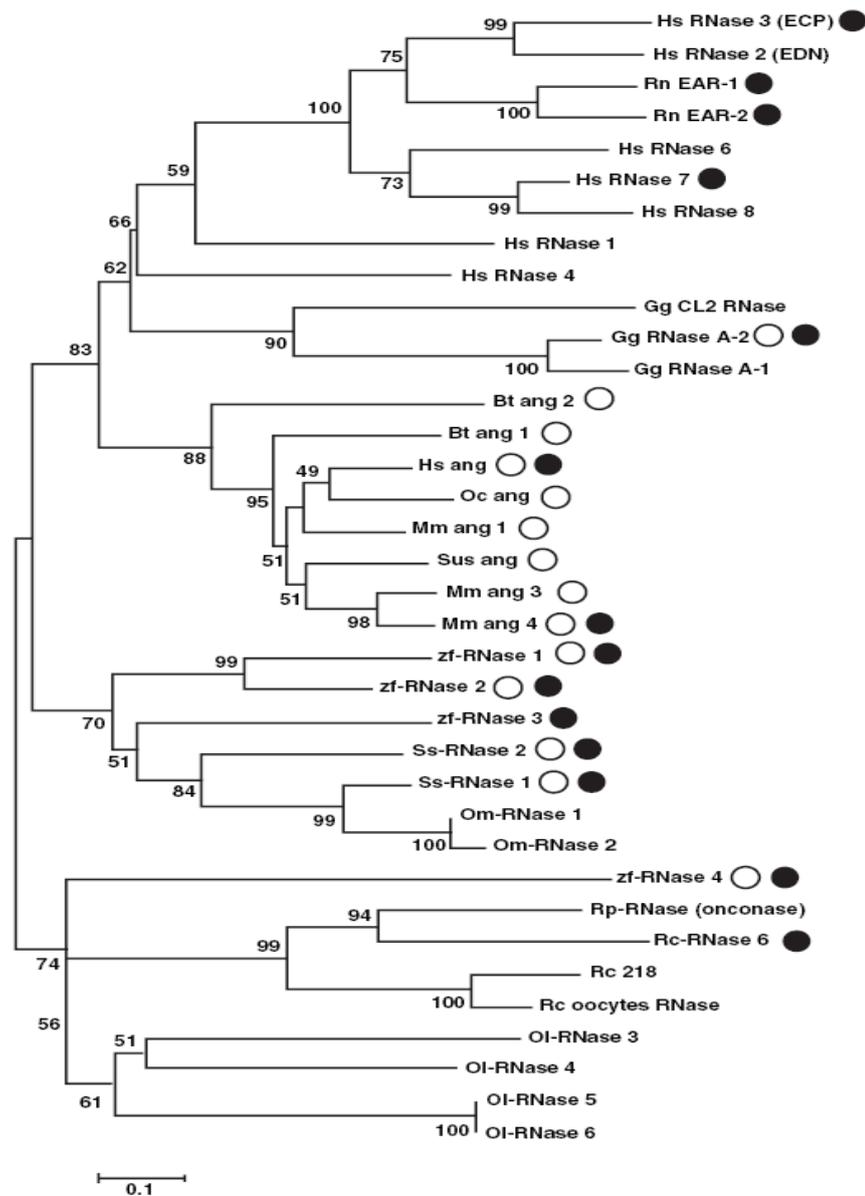


Figura 49: Albero filogenetico che illustra i legami tra le ribonucleasi di vertebrati. Con il pallino vuoto è indicata l'attività angiogenica, con quello pieno quella microbicida. Hs=*Homo sapiens*, Rn=*Rattus norvegicus*, Gg=*Gallus gallus*, Bt=*Bos taurus*, Oc=*Orictolagus cuniculus*, Mm=*Mus Musculus*, zf=*zebrafish*, Sus=*Sus scrofa*, Ss=*Salmon salar*, Om= *Om. Mykisse*, Rp=*Rana pipiens*, Rc= *Rana catesbeiana*, Ol= *Ory. Latipes*.

