

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA AVANZATA
Indirizzo: Biologia Evoluzionistica

XVIII ciclo
2002/2005

**METALLOTIONEINE NEI RETTILI SQUAMATI:
EVOLUZIONE E LORO RUOLO
NEI PROCESSI DI DISINTOSSICAZIONE
DA METALLI PESANTI**

Relatore

Ch.mo Prof. Silvana Filosa

Coordinatore

Ch.mo Prof. Silvana Filosa

Candidato

Dott. Francesca Trinchella

INDICE

SINOSSI	pag. 1
INTRODUZIONE	pag. 3
CAPITOLO 1	
LE METALLOTIONEINE	pag. 14
1.1 LE METALLOTIONEINE NEI VERTEBRATI	pag. 16
1.2 LE FUNZIONI DELLE METALLOTIONEINE	pag. 20
1.3 LE MT COME AGENTI DETOSSIFICANTI	pag. 22
1.4 SINTESI E DEGRADAZIONE DELLE MT	pag. 25
1.5 POLIMORFISMO E CONSERVAZIONE GENICA DELLE MT	pag. 29
CAPITOLO 2	
INQUINAMENTO DA METALLI PESANTI	pag. 34
2.1 IL CADMIO: METABOLISMO E TOSSICITÀ	pag. 40
CAPITOLO 3	
BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE	pag. 46
3.1 BIOINDICATORI, BIOACCUMULATORI E BIOMONITORS	pag. 47
3.2 BIOMARKERS	pag. 49
CAPITOLO 4	
SISTEMA BIOLOGICO	pag. 51
CAPITOLO 5	
SCOPO DELLA RICERCA	pag. 57

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

pag. 61

6.1 MATERIALE BIOLOGICO

pag. 61

6.2 TRATTAMENTI IN VIVO CON $CDCl_2$

pag. 61

6.2A TRATTAMENTO ACUTO

pag. 61

6.2B TRATTAMENTO CRONICO

pag. 61

6.3 METODI BIOCHIMICI

pag. 62

6.3A COMBUSTIONE DEI TESSUTI

pag. 62

6.3B DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO

pag. 63

6.3c Preparazione delle polveri acetoniche

pag. 63

6.3D PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI

pag. 63

6.3E PRECIPITAZIONE CON SOLVENTI ORGANICI

pag. 64

6.3F DETERMINAZIONE PROTEICA

pag. 64

6.3G CROMATOGRAFIA PER GEL-FILTRAZIONE

pag. 65

6.4 METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

pag. 65

6.4A ISOLAMENTO DELL'RNA

pag. 65

6.4B ANALISI DI NORTHERN BLOT

pag. 66

6.4B1 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO IN
CONDIZIONI DENATURANTI

pag. 66

6.4B2 TRASFERIMENTO SU FILTRO DELL'RNA

pag. 66

6.4C ANALISI DI DOT BLOT

pag. 67

6.4D MARCATURA DELLA SONDA DI CDNA

pag. 68

6.4E IBRIDAZIONE

pag. 68

6.4F ANALISI DENSITOMETRICA

pag. 68

6.4G PRODUZIONE DEI CDNA A SINGOLA ELICA

pag. 69

6.4H	AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) DEI CDNA PER LA METALLOTIONEINA	pag. 69
6.4I	ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO	pag. 70
6.4L	PRODUZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE	pag. 71
6.4M	TRASFORMAZIONE DI CELLULE BATTERICHE CON IL PLASMIDE RICOMBINANTE	pag. 71
6.4N	PURIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO RICOMBINANTE	pag. 72
6.4O	SEQUENZIAMENTO DEI VARI CDNA	pag. 73
6.5	METODI DI EVOLUZIONE MOLECOLARE	pag. 73
6.5A	ANALISI DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE E AMINOACIDICHE	pag. 73
6.5B	ANALISI FILOGENETICA	pag. 74
6.5C	RICOSTRUZIONE DEL TRACCIATO DEI CARATTERI	pag. 75
6.5D	CALCOLO DELL'INDICE DI IDROPATIA	pag. 75

CAPITOLO 7

RISULTATI

	STUDIO EVOLUTIVO DELLA FAMIGLIA DELLE METALLOTIONEINE IN RETTILI SQUAMATI	pag.78
7.1	DETERMINAZIONE DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE ED AMINOACIDICHE DELLE MT DI VARI RETTILI SQUAMATI	pag. 78
7.2	RICERCA DELLE ISOFORME DI MT	pag. 83
7.2A	RICERCA DI ISOFORME TESSUTO-SPECIFICHE	pag. 84
7.2B	RICERCA DI ISOFORME INDOTTE DA METALLO	pag. 84
7.2C	GEL FILTRAZIONE	pag. 85
7.2D	NORTHERN BLOT	pag. 88

7.2E	SEQUENZIAMENTO DI MT-CDNA PROVENIENTE DA ANIMALI TRATTATI	pag. 90
7.3	STUDIO EVOLUTIVO DELLE MT NEI RETTILI SQUAMATI	pag. 90
7.3A	ANALISI FILOGENETICA	pag. 91
7.3B	RICOSTRUZIONE SULL'ALBERO DELLE SPECIE DEL TRACCIATO DEI CARATTERI E DELL'INDICE DI IDROPATIA	pag. 96

CAPITOLO 8 RISULTATI

	ESPOSIZIONE AL CADMIO: DISTRIBUZIONE DEL METALLO NEI TESSUTI ED ESPRESSIONE DELLA MT	pag. 100
--	---	----------

8.1	ESPOSIZIONE ACUTA AL METALLO	pag. 100
8.1A	ACCUMULO DI CADMIO	pag. 100
8.1B	ESPRESSIONE DELLA MT	pag. 102
8.2	ESPOSIZIONE CRONICA AL METALLO	pag. 105
8.2A	ACCUMULO DI CADMIO	pag. 105
8.2B	ESPRESSIONE DELLA MT	pag. 107

	DISCUSSIONE	pag. 111
--	--------------------	----------

	BIBLIOGRAFIA	pag. 121
--	---------------------	----------

SINOSSI

Le metallotioneine, proteine pressochè ubiquitarie caratterizzate da un'elevata capacità di legare metalli pesanti grazie all'alto contenuto di cisteina, possono essere considerate il prodotto di un processo evolutivo iniziato migliaia di anni fa per fronteggiare esigenze metaboliche degli organismi correlate all'omeostasi e alla disintossicazione dei metalli pesanti. L'affermarsi negli organismi delle metallotioneine ha senza dubbio contribuito alla sopravvivenza degli stessi, con la conseguente conservazione nel corso dell'evoluzione di questa proteina.

L'evoluzione molecolare del gene codificante la metallotioneina è stata particolarmente studiata in Invertebrati e Vertebrati quali Osteitti, Anfibi, Uccelli e Mammiferi. Questi studi hanno evidenziato un elevato grado di polimorfismo a carico del gene, con la conseguente presenza nelle cellule di svariate isoforme di tale proteina. Lo studio dell'evoluzione del gene codificante la metallotioneina nei Rettili risulta interessante per l'assenza di informazioni sulla famiglia multigenica della metallotioneina in questi Vertebrati e per verificare se anche nei Rettili è presente l'elevato grado di polimorfismo a carico di questo gene.

Il presente lavoro di tesi ha l'obiettivo di studiare nei Rettili Squamati:

- l'evoluzione molecolare della famiglia multigenica delle

metallotioneine;

- il coinvolgimento delle metallotioneine nella risposta delle cellule per esposizioni acute e/o croniche al cadmio.

Lo studio della risposta molecolare che si attiva nelle cellule in seguito ad esposizione al cadmio è giustificato dal particolare interesse che desta la contaminazione da parte di questo metallo, la cui distribuzione attuale nei comparti ambientali è particolarmente alterata.

L'azione nociva del cadmio è ben nota, ma sono limitati i dati scientifici sulle correlazioni tra l'assorbimento nella cellula di questo metallo e la sintesi di molecole protettive quali le metallotioneine. Gli alterati livelli di queste molecole nei tessuti degli organismi possono rappresentare un indice specifico, anche se indiretto, di inquinamento ambientale da metalli pesanti. E' presumibile che i Rettili possano essere degli ottimi bioindicatori della contaminazione ambientale da cadmio, in quanto hanno colonizzato numerosi habitat (acque dolci e salate, ambienti terrestri) e, quali Vertebrati, sono all'apice della piramide alimentare.

I risultati descritti in questa tesi chiariscono aspetti peculiari della struttura primaria della metallotioneina dei Rettili; dimostrano l'assenza di polimorfismo a carico del gene codificante la metallotioneina nei Rettili e dimostrano che la metallotioneina può fungere da rapido agente detossificante in seguito ad un'esposizione acuta al cadmio, mentre non risulta altrettanto efficace per un'esposizione di tipo cronico.

INTRODUZIONE

Negli organismi viventi la richiesta fisiologica di oligoelementi metallici è correlata alla presenza di meccanismi molecolari deputati al trasporto e al deposito dei metalli in una forma non tossica. Nella maggioranza dei casi, a tali processi partecipano proteine specializzate, delle quali le più note sono le metallotioneine (MT). Queste ultime sono caratterizzate da un'elevata capacità di legare metalli pesanti e da un alto contenuto di cisteina, aminoacido che svolge un ruolo chiave nella formazione di complessi con i metalli di transizione (Kagi e Kojima, 1987).

Le MT funzionano come una sorta di "tampone cellulare" dei metalli, e la loro abbondanza nelle cellule dipende dal contenuto di metallo: se le riserve di oligoelementi quali rame e zinco sono elevate, il metallo legato alle MT viene escreto nell'ambiente extracellulare; se invece le riserve intracellulari di metalli essenziali sono ridotte, il metallo legato alle MT può essere utilizzato per le esigenze metaboliche dell'organismo. Inoltre, la sintesi di MT è regolata dal metallo: se la concentrazione intracellulare di metallo è alta, viene indotta la sintesi di nuove molecole di MT; se il contenuto di metallo diminuisce, la sintesi di MT viene rallentata (Vallee e Maret, 1993). Gli organismi viventi possono sfruttare questo meccanismo di sintesi regolata per diminuire gli effetti dannosi di alcuni metalli pesanti altamente tossici, quali cadmio e mercurio.

Sono definiti *metalli pesanti* gli elementi metallici con

***I metalli
pesanti***

densità superiore a 5 g/cm³. Gli elementi che rientrano in questa categoria sono circa 40: essi si comportano usualmente da cationi, sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione, da bassa solubilità dei loro idrossidi, da attitudine a formare complessi e da affinità per i solfuri.

Una categoria di metalli pesanti che merita particolare attenzione è costituita dai *metalli traccia*, così definiti perché in condizioni normali sono presenti negli organismi viventi in quantità limitata. Essi possono essere suddivisi in due classi: la prima, composta di elementi quali zinco, rame, ferro, manganese, cobalto, che a basse concentrazioni si comportano come micronutrienti essenziali per la vita, mentre risultano notevolmente tossici ad elevate concentrazioni (Keen e coll., 2003); la seconda classe, comprendente elementi quali cadmio, mercurio, cromo e piombo, sono estremamente tossici per gli organismi anche a basse concentrazioni e non sembrano avere funzioni biologiche (Valko e coll., 2005).

L'assunzione degli elementi metallici da parte degli organismi è fondamentalmente mediata dall'alimentazione e dalla respirazione; in entrambi i casi essi accedono alla circolazione sanguigna e si distribuiscono ai vari organi, per lo più sotto forma di complessi proteici.

Il meccanismo di trasporto dei metalli nelle cellule non è completamente chiarito. Specifici trasportatori denominati MIT (Metal Ion Transporter) sono implicati nell'uptake, nella distribuzione intracellulare e nella loro eventuale escrezione

*Assunzione
degli elementi
metallici*

(Knoop e coll., 2005). All'interno della cellula, i metalli possono reagire con i componenti citosolici, essere compartimentalizzati in organuli come lisosomi e mitocondri (Ahearn e coll., 2004) o essere trasportati nel nucleo (Rimber e coll., 2004).

Nel citoplasma i metalli possono legarsi a gruppi funzionali imidazolici, sulfidrilici, carbossilici o amminici di proteine enzimatiche stimolandone o deprimendone l'attività, in relazione alla loro concentrazione (Livingstone, 1982). Nel nucleo essi possono interagire con le proteine nucleari, alterando la complessa struttura della cromatina, o con gli enzimi coinvolti nel metabolismo del DNA e dell'RNA, modulandone l'attività (Banfalvi e coll., 2005).

Concentrazioni citotossiche dei metalli provocano nelle cellule l'attivazione di specifiche classi di proteine a funzione protettiva, come le heat shock proteins, che hanno il compito di preservare la struttura tridimensionale delle proteine (Krone e coll., 2003), e le MTche hanno il compito di chelare il metallo (Milnerowicz e Chmarek, 2005).

*Attivazione di
proteine a
funzione
protettiva*

L'induzione nelle cellule della sintesi delle MT costituisce la difesa più rapida ed efficace da parte degli organismi viventi all'esposizione indesiderata ai metalli tossici (Park e coll., 2001).

Le conoscenze sul ruolo delle MT possono essere applicate per la valutazione del rischio da contaminazione per metalli pesanti, per il biomonitoraggio ambientale e, pertanto, queste molecole possono essere utilizzate come ottimi biomarkers dell'inquinamento. Gli alterati livelli di concentrazione di queste

molecole nei tessuti e/o nelle cellule possono fornire un indice di anomala esposizione di un organismo ai metalli pesanti.

CAPITOLO 1
LE METALLOTIONEINE

Le metallotioneine furono messe in evidenza per la prima volta nel 1957 da ricercatori interessati allo studio dei costituenti cellulari responsabili dell' accumulo di cadmio nelle cellule renali equine (Margoshes e Vallee, 1957). Il termine “metallotioneina” fu inizialmente coniato per designare la proteina, isolata dalla corteccia renale equina (Kägi e Vallee, 1960), ricca di zolfo, e legante cadmio e zinco. Dopo il 1° Congresso Internazionale sulle MT, tenutosi nel 1978, il termine MT è stato utilizzato per individuare tutte le proteine di basso peso molecolare con requisiti simili alla metallotioneina equina. Tali requisiti sono:

- basso peso molecolare (6-8 kDa)
- elevato contenuto di metalli pesanti
- caratteristica composizione aminoacidica (elevato contenuto di cisteina e assenza o basso contenuto di aminoacidi aromatici)
- struttura primaria con una caratteristica distribuzione delle cisteine (es. Cys-X-Cys)
- caratteristiche spettroscopiche tipiche dei clusters metallotiolici.

*Caratteristiche
distintive delle
Metallotioneine*

Nel 1985 le MT furono convenzionalmente suddivise in 3 classi sulla base della MT di mammifero: nella I classe furono riunite le MT con struttura primaria correlabile a quella delle MT dei mammiferi, nella II classe le MT la cui sequenza non presentava omologia con le MT dei mammiferi, e nella III classe i metallopeptidi atipici, rinvenuti nelle piante, costituiti da unità

*Classificazione
delle
Metallotioneine*

gamma-glutamyl-cisteiniche aventi alcune proprietà in comune con le MT. Con il progredire delle conoscenze sulle MT, tale classificazione è risultata inadeguata e nel corso del 4° Meeting Internazionale sulle MT (Kansas City (USA), 1997), è stato proposto un nuovo sistema di classificazione basato sia sulla similarità di sequenza che sulle relazioni filogenetiche. Questo sistema considera le MT come una superfamiglia suddivisa in famiglie (es. MT dei vertebrati) e sottofamiglie (es. MT dei teleostei).

Le MT sono state rinvenute in taluni procarioti, nei microrganismi eucarioti, in molti vegetali e in numerosi o forse in tutti i *phyla* del regno animale (Kojima e Hunziker, 1991).

Le MT sono prevalentemente proteine citoplasmatiche (Cherian, 1994), ma possono trovarsi anche in altri compartimenti cellulari: esse sono state rinvenute nella frazione lisosomiale e nei nuclei di cellule in attiva proliferazione (Cherian, 1994; Ogra e Suzuki, 2000).

Negli organismi le MT sono particolarmente abbondanti nei tessuti parenchimatosi, ma esse possono essere presenti anche in altri tessuti e tipi cellulari. Mediante tecniche immunistochemiche, la tessuto-specificità dell'espressione delle MT è stata studiata dettagliatamente nel cane (Shimada e coll, 1997). Sebbene il fegato e il rene mostrino la più forte immunoreattività, contenuti apprezzabili di MT sono stati rilevati nel sistema nervoso centrale, nelle cellule dell'epitelio olfattivo, e nelle ghiandole mammarie, olfattorie, perianali e

*Localizzazione
tissutale ed
intracellulare
delle
Metalliotoneine*

tiroidee, nelle cellule intestinali e dello stomaco e nelle cellule epiteliali dei follicoli piliferi (Shimada e coll, 1997). Nei mammiferi, le MT sono anche presenti nei monociti (Pauwels, 1994) e, recentemente, abbinando tecniche istochimiche e marcatura con doppia fluorescenza, sono state rinvenute due diverse forme di MT negli astrociti e nelle cellule della linea mielomonocitica (Penkowa e coll, 1999). La quantità assoluta presente in specie e tessuti differenti può variare con lo stato di sviluppo, con la dieta, nonché con altri fattori ancora non ben identificati (Andrews e coll., 1991; Moccheggiani e coll., 2001). Inoltre, l'induzione dell'espressione della proteina mediante trattamenti con iniezioni di sali di cadmio porta a un accumulo differenziale di MT in topi di sesso ed età differente (Shaikh e coll., 1993).

1.1 LE METALLOTIONEINE NEI VERTEBRATI

In tutti i Vertebrati, il gene che codifica per le MT ha una struttura tripartita costituita da 3 esoni intervallati da due introni nelle posizioni aminoacidiche 9-31 o 9-32 (Samson e Gedamu, 1998).

La composizione aminoacidica delle MT è caratterizzata dalla preponderanza di residui cisteinici, che rappresentano circa la terza parte del totale degli aminoacidi. La maggior parte delle MT contiene anche quantità apprezzabili di aminoacidi basici come la lisina e, occasionalmente, l'arginina. La restante

*Composizione
aminoacidica e
struttura
primaria delle
Metallothioneine*

composizione aminoacidica è variabile e non comprende di norma aminoacidi aromatici o istidina (Kagi e Kojima, 1987).

La struttura primaria, determinata mediante le tecniche convenzionali di sequenziamento delle proteine, o ricavata dalla sequenza nucleotidica del cDNA, o del DNA del genoma, è nota per varie decine di MT di Vertebrati. A causa dell'abbondanza di residui cisteinici, le analisi convenzionali delle sequenze aminoacidiche hanno presentato non poche difficoltà e spesso hanno richiesto l'utilizzazione combinata di differenti derivatizzazioni dell'apoproteina (Hunziker, 1991). Tutte le MT dei Vertebrati, finora caratterizzate, risultano costituite da una singola catena polipeptidica contenente da 60 a 68 aminoacidi. Inoltre, le MT di ciascuna classe di Vertebrati presentano una sequenza N-terminale indicativa della classe di appartenenza: le MT di Osteitti, Uccelli e Mammiferi hanno, rispettivamente, 3, 5 e 4 residui aminoacidici localizzati a monte del primo residuo cisteinico (Kille e coll., 1994). Questa regione sembra costituire il principale epitopo antigenico della molecola di MT, per cui anticorpi diretti contro la MT umana danno una reazione crociata contro le altre MT di Mammifero, ma non reagiscono contro le MT, per esempio, di Uccelli (Kille e coll., 1994).

Scarsissime sono le informazioni sulle MT nella classe dei Rettili. E' stata messa in evidenza la presenza di una proteina con caratteristiche biochimiche simili alle MT nel fegato di alcuni Rettili, quali l'alligatore (Bell e Lopez, 1985) e la tartaruga (Anan e coll., 2002). Solo recentemente è stata

sequenziata una MT di rettile, in particolare quella del lacertide *Podarcis sicula* (Riggio e coll., 2003). Essa è costituita, come negli Uccelli, da 63 aminoacidi e presenta 5 residui aminoacidici localizzati a monte del primo residuo cisteinico.

Tutte le MT dei Vertebrati studiate hanno 20 residui cisteinici, dei quali 19 sono completamente conservati. La maggior parte di essi sono organizzati in motivi Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-Y-Cys in cui X e Y sono residui aminoacidici diversi dalla cisteina. Nelle MT di mammifero, che sono le più numerose presenti nelle banche dati, oltre 30 residui sono invariati e le posizioni dei residui basici sono completamente conservate; le sostituzioni aminoacidiche interessano soprattutto la porzione aminotermine della proteina.

E' l'abbondanza di cisteina e la sua disposizione in sequenze caratteristiche che predispone le MT a formare complessi con gli ioni dei metalli pesanti. Le MT di mammifero legano essenzialmente zinco ma possono legare altri metalli in relazione al tessuto di origine, all'età e allo stato di sviluppo (Coyle e coll., 2002). Per esempio, è noto che la MT isolata dal rene contiene più cadmio e rame rispetto a quella del fegato dello stesso organismo (Suzuki e Yamamura, 1979). La quantità di metallo per mole di proteina è costante ed ammonta a 7 equivalenti di zinco o cadmio (Vasak e coll., 1977).

*Struttura
tridimensionale
delle
Metallothioneine*

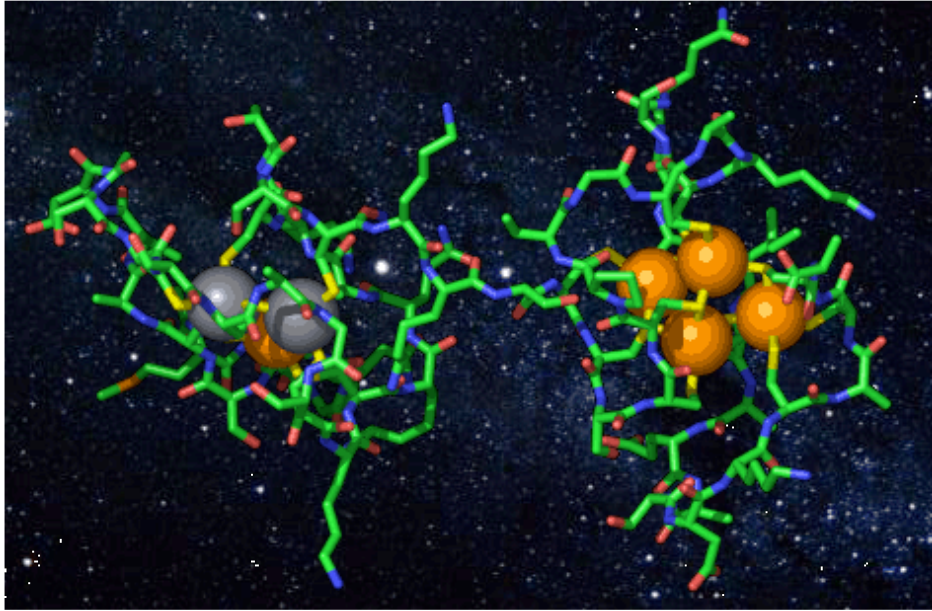


Fig. 1.1 Struttura tridimensionale della MT di Mammifero. Le sfere rappresentano gli atomi di metallo: in grigio sono rappresentati gli atomi di cadmio, in arancio quelli di zinco.

La presenza del metallo determina la struttura tridimensionale della proteina, come è stato dimostrato mediante indagini spettroscopiche, studi cristallografici (Scudiero e coll., 2005; Chan e coll., 2005) e di NMR bidimensionale (Vasak, 1998). La formazione di legami metallotiolici tra le cisteine e gli atomi di metallo causa il ripiegamento della catena polipeptidica che non presenta α eliche e foglietti β . (fig.1.1)

Dagli studi strutturali si evince che le 20 cisteine presenti in una catena formano ponti con ioni di metalli adiacenti costituendo due distinti cluster N-terminale e C-terminale: il cluster N-terminale, denominato β , con 3 equivalenti di metallo legati a 9 cisteine forma una struttura tipo cicloesano in cui tre cisteine risultano bicoordinate e sei monocoordinate, e il cluster C-terminale, denominato α , con 4 equivalenti di metallo legati a

11 cisteine forma una struttura tipo biciclononano con cinque cisteine bicoordinate e sei monocoordinate. La formazione dei complessi metallotiolici è un processo ordinato che inizia nel cluster C-terminale e, solo dopo la saturazione dei siti disponibili in tale cluster, i metalli complessano i residui cisteinici del cluster N-terminale. Il legame del metallo in ciascun cluster è cooperativo così come lo è il rilascio: in presenza di EDTA, il cluster N-terminale cede il metallo prima e più rapidamente di quello C-terminale (Winge e Nielsen , 1984; Capasso e coll., 2005).

1.2 LE FUNZIONI DELLE METALLOTIONEINE

Essendo le MT un gruppo molto antico di proteine, con una struttura conservata quasi immutata nel corso dell'evoluzione, si pensa che queste proteine siano coinvolte in processi fisiologici di importanza fondamentale per la cellula.

In effetti, sebbene la loro funzione biologica non sia del tutto chiara, sembra che le MT giochino un ruolo importante nell'omeostasi dello zinco e del rame e che esercitino un' azione detossificante nei confronti di metalli pesanti tossici. Ci sono evidenze che le MT fungano da deposito e da trasportatori intracellulari di Zn e che siano in grado di rilasciare e ridistribuire lo Zn nella cellula per processi metabolici o in caso di emergenza (Coyle e coll, 2002). E' stato recentemente riportato che le MT hanno un ruolo nella modulazione del ciclo di ossido-riduzione del rame: in condizioni riducenti

*Le
Metallothioneine
e l'omeostasi dei
micronutrienti
essenziali*

(Cu/ascorbato) esse legano efficacemente il rame, mentre possono rilasciarlo in condizioni ossidanti (Cu/ascorbato + H₂O₂) (Fabisiak e coll., 1999).

In condizioni naturali, il ruolo delle MT non è solo quello di sequestrare zinco, mantenendo bassa la concentrazione di zinco libero nella cellula: il ruolo delle MT può cambiare da accettore a donatore di ioni zinco quando tali ioni sono richiesti dalla cellula, ad esempio durante la proliferazione cellulare (Vallee e Maret, 1993).

Il destino dei metalli incorporati nelle MT dipende da particolari circostanze e dal fabbisogno di metallo da parte dell'organismo. Se le riserve di zinco sono elevate il metallo legato alle MT può essere escreto ed eliminato nell'ambiente; se le riserve di zinco sono ridotte, il metallo resta come riserva legato alle MT (Vallee e Maret, 1993). E' stato, inoltre, ipotizzato che le MT abbiano un ruolo regolativo sulla funzione biologica dello zinco, al contrario di ciò che accade per le altre numerose zinco-proteine la cui funzione è, invece, regolata dallo zinco stesso. Sebbene il legame delle MT con lo zinco sia molto forte, la proteina può cedere almeno uno dei suoi atomi di metallo ad apoenzimi (Vallee e Maret, 1993).

Inizialmente erano stati ipotizzati meccanismi di trasferimento diretto dei metalli dalle MT ai metalloenzimi (Udom e Brady, 1980), ma in seguito le evidenze sperimentali hanno dimostrato che la distribuzione cellulare dei metalli è realizzata secondo processi più complessi: i clusters

*Le
Metallothioneine
e la
distribuzione
cellulare dei
metalli*

metallotiolici delle MT possono interagire con appropriati ligandi cellulari tra i quali il più studiato è il glutatione. Il glutatione è una molecola capace di mobilitare i metalli in base al suo stato redox. La Zn-MT da fegato di coniglio può interagire con il glutatione ossidato con concomitante rilascio di Zn (Maret, 2000).

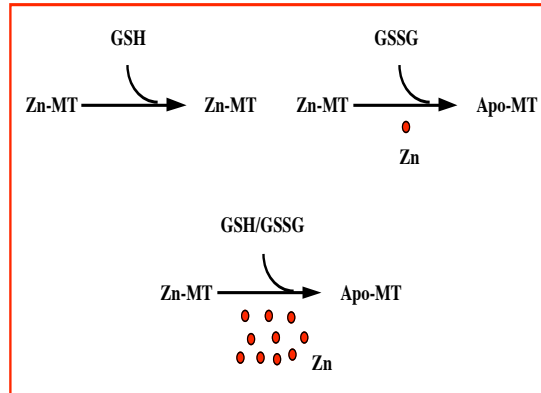


Fig. 1.2 Rappresentazione schematica del rilascio di Zn dall'MT mediato dall'interazione MT-Glutatione ossidato (GSSG)/Glutatione ridotto (GSH).

