



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN:  
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO:

BIOLOGIA DELL'INTEGRAZIONE INTERCELLULARE  
CICLO XXV

**ANALISI BIOINFORMATICA E MOLECOLARE DI CHERATINE E  
PROTEINE ASSOCIATE NELL'EPIDERMIDE DI CHELONI E  
LUCERTOLE**

**DIRETTORE DELLA SCUOLA:** PROF.SSA MARIA TERESA CONCONI

**COORDINATORE D'INDIRIZZO:** DOTT.SSA LUISA DALLA VALLE

**SUPERVISORE :** DOTT.SSA LUISA DALLA VALLE

**CORRELATORE:** PROF. LORENZO ALIBARDI

**DOTTORANDA :** FRANCESCA MICHIELI



## **Indice**

<b>Riassunto</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Introduzione</b>	<b>9</b>
1. Il tegumento dei Vertebrati: generalità	9
2. Adattamento alla vita terrestre	11
3. Corneificazione: il processo di cheratinizzazione	12
4. Componenti proteiche dell'epidermide dei Rettili e loro disposizione	12
5. Tegumento e processo di accrescimento epidermico nei Cheloni	13
5.1. Il tegumento di <i>Apalone spinifera</i> e <i>Pseudemys nelsonii</i> a confronto	19
6. Tegumento e processo di accrescimento epidermico nelle Lucertole	23
7. Tipologia di cheratine presenti nell'epidermide dei Rettili	27
7.1. Alfa-cheratine	27
7.2. Beta-proteine associate alle cheratine (KAbetaPs)	29
7.3. Analisi biomolecolare delle beta-proteine di rettile	32
8. Studio del promotore genico	39
<b>Scopo della ricerca</b>	<b>43</b>
<b>Materiali e Metodi</b>	<b>45</b>
9. Prelievo dei campioni	45
9.1. Cheloni	45
9.2. Lucertole	45
10. Estrazione dell'RNA totale	45
10.1. Controllo della qualità dell'RNA mediante elettroforesi in gel di agarosio	46
10.2. Quantificazione dell'RNA	47
11. Isolamento dell'RNA poly (A <sup>+</sup> ) dall'RNA totale	47
12. Trattamento con enzima <i>GsuI</i> ( <i>Fermentas</i> )	48
13. Sequenziamento 454	48
14. Trascrizione inversa dell'RNA (Retrotrascrizione)	49
15. Estrazione di DNA genomico	50
16. Amplificazione del DNA mediante <i>PCR</i> ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	51
16.1. Touch-down <i>PCR</i>	52
17. Analisi dei prodotti di amplificazione mediante separazione in gel di agarosio	52
18. Estrazione e purificazione di DNA da gel di agarosio	54
19. Analisi e quantificazione del DNA estratto da banda su gel di agarosio	54

20. Purificazione dei campioni di <i>PCR</i> tramite <i>kit</i> DNA <i>CLEAN AND CONCENTRATOR</i> ( <i>Zymo research</i> )	55
21. Amplificazione rapida delle estremità del cDNA mediata da RNA ligasi: <i>RLM-RACE</i> ( <i>RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends</i> )	55
21.1. 5'- <i>RLM-RACE</i>	56
22. Sequenziamento automatico del DNA	59
23. Reazione enzimatica tramite il <i>kit ExoSAP-IT</i> <i>USB Corporation</i>	60
24. <i>PCR</i> quantitativa ( <i>qRT-PCR</i> )	61
24.1. Preparazione delle rette di taratura	64
25. Clonaggio dei prodotti di <i>PCR</i>	64
25.1. Reazione di ligazione	64
25.2. Trasformazione di batteri JM109 competenti tramite <i>shock</i> termico	66
25.2.1. Preparazione dei batteri JM109 competenti	66
25.2.2. Trasformazione mediante <i>shock</i> termico	67
25.3. Controllo dell'avvenuto clonaggio mediante <i>PCR</i>	67
26. Purificazione del DNA plasmidico dai batteri (mini-prep)	68
27. Diluizioni delle mini-prep in base al numero di molecole	70
28. Strumenti bioinformatici utilizzati	70
<b>Risultati</b>	<b>77</b>
29. Cheloni	77
29.1. Ricerca molecolare e bioinformatica di alfa-cheratine e beta-proteine in <i>A. spinifera</i> e successivo confronto con i rispettivi putativi geni ortologhi in <i>P. nelsonii</i>	77
29.1.1. Alfa-cheratine	79
29.1.1.1. Alfa-cheratina 1 ( <i>As-AK1</i> )	79
29.1.1.2. Alfa-cheratina 2 ( <i>As-AK2</i> )	82
29.1.1.3. Alfa-cheratina 3 ( <i>As-AK3</i> )	85
29.1.2. Beta-proteine associate alle cheratine	89
29.2. Analisi quantitativa dell'espressione di alfa-cheratine e beta-proteine a confronto nei Cheloni <i>A. spinifera</i> e <i>P. nelsonii</i>	93
29.2.1. Confronto dell'espressione di <i>AK2</i> tra <i>A. spinifera</i> e <i>P. nelsonii</i>	94
29.2.2. Confronto dell'espressione di <i>AK3</i> tra <i>A. spinifera</i> e <i>P. nelsonii</i>	94
29.2.3. Confronto dell'espressione di beta-proteine tra <i>A. spinifera</i> e <i>P. nelsonii</i>	95
30. Lucertola verde americana <i>Anolis carolinensis</i>	95
30.1. Analisi quantitativa dell'espressione di alfa-cheratine e beta-proteine nel tegumento normale e in rigenerazione di <i>A. carolinensis</i>	98

30.1.1. Alfa-cheratine	98
30.1.2. Beta-proteine	101
40. Analisi bioinformatica del promotore genico	104
<b>Discussione</b>	<b>115</b>
41. Corneificazione nei Cheloni	115
41.1. Tipi e ruolo delle alfa-cheratine	115
41.2. Tipologie e ruolo delle beta-proteine (beta-proteine associate alle cheratine o KAbetaPs)	117
41.3. L'epidermide della tartaruga a guscio molle subisce un processo di corneificazione diverso rispetto alla tartaruga a guscio duro.	120
42. Proteine coinvolte nella rigenerazione dell'epidermide nella lucertola verde americana <i>A. carolinensis</i>	121
42.1. Alfa-cheratine espresse nel corso della rigenerazione epidermica	121
42.2. Beta-proteine espresse nel corso della neogenesi delle squame	122
43. Analisi bioinformatica del promotore genico	125
<b>Bibliografia</b>	<b>131</b>



## Riassunto

Il tegumento dei Rettili è molto particolare rispetto a quello degli altri Vertebrati in quanto è dotato di squame. Queste sono costituite da ispessimenti cornei dell'epidermide con una forma, estensione e grado di sovrapposizione variabile nei numerosi gruppi di Rettili a seconda dell'*habitat* in cui si sono adattati a vivere (Lillywhite e Maderson, 1982; Price, 1982; Irish *et al.*, 1988).

La componente proteica di questo peculiare epitelio è costituita principalmente da alfa-cheratine e beta-proteine associate alle cheratine o KAbetaPs, un tempo chiamate beta-cheratine a causa della presenza di foglietti beta e della capacità di formare filamenti.

Le alfa-cheratine o citocheratine sono presenti in tutti i Vertebrati e sono proteine strutturali fibrose appartenenti alla famiglia dei filamenti intermedi. Esse costituiscono l'impalcatura e determinano quindi la forma dei cheratinociti, sono responsabili della resistenza degli epitelii contro forze meccaniche e di tensione. Sono dotate di un peso molecolare che si aggira attorno ai 40-70 kDa, presentano un dominio centrale ad alfa-elica conservato per l'assemblaggio dei filamenti stessi, ed estremità globulari variabili (Steinert e Freedberg, 1991; Fuchs e Weber, 1994). Le KAbetaPs sono invece proteine esclusive dell'epidermide e di annessi cutanei di Rettili e Uccelli, sono le responsabili della formazione di uno spesso e robusto strato corneo in quanto si associano alle alfa-cheratine negli strati pre-cornei e progressivamente le mascherano fino a sostituirle completamente negli strati cornei più esterni dell'epidermide. Le beta-proteine sono inestensibili e non pieghevoli. La rigidità è dovuta principalmente al loro contenuto in cisteina, amminoacido che permette la formazione di ponti disolfuro che formano legami crociati intra- ed intermolecolari. Il meccanismo di aggregazione delle beta-proteine non è ancora del tutto noto ma modelli di predizione della loro struttura proteica indicano che la porzione centrale della molecola costituita da 34 amminoacidi ad alta omologia, anche chiamata "*core-box*", presenta una conformazione secondaria a foglietto beta (Fraser e Parry, 1996, 2011). Legami di interazione forte tra queste regioni beta sono ritenuti responsabili della formazione dei polimeri a partire dai monomeri di beta-proteina. I monomeri hanno basso peso molecolare, compreso tra i 10 e i 25 kDa, ridotta solubilità, dovuta presumibilmente ad una elevata quantità di glicina e un punto isoelettrico generalmente basico (Werlang e Brandelli, 2005).

Il presente lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio del ruolo svolto da alcuni tipi di alfa-cheratine e beta-proteine nell'influenzare il processo di corneificazione dell'epidermide in alcune specie di tartarughe e lucertole. La ricerca è stata suddivisa in tre filoni principali.

Nel primo filone sono state prese in considerazione due specie di tartarughe

dulcacquicole (*A. spinifera*, nota anche come tartaruga a guscio molle, e *P. nelsonii*, tartaruga a guscio duro) allo scopo di esaminare il ruolo di alcune citocheratine e beta-proteine associate nel conferire robustezza e durezza all'epidermide. In particolare *A. spinifera* è dotata di un tegumento non squamato che ha portato ad ipotizzare, nel tentativo di spiegare la consistenza soffice della cute, l'assenza di KAbetaPs o una loro modificazione nella regione del "core-box". Tramite la costruzione di una libreria di cDNA a partire da mRNA estratto dai bordi del carapace della tartaruga a guscio molle sono state isolate e in seguito caratterizzate alcune sequenze codificanti alfa-cheratine e beta-proteine. Successive analisi bioinformatiche hanno evidenziato la presenza di una regione "core-box" molto ben conservata in tutte le KAbetaPs identificate. Anche se tali analisi hanno confutato le ipotesi iniziali, rimane però ancora da chiarire come mai queste proteine non riescano ad aggregarsi per formare i tipici filamenti densi presenti negli strati beta degli altri Rettili. Confrontando in seguito mediante *Real-Time PCR* assoluta l'espressione di alfa-cheratine e beta-proteine isolate in *A. spinifera* con i rispettivi putativi geni ortologi presenti nella tartaruga a guscio duro *P. nelsonii*, si è rilevata una maggiore espressione di tutti i geni presi in considerazione nella tartaruga a guscio molle rispetto a quella a guscio duro. Questi risultati sono molto probabilmente imputabili non solo alla quantità e varietà di cheratine e proteine associate nelle due specie, ma anche a una diversa struttura e dinamica di rinnovo dell'epidermide: una maggiore velocità di ricambio cellulare che avviene per esfoliazione continua in *A. spinifera* contro una maggiore capacità di accumulo nel tempo di specifiche proteine dovuta a una muta periodica che avviene una volta all'anno in *P. nelsonii*.

Dal momento che la coda di lucertola in rigenerazione rappresenta un buon modello sperimentale per lo studio della formazione e differenziazione degli strati cornei del tegumento dei Rettili, nel secondo filone di ricerca è stata inoltre analizzata e confrontata tramite *Real-Time PCR* assoluta l'espressione di alcune citocheratine (tipo I, acido, e II, basico) e di particolari beta-proteine nella coda normale e in rigenerazione della lucertola verde americana *Anolis carolinensis*.

I risultati ottenuti hanno mostrato che i trascritti codificanti tali proteine sono maggiormente espressi nella coda in rigenerazione rispetto alla coda normale, fatto questo dovuto all'elevato tasso di differenziazione cellulare che si ha nel corso della rigenerazione delle squame, ma l'aspetto interessante è che ogni trascritto presenta un peculiare e diverso livello di espressione tra coda normale e coda in rigenerazione, a dimostrazione che i vari trascritti sono regolati in modo diverso a livello trascrizionale.

Infine, il terzo filone di ricerca ha riguardato un primo approccio di studio del promotore genico che scatena la rapida sintesi di beta-proteine durante il rinnovo epidermico che porta alla muta. Si è svolta l'analisi bioinformatica della regione



promotrice di tutte le 40 sequenze che codificano KAbetaPs isolate dal genoma completo dell'*A. carolinensis* (Dalla Valle *et al.*, 2010), allo scopo di individuare possibili *pattern* di siti di legame per fattori di trascrizione. Lo studio ha individuato alcuni fattori generali sempre presenti, alcuni molto ricorrenti e numerosi fattori specifici. Restano ancora necessarie ulteriori analisi di tipo sperimentale per identificare i fattori di trascrizione implicati nella regolazione dell'espressione genica tessuto-specifica di queste proteine.



## Abstract

The integument of Reptiles is different with respect to that of other Vertebrates because it is composed of scales, which are horny thickenings of the epidermis with shape, extension and different overlapping degrees in many groups of Reptiles depending on the habitat and adaptation (Lillywhite and Maderson, 1982; Price, 1982; Irish *et al.*, 1988).

The protein component of this peculiar epithelium consists mainly of alpha-keratins and keratin-associated beta-proteins (KAbetaPs), formerly indicated as beta-keratins, so called because the presence of beta-pleated sheets and filamentous aggregation.

The alpha-keratins or cytokeratins are present in all Vertebrates and they are fibrous structural proteins belonging to the intermediate filaments family. They form the framework and therefore determine the shape of keratinocytes and are responsible for the resilience in epithelia against mechanical forces and tensile strength. They have a molecular weight of 40-70 kDa and contain a conserved central alpha-helical structure for the assembly of the filaments and of globular variable N- and C- regions (Steinert and Freedberg, 1991; Fuchs and Weber, 1994). The KAbetaPs proteins are exclusive of epidermis and skin appendages of Reptiles and Birds and they are responsible for the formation of a thick and hard stratum corneum as they are associated with alpha-keratins in the pre-horny layers and progressively mask and replace them in the outermost horny layers of the epidermis. Beta-proteins are little extensible, non-pliable proteins. The characteristic rigidity is most likely due to their cysteine content that allows the formation of intra- and inter-molecular crosslinks (disulfide bridges) which confer compactness and resistance. The mechanism of aggregation of beta-proteins is not known in detail but the prediction models indicate that a 34 amino acid long central part of the molecule, including the highly homologous core-box presents a beta-sheet conformation (Fraser and Parry, 1996, 2011). Strong intermolecular bonds formed between these regions in numerous beta-protein monomers are believed to be responsible for the possible formation of polymers and of filaments. Monomer beta-proteins have low molecular weight (10-25 kDa), and a low solubility likely due to a high amount of glycine, and a basic isoelectric point (Werlang and Brandelli, 2005).

The present work is focused on the study of the role played by some types of keratins and beta-associated proteins in influencing the process of epidermal cornification in some species of turtles and lizards. The research has been divided into three main lines.

In the first line two species of freshwater turtles were considered (*A. spinifera*, also known as soft-shelled turtle, and *P. nelsonii*, hard-shelled turtle) in order to examine the role of cytokeratins and keratin-associated beta-proteins in the process of differentiation

and hardening of the epidermis. In particular, since *A. spinifera* does not possess a scaled integument, it was hypothesized that the soft consistency of its epidermis was due to absence of KbetaPs or that these proteins were missing of the core-box region. Through the construction of a cDNA library from the soft-shelled turtle carapace extracted-mRNA some sequences encoding alpha-keratins and beta-proteins were isolated and further characterized. Subsequent bioinformatic analyzes have shown the presence of a well conserved core-box region in all identified KbetaPs. Even though these analyzes have refuted the initial assumptions, it remains still unclear why these proteins are not able to aggregate and form the classic dense corneous material present in the beta-layer of the other reptiles. The comparison by absolute Real-Time PCR of alpha-keratins and beta-proteins expression in *A. spinifera* with their orthologous genes in the hard-shelled turtle *P. nelsonii*, has shown a higher expression of all genes in the soft-shelled turtle than in hard-shelled turtle. These results are most likely due not only to the quantity and variety of keratins and associated proteins in the two species, but also to a different structure and dynamics of epidermis renewal: a faster cell turnover that occurs by continues exfoliation in *A. spinifera* versus a greater accumulation ability over time of specific proteins due to a periodic wearing that takes place once a year in *P. nelsonii*.

Since the regenerating lizard tail is a good experimental model to study the formation and differentiation of the horny layers in reptilian epidermis, the second line of research has been addressed to the comparative study of the expression of some cytokeratins (type I, acid, and type II, basic) and some particular beta-proteins, using absolute Real Time PCR, in normal and regenerating tail of the American green lizard *Anolis carolinensis*.

The results obtained have showed that transcripts encoding these proteins are mainly expressed in the regenerating than in normal tail. This is likely due to the high rate of cell differentiation present in regenerating scales. Interestingly, each transcript has a peculiar difference of expression between normal and regenerating tail. These results are indicative of a different transcription regulation.

Finally, the third line of research has been focused on the initial attempt to study the gene promoter that triggers the rapid synthesis of beta-proteins during the renewal cycle that determines shedding. This has been done by analyzing by bioinformatic analysis the promoter region in all 40 KbetaPs isolated from the *A. carolinensis* genome (Dalla Valle *et al.*, 2010) in order to identify possible patterns of transcription factors binding site. The study has identified some general factors normally present and some others frequently occurring, including specific factors. Further experimental analysis is need to

identify the transcription factors that regulate the tissue-specific gene expression of these proteins.



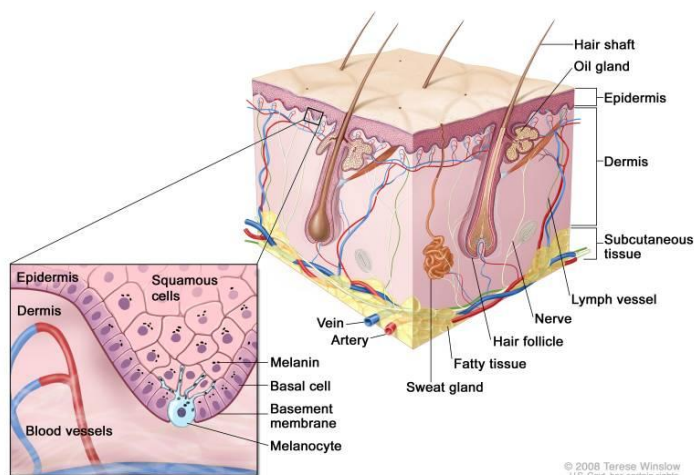
# Introduzione

## 1. Il tegumento dei Vertebrati: generalità

L'apparato tegumentario rappresenta lo strato di confine tra ambiente interno del corpo e ambiente esterno. Svolge quindi un importante ruolo di protezione meccanica nei confronti dei delicati tessuti sottostanti, ma funziona anche da barriera isolante contro la disidratazione e la penetrazione da parte di agenti chimici, fisici e biologici. Inoltre esplica altre importanti funzioni (Beaumont e Cassier, 1973; Romer e Parsons, 1987; Zavanella in "Anatomia comparata" Baldaccini *et al.*, 1996; Padoa, 1998; Liem *et al.*, 2002; Giavini e Menegola, 2010):

- negli Anfibi è sede di scambi gassosi, in questi Vertebrati infatti l'epidermide ha ancora una funzione respiratoria;
- negli Uccelli le penne vengono usate sia come isolante termico sia come mezzo di locomozione;
- anche il pelo nei Mammiferi svolge funzioni termoregolarie, sensoriali, e di protezione meccanica.
- il secreto di alcune ghiandole cutanee può avere funzione umettante, può anche costituire una sorta di segnale chimico per la comunicazione, o può venire usato come nutrimento per la prole, (ad esempio il latte nei Mammiferi);
- la colorazione della livrea può assumere funzioni mimetiche o di richiamo sessuale;
- la presenza di determinati annessi cutanei, come corna o artigli, può fungere da strumento di difesa-offesa;
- infine, nella cute sono presenti numerose terminazioni nervose e organi di senso capaci di rilevare stimoli tattili, pressori, termici e dolorifici.

Il tegumento è dunque un sistema molto complesso; esso è difatti composto da numerose tipologie di tessuti quali l'epiteliale, il tessuto connettivo, il tessuto adiposo e da una gran varietà di derivati epidermici (scaglie, squame, ghiandole, penne, peli, unghie, ecc.), peculiari delle diverse classi di Vertebrati. Nonostante la sua enorme variabilità, la cute di tutti i Vertebrati presenta comunque una struttura comune caratterizzata in genere da tre componenti: l'epidermide, il derma e la tela sottocutanea o ipoderma (Fig. 1).



**Figura 1.** Rappresentazione schematica della struttura del tegumento dei Mammiferi. A contatto con l'ambiente esterno si trova l'epidermide, seguita internamente dal derma e dalla tela sottocutanea. Il riquadro mette in evidenza lo strato basale che separa l'epidermide, in cui si trovano i cheratinociti e i melanociti, dal derma sottostante ricco di vasi sanguigni e di terminazioni nervose (immagine tratta da PDQ Cancer Information Summaries, Genetics of Skin Cancer, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65895/figure/CDR0000552637\\_\\_250/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65895/figure/CDR0000552637__250/)).

L'epidermide dei Vertebrati è un epitelio pavimentoso stratificato corneificato di origine ectodermica e costituisce l'interfaccia con l'ambiente esterno. Come tutte le altre tipologie di epitelii, l'epidermide non è vascolarizzata. Si compone di più strati di cellule sovrapposte, i cheratinociti, che poggiano su una lamina basale, la quale delimita inferiormente il confine con il derma. Quest'ultimo, derivante dal mesoderma, è invece ricco di vasi sanguigni che apportano i nutrienti anche all'epidermide mediante diffusione nei liquidi interstiziali. Il derma dei Vertebrati è formato in genere da due varietà di tessuto connettivo: di tipo lasso, chiamato anche strato spugnoso, superficiale, e di tipo compatto, noto come strato reticolare, in posizione più profonda. Nel primo sono presenti fasci sottili di fibre collagene ed elastiche prive di una orientazione ben definita e immersi in una matrice abbondante dalle cui proprietà dipendono gli scambi di metaboliti e gas fra cellule e sangue. Inoltre il derma lasso è dotato di un gran numero di cellule con funzione di difesa, come ad esempio macrofagi e linfociti, e con attività proliferativa, i fibroblasti, a cui è attribuito il ruolo di riparazione delle lesioni. Il secondo, invece, è costituito da un tessuto connettivo compatto composto di grossi fasci di fibre collagene ed elastiche disposti in modo parallelo rispetto alla superficie. La quantità di matrice e la numerosità cellulare sono limitate rispetto al derma lasso. Lo strato reticolare è dunque una porzione del tegumento molto resistente e svolge una funzione di protezione meccanica. Al di sotto di questo si trova la tela sottocutanea, anche nota come ipoderma, formata da tessuto connettivo lasso ricco di fibre elastiche.



Quest'ultimo strato si comporta come un piano di separazione atto a liberare il derma dai tessuti sottostanti permettendo lo scivolamento della cute e la conseguente formazione di ripiegamenti. In tale regione è possibile trovare cellule adipose le quali possono avere funzione di riserva, di protezione meccanica o di isolante termico (Beaumont e Cassier, 1973; Romer e Parsons, 1987; Zavanella in "Anatomia comparata" Baldaccini *et al.*, 1996; Padoa, 1998; Liem *et al.*, 2002; Giavini e Menegola, 2010).

## **2. Adattamento alla vita terrestre**

L'adattamento alla vita terrestre dagli Anfibi agli Amnioti è stato accompagnato da drastici cambiamenti del tegumento (Alibardi 2003a).

I Rettili, essendo i primi Amnioti, hanno evoluto uno strato corneo pluristratificato, assente nei pesci e comparso inizialmente nell'epidermide degli Anfibi adulti, basato su un processo di morte cellulare programmata. L'evoluzione di uno strato corneo ha richiesto la formazione *ex novo* di varie proteine e/o l'aumento della produzione di proteine di matrice, come ad esempio le proteine ricche in istidina (HRPs), proteine dell'involucro cellulare corneificato (es. involucrina, loricrina, sciellina) e di complessi lipidici per limitare la perdita d'acqua. Successivamente all'evoluzione di un'epidermide con cheratinizzazione di tipo *soft* nei Terapsidi (attualmente rappresentati dai Mammiferi) sono state prodotte altre proteine specifiche di involucrina e filaggrina nell'epidermide, e di tricoialina e cheratine dure negli speciali cheratinociti del pelo nei Mammiferi, i tricociti. Successivamente sono probabilmente comparse anche proteine ricche in glicina, tirosina e cisteina con la comparsa di una cheratinizzazione di tipo *hard* attraverso la genesi di annessi cutanei quali i peli, gli zoccoli, le corna e gli artigli (Kalinin *et al.*, 2002; Maderson, 1985; Wu *et al.*, 2004; Alibardi *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda i Rettili, questi Amnioti hanno evoluto un peculiare tipo di tegumento, il quale presenta un diverso grado di corneificazione nelle varie zone del corpo: l'epidermide presenta infatti delle aree di ipercheratinizzazione conformate in squame cornee, sovrastanti un cuscinetto dermico, noto come cuscinetto della squama. Tali regioni sono separate da porzioni di cute più sottile, le regioni cerniera, che conferiscono flessibilità alla pelle (Baldaccini *et al.* 1996). Le squame si distinguono per forma, dimensione, estensione e grado di sovrapposizione nei diversi gruppi di Rettili (Lillywhite e Maderson, 1982; Price, 1982; Irish *et al.*, 1988). Come altre tipologie di annessi cutanei, queste sono formate da grandi aree di interazione dermo-epidermica. L'evoluzione di tali strutture è caratterizzata dalla produzione di specifiche

cheratine *coiled-coil* e proteine associate nella matrice presente tra i filamenti (Alibardi *et al.*, 2009).