E' stato creato un albero filogenetico (figura 49), basato sulla comparazione di alcune ribonucleasi della superfamiglia dei vertebrati. All'interno dell'albero le ribonucleasi isolate da pesci formano due *clusters* distinti, le ribonucleasi isolate da Salmone e le prime tre di *zebrafish* sono molto legate tra loro e formano il primo gruppo, mentre la zf-RNasi-4 è compresa in un gruppo diverso insieme a ribonucleasi isolate da anfibi. Questa localizzazione ci fa comprendere che è molto probabilmente esistito un gene ancestrale comune da cui sono poi derivate le ribonucleasi dei pesci e quelle degli anfibi. Tale progenitore comune possedeva probabilmente sia proprietà angiogeniche che ribonucleasiche. Inoltre i risultati mostrati anche in questo lavoro di tesi mettono in evidenza le spiccate proprietà antimicrobiche di alcune ribonucleasi isolate da pesci, ciò permette di ipotizzare che la proteina ancestrale fosse probabilmente coinvolta anche nell'immunità innata (Pizzo et al. 2008).

Nel mio lavoro di tesi ho posto molta attenzione sulle attività peculiari delle ribonucleasi isolate da pesci, soprattutto sull'attività microbica che esse posseggono nei confronti di organismi Gram negativi e positivi. Nella prima parte del mio progetto mi sono dedicata allo studio delle ribonucleasi Ss-RNasi-1 ed Ss-RNasi-2, isolate da Salmone atlantico, un organismo che vive in diverse condizioni osmotiche, soprattutto in mare ma che durante il periodo della riproduzione popola anche le acque dolci. Il Salmone atlantico è un pesce abbastanza diffuso sul pianeta terra, trovandosi

ubiquitariamente in molte zone del globo terrestre, al contrario dell'altro organismo modello utilizzato: *zebrafish*, presente solo in poche zone della terra con habitat tropicale.

Le ribonucleasi Ss posseggono una attività microbica a largo spettro di azione verso le specie batteriche di riferimento che abbiamo utilizzato. Le Ss sono proteine con una struttura secondaria e terziaria molto stabile, anche più della ribonucleasi A, e conservano tutte le caratteristiche delle ribonucleasi isolate da pesci essendo proteine di piccole dimensioni, con molti residui cationici, e con la presenza di almeno sei cisteine formanti tre ponti disolfurici.

Studiando anche le proteine isolate da *zebrafish*, abbiamo confermato che anche esse possiedono una marcata attività antibatterica, che a differenza delle proteine precedentemente analizzate, risulta notevolmente più alta sui batteri Gram negativi, rispetto ai Gram positivi su cui è molto più modesta. Tutte le ribonucleasi isolate da pesci risultano essere molto efficaci, sono infatti in grado di conservare la loro attività antimicrobica anche se completamente denaturate al calore, o persino se le istidine catalitiche vengono inattivate.

Tali proprietà permettono di concludere che la struttura secondaria non è responsabile dell'attività microbica, mentre probabilmente lo è per l'attività ribonucleasica e angiogenica, le quali sono strettamente legate tra loro.

L'attività antimicrobica è indipendente dalle altre attività possedute dalle ribonucleasi, e probabilmente dipende dalla struttura primaria, ossia da domini aminoacidici all'interno della proteina, oppure da singoli residui cationici abbondanti nella sequenza primaria delle ribonucleasi, infatti esperimenti condotti sulla ribonucleasi 7 (Huang et al. 2007) confermano tale teoria; anche il meccanismo d'azione di altre molecole aventi attività microbica, come ad esempio le defensine, analizzate nel corso dell'introduzione (Ganz 2003), implica l'interazione con la membrana plasmatica, grazie alla presenza di numerosi residui carichi positivamente. E' abbastanza complesso immaginare come queste proteine completamente destrutturate possano svolgere un'azione citotossica verso le cellule batteriche; sebbene, visto che la membrana delle cellule procariotiche in soluzione risulta carica negativamente, e le ribonucleasi al contrario sono ricche di cariche positive, probabilmente il primo contatto avviene per interazione di tipo elettrostatico, a seguito della quale avviene la permeabilizzazione della membrana, con relativa formazione di danni diffusi alla cellula che inevitabilmente arriva alla morte.