Viceversa il complesso MT-glutatione ridotto protegge i gruppi metallotiolici bloccando il rilascio dello zinco. La concomitante presenza della coppia redox glutatione ridotto/glutatione ossidato incrementa di dieci volte la capacità di rilascio dello zinco da parte della metallothioneina (Jiang e coll., 1998). Il ciclo di ossidoriduzione del glutatione e la sua interazione con le MT svolge un ruolo chiave nella distribuzione cellulare dei metalli (fig. 1.2). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che, in presenza della suddetta coppia redox, lo Zn rilasciato dalle MT può essere utilizzato per riattivare la forma apoenzimatica della sorbitolo deidrogenasi (Jiang e coll., 1998).

1.3 LE MT COME AGENTI DETOSSIFICANTI

Il ruolo biologico delle MT è stato chiarito studiando

l'effetto dell'inattivazione dei geni codificanti le MT nei topi e l'effetto dell'amplificazione genica delle MT in linee cellulari isolate. E' stato dimostrato che topi transgenici che non esprimono le MT si sviluppano in maniera del tutto normale, ma mostrano un'aumentata sensibilità agli effetti tossici del cadmio (Klaassen e Liu, 1998). Cellule in coltura in cui i geni codificanti le MT sono amplificati risultano più resistenti al Cd rispetto alle colture di controllo (McAleer e Tuan, 2001). La correlazione tra la resistenza al cadmio e i livelli cellulari di MT è supportata da altre evidenze sperimentali. Topi neonati il cui fegato esprime costitutivamente livelli cellulari elevati di MT sono particolarmente resistenti agli effetti tossici del Cd (Klaassen e Wong, 1982). Inoltre, l'azione tossica del Cd può essere contenuta quando animali adulti vengono pretrattati con basse dosi di Cd o di Zn, capaci di promuovere la sintesi di MT (Goering e Klaassen, 1984a e 1984b). Nei topi nei quali l'espressione genica delle MT è annullata, il pretrattamento con metalli pesanti non ha effetto protettivo (Klaassen e Liu, 1998).

Studi condotti su popolazioni umane viventi in zone altamente contaminate da metalli pesanti dimostrano che nell'uomo le MT svolgono un'azione protettiva prevenendo malattie causate da metalli tossici. E' stato osservato che carcinomi dovuti all'esposizione accidentale al cadmio sono molto frequenti nei tessuti (prostata e gonadi), nei quali la concentrazione di MT è costituzionalmente bassa (Waalkes e coll., 1991). Studi epidemiologici condotti su popolazioni

*Le
Metallothioneine e
la
disintossicazione
da metalli pesanti*

giapponesi esposte ad alte concentrazioni di cadmio hanno dimostrato un aumento dell'escrezione di MT nelle urine, proporzionale alla durata dell'esposizione al cadmio (Shaikh, 1991).

Nelle cellule le MT svolgono anche altre funzioni. Studi recenti suggeriscono che le MT giocano un ruolo di difesa dagli effetti nocivi degli agenti ossidanti: cellule in coltura, provenienti da topi che non esprimono le MT, sono più sensibili allo stress ossidativo rispetto alle cellule prelevate da animali non transgenici (Lazo e coll, 1995). Anche in questo caso, il pretrattamento *in vivo* con agenti capaci di indurre la sintesi di MT determina un aumento della resistenza delle cellule ad agenti chimici che generano stress ossidativo (Sato e coll., 1995). E' stato dimostrato che l'espressione della MT eterologa di scimmia in ceppi di lievito che difettano della superossido dismutasi (SOD) protegge le cellule dagli effetti nocivi dei radicali liberi (Tamai e coll., 1993) e, *in vitro*, la Cd, Zn-MT di coniglio protegge le macromolecole dai danni causati dai radicali idrossilici (Thornalley e Vasak, 1985). E' stato proposto che i residui di cisteina delle MT possano comportarsi da riducenti rilasciando metallo in situazioni di stress ossidativo (Maret e Vallee, 1998).

Le MT sarebbero coinvolte in alcune patologie neurodegenerative (Hidalgo e coll, 2001). Una forma di MT tessuto-specifica del cervello, identificata con il fattore capace di inibire la crescita neuronale in coltura (Uchida e coll. 1991), è

*Le
Metallothioneine
nella protezione
dagli agenti
ossidanti*

*Le Metallothioneine
nelle malattie
neurodegenerative*

notevolmente ridotta nei pazienti colpiti dal morbo di Alzheimer (Uchida e coll., 1991, Yu e coll., 2001). Inoltre, topi che non esprimono tale forma di MT sono più suscettibili a processi neurodegenerativi associati ad epilessia indotta (Erickson e coll., 1997).

1.4 SINTESI E DEGRADAZIONE DELLE MT

Una delle caratteristiche salienti delle MT, certamente fondamentale per la loro funzione biologica, è l'inducibilità. Esponendo le cellule o l'organismo stesso a elevate concentrazioni di metalli traccia, può essere indotta la sintesi delle MT e tale tipo di risposta costituisce la difesa più rapida ed efficace che gli organismi attivano per esposizione indesiderata ai metalli tossici. L'espressione del messaggero e la sintesi delle MT è promossa dal metallo, ma anche da fattori di crescita, prodotti di oncogeni, secondi messaggeri come cAMP e diacilglicerolo, vitamine e ormoni (Samson e Gedamu, 1998). È stato, infine, riportato che la produzione di MT aumenta in risposta ad agenti infiammatori e sostanze chimiche citotossiche (Kägi e Schäffer, 1988; Samson e Gedamu, 1998; Coyle e coll., 2002).

La sintesi di MT è associata a numerose situazioni di stress. Sebbene numerosi agenti siano capaci di regolare la sintesi di MT, i metalli sono i più potenti induttori in quanto i geni codificanti le MT condividono, nella regione dei promotori, motivi oligonucleotidici presenti in copie multiple, noti come

*Sintesi delle
Metallothioneine*

*Metal
Regulatory
Elements
(MRE)*

“metal regulatory elements” (MRE). I motivi MRE consistono di un core conservato costituito da 7 nucleotidi (TGC(G/A)CNC) fiancheggiato da una sequenza semiconservata (Scudiero e coll., 2001). E' stata formulata l'ipotesi che le sequenze MRE funzionino riconoscendo fattori di trascrizione specifici, che, quando attivati dai metalli pesanti, si legano al DNA in prossimità del promotore del gene delle MT, inducendone l'espressione (Giedroc e coll. 2001).

L'inducibilità delle MT dipende dal tipo di metallo e dalla sua concentrazione intracellulare. E' stato riportato che, nelle cellule umane della linea HepG2, i geni codificanti le MT sono espressi in misura diversa in risposta ai metalli Zn, Cu e Cd, e le concentrazioni ottimali richieste per la massima induzione delle MT differiscono per ciascun metallo (Jahroudi e coll., 1990). La differente risposta ai metalli può essere messa in relazione con il diverso ruolo dei metalli traccia che si legano alle MT: alcuni di essi, come il cadmio, non assolvono funzioni biologiche e sono sempre tossici; altri, come lo zinco, sono coinvolti in numerosi processi biologici (Hesketh e Villette, 2002) e sono tossici solo ad alte concentrazioni. Sono state fatte due ipotesi per spiegare la diversa capacità induttiva dei metalli: una prima ipotesi prevede che lo stesso fattore di trascrizione possa mostrare differenti gradi di affinità per i metalli, così come osservato per le MT; la seconda ipotesi prevede l'esistenza di fattori di trascrizione specifici per ciascun metallo con diversa affinità per gli MRE (Samson e Gedamu, 1998). Sebbene si ritenga che le MT siano

principalmente regolate a livello trascrizionale (Karin e coll., 1984) mediante l'interazione dei fattori di trascrizione con i promotori, il quadro relativo alle "MRE binding proteins" è attualmente piuttosto frammentario essendo stati descritti fattori che riconoscono differenti MRE e/o rispondono in maniera diversa ai metalli *in vivo* o *in vitro*. Il fattore di trascrizione MTF-1 si lega specificamente agli MRE attivando la trascrizione del gene delle MT (Heuchel e coll., 1994). MTF-1 ha tutte le caratteristiche di una zinc-finger protein e funziona anche da sensore dello zinco, in quanto la sua capacità di legarsi al DNA aumenta in seguito all'esposizione allo zinco. Si hanno evidenze che il fattore di attivazione delle MT non consisterebbe nel sensore del metallo che sarebbe a sua volta regolato da un inibitore che lo rilascia in presenza del metallo (Radtke e coll., 1995).

Gli elementi che regolano l'espressione delle MT sono svariati, infatti i promotori delle MT contengono sequenze che rispondono anche ad altri fattori di trascrizione. Il promotore dei geni codificanti la MT-IIa è uno dei più complessi: esso contiene siti di legame per fattori di trascrizione attivati da fattori di crescita e attivatori di proteine chinasi A e C (Samson e Gedamu, 1998).

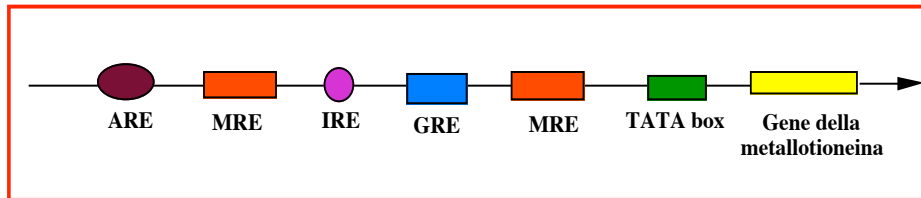


Fig.1.3 Rappresentazione schematica della struttura del promotore del gene delle MT. ARE= “Antioxidant Responsive Element”; MRE= “Metal Regulatory Element”; IRE= “Interferon Responsive Element”; GRE= “Glucocorticoid Responsive Element”.

Inoltre, distalmente a tale sito di legame, è stato individuato un elemento che risponde all’induzione da interferone (IRE). Elementi rispondenti ai glucocorticoidi (GRE) sono stati, altresì, identificati nei promotori della MT umana e di ratto. Sono state riconosciute, inoltre, regioni interne ai promotori che contengono elementi che rispondono all’induzione da agenti ossidanti (ARE) quali perossido di idrogeno (Rushmore e coll., 1991), da qui il ruolo delle MT come antiossidanti cellulari (Samson e Gedamu, 1998). (Fig. 1.3)

E’ stato dimostrato che, oltre ad un controllo di tipo trascrizionale, vi sono anche meccanismi di regolazione post-trascrizionale della sintesi delle MT indotta dal trattamento con i metalli (Scudiero e coll., 1997a).

Infine, in numerosi organismi vegetali ed animali, uomo compreso, è stato descritto un ulteriore meccanismo di regolazione dell’espressione genica delle MT influenzato dai metalli, che consiste nell’amplificazione genica, ovvero nell’aumento del numero di copie di geni codificanti le MT (Andrews, 1990).

La degradazione delle MT è un altro aspetto importante della regolazione di queste proteine. Il processo avviene sia nei lisosomi che in compartimenti non lisosomali. Essa è legata all'età dell'animale e al tipo di metallo legato. L'emivita della MT del ratto neonato è circa 49 ore, mentre quella del ratto adulto è circa 4 ore (Klaassen e coll, 1994); l'emivita della Zn-MT è approssimativamente di 18-20 ore, mentre quella della Cd-MT è di circa 3 giorni (Feldman e coll, 1978). La degradazione delle MT è regolata dal contenuto di metallo: le MT sono rapidamente degradate quando esse legano meno di cinque atomi di metallo per molecola (Choudhuri e coll, 1992). Il legame del metallo con i gruppi tiolici è influenzato dal pH; ai valori di pH esistenti nei lisosomi la maggior parte dello zinco è rilasciato dalle MT, mentre il Cd resta ad esse associato (Choudhuri e coll., 1992), e ciò potrebbe spiegare la più lunga emivita della Cd-MT rispetto alla Zn-MT *in vivo*.

1.5 POLIMORFISMO E CONSERVAZIONE GENICA DELLE MT

Si ritiene che il principale ruolo fisiologico delle MT sia legato all'omeostasi degli oligoelementi essenziali e alla protezione dagli effetti nocivi dello stress ossidativo (Coyle e coll, 2002). Tuttavia gli esperimenti d'inattivazione genica condotti su topi transgenici che non esprimono i geni codificanti le MT (Klaassen e Liu, 1998), suggerirebbero che le MT non sono essenziali per la vita, ponendo il quesito circa il significato

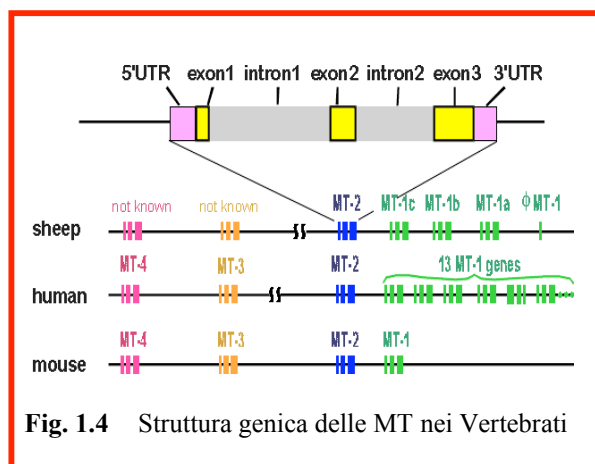
della conservazione della struttura e delle proprietà di queste proteine nel corso dell'evoluzione.

Klaassen e coll. (1999) hanno ipotizzato che le MT sarebbero comparse milioni di anni fa nei primi esseri viventi e la loro capacità di legare il metallo avrebbe costituito il vantaggio selettivo di queste proteine. Eventi di duplicazione genica e successiva evoluzione dei geni duplicati avrebbero condotto alla divergenza genica delle MT specie-specifiche. Con l'aumento della contaminazione ambientale da metalli pesanti le MT, oltre al ruolo di trasporto e deposito di "metalli traccia" fisiologici, avrebbero assunto un ruolo anche nella difesa dalla tossicità di questi stessi elementi. Esperimenti di inattivazione genica condotti sui Mammiferi, con la conseguente perdita della funzione omeostatica esercitata dalle MT nei confronti dei "metalli traccia" fisiologici, dimostrano che tale funzione potrebbe essere stata compensata dalla comparsa di altri meccanismi omeostatici. Nessun meccanismo si sarebbe evoluto per compensare l'eventuale perdita della sua funzione detossificante nei confronti del Cd che sembra essere diventato il ruolo preminente di queste proteine (Klaassen e coll, 1999).

In sintesi, le MT sarebbero molecole comparse anticamente con il compito di svolgere una funzione omeostatica nei confronti dello Zn e del Cu e, durante l'evoluzione, si sarebbero trasformate conservando l'antica funzione e, in casi patologici, assumendo funzioni detossificanti.

Nella maggior parte delle specie studiate, le MT mostrano polimorfismo genetico (fig 1.4).

Le isoforme, codificate da geni non allelici, possono essere separate mediante cromatografia a scambio ionico o elettroforesi



(Minami e coll, 2002) e si è convenuto di identificarle con le sigle MT I, MT II etc. Nei Mammiferi, ed in particolare nel coniglio, nella scimmia e nell'uomo le due forme principali MT I e MT II possono essere ulteriormente risolte in componenti secondarie denominate MT I-a, MT I-b, etc. secondo l'ordine di eluizione dalle resine a scambio ionico (Minami e coll, 2002). In seguito sono state evidenziate altre forme di MT tessuto-specifiche: dal tessuto renale di feto umano è stata purificata un'isoforma, denominata MT-0 (Soumillion e coll., 1992); dal tessuto cerebrale umano è stata caratterizzata una nuova MT, detta MT-III, costituita da 68 aminoacidi, la cui quantità è abbondante nel cervello di individui sani e notevolmente ridotta nel cervello di individui colpiti dal morbo di Alzheimer (Uchida e coll., 1991); dal tessuto epiteliale murino e umano è stata isolata, inoltre, una forma di MT denominata MT-IV, codificata da un gene ancora diverso dai precedenti, (Quaife e coll., 1994).

Il polimorfismo genetico delle MT è importante in quanto i geni polimorfici, sebbene codifichino per proteine la cui sequenza aminoacidica è molto simile, possono subire modificazioni a livello di regolazione genica, portando alla sintesi di specifiche isoforme in risposta a vari fattori fisiologici e/o ambientali.

Diversi studi hanno dimostrato che le isoforme della famiglia delle Metallotioneine spesso mostrano differenti capacità di essere trascritte, tradotte e mantenute e non sempre esse rispondono ugualmente all'induzione da metallo.

*Diversa
inducibilità delle
varie isoforme
delle
Metallotioneine*

Studi condotti su Osteitti antartici tesi a misurare i livelli di trascritto delle isoforme MT-I ed MT-II, hanno evidenziato una spiccata alterazione nel rapporto tra le due isoforme in condizioni naturali ed in seguito a trattamento con cadmio. L'espressione del trascritto per MT-I risulta costitutiva, mentre la presenza del trascritto per l'MT-II è indotta esclusivamente dal cadmio, suggerendo così che le regioni promotrici dei due geni sono diversamente responsive al metallo (Carginale e coll., 1998). Evidenze simili si sono ottenute anche nei lombrichi, dove delle due isoforme presenti, solo una, l'isoforma MT2, è coinvolta nella detossificazione dal metallo (Sturzenbaum e coll., 2004).

Studi condotti sull'Osteitto antartico *Notothenia coriiceps*, inoltre, hanno evidenziato anche un'espressione differenziale delle due isoforme di MT nei vari tessuti esaminati: nel cervello e nel rene è presente quasi esclusivamente il trascritto per

l'MTII, nel fegato i livelli dei trascritti per l'MTI e l'MTII sono confrontabili (Scudiero e coll., 2000).

CAPITOLO 2
INQUINAMENTO DA METALLI PESANTI

Negli ultimi decenni, l'inquinamento di acque e suoli a carico di metalli tossici nelle aree antropizzate è aumentato notevolmente per effetto delle attività antropiche quali combustione di idrocarburi fossili, attività minerarie, uso di fertilizzanti, pesticidi, e rifiuti urbani. I processi produttivi che avvengono ad alta temperatura immettono nell'atmosfera metalli in fase gassosa o sottoforma di particolati i quali, prima di depositarsi al suolo e in mare, sono trasportati dai venti in funzione delle loro caratteristiche chimico-fisiche: è stato dimostrato che, per esempio, i metalli in fase gassosa che si liberano per i processi industriali, possono distribuirsi sul territorio fino a 10000 Km dalla fonte di emissione. I metalli pesanti depositati sulla terra, nelle acque e nei sedimenti, sono soggetti a cicli geochimici globali che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali e direttamente, o attraverso la catena alimentare, essi possono essere accumulati nei tessuti di tutti gli organismi viventi.

Per lungo tempo si è ritenuto che il suolo fosse un comparto ambientale ragionevolmente "sicuro", in cui poter riversare le sostanze tossiche, possedendo la capacità di trattenere ingenti quantità di sostanze e composti tossici in forme chimiche innocue per gli organismi e gli ecosistemi. Questa "capacità tampone" del suolo è il risultato degli equilibri chimici che si instaurano tra gli inquinanti e le componenti del suolo (gas, soluzioni, minerali e sostanza organica) (Sequi, 1989).

Per tale motivo gli effetti dell'inquinamento del suolo da metalli pesanti sulla salute umana e sulla vitalità degli ecosistemi sono stati per lungo tempo trascurati e l'attenzione è stata rivolta all'inquinamento dell'atmosfera e delle acque, i cui effetti si ripercuotono con immediatezza sulla vitalità degli organismi e degli ecosistemi (Andrew e coll., 1996).



Attività industriali

I metalli pesanti entrano nella composizione dei prodotti usati dalle industrie e nelle coltivazioni intensive per cui, fin dal tempo della rivoluzione industriale, si è avuta la distribuzione su ampi territori (oltre 10.000Km) delle polveri emesse dagli stabilimenti industriali. L'uso dei metalli pesanti nelle attività industriali, nonché dei fertilizzanti e fitofarmaci in agricoltura, ha determinato nei suoli dell'emisfero boreale un progressivo aumento del contenuto di metalli pesanti. A causa della loro elevata tossicità, la concentrazione dei metalli pesanti in vaste aree urbane e agricole ha raggiunto soglie "critiche" causando un decremento della fertilità del suolo e della biomassa (Bertelsen e coll, 1995).



Pesticidi e fertilizzanti

Le ricerche condotte negli ultimi decenni indicano che l'inquinamento del suolo ha un rilievo sanitario ed ambientale non trascurabile. Numerose ricerche hanno indicato che intossicazioni acute e croniche da inquinanti determinano

manifestazioni tossicologiche epidemiche ed endemiche nelle popolazioni (Poels e Veerkamp, 1992; Spadaro e Rabl, 2004). Segnali allarmanti vengono inoltre dai risultati di ricerche condotte sulla vitalità degli ecosistemi che occupano acque e sedimenti fluviali, lacustri e marini, in equilibrio geochimico con il suolo.

Come già detto nell'introduzione, essenziali o utili alla vita in piccole concentrazioni, molti metalli pesanti sono tossici a concentrazioni poco superiori a quelle a cui sono benefici. La sottigliezza dell'intervallo di concentrazioni che intercorre tra la manifestazione della carenza alimentare e l'effetto tossico desta preoccupazioni in quanto richiede un'attentissima gestione dei flussi antropici (Fraga, 2005).

Numerosi metalli pesanti formano complessi stabili con i radicali sulfurici, amminici, fosforici e carbossilici della sostanza organica ed hanno quindi un'elevata tendenza a combinarsi stabilmente con i siti più reattivi dei composti chimici costituenti la materia vivente (Waalkes e coll., 2000).

Quando raggiungono concentrazioni cellulari sufficientemente alte, i metalli pesanti interferiscono con la sintesi proteica e determinano la produzione di enzimi denaturati inattivi per le funzioni biologiche. I metalli pesanti interferiscono in molti processi vitali quali, per esempio, il ciclo di Krebs e la sintesi degli steroidi (Dineley e coll., 2003); un'esposizione cronica a basse dosi di Cd, inoltre, può causare una scarsa mobilità degli spermatozoi e sterilità maschile (Satoh e coll.,

*Interferenza dei
metalli pesanti
con le funzioni
biologiche*

2002).

E' stato dimostrato che le malattie e le patologie legate all'inquinamento da metalli pesanti sono più frequenti nelle comunità siderurgiche, urbane, minerarie e agricole (Baptista Neto e coll., 2000).

I soggetti più colpiti dall'inquinamento da metalli pesanti sono le donne gravide ed i bambini di età compresa tra i tre ed i tredici anni. Analisi condotte su una popolazione residente sulle sponde del lago Maracaibo in Venezuela (Corzo e Naveda, 1998), evidenziano che fra le cause dell'aumento, statisticamente significativo, delle acefalie nei neonati vi è anche la maggior esposizione delle madri al mercurio (Hg), al piombo (Pb) e al vanadio (V).

Indagini epidemiologiche sono state condotte su popolazioni residenti sulle sponde dei laghi Aral (Kazachistan), Michigan (USA), e del Mar Baltico (Svezia), bacini endoreici che raccolgono acque reflue da regioni con intensa attività agricola ed industriale ricche, quindi, di composti organici clorurati, pesticidi, insetticidi (DDT e HCH) e metalli pesanti (Hg e Cd). Questi composti vengono assimilati mediante la catena alimentare, possono attraversare la placenta, e concentrarsi nel latte materno, nel tessuto adiposo ed in quello nervoso. I bambini che vivono sulle sponde del lago di Aral, rispetto allo standard medio, alla nascita pesano di meno, presentano un minor tono muscolare, sono più deboli, l'indice di mortalità è più alto, hanno una maggiore predisposizione alle

*Patologie legate
ai metalli
pesanti*

malattie croniche ed, infine, un ritardato sviluppo fisico e cognitivo (Zetterstrom, 1999).

Durante lo sviluppo i metalli pesanti provocano malformazioni, forse con gli stessi meccanismi che causano le malformazioni fetali, quale la sintesi di proteine inattive. Nei quartieri popolari di Città del Messico, per esempio, è stato rilevato che il 60% degli studenti della scuola dell'obbligo soffre di una grave diminuzione del quoziente intellettivo determinata dal piombo scaricato dagli autoveicoli (Romieu e coll, 1994).

Negli individui adulti, un accumulo di metalli pesanti determina patologie a carico di pelle, fegato, reni (Tong e coll. 2000) e del sistema nervoso provocando anche follia, demenza, e morte (Ilchenko, 1999). Il cromo (Cr), il berillio (Be), l'arsenico (As) il vanadio (V), il rame (Cu), il nichel (Ni), sono genotossici in quanto, determinando mutazioni del DNA, favoriscono l'insorgenza di tumori e cancri. Il cadmio (Cd) ed il piombo (Pb) agendo sul sistema immunitario determinano una riduzione dell'efficienza di riparo del DNA e, quindi, risultano indirettamente cancerogeni (Silbergeld e coll., 2000).

La capacità di molte specie vegetali di tollerare e accumulare metalli pesanti provoca un conseguente passaggio del metallo lungo la catena alimentare, con l'accumulo dello stesso all'apice della catena (Dietz e coll., 2000).

Gli effetti esercitati dai metalli pesanti a livello cellulare sono noti solo per alcuni (per esempio il piombo). Attualmente è noto che il cadmio è nocivo, ma poco si conosce delle

correlazioni tra il suo assorbimento e la produzione di molecole protettive.

2.1 IL CADMIO: METABOLISMO E TOSSICITÀ

Il Cadmio (Cd) (densità = 8.6 g/cm³) è un metallo pesante presente nel suolo in concentrazioni molto basse (circa 1 mg/Kg) (Peterson e Alloway, 1979). Il Cd è un elemento altamente tossico per la maggior parte degli organismi, con una tossicità di 2-20 volte superiore ad altri metalli pesanti e, per tale motivo, è considerato un pericoloso inquinante (World Health Organisation, WHO, 1992).

*Caratteristiche
del Cadmio*

Il cadmio è un metallo utilizzato in molti processi industriali e pertanto la sua distribuzione sulla crosta terrestre è significativamente variata negli ultimi decenni in funzione della continua e crescente antropizzazione. Il cadmio è un metallo di transizione che al pari di tutti gli altri metalli, non subisce processi di biotrasformazione; esso non ha funzioni biologiche e, a differenza dei metalli traccia (Zn, Cu, Fe, Mn) che a basse concentrazioni si comportano da micronutrienti essenziali per la vita, risulta sempre altamente tossico per la cellula.

Il fumo di sigarette, i condotti per l'acqua (dove il cadmio è usato per proteggere i metalli dalla corrosione), i cibi, le ceramiche, le vernici, i materiali per le protesi dentarie, le leghe metalliche per fili elettrici e batterie d'accumulatori sono state fonti di cadmio ben definite; il suo vasto impiego industriale, ne ha aumentato considerevolmente la biodisponibilità e, a causa della sua volatilità, gli esseri viventi, incluso l'uomo, ne vengono di frequente a contatto e lo assimilano per inalazione di polveri, fumo e per ingestione diretta. In sintesi, il cadmio costituisce un serio rischio per la salute.

L'elevata pericolosità del cadmio è dovuta non solo alla capacità di penetrare facilmente nella cellula, ma anche al lento smaltimento da parte dell'organismo e al fatto che il cadmio si può accumulare nei tessuti raggiungendo elevate concentrazioni (Schilderman e coll., 1997). E' stato dimostrato che tale ione penetra nell'organismo principalmente attraverso le vie respiratorie e digerenti, viene distribuito agli organi per via ematica e concentrandosi nei tessuti causa disturbi renali, respiratori, epatici, cardiocircolatori e neurologici. Essendo, inoltre, carcinogeno il cadmio può indurre tumori nell'intestino, rene, sistema riproduttivo maschile e respiratorio



Sigarette



Vernici



Pile e batterie

*Le più comuni
fonti di Cadmio*

(Waalkes, 2003).