### **3. Corneificazione: il processo di cheratinizzazione**

L'epidermide dei Vertebrati è costituita da cheratinociti i quali migrando dallo strato basale interno, di tipo proliferativo, verso l'esterno si differenziano progressivamente in corneociti. Responsabile di tutto ciò è l'attivazione di specifici geni durante il processo migratorio con conseguente produzione di nuove proteine, inizialmente di tipo *soft* (Kalinin *et al.*, 2002; Resing e Dale, 1991; Steinert, 1998; Wu *et al.*, 2004). Le proteine strutturali più abbondanti dell'epidermide sono le cheratine. Queste vanno gradualmente ad accumularsi nelle cellule, che inizialmente sono di forma cuboidale o cilindrica, fino a riempire tutto lo spazio a loro disposizione, provocando la morte cellulare negli strati più esterni. A questo punto le cellule perdono la loro caratteristica forma e si appiattiscono le une sulle altre andando così a formare uno spesso strato corneo che si desquama in continuazione ma che viene incessantemente rigenerato dagli strati sottostanti.

### **4. Componenti proteiche dell'epidermide dei Rettili e loro disposizione**

Nel tegumento dei Rettili si trovano proteine strutturali di natura fibrosa quali le citocheratine, note anche come alfa-cheratine, presenti in forma di tonofilamenti negli strati profondi dell'epidermide di Cheloni e Arcosauri, negli strati alfa dei Lepidosauri e a livello delle regioni cerniera localizzate tra le squame. Procedendo dagli strati interni verso quelli esterni i filamenti intermedi vengono associati e successivamente mascherati o sostituiti da proteine indicate in precedenza come beta-cheratine (Baden e Maderson, 1970; Maderson, 1985). Tali piccole proteine sono indicate attualmente come beta-proteine associate alle cheratine (KbetaPs) e determinano l'apparente scomparsa delle alfa-cheratine nello strato corneo (Alibardi *et al.*, 2007, 2009; Toni *et al.*, 2007). E' proprio la presenza di queste piccole beta-proteine che compongono la matrice fibrosa ed amorfa presente tra i filamenti di cheratina, a caratterizzare l'epidermide corneificata dei Rettili.

Nei corneociti dei Mammiferi sono presenti proteine associate alle cheratine chiamate proteine dell'involucro cellulare corneo (CCE) (Kalinin *et al.*, 2002). Recenti studi di immunocitochimica e *immunoblotting* hanno evidenziato che il tegumento dei Rettili possiede alcuni epitopi comuni a queste tipologie di proteine presenti nei Mammiferi (Alibardi, 2002a,b, 2003b; Alibardi e Toni 2004, 2005a,b). Ad esempio una proteina *loricrina-like* è stata rinvenuta negli strati di transizione e corneo dell'epidermide di

tartaruga, nelle regioni cerniera tra le squame di coccodrillo, nello strato lacunare dei serpenti. La sciellina è stata trovata nell'epidermide soffice delle tartarughe e nelle lucertole. Sono presenti anche proteine simili all'involucrina e piccole proteine ricche in prolina.

Tutte queste proteine hanno la capacità di aggregare tra loro i filamenti di cheratina allo scopo di corneificare estese porzioni citoplasmatiche dei corneociti (Holbrook, 1989). Le proteine di matrice o di CCE intervengono nella formazione di una membrana cellulare corneificata in grado di resistere a condizioni chimiche estreme e di costituire una barriera sia di tipo meccanico sia contro l'invasione da parte di agenti patogeni (Steinert e Marekov, 1995, 1996; Kalinin *et al.*, 2002).

Nell'epidermide dei Rettili sono stati descritti e localizzati tramite tecniche di immunoistochimica anche alcuni enzimi ma la loro specifica funzione non è ancora del tutto chiara (Goslar, 1958, 1964; Spearman, 1966; Roth e Jones, 1967; Spearman e Riley, 1969; Banerjee e Mittal, 1978).

## **5. Tegumento e processo di accrescimento epidermico nei Cheloni**

Il tegumento dei Cheloni è molto particolare in quanto presenta due tipologie diverse di corneificazione: morbida nella cute di collo, coda e zampe, e dura nel guscio (Parakkal e Alexander, 1972; Maderson, 1985; Landmann, 1986). E' proprio quest'ultimo che contraddistingue le tartarughe da tutti gli altri gruppi di Rettili. Superficialmente la corazza è costituita da materiale corneo ed è suddivisa in squame note con il nome di scudi, i quali presentano modalità di rinnovo peculiari a seconda della specie di appartenenza. Tali derivati cutanei mostrano esclusivi disegni ornamentali e colorazioni che caratterizzano la livrea delle numerose varietà di tartarughe. Il *pattern* finale di pigmentazione epidermica in questi Rettili è determinato dai melanosomi presenti nello strato beta dell'epidermide (Alibardi e Thompson, 1999a) a cui contribuiscono, con modalità diverse da regione a regione della pelle, i cromatofori dermici (Alibardi, 2011). In profondità, invece, si trovano delle piastre ossee chiamate anche ossa dermiche o osteodermi, le quali, saldate tra loro, possiedono un'organizzazione che non rispecchia mai quella degli scudi cornei sovrastanti. E' proprio questo strato a conferire rigidità al guscio. Le piastre ossee si sviluppano in seguito a modificazioni del derma, tramite un processo di ossificazione del connettivo che successivamente si andrà a suturare con alcune parti dello scheletro dei Cheloni (Zangerl, 1969)

Le tartarughe appartenenti alla famiglia *Trionychidae*, ad esempio il genere *Apalone*, sono strettamente adattate alla vita acquatica, e rappresentano tartarughe dal guscio molle. Gli adulti presentano un dermascheletro ridotto rispetto ai Cheloni a guscio duro e il loro carapace è formato da uno strato epidermico sottile, liscio, non suddiviso in

scudi e di consistenza simile a cuoio. Questo molto probabilmente rappresenta il risultato del tipo di adattamento a cui sono andate incontro, che permette a tali tartarughe di muoversi con velocità ed efficienza in acqua (Alibardi e Toni, 2006a).

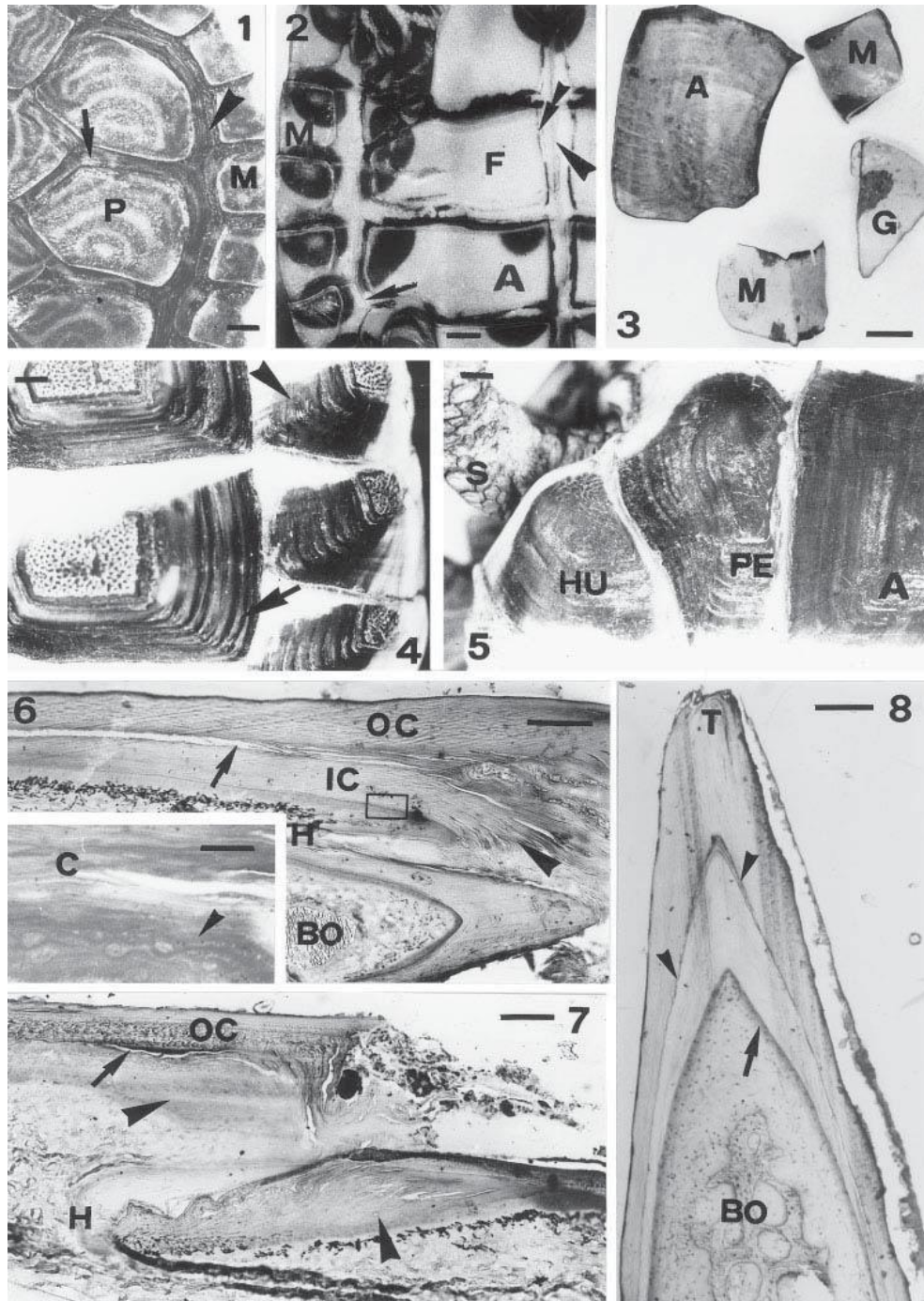
Oltre alla protezione, nei Cheloni il guscio ha anche funzioni mimetiche e la sua parte dorsale, il carapace, è utilizzato per favorire l'assorbimento di calore fornito dai raggi solari.

La crescita in questi animali avviene sia a livello delle ossa dermiche sia degli scudi cornei con la deposizione di nuovo materiale corneo (Zangerl, 1969; Alibardi, 2005, 2006a). Nei giovani esemplari le lamine ossee sono ancora separate tra loro ed è per questo che la corazza si presenta di consistenza molle se sottoposta a una certa pressione. Solo successivamente esse si saldano assieme. Nei soggetti anziani le suture possono essere ossificate.

Nelle testuggini gli scudi si allargano per deposizione di nuovo tessuto corneo attorno allo scudo preesistente il quale, con il passare del tempo, si sposta lateralmente mantenendo comunque il contatto iniziale con la rispettiva piastra ossea sottostante. Gli scudi delle tartarughe terrestri presentano in genere anelli concentrici costituiti da materiale corneo contenente beta-proteine (beta-cheratine). Questi ultimi, a volte incompleti, a volte non ben visibili a causa dell'usura, corrispondono a cicli di crescita dell'animale.

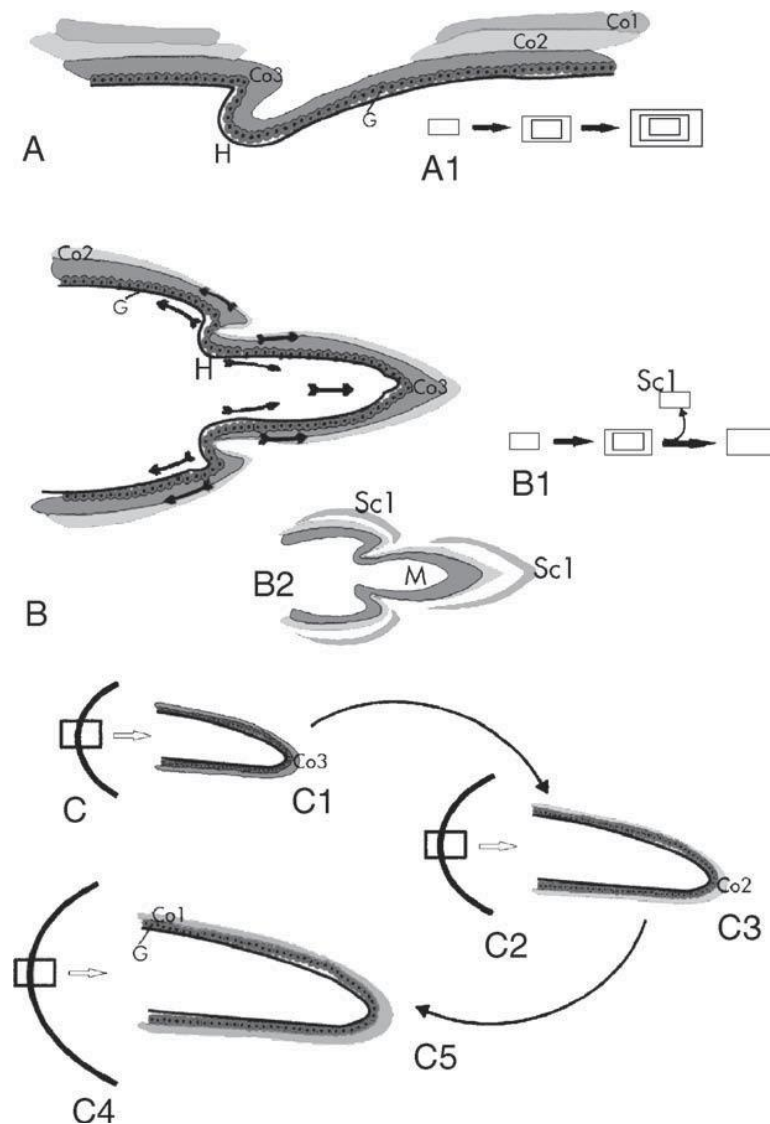
Anche in alcune specie di tartarughe dulcacquicole sono rinvenibili simili processi di crescita. Ad ogni strato depresso corrisponde un periodo di crescita non necessariamente annuale ma di durata variabile a seconda delle stagioni e dello stato di salute degli animali.

In molte specie acquatiche, al termine del periodo di accrescimento, lo strato corneo esterno degli scudi viene perso completamente. In *Chrysemis picta*, *Pseudemys (Trachemys) scripta*, e in *Pseudemys nelsonii* lo scudo viene eliminato in un pezzo unico, perché sostituito da un altro sottostante già formato e sempre adeso alla rispettiva piastra ossea (Fig. 2).



**Figura 2.** Le foto da 1 a 8 mostrano gli scudi del carapace di *Chrysemys picta* durante la fase di ricambio con quelli nuovi sottostanti. Il materiale è stato raccolto in tarda primavera. La colorazione utilizzata è il blu di toluidina. Barra = 1 mm. In particolare, le immagini 4 e 5 mostrano gli aspetti generali degli anelli di crescita degli scudi marginali (M) (contrassegnati da punte di freccia) e pleurali (P) (contrassegnati con frecce) nella testuggine *Testudo hermanni*. F, scudo femorale; A, scudo addominale; G, scudo del piastrone gulare; HU, scudo del piastrone omerale; PE, scudo pettorale; S, squame degli arti anteriori; OC, strato corneo esterno; IC, strato corneo interno; C, strato corneo; H, regione cerniera; BO, ossa dermiche; T, punta del margine dello scudo del piastrone. Nella foto 6 la barra è di 100  $\mu$ m, nella 7 è di 50  $\mu$ m, nella 8 è di 40  $\mu$ m; in tutte le altre immagini è di 1 mm (immagine tratta da Alibardi, 2005).

In altre specie invece, la caduta dei vecchi scudi avviene gradualmente per perdita di porzioni anche molto piccole. In *Apalone spinifera* invece il processo di rinnovo epidermico è di tipo continuo durante tutto l'anno e la crescita avviene prevalentemente lungo i bordi del carapace (Alibardi, 2006a; Alibardi e Toni, 2006a) (Fig. 3).



**Figura 3.** Disegno schematico che spiega il processo di crescita degli scudi cornei in *Testudo hermanni* (A-A1); in *Chrysemys picta* (B-B2) e *Apalone spinifera* (C-C5). A1, sequenza di crescita di uno scudo con formazione dell'anello. B1, sequenza di crescita di uno scudo con desquamazione dello strato corneo esterno. B2, desquamazione dello strato corneo esterno (SC1). C, C2, C4, profilo del carapace durante gli stadi di crescita progressivi (freccie curve); C1, C3, C5, sezione del margine del carapace durante gli stadi di crescita progressiva (freccie curve). CO1, strato corneo esterno, CO2, strato corneo intermedio; CO3, strato corneo interno; G, strato germinale; H, regione cerniera; SC1, scissione dello strato corneo esterno; M, scudo marginale (immagine tratta da Alibardi, 2006a).

Nei Cheloni (tartarughe e testuggini) parte del guscio danneggiato può venire riparato e nuove ossa dermiche si formano sotto ai vecchi scudi cornei, ma le nuove squame

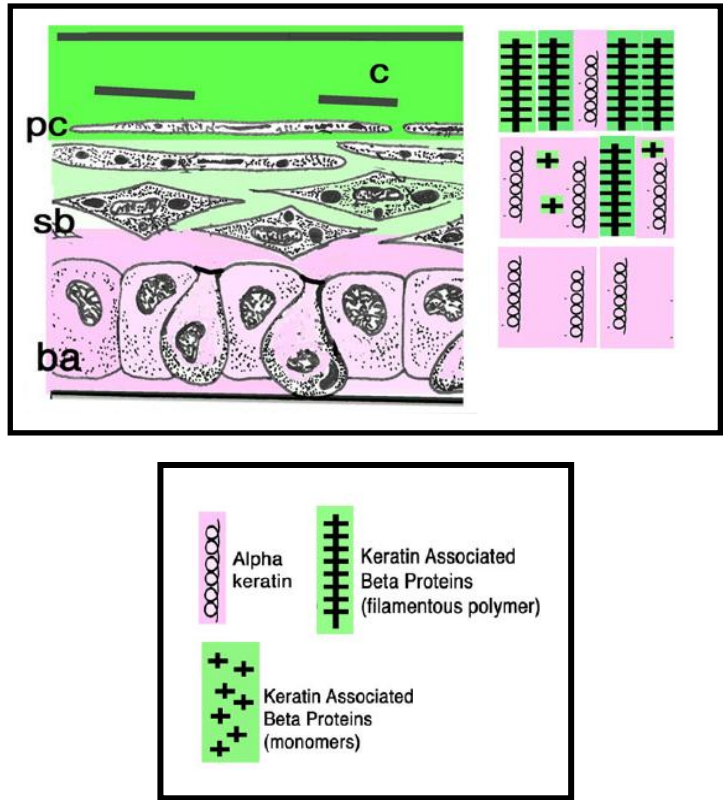
sembrano avere una morfologia irregolare rispetto a quella degli scudi originali (Bellairs e Bryant, 1985). Il processo di guarigione può durare oltre l'anno, in base all'estensione della cute danneggiata. Questa verrà in seguito ricoperta con squame atipiche. La coda può essere scarsamente rigenerata nella tartaruga *Emydura* sp. ma non in *Pseudemys nelsonii* o *Chrisemis picta*. I dettagli istologici non sono comunque disponibili (Kuchling, 2005).

Nell'epidermide del guscio lo strato basale è da cubico a colonnare. E' presente un unico strato sopra-basale durante la stagione di riposo (nelle specie adattate alle latitudini temperate), mentre più strati sopra-basali sono prodotti durante l'attiva fase di crescita (Alibardi, 2005). Le cellule beta mantengono confini irregolari entro lo strato corneo nuovamente generato, invece tali confini spariscono in parte nella porzione più superficiale a causa della "fusione" di tali cellule per dare origine a uno spesso e robusto strato corneo alla maturità, che può essere pesante e può anche contenere del calcio (Spearman, 1966; Alibardi e Thompson, 1999a).

Il guscio sembra essere prevalentemente costituito da beta-proteine, che vanno a sostituire progressivamente le alfa-cheratine presenti invece nello strato profondo germinale (Fig. 4).

La morbida epidermide di zampe, collo e coda presenta una superficie liscia o rugosa. In quest'ultimo caso le squame sono rappresentate semplicemente da pieghe della pelle e una differenziazione regionale lungo la loro superficie non è presente (Alibardi e Toni, 2006a). Tale epidermide è continuamente rinnovata e la sua struttura istologica è relativamente semplice; l'epitelio infatti è pluristratificato e cheratinizzato, ma è assente uno strato granuloso (Spearman, 1969; Alexander, 1970; Henrikson e Matoltsy, 1970; Matoltsy e Huszar, 1972; Matoltsy e Bednarz, 1975; Alibardi, 1999, 2002c). Precedenti studi isto-autoradiografici con somministrazione di istidina triziata, hanno confermato la mancanza di strutture equivalenti ai granuli di cheratoialina nello strato pre-corneo (di transizione) delle tartarughe (Fukuyama ed Epstein, 1968; Alibardi, 2002c). Lo strato basale varia da piatto a colonnare a seconda dell'attività proliferativa presente durante l'anno. Esami ultrastrutturali su epidermide morbida di tartaruga hanno identificato la presenza di corpi lamellari, e di immunoreattività loricrina-like, filaggrina-like e di transglutaminasi nello strato spinoso superiore e in quello di transizione. Lipidi e muco sono usati come molecole di matrice (Matoltsy, 1987; Alibardi *et al.*, 2004).

In quest'ultimo tipo di tegumento sono prevalentemente espresse le alfa-cheratine. Tra di esse sono comunque state ritrovate anche piccole quantità di beta-proteine, che invece sono di gran lunga più abbondanti nel tegumento morbido degli arti e della coda delle tartarughe terrestri (*Testudo* sp, *Gopherus* sp; Baden e Maderson, 1970) (Fig. 4).



**Figura 4.** Rappresentazione schematica che illustra la distribuzione di alfa-cheratine e beta-proteine nell'epidermide dei Cheloni. Ba, strato basale, sb, strato sopra-basale, pc, strato pre-corneo, c, strato corneo (immagine tratta da Alibardi, 2012d).



### 5.1. Il tegumento di *Apalone spinifera* e *Pseudemys nelsonii* a confronto



**Figura 5.** A sinistra foto di *A. spinifera*. A destra *P. nelsonii*.

Le tartarughe appartenenti alla famiglia *Trionichydae*, come *A. spinifera* (Fig. 5), differiscono dalla maggior parte dei Cheloni in quanto presentano un tipo di tegumento privo di squame. In particolare l'epidermide del guscio assomiglia a quella di arti, collo e coda, benché sia più spessa.

Queste tartarughe di acqua dolce presenti nell'America del Nord passano la maggior parte del tempo sommerse a differenza di altre specie di tartarughe; quindi la loro epidermide deve essere particolarmente resistente all'acqua. Gli studi morfologici hanno infatti rilevato la presenza di granuli deputati alla produzione di muco e lipidi. La cute morbida di questi animali è ondulata e consiste di uno strato basale, 2-4 strati sopra-basali, uno strato di transizione e strati cornei pluristratificati (Fig. 7) (Spearman, 1969; Alexander, 1970; Matoltsy e Huszar, 1972; Matoltsy e Bednarz, 1975; Wyld e Brush, 1979; Alibardi, 2002c). L'epidermide del guscio è costituita da uno strato corneo composto di corneociti che ricordano quelli dei Mammiferi, ancora separati gli uni dagli altri, circondati da un involucro cellulare corneificato nel quale sembrano mancare i tipici aggregati di beta-proteina. Un tempo si pensava che tali proteine fossero assenti nella cute di queste particolari tartarughe (Baden e Maderson, 1970; Maderson, 1985). Invece recenti studi hanno evidenziato la presenza di piccole quantità di beta-proteine anche nell'epidermide morbida di arti, coda e collo (Alibardi 2006a; Alibardi e Toni, 2006a).

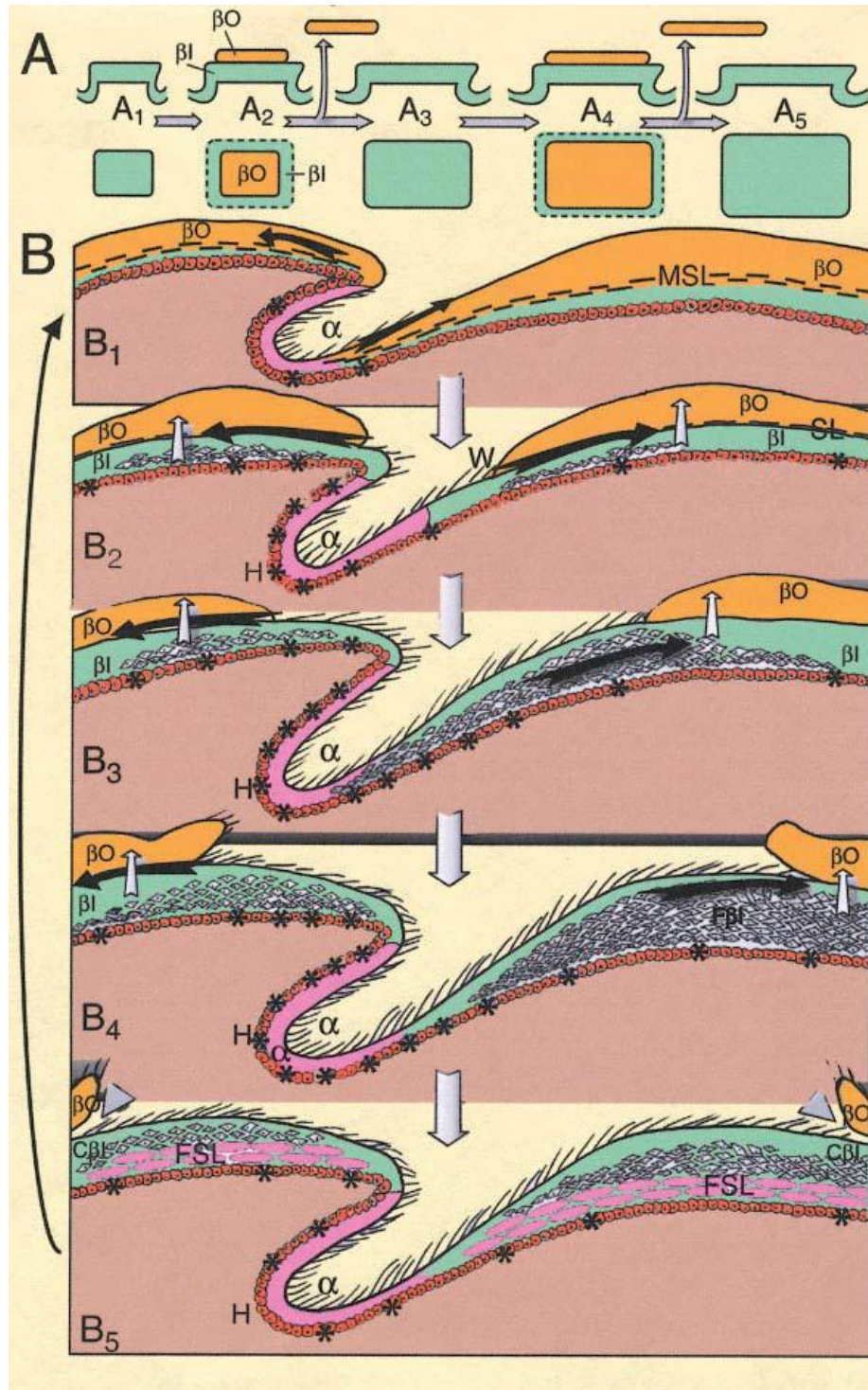
Il derma è molto spesso e presenta numerosi fasci di fibre collagene intrecciati (Fig. 7). Si ritiene possa essere la tipologia di quest'ultimo tessuto, con una struttura particolarmente ordinata, a conferire una resistente barriera meccanica che compenserebbe la relativa sofficià dell'epidermide, e la presenza di ossa dermiche ridotte. Il guscio risultante è dunque flessibile, leggero e la sua forma può venire facilmente modificata dalla contrazione o distensione dei muscoli dorsali, proprietà che

permette una maggiore agilità nel nuoto rispetto alle altre tartarughe dal guscio rigido (Alibardi e Toni, 2006a).