La maggior parte dei miei esperimenti sono stati condotti sulla zf-RNasi-3, dopo aver saggiato la sua attività microbica su batteri Gram positivi e negativi. Grazie alla disponibilità di un anticorpo specifico ho potuto effettuare diversi studi, identificando anche la localizzazione cellulare, e

ponendo così le basi per la formulazione di un possibile meccanismo d'azione.

Ho scoperto che la ribonucleasi 3 isolata da *zebrafish* subisce un taglio proteolitico tra due residui di arginina consecutivi, posti rispettivamente in posizione 30 e 31 della sequenza primaria. Si tratta probabilmente di un taglio operato da una proteasi posseduta da *E. coli*, dagli studi presenti in letteratura molte sono le proteasi di tale organismo, per la maggior parte si tratta di serin-treonin proteasi, e di metallo-proteasi (Cornista et al. 2004). Sono noti sistemi biologici in *Escherichia coli*, come quello TAT (Twin Arginine Translocation), che è localizzato nella membrana citoplasmatica. Questo complesso di proteasi è capace di riconoscere una sequenza consenso **SRRxFLK** all'interno di un peptide, ed operare su di esso un taglio proteolitico permettendo la fuoriuscita di quest'ultimo dal compartimento citosolico (LüKe et al..2008).

Molto recenti sono anche gli studi effettuati su un'altra proteasi, questa volta a localizzazione periplasmatica: la pitrilisina (Cornista et al. 2004).

Si tratta di una metallo-proteasi in grado di riconoscere peptidi segnale che recano un motivo costituito da due residui di arginina consecutivi (R-R). La pitrilisina viene inibita da alcuni cationi bivalenti quale lo zinco o da particolari composti come la fenantrolina che chela i cationi bivalenti, formando dei composti molto stabili. Molti degli esperimenti da noi compiuti ci indirizzano però verso un'altra proteasi: Omp T, localizzata a

livello della membrana esterna. Anch'essa è capace di tagliare peptidi fortemente cationici e riconoscere come sito di taglio due arginine consecutive, essa è utilizzata dalla cellula batterica per inattivare molecole tossiche come la protamina (Dekker et al. 2001). Nel caso della ribonucleasi zf3 l'evoluzione potrebbe avere innescato un meccanismo contrario, che comporta il taglio della zf-RNasi-3 a seguito del quale si produce un polipeptide dotato di attività microbica. Infatti la ribonucleasi 3 dopo proteolisi viene scissa in due frammenti: un piccolo peptide di 30 a.a. dal peso di 3.8 kDa, ed una proteina dal peso di 10.5 kDa (LF-Zf3). Dopo aver effettuato saggi di attività antimicrobica si è visto che il frammento da 10.5 kDa è attivo, e non solo contro Gram negativi come la zf-RNasi-3 intera, ma anche contro Gram positivi. Da analisi di dicroismo circolare risulta che la proteina tronca è completamente destrutturata.

Inoltre mentre la proteina zf-RNasi-3 per essere attiva deve essere processata, LF-zf3 in forma ricombinante non ha questa necessità, quindi potrebbe inserirsi direttamente nella membrana plasmatica, uccidendo la cellula batterica.

Dagli esperimenti di localizzazione cellulare emergono altri importanti dati: la proteasi di *E. coli* si trova nella frazione membranaria, esperimenti di *western blot* mostrano la completa assenza di attività proteolitica nella frazione periplasmatica, nonché nel compartimento citosolico.

Gli stessi esperimenti condotti su *S. aureus* hanno dimostrato la presenza della sola proteina intera a livello di compartimento membranario, quindi l'assenza di proteolisi da parte di batteri Gram positivi, e la localizzazione della zf-RNasi-3 a livello membranario non permettono l'uccisione delle cellule batteriche.