Il cadmio penetra nella cellula utilizzando i canali del calcio voltaggio dipendenti o associati a recettori transmembrana e nella cellula in seguito al legame con vari costituenti citoplasmatici e nucleari interferisce con i normali processi di proliferazione e differenziamento cellulare (Beyersmann e Hechtenberg, 1997). In particolare, il cadmio, essendo chimicamente molto simile allo zinco e al calcio, interferisce con la loro omeostasi e si sostituisce nei meccanismi di trasporto e nei siti di legame (Kiss e Osipenko, 1994). Il cadmio si lega ai residui cisteinici delle proteine e, con alta affinità, anche ai domini Zinc-binding di molte metalloproteine, interferendo, o addirittura bloccando, le funzioni cellulari Zn-dipendenti. Il cadmio, inoltre, causa perossidazione dei lipidi e, nel nucleo, rotture nel DNA e inibizione dei meccanismi di riparo (Hassoun e Stohs, 1996). Molti di questi effetti sono legati alla produzione di specie ossigeno reattive (ROS) e/o all'abbassamento dei livelli di glutatione (Stohs e Bagchi, 1995) e degli enzimi antiossidanti (Casalino e coll., 2002). Concentrazioni citotossiche di cadmio esercitano marcati effetti anche sulla sintesi proteica che risulta in alcuni casi inibita, in altri marcatamente aumentata soprattutto per quanto riguarda alcune specifiche classi di proteine come proto-oncogeni (Jin e Ringertz, 1990), geni soppressori tumorali e proteine a funzione protettiva, come le metallothioneine (Theocharis e coll., 2003) e le heat shock proteins, la superossido-dismutasi, la catalasi e l'ubiquitina (Zikic e coll.,

*Assorbimento
cellulare,
distribuzione ed
effetti a livello
molecolare*

2001). Queste proteine agiscono con meccanismi diversi: chelano il metallo prevenendone gli effetti tossici, rimuovono le specie ossigeno reattive, riparano i danni alle membrane plasmatiche e al DNA, rinaturano o degradano le proteine denaturate.

Le disfunzioni fisiologiche dovute all'esposizione al cadmio sono tanto numerose da rendere impossibile distinguere gli effetti primari da quelli secondari (Nath e coll., 1984). Entrando in competizione con lo zinco per i siti di legame delle biomolecole, il cadmio può interferire con alcune funzioni essenziali di questo metallo, quali il controllo delle reazioni enzimatiche e l'utilizzo dei nutrienti,

Il cadmio può anche fungere da catalizzatore per reazioni d'ossidazione che generano radicali liberi, causando il danneggiamento dei tessuti. In un cospicuo gruppo di specie di invertebrati e vertebrati uomo compreso, il cadmio sembra deprimere alcune funzioni immunitarie riducendo la resistenza dell'ospite verso batteri e virus ed accrescere il rischio di cancro, soprattutto ai polmoni e alla prostata (Degraeve, 1981).

Negli ultimi anni è stato dimostrato che l'esposizione al cadmio causa, enfisema, anemia, fenomeni immunosoppressivi con conseguente aumento della probabilità di sviluppare cancro, ipertensione e malattie cardiache (Satoh e coll., 2002).

L'effetto cancerogeno del cadmio sembra essere indiretto, infatti il metallo da solo non causa mutazioni genetiche, anche quando raggiunge nella cellula concentrazioni citossiche (50

*Disfunzioni
fisiologiche
dovute al
Cadmio*

mM, corrispondenti a circa 4,8 mg/Kg), ma inibisce sensibilmente il processo di riparo del DNA già quando è presente a concentrazioni pari a 0,048 mg/Kg (Oberheitmann e coll. 1999).

Il cadmio intacca anche le ossa e causa dolori alle articolazioni: il “morbo itai-itai” (grido di dolore equivalente a "ahi, ahi"), che colpisce prevalentemente le donne di età medio-avanzata e causa dolori ai reni e alle articolazioni e deformazione e fragilimento delle ossa, fu studiato per la prima volta in popolazioni giapponesi tra gli anni '40 e '50. Tali popolazioni si ammalarono per la contaminazione ambientale da cadmio oggi considerata la più grave accaduta nel mondo. Fu riconosciuto che la malattia era dovuta ad un'intossicazione cronica da cadmio di tipo alimentare, per la contaminazione dell'ambiente (acqua e suolo) da parte degli scarichi industriali (Nogawa e Kido, 1993; Ogawa e coll, 2004).

*Il morbo itai-
itai*

Studi epidemiologici suggeriscono che un'eccessiva concentrazione ematica di cadmio è un fattore di rischio nell'insorgenza dell'arteriosclerosi. Basse concentrazioni di cadmio determinano l'aumento della concentrazione cellulare di calcio, che regola la proliferazione cellulare, quindi il cadmio può essere indirettamente un fattore di rischio per la proliferazione delle cellule muscolari lisce e dell'epitelio vascolare, con conseguente aumento della pressione arteriosa e rischio di arteriosclerosi (Fujiwara e coll, 1998).

CAPITOLO 3
BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE

Il *biomonitoraggio* consiste nell'analisi (monitoraggio) dell'ambiente facendo uso di organismi viventi. Questo metodo si basa sul principio che gli organismi assimilando sostanze presenti nell'ambiente (tossiche e non) possano evidenziare alterazioni metaboliche e morfologiche che riflettano la condizione ambientale, ed eventualmente il grado di inquinamento. L'assorbimento di una sostanza tossica o costitutiva (O₂, H₂, micronutrienti essenziali) da parte degli organismi viventi consente di indicarne la presenza nell'ambiente e, in prima approssimazione, anche la concentrazione della stessa.

In genere ogni organismo vivente risponde in maniera diversa ai fattori sia naturali che antropici presenti nell'ambiente in cui essi vivono ed un' analisi morfologica e/o molecolare di questi organismi può evidenziare l'effettiva condizione dell'individuo o di un ecosistema.

Il biomonitoraggio fu utilizzato per la prima volta in Scandinavia alla fine degli anni '60, quando furono utilizzati dei muschi per valutare l'inquinamento da metalli pesanti. Successivamente l'uso di organismi per il monitoraggio ambientale si è diffuso (Fernandez e coll., 2002; Ruhling and Tyler, 2004): il notevole aumento dell'inquinamento negli ultimi decenni ha contribuito all'utilizzo specifico di questa metodica per la valutazione della contaminazione ambientale.

3.1 BIOINDICATORI, BIOACCUMULATORI E BIOMONITORS

Gli organismi viventi possono essere impiegati per il monitoraggio ambientale sia come bioindicatori, sia come bioaccumulatori. Un “*bioindicatore*” è quello che consente di evidenziare le caratteristiche biologiche e chimico-fisiche che compaiono in un organismo in risposta al grado di inquinamento a cui esso è esposto. Le principali caratteristiche valutate negli studi di biomonitoraggio sono: a) modificazioni morfologiche, b) variazioni della vitalità (es. variazioni del numero di individui bioindicatori che occupano l'area in esame, c) alterazioni funzionali, d) eventuali capacità di accumulo di sostanze inquinanti.

Bioindicatori

Un bioindicatore ottimale è l'organismo che consente di stabilire una precisa correlazione tra le modificazioni biologiche (sintomi) e i livelli di inquinante a cui è esposto permettendo un'analisi quantitativa oltre che qualitativa del tasso di inquinamento.

Un “*bioaccumulatore*” è un organismo che consentendo di misurare il contenuto e l'accumulo di un inquinante negli organi e nei tessuti, permette di ricostruire il profilo di deposito sul territorio. Un organismo può essere utilizzato come bioaccumulatore solo se presenta specifiche caratteristiche quali: a) capacità di accumulare la sostanza in esame fino ad elevate concentrazioni; b) tolleranza nei confronti della sostanza in esame (un organismo che non possiede tale requisito non permette di evidenziare elevate concentrazioni e quindi livelli

Bioaccumulatori

elevati di inquinamento; c) possibilità di definirne l'età (l'accumulo di una sostanza è funzione della concentrazione ma anche del tempo di esposizione).

Attualmente come bioindicatore per il monitoraggio delle acque marine è usata l'alga *Fucus vesiculosus* che è in grado di accumulare elevate quantità di metalli per cui il contenuto intracellulare di metalli pesanti è un indice della concentrazione dei metalli nell'ambiente in cui essa vive. Per il monitoraggio dell'inquinamento da metalli pesanti negli ecosistemi terrestri e di acqua dolce sono impiegati rispettivamente come indicatori il verme *Lumbricus rubellus* e la trota (Morris e coll., 1999). Molti sono gli studi condotti sull'uso dei molluschi e dei pesci per il monitoraggio delle acque; alquanto frammentari sono, invece, le informazioni sull'uso di Tetrapodi terrestri come bioindicatori per il biomonitoraggio ambientale.



Fucus vesiculosus



Lumbricus rubellus



Salmo trutta

L'identificazione di Tetrapodi come bioindicatori potrebbe essere utilizzata come un sistema di interesse sociale in quanto i Tetrapodi sono al vertice della piramide alimentare.

3.2 BIOMARKERS

La moderna tossicologia ambientale ha gradualmente affiancato alle indagini di biomonitoraggio un altro approccio metodologico basato sulla analisi delle risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può dare se sottoposto a stress chimico ambientale.

Sono definiti *biomarkers* o indici di stress le alterazioni di una funzione molecolare o di una struttura cellulare indotte da un contaminante, evidenziabili e quantificabili in un soggetto bioindicatore.

*Alterazioni
molecolari e
cellulari come
indici di stress*

Le risposte che l'organismo realizza quando si trova a contatto con una sostanza chimica rappresentano "potenziali biomarker" (Shugart e coll, 1992) utilizzabili per il monitoraggio ambientale (Bayne e coll., 1979). Mediante lo studio delle risposte immediate il biomarker permette di prevedere con notevole anticipo l'insorgenza di effetti nocivi come cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive, e mortalità.

Quando un composto tossico entra in un ecosistema (marino, terrestre o d'acqua dolce) determina una serie d'alterazioni o danni di differente entità che vanno dal danno molecolare e citologico, fino a giungere ad alterazioni strutturali degli organismi e quindi delle popolazioni o della comunità (Olsson e coll, 2005). La tossicità primaria di un contaminante, molto pericolosa perché non evidenziabile ad un'analisi generica, agisce, in linea generale, a livello molecolare,

determinando modificazioni delle attività enzimatiche, alterazioni del DNA, RNA, proteine ecc.; successivamente gli effetti si possono rilevare, con un meccanismo a cascata, a livello citologico, tissutale, di organo ed organismo fino ad interessare l'intera popolazione.

Gli organismi che subiscono uno stress tossico per un inquinante rispondono in un primo momento attivando meccanismi adattativi tendenti a neutralizzare l'azione nociva e riequilibrare l'omeostasi nell'organismo. Le risposte omeostatiche a livello primario più note sono l'attivazione di sistemi multienzimatici come le monoossigenasi, gli enzimi coniugati, o le metallotioneine che attualmente sono considerate un'ottima classe di biomarkers per l'analisi della contaminazione da metalli pesanti poiché è stato dimostrato che all'aumento della concentrazione dell'inquinante (metalli pesanti) corrisponde l'aumento del livello di queste molecole nei tessuti.

Dal confronto tra le concentrazioni dei biomarkers presenti nei soggetti bioindicatori, campionati in aree da testare e quelli degli organismi provenienti da aree incontaminate possono derivare informazioni sui rischi a cui sono soggetti gli ecosistemi (Decaprio, 1997).

CAPITOLO 4
SISTEMA BIOLOGICO

La classe dei Rettili comprende attualmente 4 ordini: Cheloni, Squamati, Rincocefali e Loricati. Una classificazione che comprende le forme estinte e le viventi può essere fatta in base ad alcuni caratteri del cranio, nella regione temporale. Si possono così stabilire 5 sottoclassi: gli Anapsidi, comprendenti i Cotilosauri (estinti) e i Cheloni; i Parapsidi, gli Ittiopterigi e i Sinapsidi (da cui deriveranno i Mammiferi), comprendenti forme estinte; i Diapsidi, suddivisi in Lepidosauri, comprendenti gli Eusuchi (estinti), i Rincocefali e gli Squamati, e Arcosauri, con 5 ordini, tutti estinti, tranne i Loricati. Particolare importanza riveste il gruppo degli Arcosauri Tecodonti, da cui hanno preso origine tutti gli altri Arcosauri, compresi i Saurischi, da cui deriveranno gli Uccelli (Padoa, 1992). In sintesi, la sottoclasse dei Diapsidi viene attualmente considerata una linea monofiletica che include la maggior parte dei gruppi più importanti dei tetrapodi Mesozoici, i Loricati, i Rincocefali, gli Squamati e gli Uccelli (Pough e coll., 1997).

L'ordine degli Squamati, comprendente circa 5800 specie di lucertole, anfisbene e serpenti, rappresenta per ampiezza il secondo gruppo di tetrapodi viventi.

Le lucertole hanno dimensioni che vanno dai tre centimetri dei piccoli gechi ai circa tre metri del varano di Komodo. Nel Giurassico dal gruppo delle lucertole si sono differenziate quattro linee filogenetiche principali: gli Iguani ed i Gekoti,

costituiti per lo più dal corpo robusto con una notevole diversificazione nella forma corporea, e gli Scincomorfi e gli Anguinomorfi, di forma allungata e con una minore diversificazione morfologica rispetto agli Iguani e ai Gekoti. Molte lucertole di questi quattro gruppi utilizzano i ferormoni nel comportamento sessuale ma differiscono per l'uso che fanno degli organi di senso. Molti Iguani sono predatori sedentari che utilizzano la vista per individuare le prede e gli invasori dei loro territori. Gli Iguani spesso utilizzano i colori e gli annessi della propria pelle (creste, rigonfiamenti della cute, ecc.) come strumenti per il corteggiamento e la difesa territoriale. Le lucertole Scincomorfe ed Anguimorfe sono predatori che cacciano muovendosi su ampie zone, utilizzano l'olfatto per individuare la preda e non hanno territori determinati. Gli Anfisbeni, a volte considerati come una famiglia di lucertole, sono in realtà Squamati specializzati che preferiscono nascondersi in tane o in gallerie che scavano aiutandosi con il cranio molto robusto. I Serpenti, o Ofidi, rappresentano un gruppo di Squamati molto specializzati, caratterizzati dall'aver un corpo sottile allungato e dalla mancanza di arti. L'organizzazione della massa corporea serpentiforme è associata a specifiche modalità di locomozione (serpentino, rettilineo, a fisarmonica ed ad onde laterali), di cattura della preda (uso del veleno) e di deglutizione (cranio fortemente cinetico).

Molti Squamati hanno complessi comportamenti sociali, associati con la territorialità ed il corteggiamento e cure parentali

alquanto limitate. Gli Squamati hanno fecondazione interna e mostrano una varietà di modalità riproduttive che va dalla oviparità (le uova sono depositate in un nido e lo sviluppo è supportato interamente dal vitello), alla ovoviviparità (le uova sono trattenute nell'ovidotto e il sostentamento trofico dipende dal vitello), alla viviparità (le uova sono ritenute nell'ovidotto e lo sviluppo è supportato dal trasferimento di sostanze nutritive dalla madre ai piccoli mediante una placenta epitelio-vitellina o epitelio-allantoidea).

Sebbene gli Squamati siano ectotermi, essi regolano con particolare precisione la propria temperatura corporea esponendosi al sole. L'alimentazione, la gravidanza e le infezioni batteriche possono alterare la termoregolazione per cui gli individui possono avere un aumento o una diminuzione della temperatura corporea rispetto a quella che hanno in condizioni normali.

Per gli studi di biologia molecolare e di filogenesi sono stati utilizzati esemplari di Rettili appartenenti all'ordine degli Squamati tra cui esemplari degli infraordini di *Gekkota*, *Scincomorpha*, *Iguania*, *Diploglossa* e *Xenophidia* provenienti dalle nostre zone e dal Madagascar. In particolare, per i trattamenti sperimentali con cadmio è stata utilizzata la specie *Podarcis sicula*, tipico lacertide delle nostre campagne, di facile reperibilità e facilmente manipolabile in laboratorio. In figura 4.1 è riportata la relazione filogenetica esistente tra le specie utilizzate, elencate nella tabella 4.1.

TAB. 4.1
Specie di rettili utilizzate

SPECIE	FAMIGLIA	INFRAORDINE	DISTRIBUZIONE
<i>Calumma brevicornis</i>	Chamaleonida	Iguania	Madagascar
<i>Phelsuma barbouri</i>	Gekkonidae	Gekkota	Madagascar
<i>Pygomeles braconnieri</i>	Scincidae	Scincomorpha	Madagascar
<i>Paroedura masobe</i>	Gekkonidae	Gekkota	Madagascar
<i>Furcifer pardalis</i>	Chamaleonidae	Iguania	Madagascar
<i>Oplurus quadrimaculatus</i>	Oplurinae	Iguania	Madagascar
<i>Bothrops insularis</i>	Viperidae	Serpentes	Brasile
<i>Elaphe quatorlineata</i>	Colubridae	Serpentes	Europa
<i>Anguis fragilis</i>	Anguidae	Diploglossa	Europa
<i>Podarcis sicula</i>	Lacertidae	Scincomorpha	Europa
<i>Chalcides chalcides</i>	Scincidae	Scincomorpha	Europa
<i>Zootoca vivipara</i>	Lacertidae	Scincomorpha	Europa

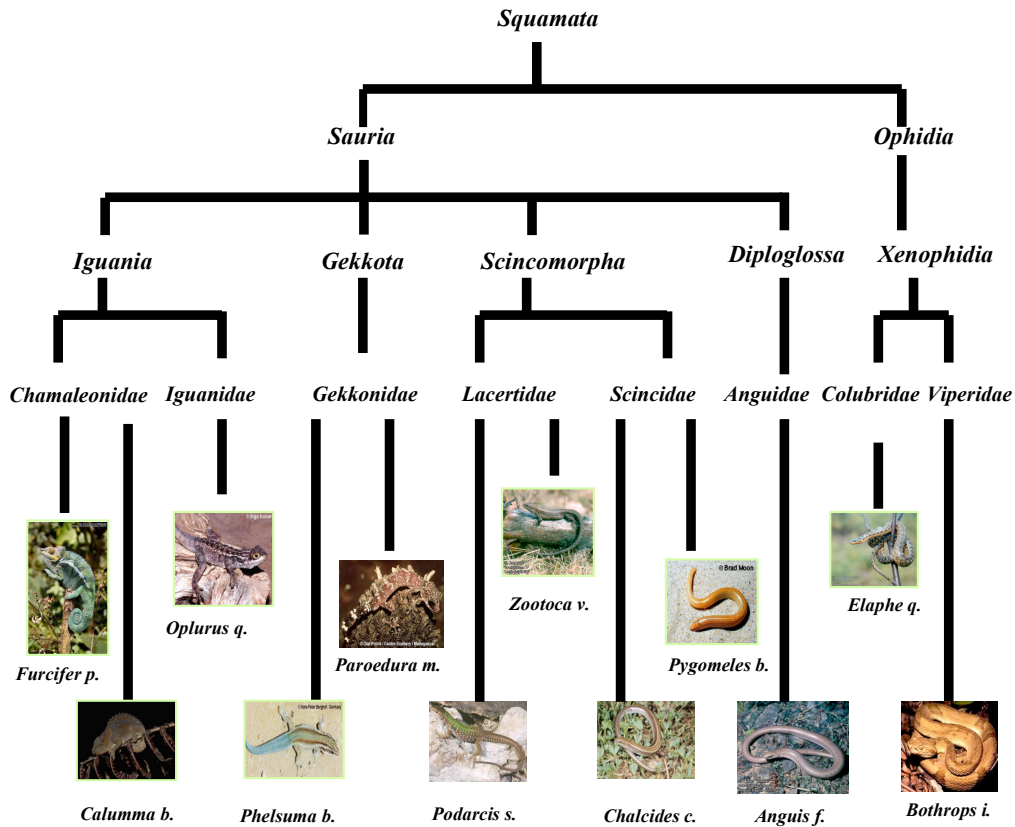


Fig. 4.1 Relazione filogenetica esistente tra le specie oggetto del presente studio, secondo Zug e collaboratori (Zug et al, 2001).

CAPITOLO 5
SCOPO DELLA RICERCA

La metallotioneina è una proteina pressochè ubiquitaria, con struttura e funzioni che si sono conservate nel corso dell'evoluzione degli organismi viventi. Studi recenti hanno dimostrato che, sebbene la struttura primaria dell'MT dei Vertebrati sia molto conservata, piccole modifiche nella sequenza aminoacidica della MT delle differenti specie di Vertebrati si sono accumulate nel tempo. Tali modifiche hanno determinato differenze della sua conformazione, delle caratteristiche dinamiche e della stabilità della molecola (D'Auria e coll, 2001; Capasso e coll, 2002, Scudiero e coll, 2005). Studi di evoluzione molecolare e caratterizzazione funzionale del gene delle MT sono stati condotti negli Osteitti (Bargelloni e coll, 1999; Scudiero e coll, 2001), negli Anfibi (Saint-Jacques e coll, 1995), negli Uccelli (Andrews e coll, 1996) e nei Mammiferi (Karin e Richards, 1984; Peterson e coll, 1988), e, in alcuni casi, sono state fatte anche comparazioni tra le MT di individui appartenenti a classi diverse di Vertebrati (Capasso e coll, 2003; Scudiero e coll, 2005). Poche, invece, sono le informazioni sulla struttura, funzione ed evoluzione del gene codificante l'MT nei Rettili.

La peculiare caratteristica dell'MT di legare metalli pesanti e di poter essere indotta dall'aumento dei livelli dei metalli nella cellula, ha portato negli ultimi anni ad un costante aumento degli studi che utilizzano tale proteina per definirne la funzione e nel tentativo di poterla utilizzare come biomarker dell'inquinamento ambientale da metalli. Inoltre, differenti metalli hanno anche la capacità di indurre specifiche forme di MT in grado di legare con

diversa affinità un metallo piuttosto che un altro. L'interesse per gli studi di biomonitoraggio dei metalli pesanti, è dovuto soprattutto al fatto che negli ultimi decenni l'inquinamento delle acque dolci e marine e del suolo a carico degli stessi è aumentato ad opera delle attività antropiche. Lo studio di inquinanti, quali mercurio e piombo, è stato alquanto approfondito, è ancora poco noto, invece, il meccanismo d'azione del cadmio, la cui ridistribuzione sulla terra negli ultimi anni è notevolmente cambiata in seguito all'urbanizzazione. Attualmente è nota l'azione nociva di questo metallo, ma si conosce poco la correlazione esistente tra il suo uptake e il coinvolgimento delle molecole protettive nella risposta cellulare.

L'obiettivo della ricerca, oggetto della presente tesi, è stato quello di affrontare per la prima volta uno studio evolutivo della famiglia multigenica delle metallotioneine nel gruppo dei Rettili Squamati. Contemporaneamente, è stato valutato, in *Podarcis sicula*, l'accumulo di cadmio nella cellula dopo esposizione cronica o acuta ad esso, nonché l'eventuale capacità della cellula di attivare la sintesi di metallotioneine e meccanismi protettivi detossificanti.

Lo scopo di questo progetto di tesi può così essere schematizzato:

- ottenere la sequenza nucleotidica ed amminoacidica delle metallotioneine in diverse specie;
- effettuare lo studio filogenetico dell'evoluzione del gene per la metallotioneina in questo gruppo di Vertebrati;

- evidenziare un'eventuale espressione differenziale di isoforme di metallotioneina in tessuti e organi di animali sperimentalmente contaminati da cadmio;
- determinare in *Podarcis sicula* i livelli di assorbimento di cadmio in diversi tipi cellulari, in funzione della dose utilizzata e del tempo di esposizione;
- verificare la capacità della cellula di attivare meccanismi protettivi e valutando l'espressione genica della metallotioneina in funzione della modalità di somministrazione del cadmio e della sua concentrazione intracellulare.

Il progetto è stato affrontato con un approccio sperimentale multidisciplinare, utilizzando tecniche di biologia molecolare e di biochimica, e programmi per lo studio dell'evoluzione molecolare. In particolare, per lo studio della risposta cellulare il metallo è stato somministrato agli animali secondo due modalità: alcuni esemplari sono stati sottoposti ad un trattamento acuto per valutare la risposta a livello molecolare; altri animali sono stati sottoposti ad un trattamento cronico per valutare il comportamento della cellula in condizione di stress da inquinante ambientale.

CAPITOLO 6
MATERIALI E METODI

6.2 MATERIALE BIOLOGICO

Per lo studio filogenetico delle MT, sono stati utilizzati vari rettili Squamati provenienti dal parco naturale del Matese e dal Madagascar. Per la valutazione della tossicità dovuta al cadmio sono stati utilizzati esemplari di *Podarcis sicula*. Le lucertole, catturate nei dintorni di Napoli, sono state tenute in terrari con regime fotometrico naturale e alimentate con larve di mosche.

Tutti gli animali sono stati anestetizzati con etere e sacrificati. I tessuti estratti dagli Squamati nostrani sono stati velocemente rimossi e conservati a -80° . I tessuti estratti dagli animali del Madagascar sono stati forniti dal Dott. Gennaro Aprea opportunamente conservati in RNA later (Ambion).

6.2 TRATTAMENTI IN VIVO CON $CdCl_2$

6.2A TRATTAMENTO ACUTO

Ad alcuni esemplari di *P. sicula* è stato somministrato Cd ad una concentrazione di 1 e 2 $\mu g/g$ di peso corporeo mediante iniezione per via sottocutanea di una soluzione di $CdCl_2$. A due, sette e quattordici giorni dal trattamento, gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati gli organi d'interesse (fegato, reni, ovaio, cervello).

6.2B TRATTAMENTO CRONICO

Ad altri esemplari di *P. sicula* è stato, invece, somministrato Cd ad una concentrazione di $1\mu g/g$ di peso corporeo mediante somministrazione per via alimentare di una soluzione di $CdCl_2$. Il metallo è stato somministrato a giorni alterni per un periodo massimo di sessanta giorni.

Contemporaneamente gli esemplari controllo hanno subito simile trattamento mediante somministrazione di acqua (subendo quindi lo stesso stress e assimilando le stesse quantità di liquidi degli animali trattati). Dopo 10, 30, e 60 giorni gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati gli organi d'interesse (fegato, reni, ovaio, cervello, intestino).

6.3 METODI BIOCHIMICI

6.3A COMBUSTIONE DEI TESSUTI

Una volta espantati, i vari organi sono stati pesati e sottoposti ad una combustione blanda (essendo il cadmio volatile): sono stati trattati con 0.5-1 ml di acido nitrico al 70% a 70°C per 20 minuti. Al termine del trattamento, sono stati centrifugati per 5 minuti a 12000 g. Il supernatante è stato quindi diluito opportunamente per determinare il contenuto di cadmio nei diversi tessuti.

6.3B DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO

Il contenuto di metallo è stato determinato mediante Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico con lo Spettrofotometro Perkin Elmer, modello 5100 ZEEMAN, fornito di fornello di grafite HGA 600 ed autocampionatore.

6.3C PREPARAZIONE DELLE POLVERI ACETONICHE

I tessuti di Podarcis sono stati rapidamente rimossi dagli animali, congelati ed omogenizzati in 5 volumi di acetone preraffreddato a -20°C. Gli omogenati sono stati centrifugati a 12·000g per 10 minuti a -10°C. I residui sono stati sottoposti allo stesso trattamento 5 volte ed, infine, essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente. Le polveri acetoniche sono state conservate a -20°C.

6.3D PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI

Da 0,5 a 2g di polveri acetoniche provenienti dai due tessuti sono stati omogeneizzati con ultraturrax (4 colpi da 2 minuti ciascuno) in 2-4 ml di tampone Tris-HCl 20 mM pH 8,6. Gli estratti sono stati centrifugati a 10·000g per 20 min e il supernatante ottenuto da ciascun estratto è stato centrifugato ulteriormente a 10·000 g per 20 min. Tutte le procedure sono state condotte a +4°C.

6.3E PRECIPITAZIONE CON SOLVENTI ORGANICI

I supernatanti provenienti dall'ultima centrifugazione sono stati sottoposti ad un doppio trattamento con solventi organici, che determina la precipitazione selettiva delle metalloproteine (Comeau e coll., 1992). A ciascun supernatante è stato aggiunto un ugual volume di una soluzione di etanolo e cloroformio (1,05/0,08 v/v). Il precipitato risultante è stato rimosso per centrifugazione a 20·000 g per 15 min, ed al supernatante sono stati aggiunti 3 volumi di etanolo a -20°C. Il campione è stato

tenuto 16 ore a -20°C , centrifugato a $20\cdot000\text{ g}$ per 20 min ed il pellet è stato sciolto in 1 ml di tampone Tris-HCl 20 mM pH 8,6.