Mentre nelle tartarughe a guscio duro il rinnovo dello strato corneo è lento o intermittente a tempi lunghi (una volta all'anno), in *A. spinifera* sembra che il tipo di epidermide sia del guscio sia di arti, coda e collo venga rinnovata per desquamazione più o meno continua, come avviene nei Mammiferi.

In generale quindi la cute dei Cheloni appartenenti alla famiglia *Trionichyidae* è simile a quella morbida che si trova in arti, coda e collo di altre specie di tartarughe, come ad esempio in *Pseudemys nelsonii* (Fig. 5), tartaruga a guscio duro, dove invece lo strato corneo del guscio è compatto e ricco di beta-proteine. Queste ultime si aggregano con il passare del tempo a formare robusti intrecci di materiale corneo, i quali, aumentando sempre più di volume, riempiono completamente i corneociti. Il meccanismo di parziale fusione delle membrane plasmatiche, che dà così origine a una sorta di “complesso sinciziale” nello strato corneo-beta compatto, non è noto. Questo processo contribuirebbe quindi nell'indurire gli strati beta delle tartarughe d'acqua dolce e terrestri. (Alibardi e Toni, 2006b).

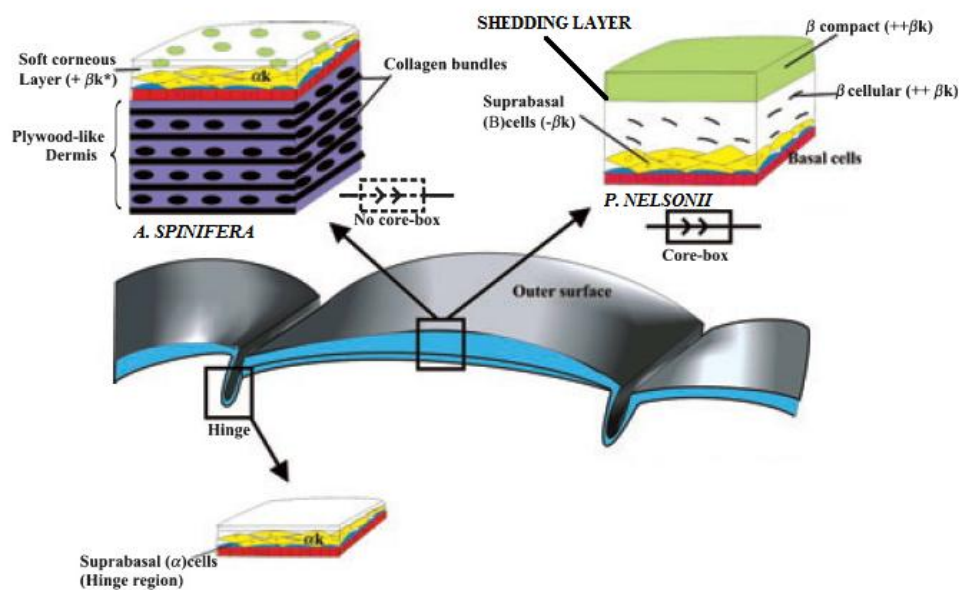
In *C. picta*, *P. scripta* e *P. nelsonii* inoltre, probabilmente in autunno inoltrato nei nostri climi, vengono prodotti sotto lo strato corneo di ciascuno scudo un gran numero di cellule sottili che assomigliano ai corneociti alfa del tegumento soffice, che andranno a formare uno strato di desquamazione (*shedding layer*, Fig. 7) nella successiva stagione primaverile (Alibardi, 2005, 2006a). A primavera/inizio estate si avrà nuovamente una massiccia produzione di beta-corneociti sotto a questo strato di desquamazione ancora immaturo. La differente consistenza dello strato epidermico esterno e del sottostante strato di desquamazione, assieme a probabili reazioni enzimatiche di degradazione delle giunzioni cellulari, provocherà la perdita dell'intera superficie esterna degli scudi, giacente al di sopra dello strato di desquamazione. Sarà il nuovo strato corneo interno, prodotto sotto a quello di scissione nella nuova stagione calda, ad ispessirsi fino a formare un nuovo strato corneo (Fig. 6).



**Figura 6.** Disegno schematico della modalità di crescita dell'epidermide nella tartaruga *Chrysemys picta* durante la fase di desquamazione. A. Vista generale della fase progressiva di allargamento dello scudo e di desquamazione dello strato corneo esterno (sezioni nella sequenza in alto) con il successivo allargamento dello scudo (nella vista dorsale in alto). B. Dettagli della crescita dalla regione cerniera in sezione longitudinale (B1, riposo o basso tasso di rinnovo; B2, inizio della crescita; B3-4, crescita attiva e desquamazione in B5).  $\alpha$ , alfa-cellule (sfilacciatura sulla superficie degli scudi dovuta a usura); A1, scudo della tartaruga alla nascita; A2, crescita (linea tratteggiata) e formazione del primo strato di scissione; A2-

3, desquamazione del primo strato corneo esterno che lascia emergere il sottostante nuovo scudo allargato (A3); A4, crescita (linea tratteggiata) e formazione del secondo strato di scissione; A4-5, desquamazione del secondo strato corneo esterno che permette allo scudo sottostante allargato di emergere (A5);  $\beta$ I, strato corneo beta interno;  $\beta$ O, strato corneo beta esterno; F $\beta$ I, cellule beta durante la loro differenziazione appartenenti allo strato beta interno in via di formazione; FSL, differenziazione delle cellule alfa dello strato di scissione in via di formazione; H, regione cerniera; MSL, strato di scissione in via di maturazione; SL, strato di scissione; W, strato di esfoliazione. Le frecce indicano il distacco dello strato corneo esterno; gli asterischi indicano le cellule in divisione. Le frecce nere curve indicano crescita laterale; le frecce bianche perpendicolari indicano crescita verticale (immagine tratta da Alibardi, 2005).

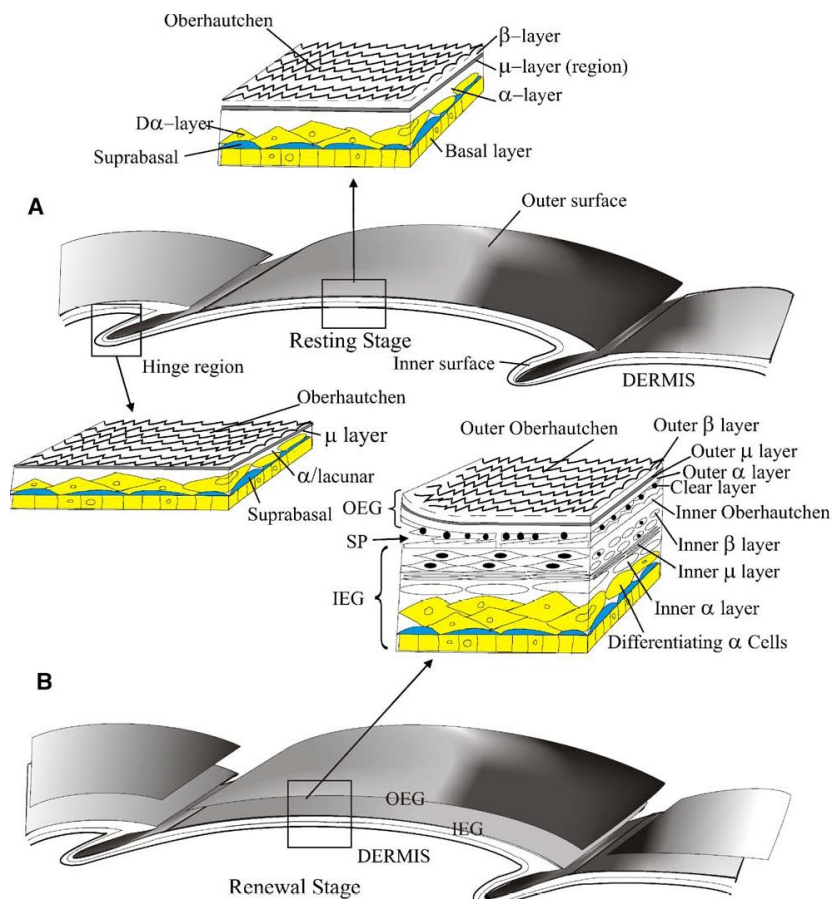
Tale processo, che mantiene lo spessore dello strato corneo circa costante, ha molto probabilmente il ruolo di mantenere leggera la massa corporea delle specie acquatiche, senza produrre uno spesso e pesante strato corneo tipico invece delle tartarughe terrestri. E' anche probabile che le sottili alfa-cellule che contengono lipidi abbiano un ruolo di barriera contro la perdita d'acqua e di isolante termico nei confronti dei tessuti sottostanti durante la rigida stagione invernale (Willard *et al.*, 2000; Alibardi, 2006a).



**Figura 7.** Rappresentazione schematica che mette in rilievo il confronto tra le diverse tipologie di tegumento presenti in due differenti specie di tartarughe, *A. spinifera*, nota anche come tartaruga a guscio molle, e *P. nelsonii*, tartaruga a guscio duro (immagine tratta da Alibardi *et al.*, 2007).

## 6. Tegumento e processo di accrescimento epidermico nelle lucertole

La complessa epidermide dei Lepidosauri (lucertole e serpenti) è formata da diversi strati prodotti in un processo ciclico chiamato ciclo di muta (Maderson *et al.*, 1972; Maderson, 1985; Landmann, 1986). Partendo dall'esterno e procedendo verso l'interno, i differenti strati prendono il nome di *Oberhautchen* e strato beta seguiti dagli strati *mesos* e alfa (Fig. 8). Quest'ultimo è ulteriormente suddiviso in strato lacunare, chiaro e alfa maturo. I primi due strati sono rigidi e conferiscono resistenza meccanica agli strati sottostanti, inizialmente costituiti da cellule vive. Anche quando i vari strati alfa maturano si forma un tessuto corneo con caratteristiche diverse da quelli beta più esterni. Gli strati alfa maturi forniscono una barriera contro la perdita d'acqua e in particolare gli strati alfa e lacunare determinano l'elasticità e la flessibilità della pelle (Maderson, 1985; Maderson *et al.*, 1998; Alibardi e Maderson, 2003).



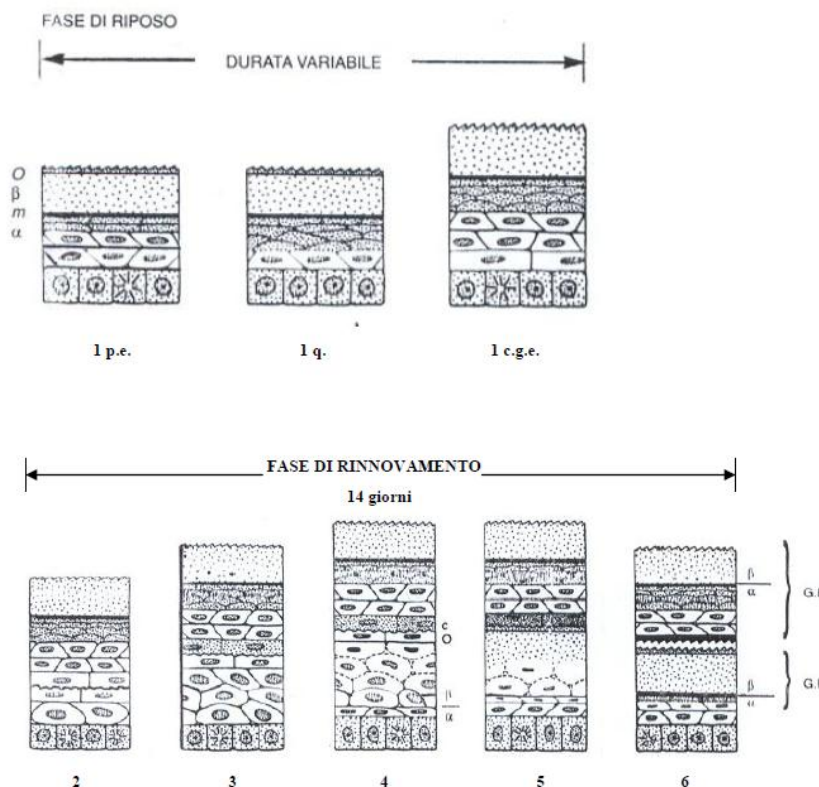
**Figura 8.** Disegno rappresentativo della struttura della squama di lucertola in fase di riposo (A) e in fase di rinnovo nello stadio 4 del ciclo di muta (Maderson, 1985; Landmann, 1986) (B). Legenda: IEG: generazione epidermica interna; OEG: generazione epidermica esterna; SP: muta (da Alibardi e Toni, 2006b).

Il ciclo di muta è suddiviso in due fasi:

- una di riposo, di durata variabile a seconda della specie, delle stagioni e delle condizioni di salute dell'animale, in cui la proliferazione è interrotta o ridotta,
- una di rinnovo di circa 15 giorni.

In genere la fase di rinnovo termina con la perdita di un astuccio corneo o *exuvia* nei serpenti o di lembi di epidermide nelle lucertole. Nella fase di rinnovo sono visibili due generazioni epidermiche: una interna e una esterna. Quando gli strati profondi della generazione esterna si sono differenziati in lacunare e chiaro, si forma un piano di scissione tra quest'ultimo e l'*Oberhautchen* della generazione epidermica interna e questi due strati, chiaro ed *Oberhautchen*, insieme vanno a costituire il "complesso di desquamazione o di muta". E' a questo livello che le due generazioni epidermiche si separano. La muta avviene perché sono prodotti in successione due strati di consistenza diversa, quello chiaro sopra ed *Oberhautchen* sotto, tra cui avverrà la separazione. Il processo che li separa permette il distacco della generazione esterna a seguito della degradazione delle giunzioni cellulari e del logorio tra strati con diversa composizione proteica e resistenza meccanica (Goslar, 1958, 1964; Alibardi, 2012d).

L'intero ciclo di muta è stato suddiviso da Maderson (1985) in sei stadi come si può osservare nella figura 9.

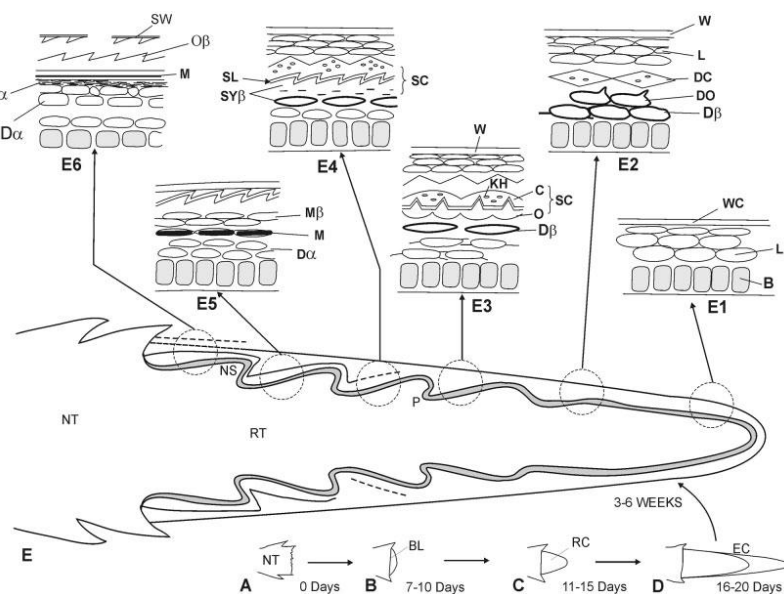


**Figura 9.** Rappresentazione schematica dell'epidermide dei Lepidosauri. I numeri indicano lo stadio

raffigurato. La fase di riposo (stadio 1) comprende uno stadio immediatamente successivo all'esuviazione (1 p.e.), uno stadio quiescente (1 q.) e uno stadio durante il quale viene completata la generazione esterna dell'epidermide (1 c.g.e.). Nella fase di rinnovamento, si forma dapprima lo strato beta ( $\beta$ ), poi inizia la formazione dello strato alfa ( $\alpha$ ); successivamente si completa il processo di corneificazione dello strato beta e dello strato *mesos* (m) della generazione interna (G.I.) e compare una fessura tra la generazione esterna (G.E.) e l'*Oberhautchen* (O) della generazione interna; al termine dello stadio 6 avviene il distacco della generazione esterna (modificato da Landmann, 1979).

Nelle lucertole non è possibile determinare la fase del ciclo di muta da un esame esterno della cute. La fase di rinnovo può essere però indotta dopo amputazione della coda, processo che ne stimola la rigenerazione nella maggior parte dei casi (Alibardi, 1994a,b, 1995a,b,c). Il processo di distacco della coda nelle lucertole prende il nome di autotomia (o autoamputazione) ed è un meccanismo naturale di difesa attuato dalle lucertole per sfuggire ad un predatore. Bellairs e Bryant (1985) hanno studiato ampiamente questo fenomeno. Generalmente l'autotomia nei Rettili coinvolge la rottura e conseguentemente la perdita della coda che avviene in corrispondenza di determinati siti conosciuti con il nome di piani di frattura. Questi sono presenti in quasi tutte le vertebre caudali, ad eccezione di quelle più prossimali. Ciascun piano di frattura passa attraverso il centro e l'arco neurale di ciascuna vertebra. Le vertebre sono strutture intersegmentali, essendo derivati dalla porzione posteriore di uno sclerotomo e dalla porzione anteriore dello sclerotomo successivo (Williams, 1959; Werner, 1971; Winchester e Bellairs, 1977). I muscoli caudali sono invece segmentali, e prolungamenti muscolari provenienti da direzioni opposte si incontrano a livello di ciascun piano di frattura. Le arterie caudali sono dotate di sfinteri muscolari davanti a ciascuno di tali piani e le vene presentano valvole. L'autotomia avviene tramite un processo attivo che necessita della contrazione dei muscoli caudali. La coda deve subire un ripiegamento ad angolo acuto su di un lato e subito dopo sul lato opposto, in modo da provocare la frattura della vertebra e il conseguente distacco completo della coda. Dopo la rottura del centro vertebrale, le estremità dei muscoli caudali si separano. La fuoriuscita di sangue viene impedita grazie alla contrazione dei muscoli dello sfintere arterioso e alla chiusura delle valvole venose. La coda, in seguito al processo di autotomia, si contorce per qualche istante, e i suoi movimenti convulsi possono distrarre l'attenzione di un predatore mentre la lucertola è libera di fuggire. Quando la coda rigenera, al posto delle vertebre si forma un cilindro di cartilagine in cui sono assenti i piani di frattura. Quindi nel caso di una ulteriore autotomia della coda, il piano di distacco della coda dovrà essere presente nelle porzioni anteriori rispetto alla coda rigenerata (Bellairs e Bryant, 1985; Pough *et al.*, 1993).

Nell'epidermide della coda in rigenerazione è presente una sequenza di formazione delle squame (neogenesi) che riproduce la fase di rinnovo del ciclo di muta (Maderson, 1985; Alibardi, 1994a,b, 1995c). Questi studi hanno mostrato che nelle lucertole, a una temperatura di circa 25°C dopo una decina di giorni dall'autotomia della coda, avviene una rigenerazione dell'epitelio e la formazione di un blastema (Fig. 10). Quest'ultimo si allunga rapidamente formando un'escrescenza conica (in 11-15 giorni). La crescita è generalmente rapida e dopo circa 16-20 giorni la coda neo-rigenerata è più lunga di 5 mm. Fino a questo punto la cute che ricopre la coda è scura, liscia e morbida, e non si sono ancora formate le squame. La loro rigenerazione (neogenesi) avviene dopo circa 3 settimane (Maderson, 1985). Esse appaiono come piccole tegole disposte attorno ad anelli circolari, detti verticilli. Nei giorni successivi, il processo di formazione delle squame si propaga dalle regioni prossimali a quelle distali, procedendo verso la punta della coda rigenerante. Dopo 6-7 settimane dall'amputazione, la maggior parte della coda rigenerante è formata e le nuove squame ricoprono quasi tutta la sua superficie. Questo modello sperimentale è quindi molto interessante perché permette di studiare la differenziazione degli strati alfa e beta e la produzione di specifiche cheratine nelle nuove squame in via di formazione (Dalla Valle *et al.*, 2005).



**Figura 10.** Disegno schematico che mostra gli stadi della coda in rigenerazione nelle lucertole. **A.** Amputazione (giorno zero). **B.** Blastema rigenerativo (7-10 giorni dopo l'amputazione). **C.** Escrescenza conica (11-15 giorni dopo l'amputazione). **D.** Coda in rigenerazione ma senza squame (16-20 giorni dopo l'amputazione). **E.** Coda in rigenerazione allungata in cui iniziano a formarsi le squame (3-6 settimane dopo l'amputazione). **E1-E5.** Differenziamento progressivo dell'epidermide in momenti diversi della rigenerazione della coda.  $\alpha$ , strato alfa; B, strato basale (germinale);  $\beta$ , strato beta; BL, blastema rigenerativo; BM, membrana basale; C, strato chiaro;  $D\alpha$ , strato alfa in differenziamento;  $D\beta$ , strato beta in



differenziamento; DC, strato chiaro (granuloso) in differenziamento; DO, strato *Oberhautchen* in differenziamento; EC, cono in allungamento; KH, granuli simili a cheratoialina; L, strato lacunare; M, strato *mesos*; M $\beta$ , cellule beta che si fondono; NT, coda normale (moncherino); NS, squama neogenica; NT, coda normale; O, strato *Oberhautchen*; O $\beta$ , *Oberhautchen* fuso con lo strato beta; P, papille epidermiche; RC cono in rigenerazione; RT, coda in rigenerazione; SC, complesso di muta, (composto da strato chiaro più *Oberhautchen*); SL, linea della muta (dove avviene il distacco dell'epidermide); SW, epidermide ferita che si sta staccando; SY $\beta$ , strato beta sinciziale; W, epidermide ferita corneificata (immagine tratta da Dalla Valle *et al.*, 2005).

Durante la fase di differenziazione epidermica, nei primi 20 giorni, sono prodotte solamente le alfa-cheratine. Quando inizia la formazione di squame neogeniche e i primi strati epidermici si sono differenziati sotto la cute ferita, le cellule che sintetizzano le beta-proteine vengono prodotte dallo strato germinale sottostante (Alibardi, 1994a,b; Alibardi *et al.*, 2004; Alibardi e Toni, 2006b; Dalla Valle *et al.*, 2005).

Dal momento che da un punto di vista citologico la differenziazione delle cellule beta nell'epidermide in rigenerazione è la stessa che avviene anche nell'epidermide normale ed embrionale (Alibardi, 2003a), il presente modello di differenziazione è di notevole praticità e di interesse per lo studio della formazione di beta-proteine nell'epidermide di lucertola. Da ricerche condotte in questi studi si è visto che la produzione di mRNA codificante le KAbetaPs (beta-proteine associate alle cheratine, beta-cheratine) viene attivata tardi, dopo che le cellule hanno raggiunto almeno 2-3 strati soprabasali a partire dallo strato germinale, quando in genere inizia il terzo-quarto stadio della fase di rinnovo del ciclo di muta (Maderson, 1985; Maderson *et al.*, 1998).

## **7. Tipologia di cheratine presenti nell'epidermide dei Rettili**

Le cellule epiteliali possiedono importanti proteine strutturali: le cheratine e le proteine associate (Fraser *et al.*, 1972; Matoltsy, 1987; Coulombe e Omary, 2002; Alibardi *et al.*, 2009). Nell'epidermide dei Rettili vengono sintetizzati due gruppi principali di proteine note come alfa-cheratine o citocheratine e beta-cheratine oggi più propriamente conosciute come beta-proteine associate alle cheratine o KAbetaPs a causa delle loro caratteristiche e della loro funzione (Alibardi *et al.*, 2007, 2009). Entrambe presentano valori di solubilità, peso molecolare, composizione aminoacidica, struttura secondaria, proprietà elastiche e modalità di assemblamento diverse.

### **7.1. Alfa-cheratine**

Le alfa-cheratine sono proteine strutturali appartenenti alla famiglia dei filamenti intermedi e presenti in tutti i Vertebrati e Invertebrati (Fuchs e Marchuk, 1983; Steinert

e Freedberg, 1991; Fuchs e Weber, 1994; Coulombe e Omary, 2002). Ne esistono di diverse tipologie a seconda dei tessuti in cui esse sono contenute: neurofilamenti, desmina, vimentina ecc. Sono composte di subunità il cui peso molecolare varia tra i 40 e i 70 kDa. Si ritiene che siano presenti almeno 50 geni diversi codificanti citocheratine nel genoma umano e in altri Mammiferi. Queste cheratine soffici sono responsabili dell'impalcatura e quindi della forma dei cheratinociti, determinano la resistenza meccanica degli epitelii contro forze meccaniche e di tensione, ma sono coinvolte anche in altri ruoli, come ad esempio nella segnalazione cellulare, nella risposta agli stress e nel processo di apoptosi.

I fasci di cheratina sono costituiti da filamenti spessi 8-10 nm, le cui unità presentano una regione centrale ad alfa-elica, che consiste in 310 amminoacidi, altamente conservata in sequenza e lunghezza nei diversi *taxa*, e due domini globulari variabili alle estremità N- e C-terminali (Steinert e Freedberg, 1991; Fuchs e Weber, 1994). Il dominio centrale è il responsabile dell'assemblaggio dei filamenti stessi.