Analizzando i dati ottenuti, possiamo concludere che il taglio proteolitico è indispensabile per l'attività microbica della proteina zf-RNasi-3; organismi come i pesci sintetizzano molecole citotossiche, ma non attive su se stessi. E' l'organismo bersaglio ad essere colpito in quanto possiede la proteasi che attiva la proteina microbica.

Gli esperimenti di localizzazione cellulare sono stati supportati da esperimenti di microscopia a fluorescenza, i quali hanno confermato che la proteina entra all'interno della cellula batterica provocandone la morte. Si può osservare al microscopio a fluorescenza la formazione di vere e proprie strutture granulari, all'interno della cellula che sta per lisare, probabilmente formate da invaginazioni di membrana.

Un dato interessante, e confermato da questi esperimenti, è che il contatto e l'internalizzazione della proteina nella cellula batterica è indispensabile per la morte della cellula stessa.

Escludendo l'attività ribonucleasica alla base della proprietà antibatterica, abbiamo proposto che la morte cellulare potesse avvenire mediante lisi

osmotica, anche tale ipotesi è stata esclusa a seguito di opportuni esperimenti.

L'ipotesi ultima è quella di una plasmolisi.

La proteina tronca con i suoi domini carichi positivamente, viene a contatto con la cellula, entra in membrana plasmatica, e porta la cellula a morte, creando dei pori nella membrana plasmatica, e facendo riversare il contenuto citoplasmatico all'esterno.

Grazie alle osservazioni di microscopia a fluorescenza ed a contrasto di fase si può notare la formazione di veri e propri foci, strutture granulari come già detto in precedenza, che potrebbero essere formati dalla membrana plasmatica che dopo il contatto con la proteina LF-zf3, si invagina all'interno, subendo quelle alterazione che risulteranno letali per la cellula. Il meccanismo d'azione proposto è simile a quello di molti peptidi presenti in natura, che hanno una spiccata attività antimicrobica, come le defensine.

Il risultato di maggior interesse ottenuto dal mio lavoro di tesi, è quello di aver dimostrato che le ribonucleasi da pesci posseggono una spiccata attività microbica anche nei confronti di batteri patogeni, questo le rende particolarmente importanti in quanto potrebbero essere utilizzate nella cura di patologie da cui anche gli stessi pesci sono affetti.

Le ribonucleasi prese in esame in questo lavoro di tesi possono essere considerate antibiotici di origine naturale, e forse in futuro potranno essere

utilizzate in sostituzione o ad integrazione degli antibiotici convenzionali oggi in commercio.

5. Bibliografia

Barone G., Del Vecchio P., Fessas D., Giancola C., and Graziano G. (1993) THESEUS: a new software package for the handling and analysis of thermal denaturation data for biological macromolecules. *J Thermal Anal* **39**, 2779-2790.

Beintema, J. J. and Kleineidam R. G. (1998). The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 825-832.

Blank A., Sugiyama R. H., Dekker C. A. (1982). Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.*; **120**, 267-75.

Bradley R. Kelemen, Klink T. A., Behlke M. A. , Eubanks S. R., Leland P. A. and Raines R. T.. (1999). Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Research*, **27** (18), 3696-3701

Cho S., and Zhang J. (2007). Zebrafish Ribonucleases Are Bactericidal: Implications for the Origin of the Vertebrate Ribonuclease A Superfamily. *Mol.Biol.Evol* **24**, 1259-1268

Cornista JC, Ikeuchi S., Haruki M., Kohara A., Takano k., Morikawa M., AND Kanaya S. (2004). Cleavage of Various Peptides with Pitrilysin of *Escherichia coli*: Kinetic analisys using β -Eandorphin and Its Derivates. *Biosci. Biotechnol. Biohem.* **68**, 2128-2137.

Cornista JC, Koga Y., Takano K, Kanaya S. (2006). Amyloidogenecity and pitrilysin sensitivity of a lysine-free derivative of amyloid beta-peptide cleaved from a recombinant fusion protein. *J Biotechnol.* **122**, 186-97

D'Alessio G., Di Donato A., Parente A., and Piccoli R.(1991). Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 104-106.

D'Alessio Giuseppe. (1993). New and cryptic biological messages from RNases. *Trends Cell Biol.*; **3(4)**, 106-109.