6.3F DETERMINAZIONE PROTEICA

La determinazione proteica dei campioni provenienti dalla precipitazione selettiva con solventi organici è stata eseguita con il metodo di Lowry (Lowry e altri, 1951), modificato. Ad ogni campione sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione costituita da 50 parti di NaCO_3 al 3% in NaOH 0.1N, 1 parte di Sodio Tartrato al 2% e 1 parte di CuSO_4 all'1%. I campioni sono stati lasciati per 10 minuti a temperatura ambiente, poi ad essi sono stati aggiunti $200\mu\text{l}$ di Folin 1M e tenuti altri 10 minuti a temperatura ambiente. Trascorso tale periodo, è stata misurata l'assorbanza dei vari campioni con lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 750 nanometri.

La concentrazione proteica è stata quindi calcolata rapportando l'assorbanza dei campioni a quella di pari quantità di albumina usata come standard.

6.3G CROMATOGRAFIA PER GEL-FILTRAZIONE

I campioni sono stati incubati con cadmio in quantità equimolare allo zinco contenuto e sono stati dializzati in tampone Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 per 16 ore a 4°C utilizzando membrane di taglio 2000 Da.

I campioni incubati con CdCl_2 contenenti 20-30 mg di proteine, sono stati caricati su una colonna di Sephadex G-75 (dimensioni 2,6 x 36 cm), equilibrata con tampone Tris-HCl 20 mM, pH 8,6. Il volume escluso della colonna e il volume

d'eluizione della MT sono stati determinati mediante standardizzazione con Blu Destrano e MT di coniglio (Sigma), rispettivamente. La colonna è stata eluita con tampone Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ad un flusso di 1 ml/min. Sono state raccolte frazioni da 1,3 ml, analizzate per contenuto di rame e cadmio ed assorbanza a 280 nm.

6.4 METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

6.4A ISOLAMENTO DELL'RNA

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente TRI-REAGENT (Sigma Chemical), secondo il metodo messo a punto da Chomczynski e Sacchi (1987). I vari tessuti sono stati omogeneizzati con 1 ml di reagente per 100 mg di tessuto. Il campione è stato agitato, lasciato a temperatura ambiente per 10 min. e centrifugato a 17.000g per 15 min. Dopo la centrifugazione, è stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA, che è stato recuperato mediante precipitazione con isopropanolo. Il campione è stato successivamente centrifugato a 6.700g per 5 min. e il pellet è stato sciolto in H₂O trattata con l'inibitore delle ribonucleasi DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1%. La purezza e la concentrazione dell'RNA sono state verificate sia spettrofotometricamente che mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'analisi elettroforetica è stata effettuata con gel d'agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA), con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 30 min a 50 Volts costanti. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro d'etidio ad una concentrazione finale di 1

mg/ml, che permette di visualizzare l'RNA mediante irraggiamento del gel con luce ultravioletta.

6.4B ANALISI DI NORTHERN BLOT

6.4B1 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO IN CONDIZIONI DENATURANTI

L'RNA totale estratto dai vari tessuti di *P. sicula* (fegato, reni, cervello, ovaio, intestino) è stato frazionato mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio all'1,2%, contenente 2,2 M formaldeide. La corsa elettroforetica è stata condotta a 90 V costanti per 6 ore in tampone MOPS (acido morfolinopropansulfonico 0,02 M, acetato di sodio 5 mM, EDTA 1 mM).

6.4B2 TRASFERIMENTO SU FILTRO DELL'RNA

L'RNA è stato trasferito dal gel di agarosio ad una membrana di nylon caricata positivamente (IMMOBILION-Ny⁺, Millipore) per capillarità per 16 ore. Prima del trasferimento il gel e la membrana sono stati lavati in SSC 20X (soluzione di trasferimento, dove 1X SSC corrisponde a cloruro di sodio 0,15 M e citrato di sodio 0,015 M) per 20 min. Per effettuare il trasferimento, in una vaschetta contenente SSC10X è stata posta una piattaforma di dimensioni superiori a quelle del gel, su cui è stato adagiato un foglio di carta Whatman 3MM, funzionante da ponte, imbevuto di soluzione di trasferimento ed avente le estremità pescanti nel liquido di trasferimento. Al centro del ponte è stato posto il gel e su questo una membrana di nylon,

anch'essa imbevuta di soluzione di trasferimento. Sopra la membrana è stato disposto un sistema costituito da alcuni fogli di carta Whatman 3MM, una pila di fogli di carta da filtro ed infine una lastra di vetro su cui è stato adagiato un peso di circa 1/2 kg.

Al termine del trasferimento, l'RNA è stato fissato sulla membrana mediante esposizione di quest' ultima ai raggi UV per 3-5 minuti. L'avvenuto blotting è stato verificato colorando il filtro con blu di metilene 0.02% in 0.3M NaAc (pH 5.5) fino alla visualizzazione dell'RNA (3-5min). Il filtro è stato poi decolorato con una soluzione SSC 0.2X-SDS 1% per 15min a temperatura ambiente.

6.4C ANALISI DI DOT BLOT

L'analisi è stata condotta mediante l'apparecchio Bio-Dot Microfiltration della BIO-RAD.

La membrana di nylon (IMMOBILION-Ny⁺, Millipore) su cui è fatto aderire l'RNA è stata pretrattata in acqua distillata. L'apparecchio è stato assemblato secondo le istruzioni del manuale.

Immediatamente prima dell'utilizzo, l'RNA totale estratto dai vari tessuti di *P. sicula* (fegato, reni, cervello, ovaio, intestino) è stato denaturato in 500µl di una soluzione NaOH 10mM-EDTA 1mM. I campioni di RNA sono stati caricati nei pozzetti dell'apparecchio ed è stato applicato un leggero vuoto mediante una pompa ad acqua che ha consentito all'RNA di aderire sulla membrana di nylon. I pozzetti sono stati lavati con 500µl della precedente soluzione denaturante ed è stato riapplicato il vuoto. L'apparecchio è stato disassemblato e la membrana è stata

recuperata e trattata secondo le modalità precedentemente descritte per il Northern Blot.

6.4D MARCATURA DELLA SONDA DI CDNA

Il frammento di cDNA codificante la MT (20-25 ng) già disponibile in laboratorio è stato reso radioattivo mediante il metodo della random priming (Sambrook e coll., 1982), utilizzando 20 μ Ci di [α - 32 P]dCTP. Il nucleotide radioattivo non incorporato in eccesso è stato allontanato mediante eluizione su colonnina MicroBiospin P30 (Bio-Rad).

6.4E IBRIDAZIONE

Le membrane, sulle quali è stato immobilizzato l'RNA totale, sono state preibridate utilizzando la soluzione ULTRAhyb (Ambion) a 42°C per 2 ore. L'ibridazione è avvenuta nella stessa soluzione di preibridazione, a cui è stata aggiunta la sonda di cDNA precedentemente marcata e denaturata a 100°C per 5 min., a 42°C per 16 ore. Dopo l'ibridazione le membrane sono state lavate in SSC 0,25X e SDS 0.1% a 50°C, asciugate all'aria ed autoradiografate sia utilizzando lastre autoradiografiche FujiFilm per 16 ore a -80°C,

6.4F ANALISI DENSITOMETRICA

L'analisi quantitativa delle bande di ibridazione è stata effettuata mediante ulteriore autoradiografia con l'apparecchio PhosphorImager (Storm Imaging System, Amersham Pharmacia Biotech) corredato di software Image Quant (Molecular Dynamics). L'integrità e la quantità di RNA totale caricato sono

state determinate mediante colorazione dei filtri con blu di metilene allo 0,04% in 0,5 M sodio acetato pH 5,2 per 10 minuti.

6.4G PRODUZIONE DEI cDNA A SINGOLA ELICA.

I vari cDNA a singola elica sono stati prodotti a partire da 5 µg di RNA totale da tessuto epatico proveniente da diverse specie di rettili Squamati, mediante polimerizzazione con l'enzima Trascrittasi Inversa. L' RNA è stato denaturato alla temperatura di 70°C per 3 min, ed è stato retrotrascritto aggiungendo 10 pmoli di una miscela contenente i deossiribonucleotidi dATP, dGTP, dTTP e dCTP, 20 unità di RNasina (Promega), 200 unità dell'enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e, come primer di innesco per la reazione, 50 pmoli di un oligo(dT)₁₇ fornito di un adattatore costituito da 27 basi: CGGAGATCTCCAATGTGATGGGAAT

TC(T)₁₇ (sintetizzato da Amersham Pharmacia Biotech.).

La reazione è stata condotta a 42°C per 2 ore, successivamente l'enzima è stato inattivato per 5 min a 65°C.

6.4H AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) DEI cDNA PER LA METALLOTIONEINA

Le PCR sono state condotte utilizzando come DNA stampo il cDNA a singola elica ottenuto dalla reazione di trascrizione inversa. Come innesco della reazione sono stati utilizzati un primer non specifico corrispondente all'adattatore descritto sopra troncato della coda di dT, e come primer specifico un

oligonucleotide di 20 basi, disegnato sulla base della sequenza N-terminale della MT di *Podarcis* (Riggio e coll, 2003). La sequenza di tale oligonucleotide è la seguente: 5'-ATGGATCCTTGCGAATGCGCC-3'.

La miscela di reazione delle PCR conteneva: un'aliquota di cDNA a singola elica (0,5 µg), 5U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer), 50 pmoli di ciascuno dei primers sopra citati, 0,2 mM (concentrazione finale) di dNTP in Tris/HCl 10 mM pH8,3 contenente KCl 5 mM e MgCl₂ 2,5 mM. Dopo una denaturazione a 95°C per 3 min, i successivi cicli di PCR erano costituiti nel seguente modo: 95°C per 1 min, 55°C per 1 min, 72 °C per 1 min (30 cicli), seguiti da un ciclo finale di polimerizzazione a 72 °C per 15 min. I cicli di PCR sono stati condotti su un blocco termico programmabile PCR Express Hybaid.

6.4I ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.

I prodotti delle amplificazioni da PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio. L'analisi elettroforetica è stata effettuata con un gel d'agarosio all'1.5% in tampone TAE (Tris-acetato-EDTA), con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 30 min a 100 Volts costanti; come indicatore di peso molecolare è stata usata una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro d'etidio ad una concentrazione finale di 1 µg/ml, che permette di visualizzare i frammenti di DNA mediante irraggiamento del gel con luce ultravioletta. Le

relative bande sono state recuperate dal gel utilizzando il kit Qiaquick (Qiagen).

6.4L PRODUZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE.

Il cDNA proveniente dalle varie PCR è stato inserito nel vettore plasmidico TOPO T-A Vector, già linearizzato, contenuto nel kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Tale vettore determina la resistenza all'antibiotico Ampicillina da parte del batterio ospite; inoltre lega covalentemente l'enzima Topoisomerasi I e presenta la caratteristica di avere alle estremità 3' una T-protrudente, complementare alla A-protrudente presente al 3' del DNA amplificato per PCR. Il cDNA è stato inserito nel plasmide mediante incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.

6.4M TRASFORMAZIONE DI CELLULE BATTERICHE CON IL PLASMIDE RICOMBINANTE

Per la trasformazione delle cellule batteriche da parte del plasmide ricombinante è stato utilizzato lo shock termico che provoca il passaggio del DNA plasmidico attraverso la parete della cellula batterica. Il ceppo di *Escherichia coli* utilizzato è il TOP10F', che garantisce un'alta efficienza di trasformazione. Le cellule che captano il DNA plasmidico crescono su terreno contenente Ampicillina, per la quale il plasmide porta la resistenza.

Due μl della miscela proveniente dalla reazione con l'enzima Topoisomerasi I sono stati aggiunti a 40 μl di cellule competenti ed i campioni sono stati incubati su ghiaccio per 30

minuti. Lo shock termico è stato effettuato mediante incubazione a 42° C per 30 secondi. Al termine di questa reazione ai campioni sono stati aggiunti 250 µl di SOC-medium ed è stata effettuata la crescita delle cellule batteriche a 37° C per 30 minuti. Dopo tale periodo, 100 µl della coltura sono stati piastrati su terreno solido (LB-Agar + Ampicillina 50 µg/ml) e le piastre sono state incubate a 37° C per 16 ore, per permettere la crescita dei batteri ricombinanti.

6.4N PURIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO RICOMBINANTE.

Il DNA plasmidico è stato purificato utilizzando il Qiaprep Plasmid kit (Qiagen) basato sul metodo della lisi con alcali descritto da Sambrook e coll. (1982). Una singola colonia batterica del ceppo opportunamente trasformato con il plasmide contenente il frammento di DNA esogeno è stata inoculata in 5 ml di LB contenente ampicillina 50 µg/ml e fatta crescere a 37°C per 16 ore. La coltura è stata poi centrifugata a 8.000g per 15 min ed il pellet batterico risospeso in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenente EDTA 10 mM. Successivamente la sospensione batterica è stata lisata in condizioni alcaline ed il lisato neutralizzato in un tampone ad elevata concentrazione salina. Il DNA plasmidico è stato quindi adsorbito su una colonnina di gel di silice e separato da RNA, proteine ed altri componenti cellulari. L'eluizione finale è avvenuta mediante Tris 10 mM pH 8,0.

6.40 SEQUENZIAMENTO DEI VARI CDNA

Il frammento di cDNA inserito nel plasmide TOPO T-A Vector è stato sequenziato direttamente nel plasmide ospite, mediante il metodo dei dideossiribonucleotidi messo a punto da Sanger e coll. (1977). 3 µg di DNA plasmidico sono stati denaturati e sequenziati usando il “T₇ Sequencing Kit” (Amersham Pharmacia Biotech), che utilizza come enzima la T₇ DNA polimerasi. Come primer di innesco della reazione sono stati usati due oligonucleotidi complementari ai promotori T₇ ed SP₆, presenti sul plasmide, rispettivamente alle due estremità del frammento inserito, che permettono di far avvenire la reazione di sequenziamento su entrambe le catene del DNA. Per la marcatura del DNA è stato utilizzato ³⁵S-dATP. La miscela è stata caricata su un gel denaturante di acrilammide/urea al 6% (le dimensioni del gel erano di 40 cm di lunghezza e 0,4 mm di spessore) in TBE (Tris-Acido Borico-EDTA). La corsa elettroforetica è stata condotta per 4-6 ore a 50 Watt costanti, utilizzando TBE come tampone di corsa. Il gel, dopo essere stato essiccato, è stato autoradiografato per 24-48 ore.

6.6 METODI DI EVOLUZIONE MOLECOLARE

6.5A ANALISI DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE E AMINOACIDICHE

Le sequenze di MT utilizzate in questo lavoro sono state in parte richiamate dalle banche dati GenBank ed EMBL utilizzando i sistemi di ricerca per similarità FASTA e BLAST. Le sequenze delle MT dei rettili sono state ottenute in laboratorio secondo la procedura descritta, e allineate con i

programmi CLUSTAL X e WebLogo, utilizzando i parametri di default. Il programma WebLogo, disponibile al sito <http://weblogo.berkeley.edu/>, genera una rappresentazione grafica (un “logo”) di un allineamento multiplo, nel quale ogni sito costituisce una colonna: le lettere impilate nella colonna sono i simboli degli aminoacidi presenti in quel sito nell’allineamento, e l’altezza di ciascun simbolo (misurata in bits) indica la conservazione dell’aminoacido lungo l’allineamento, infatti, più è alto il simbolo, più l’aminoacido corrispondente è conservato tra le sequenze allineate (Crook e coll, 2004). I colori con cui sono rappresentati i simboli corrispondenti agli aminoacidi non sono casuali: aminoacidi con le stesse caratteristiche chimico-fisiche (tipo di carica, lunghezza della catena laterale, ecc.) sono indicati con lo stesso colore. Le sequenze amminoacidiche delle 37 MT provenienti da specie diverse di Vertebrati utilizzate per le analisi filogenetiche (vedi tabella 7.2) sono state allineate con il programma CLUSTAL X.

6.5B ANALISI FILOGENETICA

L’analisi filogenetica delle sequenze di MT allineate con CLUSTAL X è stata eseguita applicando il metodo della massima parsimonia implementato nel software PAUP v. 4.0b 10 e il metodo Bayesiano implementato nel software MrBayes v. 3.1. La ricerca degli alberi più parsimoniosi è stata effettuata applicando il metodo euristico, aggiungendo le sequenze in modo random con 10 repliche ed utilizzando l’algoritmo TBR per lo scambio (swapping) dei rami degli alberi.

La topologia bayesiana è stata ottenuta implementando nel programma Mr Bayes un modello evolutivo General Time Reversible (GTR) con velocità di sostituzione lungo i siti regolata da funzione Gamma con un valore stimato del parametro α pari a 1.1. La ricerca è stata condotta facendo procedere due analisi simultaneamente per 400.000 generazioni con campionamenti ogni 100 cicli. A questo punto, il valore della deviazione standard delle frequenze divise (split frequencies) delle due analisi era inferiore a 0.01 ed il fattore di riduzione molto vicino a 1 per tutti i parametri, segno della raggiunta convergenza delle due analisi. Dei 4000 alberi ottenuti, i primi 1000 sono stati eliminati perché ottenuti prima della convergenza (stimata in base al valore della funzione di massima verosimiglianza); i rimanenti 3000 alberi sono stati condensati in un albero consenso mediante il comando *sumt burnin=1000*.

6.5C RICOSTRUZIONE DEL TRACCIATO DEI CARATTERI

Il tracciato dei caratteri è stato riportato sull'albero filogenetico delle specie di vertebrati impiegati nel presente studio utilizzando il software MacClade v. 4.06. L'albero filogenetico delle specie è stato desunto dai dati tassonomici disponibili, basandosi sulla filogenesi dei Vertebrati. La filogenesi dei Rettili è stata ricostruita sulla base delle indicazioni fornite da Zug e collaboratori (2001).

6.5D CALCOLO DELL'INDICE DI IDROPATIA

L'indice medio di idropatia delle MT è stato calcolato sommando l'indice di idrofobicità cambiato di segno dei singoli

residui amminoacidici della sequenza, determinati con il software MacVector, e dividendo tale somma per il numero di residui presenti nella catena.

CAPITOLO 7

RISULTATI

STUDIO EVOLUTIVO DELLA FAMIGLIA DELLE MT IN RETTILI SQUAMATI

7.1 DETERMINAZIONE DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE ED AMINOACIDICHE DELLE MT DI VARI RETTILI SQUAMATI

Frammenti di cDNA codificante la MT sono stati generati dall'RNA totale estratto dal fegato dei Rettili Squamati elencati nella tabella 1, utilizzando come innesco per la reazione di PCR un oligonucleotide specifico, chiamato Pod N-Ter, disegnato sui primi sette amminoacidi della sequenza N-terminale della MT di *Podarcis sicula* già da noi precedentemente isolata e sequenziata (Riggio e coll, 2003).

L'elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% dei prodotti ottenuti dalle reazioni di PCR ha rivelato la presenza di una banda di cDNA avente una dimensione variabile tra 350 e 600 bp per ogni specie di Squamato considerato. Le bande di cDNA estratte dal gel, clonate nel plasmide Topo T-A vector e sequenziate con il metodo dei dideossinucleotidi, corrispondono all'intero messaggero costituito dalla regione codificante la MT e all'estremità non tradotta al 3'. Le sequenze ottenute sono state introdotte nelle banche dati EMBL/GenBank/DDBJ utilizzando il sito www.ebi.ac.uk/Submissions/index.html. Nella tabella 7.1 sono riportati i numeri di accesso assegnati a ciascuna sequenza.

Tabella 7.1

Elenco delle specie, abbreviazioni e numeri di accesso assegnati dall'European Bioinformatics Institute alle sequenze di MT inserite nelle banche dati delle sequenze nucleotidiche.

Specie	Numero di Accesso	Abbreviazione
<i>Anguis fragilis</i>	AM087390	Anguis
<i>Calumma brevicornis</i>	AM087392	Calumma
<i>Chalcides chalcides</i>	AM087391	Chalcides
<i>Elaphe quatorlineata</i>	AM087393	Elaphe
<i>Furcifer pardalis</i>	AM087394	Furcifer
<i>Oplurus quadrimaculatus</i>	AM087395	Oplurus
<i>Paroedura masobe</i>	AM087396	Paroedura
<i>Phelsuma barbouri</i>	AM087397	Phelsuma
<i>Pygolemes braconnieri</i>	AM087398	Pygomeles
<i>Zootoca vivipera</i>	AM087399	Zootoca

In figura 7.1 è riportato l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle MT di Rettili. Tutte le sequenze presentano una regione codificante di 189 paia di basi abbastanza conservata e le regioni 3' non tradotte (3'-UTR) molto più variabili, sia per lunghezza che per composizione nucleotidica. In particolare, le regioni 3'-UTR delle MT dei due Scincidi considerati, *C. chalcides* e *P. braconnieri* (rappresentati in fig. 7.1 in rosso), hanno una lunghezza (circa 360 nucleotidi) pari al doppio di quella delle regioni 3'-UTR delle MT di tutti gli altri rettili.

1 60
Calumma ATGGATCCTCAGGACTGCGGCTGCGCCACAGGTGGCTCTTTGTTTCATGTGCCGGCTCCTGT
Furcifer ATGGATCCTCAGGACTGCGGATGTGCCACAGGTGGTCTTTGTTTCATGTGCCGGCTCCTGT
Anguis ATGGATCCTCAGGACTGCGACTGCGCGCGCGGTGGTCTTTGTTTCATGTGCCGGTTCCTGC
Paroedura ATGGATCCTCAGGACTGCCCTGTGTACCGGTGGTCTTTGTTAGCTGTGTGGTTCTCTGC
Phelsuma ATGGATCCTCAGGACTGCCCATGCGCTACTGGTGGTACTTGTAGCTGCGCTGGTTCTCTGC
Chalcides ATGGATCCTCAGGACTGCTCCTGCAACACCGGTGGCACTTGCACCTGTGTGGATCCTGTC
Pygomeles ATGGATCCTCAGGACTGCTCCTGCAACACCGGTGGTCTTTGTCAGCTGTGTGGATCCTGTC
Oplurus ATGGATCCTCAGGACTGCGCTGCGCCGCGGTGGTCTCTGCTCCTGTGTGGATCCTGTC
Podarcis ATGGATCCTCAGGACTGCGCTGCGCCACTGGTGGTCTTTGTACCTGTGCCGGCTCCTGC
Zootoca ATGGATCCTCAGGACTGCGCTGCGCCACTGGTGGTCTTTGTCCCTGTGCCGGCTCCTGC
Bothrops ATGGATCCCAGAATTGCGACTGCGCCACCGGTGGTCTTTGTCTCATGCGATGGATCCTGTC
Elaphe ATGGATCCTCAGGACTGCGGCTGTGCCACTGGCAGCTCTTCTCTCTGTAATGGATCCTGTC
***** ** * **** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

61 120
Calumma AAATGCAAAAATTGCAAGTGTACCTCATGCAAAAAAGCTGCTGTTCTTGTGCCCTGCC
Furcifer AAATGCAAAAATTGCAAGTGTACCTCATGCAAGAAAAGCTGCTGTTCTTGTGCCCTGCC
Anguis AAATGCAAAAATTGCAAAATGTACCTCGTGTAAAAAAGCTGCTGTTCTTGTGCCCAGCG
Paroedura AAATGCAAGAATTGCAAAATGTACTTCTTCCGCAAAAAAGCTGCTGTTCTTGTGCCATCT
Phelsuma AAATGCAAAAATTGCAAGTGTACTTCTTCCGCAAAAAAGCTGCTGTTCTTGTGCCAGCT
Chalcides AAATGCAAAAATTGCAAGTGTACCTCTTGTAAAAAAGCTGCTGTTCTTGTGCCCAGCC
Pygomeles AAGTGCAAAAATTGCAAGTGTACATCTTGTAAAAAAGCTGCTGCTCCTGTTGCCCAGCT
Oplurus AAATGCAAGGACTGCAAGTGCACCTCCTGCAGAAAAAGCTGCTGCTCCTGTTGCCCGGT
Podarcis AAATGCAAAAATTGCAAAATGCACCTTTCATGCAAAAAAAGCTGCTGCTCCTGTTGCCCAGCT
Zootoca AAATGCAAAAATTGCAAAATGCACCTTTCATGCAAAAAAAGCTGCTGCTCCTGTTGCCCAGCT
Bothrops AAATGCAAAAATTGCAAGTGTACTTCTGTGTAAAAAAGCTGCTGCTCCTGTTGCCCAGCC
Elaphe AAATGCAAAAATTGCAAAATGTACTTCTGTGCAAAAAAAGCTGCTGTTCTGTTGCCCGCC
** ***** * ***** ** ** ** * ** ***** ***** ** ** ***** *

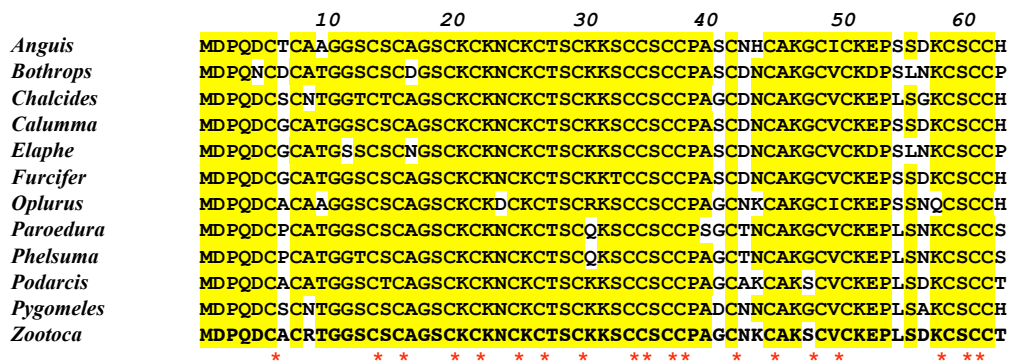
121 180
Calumma AGCTGCGATAACTGCGCTAAAGGTTGCGTCTGCAAAAGGCCATCATCCGACAAATGCAGC
Furcifer AGCTGCGACAACTGCGCTAAAGGTTGCGTCTGCAAAAGGCCATCATCCGACAAATGCAGC
Anguis AGCTGCAACCACTGTGCCAAGGGCTGCATCTGCAAAAGGCCCTTCTTGATAAATGCAGC
Paroedura GGCTGCACCAACTGTGCCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGAACCTCTGTCAAACAAAGTGTAGC
Phelsuma GGCTGCACCAATTTGCCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGGCCACTGTGCAATAAAGTGCAGC
Chalcides GGCTGCGCAAAATTTGCCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGGCCCTTATCGGGCAAGTGCAGT
Pygomeles GACTGCAACAATTTGCCCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGGCCCTTTTCAGCCAAGTGCAGC
Oplurus GGTGCAACAAGTGTGCCAAGGGATGCATCTGCAAAAGAACCTGCTCAAATCAGTGCAGC
Podarcis GGATGCGCAAAATTTGCCAAGAGTTGTGTCTGCAAAAGGCCACTGTGCAATAAATGCAGC
Zootoca GGATGCAACAATTTGCCAAGAGTTGTGTCTGCAAAAGGCCACTGTGCGATAAATGCAGC
Bothrops AGCTGTGACAACCTGTGCCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGGCCCTTCTTGACAATAATGCAGC
Elaphe AGCTGTGACAACCTGCGCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGATCCTTCCCTGACAATAATGCAGC
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

181 240
Calumma TGTGTCACATAAAA-TGGATGTTTCCCTTTTTTTCCCTCTGTAAATA-TTCTGTATGAT
Furcifer TGTGTCACATAAAAATGGATCTTTTCCCTTCC--CCCCCTGTAAATA-TTCTGTATAAT
Anguis TGTGTCACATAAAAATGGATGCTTTTCCCTTCC-----CTCTGTAAATA-TTCTGTATGA
Paroedura TGTGTCACATAAAAATGCACCGCTTTGTT-----CCTGTAAATAATTTCTGTATGG-
Phelsuma TGTGTCACATAAAAATGCACCGTTTGGGT-----CCTGTAAATA-TTCTGTATGG-
Chalcides TGTGTCACATAAAT-TGTAGCTTTTTCTCAT-----CTCTGTAAATG-CACGATGTGAT
Pygomeles TGTGTCACATAAAT-CATAGCTTTTCCCAT-----CTCTGTAAAT--ACAATG-AT
Oplurus TGTGTCACATAAAA-TGGACAGTTTATT-----CTCTGTAAATTTTGTAGGATGA-
Podarcis TGCTGCACCTAAAATGCGCTTTGAG-----AAAAAGGAGACAATTTTCC
Zootoca TGCTGCACCTAAAATGCGCTTTGA-----AAAAAGGAGACAATTTTCC
Bothrops TGCTGCCCCGTAACCCCTCGGCACCTTTTTTCTGTGTAACCTANGTTAAATCTGTGTGC-
Elaphe TGCTGCCCCGTAACCCACCTGGCCACTTCTTTTTGTATTATGTTAAATCTGTATGTC-
** ** * ** *