I monomeri di cheratina possono avere caratteristiche acide (tipo I) o basiche (tipo II) e sono presenti in egual misura all'interno dei filamenti. Coppie di lunghe alfa-eliche si dispongono parallelamente a formare una struttura *coiled-coil*: un'alfa-elica si avvolge all'altra per formare estese strutture a bastoncino (Moll *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 1983, O'Guin *et al.*, 1987).

L'aggregazione tra subunità di cheratina è resa possibile dalla presenza di siti di legame localizzati all'estremità dei domini globulari. I filamenti che si formano sono in grado di tollerare forze di stiramento e flessione grazie al fatto che le singole subunità si trovano sfalsate le une rispetto alle altre. Questi filamenti si accumulano e si aggregano nello strato pre-corneo (Baden e Maderson, 1970; Baden *et al.*, 1974; Maderson, 1985; Landmann, 1986). In genere sono inclusi in una matrice di proteine e lipidi, la quale ha una funzione di barriera contro la perdita d'acqua. Le alfa-cheratine fanno parte di una famiglia multigenica di proteine, i cui componenti sono differentemente espressi in vari epitelii in rapporto al tipo cellulare e al grado di differenziamento (Fuchs *et al.*, 1987; Steinert *et al.*, 1984). Ad esempio nei Mammiferi, oltre alle alfa-cheratine citoplasmatiche, vi sono cheratine tipiche del pelo dette di tipo *hard*. Esse si contrappongono alle cheratine morbide per il rilevante contenuto in cisteina che conferisce un maggior grado di resistenza mediante la formazione di legami crociati disolfuro (Wang *et al.*, 2000). La creazione dei ponti disolfuro non è coinvolta nella polimerizzazione delle molecole, interviene invece nella stabilizzazione del polimero già formato, ed infatti ha luogo verso gli ultimi stadi della biosintesi di cheratina (Fraser e Parry, 2009). Questo tipo di legame conferisce durezza al tessuto.

È stato inoltre evidenziato un appaiamento in coppie epitelio-specifiche di cheratine di tipo I e II, simile a quello dei Mammiferi, anche nei Rettili (Sun *et al.*, 1983; Steinert *et al.*, 1984; Fuchs *et al.*, 1987; O'Guin *et al.*, 1987; Steinert e Freedberg, 1991).

Precedenti studi di immunocitochimica, elettroforesi ed *immunoblotting* hanno mostrato una reazione crociata tra anticorpi contro citocheratine di mammifero e cheratine acide e basiche di embrioni e Rettili adulti (Alibardi, 2000a,b; Alibardi *et al.*, 2000, 2001; Sawyer *et al.*, 2000), evidenziando così l'esistenza di epitopi comuni tra citocheratine di Mammiferi e di Rettili. In questi ultimi, le alfa-cheratine sono osservabili soprattutto a livello degli strati basali dell'epidermide e lungo le regioni cerniera tra le squame.

Mediante analisi condotte con l'uso di anticorpi anti-citocheratine utilizzati sull'epidermide della tartaruga *Chrysemis picta* (Alibardi, 2002c) è stato dimostrato che l'espressione di cheratine acide e basiche nell'epidermide morbida e dura (corazza) delle tartarughe assomiglia a quella di altri Rettili (Alibardi *et al.*, 2000, Alibardi 2001a), Uccelli e Anfibi Anuri (Alibardi, 2001b) e dell'uomo (Sun *et al.*, 1983; O'Guin *et al.*, 1987). Le alfa-cheratine acide sono maggiormente presenti negli strati basali, mentre scompaiono negli strati pre-cornei e cornei. Invece le alfa-cheratine basiche sono presenti negli strati più esterni ma sembrano scomparire o essere molto più ridotte nello strato corneo.

Uno studio effettuato da Fuchs e Marchuk (1983) ha messo in luce che le cheratine di tartaruga di tipo I (acidiche) hanno un peso molecolare che varia tra i 44 e i 58 kDa, mentre le cheratine di tipo II (basiche) variano tra i 55 e i 62 kDa, confermando la maggiore grandezza delle cheratine basiche rispetto a quelle acide, come accade in tutti gli altri Vertebrati.

Nell'epidermide dei Rettili di vari gruppi (Lepidosauri e Loricati) sono generalmente presenti almeno 12 diverse citocheratine tra acide e basiche, ma non ne sono attualmente note le specifiche sequenze aminoacidiche (Alibardi e Toni, 2006b).

## **7.2. Beta-proteine associate alle cheratine (KAbetaPs)**

Le beta-proteine associate alle cheratine (*Keratin Associated beta-Proteins*, KAbetaP), note in letteratura anche come beta-cheratine, sono importanti proteine strutturali dell'epidermide e degli annessi cutanei di Rettili e Uccelli in quanto contribuiscono alla formazione di uno strato corneo robusto, resistente agli stress meccanici, ma nello stesso tempo poco elastico e flessibile che andrebbe a ridurre la capacità di movimento di questi animali se non fossero presenti delle aree più sottili di giunzione presenti tra le squame, le regioni cerniera, in cui le beta-proteine sembrano essere per lo più assenti (Baden e Maderson, 1970; Maderson, 1985; Alibardi *et al.*, 2009). Tali piccole proteine (12-25 kDa) non appartengono alla famiglia dei filamenti intermedi, bensì sono

proteine associate alle alfa-cheratine e hanno un ruolo simile alle KAPs (proteine associate alle cheratine o “*Keratin Associated Proteins*”) presenti negli annessi cutanei duri di peli, artigli e corna dei Mammiferi (Powel e Rogers, 1994). Per questo motivo le beta-cheratine sono state rinominate beta-proteine associate alle cheratine (KAbetaPs; Alibardi *et al.*, 2007, 2009). La loro caratteristica resistenza è dovuta molto probabilmente all’elevato contenuto in cisteina, amminoacido che permette la formazione di forti legami intermolecolari (ponti disolfuro) i quali conferiscono compattezza e solidità agli agglomerati molecolari che lo contengono. Il meccanismo di aggregazione delle beta-proteine non è ancora del tutto noto (Fraser *et al.*, 1972; Fraser e MacRae, 1978; Fraser e Parry, 1996). Modelli di predizione della loro struttura proteica indicano che la porzione centrale della molecola, chiamata “*core-box*”, presenta la classica conformazione secondaria a foglietto beta (Fraser e Parry, 1996, 2011). Legami idrogeno o polari tra i vari “*core-box*” sono ritenuti essere i possibili responsabili della formazione dei polimeri a partire da monomeri di beta-proteina. Questa particolare regione inoltre presenta la peculiarità di essere conservata tra le varie specie. Le beta-proteine dei Rettili appartengono a famiglie multigeniche che si sono originate per duplicazione e successiva diversificazione e questo potrebbe avere determinato la tessuto-specificità che tali proteine sembrano possedere. In generale, hanno basso peso molecolare, compreso tra i 10 e i 25 kDa, ridotta solubilità, dovuta presumibilmente ad una elevata quantità di glicina e possiedono resistenza antimicrobica contro la degradazione (Werlang e Brandelli, 2005).

Precedenti studi ultrastrutturali, di immunocitochimica e di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che le beta-proteine sono prodotte dai ribosomi liberi delle cellule beta differenzianti. Gli aggregati di tali proteine iniziano ad accumularsi nello strato pre-corneo in Cheloni e Coccodrilli. Mentre un tempo si riteneva che si accumulassero solamente nello strato beta e *Oberhautchen* dell’epidermide di lucertole e serpenti, recenti ricerche hanno evidenziato una loro presenza anche a livello di strato *mesos* e alfa (Maderson, 1985; Gregg e Rogers, 1986; Landmann, 1986; Alibardi e Thompson, 1999a, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2005; Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012). Si ritiene che le beta-proteine si vadano ad associare alle alfa-cheratine fino a farle scomparire completamente (Landmann, 1986; Alibardi e Thompson, 1999b; Dalla Valle *et al.*, 2005). In questo confermano il ruolo analogo rispetto alle KAPs (*Keratin Associated Proteins*) presenti negli annessi cutanei dei Mammiferi (Alibardi *et al.*, 2007, 2009).

Per quanto riguarda la composizione aminoacidica, tali proteine sono caratterizzate dal possedere un’elevata quantità di glicina (16-40%) e una percentuale variabile di cisteina e tirosina (4.5-18%), amminoacidi questi disposti prevalentemente alle estremità N- e

C-terminali che sono generalmente variabili. Sembra essere relativamente elevata la quantità di prolina (8-16%), presente invece per la maggior parte nella porzione centrale. Questo aspetto risulta ben conservato tra le varie specie di Rettili (Landman, 1986; Alibardi *et al.*, 2004; Alibardi e Toni, 2005a,b,c,d).

Le beta-proteine native presentano un punto isoelettrico da basico a neutro e solo una piccola frazione appare essere acida, mentre molte beta-proteine a maturità o estratte da epidermide matura appaiono acide (Alibardi e Toni, 2006b; Toni *et al.*, 2007). L'acidità sembra dovuta probabilmente a reazioni di fosforilazione (Sawyer *et al.*, 2000; Toni *et al.*, 2007). Differenti forme di monomeri di beta-proteine sono presenti negli annessi cutanei e la diversa composizione di questi conferisce alla struttura che origina caratteristiche di rigidità variabili (Wyld e Brush, 1979, 1983; Gillespie *et al.*, 1982; Hallahan *et al.*, 2009). Negli Uccelli le beta-proteine possono essere raggruppate in alcune tipologie: di squama, becco, artiglio, penna e cheratine simili a quelle delle penne. Ognuna di queste è caratterizzata da un unico *pattern* di monomeri di beta-cheratina (Wyld e Brush, 1979, 1983; Gregg e Rogers, 1986; Presland *et al.*, 1989; Sawyer *et al.*, 2000; Sawyer e Knapp, 2003). In genere le beta-proteine delle penne hanno un peso molecolare minore rispetto alle altre (10-12 kDa). Le beta-proteine condividono un epitopo comune di 14-20 amminoacidi, riconosciuto dall'anticorpo chiamato beta-universale (Sawyer *et al.*, 2000, 2003, 2005). L'utilizzo di tale anticorpo anche su Cheloni ha dimostrato la presenza dell'epitopo in questione. Solamente le beta-proteine dell'epidermide della tartaruga a guscio molle *A. spinifera* non vengono riconosciute da questo anticorpo, bensì da anticorpi generici per le beta-cheratine (Alibardi e Toni, 2007; Toni *et al.*, 2007).

Informazioni su percentuale di amminoacidi, immunocitochimica, autoradiografia, e le recenti determinazioni della sequenza primaria delle beta-proteine hanno indicato che queste sono diverse a seconda delle specie di Rettili: esse appartengono infatti a tre differenti gruppi: beta-proteine di Cheloni (tartarughe, testuggini), di Arcosauri (Coccodrilli e Uccelli), e di Lepidosauri (lucertole, serpenti, sfenodonti e Anfisbenidi). Comunque queste proteine condividono alcuni epitopi immunologici comuni che danno reazioni crociate con quelli di Uccelli (Carver e Sawyer, 1987; Sawyer *et al.*, 2000; Alibardi e Sawyer, 2002).

Fino ad oggi sono state sequenziate più di un centinaio di beta-proteine associate alle cheratine da diverse specie di Lepidosauri, Coccodrilliani e tartarughe (Dalla Valle *et al.*, 2005, 2007a,b; 2009a,b, 2010 ; Hallahan *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010).

### 7.3. Analisi biomolecolare delle beta-proteine di rettile

Le informazioni iniziali riguardo alla biologia molecolare di queste particolari proteine nei Rettili sono state ottenute, nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato, mediante l'uso di oligonucleotidi degenerati, scelti sulla regione del "core-box" di beta-proteine di uccello (Gregg e Rogers 1986) e dell'unico frammento di sequenza proteica allora disponibile per beta-proteine di rettile e corrispondente a una beta-proteina isolata dall'unghia di *Varanus gouldii* (Inglis *et al.*, 1987). La prima sequenza di mRNA codificante una beta-proteina di rettile è stata isolata a partire da tessuti di coda in rigenerazione della lucertola *Podarcis sicula* (Dalla Valle *et al.*, 2005). I risultati ottenuti in questa ricerca hanno dimostrato che la proteina è ricca in prolina e glicina e tramite esperimenti di ibridazione *in situ* si è visto che è espressa negli strati beta dell'epidermide in rigenerazione; inoltre grazie alle sue caratteristiche chimiche e all'elevata omologia con le beta-proteine di uccello, è stata confermata la sua appartenenza al gruppo delle cheratine dure (Dalla Valle *et al.*, 2005). In seguito la sequenza di beta-proteine è stata ottenuta anche a partire dall'mRNA estratto dall'epidermide di due specie di gecko, *Tarentula mauritanica* e *Hemidactylus turcicus* (Dalla Valle *et al.*, 2007a), dal serpente, *Elaphe guttata* (Dalla Valle *et al.*, 2007b), dalla tartaruga a guscio duro *Pseudemys nelsonii* (Dalla Valle *et al.*, 2009b) e dal coccodrillo *Crocodylus niloticus* (Dalla Valle *et al.*, 2009a). In particolare sono in totale 17 le beta-proteine isolate dalla tartaruga a guscio duro *P. nelsonii* e tutte possiedono la medesima struttura ritrovata in altri Rettili e Uccelli. Solo la regione corrispondente al "core-box" si trova più spostata verso la regione 5'-UTR, che è ben conservata rispetto alla regione 3'-UTR. Negli Arcosauri si ritrova una situazione analoga che li distingue assieme ai Chelonidi dai Lepidosauri (Dalla Valle *et al.*, 2009b).

Oltre alla caratterizzazione della sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta, le analisi condotte hanno permesso di evidenziare che nei Rettili, come in precedenza dimostrato anche negli Uccelli, le beta-proteine appartengono a famiglie geniche probabilmente determinate da processi di duplicazione e costituite da numerosi geni che si sono via via differenziati tra loro, acquisendo caratteristiche biochimiche diverse.

Nel 2007 è stata resa disponibile la prima bozza del genoma di un rettile, l'*Anolis carolinensis* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?org=Lizard&db=anoCar1&hgid=112810225>) e questo ha reso possibile la determinazione, tramite analisi bioinformatiche e sperimentali, di tutti i geni codificanti KAbetaPs presenti in questa specie (Dalla Valle *et al.*, 2010).

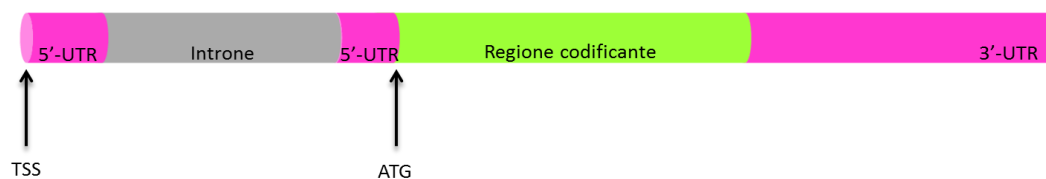
Il piccolo *Anolis carolinensis* (Fig. 12), comunemente chiamato camaleonte americano a causa della sua capacità di cambiare colorazione della livrea da un verde brillante a marrone scuro, appartiene ad uno dei generi biologicamente più diversificati del mondo

con oltre 350 specie conosciute (Williams, 1983; Losos *et al.*, 1998). Da circa 40 anni gli Anolidi vengono utilizzati per un'ampia varietà di studi biologici di tipo comparativo nel campo della fisiologia, della neurologia e dell'etologia, in quanto sono organismi largamente diffusi in natura e facili da studiare sia nel loro *habitat* naturale che in laboratorio per la loro facilità di allevamento. *L.A. carolinensis* è una lucertola iguanide con abitudini prettamente arboricole il cui areale è molto vasto e comprende le due Americhe.



**Figura 12.** Esemplare di *Anolis carolinensis* adulto (foto da : <http://www.herpindiego.com/Texas2006TR.html>).

La conoscenza del genoma completo della lucertola verde americana, *Anolis carolinensis*, ha permesso di isolare e caratterizzare tutti i 40 geni codificanti beta-proteine (Li\_Ac\_1-40, che sta per *Lizard Anolis carolinensis*) localizzati insieme nello scaffold 455 e quindi presumibilmente in un solo cromosoma (Dalla Valle *et al.*, 2010). L'analisi di questi geni ha evidenziato sempre le medesime caratteristiche già rilevate nelle altre specie di Rettili analizzate (Fig. 13): una porzione 5'-terminale non tradotta (*UTR*) non codificante, costituita in parte da un primo esone non tradotto, un unico introne di lunghezza variabile tra le 800 e 8200 paia di basi che separa in due la regione 5'*UTR*, una regione codificante ininterrotta di dimensione variabile e infine la regione 3'-*UTR*, sempre poco conservata (Dalla Valle *et al.*, 2010). Per quanto riguarda gli introni presenti nei geni delle beta-proteine è stato ipotizzato un loro eventuale ruolo nella regolazione della trascrizione. Infatti Gregg e Rogers (1986) avevano osservato un incremento nell'efficienza della trascrizione dopo la rimozione di un introne e la sua sostituzione con un frammento qualsiasi delle stesse dimensioni.



**Figura 13.** Rappresentazione grafica della struttura di un gene codificante beta-proteine. In rosa è evidenziata la regione 5'-UTR intervallata da un introne (in grigio) e la regione 3'-UTR. La regione codificante, priva di interruzioni, è invece rappresentata con il colore verde.

Le beta-proteine dedotte di *A. carolinensis* sono state suddivise in quattro principali sottofamiglie in base alla percentuale di glicina e cisteina (amminoacidi che rivestono un ruolo chiave per queste proteine):

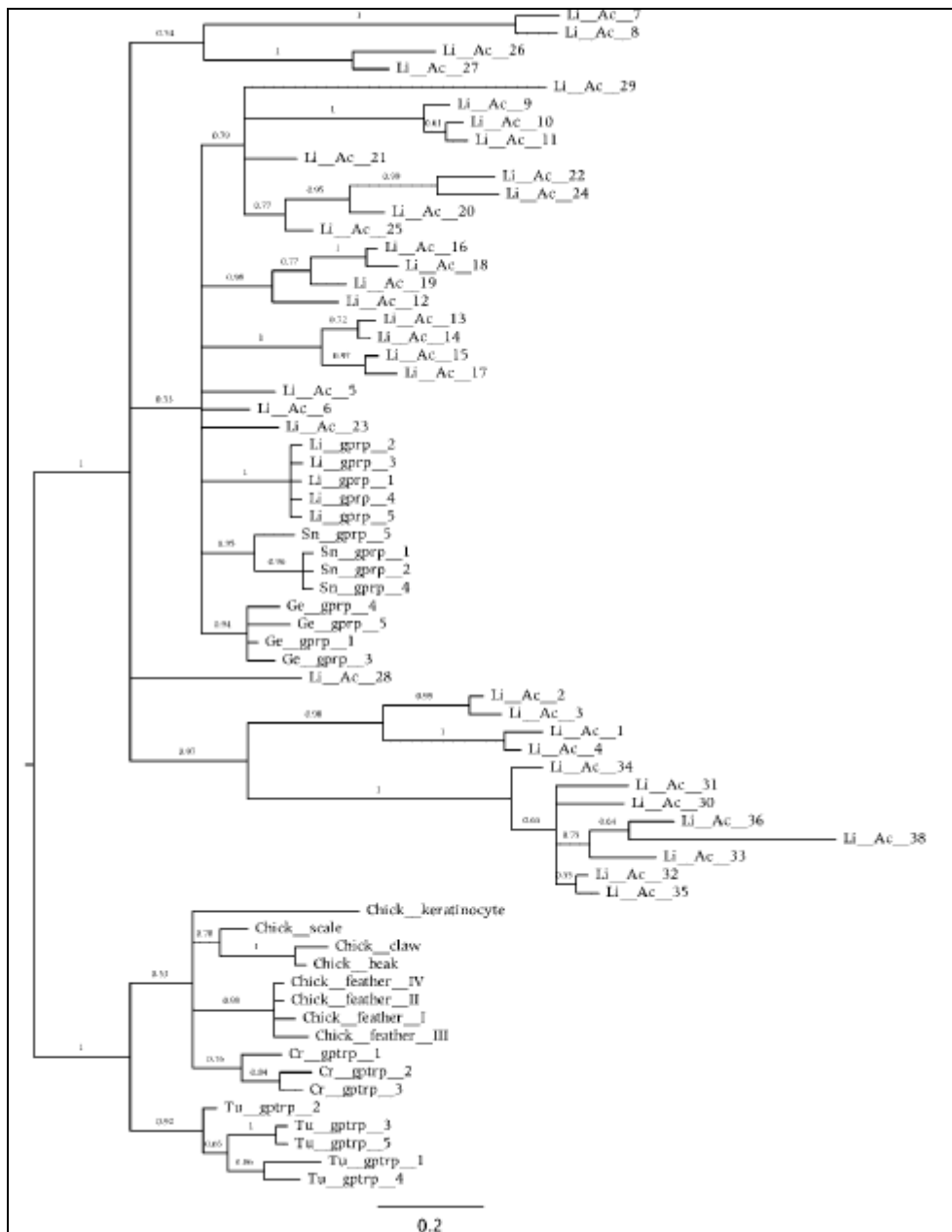
1. ricche in glicina (HgG),
2. ricche in glicina e cisteina (HgGC),
3. ricche in cisteina (HgC),
4. a basso contenuto sia di glicina sia di cisteina (LwGC).

Ciascuna di esse contiene un numero variabile di componenti che differiscono per PM, composizione aminoacidica, punto isoelettrico etc. Si pensa che la glicina possa formare avvolgimenti casuali e abbassare la solubilità delle proteine in cui essa è contenuta mentre la cisteina, come accennato precedentemente, grazie alla formazione di legami crociati intermolecolari, potrebbe avere il ruolo di indurire il materiale corneo in particolare di squame e artigli. Analisi di espressione genica hanno dimostrato che queste proteine dello strato corneo possono essere utilizzate nelle squame, nelle setole adesive e negli artigli, ipotizzando una loro possibile tessuto-specificità. Si pensa, infatti, che gruppi di geni esclusivi potrebbero essere attivati in una specifica tipologia di annesso cutaneo. Ad esempio le beta-cheratine 2 e 3 (Li\_Ac\_2-3), che corrispondono alle proteine ricche in glicina e cisteina, sono state trovate nelle squame dure delle dita, artigli inclusi. Mentre le beta-cheratine dalla 14 alla 19 (Li\_Ac\_14-19), ricche in glicina soltanto, sono principalmente espresse nelle squame soffici della coda in rigenerazione (Dalla Valle *et al.*, 2010).

L'analisi del genoma di pollo ha invece permesso di identificare quasi 140 geni codificanti beta-proteine, localizzati in otto cromosomi diversi. La maggior parte dei geni sono contenuti nei cromosomi 25 e 27 (Dalla Valle *et al.*, ricerca ancora in corso; Greenwold e Sawyer, 2010; Greenwold e Sawyer, 2011). In generale i geni per queste proteine negli Uccelli mostrano avere la stessa organizzazione strutturale presente nei Rettili.



Le beta-proteine di *A. carolinensis* sono inoltre state inserite in un albero filogenetico (Fig. 14) utilizzando un'inferenza filogenetica bayesiana implementata con *MrBayes* v3.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Il confronto delle sequenze e le analisi filogenetiche hanno evidenziato che le KAbetaPs dei Lepidosauri sono alquanto differenti da quelle di Arcosauri e Cheloni (Dalla Valle *et al.*, 2009a,b; Alibardi *et al.*, 2009). Confrontando le sequenze di *Anolis* con le poche sequenze isolate da altre lucertole e dal serpente, sembra che le sequenze di *Anolis* si siano maggiormente diversificate rispetto a quelle degli altri Lepidosauri. Questo però probabilmente deriva dal numero limitato di sequenze disponibili per gli altri Rettili e dalla loro identificazione a partire da uno stesso tipo di tessuto. Un'analisi più approfondita si potrà fare quando saranno disponibili altri genomi di Rettili.



**Figura 14.** Albero filogenetico di KAbetaPs di *A. carolinensis* e altri Sauropsidi usando l'inferenza filogenetica bayesiana implementata con *MrBayes* v3.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). I numeri sopra i rami sono le probabilità bayesiane viste a posteriori (Dalla Valle *et al.*, 2010).

Recenti studi ultrastrutturali, di immunocitochimica e *immunoblotting* su cute normale, in rigenerazione e durante lo sviluppo embrionale di lucertole Anolidi e dello sfenodonte sono riusciti ad individuare i siti di accumulo delle diverse tipologie di beta-proteine utilizzando anticorpi diretti contro membri rappresentativi delle famiglie principali di tali proteine (Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012):

- per le KAbetaPs ricche in glicina l'anticorpo è stato preparato contro HgG5 (Li-Ac-13), che riconosce anche il gruppo di beta-proteine compreso tra la 12 e la 19;

- per quelle ricche in glicina e in cisteina è stato usato un anticorpo contro HgGC3 (Li-Ac-3), che riconosce anche le beta-proteine Li-Ac-1, 3 e 4,
- per le medio-ricche in glicina e cisteina l'anticorpo è stato costruito contro HgGC10 (Li-Ac-25), riconosce anche il piccolo sottogruppo di beta-proteine da Li-Ac-20 a Li-Ac-24,
- e infine per le ricche in cisteina si è utilizzato un anticorpo che riconosce HgC1 (Li-Ac-2).

Tali ricerche hanno dimostrato che, sorprendentemente, anche gli strati alfa contengono KAbetaPs e non solo gli strati beta, come era stato ritenuto per molti anni (Fig. 15).

HgG5, anche nota come Li-Ac-13, una proteina basica di 168 amminoacidi, ricca in glicina (28%), ma povera in cisteina (meno del 4%) sembra essere specificamente espressa negli strati beta, andando quindi a ridurre il loro grado di elasticità. Tale proteina presenta identità aminoacidica più alta del 61% con le beta-proteine Li\_Ac\_12-19, rappresentando la sottofamiglia più ampia di tutte le KAbetaPs di *Anolis*. Esse sono espresse nelle squame della coda in rigenerazione e del sacco gulare, tranne Li-Ac-16 (Dalla Valle *et al.*, 2010). Una considerevole quantità di glicina nelle cheratine e proteine cornee associate ne aumenta l'idrofobicità e conseguentemente la loro insolubilità (Steinert e Freedberg, 1991). Quindi, HgG5 potrebbe essere la responsabile della relativa impermeabilità dello strato beta.