D'Alessio G., and Riordan J. F., eds. (1997). Ribonucleases: structures and functions. *Academic Press*, New York.

Dekker N., Cox R. C., Kramer A., and Egmond R. A. (2001). Substrate Specificity of the Integral Membrane ProteaseOmp T Determined by Spatially Addressed Peptide Libraries. *Biochemistry.* **40**, 1694-1701.

Ganz Tomas (2003). Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nature*. **3**, 710-720

Hooper. L. V., Stappenbeck T. S., Hong C. V., and Gordon J. I. (2003). Angiogenins: a new class of microbial proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* **4**, 269-273

Huang YC., Lin Y.M., Chang T.W., Wu S.J., Lee Y.S., Chang M.D., Chen C., Wu S.H., and Liao Y.D.(2007) The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity. *J Biol Chem* **282**, 4626-4633

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) **227**:680-685.

Lüke I., Handford JI., Palmer T., Sargent F.(2009). Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *ARCH. Microbiol* (Epub ahead of print).

Kazakou K., Holloway D.E., Prior S.H., Subramanian V., Acharya K. V. (2008). Ribonuclease A Homologues of Zebrafish: polymorphism, crystal

structures of two representatives and their evolution implication. *J Mol. Biol.* **380**, 206-222.

Kelemen B. R., Klink, T. A., Behlke, M. A., Eubanks, S. R., Leland, P. A., and Raines, R.T. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**(18), 3696-3701

Kondo, Kawai, Yagyu et al., (2001). Changes in the cell structure of *Flavobacterium psychrophilum* with length of culture. *Microbial. Immunol.*, **45**, 813-818.

Manfrin, Tonon, Cervellione et al. (2005). Infezione sperimentale con *Flavobacterium psychrophilum* in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) per via intraperitoneale e per bagno “, *Ittiopatologia.*, **2**, 171-182.

Peter A, Leland K., Staniszewski K. E., Park C., Kelemen B. R., and Raines R. T. (2002). The Ribonucleolytic Activity of Angiogenin. *Biochem.* **41**, 1343-1350.

Pizzo E., and D'Alessio G. (2007). The success of the RNase scaffold in the advance of biosciences and in evolution. *Gene* **30**;406(1-2):8-12.

Pizzo E., Buonanno, P. Di Maro A., Ponticelli S. De Falco S., Quarto N., Cubellis M.V., D'Alessio G. (2006). Ribonucleases and Angiogenins from Fishes. *Journal of Biological Chemistry* **281**:27454-27460.

Pizzo E., Varcamonti M., Di Maro A., Zanfardino A., Giancola C. and D'alessio G. (2008). Ribonuclease with angiogenic and bactericidal activities from Atlantic salmon. *The Febs Journal* **275**, 1283-1295.

Prearo M., Zanoni R.G., Campo Dall'Orto B., Pavoletti E., Florio D., Penati V., Ghittino C. (2004). Mycobacterioses: emerging pathologies in aquarium fish. *Vet Res Commun.* 1:315-7.

Quarto N., Pizzo E. and D'Alessio G.(2008). Temporal and spatial expression of RNases from *zebrafish* (*Danio rerio*). *Gene.* **427**, 32-41

Raines R. T. 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**:1045-1065.

Sambrook, K.J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, **1**, 1.21-1.52.

Shapiro R., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 25(12), 3527-3532.

Sorrentino S. (1998). Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 785–794

Sorrentino S. and Libonati M. (1997) Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett.*, **404**, 1–5.

Tarrya M. J., Scha[¨] E., Chena S., Buchananc G., Greenea N. P., Lead S. M., Palmerc T., Saibilb H- R. and Berksa B.C. Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. (2009). *Pnas*; **32**, 13284-13289.

Wu Y., Saxena S.K., Ardelt W., Gadina M., Mikulski S.M., De Lorenzo C., D'Alessio G, Youle R.J. (1995) A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem.* **270**(29):17476-81

Zhang J., Dyer K. D., and Rosenberg H. F. (2003) Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Ac*