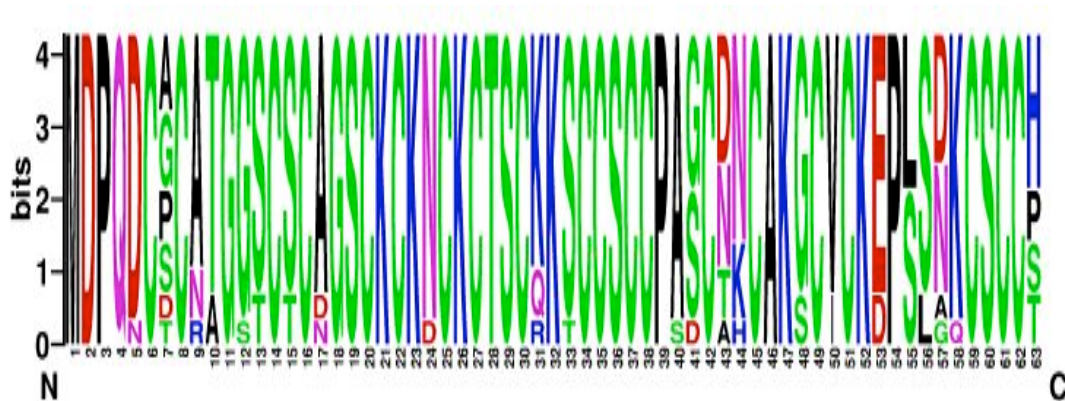
241 300
Calumma TTTTAAAAGATCAACTTTCCGAACACAATGC-ATAAATTGTAGCTCCCCC-CCCCATA
Furcifer TTTTAAAAG-TCAACTTTCCAAACGCAATGC-ATAAATTGTAGCTCCTTTTTCCCCATA
Anguis --GCAAGA--CAATTTTTCAGAACACAGTGG-ATGTGTTGTAACAGTTTTT--TTCATG
Paroedura -TCCAAAACGTTAATGCTTTGACCACAATGA-GTATTTTGTAGCAGTTTTGCATGTGGG
Phelsuma -TCAAAAAGATGAGTG-TTCGACCACAATGA-GTGTGTTGTAAGTTTTGCATGTGGG
Chalcides TTTTTTTTT--TAAAAAGAGAACAATGA-ATATTTTGTAAATCGTTTCA--TGCCGAT
Pygomeles GCTTAAAAA--AAAAATTCAGAACACAATGA-ATATTTTGTAAATAGTTTCA--TGCTGAT
Oplurus ---AAAAGTATTATTTTTTTCAGAACAGAAGAA-AGAATATTTGTACCTTTA-----AAA
Podarcis TATTTTGTAAATGCTCTTTTCATACAGATAAA-AG-AAGAAAAATGTTTTCA-----
Zootoca TATTTTGTAAATGCTCTTTTCATACAGATAAA-AGGAAGAAAAATGTTTTCA-----
Bothrops -TGTAATA-TGATTTTTCAGGCTACAGCAATGCGTGTATCATTGTTCT-----A
Elaphe -AGTAAATAATGATTTTTTCAGGCTACAGCAATGTTGCTTGTGTTTTTTTTAAAAAA
*

	301		360
<i>Calumma</i>	C-----AGATGAACGGGAAATAAAATGTT--GATCTCAG-----		
<i>Furcifer</i>	G-----ACATGAACGGGAAATAAAATGTT--GATCTCAGAGAGAGA-----		
<i>Anguis</i>	C-----A-GTGAAGGAAATAAAAGTTATGACTT-----		
<i>Paroedura</i>	G-----GGAGGGAGAGAAAATAAAAGCTGTGATGTAACAGG-----		
<i>Phelsuma</i>	GCTGTGGGGAGATAAGGAAAATAAAAGCTGTGATTT-----		
<i>Chalcides</i>	GA---AAGGCAGCGTCTGTGATTGAACGCTAT-ATATTTTCCTTTGGACATGTTGGGTGT		
<i>Pygomeles</i>	GA---AAGGCAGCGTCTGTGATTGAATGCTCTTATATTTTCCTTTGGACATGTTGGGCTT		
<i>Oplurus</i>	AT----GCAGATAAAAAATAAAATATGTTTCCTATAT-----		
<i>Podarcis</i>	-----GAAAAATAAAAGTATTTTAACTTG-----		
<i>Zootoca</i>	-----GAAAAATAAAAGTATTTTAACTTG-----		
<i>Bothrops</i>	GCT---GGAGAGCATGAAAAATAAA-----		
<i>Elaphe</i>	GCC---TGAGAGCATGAAAAATAAAAGCTGACTTCAGTCAAACGC-----		
	361		420
<i>Calumma</i>	-----		
<i>Furcifer</i>	-----		
<i>Anguis</i>	-----		
<i>Paroedura</i>	-----		
<i>Phelsuma</i>	-----		
<i>Chalcides</i>	ATAAAAAATTATGGAAAACCTTAACATGTATTGTTGATGTGCACTCTGCTGGAGGGTTGGAA		
<i>Pygomeles</i>	CTAAAAATGGTGGAAAATTGAACATGTATTGTTGATGTGTGCT--ACTGGAAGGCTGTAA		
<i>Oplurus</i>	-----		
<i>Podarcis</i>	-----		
<i>Zootoca</i>	-----		
<i>Bothrops</i>	-----		
<i>Elaphe</i>	-----		
	421		460
<i>Calumma</i>	-----		
<i>Furcifer</i>	-----		
<i>Anguis</i>	-----		
<i>Paroedura</i>	-----		
<i>Phelsuma</i>	-----		
<i>Chalcides</i>	TGAGAATCTGCAAGGGGCTTCAGTGAATGGCTTGGGTGAAATCGTTCGGGGTTCAGCT		
<i>Pygomeles</i>	TGAGAATCTACAAGGGGCT-----GGCTTCGGTGGGATGACTCCTTCGGAGTTCAACT		
<i>Oplurus</i>	-----		
<i>Podarcis</i>	-----		
<i>Zootoca</i>	-----		
<i>Bothrops</i>	-----		
<i>Elaphe</i>	-----		
	461		520
<i>Calumma</i>	-----		
<i>Furcifer</i>	-----		
<i>Anguis</i>	-----		
<i>Paroedura</i>	-----		
<i>Phelsuma</i>	-----		
<i>Chalcides</i>	CCCATGCAATAAAATCTGGGTACATGTAATGCTGCTGTTTCAGGCTTTCACGATCACAGC		
<i>Pygomeles</i>	ACCCCAAAATAAGATCTGGGTACATGTAGCGTTGCTGTTTCAGGCTTTCACGATCACAGC		
<i>Oplurus</i>	-----		
<i>Podarcis</i>	-----		
<i>Zootoca</i>	-----		
<i>Bothrops</i>	-----		
<i>Elaphe</i>	-----		
	521	555	
<i>Calumma</i>	-----		
<i>Furcifer</i>	-----		
<i>Anguis</i>	-----		
<i>Paroedura</i>	-----		
<i>Phelsuma</i>	-----		
<i>Chalcides</i>	ATGTCATTTT--GGATTAAGCAACTTGAGCTCC		
<i>Pygomeles</i>	ATGTCGTGTTTTTGGATTAAGCAACTTGAGCTAC		
<i>Oplurus</i>	-----		
<i>Podarcis</i>	-----		
<i>Zootoca</i>	-----		
<i>Bothrops</i>	-----		
<i>Elaphe</i>	-----		

Fig. 7.1 Allineamento delle sequenze di MT dei Rettili riportati in Tab. 7.1. e da *P. sicula* (Riggio e coll, 2003) e *B. insularis* (EMBL). Gli asterischi indicano i residui conservati; il box giallo indica il codone di terminazione; le sequenze in blu indicano le specie appartenenti alla famiglia degli Scincidi.



a



b

Fig. 7.2 Allineamento delle sequenze aminoacidiche delle MT dei Rettili. Oltre alle MT dei Rettili riportati in Tabella 7.1, sono state analizzate le sequenze dell'MT di *Podarcis* (Riggio e coll, 2003) e di *Bothrops* (disponibile in Banca Dati). **a)** Allineamento ottenuto mediante il programma Clustal-X; in giallo sono evidenziati i residui conservati. **b)** Allineamento ottenuto mediante il programma WebLogo. I colori dei caratteri si riferiscono alle caratteristiche chimico-fisiche che contraddistinguono ciascun aminoacido.

Le sequenze delle MT di Rettili sono state ricavate dalle sequenze nucleotidiche; gli aminoacidi sono indicati con lettere maiuscole, secondo la nomenclatura convenzionale utilizzata in biochimica (Berg e coll, 2003). L'allineamento delle sequenze amminoacidiche (fig. 7.2) mostra come tutti i residui cisteinici (C, indicati con un asterisco in figura 7.2a), responsabili del legame con il metallo, sono conservati, mentre si notano differenze a carico dell'aminoacido lisina (K) in posizione 31, 44

e 58. La lisina è un aminoacido particolarmente importante per la metallotioneina, in quanto partecipa alla stabilizzazione del legame del metallo ai gruppi SH delle cisteine (Parente e coll., 1985). Si evidenziano, inoltre, anche differenze nella presenza di residui aminoacidici, quali istidina (H) e arginina (R), tipici delle MT di Uccelli, ma assenti in quelle di Osteitti e Mammiferi. La rappresentazione dell'allineamento ottenuto mediante il programma WebLogo (fig. 7.2b, cfr. Metodi) dà immediatamente un'idea della frequenza con cui nelle sequenze analizzate il residuo è presente in un determinato sito. Nell'immagine rappresentata le dimensioni del carattere sono proporzionali alla frequenza stessa: laddove vi è un solo carattere, vuol dire che l'aminoacido è conservato in quel determinato sito. Per tutte le sequenze considerate, dove ad un determinato sito vi sono più caratteri, l'altezza di ciascun carattere indica quante volte esso è conservato nelle sequenze.

7.2 RICERCA DELLE ISOFORME DI MT

Il clonaggio dei frammenti di cDNA ha mostrato la presenza, in tutti i casi, di una sola forma di MT, in accordo con quanto già visto in *P. sicula* (Riggio e coll., 2003) e *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2003). Poiché è noto che per le MT dei Vertebrati è comune la presenza di più isoforme sono stati approntati esperimenti tendenti a chiarire se nei Rettili ci fosse effettivamente una sola forma di MT, o se ci fossero altre isoforme, magari meno rappresentate. Per ciascun Rettile esaminato, sono stati sequenziati un numero cospicuo di cloni (15-20), ottenendo in tutti i casi sempre la stessa sequenza.

Poiché la costruzione di librerie di cDNA portano ad un'amplificazione degli RNA messaggeri, con maggiore possibilità di evidenziare, nei successivi cicli di PCR, la presenza di trascritti rari, sono state effettuate reazioni di PCR a partire da una libreria di cDNA costruita dal fegato della lucertola *Podarcis sicula*, fornita dalla Dott.ssa Riggio (dati non pubblicati). Anche in questo caso il frammento di cDNA ottenuto corrispondeva sempre alla stessa forma di MT già sequenziata in precedenza.

7.2A RICERCA DI ISOFORME TESSUTO-SPECIFICHE

Poiché nei Vertebrati è comune la presenza di isoforme di MT tessuto-specifiche (Scudiero e coll, 2000), sono stati amplificati e clonati frammenti di cDNA per la MT ottenuti dall'RNA totale estratto da differenti tessuti di *P. sicula* (ovaio, rene, cervello e fegato) secondo le modalità descritte nei materiali e metodi. Anche in questo caso, il sequenziamento di svariati cloni per ciascun tessuto evidenzia sempre la presenza di un'unica forma di MT.

7.2B RICERCA DI ISOFORME INDOTTE DA METALLO

Sono stati effettuati esperimenti per verificare se, in *P. sicula*, potessero esserci, come evidenziato in molti Invertebrati e Vertebrati (Carginale e coll, 1998), isoforme di MT indotte da cadmio. Innanzitutto si è proceduto a determinare se, in questo organismo, il cadmio potesse indurre la sintesi e l'espressione della MT. Esemplari di *Podarcis* sono stati trattati con un'unica iniezione per via sottocutanea di una soluzione di CdCl₂, come

descritto nei Metodi; successivamente i tessuti epatici e ovarici di animali controllo e trattati sono stati utilizzati mediante analisi di cromatografia per gel filtrazione e analisi di Northern Blot.

7.2C GEL FILTRAZIONE.

Gli estratti ottenuti (cfr. Metodi), dopo precipitazione con solventi organici, sono stati incubati con CdCl_2 al fine di sostituire il cadmio allo zinco complessato con le proteine. Tale sostituzione è stata effettuata per rendere più sensibile la determinazione del contenuto di metallo mediante lo spettrofotometro ad assorbimento atomico. Gli estratti sono stati dializzati per allontanare il metallo non legato, e infine sono stati frazionati per cromatografia di permeazione molecolare su colonna di Sephadex G-75. Sulle frazioni raccolte è stata misurata l'assorbanza e il contenuto di cadmio e rame. La determinazione del contenuto di rame è stata necessaria per avere un quadro completo delle MT presenti negli estratti, in quanto l'incubazione con il cadmio allontana lo zinco dalle MT, ma non il rame, che ha una maggiore costante di affinità per i gruppi tiolici delle MT (Toriumi e coll, 2005). I profili di eluizione ottenuti con gli estratti epatici di animali controllo (fig. 7.3a) e trattati con cadmio (fig. 7.3b), mostrano l'assorbanza a 280 nm (in blu) e il contenuto di cadmio (in rosso) e rame (in verde). E' possibile osservare che, in entrambi i casi, i due metalli coeluiscono sotto forma di due picchi: il picco I (frazioni 16-26) e il picco II (frazioni 32-44). Il picco I eluisce con proteine di elevato peso molecolare, il picco II

eluisce nella zona in cui eluisce la MT di mammifero utilizzata come standard (cfr. Metodi).

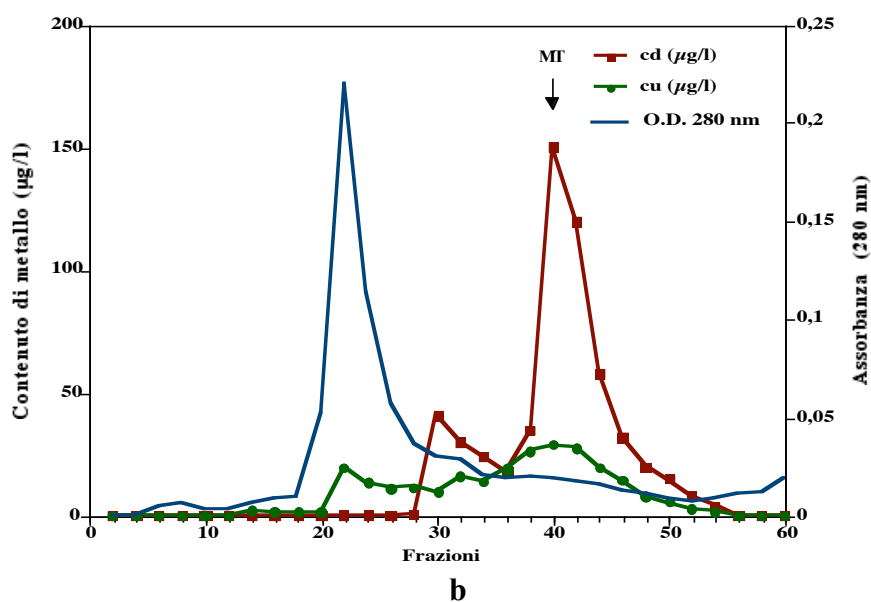
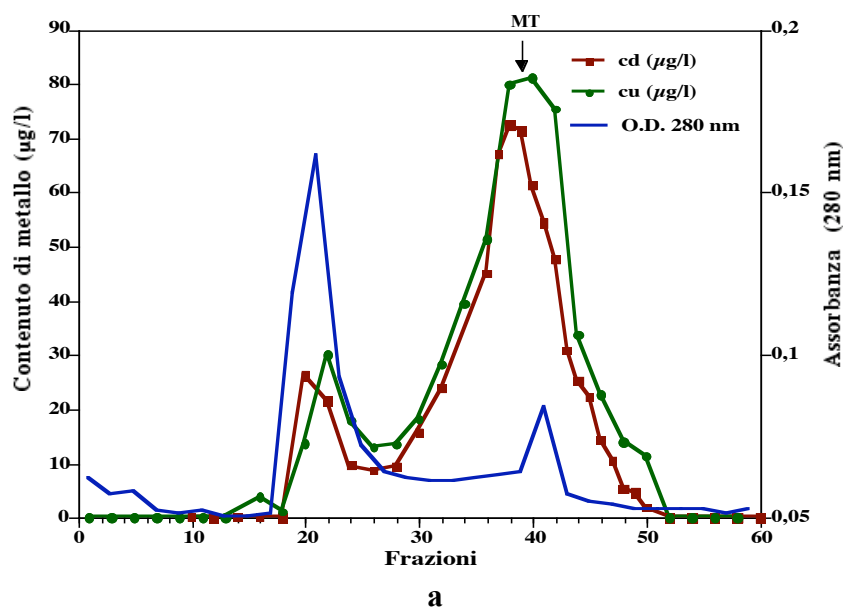


Fig 7.3 Profili di eluizione di due colonne di Sephadex-G75 da estratti epatici, provenienti da animali trattati (a) e non trattati (b), precipitati con solventi organici ed incubati con CdCl₂, come descritto nei Metodi.

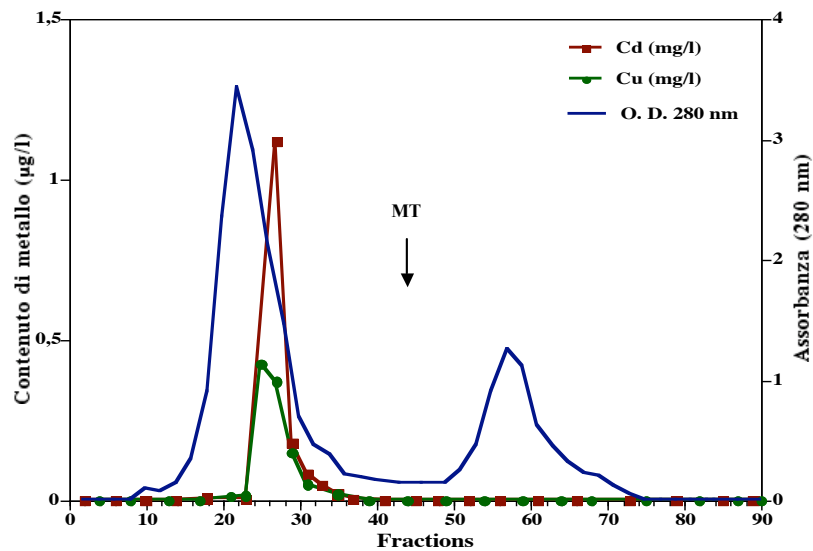
Bisogna notare che il notevole incremento del picco dell'MT è dovuto all'esposizione degli animali al cadmio. Infatti, la quantità di cadmio rivelabile nel picco II degli estratti

provenienti da animali trattati (fig. 7.3b) è circa il doppio di quella presente nel picco II degli estratti provenienti da animali controllo (fig. 7.3a). Nel fegato, in cui la MT è costitutivamente presente, il contenuto della proteina aumenta sensibilmente dopo il trattamento con il cadmio.

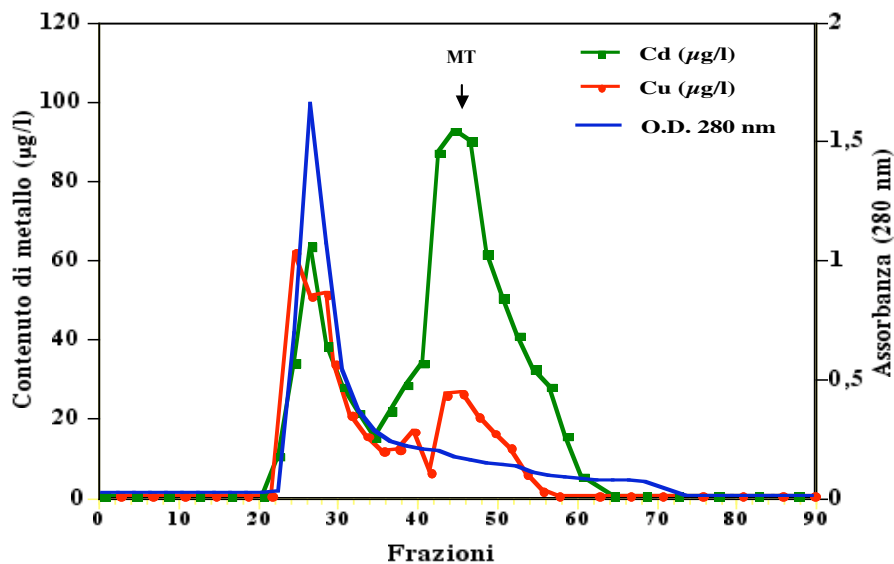
La figura 7.4a mostra il profilo di eluizione di una colonna caricata con un estratto ovarico di animale non trattato.

E' possibile osservare che il cadmio (colore rosso) eluisce solo con proteine di elevato peso molecolare (picco I), mentre è assente nella zone di eluizione della MT, indicando che nella gonade questa proteina è assente. Il profilo di eluizione ottenuto da estratti ovarici provenienti da animali trattati con cadmio (fig. 7.4b) mostra, a differenza di quanto avveniva per la cromatografia relativa agli animali non trattati, che il cadmio eluisce sotto forma di due picchi. Il cadmio associato al picco I, negli estratti epatici, eluisce con proteine di elevato peso molecolare, quello associato al picco II in prossimità della regione in cui eluisce la MT.

Questi risultati indicano che nell'ovaio, in cui la MT è assente in condizioni fisiologiche, la sintesi della proteina è indotta dalla presenza del cadmio, dimostrando così il forte potere induttivo del metallo.



a



b

Fig. 7.4 Profili di eluizione di due colonne Sephadex G-75 da estratti di follicoli previtellogeni, provenienti da animali trattati (a) e non trattati (b), precipitati con solventi e trattati con CdCl_2 , come descritto nei Metodi.

7.2D NORTHERN BLOT.

Allo scopo di analizzare le variazioni dell'espressione genica dell'RNA messaggero codificante l'MT in funzione dell'esposizione al cadmio, sono stati condotti esperimenti di ibridazione su Northern blot di RNA totale estratto da fegato e da ovaio di esemplari di *Podarcis* tenuti in condizioni normali o trattati con cadmio.

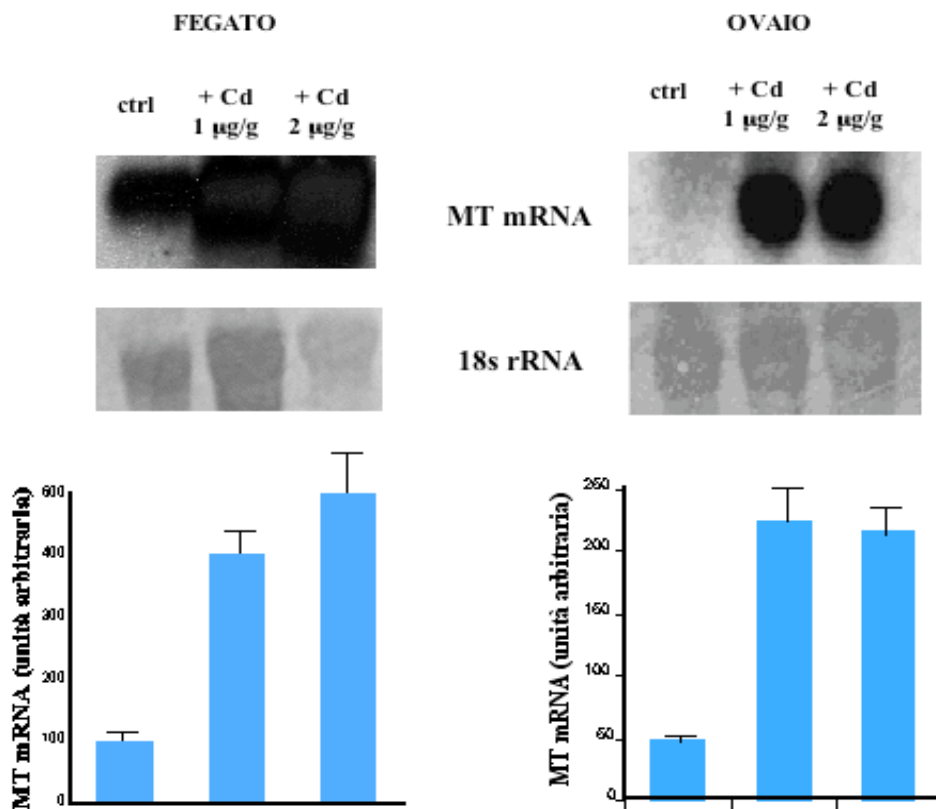


Fig. 7.5 Espressione genica della MT in seguito al trattamento con cadmio in fegato e ovaio di *P. sicula*. Il pannello superiore mostra l'RNA ibridato con la sonda per l'MT; il pannello centrale mostra l'integrità e la quantità dell'RNA caricato su filtro mediante colorazione dell'RNA ribosomale; il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica condotta sulle bande di ibridazione. I dettagli sono descritti nei Metodi.

Per ogni tessuto sono stati utilizzati uguali quantità di RNA, usando come sonda per l'ibridazione un frammento di cDNA di 250 bp corrispondente ad un tratto della regione codificante e all'intera regione 3' non tradotta della MT della specie in esame, come descritto nei metodi. I risultati riportati in figura 7.5 mostrano che la quantità di messaggero per la MT, già costitutivamente cospicua nei due organi esaminati, aumenta significativamente sia nel fegato che nell'ovaio di animali trattati.

Il metallo, dunque, in *P. sicula* attiva la sintesi dell'MT mediante due diversi meccanismi: 1) a livello trascrizionale,

attivando i promotori del gene; 2) a livello post-trascrizionale, attivando la traduzione del messaggero anche nelle cellule in cui non è costitutivamente tradotto.

7.2E Sequenziamento di MT-cDNA proveniente da animali trattati.

Avendo dimostrato che il cadmio effettivamente può indurre l'espressione della MT, sono state condotte reazioni di RT-PCR a partire da RNA totale estratto da fegato o da gonade di animali trattati con cadmio, allo scopo di identificare eventuali isoforme di MT indotte da cadmio. Il sequenziamento di numerosi cloni (oltre 20 per ciascun tessuto) ottenuti dal frammento di cDNA ha dato come risultato sempre la stessa sequenza per l'MT.

7.4 STUDIO EVOLUTIVO DELLE MT NEI RETTILI SQUAMATI

Per condurre l'analisi filogenetica delle MT nei Vertebrati, oltre alle sequenze di MT dei Rettili (in rosso), sono state aggiunte al "data set" 12 sequenze rappresentative delle MT di Mammiferi (in rosa), 4 sequenze disponibili degli Uccelli (in blu), 2 disponibili degli Anfibi (in verde) e 7 rappresentative delle MT degli Osteitti (in azzurro) (tabella 7.2). L'allineamento delle 37 sequenze così ottenute è mostrato in figura 7.6.