Le due proteine ricche in glicina e cisteina, HgGC3 e HgGC10, invece si dispongono in modo diverso rispetto a HgG5. HgGC3 è una proteina acidica di 92 amminoacidi con un contenuto in glicina molto elevato (maggiore del 30%), e un contenuto in cisteina decisamente più basso (vicino al 9%). Presenta identità aminoacidica superiore al 60% con le beta-proteine Li\_Ac\_1-4. Essa risulta poco espressa negli strati beta più esterni mentre appare principalmente richiesta per la produzione degli strati alfa più profondi soprattutto a livello delle dita. Il suo ruolo quindi è fornire resistenza agli strati in cui è contenuta grazie alla formazione di numerosi ponti disolfuro intermolecolari.

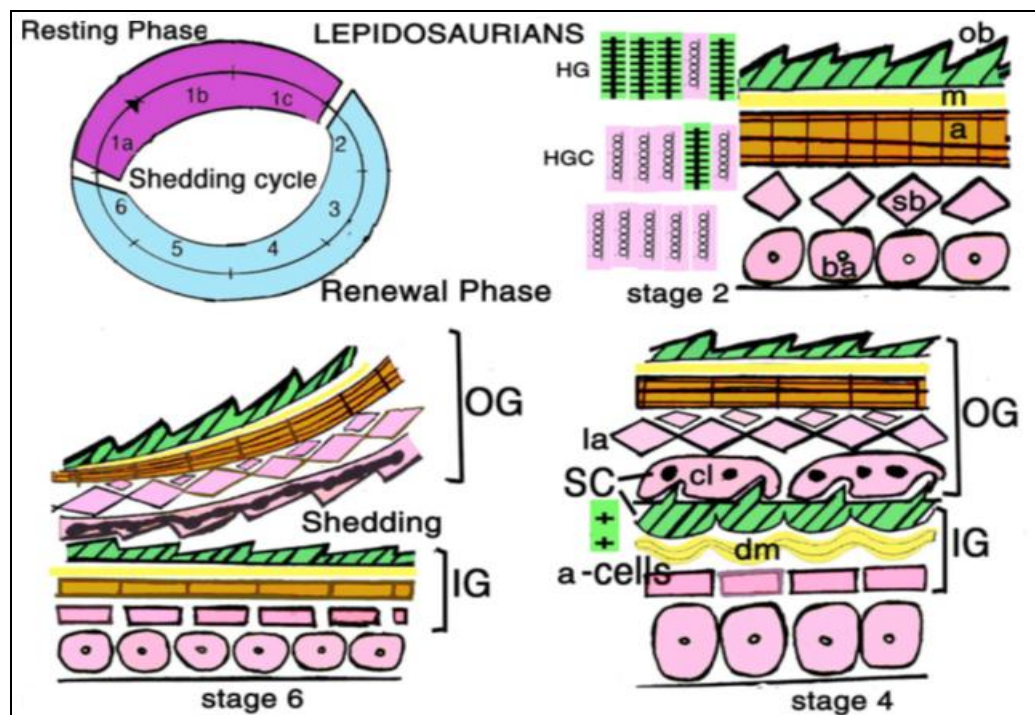
HgGC10, detta anche Li-Ac-25, è una proteina acidica di 108 amminoacidi e contiene più bassi livelli di glicina (13%) ma leggermente più alti di cisteina (14.5%) rispetto a HgGC3. Per questo viene identificata come medio-ricca in glicina e cisteina. Presenta elevata identità di sequenza aminoacidica con le proteine Li\_Ac\_20-24 e in base a precedenti studi condotti da Dalla Valle e collaboratori (2010) sembra essere espressa nel sacco gulare e nella coda in rigenerazione. Li-Ac-25 appare essere ubiquitaria rispetto a HgG5 e HgGC3, infatti, essa viene variabilmente espressa anche nello strato beta di differenti tipologie di squame, mentre si trova a più alte concentrazioni negli strati alfa delle squame normali e in particolare delle sete adesive. HgGC10 risulta quindi meno idrofobica rispetto ad HgG5, ma il suo maggiore contenuto in cisteina

rispetto ad HgGC3 contribuisce ad aumentare la resistenza del materiale corneo non solo degli strati beta ma anche degli strati alfa.

Infine HgC1, che rappresenta una piccola famiglia di KAbetaPs, risulta poco presente nell'epidermide di *A. carolinensis*: si trova espressa in bassa quantità negli strati alfa, mentre è completamente assente negli strati beta. La specifica localizzazione di questa piccola proteina basica dovrà essere indagata più approfonditamente in futuro.

Dunque, sembra che la sintesi di beta-proteine ricche in glicina nello strato beta determini la durezza e l'idrofobicità; mentre l'accumulo di beta-proteine medio-ricche e ricche in glicina e cisteina forniscano flessibilità agli strati alfa e *Oberhautchen*. Da questo consegue che un preciso accumulo nel tempo di specifiche beta-proteine su uno *scaffold* di filamenti intermedi (alfa-cheratine) durante il ciclo di muta sarebbe all'origine dei sei diversi strati dell'epidermide dei Lepidosauri (Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012) e non un'alternanza della produzione di alfa-cheratine e beta-proteine come invece si è creduto per molti anni (Baden e Maderson, 1970; Maderson, 1985; Landman 1986).

Dopo gli studi sopraccitati che hanno portato alla conoscenza sia della struttura genica sia delle sequenze proteiche delle beta-proteine, rimane ora da studiare il meccanismo molecolare di regolazione dei geni codificanti le KAbetaPs e di altre proteine necessarie al processo di corneificazione dell'epidermide nei Rettili, che potrebbe iniziare con l'analisi della regione promotrice di tali geni.



**Figura 15.** Rappresentazione schematica della distribuzione delle citocheratine e beta-proteine associate alle cheratine nell'epidermide dei Lepidosauri (lucertole e serpenti) durante il ciclo di muta. IG,

generazione interna; OG, generazione esterna, ba, strato basale; sb, strato sopra-basale; a, strato alfa; m, strato *mesos*; ob, *Oberhautchen*, HG, beta-proteine ricche in glicina; HGC, beta-proteine ricche in glicina e cisteina; SC, complesso di desquamazione; cl, strato chiaro; la, strato lacunare; dm, strato *mesos* in differenziamento (immagine tratta da Alibardi, 2012d).

## 8. Studio del promotore genico

L'espressione dei geni subisce in genere una regolazione sia di tipo spaziale sia di tipo temporale (Strachan e Read, 2006). Esistono geni essenziali, chiamati anche geni *housekeeping* che devono sempre essere espressi, in qualsiasi tipo di cellula perché codificano prodotti essenziali per la vita della cellula stessa, mentre alcuni geni hanno un campo di espressione limitato a specifici tessuti. Inoltre l'espressione genica può essere influenzata e quindi regolata a seconda dello stadio del ciclo cellulare, dello stadio di sviluppo, ma anche del differenziamento a cui va incontro un dato tipo cellulare (ad esempio in alcune cellule completamente differenziate la trascrizione non avviene). Inoltre alcuni geni vengono attivati in risposta a segnali prodotti dall'ambiente o a segnali extracellulari (espressione inducibile). Quando il fattore di induzione viene eliminato, l'espressione genica ritorna allo stato iniziale di equilibrio.

La regolazione dell'espressione genica può avvenire su più livelli: influenzando la trascrizione, i processi post-trascrizionali, oppure attraverso meccanismi epigenetici. In ogni caso la regolazione dell'espressione avviene mediante il legame di specifiche proteine, i fattori di trascrizione, a determinate regioni di DNA, che si localizzano principalmente a livello del promotore. Tale regione si trova a monte del sito di inizio della trascrizione e può essere suddivisa in tre porzioni: promotore centrale, prossimale e distale, a seconda della sua posizione rispetto al sito di inizio della trascrizione. I fattori di trascrizione giocano un ruolo chiave nella regolazione della trascrizione, in quanto, dopo essere stati attivati, vanno a legarsi a specifici siti di legame nelle regioni regolatrici promotoriali, reclutando così co-fattori e componenti del macchinario di rimodellamento del nucleosoma (Strachan e Read, 2006; Kel *et al.*, 2003; Chekmenev *et al.*, 2005) In tal modo si rende possibile la formazione di legami DNA-complessi proteici, i quali provvederanno all'attivazione o alla repressione della trascrizione genica.

I fattori di trascrizione appartengono in generale a due tipologie:

- fattori di trascrizione *generici*: servono a mantenere un livello basale di trascrizione genica e sono ubiquitari,
- fattori di trascrizione *specifici*: sono in grado di modulare i livelli basali di espressione e dipendono dal particolare tipo di tessuto in cui vengono espressi, per

questo si chiamano anche fattori tessuto-specifici, e sono in grado di regolare peculiari gruppi di geni. Tali fattori sono anche detti attivatori, se inducono la trascrizione, oppure repressori, se la inibiscono.

Esiste anche una gran varietà di fattori proteici che regola la trascrizione indirettamente e cioè non andando a legare il DNA, bensì i fattori di trascrizione. Tali proteine sono note come co-attivatori o co-repressori. Molto spesso la regolazione dell'espressione genica è controllata da più gruppi di elementi proteici, che si possono localizzare a distanze anche molto grandi rispetto alla posizione in cui si trovano i geni da essi controllati.

Capire i meccanismi che stanno alla base della regolazione dell'espressione genica a livello di trascrizione è uno tra i problemi chiave dell'era post-genomica (Kel *et al.*, 2003; Chekmenev *et al.*, 2005). Grazie alla conoscenza del genoma di *A. carolinensis* e dell'intero gruppo di proteine codificanti KAbetaPs (Dalla Valle *et al.*, 2010) è possibile e necessaria un'indagine di tipo molecolare sul promotore che renda conto della probabile tessuto-specificità del gran numero di proteine espresse nell'epidermide e annessi cutanei in questa specie per poter essere successivamente estesa a tutti i Rettili.

L'analisi del promotore genico avviene ricercando possibili siti di legame per fattori di trascrizione presenti in tale regione regolatrice. Uno studio preliminare si avvale di strumenti bioinformatici che, tramite determinati algoritmi, sono in grado di confrontare le sequenze promotoriali incognite con sequenze note di siti di legame per fattori di trascrizione all'interno di banche dati apposite. Una volta identificati quali possano essere i probabili siti di legame per tali proteine regolatrici si procede con metodi sperimentali al fine di verificare che le proteine in questione effettivamente si leghino al DNA. I metodi più usati sono in genere esperimenti che si basano sulla metodica *EMSA* (*E*lettroforetic *M*obility *S*hift *A*ssay) e su corse elettroforetiche di *supershift gel assay*.







## Scopo della ricerca

Il tegumento dei Rettili è molto particolare rispetto a tutti gli altri Vertebrati, in quanto è caratterizzato dalla presenza di squame. Queste sono diverse per forma, dimensione e grado di cheratinizzazione non solo nelle varie zone del corpo dello stesso animale ma anche tra i gruppi di Rettili stessi, andando così a contraddistinguere le differenti specie (Lillywhite e Maderson, 1982; Price, 1982; Irish *et al.*, 1988). La formazione di un robusto strato corneo è dovuta soprattutto alla presenza di particolari proteine, note in precedenza come beta-cheratine e ora come beta-proteine associate alle cheratine (KAbetaPs), che si trovano esclusivamente in Rettili e Uccelli.

Lo scopo di questa tesi è quello di fornire un contributo alla comprensione del meccanismo di corneificazione dei Rettili, andando a focalizzare l'attenzione su peculiari specie di Cheloni dulcacquicoli, che presentano una diversa consistenza del guscio, e sulle lucertole, poiché possiedono un tipo di epidermide molto complesso.

La ricerca è stata quindi suddivisa in tre filoni principali. Il primo filone ha riguardato la ricerca di alfa-cheratine e beta-proteine nella tartaruga a guscio molle *A. spinifera*, caratterizzata dall'aver un tegumento non squamato. Precedenti studi basati sull'utilizzo di anticorpi avevano rilevato in questa specie un'esigua presenza di beta-proteine e avevano suggerito la possibile esistenza di beta-proteine modificate in particolari regioni (Alibardi e Toni, 2006b; Alibardi, 2006b; Alibardi *et al.*, 2009). Con la presente tesi si è voluto verificare la suddetta ipotesi e confrontare i livelli di trascritti codificanti cheratine e proteine associate isolate nella specie a guscio molle con i rispettivi trascritti presenti in una caratteristica specie di tartaruga a guscio duro, la *P. nelsonii*. Il secondo filone è stato incentrato invece sul confronto dei livelli di espressione di alcuni trascritti codificanti alfa-cheratine e beta-proteine nella coda normale e in rigenerazione della lucertola verde americana *A. carolinensis*. Tutto ciò per evidenziare eventuali differenze a livello della trascrizione in condizioni normali e in condizioni di attivo differenziamento cellulare. Infine, l'ultimo filone di ricerca ha riguardato un primo abbozzo di analisi di tipo bioinformatico del promotore genico delle beta-proteine precedentemente isolate nell'*Anolis* (Dalla Valle *et al.*, 2010) per cercare di spiegare che cosa regoli la tessuto-specificità di tali proteine.



# Materiali e Metodi

## 9. Prelievo dei campioni

### 9.1. Cheloni

I campioni di cute prelevati da varie regioni anatomiche delle tartarughe *A. spinifera* e *P. nelsonii* sono stati forniti dal Prof. Lorenzo Alibardi (Università di Bologna). In particolare sono stati utilizzati i seguenti campioni di cute: regione marginale del carapace, coda, collo e zampe. Dal fegato è stato invece estratto il DNA genomico. I tessuti prelevati sono stati conservati a -80°C.

### 9.2. Lucertole

L'amputazione della porzione finale della coda di quattro esemplari adulti di *A. carolinensis* (5-6 cm a partire dalla punta) è avvenuta tramite il processo naturale di autotomia della coda indotta dalla torsione ad angolo acuto su di un lato e successivamente sul lato opposto. La rigenerazione di quest'ultima si è avuta a una temperatura tra i 24 e i 30°C. Dopo un periodo di circa quaranta giorni dall'amputazione iniziano a formarsi le squame neogeniche nella regione prossimale vicino al moncone della coda che ha ora una lunghezza di circa 0,8-2,0 cm. La coda rigenerata è stata prelevata inducendo nuovamente l'autotomia nella regione prossimale anteriore al moncone della coda. I campioni di coda normale e in rigenerazione sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA. Gli animali sono stati acquistati presso negozi di animali.

## 10. Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il prodotto "TRIzol" della ditta *Invitrogen* (Milano, Italia). L'estrazione e manipolazione dell'RNA totale viene svolta sotto cappa, utilizzando vetreria sterilizzata o trattata a 200°C in stufa per l'intera notte.

### Reagenti:

- TRIzol *Invitrogen*
- Cloroformio
- Isopropanolo
- Etanolo 70%

### Procedimento:

Per l'estrazione dell'RNA totale vengono utilizzati dei mortai in ceramica, dove vengono depositati i tessuti da estrarre. Il materiale viene ridotto in polvere tramite l'utilizzo di un pestello ed azoto liquido. Quando il materiale è ridotto in polvere si aggiunge 1 ml di TRIzol. Dopodiché l'omogenato viene trasferito in una *eppendorf* da 1,5 ml alla quale vengono aggiunti 200 µl di cloroformio. La provetta viene agitata per 15 secondi e poi lasciata in ghiaccio per 5-10 minuti per ottenere la separazione dell'RNA. Al termine di questo periodo di incubazione il campione viene centrifugato per 15 minuti a 4°C alla massima velocità ottenendo così una suddivisione in tre fasi:

- FASE INFERIORE: di colore rosa, con fenolo, cloroformio e detriti cellulari.
- FASE INTERMEDIA: sottile anello opaco, biancastro che contiene il DNA.
- FASE SUPERIORE: fase acquosa che contiene l'RNA.

La fase acquosa sovrastante, contenente l'RNA, viene prelevata e trasferita in una nuova *eppendorf*, dove viene aggiunto un uguale volume di isopropanolo.

Il campione viene lasciato per almeno 2 ore, oppure *overnight*, a -20°C per consentire la precipitazione dell'RNA. Viene poi centrifugato per altri 15 minuti a 4°C a 12.000 g ed il *pellet* ottenuto viene, dopo la rimozione del surnatante, risospeso in 500 µl di etanolo 70% freddo (conservato a -20°C). Quindi si centrifuga per 15 minuti a 4°C e si rimuove l'etanolo. Questo passaggio può essere ripetuto una seconda volta. Infine si lascia asciugare il *pellet* a temperatura ambiente sotto cappa, in modo tale che l'etanolo evapori completamente. Il materiale viene quindi risospeso in 10-30 µl di acqua milliQ, a seconda della quantità di RNA sedimentato, e subito dopo conservato a -80°C.

### **10.1. Controllo della qualità dell'RNA mediante elettroforesi in gel di agarosio**

La qualità dell'RNA estratto viene controllata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% utilizzando 1 µl dell'RNA totale estratto che viene diluito con acqua distillata e *buffer* di caricamento. Il tutto viene caricato su gel di agarosio e, se l'RNA è di buona qualità, al transilluminatore saranno visibili a fine corsa due bande: una, più alta, corrispondente all'RNA 28S e l'altra, più bassa, corrispondente all'RNA 18S. La presenza di ulteriori bande o di uno striscio (*smear*) sono indici di degradazione dell'RNA.

## 10.2. Quantificazione dell'RNA

La concentrazione dell'RNA viene in genere determinata attraverso l'analisi al *Nanodrop*, presso il CRIBI.

Durante la misurazione, che normalmente avviene su 1,5 µl di RNA, viene anche annotato il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm per conoscere l'indice di purezza: generalmente si considera un buon valore quello compreso tra 1,8 e 2,0; infatti, se l'indice è inferiore a 1,8 vuol dire che oltre al DNA nel campione sono presenti impurità, come proteine e fenoli, mentre se è superiore a 2,0 significa che è molto probabile la presenza di quantità elevate di cloroformio, il quale assorbe alla medesima lunghezza d'onda dell'acido nucleico.

## 11. Isolamento dell'RNA poly (A<sup>+</sup>) dall'RNA totale

Per isolare dall'RNA totale estratto dalle regioni marginali del carapace di *A. spinifera*, l'mRNA poly (A<sup>+</sup>), è stato utilizzato il *kit Nucleo Trap mRNA* (Clontech, Francia). Questa procedura è stata necessaria per ottenere l'mRNA da inviare alla ditta *Evrogen* (Russia) per la creazione di una libreria di cDNA di *A. spinifera*.

Per purificare l'mRNA poly (A<sup>+</sup>), si porta l'RNA totale fino ad un volume di 200 µl con acqua milliQ, si aggiunge un uguale volume di soluzione RMO e, ogni 100 µg di RNA totale, 15 µl della soluzione contenente sferette di lattice, alle quali sono legati covalentemente dei residui di oligo(dT). Si mescola per inversione e si scalda il tutto a 68°C per 5 minuti per denaturare le strutture secondarie dell'RNA. Dopo il riscaldamento si lascia la provetta a temperatura ambiente per 10 minuti invertendola ogni 2 minuti. Questa operazione è importante perché permette un miglior legame del poly (A<sup>+</sup>) dell'RNA agli oligo (dT) legati alle sferette di lattice.

Si centrifuga per 15 secondi a 2.000 g e poi per 2 minuti a 11.000 g.

Dopo le centrifugazioni si elimina il surnatante e si dissolve completamente il *pellet* in 600 µl di *washing buffer* RM2. Si trasferisce questa sospensione nei micro filtri contenuti nel *kit* e si centrifuga per 15 secondi a 2.000 g, poi per 2 minuti a 11.000 g. Le sferette di lattice con legato l'mRNA verranno trattenute nel filtro.

Si procede poi con un secondo lavaggio: si aggiungono 500 µl di *buffer* RM3 e si risospendono le sferette delicatamente fino a non vedere più il *pellet*. Questo passaggio è importante per la rimozione dell'RNA ribosomiale. Si centrifuga per 15 secondi a 2.000 g e 2 minuti a 11.000 g; si scarta la soluzione passata attraverso il filtro.

Questo lavaggio viene ripetuto una seconda volta.

Si centrifuga poi per 1 minuto a 11.000 g senza tappo della centrifuga per fare evaporare completamente la soluzione di lavaggio. Si trasferisce il microfiltro in una

nuova *ependorf* da 1,5 ml e si aggiungono 20 µl di acqua RNasi *free*, precedentemente scaldata a 68°C, ogni 10 µl di soluzione con le sferette di lattice aggiunta nel primo passaggio della purificazione e si risospende l'RNA. Si mette infine a incubare l'*ependorf* con il filtro a 68°C per 7 minuti. Si centrifuga poi per 1 minuto a 11.000 g. L'RNA poly (A<sup>+</sup>) derivante dalla regione marginale del carapace della specie *A. spinifera* è stato quantificato al *Nanodrop* ed inviato ai laboratori della ditta *Evrogen* (Russia) per la costruzione della libreria di cDNA. Qui è stata eseguita la sintesi del cDNA e la successiva amplificazione (fino a 5 µg), necessaria per il sequenziamento 454. Il cDNA è stato sintetizzato tramite la tecnica *SMART* (Zhu *et al.*, 2001) e amplificato tramite *PCR* con i seguenti oligo:

SMART Oligo II oligonucleotide	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCrGrGrG-3'
CDS-GSU primer	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTGGAG-d(T) 20-VN-3'
SMART PCR primer	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

## 12. Trattamento con enzima *GsuI* (*Fermentas*)

Il cDNA sintetizzato ed amplificato dalla ditta *Evrogen*, è stato trattato con l'enzima *GsuI* della ditta *Fermentas* secondo il protocollo sotto descritto. Questa reazione di restrizione permette di eliminare dal campione gli oligonucleotidi utilizzati per la sintesi del cDNA e che contengono quindi il sito di restrizione per questo enzima.

Viene preparata una provetta contenente:

REAGENTI	QUANTITA'
<i>Buffer</i> 10X	5 µl
BSA 100X	0,5 µl
cDNA (5ng)	x µl
<i>Gsu I</i> (1U/µg)	1 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 50 µl

La provetta è stata incubata per 2 ore a 30°C. Dopo questa reazione il campione di cDNA è stato purificato con una colonnina *Amicon Ultra 100 K* della ditta *MILLIPORE* (Milano, Italia).

## 13. Sequenziamento 454

Il sequenziamento della libreria di cDNA è stato effettuato presso la ditta *BMR-Genomics* (Via Re di Puglia, Padova). Come metodo di sequenziamento è stata scelta la

tecnologia del pirosequenziamento, sviluppata dalla 454 *Life Sciences* e successivamente acquistata dalla *Roche*. Questa nuova tecnologia di sequenziamento rappresenta una grande innovazione rispetto ai metodi tradizionali: attraverso questo metodo si è in grado di assicurare con una singola corsa la lettura di oltre un milione di singoli frammenti di DNA con una lunghezza media compresa fra 400 e 500 paia di basi e con un'elevata accuratezza (>99,5%). Questo metodo utilizza la nuova tecnica della *PCR* in emulsione o amplificazione clonale (*emPCR*) che riduce drasticamente i tempi totali del processo, eliminando la necessità di clonare il DNA da sequenziare.

#### 14. Trascrizione inversa dell'RNA (Retrotrascrizione)

L'RNA totale viene retrotrascritto in cDNA, ovvero DNA complementare a singola elica, sintetizzato a partire da un campione di RNA messaggero grazie all'enzima Trascrittasi inversa. Questo enzima opera su un singolo filamento di mRNA, generando il suo DNA complementare, e utilizzando come *primer*, nel nostro caso, una miscela di esanucleotidi. Per tale reazione è stato usato il kit "*ImProm-II™ Reverse Transcriptase*" (*Promega*).

##### Procedimento:

Viene preparata una provetta contenente:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
RNA (1 µg)	x µl
<i>Random</i> esameri	2 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 10 µl

La provetta viene posta quindi a 70°C per 5 minuti in modo che l'RNA venga denaturato e nel frattempo viene preparata una seconda provetta contenente la miscela per la sintesi del cDNA:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
<i>Improme Reaction Buffer 5X</i>	4,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,4 µl
dNTPs <i>Mix</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>RNase inhibitor Promega</i> (40 U/µl)	0,5 µl
<i>Improm II Reverse Transcriptase</i>	1,0 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 10 µl

Una volta trascorsi i 5 minuti a 70°C, si lasciano i campioni a 4°C per 5 minuti. Successivamente si aggiungono i 10 µl della miscela per la sintesi a ciascun campione, che viene poi trasferito nel termociclatore, impostato con le seguenti condizioni:

REAZIONE	TEMPERATURA	DURATA
Legame degli esameri all'RNA	25°C	5 min
Reazione di retrotrascrizione	50°C	60 min
Inattivazione dell'enzima	70°C	15 min

Per degradare l'RNA rimasto, al termine delle suddette fasi, viene aggiunto ad ogni campione 1 µl dell'enzima *RNAseH* e si lascia incubare a 37 °C per 20 minuti. I campioni di cDNA vengono conservati a -20°C.

## 15. Estrazione di DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico dai campioni di fegato è stato utilizzato il *kit* “*DNeasy Tissue & Blood*” della ditta *Qiagen* (Milano, Italia). La purificazione del DNA avviene mediante il legame dell'acido nucleico ad una membrana silicea contenuta in una colonnina. Per l'estrazione vengono utilizzati i seguenti reagenti:

- Tampone di lisi del tessuto, ATL
- *Proteinasi K* (20 mg/ml)
- *RNAse A* (100 mg/ml)
- Tampone AL
- Etanolo assoluto
- Tampone di lavaggio 1, AW1
- Tampone di lavaggio 2, AW2

### Procedimento:

25 mg del tessuto di interesse vengono spezzettati e poi trasferiti in una *eppendorf* da 1,5 ml alla quale vengono poi aggiunti 180 µl di *buffer ATL* e 20 µl di *Proteinasi K*. Si vortica e si incuba il campione a 55°C per diverse ore, fino alla completa lisi del campione.

Dopo la lisi del tessuto si vortica per 15 secondi e si aggiungono al campione 200 µl di tampone AL e 200 µl di etanolo assoluto e si mescola il tutto. Il campione così ottenuto viene caricato in una colonnina inserita in un tubo collettore da 2 ml (*DNeasy Mini spin column*). Si centrifuga a 8.000 rpm per 1 minuto in una microcentrifuga e successivamente si scarta il liquido che viene raccolto nel tubo collettore. Si pone la



colonnina nuovamente nel tubo collettore, si aggiungono 500 µl di tampone AW1, si centrifuga per 1 minuto a 8.000 rpm e si elimina la soluzione raccolta. La colonnina viene posta nuovamente nello stesso tubo, si aggiungono 500 µl del tampone AW2 e si centrifuga alla massima velocità (14.000 rpm) per 3 min, dopo di che si scarta il serbatoio collettore contenente il fluido raccolto. Si può procedere a un'ulteriore centrifuga di 40 secondi a 14.000 rpm in modo da eliminare ogni traccia di etanolo. Infine la colonnina provvista di membrana viene posta in una *eppendorf* da 1,5 ml. Il DNA viene eluito con 150 µl di H<sub>2</sub>O milliQ aggiunti direttamente sulla membrana, si incuba a temperatura ambiente per 1 minuto e successivamente si centrifuga per 1 minuto a 8.000 rpm. Il DNA così ottenuto viene quantificato al *Nanodrop* e conservato a -20°C.

## 16. Amplificazione del DNA mediante *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*)

La *PCR* è una reazione enzimatica, condotta *in vitro*, utilizzata per produrre molte copie di uno specifico frammento di DNA. La reazione avviene tramite ripetuti cicli costituiti da tre fasi distinte:

- 1) denaturazione termica del DNA stampo;
- 2) appaiamento dell'oligonucleotide alla sequenza complementare del DNA stampo;
- 3) estensione dell'oligonucleotide con sintesi di una nuova catena di DNA complementare a quella dello stampo, mediante l'uso di una polimerasi termostabile, ovvero la *Taq* DNA polimerasi.

### Reagenti:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
<i>Buffer Biotherm</i> 10X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µl
dNTPs <i>Mix</i> (10 mM)	0,5 µl
Oligonucleotide 5' (10 µM)	0,5 µl
Oligonucleotide 3' (10 µM)	0,5 µl
<i>Taq</i> polimerasi <i>Biotherm</i> (5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	x µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 25,0 µl

I campioni vengono sottoposti alle seguenti condizioni nel termociclatore:

FASI	TEMPERATURA	DURATA	N° CICLI
Pre-denaturazione	95°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	40
Appaiamento	Variabile	30 sec	
Estensione	72°C	Variabile	
Estensione finale	72°C	10 min	1
Terminazione	20°C	2 min	1

### 16.1. Touch-down PCR

Questa metodica utilizza un programma in cui viene variata la temperatura di *annealing*, in modo tale da aumentare la specificità nella formazione del complesso iniziale *primer*-templato e quindi del prodotto finale di *PCR*. La temperatura di *annealing* nel ciclo iniziale è 5-10°C sopra alla  $T_m$  (temperatura di *melting*) dei *primer* utilizzati e nei cicli seguenti la temperatura viene gradualmente ridotta di 1°C per ogni ciclo fino al corrispondente valore più basso della  $T_m$  dei *primer*, che viene mantenuto per i cicli successivi. Risulta quindi possibile evitare lunghe e complicate misure di ottimizzazione della temperatura di *annealing*, per *primer* che presentano  $T_m$  anche molto diverse tra loro.

Il numero di cicli dipende dal *range* di temperatura scelto per la reazione, in base alla temperatura di *melting* dei *primer* utilizzati. La durata della fase di estensione dipende dalla lunghezza attesa dell'amplificato. Si considera necessario un minuto di estensione per amplificare circa 1.000 paia di basi. I reagenti utilizzati sono gli stessi che si usano per le normali *PCR*. La quantità di DNA aggiunta può variare ma in genere vengono usati 50 ng.

La reazione di amplificazione avviene in un volume finale di 25 µl. I campioni sono poi conservati a -20°C.

## 17. Analisi dei prodotti di amplificazione mediante separazione in gel di agarosio

Mediante questa tecnica è possibile visualizzare l'effettiva presenza dei prodotti di *PCR*. Attraverso l'applicazione di un campo elettrico si possono separare in base al peso molecolare frammenti di DNA o di RNA; in virtù della carica degli acidi nucleici, tali frammenti possono migrare attraverso il gel. Il DNA è infatti dotato di gruppi fosfato (carichi negativamente) che fanno migrare tutta la molecola verso il catodo, cioè il polo positivo del campo elettrico. Gli acidi nucleici attraversano il gel grazie alla sua

porosità. Il diametro dei pori influenza quindi la velocità di migrazione dell'acido nucleico: più lunga è la molecola più lento sarà il suo spostamento attraverso il gel. Il diametro dei pori tuttavia può essere fatto variare modificando la concentrazione dell'agarosio del gel. Nella presente tesi è stato utilizzato sempre gel all'1% di agarosio. Il gel è stato addizionato di un colorante che, intercalandosi tra le basi della sequenza, permettesse di evidenziare lo stato di migrazione dell'acido nucleico all'interno del gel. Come colorante è stato usato il *GEL RED*: esso assorbe luce UV con lunghezza d'onda compresa tra i 250 e i 320nm riemettendola sottoforma di luce visibile fluorescente con lunghezza d'onda maggiore (590 nm) e quindi visibile al transilluminatore. Viene aggiunto 1 µl di colorante ogni 20 ml di agarosio.

Il gel è composto, oltre che da agarosio e colorante anche da un tampone, il TAE, formato da:

- 4,84 g Tris-base
- 2 ml EDTA 0,5 M pH 8
- 1,14 ml acido acetico glaciale
- EDTA 0,5 M portato a pH 8 con NaOH 10 M

Il tampone autoclavato viene usato per disciogliere l'agarosio in polvere e viene riscaldato fino a raggiungere l'ebollizione. Successivamente viene aggiunto il colorante e il tutto viene versato in una vaschetta (che darà la forma al gel una volta raffreddatosi) e in cui vengono posti dei pettini adibiti alla formazione dei pozzetti di caricamento.

Dopo la formazione, il gel verrà rimosso dalla vaschetta e posizionato in una camera elettroforetica in cui è stato posto come tampone di corsa il TAE. Prima di caricare i campioni è necessario aggiungere un tampone di caricamento nella misura di 1 µl ogni 10 µl di campione. Il tampone 10x è così composto:

- Blu di xilene/bromofenolo 0,25%
- Glicerolo 5 ml
- H<sub>2</sub>O mQ 5 ml

Si usa un tampone di caricamento composto da blu di xilene o blu di bromofenolo in base alla lunghezza dei frammenti caricati. Il blu di bromofenolo migra similmente a frammenti di DNA di circa 0,5 kb. Per frammenti più corti invece è consigliabile usare tampone di caricamento preparato con blu di xilene. Oltre ai campioni è necessario usare uno dei pozzetti per il caricamento di un marcatore contenente frammenti di DNA di peso molecolare noto (*1 kb DNA Ladder*, Invitrogen) allo scopo di effettuare un paragone con i campioni per ottenere una stima della lunghezza dei frammenti amplificati.

In seguito al caricamento del marcatore e dei campioni, agli estremi della camera di caricamento viene applicata una differenza di potenziale di circa 5V/cm. Il risultato della corsa elettroforetica può essere visualizzato tramite transilluminatore a luce UV.

## **18. Estrazione e purificazione di DNA da gel di agarosio**

Per l'estrazione e la purificazione dei prodotti di *PCR* dal gel di agarosio è stato utilizzato il kit “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*” (*Promega*).

L'estrazione e la purificazione dei frammenti di DNA si basano sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul legame selettivo degli acidi nucleici alla matrice della colonnina.

### Reagenti:

- *Membrane Binding Solution*
- *Membrane Wash Solution*

### Procedimento:

Viene preparato un gel di agarosio e nei pozzetti si caricano i campioni. Alla fine della corsa, con un bisturi, si ritagliano le zone del gel contenenti la banda di interesse e si inseriscono in una *ependorf* del volume opportuno. Si pesa con esattezza il pezzetto di gel prelevato e si aggiungono 10 µl di *Membrane Binding Solution* per ogni 10 mg di gel. Si incubano le provette a 50°C-65°C per 10 minuti agitandole ogni 2-3 minuti per facilitare lo scioglimento del gel dovuto anche alla presenza di etanolo nel *buffer*. La soluzione così ottenuta viene trasferita in una colonnina con filtro che a sua volta è posta all'interno di una provetta e viene lasciata incubare a temperatura ambiente per 1 minuto. Il campione viene quindi centrifugato per 1 minuto alla massima velocità in una microcentrifuga. Dopo aver eliminato l'eluato, la colonnina con filtro viene lavata con 700 µl di *DNA Membrane Wash Solution* e centrifugato come sopra. Di nuovo viene eliminato l'eluato e si ripete il lavaggio con 500 µl di *Membrane Wash Solution* per 5 minuti. Successivamente si centrifuga per 1 minuto allo scopo di eliminare eventuali residui di etanolo presenti sulla membrana. Si trasferisce la colonnina in una nuova provetta e il DNA presente sul filtro viene infine eluito con 20-30 µl di H<sub>2</sub>O milliQ, centrifugando alla massima velocità per 1 minuto.

## **19. Analisi e quantificazione del DNA estratto da banda su gel di agarosio**

Per determinare la concentrazione di un campione di DNA se ne preleva un'aliquota e la si fa correre in un gel di agarosio all'1% in parallelo con una scala di DNA a concentrazione nota (*Low DNA Mass Ladder, Invitrogen*). Dal confronto della

luminosità delle bande dei campioni con quelle del *ladder* è possibile stimarne la concentrazione.

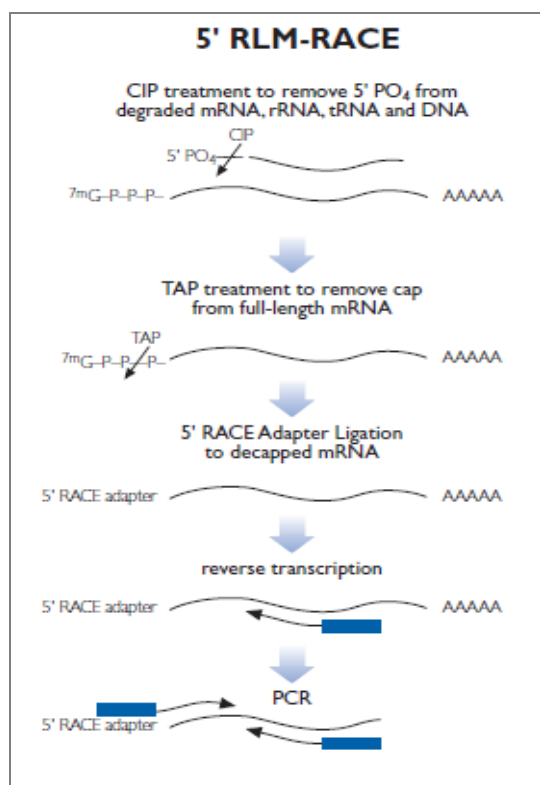
## **20. Purificazione dei campioni di PCR tramite *kit* DNA CLEAN AND CONCENTRATOR (Zymo research)**

Dopo aver misurato il volume delle reazioni di PCR si aggiungono alla provetta due volumi della soluzione DNA *Binding Buffer* (oppure sei volumi quando è necessario purificare i campioni di cDNA a singolo filamento). Dopo aver mescolato si carica la soluzione così ottenuta in una colonna dotata di filtro e si aspetta un minuto, in modo tale che il filtrino si imbeva della soluzione appena versata. Si centrifuga quindi alla massima velocità per 30 secondi e si aggiungono in seguito 200  $\mu$ l della soluzione *Wash Buffer*. Si centrifuga nuovamente per 30 secondi alla massima velocità. Dopo aver svuotato la colonnina dall'eluato, si esegue una centrifugazione a vuoto per fare evaporare l'etanolo presente nella soluzione di lavaggio. Il filtrino viene quindi inserito in una *ependorf* da 1,5 ml e si aggiungono 8  $\mu$ l di acqua milliQ, scaldata precedentemente nel termoblocco. Si lascia incubare il filtrino a temperatura ambiente per 1 minuto abbondante e si centrifuga per 30 secondi alla massima velocità.

Per la quantificazione si carica 1  $\mu$ l del prodotto di purificazione in gel d'agarosio all'1% e 6  $\mu$ l di *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen)*. Dal confronto della luminosità della banda del campione con quelle del *ladder* è possibile stimarne la concentrazione.

## **21. Amplificazione rapida delle estremità del cDNA mediata da RNA ligasi: RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends)**

Questa tecnica permette di amplificare, utilizzando la reazione di PCR, regioni di cDNA comprese tra un sito interno conosciuto e la parte terminale 3'- o 5'- di un determinato trascritto. Le reazioni sono state effettuate utilizzando il *kit FirstChoice®RLM-RACE* della ditta *Ambion (Austin, USA)*, che consiste in un protocollo perfezionato della classica RACE.



**Figura 16.** Rappresentazione schematica della reazione 5'-RLM-RACE (kit FirstChoice®RLM-RACE, ditta Ambion. Austin, USA).

### 21.1. 5'-RLM-RACE

L'RNA totale viene inizialmente trattato con l'enzima CIP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*), che rimuove l'estremità 5'-fosforilata da molecole di rRNA, mRNA frammentato, tRNA ed eventuale DNA genomico contaminante. L'enzima CIP non rimuove però il cappuccio all'estremità 5' delle molecole di mRNA intatto (Fig. 16).

- |                       |              |
|-----------------------|--------------|
| ▪ RNA totale (1 µg)   | x µl         |
| ▪ CIP Buffer 10X      | 2 µl         |
| ▪ CIP                 | 2 µl         |
| ▪ Nuclease-free Water | fino a 20 µl |

#### Procedimento:

la provetta con i reagenti viene incubata a 37°C per 1 ora, dopo essere stata vorticata e centrifugata. Terminata l'incubazione l'RNA viene purificato dalla miscela di reazione con il metodo fenolo:cloroformio aggiungendo i seguenti reagenti alla provetta:

▪ Soluzione di ammonio acetato	15 µl
▪ <i>Nuclease-free Water</i>	115 µl
▪ Fenolo acido (pH 4.5): Cloroformio	150 µl

Il tutto viene poi vorticato e centrifugato per 5 minuti a temperatura ambiente, alla massima velocità. La fase acquosa superiore, contenente l'RNA, viene recuperata, trasferita in una nuova provetta e addizionata con 150 µl di cloroformio, vorticata e centrifugata nuovamente con le stesse modalità. La fase acquosa ottenuta viene nuovamente trasferita in una nuova *eppendorf*, addizionata con 150 µl di isopropanolo per far precipitare l'RNA e posta a -20°C per 10 minuti. La provetta poi viene centrifugata alla massima velocità per 20 minuti a 4°C. Al termine della fase di centrifugazione si elimina il surnatante e si risospende il *pellet* in 0,5 ml di etanolo 70% freddo. La provetta viene centrifugata per 5 minuti alla massima velocità e dopo aver eliminato l'etanolo si lascia asciugare il *pellet*. Infine il precipitato viene risospeso in 11 µl di TAP *buffer* 1X.

A questo punto l'RNA così ottenuto può essere trattato con l'enzima TAP (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*), che è necessario per rimuovere il cappuccio all'estremità 5' dell'mRNA integro, lasciando un gruppo monofosfato, necessario per la successiva tappa di ligazione (Fig. 16).

Reagenti:

▪ RNA trattato con CIP	4 µl
▪ TAP	1 µl

La reazione richiede un'ora di incubazione a 37°C.

Successivamente, al 5'- monofosfato dell'RNA viene legato un oligonucleotide adattatore di 45 pb:

**5'-RACE adattatore:**

5'-GCU GAU GGC GAU GAA UGA ACA CUG CGU UUG CUG GCU UUG AUG  
AAA-3'

La reazione di ligazione è catalizzata dall'enzima T4 RNA ligasi (Fig. 16).

REAGENTI	QUANTITA'
RNA trattato con CIP/TAP	5 µl
5' <i>RACE Adapter</i> (0,3 µg/µl)	5 µl
RNA <i>ligase Buffer</i> 10X	1 µl
T4 RNA <i>ligase</i> (2,5 U/µl)	2 µl
<i>Nuclease-free water</i>	1 µl

La provetta contenente la miscela di reazione viene centrifugata rapidamente, incubata a 37°C per un'ora, dopodiché si può procedere con la retrotrascrizione utilizzando una miscela di decameri secondo il seguente protocollo:

Reagenti:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
RNA ottenuto dalla ligazione	2 µl
dNTPs <i>Mix</i> (2,5 mM)	4 µl
<i>Random Decamers</i> (50 µM)	2 µl
RT <i>Buffer</i> 10 X	2 µl
RNase <i>Inhibitor</i> (10 U/µl)	1 µl
M-MLV <i>Reverse transcriptase</i>	1 µl
<i>Nuclease-free water</i>	fino a 20 µl

La provetta con la miscela di reazione va posta a 42°C per un'ora, al termine della quale si ottiene il cDNA necessario per le successive reazioni di *PCR*. Per tali reazioni è stato impiegato l'enzima *Taq* polimerasi *Biotherm* e due oligonucleotidi 5', forniti dal *kit* della 5'-RLM-*RACE*, che si legano alla sequenza del 5'-*RACE* adattatore e si trovano uno a monte (5'-*RACE* esterno) rispetto all'altro (5'-*RACE* interno). Sono riportate di seguito le sequenze dei due oligonucleotidi:

**5'-*RACE* esterno (*outer*):**

5'-GC TGA TGG CGA TGA ATG AAC ACT G-3'

**5'-*RACE* interno (*inner*):**

5'-CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TAT G-3'

Tali oligonucleotidi 5'-terminali vanno accoppiati agli opportuni oligonucleotidi antisense specifici per il gene in esame. In particolare, si fa una prima *PCR* utilizzando



l'oligonucleotide 5'-*RACE* esterno e un oligonucleotide antisenso specifico per il gene *target* e si procede poi con una *nested PCR*, ovvero con una reazione di amplificazione eseguita *in vitro* che utilizza come DNA stampo l'amplificato ottenuto dalla precedente *PCR* e quindi, grazie alla presenza di due oligonucleotidi interni a quel frammento, si ottiene l'ulteriore amplificazione del prodotto della prima *PCR*. Si ricorre pertanto all'impiego dell'oligo 5'-*RACE* interno e di un oligonucleotide antisenso specifico posto a monte rispetto a quello usato per la prima *PCR*. Si può utilizzare anche un oligonucleotide interno al frammento ed un altro che si lega ad una delle due estremità, in questo caso si effettua una *emi-nested*.

Reagenti:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
<i>Buffer Biotherm 10X</i>	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µl
dNTPs <i>Mix</i> (10 mM)	0,5 µl
Oligonucleotide 5' (10 µM)	0,5 µl
Oligonucleotide 3' (10 µM)	0,5 µl
<i>Taq</i> polimerasi <i>Biotherm</i> (5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	da 1,0 a 2,0 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 25,0 µl

La reazione di *PCR* viene eseguita con i seguenti parametri:

FASI	TEMPERATURA	DURATA	N° CICLI
Pre-denaturazione	95°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	40
Appaiamento	Variabile	30 sec	
Estensione	72°C	Variabile	
Estensione finale	72°C	10 min	1
Terminazione	20°C	2 min	1

## 22. Sequenziamento automatico del DNA

Questa metodica è stata eseguita presso il servizio di sequenziamento del DNA dell'azienda BMR-*Genomics* (Padova). Per la reazione di sequenziamento si prepara una miscela contenente il *primer* specifico (3,2 µM) ed una quantità di DNA variabile

in base alla lunghezza del template e al tipo di DNA (DNA in doppia o in singola elica, plasmidico o da *PCR*). In ogni caso, viene sempre preparata una quantità doppia di campione, in modo tale che l'analisi possa essere ripetuta in caso di fallimento.

Si pone la miscela in una provetta da sequenziamento, si porta a secco a 65°C e poi si consegna al centro di sequenziamento.

### **23. Reazione enzimatica tramite il kit *ExoSAP-IT* USB Corporation**

Se nel gel di agarosio si ottiene una singola banda pulita del prodotto di *PCR*, si può applicare un metodo più semplice ed economico per ricavare il DNA da sequenziare: si purifica il prodotto di amplificazione direttamente tramite reazione enzimatica. Vengono utilizzati gli enzimi del kit *ExoSAP-IT* (*Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase Method*) della USB Corporation. La purificazione dei prodotti di *PCR* comporta l'eliminazione di *primer*, dNTPs, enzimi ed altri prodotti secondari rimasti in soluzione.

#### Reagenti:

- Prodotto di *PCR* (5 µl)
- Esonucleasi I 5 Unità
- Fosfatasi alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) 1 Unità

#### Procedimento:

in una provetta da sequenziamento vengono posti 5 µl del prodotto di *PCR* e si aggiungono 2 µl di *ExoSAP-IT*; la miscela viene posta nel termociclatore che svolge il seguente ciclo:

- 37°C 15 minuti
- 80°C 15 minuti

Durante il primo ciclo a 37°C, avviene la degradazione dei *primers* e dei nucleotidi rimasti ad opera del primo enzima, mentre nel secondo ciclo a 80°C l'enzima stesso viene inattivato.

Il campione viene poi messo a 4°C per 10 minuti per bloccare completamente la reazione enzimatica. Successivamente si aggiungono in una provetta una quantità di DNA, scelta in base alla lunghezza e alla concentrazione del template, e 2 µl di *primer* alla concentrazione di 3,2 µM e si porta tutto a secco a 65 °C.

## 24. PCR quantitativa (*qRT-PCR*)

Per quantificare l'espressione dei geni delle beta-proteine e delle alfa-cheratine sia negli esperimenti condotti su campioni di epidermide di tartaruga sia in quelli eseguiti sulla pelle normale e in rigenerazione di lucertola, è stata utilizzata la tecnica della *Real Time PCR* condotta con la strumentazione disponibile presso il centro *MicroCribi*. Tutti i campioni utilizzati sono stati analizzati in triplicato in un volume di 20 µl usando il kit *DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR kit* (Finnzymes, Euroclone, Milano, Italia). Le *PCR* sono state analizzate con il software *Applied Biosystem 7500 Real Time System*. I valori soglia (Ct) sono stati generati automaticamente dal sistema. Tali valori sono stati usati in seguito per valutare l'espressione degli amplificati.

Il protocollo di analisi adottato non richiede la sintesi di sonde con sequenza specifica ma si basa sull'uso del SYBR *green*, un fluoroforo intercalante che si lega al DNA a doppio filamento (dsDNA) e che funziona come *reporter*. Il SYBR si può legare a dimeri di *primer* o a prodotti aspecifici, dando così un segnale non corretto. La specificità di reazione può però essere garantita dalla specificità della coppia di *primer* utilizzata e può essere verificata analizzando le curve di *melting* alla fine dell'amplificazione. Questa analisi fornisce un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivela la presenza di dimeri o prodotti aspecifici. Gli strumenti per *Real Time PCR*, oltre a fungere da termociclatori, eccitano i fluorocromi presenti nei campioni e convogliano quindi la fluorescenza emessa in risposta fino ad uno spettrografo. Appositi *software* acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per ogni ciclo della *PCR* e convertono la variazione di fluorescenza del *reporter* in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuato determinando il ciclo della *PCR* (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del *reporter* e dove cioè i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema.

Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati con il gene *housekeeping gadph* (in generale, nei nomi dati agli oligo, la sigla F, che contraddistingue i *primer* senso, sta per *forward*, la sigla R, che contraddistingue i *primer* antisenso, sta per *reverse*):

Gene	Oligo	Sequenza	Applicazioni
gadph	GADPH-F1	5'-GACAACATATGGCATGGTGGGA-3'	<i>qPCR</i>
	GADPH-R1	5'-CTTAATGTCATCATACTTGGC-3'	

Elenco degli oligonucleotidi usati per amplificare beta-proteine (Li-Ac-X) e alfa-cheratine (Ac-Ker-X) di *A. carolinensis* negli esperimenti di *Real Time PCR*:

Gene	Oligo	Sequenza	Applicazioni
<b>Li-Ac-24</b>	Li-Ac-24/25-F1	5'-CATCTCTATCTATCGCTTGC-3'	<i>qPCR</i>
	Li-Ac-24-R1	5'-CTGATGCAGCAAGGGGTG-3'	
<b>Li-Ac-25</b>	Li-Ac-24/25-F1	5'-CATCTCTATCTATCGCTTGC-3'	
	Li-Ac-25-R1	5'-GTTGATGCAGGAAGGGACT-3'	
<b>Li-Ac-35</b>	Li-Ac-35-F1	5'-CAACTGATCTTTCAACCTGC-3'	
	Li-Ac-35-R1	5'-GCATTGCCACCTCTCACG-3'	

Gene	Oligo	Sequenza	Applicazioni
<b>Ac-Ker-14A</b>	Ac-Ker14A-F1	5'-GGAAGTGGTTTATCTCAGG-3'	<i>qPCR</i>
	Ac-Ker14AB-R1	5'-GTCTTGCTGAAGAACCACTG-3'	
<b>Ac-Ker-14B</b>	Ac-Ker14B-F1	5'-GGAAGTGGCTTACCTGCAC-3'	
	Ac-Ker14AB-R1	5'-GTCTTGCTGAAGAACCACTG-3'	
<b>Ac-Ker-75A</b>	Ac-Ker75A-F1	5'-CAACAAGCGCACTACTGCTG-3'	
	Ac-Ker75A-R1	5'-TAGAACAATGTTGGTGTCACTG-3'	
<b>Ac-Ker-75B</b>	Ac-Ker75B-F1	5'-CAATCGACGTACCTCTGCTG-3'	
	Ac-Ker75B-R1	5'-AGGATGACAGCAGTATCAGAC-3'	

Elenco completo di tutti gli oligonucleotidi utilizzati per amplificare sequenze di alfa-cheratine (AK) e beta-proteine nelle tartarughe *A. spinifera* (Tu-As) e *P. nelsonii* (Tu-Pn):

Gene	Oligo	Sequenza	Applicazioni
<b>As-AK1</b>	As-AK1-F1	5'-AACGCTGATCTGGAGAAGC-3'	PCR da DNA genomico
	As-AK1-R1	5'-CTTGCTTATGGTCAGCTGG-3'	5'-RACE
	As-AK1-R2	5'-TGAAGCAGCTGGACCTTGC-3'	5'-RACE
	As-AK1-R3	5'-AAACCACCGCCGCACACG-3'	5'-RACE
	As-AK1-F2	5'-GGTGGAAGTGGTGGTTTCG-3'	PCR dell'intera regione codificante
	As-AK1-R4	5'-CATACCACTGTTCCACCTC-3'	PCR da DNA genomico
	As-AK1-R5	5'-GGAGAATCATCATCATGTCTG-3'	PCR dell'intera regione codificante
<b>As-AK2</b>	As-AK2-F1	5'-CGTAGAGTCCTAGATGACC-3'	<i>qPCR</i> , PCR da DNA genomico
	As-AK2-F2	5'-CTCATACCACCACTAAAACGC-3'	PCR dell'intera regione codificante
	As-AK2-R1	5'-CCCTACGATTTTGCTCAGC-3'	<i>qPCR</i> , 5'-RACE, PCR da DNA genomico
	As-AK2-R2	5'-ATCACCATTTGCCTCCTCC-3'	5'-RACE
	As-AK2-R3	5'-CTACATTTGTTCAGAACATTTCC-3'	PCR dell'intera regione codificante

Gene	Oligo	Sequenza	Applicazioni
As-AK3	As-AK3-F1	5'-TCAGCGTAGAGATGGATGC -3'	<i>qPCR, PCR</i> da DNA genomico
	As-AK3-F2	5'-GTGGCGGCTTTGGTGGTG -3'	<i>PCR</i> dell'intera regione codificante
	As-AK3-R1	5'-AGCATCCATCTCTACGCT -3'	5'- <i>RACE</i>
	As-AK3-R2	5'-GGATTTGTGCTAGCTGTGC -3'	5'- <i>RACE</i>
	As-AK3-R3	5'-CTCTCTCATCTCAGACAGG -3'	<i>qPCR, PCR</i> da DNA genomico
	As-AK3-R4	5'-CTGGTACAATACAGGTGGTC -3'	<i>PCR</i> dell'intera regione codificante

Gene	Oligo	Sequenza	Applicazioni
Tu-As-1/10	Tu-As-F	5'-GTACCCACTTCTCTTGAC -3'	<i>Primer</i> senso comune a tutti gli isogruppi, <i>qPCR, PCR</i> da DNA genomico
	Tu-As-R	5'-CGAAGCTGTCTTGAGGGCA -3'	<i>qPCR, PCR</i> da DNA genomico
Tu-As-1	Tu-As-R1	5'-CCTTGGTCCGTGCTAATGC -3'	<i>PCR</i> dell'intera regione codificante
	Tu-As-1R	5'-CCTTGGTCCGTGCTAATGC -3'	5'- <i>RACE</i>
	Tu-As-2R	5'-AGCTCACGGACAGGTTGG -3'	5'- <i>RACE</i>
Tu-As-2	Tu-As-R2	5'-GCGTAGGGAATCTCCAGG -3'	<i>PCR</i> dell'intera regione codificante
Tu-As-3	Tu-As-R3	5'-GTGCTCCTGGCTTTACC -3'	<i>PCR</i> dell'intera regione codificante
Tu-As-4	Tu-As-R4	5'-GCTGGATTTACGCAGGCG -3'	<i>PCR</i> da cDNA dell'intera regione codificante dell'isogruppo 4
Tu-As-5			
Tu-As-6			
Tu-As-7			
Tu-As-8			
Tu-As-9			
Tu-As-10	Tu-As-R5	5'-CTTGGGTGGTGAATCTCCATC -3'	<i>PCR</i> dell'intera regione codificante
	Tu-As-3R	5'-GCCACAACCTCCGAAGCG -3'	5'- <i>RACE</i>
Tu-Pn	Tu1F	5'-ACACTTCTCCGACTTC-3'	<i>qPCR</i>
	Tu3R	5'-CTGTGCTGAGGGAAATTGCT-3'	

Condizioni di amplificazione nella *qPCR* a due step:

FASI	TEMPERATURA	DURATA	N° CICLI
Denaturazione iniziale	95°	10 min	1
Denaturazione	95°	30 sec	45 cicli
Appaiamento ed estensione	variabile	1 min	
Stadio di dissociazione	95°	15 sec	1
	60°	1 min	
	95°	15 sec	
	60°	15 sec	

Negli esperimenti riguardanti le tartarughe la temperatura di appaiamento ed estensione è stata mantenuta a 55°C per tutti i frammenti genici amplificati, e quindi per alfa-cheratine, beta-proteine e *gadph*. Negli esperimenti riguardanti le lucertole lo *step* di appaiamento ed estensione è stato mantenuto per tutti i frammenti genici, e quindi per alfa-cheratine, beta-proteine e *gadph*, a una temperatura di 58°C.

## 24.1. Preparazione delle rette di taratura

La tecnica della *Real Time PCR* permette la determinazione precisa del numero di molecole di RNA in relazione alla quantità di tessuto prelevato, grazie alla comparazione con una curva *standard*. Tale curva è formata da diluizioni seriali (da 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> molecole) di un campione di partenza di DNA plasmidico contenente il frammento del gene da amplificare.

I frammenti genici, clonati nel vettore *pGEM-T Easy* (*Promega*), sono stati ottenuti mediante retrotrascrizione dell'RNA dei campioni di cute delle tartarughe *A. spinifera* e *P. nelsonii* e da campioni di coda della lucertola *A. carolinensis* e successiva amplificazione tramite *PCR*, con gli stessi oligonucleotidi usati nella *Real Time PCR*. I plasmidi ricombinanti così ottenuti, sono stati quantificati allo spettrofotometro (*Nanodrop*) e in gel di agarosio e quindi diluiti in maniera seriale.

## 25. Clonaggio dei prodotti di *PCR*

### 25.1. Reazione di ligazione

La ligazione di un qualsiasi frammento di DNA con un vettore plasmidico linearizzato avviene tramite la formazione di nuovi legami tra i residui fosfato delle terminazioni in 5'- della doppia elica e gli ossidrili in 3'-. La formazione di questo legame fosfodiesterico può essere catalizzata *in vitro* da diversi tipi di DNA ligasi e solitamente viene utilizzata la DNA ligasi del batteriofago T4.

Per la reazione di ligazione dei frammenti di *PCR* è stato impiegato il *kit* commerciale *pGEM®-T Easy Vector* (*Promega*) in cui il plasmide (Fig. 17) si trova già nella forma linearizzata e presenta una timidina singola ad entrambe le estremità. La presenza di "T" sporgenti nel sito di inserzione migliora di gran lunga l'efficienza di ligazione dei prodotti di *PCR*, impedendo la chiusura del vettore in una forma circolare e fornendo sporgenze compatibili per gli amplificati ottenuti mediante polimerasi termostabili. Questo plasmide è dotato di un sito di poli-clonaggio inserito all'interno della regione codificante dell'enzima beta-galattosidasi. L'inattivazione inserzionale dell'alfa-peptide permette l'identificazione diretta dei cloni ricombinanti tramite selezione delle colonie bianche/blu. In presenza di IPTG (induttore del promotore del gene per la beta-

galattosidasi) e X-Gal (substrato dell'enzima beta-galattosidasi) nelle piastre di trasformazione, i batteri contenenti i plasmidi richiusi e privi di inserto formano colonie blu in quanto l'enzima beta-galattosidasi sintetizzato scinde l'X-Gal in un prodotto blu. Al contrario colonie bianche sono rappresentative di batteri contenenti plasmidi ricombinanti nei quali l'inserto, interrompendo la fase di lettura dell'enzima, blocca l'attività della beta-galattosidasi.

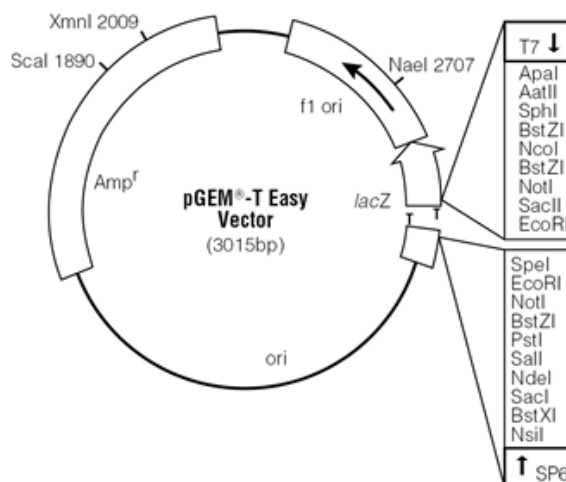
Per ottimizzare la reazione è stato usato un rapporto inserto:vettore pari a 3:1. La quantità di DNA necessaria alla reazione di ligazione è stata calcolata utilizzando la seguente formula che tiene conto della lunghezza del frammento da clonare:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{lunghezza inserto (Kb)} \times \text{ng vettore}}{\text{lunghezza vettore (Kb)}} \times \frac{\text{rapporto molare inserto}}{\text{vettore}}$$

Si imposta la reazione di ligazione come segue:

REAGENTI	QUANTITA'
<i>Rapid Ligation Buffer 2X</i>	5 µl
T4 DNA ligasi	1 µl
Inserto di DNA	x µl
<i>Vettore pGEM®-T Easy (50 ng/µl)</i>	1 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 10 µl

La soluzione viene mantenuta *overnight* a 4°C.



**Figura 17.** Mappa del vettore plasmidico *pGEM®-T Easy Vector* ([http://www.promega.com/paguide/images/1473VA05\\_6A.jpg](http://www.promega.com/paguide/images/1473VA05_6A.jpg)).

## 25.2. Trasformazione di batteri JM109 competenti tramite *shock* termico

La trasformazione comporta l'introduzione di DNA esogeno in una cellula procariote. Essa può essere ottenuta trattando le cellule in modo da cambiare temporaneamente le caratteristiche della membrana cellulare, per esempio, mediante *shock* termico oppure applicando un campo elettrico tra due elettrodi immersi nella sospensione cellulare. In entrambi i casi si provoca la formazione sulle membrane di punti di rottura localizzati che permettono lo scambio di molecole tra l'interno e l'esterno della cellula. Per aumentare l'efficienza di trasformazione i batteri vengono sottoposti ad un particolare trattamento, sono cioè resi competenti.

### 25.2.1. Preparazione dei batteri JM109 competenti

#### Reagenti:

- Terreno LB

Il terreno LB sterile si prepara sciogliendo 20 g di terreno LB *BROTH* in polvere (*Invitrogen*) in un litro di H<sub>2</sub>O. La soluzione ottenuta viene autoclavata e conservata a 4°C.

- CaCl<sub>2</sub> (0,1 M)
- Glicerolo

I batteri della specie *Escherichia coli*, del ceppo JM109, prelevati da uno *stock* crioconservato a -80°C, vengono inoculati in 5 ml di terreno LB a 37°C, lasciato per tutta la notte in agitazione. Il giorno seguente si preleva 1 ml di coltura e lo si diluisce in 100 ml di terreno LB. Il tutto viene incubato a 37°C, in agitazione, finché l'assorbanza della coltura batterica a 600 nm non raggiunge una densità ottica pari a 0,3 O.D. La coltura viene quindi raffreddata in ghiaccio per 30 minuti in modo da bloccare la crescita batterica. I batteri vengono quindi raccolti dal brodo di coltura mediante centrifugazione a 4°C per 15 minuti a 2.500-3.000 g dopo aver suddiviso i 100 ml di coltura in due tubi da 50 ml. Dopo aver eliminato il surnatante, si risospendono i sedimenti con 50 ml di CaCl<sub>2</sub> 0.1 M freddo. Dopo aver lasciato le cellule in ghiaccio per almeno 30 minuti si procede con una seconda centrifugazione e si risospende il *pellet* in 5 ml di una soluzione di CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e glicerolo 10%. A questo punto la coltura batterica viene suddivisa in *eppendorf* da 1,5 ml e conservata a -80°C.



### 25.2.2. Trasformazione mediante *shock* termico

#### Reagenti:

- Terreno di coltura LB
- Una soluzione pari a 100 ml di terreno SOC (pH 7) contiene:
  - 2 g Bacto-Tryptone
  - 0,5 g estratto di lievito
  - 1 ml NaCl (1 M); 0,25 ml KCl (1 M); 1 ml Mg<sup>2+</sup> (2 M)
  - 1 ml glucosio (2 M)

La miscela viene autoclavata e conservata a -20°C.

- Ampicillina (100 µg/ml)
- IPTG (100 mM)
- X-Gal (80 µg/ml)

#### Procedimento:

i batteri, conservati a -80°C in aliquote da 150 µl, vengono riposti in ghiaccio e lasciati scongelare per circa 5 minuti. In seguito vengono aggiunti ai batteri dai 2 ai 4 µl della reazione di ligazione e si lasciano in ghiaccio per circa 30 minuti a 4°C. Si effettua poi uno *shock* termico a 42°C per 40 secondi, al termine dei quali i batteri vengono nuovamente posti in ghiaccio per 2 minuti. Si aggiunge 1 ml di terreno liquido SOC a temperatura ambiente e i batteri vengono incubati per 1 ora e mezza a 37°C in blanda agitazione (circa 150 rpm). Dopo l'incubazione i batteri vengono seminati in piastre di terreno solido LB (cioè addizionato di agar all'1,2%), contenenti l'ampicillina, l'IPTG e l'X-Gal e vengono lasciati crescere per tutta la notte a 37°C. Le piastre così preparate permettono di selezionare i batteri che contengono il plasmide ricombinante portante la resistenza all'antibiotico.

Il giorno successivo si possono osservare delle colonie batteriche derivate dalla divisione dei batteri; ogni colonia rappresenta un clone derivato dalla divisione di un unico batterio.

### 25.3. Controllo dell'avvenuto clonaggio mediante *PCR*

La verifica dell'avvenuto inserimento del frammento di DNA nel plasmide viene eseguita mediante *PCR* utilizzando gli oligonucleotidi M13F e M13R che si trovano a monte e a valle del sito di poli-clonaggio. Si divide una piastra contenente LB-agar e ampicillina in settori numerati. Usando un puntale sterile si preleva una colonia isolata, la si striscia su un settore numerato della nuova piastra e poi la si immerge nella corrispondente provetta da *PCR* contenente 20 µl di una soluzione così composta:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
<i>Buffer Biotherm</i> 10X	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,2 µl
Oligonucleotide 5' (10µM)	0,6 µl
Oligonucleotide 3' (10µM)	0,6 µl
dNTPs <i>Mix</i> (10mM)	0,6 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 20,0 µl

Le provette vengono tenute per 10 minuti a 98°C affinché le pareti batteriche si rompano e il DNA fuoriesca.

Al termine di questa fase vengono aggiunti 10 µl di una soluzione contenente 0,4 U dell'enzima *Taq* polimerasi:

MIX PER UN CAMPIONE	QUANTITA'
<i>Buffer Biotherm</i> 10X	1,0 µl
<i>Taq</i> polimerasi (5U/µl)	0,2 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	fino a 10,0 µl

I campioni vengono quindi sottoposti alle seguenti condizioni nel termociclatore:

FASI	TEMPERATURA	DURATA	N° CICLI
Pre-denaturazione	95°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	45 sec	35
Appaiamento	55°C	70 sec	
Estensione	72°C	variabile	
Estensione finale	72°C	10 min	1
Terminazione	20°C	2 min	1

Si procede quindi alla corsa su gel di agarosio e all'eventuale reazione enzimatica per il sequenziamento (vedi paragrafi precedenti).

## 26. Purificazione del DNA plasmidico dai batteri (mini-prep)

La purificazione è stata eseguita mediante il protocollo e i reagenti forniti dal *kit* "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche Molecular Biochemicals, Italia). Tale procedimento

consiste nella lisi alcalina dei batteri e nella purificazione del DNA plasmidico mediante legame ad una resina di fibre di vetro contenuta in una colonnina, in presenza di sali caotropici.

Reagenti:

- Terreno LB
- Ampicillina 100 µg/ml
- Tampone di risospensione:
  - 50 mM Tris-HCl pH 8
  - 10 mM EDTA (acido etilendiamminotetracetico)
  - 100 µg/ml RNase A.
- Tampone di lisi:
  - 0,2 mM NaOH
  - 1% SDS (Sodio Dodecil Solfato)
- Tampone di legame:
  - 4 M guanidina-HCl
  - 0,5 M potassio acetato pH 4,2.
- Tampone di lavaggio I:
  - 5 M guanidina-HCl
  - 20 mM Tris-HCl
  - 0,6 volumi etanolo assoluto.
- Tampone di lavaggio II:
  - 20 mM NaCl
  - 2 mM Tris-HCl pH 7,5
  - 4 volumi etanolo assoluto.

Si preleva con un puntale sterile una singola colonia di batteri *E. coli* trasformati col plasmide da isolare. La colonia viene inoculata in 5 ml di terreno LB sterile addizionato di ampicillina (100 µg/ml). La coltura viene incubata tutta la notte a 37°C in costante agitazione.

Il giorno dopo si prelevano 2 ml della coltura e si centrifugano a 16.000 rpm per 2 minuti. Si scarta il surnatante e si risospende il sedimento in 250 µl di tampone di risospensione. Si aggiungono 250 µl di tampone di lisi, mescolando il contenuto della provetta per inversione. Una volta provocata la lisi, si aggiunge il tampone di legame nella quantità di 350 µl; questo induce la precipitazione delle proteine e del DNA genomico. Si mescola nuovamente per inversione e si incuba la provetta in ghiaccio per 5 minuti. Si prosegue centrifugando a velocità massima per 15 minuti. Il surnatante formatosi viene prelevato e immesso in una colonnina *High pure filter tube* posta al di

sopra di una provetta da 2 ml che funga da serbatoio collettore. Si centrifuga per 1 minuto alla massima velocità. Si scarta l'eluato in quanto il DNA plasmidico rimarrà legato al filtro della colonnina. L'aggiunta di 500 µl di tampone di lavaggio I permetterà di eliminare le nucleasi presenti. Si procede con un'altra centrifugazione di 1 minuto e si elimina nuovamente l'eluato. Si aggiungono 700 µl di tampone di lavaggio II e si centrifuga a 13.000 g per un minuto per eliminare i componenti batterici residui. Si ripete il lavaggio con il tampone di lavaggio II. Si centrifuga ulteriormente per un minuto per eliminare l'eventuale presenza di tracce del tampone. La colonnina viene inserita su una provetta da 1,5 ml sterile e si eluisce il DNA plasmidico aggiungendo 30 µl di acqua e centrifugando 1 minuto alla massima velocità.

## 27. Diluizioni delle mini-prep in base al numero di molecole

Il numero di molecole di vettore+inserto viene calcolato a partire dal numero di moli presenti in 1 µl:

$$\text{n}^\circ \text{ moli di vettore + inserto} = \frac{\text{Concentrazione di vettore + inserto (g/}\mu\text{l)}}{\text{Peso molecolare del vettore + inserto (g/mol)}}$$

dove il peso molecolare del costrutto è dato dalla sua lunghezza in paia di basi per il peso medio di una coppia di basi (650 Da).

Il numero di moli per µl così ottenuto, viene quindi moltiplicato per il numero di Avogadro; il risultato corrisponde al numero di molecole di vettore ricombinante contenute in 1 µl di preparato.

Da qui si preparano delle diluizioni a partire da un campione contenente  $10^{10}$  molecole; si ottiene così una serie di campioni contenenti da  $10^{10}$  fino a  $10^2$  molecole, che verranno utilizzate per la costruzione delle rette di taratura nella *Real Time PCR* (paragrafo 24.1).

## 28. Strumenti bioinformatici utilizzati

### *ExPASy*

*ExPASy* è un portale di bioinformatica gestito dall'Istituto svizzero di bioinformatica (SIB). Permette l'accesso a molte risorse scientifiche come banche dati e *software* in diversi settori delle scienze della vita. Gli scienziati possono accedere a una vasta gamma di risorse in molti settori diversi, come la genomica, la proteomica, filogenesi/evoluzione, biologia dei sistemi, genetica delle popolazioni, trascrittomica, ecc. Disponibile presso il sito <http://www.expasy.org/>.

### ***ProtParam***

*ProtParam* è uno strumento che permette il calcolo di vari parametri fisici e chimici per una proteina o per una sequenza inserita dall'operatore. I parametri calcolati sono il peso molecolare, pI teorico, composizione aminoacidica, composizione atomica, coefficiente di estinzione, vita media, indice di instabilità, indice alifatico. Tale programma è reperibile all'indirizzo Internet <http://web.expasy.org/protparam/>.

### ***ExSPASy-Translate tool (Expert Protein Analysis System)***

Il programma permette di tradurre sequenze nucleotidiche scelte dall'operatore e mostra come risultato sei possibili *frame* di lettura della rispettiva sequenza aminoacidica tradotta (tre in direzione 5'→3' e tre in direzione 3'→5') (<http://web.expasy.org/translate/>).

### ***HMMER***

*HMMER* (reperibile al sito Internet <http://hmmer.janelia.org/search>) è un programma per la ricerca di omologie di sequenza che permette di identificare una sequenza non nota tramite il confronto con sequenze note depositate in *database*. Tale strumento individua il tipo di proteina o la famiglia proteica di appartenenza fornendo rispetto a questo dato anche un valore "*E-value*". L'*E-value* rappresenta la probabilità che l'omologia di sequenza riscontrata sia dovuta al caso, per cui più basso è il valore riportato, maggiore sarà la probabilità che il risultato corrisponda alla realtà. Inoltre il programma *HMMER* fornisce informazioni sulla proteina stessa e sulla sua distribuzione negli organismi.

### ***BLAST***

*BLAST* (*B*asic *L*ocal *S*earch *T*ool) è un algoritmo ideato e sviluppato negli anni '90 che permette di identificare l'identità di una sequenza, sia nucleotidica sia aminoacidica, non nota tramite il confronto con sequenze note depositate in *database*. E' disponibile presso il sito <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### ***ClustalW***

Il programma permette di allineare sequenze di acidi nucleici o proteine. Gli allineamenti possono essere effettuati tra due sequenze (allineamenti *pair-wise*) oppure tra sequenze multiple. Immettendo le sequenze in formato *fasta*, il *software* le

restituisce allineate. Si ottengono così fondamentali informazioni sulle regioni conservate tra queste (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw/>).

### ***PSIPRED***

*PSIPRED* è un semplice e preciso metodo di predizione della struttura secondaria di una sequenza nucleotidica codificante. E' reperibile al sito Internet <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, (McGuffin *et al.*, 2000).

### ***Finch TV***

*Finch TV* (versione 1.4) è un programma che viene utilizzato per visualizzare le sequenze ottenute dal sequenziamento automatico del DNA. E' scaricabile dal sito <http://www.geospiza.com/finchtv.html>.

### ***ENTREZ***

Sistema di ricerca prodotto dall'NCBI che permette di recuperare dati riguardanti sequenze nucleotidiche e proteiche, mappe, strutture ed informazioni tassonomiche. *ENTREZ* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ>) fornisce inoltre un importantissimo strumento, *PUBMED*, banca dati che consente di accedere a tutte le citazioni bibliografiche contenute in *MEDLINE*.

### ***Genbank***

*Genbank* è una banca dati, fornita dall'NCBI, in cui sono presenti tutte le sequenze nucleotidiche pubblicamente disponibili. Insieme a DDBJ (*DNA DataBank of Japan*) ed EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), fa parte dell'*International Nucleotide Sequence Database Collection*, una collaborazione tra diverse banche dati che condividono quotidianamente i dati riguardanti le sequenze nucleotidiche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

### ***NCBI (National Center for Biotechnology information)***

Divisione del *National Library of Medicine* (NLM), situato presso il *National Institute of Health* (NIH), USA. Fondato nel 1988 per decisione governativa con lo scopo di fornire un supporto alla ricerca nella biologia molecolare, gestisce *database* pubblici e sviluppa *software* per l'analisi dei dati genomici (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### ***Ensembl***

Il progetto *Ensembl* produce banche dati del genoma dei Vertebrati e di altre specie eucariotiche e rende queste informazioni disponibili gratuitamente *online*. E' reperibile al sito Internet <http://www.ensembl.org/>.

### ***BLAT (BLAST-Like Alignment Tool)***

*Blat* è un programma sviluppato da Jim Kent alla UCSC per identificare similitudini tra sequenze di DNA e sequenze proteiche. Questo *software* riesce a mappare velocemente la regione genomica di interesse e a fare allineamenti con specie diverse presenti nel *browser*. E' inoltre possibile visualizzare le sequenze genomiche con la suddivisione esoni-introni. E' disponibile al sito internet <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>.

### ***TFSEARCH***

Le sequenze promotoriali delle 40 beta-proteine di *A. carolinensis* (Dalla Valle *et al.*, 2010) sono state analizzate mediante il programma *TFSEARCH*, versione 1.3. Il programma permette la ricerca di siti di *binding* per fattori di trascrizione noti all'interno di sequenze nucleotidiche. Tale applicativo è stato sviluppato da Akiyama (Kyoto University) nel 1995. E' stato possibile utilizzare il *software* tramite un'interfaccia *online* disponibile presso il sito <http://www.rwcp.or.jp/lab/pdappl/papia.html>. Per la ricerca dei siti, *TFSEARCH* utilizza la banca dati di profili di siti di legame per fattori di trascrizione *TFMATRIX* all'interno del *database TRANSFAC*. La compilazione di questo *database* è stata curata da Heinemeyer e collaboratori nel 1998. La ricerca di siti di *binding* per fattori di trascrizione è stata eseguita contro matrici di Vertebrati. Il programma permette di selezionare inoltre il valore di omologia tra i siti di *binding* potenziali presenti nella sequenza immessa e i siti di *binding* presenti nella banca dati. Il valore di *default* prevedeva una percentuale di omologia del 75% ma, per rendere la ricerca più stringente e precisa, il valore di omologia è stato portato a 95%, non ammettendo quasi nessun *mismatch* tra le sequenze. Il programma restituisce la sequenza in analisi unitamente alla collocazione dei siti di *binding* per i fattori di trascrizione trovati. Vengono inoltre indicati il tipo di fattore di trascrizione che potenzialmente lega la sequenza in analisi, la percentuale di omologia e un collegamento ipertestuale mediante il quale si può accedere a dati inerenti al quel determinato fattore di trascrizione e alla relativa bibliografia.