	10	20	30	40	50	60	
Anguis	MDPQDCTCAA	GGSCSCAGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	SCNHCAKGCI	CKEPSSDRCS	CCH
Bothrops	MDPQNCDCAT	GGSCSCDGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	SCDNCAKGCV	CKDPSLNKCS	CCP
Calcidetes	MDPQDCSCNT	GGTCTCAGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	GCDNCAKGCV	CKEPLSGRCS	CCH
Calumma	MDPQDCGCAT	GGSCSCAGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	SCDNCAKGCV	CKEPSSDKCS	CCH
Elaphe	MDPQDCGCAT	GGSCSCNGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	SCDNCAKGCV	CKDPSLNKCS	CCP
Furcifer	MDPQDCGCAT	GGSCSCAGSC	KCKNCKCTSC	KKTCCSCCPA	SCDNCAKGCV	CKEPSSDRCS	CCH
Oplurus	MDPQDCACAA	GGSCSCAGSC	KCKDCKCTSC	RKSCCSCCPA	GCNKCAKGCI	CKEPSSNQCS	CCH
Paroedura	MDPQDCPCAT	GGSCSCAGSC	KCKNCKCTSC	QKSCCSCCPS	GCTNCAKGCV	CKEPLSNRCS	CCS
Phelsuma	MDPQDCPCAT	GGTCTCAGSC	KCKNCKCTSC	QKSCCSCCPA	GCTNCAKGCV	CKEPLSNRCS	CCS
Podarcis	MDPQDCACAT	GGSCTCAGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	GCAKCAKSCV	CKEPLSDKCS	CCT
Pygomeles	MDPQDCSCNT	GGSCSCAGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	DCNNCAKGCV	CKEPLSARCS	CCH
Zootoca	MDPQDCACRT	GGSCSCAGSC	KCKNCKCTSC	KKSCCSCCPA	GCNKCAKSCV	CKEPLSDRCS	CCT
Gallus	MDPQDCTCAA	GDSCSCAGSC	KCKNCRCRSC	RKSCCSCCPA	GCNNCAKGCV	CKEPASSKCS	CCH
Anas	MDPQDCTCAA	GDSCSCAGSC	KCKNCRCRSC	RKSCCSCCPA	GCNNCAKGCV	CKEPASSKCS	CCH
Cairina	MDPQDCTCAA	GDSCSCAGSC	KCKNCRCRSC	RKSCCSCCPA	GCNNCAKGCV	CKEPASSKCS	CCH
Meleagris	MDPQDCTCAA	GDSCSCAGSC	KCKNCRCRSC	RKSCCSCCPA	GCNNCAKGCV	CKEPASSKCS	CCH
MusMT-1	MDP-NCSCST	GGSTCTTSSC	ACKNCKCTSC	KKSCCSCCPV	GCSKCAQGCV	CKGAA-DRCT	CCA
MusMT-2	MDP-NCSCAS	DGSCSCAGAC	KCKQCKCTSC	KKSCCSCCPV	GCAKCSQGC	CKEAS-DRCS	CCA
RattusMT-1	MDP-NCSCST	GGSTCTSSC	GCKNCKCTSC	KKSCCSCCPV	GCSKCAQGCV	CKGAS-DRCT	CCA
RattusMT-2	MDP-NCSCAT	DGSCSCAGSC	KCKQCKCTSC	KKSCCSCCPV	GCAKCSQGC	CKEAS-DRCS	CCA
OvisMT-1	MDP-NCSCPT	GGSCSCAGSC	TCKACRCPSC	KKSCCSCCPV	GCAKCAQGCV	CKGAS-DRCS	CCA
OvisMT-2	MDP-NCSCPTA	GESCTCAGSC	KCKDCKCASC	KKSCCSCCPV	GCAKCAQGCV	CKGAS-DRCS	CCA
Cricetulus	MDP-NCSCST	GSTCTCSSC	GCKDCKCTSC	KKSCCSCCPV	GCSKCAQGCV	CKGAS-DRCT	CCA
Cricetulu	MDP-NCSCAT	DGSCSCAGSC	KCKECKCTTC	KKSCCSCCPV	GCAKCSQGC	CKEAS-DRCS	CCA
HomoMT-1	MDP-NCSCAT	GGSCSCAGSC	KCKECKCTSC	KKSCCSCCPM	GCAKCAQGCV	CKGAS-ERCS	CCA
HomoMT-2	MDP-NCSCAA	GDSCTCAGSC	KCKECKCTSC	KKSCCSCCPV	GCAKCAQGC	CKGAS-DRCS	CCA
CanisMT-1	MDP-DCSCST	GGSTCTCAGSC	KCKECKCTSC	KKSCCSCCPV	GCAKCAQGC	CKGAS-DRCS	CCA
CanisMT-2	MDP-NCSCAA	GGSTCTCAGSC	KCKECKCTSC	KKSCCSCCPV	GCAKCAQGC	CKGAS-DRCS	CCA
CaceratMTI	MDP--CECSK	SGNCCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CIGKT-CDTS	CCQ
ChamatMTI	MDP--CDCSK	SGTCNCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CKGKT-CDTS	CCQ
CrastMTI	MDP--CECSK	SGTCNCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CKGKT-CDTS	CCQ
GacutiMTI	MDP--CDCSK	SGTCNCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CKGKT-CDTS	CCQ
PborgheMTI	MDP--CDCSK	SGTCNCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CKGKT-CDTS	CCQ
PcharMTI	MDP--CECSK	SGNCCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CKGKT-CDTS	CCQ
TbernMTI	MDP--CECSK	SGTCNCGGSC	TCTNCSCKSC	KKSCCPCCPS	GCTKASGCV	CKGKT-CDTS	CCQ
Ambystoma	M--DCACAT	GGSCSCAGSC	KCENCKCTSC	KKSCCSCCPS	ECEKCGQGC	CKGGSSEKCS	CCN
Xenopus	MDPQDCKCET	GASCSCGTTC	SCSNCKCTSC	KKSCCSCCPA	ECSKCSQGC	CEKGS-KKCS	CCN
		* * *	* * *	* * * *	* * * * *	* * * *	**

Fig.7.6 Allineamento aminoacidico di tutte le MT utilizzate nel presente studio evolutivo. Gli asterischi indicano gli aminoacidi conservati. In giallo è evidenziato l'aminoacido in posizione 63.

7.3A ANALISI FILOGENETICA

L'evoluzione delle MT è stata ricostruita utilizzando il metodo della massima parsimonia ed il metodo Bayesiano. Nelle figure 7.7 e 7.8, sono riportati gli alberi inferiti con questi due metodi. Come si può osservare, i due alberi sono sostanzialmente simili quando l'indice di consenso della massima parsimonia ed il valore della probabilità posteriore del metodo Bayesiano sono ambedue alti. Le maggiori divergenze tra i due metodi si hanno quando gli indici differiscono tra loro in modo significativo.

Tabella 7.2
Specie, numeri di accesso e nomi abbreviati delle sequenze utilizzate nelle analisi filogenetiche.

Specie	Numero di accesso	Abbreviazione
<i>Anguis fragilis</i>	AM087390	Anguis
<i>Bothrops insularis</i>	BM401839	Bothrops
<i>Chalcides chalcides</i>	AM087392	Chalcides
<i>Calumma brevicornis</i>	AM087391	Calumma
<i>Elaphe quatorlineata</i>	AM087393	Elaphe
<i>Furcifer pardalis</i>	AM087394	Furcifer
<i>Oplurus quadrimaculatus</i>	AM087395	Oplurus
<i>Paroedura masobe</i>	AM087396	Paroedura
<i>Phelsuma barbouri</i>	AM087397	Phelsuma
<i>Pygolemes braconnieri</i>	AM087398	Pygomeles
<i>Podarcis sicula</i>	AJ609541	Podarcis
<i>Zootoca vivipera</i>	AM087399	Zootoca
<i>Gallus gallus</i>	NM205275	Gallus
<i>Anas platyrhincos</i>	U34231	Anas
<i>Cairina moschata</i>	U34230	Cairina
<i>Meleagris gallopavo</i>	AF321983	Meleagris
<i>Mus musculus</i>	DV075710	MusMT1
<i>Mus musculus</i>	DV075733	MusMT2
<i>Rattus norvegicus</i>	NM012589	RatMT1
<i>Rattus norvegicus</i>	M11794	RatMT2
<i>Ovis aries</i>	X00953	OvisMT1
<i>Ovis aries</i>	X07975	OvisMT2
<i>Cricetulus griseus</i>	D10551	Cricetulus
<i>Cricetulus griseus</i>	M11265	Cricetulus
<i>Homo sapiens</i>	NM176870R	HomoMT1
<i>Homo sapiens</i>	D2844	HomoMT2
<i>Canis familiaris</i>	NM001003173	CanisMT1
<i>Canis familiaris</i>	NM001003149	CanisMT2
<i>Chaenocephalus aceratus</i>	Z72483	C aceratusMTI
<i>Chionodraco hamatus</i>	Y12580	C hamatusMTI
<i>Chionodraco rastrospinosus</i>	Z72484	C rastroMTI
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	AJ007560	G acuticepsMTI
<i>Pagotheni borchgrevinki</i>	AJ007562	P borgheMTI
<i>Parachaenichthys charcoti</i>	AJ007950	P charMTI
<i>Trematomus bernacchi</i>	AJ011585	T bernacchiMTI
<i>Ambystoma mexicanum</i>	AF008583	Ambystoma
<i>Xenopus laevis</i>	X69380	Xenopus

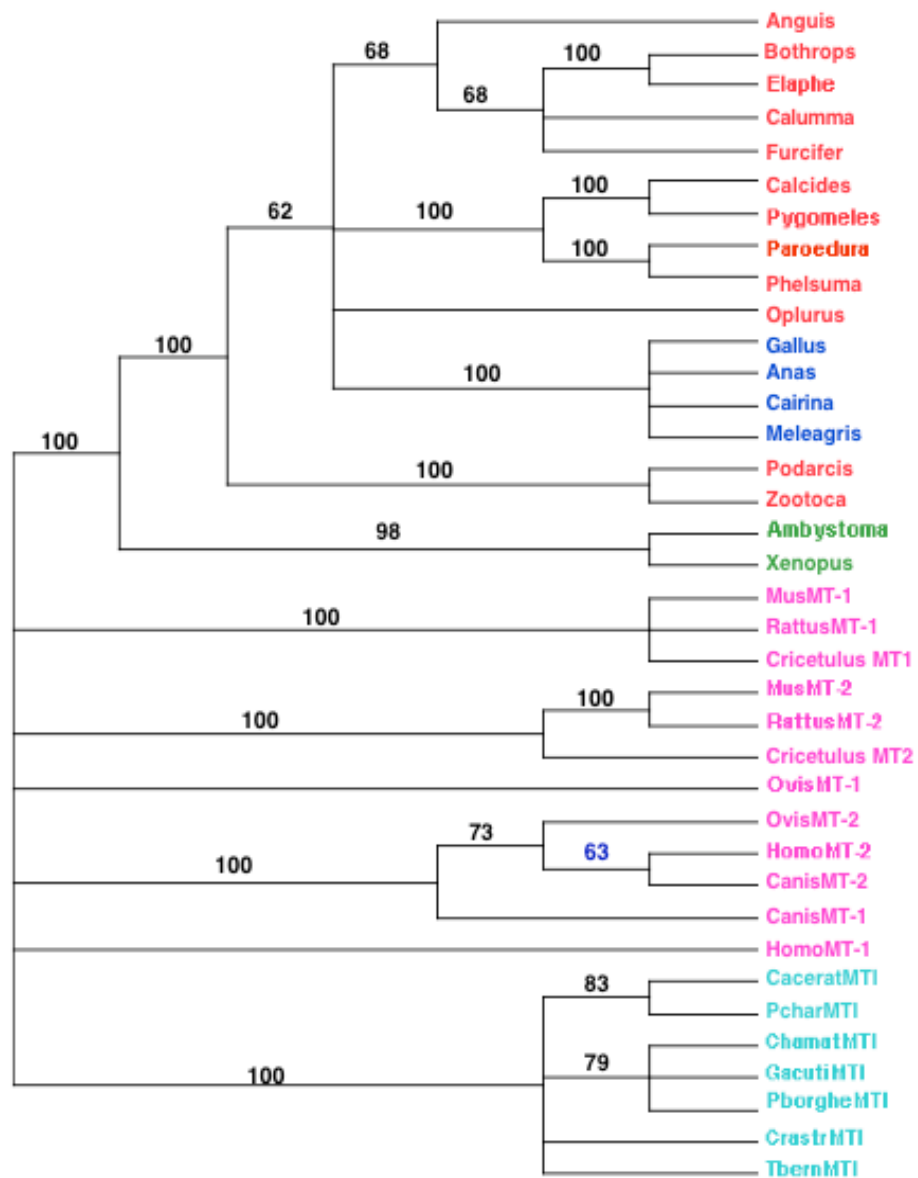


Fig. 7.7 Albero filogenetico delle MT dei Vertebrati ottenuto mediante il metodo della massima parsimonia. I numeri ai nodi indicano l'indice di consenso.

In generale, anche se alla base ambedue gli alberi presentano politomia, si può dire che l'albero ottenuto con l'inferenza Bayesiana è meglio risolto dell'albero ottenuto con la massima parsimonia, in quanto mostra una minore politomia all'interno di ciascun clade.

Inoltre, alcuni nodi dell'albero Bayesiano sono supportati da un valore della probabilità posteriore mediamente alto, laddove gli stessi nodi hanno un basso indice di consenso nell'albero ottenuto con la parsimonia. Ad esempio, l'indice di consenso (albero di massima parsimonia) del nodo che genera i rami HomoMT-1 e HomoMT-2 è 63 (in blu nella fig. 7.7), mentre il valore di probabilità posteriore (albero Bayesiano) per lo stesso nodo è di 0,79, espresso in centesimi (in blu nella fig. 7.8). Resta da dire che i due metodi non danno come risultato topologie perfettamente congruenti, soprattutto per quanto riguarda il clade dei Rettili. Comunque, dal confronto dei due alberi, si evince che la topologia Bayesiana è più affidabile, per la migliore risoluzione ed un più alto valore delle probabilità posteriori. Inoltre, i due alberi costruiti con le sequenze delle MT mostrano, per quanto riguarda i Rettili, una certa incongruenza con quanto è noto della filogenesi delle specie. Si può notare, ad esempio, come, in base all'evoluzione delle MT, Furcifer, Calumma e Oplurus negli alberi delle MT segregano a partire da nodi differenti, pur appartenendo tutti all'Infraordine degli Iguania (fig. 4.1).

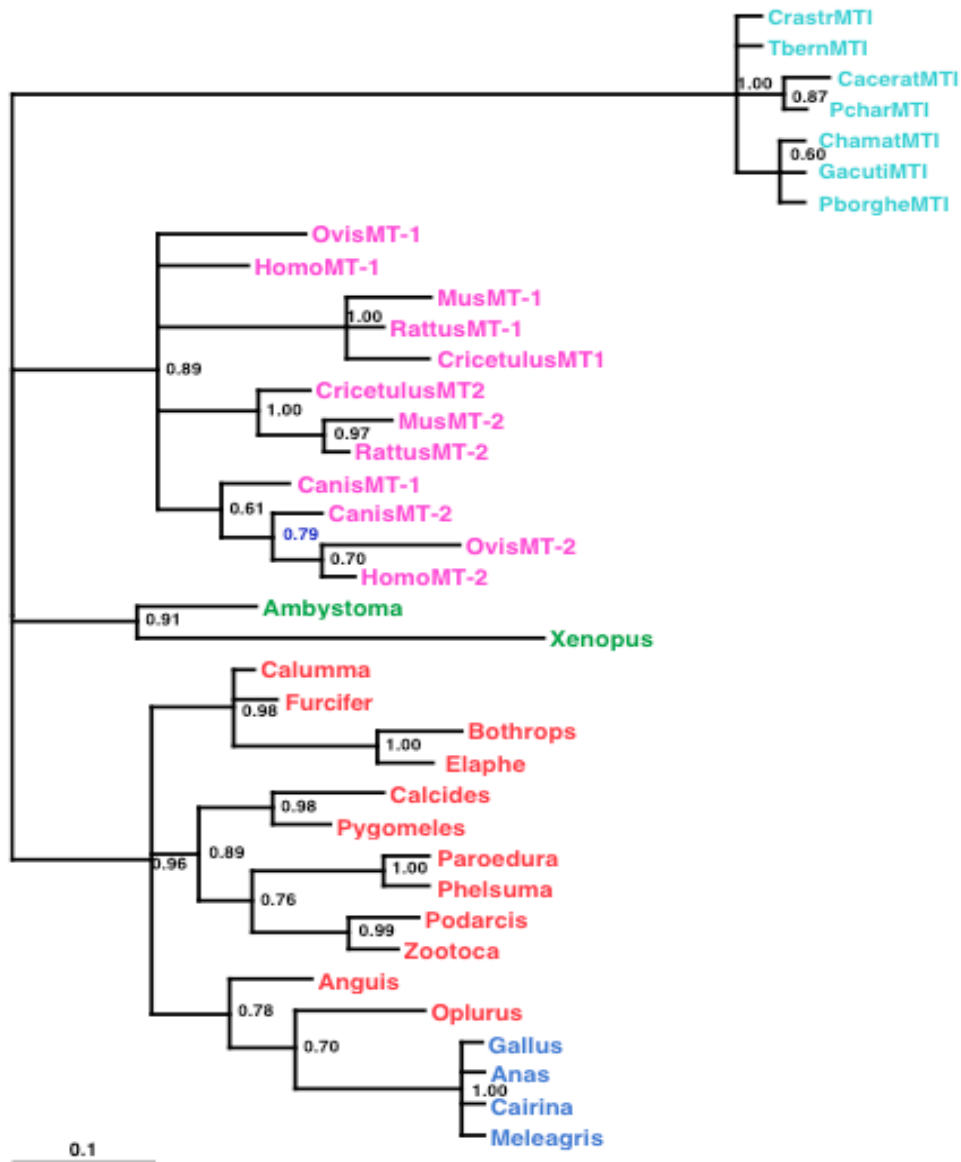


Fig. 7.8 Albero filogenetico delle MT dei Vertebrati ottenuto mediante il metodo Bayesiano. I numeri ai nodi rappresentano il valore della probabilità posteriore.

7.3B RICOSTRUZIONE SULL'ALBERO DELLE SPECIE DEL TRACCIATO DEI CARATTERI E DELL'INDICE DI IDROPATIA

Come è possibile notare osservando l'allineamento delle sequenze di MT (fig. 7.6), l'amminoacido in posizione 63 costituisce un sinapomorfismo (carattere derivato e condiviso) utile a distinguere i vari cladi. In figura 7.9, è stato riportato il tracciato di questo carattere sull'albero filogenetico delle specie. E' interessante notare che nella posizione 63 tutti gli Osteitti hanno un residuo di glutammina (Q, in marrone chiaro), gli Anfibi hanno un'asparagina (N, in rosso) ed i Mammiferi un'alanina (A, in celeste).

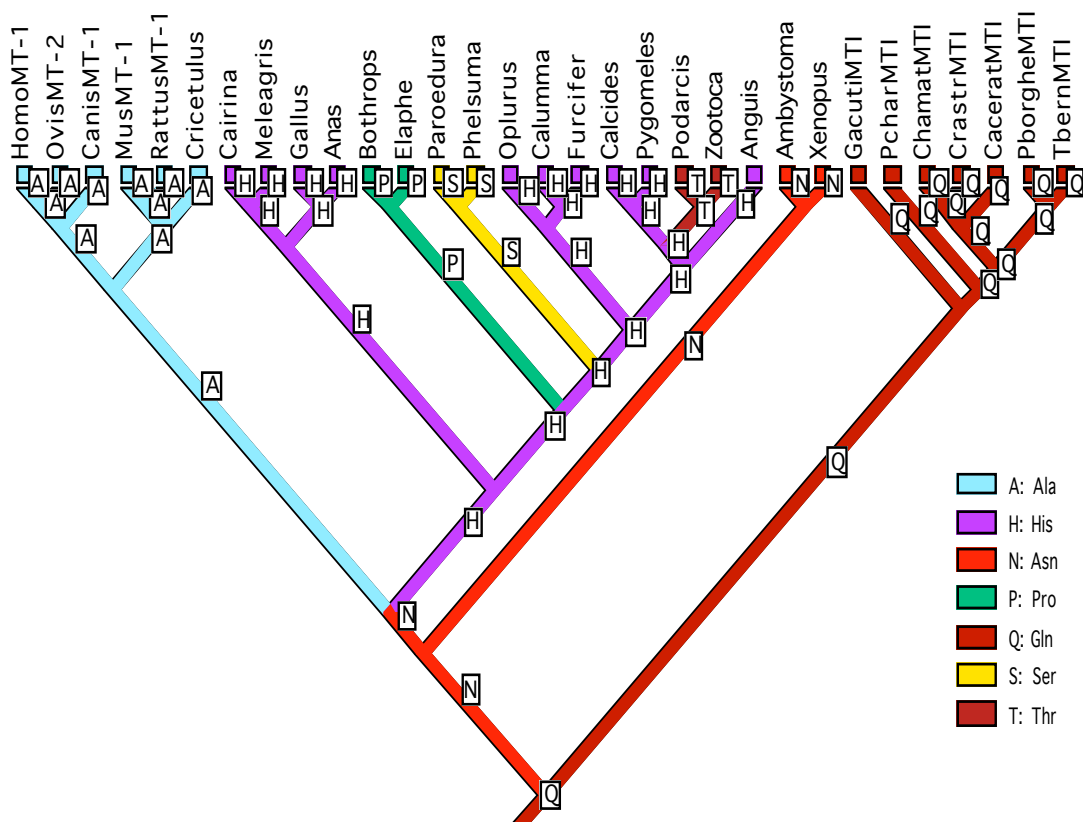


Fig. 7.9 Tracciato del carattere distintivo 63 sull'albero filogenetico delle specie oggetto di studio

Nel clade dei diapsidi analizzati (Uccelli e Squamati), la situazione si presenta più variegata: tutti gli Uccelli e gli appartenenti all'infraordine Iguania (*Oplurus*, *Calumma*, *Furcifer*) e a quello dei Diploglossa (*Anguis*), hanno un'istidina (H, in viola) in posizione 63; gli appartenenti all'infraordine Gekkota (*Phelsuma*, *Paroedura*) hanno serina (S, in giallo), mentre i serpenti (*Elaphe*, *Bothrops*) hanno prolina (P, in verde). Infine, i due rappresentanti degli Scincomorpha (*Podarcis* e *Zootoca*) hanno una treonina (T, in marrone scuro) in posizione 63.

In figura 7.10 è riportato l'albero filogenetico delle specie utilizzate, con il tracciato dell'indice di idropatia (combinazione degli effetti dovuti alle caratteristiche idrofobe ed idrofiliche degli aminoacidi costituenti la proteina) delle MT, calcolato come descritto nei Metodi.

La traccia bianca corrisponde ad un valore più basso dell'indice d'idropatia, la traccia diventa via via più scura con l'aumentare dell'indice d'idropatia. Si può notare una certa tendenza all'aumento dell'idropatia nel corso dell'evoluzione: infatti la traccia diventa più scura in alcuni rami terminali.

Un incremento netto dell'indice di idropatia si ha nella linea filetica dei Mammiferi. Tale incremento dell'idropatia sembra essere il risultato di cambiamenti filogenetici piuttosto che una sorta di risposta adattativa associabile ad un particolare stile di vita o a fattori come, per esempio, l'affermarsi dell'omeotermia, in quanto le MT degli Uccelli hanno livelli di idropatia confrontabili con quelli degli eterotermi.

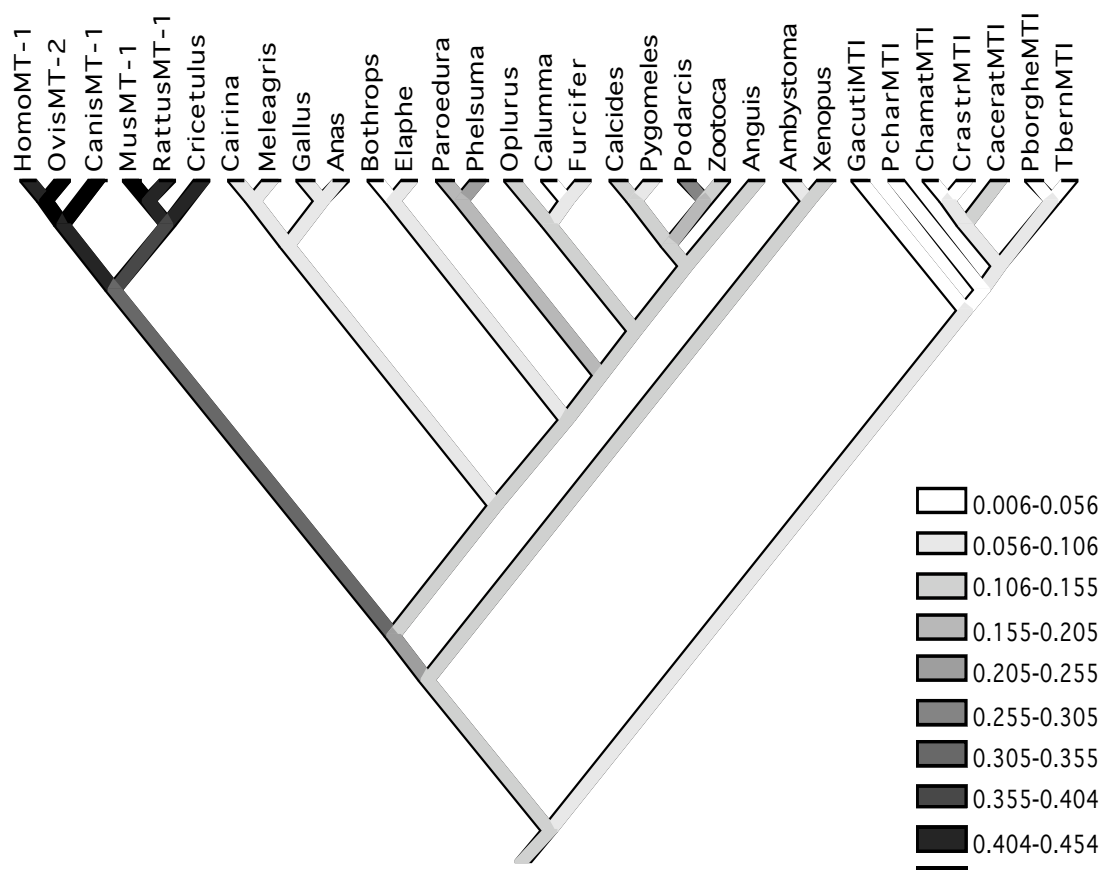


Fig. 7.10 Tracciato dell'indice di idropatia sull'albero filogenetico delle specie oggetto di studio

Poiché l'idropatia è un carattere strettamente associato alla flessibilità della molecola proteica, nel senso che la prima è inversamente proporzionale alla seconda, ne risulta che le MT dei Mammiferi sono più rigide di quelle presenti in altre specie di Vertebrati.

CAPITOLO 8

RISULTATI

**ESPOSIZIONE AL CADMIO: DISTRIBUZIONE DEL
METALLO NEI TESSUTI ED ESPRESSIONE DELLA MT**

8.1 ESPOSIZIONE ACUTA AL METALLO.

8.1A ACCUMULO DI CADMIO

Allo scopo di determinare l'accumulo di cadmio nei differenti tessuti, esemplari di *Podarcis* sono stati trattati con una singola dose di CdCl_2 somministrata per via intraperitoneale ($2\mu\text{g/g}$ peso corporeo) e gli organi (fegato, ovaio, cervello e rene) prelevati ad intervalli di tempo (3 esemplari per ogni punto). Come descritto nei Metodi, al termine del trattamento, i tessuti sono stati sottoposti a combustione acida ed il contenuto del metallo è stato misurato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico. I risultati, espressi come ng di metallo/mg di tessuto, sono riportati nella tabella 8.1.

Tabella 8.1

Accumulo di cadmio in differenti tessuti di *P. sicula* dopo un'unica somministrazione del metallo per via sottocutanea. In tabella è riportata la media e la deviazione standard dei valori ottenuti da 3 distinti campioni per ciascun punto sperimentale.

	Controllo (ng Cd/mg tessuto)	2 giorni (ng Cd/mg tessuto)	7 giorni (ng Cd/mg tessuto)	14 giorni (ng Cd/mg tessuto)
Fegato	$0,284 \pm 0,090$	$40,69 \pm 10,89$	$76,25 \pm 31,71$	$47,87 \pm 9,20$
Ovaio	$0,452 \pm 0,167$	$56,70 \pm 35,63$	$9,47 \pm 4,08$	$13,43 \pm 5,74$
Cervello	$0,430 \pm 0,141$	$0,582 \pm 0,070$	$1,643 \pm 0,126$	$1,24 \pm 0,328$
Rene	$0,332 \pm 0,070$	$92,87 \pm 19,87$	$4,49 \pm 1,652$	$2,41 \pm 0,39$

In figura 8.1 è riportata la rappresentazione grafica dell'accumulo di cadmio nei vari tessuti analizzati. Il box plot fornisce una visione della dispersione delle misure effettuate, la linea orizzontale all'interno del box rappresenta la mediana.

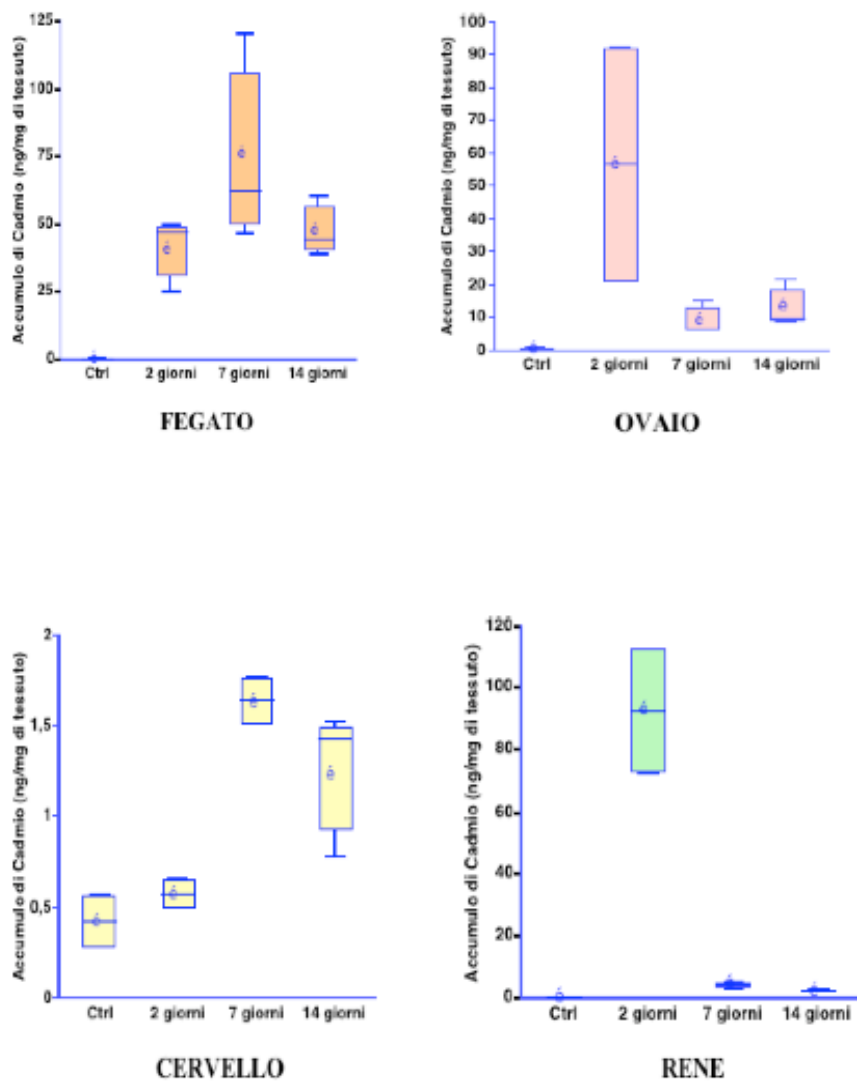


FIG. 8.1 Rappresentazione grafica (BOX PLOT) dell'accumulo di cadmio in diversi tessuti di *P. sicula* dopo iniezione sottocutanea del metallo e prelievo dei tessuti a diversi tempi di esposizione.

I risultati dimostrano che tracce di cadmio si ritrovano in tutti i tessuti, anche in quelli provenienti da animali di controllo, forse a causa della presenza naturale di tracce di cadmio nell'ambiente. Dopo il trattamento, la quantità di cadmio aumenta concentrandosi soprattutto nel fegato, nel rene e anche nell'ovaio, mentre il contenuto di cadmio nel cervello rimane a livelli più bassi. La distribuzione del metallo nei tessuti tende a variare nel tempo. Nel rene e nella gonade la concentrazione di cadmio aumenta già 2 giorni dopo il trattamento e diminuisce dopo 7 giorni. Nel fegato e nel cervello la concentrazione massima di metallo si evidenzia dopo una settimana dal trattamento: nel tempo la concentrazione nel cervello rimane pressochè costante, nel fegato, invece, tende a diminuire dopo 14 giorni.

8.1B ESPRESSIONE DELLA MT

Per determinare le variazioni nei livelli di messaggero per l'MT nei tessuti dopo esposizione acuta al cadmio, è stata effettuata l'ibridazione su Dot blot dell'RNA totale estratto dai tessuti, prelevati da animali controllo e da animali trattati, dopo 2, 7 e 14 giorni dal trattamento. Si è preferito condurre l'analisi su Dot blot, piuttosto che su Northern blot, in quanto il Dot blot permette di esaminare più campioni contemporaneamente e di avere una visione immediata delle differenze tra i vari campioni.

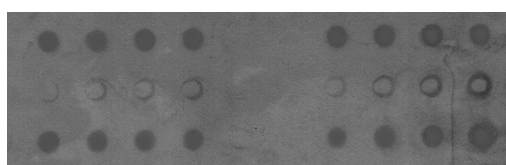


Fig. 8.2 Filtro ottenuto mediante Dot Blot. L'RNA adsorbito alla membrana è stato fissato e colorato secondo la procedura citata nei metodi per evidenziarne la quantità e l'integrità.

I livelli di espressione sono stati poi misurati quantitativamente mediante analisi densitometrica; l'integrità e la quantità dell'RNA caricato su filtro sono state verificate mediante colorazione dell'RNA ribosomale come descritto nei Metodi (fig. 8.2).

Dall'analisi (fig. 8.3) emerge che tutti i tessuti esprimono costitutivamente l'MT: il livello di MT mRNA è elevato e comparabile nel fegato e nel cervello, mentre è di circa 8 volte inferiore nell'ovaio e nel rene. Il trattamento con cadmio non ha gli stessi effetti su tutti i tessuti: nel cervello, dove i livelli di cadmio nelle cellule si mantengono bassi, il trattamento non induce l'aumento dell'MT mRNA; al contrario, il cadmio induce aumento del messaggero negli altri tessuti esaminati, già dopo 2 giorni dal trattamento. In particolare, nel rene i livelli del trascritto rimangono alti per tutto il periodo esaminato, nella gonade tende a diminuire a 14 giorni; infine, nel fegato la quantità di trascritto aumenta nel tempo e la massima quantità di MT mRNA si osserva a 7 giorni dal trattamento, in concomitanza con il picco massimo di accumulo di cadmio (Fig. 8.1), e diminuisce dopo 14 giorni.

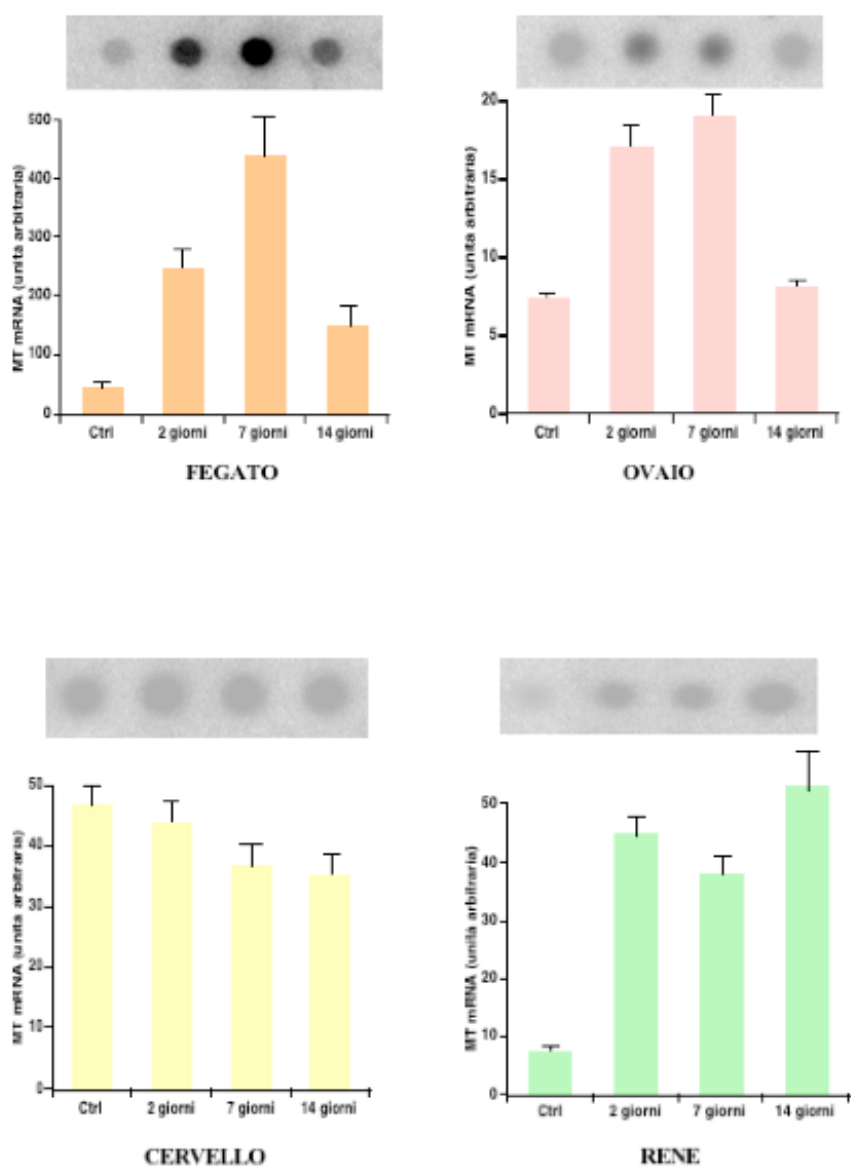


Fig. 8.3 Espressione della MT in vari tessuti di *P. sicula*, prelevati da animali controllo e animali trattati con cadmio a 2, 7 e 14 giorni dal trattamento. Il pannello superiore mostra l'ibridazione su Dot blot dell'RNA totale con la sonda per l'MT; il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica condotta sulle bande di ibridazione. I dettagli sono descritti nei Metodi

8.3 ESPOSIZIONE CRONICA AL METALLO.

8.2A ACCUMULO DI CADMIO

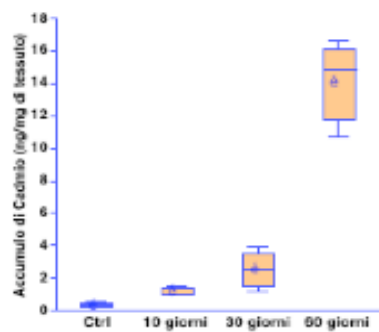
Ad esemplari di *P. sicula* è stato somministrato cadmio per via alimentare, come descritto nei Metodi. Il metallo (1 µg/g di peso corporeo) è stato somministrato a giorni alterni per un periodo massimo di sessanta giorni. Dopo 10, 30, e 60 giorni dagli animali (3 esemplari controllo e 3 esemplari trattati) sono stati prelevati i tessuti (fegato, reni, ovaio, cervello, intestino) e sottoposti a combustione acida. In questi esperimenti con trattamento cronico, le osservazioni sono state estese anche all'intestino, in quanto principale organo coinvolto in caso di intossicazione di tipo alimentare. Il contenuto di metallo per ciascun organo, misurato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico ed espresso come ng di metallo/mg di tessuto, è riportato nella tabella 8.2.

Tabella 8.2

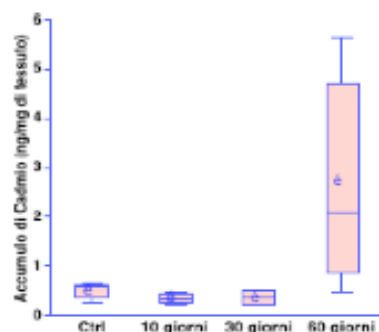
Accumulo di cadmio in differenti tessuti di *P. sicula* dopo somministrazione costante a giorni alterni del metallo per via alimentare. In tabella è riportata la media e la deviazione standard dei valori ottenuti da 3 distinti campioni per ciascun punto sperimentale.

	Controllo (ng Cd/mg tessuto)	10 giorni (ng Cd/mg tessuto)	30 giorni (ng Cd/mg tessuto)	60 giorni (ng Cd/mg tessuto)
Fegato	0,42 ± 0,198	1,137 ± 0,221	2,55 ± 0,99	19,99 ± 7,512
Ovaio	0,424 ± 0,173	0,355 ± 0,11	0,373 ± 0,139	2,362 ± 1,424
Cervello	0,302 ± 0,155	0,375 ± 0,207	0,37 ± 0,133	0,714 ± 0,209
Intestino	0,411 ± 0,342	8,13 ± 0,305	16,78 ± 13,41	36,67 ± 22,82
Rene	0,585 ± 0,382	0,699 ± 0,414	4,355 ± 1,17	4,34 ± 3,56

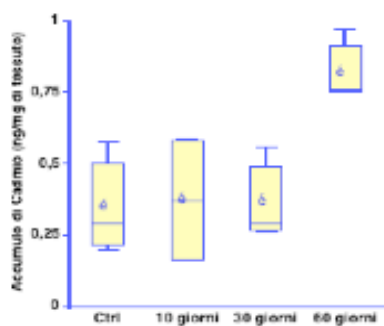
La rappresentazione grafica delle misure effettuate è mostrata nei box plot in figura 8.4.



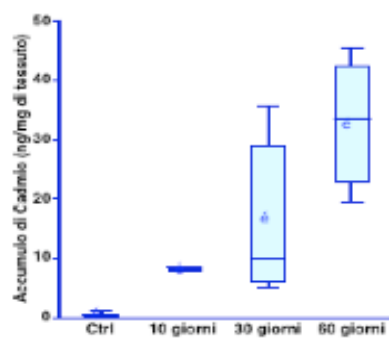
FEGATO



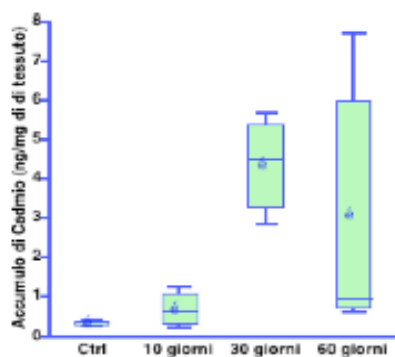
OVAIO



CERVELLO



INTESTINO



RENE

FIG. 8.4 Rappresentazione grafica (BOX PLOT) dell'accumulo di cadmio in diversi tessuti di podarcis sicula dopo somministrazione costante a giorni alterni del metallo per via alimentare (Trattamento cronico).

I box plot, fornendo una visione della dispersione dei valori misurati, dimostrano chiaramente un'elevata variabilità individuale. Il metallo si accumula dopo soli 10 giorni dal trattamento nelle cellule dell'intestino; parte di esso passa nel distretto circolatorio, distribuendosi negli altri organi. In particolare, il cadmio tende ad accumularsi nel fegato, poi nel rene e nell'ovaio. Nel cervello l'accumulo di cadmio è molto meno significativo. Inoltre si osserva che l'accumulo nei tessuti non sembra essere immediato: i livelli maggiori di metallo si osservano per lo più tra 30 giorni (intestino e rene) e 60 giorni (fegato, ovaio e, seppure in maniera ridotta, cervello).

8.2B ESPRESSIONE DELLA MT

Le variazioni nei livelli di messaggero per l'MT nei differenti tessuti in seguito all'esposizione prolungata al cadmio sono state valutate mediante ibridazione su Dot blot dell'RNA totale estratto dai tessuti prelevati da animali controllo e da animali trattati dopo 10, 30 e 60 giorni dall'inizio del trattamento.

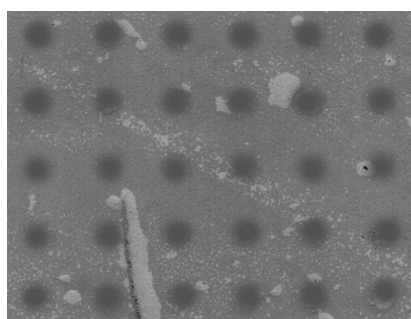


Fig. 8.5 Filtro ottenuto mediante Dot Blot. L'RNA adsorbito alla membrana è stato fissato e colorato secondo la procedura citata nei metodi per evidenziarne la quantità e l'integrità.

Anche in questo caso, per l'elevato numero di campioni da esaminare e per apprezzare meglio le differenze dell'espressione dell'MT mRNA nei vari campioni, si è preferito condurre l'analisi su Dot blot, piuttosto che su Northern blot. I livelli di espressione sono stati misurati quantitativamente mediante analisi densitometrica; l'integrità e la quantità dell'RNA caricato su filtro sono state verificate mediante colorazione dell'RNA ribosomale (fig. 8.5)(cfr. Metodi).

I risultati delle analisi, riportati in figura 8.6, confermano i dati riportati in fig. 8.4: il trascritto per l'MT è espresso costitutivamente in tutti i tessuti analizzati; inoltre l'intossicazione cronica da cadmio induce una risposta diversa nei vari tessuti analizzati. È interessante notare che, laddove il contenuto di MT mRNA è costitutivamente alto, e cioè nel fegato e nel cervello, non c'è ulteriore induzione dell'espressione genica, neanche dopo 60 giorni di trattamento prolungato con cadmio, anche se questo trattamento determina un aumento della quantità del metallo accumulato nelle cellule e soprattutto negli epatociti. Negli altri tessuti si osserva induzione dell'espressione genica dell'MT, anche se questa induzione non è sempre temporalmente associata all'accumulo di cadmio: nell'intestino, infatti, la concentrazione di metallo nelle cellule aumenta già dopo 10 giorni, ma il livello massimo di trascritto si osserva a 60 giorni; nell'ovaio e nel rene un significativo aumento del trascritto per l'MT è apprezzabile solo dopo trattamento prolungato per 60 giorni.

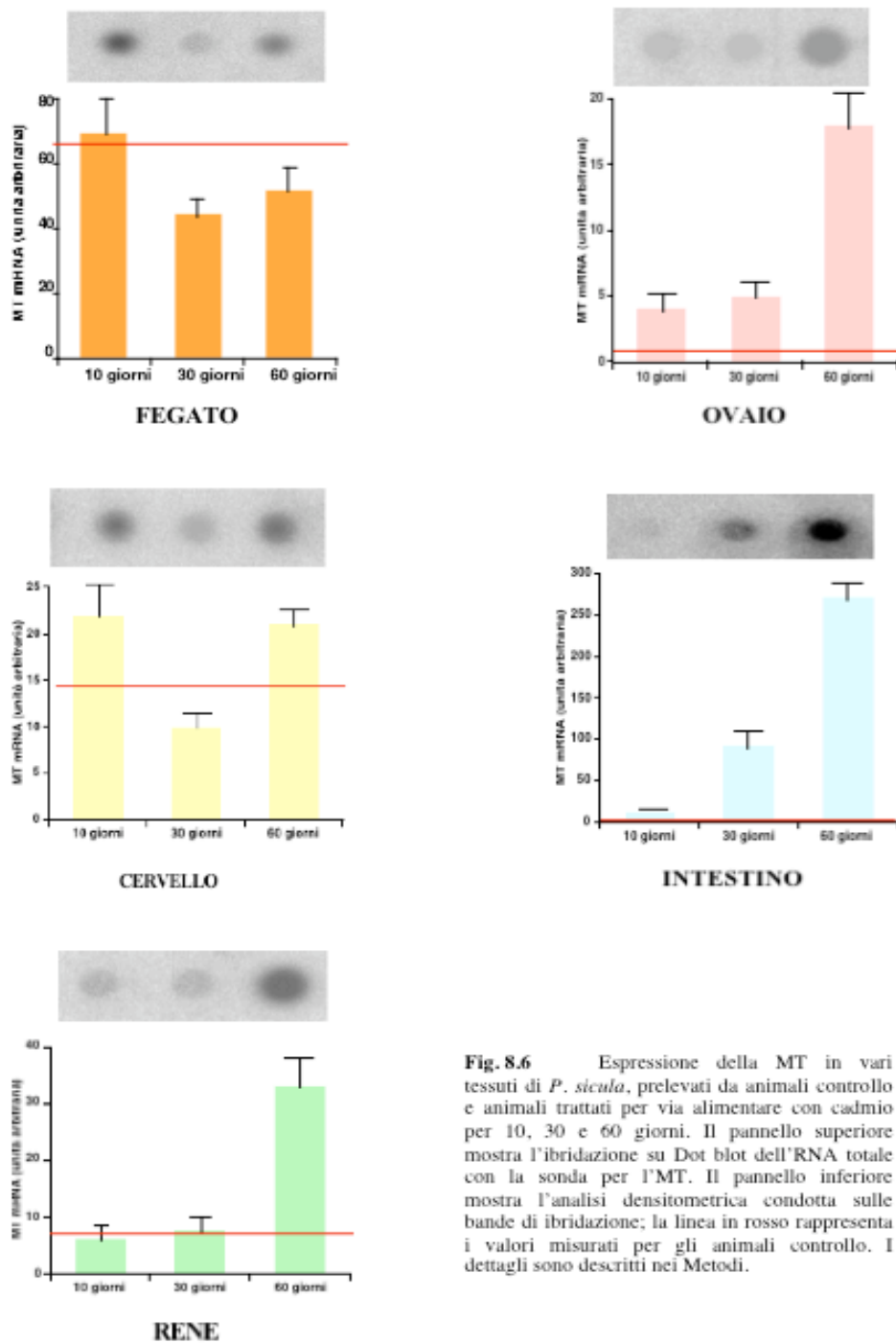


Fig. 8.6 Espressione della MT in vari tessuti di *P. sicula*, prelevati da animali controllo e animali trattati per via alimentare con cadmio per 10, 30 e 60 giorni. Il pannello superiore mostra l'ibridazione su Dot blot dell'RNA totale con la sonda per l'MT. Il pannello inferiore mostra l'analisi densitometrica condotta sulle bande di ibridazione; la linea in rosso rappresenta i valori misurati per gli animali controllo. I dettagli sono descritti nei Metodi.

DISCUSSIONE

I risultati riportati nella presente tesi chiariscono alcuni aspetti dell'evoluzione molecolare e dell'espressione del gene codificante la metallotioneina nei Rettili Squamati.

Lo studio evolutivo evidenzia l'esistenza di interessanti differenze tra le MT degli Squamati e quelle degli Uccelli, i due principali gruppi di Vertebrati appartenenti al più vasto raggruppamento dei Diapsidi. Le sequenze della MT ottenute da esemplari di vari infraordini di Squamati presi in considerazione in questo lavoro di tesi (Gekkota, Scincomorpha, Iguania, Diploglossa e Xenophidia), dalla lucertola *Podarcis sicula* (Riggio e coll, 2003) e dall'ofide *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2003), già disponibili in banca dati EMBL, offrono una panoramica sufficiente delle caratteristiche delle MT di questo ordine. Dal confronto della MT di questi Rettili Squamati emergono differenze significative, invece dal confronto delle MT degli Uccelli risulta che in questa classe essa è molto conservata. Le MT degli Uccelli, infatti, hanno una struttura primaria identica e tipica della classe, caratterizzata, tra l'altro, dalla presenza di aminoacidi quali arginina e istidina, assenti nelle MT di tutti gli altri Vertebrati (Andrews e coll, 1996). Tutti i trascritti delle MT dei Rettili presentano, come gli Uccelli, una regione codificante di 189 nucleotidi, seguiti da una regione non tradotta di lunghezza variabile. Generalmente tale regione non supera le 150 paia di basi, tranne che negli Scincidi, dove è sensibilmente più lunga (circa 370 paia di basi). Il significato di questa differenza nella regione non tradotta non è

ancora chiarito; recenti evidenze sperimentali dimostrano che, a livello delle regioni 3' non tradotte delle MT, ci sono elementi regolativi aventi un ruolo importante nel determinare la distribuzione citoplasmatica del messaggero e nel controllarne la successiva traduzione (Hesketh, 2004; Nury e coll, 2005). La sequenza aminoacidica costituita da 63 residui e la sequenza N-terminale, con 5 residui aminoacidici a monte della prima cisteina, presentano caratteristiche comuni a tutti i Diapsidi. Poiché la regione N-terminale costituisce il principale epitopo antigenico dell'MT (Kille e coll, 1994), è presumibile supporre che gli anticorpi contro le MT di Uccelli possano reagire anche contro le MT dei Rettili. A livello della sequenza aminoacidica si possono riscontrare alcune sostituzioni aminoacidiche tipiche, che caratterizzano una specie o gruppi di specie. Generalmente, infatti, nei Vertebrati in posizione 31 è presente l'aminoacido lisina, che è sostituito dall'arginina negli Uccelli; tra gli Squamati, è presente la lisina, tranne che negli esemplari di Gekkota, che in posizione 31 presentano una glutammina, ed in Oplurus che, come negli Uccelli, portano l'arginina. In posizione 58, la lisina tipica di Anfibi, Uccelli e Mammiferi, è presente anche negli Squamati, tranne che in Oplurus, dove è sostituita dalla glutammina. La presenza della lisina vicino ad un residuo cisteinico, come nel caso delle posizioni 31 e 58, potrebbe influenzare il legame del metallo con il gruppo tiolico della cisteina immediatamente adiacente, stabilizzandolo (Parente e coll, 1985).

Come si è detto in precedenza, è significativa la presenza di un residuo di istidina in posizione 63 in molti Diapsidi studiati.

Tra gli Squamati, l'istidina in questa posizione si trova negli Iguania e nei Diploglossa, mentre in *Anguis fragilis* è presente in posizione 44. L'istidina può essere carica positivamente od essere priva di carica, in funzione dell'ambiente circostante. Poiché l'anello imidazolico presente nella catena laterale è altamente reattivo, tale residuo può partecipare, con le cisteine, al legame tra la molecola e gli atomi di metallo, rendendo tale legame più stabile (Berg e coll, 2003).

Altra caratteristica tipica delle MT degli Uccelli, non riscontrabile negli altri vertebrati, è la mancanza di polimorfismo a carico del gene dell'MT. L'analisi del genoma di Gallus dimostra la presenza di un unico gene dell'MT, avente l'organizzazione tipica di altri Vertebrati (Andrews e coll, 1996). I risultati riportati in questa tesi dimostrano che la mancanza di polimorfismo sembra essere tipica di molti Diapsidi e di specie da essi derivate. Infatti, in nessuno dei Rettili esaminati è stata evidenziata la presenza di duplicazioni a carico del gene della MT.

I risultati dell'analisi filogenetica dimostrano che le sequenze delle MT degli Squamati non costituiscono un unico clade, come accade, al contrario, per quelle degli Uccelli. Negli Squamati, invece, si riscontra una certa incongruenza tra l'albero delle MT e la filogenesi delle specie. Tale incongruenza potrebbe dipendere da varie cause, la più importante delle quali potrebbe essere la presenza di geni la cui divergenza risale a eventi di duplicazione genica verificatisi in un più o meno lontano passato. Ciò equivale a dire che gli attuali geni codificanti le MT degli Squamati non costituiscono un gruppo di

geni ortologi. L'esistenza di sinapomorfismi, come per esempio la presenza di un particolare amminoacido nella posizione 63, costituisce un interessante carattere distintivo non solo nell'ambito dei Vertebrati, ma anche nell'interno del clade degli Squamati. Ulteriori studi e la disponibilità di altre sequenze di MT potranno contribuire a definire meglio l'evoluzione delle MT dei Diapsidi.

Un risultato interessante viene dall'analisi del tracciato dell'idropatia riportato sull'albero tassonomico. Come si è detto in precedenza, l'idropatia di una proteina è strettamente correlata alla flessibilità della molecola, nel senso che ad un aumento dell'idropatia corrisponde una diminuzione della sua flessibilità. A sua volta, la flessibilità della proteina può favorire cambiamenti conformazionali, importanti affinché la molecola mantenga la propria funzionalità anche a basse temperature. I risultati mostrano che nel corso dell'evoluzione dei Vertebrati si è verificata una netta diminuzione della flessibilità delle MT lungo la linea filetica dei Mammiferi. Questa diminuita flessibilità sembra essere il risultato di cambiamenti filogenetici non rapportabili allo sviluppo dell'omeotermia, in quanto le MT degli Uccelli hanno un grado di flessibilità confrontabile con quello degli eterotermi. Tali previsioni dovranno ricevere conferma sperimentale da studi comparativi sulle proprietà delle MT nei tetrapodi o, se necessario, di altre classi di Vertebrati.

I trattamenti sperimentali delle lucertole con cadmio hanno permesso di ottenere informazioni interessanti sull'ingresso, la distribuzione e l'escrezione del metallo in differenti tessuti. Le indagini hanno anche permesso di chiarire la correlazione tra

accumulo del metallo e risposta cellulare tramite l'attivazione della sintesi di MT. Numerosi sono gli studi condotti sull'accumulo, l'assorbimento e la distribuzione tissutale del cadmio in organismi vegetali o in invertebrati acquatici. Pochi sono, invece, gli studi condotti sui Tetrapodi terrestri, forse a causa della elevata variabilità individuale che si riscontra in questi organismi complessi. Fattori quali sesso ed età sembrano giocare un ruolo importante nella risposta tissutale al metallo (Horiguchi e coll, 2004). I risultati ottenuti mostrano che anche in *Podarcis* vi è un'elevata variabilità individuale nell'accumulo di metallo; i dati sono comunque chiaramente indicativi di una diversa capacità dei vari tessuti ad accumulare cadmio. Il trattamento con un'unica dose di sali di cadmio, somministrati per via sottocutanea, determina una rapida distribuzione del metallo in fegato, rene e ovaio. Il dato ottenuto per il cervello, dove è possibile individuare tracce dell'avvenuta esposizione al metallo dopo una settimana dal trattamento, è in contrasto con quanto affermato da Jin e collaboratori, secondo i quali la barriera emato-encefalica riuscirebbe a bloccare completamente l'ingresso del cadmio nelle cellule neuronali, i cui effetti neurotossici sarebbero dovuti a interferenze nel metabolismo dello zinco, piuttosto che ad un effetto diretto del cadmio sui neuroni (Jin e coll, 1998). Inoltre, mentre per gli altri tessuti è evidente la capacità di eliminare il metallo in tempi brevi, per il cervello si nota la persistenza del cadmio nelle cellule. In particolare, nel rene si riscontrano concentrazioni molto basse di cadmio già dopo una settimana dal trattamento. Al momento non è chiaro come il rene elimina il cadmio: è probabile che il

metallo, come dimostrato in Mammiferi contaminati da cadmio (Swierczek e coll, 2004), venga escreto dalle cellule renali attraverso le urine, in forma libera o legato alle metallotioneine, ma è anche probabile che parte del metallo ritorni in circolo e che si accumuli nel fegato, poiché la concentrazione di cadmio in questo organo continua ad aumentare fino a 7 giorni dalla somministrazione.

I risultati ottenuti dimostrano anche il coinvolgimento della metallotioneina nella risposta cellulare al cadmio. In seguito all'esposizione al metallo, si osserva un aumento dei livelli di MT mRNA in tutti i tessuti analizzati, tranne che nel cervello. In quest'organo, d'altro canto, il livello costitutivo del trascritto è molto alto, paragonabile a quello riscontrato nel fegato, organo in cui di solito il contenuto di MT è più abbondante. La mancanza nei Rettili di polimorfismo del gene della MT dimostra che la presenza dell'isoforma specifica MT-III del cervello (Uchida e coll, 1991) è tipica solo dei Mammiferi.

Dopo induzione, il trascritto raggiunge il suo massimo livello nel fegato dopo sette giorni dal trattamento, in concomitanza con il picco di cadmio, mentre negli altri organi l'MT mRNA tende a mantenersi su livelli elevati anche quando la concentrazione di cadmio intracellulare diminuisce sensibilmente. Le analisi cromatografiche dimostrano, inoltre, che la somministrazione di cadmio per via sottocutanea induce la sintesi di apprezzabili quantità di MT non solo nell'ovaio, in cui in condizioni normali è presente il messaggero ma assente un pool endogeno di MT, ma anche nel fegato, in cui la proteina è presente già in condizioni fisiologiche. La presenza di trascritto

materno dell'MT in ovociti e uova è stata ampiamente documentata nei ricci di mare (Scudiero e coll, 1997b; Scudiero e coll, 1998). E' stato ipotizzato che tale trascritto rappresenti un pool di riserva e che la sua traduzione si attivi, in condizioni fisiologiche normali, nel corso dello sviluppo embrionale. L'induzione di MT in seguito a contaminazione acuta da cadmio costituisce una difesa rapida ed efficace da parte degli organismi viventi all'esposizione indesiderata al metallo. E' noto che la sintesi di MT in risposta al cadmio può essere regolata non solo a livello trascrizionale, ma anche a livello post-trascrizionale (Scudiero e coll, 1997a). In Podarcis, l'aumentata produzione di MT indotta da cadmio nell'ovaio può essere dovuta ad una regolazione trascrizionale che porta alla sintesi *de novo* di RNA messaggero e/o all'attivazione post-trascrizionale del messaggero accumulato nell'ovocita.

I risultati ottenuti con il trattamento cronico dimostrano che il cadmio introdotto per via alimentare è assorbito a livello intestinale e successivamente riversato nel torrente circolatorio. Studi condotti su linee cellulari epiteliali hanno dimostrato che il cadmio può entrare e uscire attraverso le membrane delle cellule epiteliali sia grazie a diffusione passiva che mediante l'interazione tra scambiatori anionici inorganici e scambiatori cationici organici (Endo, 2002). Dal torrente circolatorio il cadmio passa agli altri organi, tendendo ad accumularsi dapprima nel fegato e nel rene, poi nella gonade e nel cervello, dove il livello di cadmio si mantiene alquanto basso, se confrontato con quello di altri organi. Anche nel caso di trattamento per via alimentare, comunque, si riscontra che il

cadmio può passare attraverso la barriera emato-encefalica. Per quanto riguarda l'espressione della MT in seguito a trattamento cronico, i dati ottenuti dimostrano che l'intossicazione cronica da cadmio induce una diversa risposta nei tessuti. Nel cervello e nel fegato non si osserva induzione del messaggero della MT, nemmeno dopo trattamento prolungato e successivo accumulo del metallo nelle cellule. Questo dato è particolarmente interessante, visto che generalmente gli epatociti rispondono all'accumulo di metallo inducendo la sintesi di MT. E' possibile che, in questo caso, il metallo che si accumula lentamente sia legato alle MT costitutivamente sintetizzate e ad altre proteine in grado di legare in maniera selettiva il cadmio (Deagen e Whanger, 1985). Nell'ovaio e nel rene si osserva, invece, l'induzione dell'espressione della MT; ma mentre nell'ovaio l'induzione coincide con l'effettivo aumento di concentrazione di metallo nelle cellule, nel rene si osserva un significativo aumento del livello di trascritto solo dopo che nel tessuto si è già accumulato una certa quantità di cadmio: è stato ipotizzato che parte del cadmio che si accumula nel rene non penetri nelle cellule in forma libera, ma già complessato alle MT (Elsenhans e coll, 1997). Recentemente è stato anche dimostrato che le MT presenti nelle cellule intestinali sono in grado di trasportare il metallo all'esterno della cellula secernendo le MT stesse (Molledo e coll, 2000). Secondo tale ipotesi, il metallo che inizialmente si accumula nelle cellule renali si troverebbe legato a proteine, e non sarebbe quindi in grado di indurre l'attivazione della sintesi della MT. La significativa induzione dell'espressione della MT nell'intestino, osservabile dopo 30

giorni di trattamento, supporta in qualche modo l'ipotesi secondo la quale le cellule della mucosa intestinale possano secernere non solo il cadmio in forma libera, ma anche quello legato all'MT.

In conclusione, si può affermare che l'animale risponde in modo diverso in rapporto al tipo di somministrazione del cadmio. Infatti, dati ottenuti dimostrano che il coinvolgimento della MT nella risposta cellulare al metallo varia in base al tipo di esposizione: quando la cellula è esposta repentinamente ad una dose massiccia di cadmio, si ha la rapida attivazione della sintesi e dell'espressione dell'MT; quando la cellula accumula il metallo più lentamente, la risposta non è altrettanto rapida, anzi, in alcuni tessuti, quali il fegato, non si ha induzione dell'espressione genica dell'MT, nemmeno dopo un trattamento con metallo moderatamente lungo. Questo dato suggerisce che la metallotioneina è una molecola che può essere utilizzata per monitorare l'ambiente soltanto in particolari condizioni: può essere utilizzata come biomarker di una esposizione acuta occasionale, mentre non può essere considerata un buon biomarker di una esposizione cronica per via alimentare, soprattutto per tessuti quale il fegato.

BIBLIOGRAFIA

- Ahearn GA, Mandal PK, Mandal A. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp Physiol [B]*. 2004 174:439-52.
- Anan Y, Kunito T, Sakai H, Tanabe S. Subcellular distribution of trace elements in the liver of sea turtles. *Mar Pollut Bull*. 2002 45:224-9.
- Andrew J.E., Brimblecombe P., Jickells T.D., and Liss P.S., 1996. An introduction to environmental chemistry. Blackwell Science.
- Andrews G.K. (1990) Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Food Nutr Sci*, 14, 193-258
- Andrews GK, Fernando LP, Moore KL, Dalton TP, Sobieski RJ. Avian metallothioneins: structure, regulation and evolution. *J Nutr*. 1996 126:1317S-23S
- Andrews GK, Huet-Hudson YM, Paria BC, McMaster MT, De SK, Dey SK. Metallothionein gene expression and metal regulation during preimplantation mouse embryo development (MT mRNA during early development). *Dev Biol*. 1991 145:13-27.
- Banfalvi G, Gacsi M, Nagy G, Kiss ZB, Basnakian AG. Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells. *Apoptosis*. 2005 10:631-42.
- Baptista Neto JA, Smith BJ, McAllister JJ. Heavy metal concentrations in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. *Environ Pollut*. 2000 109:1-9.
- Bargelloni L, R. Scudiero, E. Parisi, V. Carginale, C. Capasso, T. Patarnello. (1999) Metallothioneins in Antarctic fish: Evidence for independent duplication and gene conversion. *Mol. Biol. Evol.*, 7, 885-897

- Bayne BL, Moore MN, Widdows J, Livingstone DR, Salkeld P. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1979 286:563-81.
- Bell JU, Lopez JM. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the liver of alligators exposed to cadmium. *Comp Biochem Physiol C.* 1985 82:123-8.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochimica.* V Edizione, 2003 Zanichelli, pp. 992
- Bertelsen B.O., Steinnes E., Solberg W., and Jingsen J., 1995. Heavy metal concentration in plants in relation to atmospheric heavy metals deposition. *Journal of Environmental Quality*, 24: 1018-1026.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2, 247-61
- Capasso C, Carginale V, Crescenzi O, Di Maro D, Spadaccini R, Temussi PA, Parisi E. Structural and functional studies of vertebrate metallothioneins: cross-talk between domains in the absence of physical contact. *Biochem J.* 2005 391:95-103.
- Capasso C, O. Abugo, F. Tanfani, A. Scire, V. Carginale, R. Scudiero, E. Parisi, S. D'auria (2002) Stability and Conformational Dynamics of Metallothioneins from the Antarctic Fish *Notothenia coriiceps* and Mouse. *Proteins* 46, 259-267
- Capasso C, V. Carginale, R. Scudiero, O. Crescenzi, R. Spadaccini, P.A. Temussi, E. Parisi. (2003) Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein. Relationship with structural diversification and organismal temperature. *J. Mol. Evol.*, 57, S250-S257
- Carginale V, Scudiero R, Capasso C, Capasso A, Kille P, di

- Prisco G, Parisi E. Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish, which exhibits no basal metallothionein protein but high endogenous mRNA levels. *Biochem J.* 1998 332:475-81.
- Casalino E, Calzaretto G, Sblano C, Landriscina C. (2002) Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium *Toxicology*, 1-2, 37-50.
- Chan J, Merrifield ME, Soldatov AV, Stillman MJ. XAFS spectral analysis of the cadmium coordination geometry in cadmium thiolate clusters in metallothionein. *Inorg Chem.* 2005 44:4923-33.
- Cherian MG. The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ Health Perspect.* 1994 3:131-5.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-159.
- Choudhuri S, McKim JM Jr, Klaassen CD. Role of hepatic lysosomes in the degradation of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 115:64-71
- Corzo G, Naveda R. Occupational exposure to lead in production units in Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin.* 1998 39:163-73.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002 59:627-47.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004 14:1188-1190
- D'Auria S, V. Carginale, R. Scudiero, O. Crescenzi, D. Di Maro, P.A. Temussi, E. Parisi, C. Capasso. (2001) Structural characterisation and thermal stability of *Notothenia coriiceps* metallothionein. *Biochem J.*, 354, 291-299

- Deagen JT, Whanger PD. Properties of cadmium-binding proteins in rat testes. Characteristics unlike metallothionein. *Biochem J.* 1985 231:279-83.
- Decaprio AP Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ Sci Tech* 31:1873-1848
- Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutat Res.* 1981 86:115-35.
- Dietz R, Riget F, Cleemann M, Aarkrog A, Johansen P, Hansen JC. Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems. *Sci Total Environ.* 2000 245:221-31.
- Dineley KE, Votyakova TV, Reynolds IJ. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *J Neurochem.* 2003 85:563-70.
- Elsenhans B, Strugala GJ, Schafer SG. Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Hum Exp Toxicol.* 1997 16:429-34.
- Endo T. Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002 131:223-9
- Erickson JC, Hollopeter G, Thomas SA, Froelick GJ, Palmiter RD. Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J Neurosci.* 1997 17:1271-81.
- Fabisiak J.P., Tyurin V. A., Tyurina Y. Y. (1999) Redox regulation of copper-metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1;363, 171-81
- Feldman SL, Failla ML, Cousins RJ. Degradation of rat liver metallothioneins in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1978 544:638-46.
- Fernandez JA, Ederra A, Nunez E, Martinez-Abaigar J, Infante M, Heras P, Elias MJ, Mazimpaka V, Carballeira A.

- Biomonitoring of metal deposition in northern Spain by moss analysis. *Sci Total Environ.* 2002 300:115-27.
- Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med.* 2005 26:235-44.
- Fujiwara Y, Watanabe S, Kaji T. Promotion of cultured vascular smooth muscle cell proliferation by low levels of cadmium. *Toxicol Lett.* 1998 94:175-80.
- Giedroc DP, Chen X, Apuy JL. Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2001 34:577-96.
- Goering PL, Klaassen CD. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984a 74:308-13.
- Goering PL, Klaassen CD. Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984b 74:299-307.
- Hassoun EA, Stohs SJ. (1996). Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicology.* 3, 219-26.
- Hesketh JE, Villette S. Intracellular trafficking of micronutrients: from gene regulation to nutrient requirements. *Proc Nutr Soc.* 2002 61:405-14.
- Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M., Schaffner W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* 13:2870-2875

- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001 55:133-45.
- Horiguchi H, Oguma E, Sasaki S, Miyamoto K, Ikeda Y, Machida M, Kayama F. Comprehensive study of the effects of age, iron deficiency, diabetes mellitus, and cadmium burden on dietary cadmium absorption in cadmium-exposed female Japanese farmers. 2004 *Toxicol Appl Pharmacol.* 196:114-123
- Hunziker PE (1991) Amino Acid sequence determination. *Methods Enz.* 205 B,421-426
- Jahroudi N, Foster R, Price-Haughey J, Beitel G, Gedamu L. Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure. *J Biol Chem.* 1990 265:6506-11.
- Jiang LJ, Maret W, Vallee BL. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95:3483-8.
- Jin P, Ringertz NR. (1990) Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts. *J Biol Chem.* 24, 14061-4.
- Junqueira-de-Azevedo Ide L, Ho PL. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 2002 299:279-91
- Kägi J.H.R., Schäffer A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27: 8509-8515
- Kägi J.H.R., Vallee B.L. (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem.*, 235, 3460-3465
- Kagi JH, Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.* 1987 52:25-61.

- Karin M, Richards RI. The human metallothionein gene family: structure and expression. *Environ Health Perspect.* 1984 54:111-5.
- Kille P., Hemmings A., Lunney E.A. (1994). Memories of metallothionein. *Biochim Biophys Acta*, 1205, 151-61.
- Kiss T., Osipenko O.N. (1994) Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol. Rev*, 3, 245-246
- Klaassen CD, Choudhuri S, McKim JM Jr, Lehman-McKeeman LD, Kershaw WC. In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environ Health Perspect.* 1994 102 141-6.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999:267-94.
- Klaassen CD, Liu J. Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J Toxicol Sci.* 1998 23:97-102.
- Klaassen CD, Wong KL. Cadmium toxicity in the newborn rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982 60:1027-36
- Knoop V, Groth-Malonek M, Gebert M, Eifler K, Weyand K. Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. *Mol Genet Genomics.* 2005 23;:1-12
- Kojima Y, Hunziker P;E Amino acid analysis of metallothionein. *Methods Enzymol.* 1991;205:419-21.
- Krone PH, Evans TG, Blechinger SR. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2003 14:267-74.
- Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KH, Pitt BR. Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in

- metallothionein I and II genes. *J Biol Chem.* 1995 270:5506-10.
- Livingstone D.R. (1982) General biochemical indices of sublethal stress. *Mar Pollut Bull*, 13,261-263
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 193:265-75.
- Madden EF. The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev Environ Health.* 2003, 18:91-109.
- Maret W, Vallee BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95:3478-82.
- Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr.* 2000 130:1455S-8S.
- Margoshes M, Vallee BL (1957) A cadmium binding protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc.*, 79, 4813-4814
- McAleer MF, Tuan RS. Metallothionein overexpression in human trophoblastic cells protects against cadmium-induced apoptosis. *In Vitro Mol Toxicol.* 2001 14:25-42.
- Milnerowicz H, Chmerek M. Influence of smoking on metallothionein level and other proteins binding essential metals in human milk. *Acta Paediatr.* 2005 94:402-6.
- Minami T, Ichida S, Kubo K. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 781:303-11
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology.* 2000:133-43.
- Molledo O, Verde C, Capasso A, Parisi E, Remondelli P, Bonatti S, Alvarez-Hernandez X, Glass J, Alvino CG, Leone

- A. Zinc transport and metallothionein secretion in the intestinal human cell line Caco-2. *J Biol Chem.* 2000 13;275(41):31819-25.
- Morris C.A., Sturzenbaum S., Nicolaus B., Morgan A.J., Harwood J.L., Kille P. (1999) Identification and characterization of Metallothionein from environmental indicator species as potential biomonitors. In *Metallothionein IV*. C. Klaassen(ed.) Birkhauser Verlag Basel/Switzerland
- Nath R, Prasad R, Palinal VK, Chopra RK. Molecular basis of cadmium toxicity. *Prog Food Nutr Sci.* 1984 8:109-63.
- Nogawa K, Kido T. Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993 65:S43-6.
- Oberheitmann B, Schafer J, Dally H, Garms A, Frentzel-Beyme R, Hoffmann W. The chromosome-based challenge assay using fluorescence in situ hybridization: a possible test for increased cancer susceptibility. *Mutat Res.* 1999 428:157-64.
- Ogawa T, Kobayashi E, Okubo Y, Suwazono Y, Kido T, Nogawa K. Relationship among prevalence of patients with Itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the Jinzu River basin, Toyama prefecture of Japan. *Int J Environ Health Res.* 2004 14:243-52.
- Ogra Y, Suzuki KT Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 46:357-65.
- Olsson IM, Eriksson J, Oborn I, Skerfving S, Oskarsson A. Cadmium in food production systems: a health risk for sensitive population groups. *Ambio.* 2005 34:344-51.
- Oskarsson A, Palminger Hallen I, Sundberg J, Petersson Grawe K. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. *Analyst* 1998 123:19-23.

- Padoa, Manuale di Anatomia comparata dei Vertebrati, 1992. Feltrinelli Editore..
- Parente A, Merrifield B, Geraci G, D'Alessio G. Molecular basis of superreactivity of cysteine residues 31 and 32 of seminal ribonuclease. *Biochemistry*. 1985 24:1098-104.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD. Protective effect of MT against the toxicity of cadmium and other metals (1). *Toxicology* 2001 Jun 21;163(2-3):93-100
- Pauwels M, van Weyenbergh J, Soumillion A, Proost P, De Ley M. Induction by zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes. *Eur J Biochem*. 1994 220:105-10.
- Penkowa M, Nielsen H, Hidalgo J, Bernth N, Moos T. Distribution of metallothionein I + II and vesicular zinc in the developing central nervous system: correlative study in the rat. *J Comp Neurol*. 1999 412:303-18.
- Peterson MG, Hannan F, Mercer JF. The sheep metallothionein gene family. Structure, sequence and evolutionary relationship of five linked genes. *Eur J Biochem*. 1988 174:417-24.
- Poels CL, Veerkamp W. Hazard assessment of chemical contaminants in soil. *Toxicol Lett*. 1992 64 503-10.
- Pough FH, Heiser JB, Mc Farlandwn, *Biologia evolutiva e comparata dei Vertebrati*, 1997. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C., Froelick G.J., Kelly E.J., Zambrowicz BP., Palmiter RD. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, 33, 7250-7259
- Radtke F, Georgiev O, Muller HP, Brugnera E, Schaffner W. Functional domains of the heavy metal-responsive

- transcription regulator MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 1995 23:2277-86.
- Riggio M, Trinchella F, Filosa S, Parisi E, Scudiero R. Accumulation of zinc, copper, and metallothionein mRNA in lizard ovary proceeds without a concomitant increase in metallothionein content. *Mol Reprod Dev.* 2003 66:374-82.
- Roesijadi G. Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 46:393-405.
- Romieu I, Palazuelos E, Hernandez Avila M, Rios C, Munoz I, Jimenez C, Cahero G. Sources of lead exposure in Mexico City. *Environ Health Perspect* 1994 102:384-389.
- Ruhling A, Tyler G. Changes in the atmospheric deposition of minor and rare elements between 1975 and 2000 in south Sweden, as measured by moss analysis. *Environ Pollut.* 2004 131:417-23.
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 1991 266:11632-9.
- Saint-Jacques E, April MJ, Seguin C. Structure and metal-regulated expression of the gene encoding *Xenopus laevis* metallothionein-A. *Gene.* 1995 160:201-6
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1982). *Molecular cloning. A Laboratory Manual. Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson SL, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;59:257-88.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74,5463-5467

- Sato M, Sasaki M, Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Arch Biochem Biophys*. 1995 316:738-44.
- Sato M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Tohyama C. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med* 2002 196: 23-32
- Schilderman PA, Moonen EJ, Kempkers P, Kleinjans JC. Bioavailability of soil-adsorbed cadmium in orally exposed male rats. *Environ Health Perspect*. 1997 105:234-8.
- Scudiero R, C. Verde, V. Carginale, P. Kille, C. Capasso, G. di Prisco, E. Parisi. (2000) Tissue-specific regulation of metallothionein and metallothionein mRNA accumulation in the Antarctic notothenioid, *Notothenia coriiceps*. *Polar Biol* 23, 17-23
- Scudiero R, Carginale V, Capasso C, Riggio M, Filosa S, Parisi E. Structural and functional analysis of metal regulatory elements in the promoter region of genes encoding metallothionein isoforms in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (icefish). *Gene*. 2001 274:199-208
- Scudiero R, Carginale V, Riggio M, Capasso C, Capasso A, Kille P, di Prisco G, Parisi E. Difference in hepatic metallothionein content in Antarctic red-blooded and haemoglobinless fish: undetectable metallothionein levels in haemoglobinless fish is accompanied by accumulation of untranslated metallothionein mRNA. *Biochem J*. 1997a 322:207-11.
- Scudiero R, V. Carginale, C. Capasso, P. Kille, E. Parisi. Biochemical and Molecular Studies on Metallothionein in Antarctic Aquatic Organisms. *Trends Comp. Biochem. Physiol*, 1998 4: 153-164
- Scudiero R, C. Capasso, V. Carginale, M. Riggio, A. Capasso, M. Ciaramella, S. Filosa, E. Parisi. PCR amplification and cloning of metallothionein complementary DNAs in temperate and Antarctic sea urchin characterised by a large

- difference in egg metallothionein content. *Cell. Mol. Life Sciences*, 1997b 53: 472-477
- Scudiero R, Temussi PA, Parisi E. Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. *Gene*. 2005 345:21-6.
- Sequi P. Ed, 1989. "Chimica del suolo". Patron Editore, Bologna.
- Shaikh Z.A. (1991). Chronic cadmium exposure and metallothionein. In *Metallothionein in biology and medicine*. (Klaassen CD & Suzuki KT Eds.) CRC Press, Florida, pp.383-391
- Shaikh ZA, Jordan SA, Tewari PC. Cadmium disposition and metallothionein induction in mice: strain-, sex-, age- and dose-dependent differences. *Toxicology*. 1993 80:51-70.
- Shimada A, Yanagida M, Umemura T. An immunohistochemical study on the tissue-specific localization of metallothionein in dogs. *J Comp Pathol*. 1997 116:1-11.
- Shugart LR, McCarthy JF, Halbrook RS. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal*. 1992 12:353-60.
- Silbergeld EK, Waalkes M, Rice JM. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med*. 2000 38:316-23.
- Soumillion A., Van Damme J., De Ley M. (1992). Cloning and specific polymerised-chain-reaction amplification of a third charge-separable human metallothionein isoform. *Eur. J. Biochem.*, 209,999-1004
- Spadaro JV, Rabl A. Pathway analysis for population-total health impacts of toxic metal emissions. *Risk Anal*. 2004 24:1121-41.
- Stohs S.J., Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.*; 2, 321-36.

- Suzuki KT, Yamamura M. Distribution of cadmium in liver and kidneys by loadings of various Cd-complexes and relative metal ratios in the induced metallothioneins. *Biochem Pharmacol.* 1979 28:3643-9.
- Swierczek S, Abuknesha RA, Chivers I, Baranovska I, Cunningham P, Price RG. Enzyme-immunoassay for the determination of metallothionein in human urine: application to environmental monitoring. 2004 *Biomarkers.* 9:331-340
- Tamai KT, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS, Thiele DJ. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeastcopper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 90:8013-7.
- Theocharis SE, Margeli AP, Koutselinis A. (2003) Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *Int J Biol Markers.*; 3: 162-9
- Thornalley PJ, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta.* 1985 827:36-44.
- Toriumi S, Saito T, Hosokawa T, Takahashi Y, Numata T, Kurasaki M. Metal binding ability of metallothionein-3 expressed in *Escherichia coli*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005 96:295-301.
- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. (1991). The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7, 337-347
- Udom AO, Brady FO. Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem J.* 1980 187:329-35.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005:1161-208.

- Vallee B. L., Maret W. (1993). The functional potential and potential functions of metallothioneins: a personal perspective. In *Metallothionein III - Biological roles and medical implications*. (Suzuki KT., Imura N. & Kimura M Eds.), Birkhauser Verlag, Basel Switzerland, pp. 1-27
- Vasak M Application of ¹¹³Cd NMR to metallothioneins. *Biodegradation*. 1998; 9:501-12.
- Vasak M, Overnell J, Good M. Spectroscopic and chemical approaches to the study of metal-thiolate clusters in metallothionein (MT). *Experientia Suppl.* 1987;52:179-89.
- Waalkes M.P., Wahba Z.Z., Koizumi T., Perantoni A., Bhave M.R. (1991). Cadmium-binding proteins in target tissues of cadmium carcinogenesis. In *Metallothionein in biology and medicine*. (Klaassen CD & Suzuki KT Eds.), CRC Press, Florida, pp.145-163
- Waalkes MP, Fox DA, States JC, Patierno SR, McCabe MJ Jr. Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicol Sci.* 2000 56:255-61.
- Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003 533:107-20.
- Winge DR, Nielson KB. Formation of the metal-thiolate clusters of rat liver metallothionein. *Environ Health Perspect.* 1984 54:129-33.
- World Health Organisation (WHO) (1992). *Environmental Health Criteria 134 - Cadmium* International Programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol.* 2005 18:339-53.
- Yu WH, Lukiw WJ, Bergeron C, Niznik HB, Fraser PE. Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2001 894:37-45

Zetterstrom R. Child health and environmental pollution in the Aral Sea region in Kazakhstan. *Acta Paediatr Suppl.* 1999 88:49-54.

Zikic RV, Stajn AS, Pavlovic SZ, Ognjanovic BI, Saicic ZS (2001). Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol Res.*; 1, 105-11.

Zug, G.R.; Vitt, L.J. & Caldwell, J.P. (2001) *Herpetology*, 2nd ed. Academic Press San Diego.