### ***MATCH e P-Match***

Assieme al precedente *software* si è deciso di analizzare le regioni promotrici delle 40 KAbetaPs di *A. carolinensis* (Dalla Valle *et al.*, 2010) anche con i programmi *Match* (versione pubblica 1.0) e *P-Match* (versione pubblica 1.0) allo scopo di rendere i risultati il più possibile attendibili. Questi strumenti bioinformatici, come *TFSEARCH*, sono programmi di predizione di possibili siti di legame per fattori di trascrizione in sequenze di DNA incognite. I programmi operano confrontando, tramite particolari algoritmi, le sequenze nucleotidiche inserite dall'operatore in un'interfaccia *online* con profili di siti di legame per fattori di trascrizione presenti all'interno del *database TRANSFAC*. Le versioni pubbliche si trovano nel sito <http://www.gene-regulation.com/pub/programs>. Anche in questo caso la ricerca di siti di *binding* per fattori di trascrizione è stata eseguita contro matrici di Vertebrati. Il programma indica il tipo di fattore di trascrizione che potenzialmente lega la sequenza in analisi, la collocazione, la percentuale di omologia e un collegamento ipertestuale mediante il quale è possibile risalire alla bibliografia e ai dati riguardanti i vari fattori di trascrizione identificati.







## Risultati

### 29. Cheloni

#### 29.1. Ricerca molecolare e bioinformatica di alfa-cheratine e beta-proteine in *A. spinifera* e successivo confronto con i rispettivi putativi geni ortologhi in *P. nelsonii*

Precedenti studi, condotti nel laboratorio del Prof. Lorenzo Alibardi (Università di Bologna) e basati su analisi autoradiografiche, immunoistochimiche, e mediante isolamento mono e bidimensionale di proteine estratte da guscio, zampe e collo della tartaruga a guscio molle *A. spinifera* avevano indicato la presenza, anche nell'epidermide di questa specie animale, di proteine appartenenti alla famiglia delle beta-proteine, ma con livelli di espressione molto bassi (Alibardi e Toni, 2006a; Alibardi, 2006a). E' importante sottolineare che, dal punto di vista morfologico, lo strato corneo dell'epidermide, anche nel carapace, appare comunque diverso da quello tipico delle altre tartarughe. Risulta infatti formato da corneociti separati e sottili come in presenza in uno strato corneo contenente alfa-cheratina ma privo di addensamenti di beta-proteine. La localizzazione immunocitochimica, usando anticorpi generali per le beta-proteine, mostrava una diffusa immunofluorescenza o una diffusa marcatura con oro colloidale nelle analisi condotte a livello ultrastrutturale. Precedenti analisi biomolecolari, condotte con coppie di *primer* degenerati o selezionati in regioni conservate tra le beta-proteine di specie diverse di Rettili, avevano invece sempre dato risultati negativi.

Varie ipotesi sono state formulate sulle proteine coinvolte nel processo di corneificazione di questa specie di rettile: presenza di beta-proteine non riconoscibili in modo ottimale dagli anticorpi fino a quel momento disponibili o presenza di KAbetaPs con sequenza aminoacidica e struttura diversa dalle beta-proteine presenti nelle altre specie di Rettili (Alibardi *et al.*, 2009). In particolare, la mancata immunoreattività all'anticorpo beta-universale, diretto contro la regione del "core-box" delle KAbetaPs di Coccodrilli ed Uccelli, suggeriva la mancanza di questa regione conformata a foglietto beta nelle proteine della tartaruga a guscio molle. La durezza meccanica delle KAbetaPs è in relazione a questa regione a foglietto beta della proteina, responsabile della formazione dei filamenti di beta-proteina (Gregg e Rogers, 1986; Fraser e Parry, 2008). La possibile mancanza di tale regione proteica, dedotta dal mancato riconoscimento da parte dell'anticorpo beta-universale, portava ad ipotizzare la mancanza di KAbetaPs canoniche nell'epidermide della tartaruga a guscio molle (Alibardi e Toni, 2007; Toni *et al.*, 2007). Un'altra possibilità era che l'anticorpo non

riconoscesse la proteina della tartaruga o che non fosse sufficientemente sensibile per i possibili bassi livelli di questa proteina nell'epidermide della tartaruga a guscio molle. Onde ottenere una risposta alle domande sulla presenza o meno delle K $\beta$ Ps nell'epidermide della tartaruga a guscio molle e sul ruolo di tali proteine e di alcune loro regioni aminoacidiche nel conferimento della durezza e resistenza meccanica, nella presente tesi si è cercato di analizzare l'espressione di trascritti codificanti proteine appartenenti alle famiglie delle alfa-cheratine e K $\beta$ Ps partendo dall'RNA estratto dalle regioni marginali (quindi in crescita ed espansione) del carapace di questa particolare specie di tartaruga. L'espressione dei trascritti è stata analizzata dopo preparazione e sequenziamento di una libreria di cDNA mediante la tecnologia del pirosequenziamento 454, disponibile presso il centro BMR *Genomics* (Padova).

Per la preparazione della libreria è stata necessaria l'estrazione di grandi quantità di RNA totale e la successiva purificazione dell'RNA poly (A<sup>+</sup>). L'RNA messaggero ottenuto è stato mandato alla ditta *Evrogen* (Mosca, Russia) per la sintesi e successiva amplificazione della relativa libreria di cDNA. Infine, 5  $\mu$ g della libreria di cDNA, sintetizzata dalla *Evrogen*, sono stati trattati con l'endonucleasi di restrizione *GsuI*, purificati e fatti pervenire al centro BMR per il loro sequenziamento con la tecnologia 454. A causa del costo di tale approccio e dei limitati fondi a disposizione (Progetto PRIN2008, 2008CTAXSE\_002) è stato possibile esaminare solo una parte del trascrittoma ottenuto con questa tecnica (è stato infatti coperto solo 1/8 della superficie del vetrino). I risultati ottenuti sono quindi parziali ma, visto che sono stati analizzati geni molto espressi a livello di epidermide, questo non ha compromesso i risultati finali.

Le sequenze ottenute sono state analizzate tramite il programma *BLAST* per individuare quali fossero i trascritti codificanti le proteine oggetto di questa tesi. A tal fine sono state usate come "query" tutte le sequenze fino ad ora disponibili di beta-proteine isolate in varie specie di Rettili (Dalla Valle *et al.*, 2005, 2007a,b, 2009a,b, 2010; Hallahan *et al.*, 2009) e sequenze codificanti alfa-cheratine trovate in precedenti ricerche condotte sul genoma di *Anolis carolinensis* e di *Gecko gecko* (Eckhart *et al.*, 2008; Hallahan *et al.*, 2009). Sono state inoltre utilizzate sequenze di alfa-cheratine espresse nell'epidermide di Mammiferi e Uccelli.

Dopo aver identificato i trascritti codificanti alfa-cheratine nella tartaruga a guscio molle *A. spinifera* sono stati ricercati i rispettivi putativi geni ortologi nella tartaruga a guscio duro *P. nelsonii*. Tale analisi è stata condotta per poter effettuare una successiva indagine di tipo quantitativo sull'espressione delle proteine in esame mediante *Real time PCR* assoluta. Questo approccio ha permesso di evidenziare eventuali differenze di espressione genica nelle due specie di tartarughe, ciascuna caratterizzata da un

differenti gradi di corneificazione del tegumento. Per poter effettuare questi ultimi esperimenti è stato necessario estrarre l'RNA totale da campioni di cute del collo, coda e arti, oltre che dai bordi del carapace, provenienti da tre esemplari di tartarughe a guscio duro e da tre esemplari di tartarughe a guscio molle.

Per esigenze di spazio nelle immagini, negli allineamenti e nei grafici verranno utilizzate le sigle: As, quando ci si riferirà alla tartaruga a guscio molle *A. spinifera*, e Pn, quando si farà riferimento alla tartaruga a guscio duro *P. nelsonii*.

### **29.1.1. Alfa-cheratine**

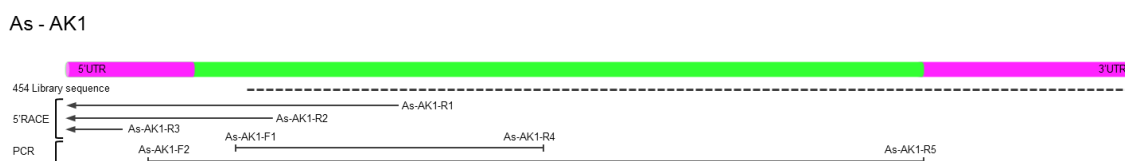
L'analisi bioinformatica della libreria di cDNA della tartaruga a guscio molle ha rilevato la presenza di sei frammenti di sequenze corrispondenti ad alfa-cheratine. Tutti e sei i trascritti derivavano da isogruppi contenenti una sola *isotig* ed erano mancanti di parte della regione codificante e della porzione 5'-UTR. La determinazione di sequenze non complete è causata dalla notevole dimensione del messaggero corrispondente che codifica proteine relativamente grandi: il peso molecolare delle citocheratine varia infatti da 40 a 70 kDa (Sun *et al.*, 1983; Moll *et al.*, 1982). Nella prima fase del lavoro si è cercato di ottenere la sequenza completa di tutti e sei i trascritti di alfa-cheratina, ma probabilmente a causa di possibili bassi livelli di espressione è stato possibile completare del tutto o quasi la sequenza di solo tre di queste, siglate AK1, AK2 e AK3. Le sequenze sono disponibili presso il database EMBL/GenBank/DDBJ con i codici di accesso HF562343 (AK1), HF562344 (AK2) e HF562345 (AK3). La parte mancante è stata ottenuta tramite la tecnica 5'-RACE che permette di ottenere molecole di cDNA comprese tra la regione nota e la parte 5'-terminale dei trascritti. Il *kit* utilizzato per l'esecuzione di questo protocollo, secondo le specifiche della ditta che lo commercia, permette di legare un adattatore, che funzionerà da sito di legame per gli oligonucleotidi 5'-RACE nelle reazioni di PCR, unicamente agli mRNA maturi (dotati di cappuccio in posizione 5'-terminale) e quindi in teoria permette di evitare di lavorare su trascritti non completi. Nonostante queste caratteristiche i trascritti di AK1 e AK3 non sembrano essere completi in tutta la regione codificante. Per questo motivo l'analisi 5'-RACE è stata ripetuta più volte ma i risultati ottenuti sono rimasti comunque sempre gli stessi.

#### **29.1.1.1. Alfa-cheratina 1 (As-AK1)**

Per l'esecuzione dell'analisi 5'-RACE e per la conseguente identificazione della sequenza completa (o quasi) del trascritto AK1 sono stati scelti degli oligonucleotidi antisenso, disegnati sulla regione ottenuta dalla libreria di cDNA, rispettivamente As-AK1-R1, As-AK1-R2 e As-AK1-R3, da accoppiare con gli oligonucleotidi senso

adattatori, 5'-RACE outer e 5'-RACE inner, in una serie di reazioni di PCR, nested ed emnested PCR (Fig. 18). Nella prima PCR sono stati abbinati gli oligo 5'-RACE outer e As-AK1-R1. L'amplificato così ottenuto è stato usato come stampo per la seconda reazione di PCR in cui si sono accoppiati gli oligo 5'-RACE inner e As-AK1-R2, selezionato in una regione a monte rispetto ad As-AK1-R1. Infine il prodotto ottenuto da quest'ultima PCR è stato ulteriormente amplificato nella terza reazione di PCR servendosi degli oligonucleotidi 5'-RACE inner e As-AK1-R3. Il frammento risultante è stato poi clonato, sequenziato e allineato con la sequenza derivante dal pirosequenziamento 454. L'allineamento mediante *ClustalW* e l'utilizzo del programma *ExPASy-translate* hanno verificato che la regione codificante presente nel trascritto del sequenziamento 454 era quasi completa mentre mancava di tutta la regione 5'-UTR. Come già riferito nella parte introduttiva dei risultati, l'analisi 5' RACE è stata ripetuta ottenendo però sempre lo stesso risultato. E' stato quindi considerato il primo codone ATG come codone di inizio della traduzione anche se la regione N-terminale potrebbe essere ancora parziale.

Per controllare sperimentalmente l'accuratezza del sequenziamento 454 (corrispondente alla regione sottolineata con un tratteggio nella figura 18), è stata amplificata l'intera regione codificante utilizzando un oligonucleotide senso a monte dell'ATG appena ottenuto (As-AK1-F2) e un oligonucleotide antisenso selezionato dopo il codone di stop (As-AK1-R5). Il risultato dell'amplificazione è stato successivamente sequenziato in entrambe le direzioni, confermando l'identità della sequenza ottenuta dalla libreria di cDNA.



**Figura 18.** Illustrazione schematica delle reazioni che hanno condotto al sequenziamento completo del trascritto codificante la proteina As-AK1 in *A. spinifera*.

Dopo aver ricavato la sequenza del gene As-AK1 nella tartaruga a guscio molle sono stati utilizzati gli oligo senso (As-AK1-F1 e As-AK1-F2), altri due oligo senso (non riportati nella figura 18), e due oligo antisenso (oltre a As-AK1-R4) per cercare di amplificare lo stesso frammento genico appartenente a As-AK1 in entrambe le specie di tartarughe, *A. spinifera* e *P. nelsonii*, e poter così condurre un'analisi di espressione mediante protocolli di *Real Time PCR* assoluta. Nessuna delle possibili combinazioni di oligonucleotidi testate erano in grado di produrre risultati positivi nella tartaruga a

guscio duro. Non è stato quindi possibile analizzare quantitativamente l'espressione di questo gene. Se presente, il gene ortologo ad AK1 nella tartaruga a guscio duro presenta differenze di sequenza così numerose da rendere difficile la sua amplificazione utilizzando *primers* selezionati sulla sequenza della tartaruga a guscio molle.

La sequenza nucleotidica di AK1 contiene complessivamente 1735 nucleotidi ed è suddivisa in una regione 5'-UTR di 212 basi, una regione codificante di 1191 basi e una regione 3'-UTR di 332 basi (Fig. 19). Nella porzione 3'-UTR è presente un sito di poliadenilazione, 30 nucleotidi a monte della fine del trascritto (evidenziato in rosso), a riprova del fatto che la sequenza è completa nella regione 3'-UTR.

```

gaggtggcgtgtgcccgggtggcttgggtgga - 212
ggtatcatcgggtgcaggtggtgtgtgcccgggtggcttggcggaggtgccttggcggagttggcgtgtgcccgggtggcttgggtgga - 180
agcgggtggcttgggtggaagcgggtgcttgggtggaagtggtggttccgggtgcacgatggcctcttcagcaccatgaaaggtcacc - 90
ATGcagaacctaatgatcgcttggcatcttacctggaaggttccggatgggaagaaagcaacgctgatctggagaagctcatcaag + 90
M Q N L N D R L A S Y L E K V R D L E E S N A D L E K L I K + 30
gaatgggtatcagaagcaaggtccagctgcttccatgaaggaactctccctatcttgaagagattgacgacattggcaagagattggt + 180
E W Y T K Q G P A A S L K D Y S P Y L K E I D D I G K E I V + 60
gttgctctgtggaatgtaacaaggtagctgtggatgttgataaacactaagatgactattgatgactttagaacaaagcagagcatgaa + 270
V A S V E C N K V A V D V D N T K M T I D D F R T K A E H E + 90
atggcgtcccgccaagtgtggaggctgataatggttaccgccccttgggtggaccagctgaccataagcaagctgacctagagatg + 360
M A L R Q N V E A D I N G L R P L L D Q L T I S K S D L E M + 120
gagtatgaaacctgaaggaggaactaatttctctcatgaagaacctgaggaggaaatgaagattgattacacagaccactggtgat + 450
E Y E T L K E E L I S L M K N H E E E I K G L I T Q T T G D + 150
gtcaatgtggaggtcaatgctgccccaggtacgatctgacggaagcactagatgacatgagaaaagagtatgatgctatcatagagaga + 540
V N V E V N A A P G Y D L T E A L D D M R K E Y D A I I E R + 180
aatcgcaagaggtggaacagtgatgacagcaagatagcagaagttatcaagaagtcagcacaagtgcccaagacatagagatcaac + 630
N R K E V E Q W Y A A K I A E V N Q E V S T S G Q D I E I N + 210
agcaaacaaatcacagagctgagacgtgaataccagaatgtggaattgagctgcaatcccagctcagcatgctgagctcttgcagttcc + 720
S K Q I T E L R R E Y Q N V E I E L Q S Q L S M L Q S L Q S + 240
tcttggacgacaccgaatgtcgctacaatgatcagctgcaacagatgacagagcgttattggctctgtggaggaagaaactggcaaatatt + 810
S L D D T E C R Y N M Q L Q Q M Q S V I G S V E E E L A N I + 270
cgatgtgaaatagaaaatcagagccaagagtacaagttgctcctgggcatcaagatgacagctggagcaggagatagctcaatatcggagt + 900
R C E I E N Q S Q E Y K L L L G I K M Q L E Q E I A Q Y R S + 300
ctgcttgactcaggaagtaaacattagtggtgcagaagcgtgaagagggtgtcagcaggggtggaggaacagagtaggagctggt + 990
L L D S G S K D I S V A E G V R G G V S R G G G N R V G A G + 330
agtgttctacattacctagaggaggagatggagtcagagcaggaggaggaggaggtgtcagagtaggaggagaatcaaacagaaacagaa + 1080
S V P T L P R G G D G V R A G G G G V R V G G E S N R T E + 360
ggaggtggctcagtagtaagaggagaaggtagcagagaggagaagaggagaagaagaagatcatctaagtctaagtaagcttggctac + 1170
G G G S V V R G E G S T G G R G E E R R S S K S N E S F A Y + 390
tcaagaagaaactatgagTAAccagacatgatgatcttccagccgaacactatccatttaagcaaaagcagacaaggttagaattgaa + 1260
S R R N Y E *
ttcaccatatttctgtgatgctacacaaagagcaaaagagaaatgcttctaaaagttatcaacgcttctgatgccatctatttctctggg + 1350
gcctctgaagcttctcagatgggcaacttctcctgctattgcaacctgcttcttccagctgtaaatgttttgggttcagtcaccaata + 1440
tctgacaatctgtaccaaggtgtgtagctgctcactgtgcaaggtgtctctAATAAAacttcatttctcctgatgcaaac + 1523

```

**Figura 19.** Sequenza nucleotidica del trascritto As-Ak1. In rosso sono evidenziati il codone di inizio (ATG) e di fine (TAA) della traduzione e il segnale canonico di poliadenilazione (AATAAA). La sequenza aminoacidica è riportata sotto la sequenza nucleotidica. La sequenza è disponibile presso il *database* EMBL/GenBank/DBJ con il codice di accesso HF562343.

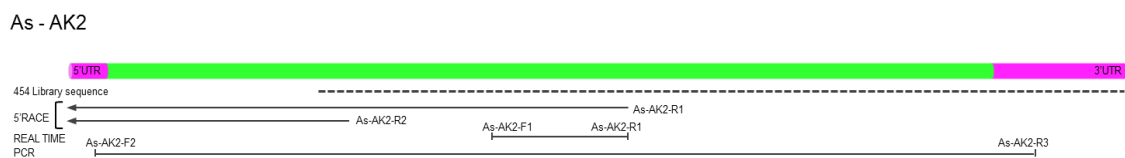
La sequenza dedotta di AK1 è costituita da 396 amminoacidi con un peso molecolare di 44 kDa e punto isoelettrico teorico (pI) di 4,7. La percentuale di cisteina è pari a 0,8%. L'analisi mediante i programmi *HMMER* e *BLASTp* indica che questa proteina appartiene alla famiglia delle citocheratine acide di tipo I con valori di *E-value* estremamente bassi ( $10^{-130}$ ), e quindi significativi.

Nello specifico questa proteina presenta il 61% di identità aminoacidica con le citocheratine di tipo I, 14 e 17 di *Gallus gallus*. Per quanto riguarda i Rettili presenta un'identità del 59% con la citocheratina 13 di *A. carolinensis* e un'identità pari al 55% con due alfa-cheratine (alfa-cheratine 1 e 10) isolate dall'epidermide delle dita del *Gecko gecko* (Hallahan *et al.*, 2009). Una simile identità (57%) è stata trovata con la cheratina 13 di *H. sapiens*, espressa prevalentemente nell'epidermide (Waseem *et al.*, 1998).

### 29.1.1.2. Alfa-cheratina 2 (As-AK2)

L'analisi dell'alfa-cheratina 2 è stata effettuata con le stesse modalità usate per l'alfa-cheratina 1. Anche in questo caso la sequenza isolata dal pirosequenziamento 454 conteneva la maggior parte della regione codificante e la porzione 3'-UTR.

Sono stati scelti due oligonucleotidi antisenso, As-AK2-R1 e As-AK2-R2, da abbinare agli oligonucleotidi adattatori 5'-RACE *outer* e 5'-RACE *inner* per sequenziare la regione mancante e corrispondente all'estremità N-terminale della proteina e la regione 5'-UTR a monte di essa. Nella prima reazione di PCR è stato accoppiato il *primer* 5'-RACE *outer* e il *primer* As-AK2-R1. Il risultante amplificato è stato utilizzato nella seconda reazione di PCR condotta con gli oligo 5'-RACE *inner* e As-AK2-R2 (Fig. 20).



**Figura 20.** Illustrazione schematica delle reazioni che hanno condotto al sequenziamento completo del trascritto codificante la proteina As-AK2 in *A. spinifera*.

Il frammento risultante è stato clonato, sequenziato e confrontato con la rispettiva sequenza rilevata nel trascrittoma della tartaruga a guscio molle. In tal modo è stato possibile ricavare la sequenza completa del trascritto codificante la proteina As-Ak2 (Fig. 21). Anche in questo caso, la verifica della sequenza completa della regione codificante è stata ottenuta mediante amplificazione con i *primers* As-AK2-F2 e As-AK2-R3. Il frammento ottenuto è stato amplificato in entrambe le direzioni.



```

ttctctcactccactttgattactctggttatattttaacaactcataccaccactaaaacgct - 63
516tctcttcggagtgctagtggtatccaaagtttctcattttctcaaggtgggtggatcagtcagactatcttgcataggaggaagcttt + 90
M S L R S A S G S K V S S F S Q G G G S V R L S C I G G S F + 30
ggtaatggggagtgtagtggtttgactgggggatctgggtggttgattaggtaggactaagaggaggagcatgtgggtggctttgggtgga + 180
G N G S V C G L T G G S G V G L G S G L R G G A C G G F G G + 60
ggctatttggtggttttgggtcatgtatcagctggaggaggttatggagatgctcattttagtagctcatttggaggcttaggtagtgcc + 270
G Y C G G F G H V S A G G G Y G D A Y C S S S F G G L G S G + 90
tttgggtggagctgtggtggggccttgggtggagctgatggcagctttctatctggtggcgaagaaagcaacatgcagaatcctaatgac + 360
F G G V C G G F G G A D G S F L S G G E K E T M Q N L N D + 120
cgcctagctaatcctgaataaggtacgggcttggaggaggcaaatgggtgactcttgaattaaaaatcaagcaatgggtatgagaaacat + 450
R L A N Y L N K V R A L E E A N G D L E I K I K Q W Y E K H + 150
gctgctactgctgggttagccatgattacagcaaatattaccagataatgaagatcttcagaatcagatactctctgcaactactgac + 540
A A T A G L G H D Y S K Y Y Q I I E D L Q N Q I L S A T T D + 180
aatgccaatatagctcctgaggtgacaataccaagcttggctgctgatgactctccgacttaagatgaaaatgaactgttcctcaccacaa + 630
N A N I V L Q V D N T K L A A D D F R L K Y E N E L F L H Q + 210
agtgttgaagctgacattaatggctgctgtagagcttagatgacctaacctaccagatccaatctggaagcagaacttgaaagcctg + 720
S V E A D I N G L R R V L D D L T I T R S N L E A E L E S L + 240
actgaagctaatatcttaagaagaacctgaagaggaaactgaacaagcccagcctcagctcagctgaagtgaaatgtagaaatg + 810
T E E L I Y L K K N H E E E L K Q A Q H G S T G E V N V E M + 270
aatgctgctccaggagtgatcctaatgaagactctgaatgacatgagaactcagatgaaatccttctgtagcaaaaatcgtaggaggct + 900
N A A P G V D L M K T L N D M R T Q Y E I L A E Q N R R E A + 300
gaagaacagtttaataaaaacagctcaacagctgcagcaacaaatcttctcatgctggtggaagcagattcagccagcagatgagataat + 990
E E Q F N K T S Q Q L Q Q Q I F H D A G E A D S A R H E I N + 330
gagatcaaacgtactctccaaacctggacattgagctacaatccctctggcccagaaatgctccctggaaggcaccttgacagaaact + 1080
E I K R T L Q T L D I E L Q S L L A Q K C S L E G T L T E T + 360
gaaggaaactacaatgctcagctttcacaaatgcagcttctgattagcaacctggagggaacaattaaagcaaatcagatgtgaaatagaa + 1170
E G N Y N V Q L S Q M Q L L I S N L E E Q L K Q I R C E I E + 390
tcgcagaatggagaatatgaacagctcctgggcatcaagactcgtctcagatggagattgagacctataggcgcctgctaaatggagaa + 1260
C Q N G E Y E Q L L G I K T R L E M E I E T Y R R L N G E + 420
ggagggtgttttagagctgaaagttaccgctatcaagactcaagagttcaaatgaaaggattacctctgtcagcaaaagaaatcctcagat + 1350
G G G F R A E S Y R Y Q D S R V Q M K G L P L S A K K S S D + 450
cttgggtcaagctcaagagttcaaatgaaagaacctctaaaactagagtggttgaagacaattggtgaaagctggtggatggcaaaata + 1440
L G Q D S R V Q M K E P S K T R V V K T I V E E L V D G K I + 480
gtctcatcacaagtcagctgagttgaagaaagccagctaaaEaa*taacataaaaatggaacaaaggatcctccaacatgtacctatag + 1530
V S S Q V Q S V E R P A K *
tcagaacaaaaaacaggaaatgcttgaacaaatgtagaattataagtggtttagtggcttccatcttaaaaaataaagtttctagtagt + 1620
ctgctttttctctctggtggttgccaaaaaacattctgctgcttctggttttttAataaa*tttttaactggtgacattaa + 1704

```

**Figura 21.** Sequenza nucleotidica completa del trascritto As-Ak2. In rosso sono evidenziati il codone di inizio (ATG) e di fine (TAA) della traduzione e il segnale canonico di poliadenilazione (AATAAA). La sequenza aminoacidica è riportata sotto la sequenza nucleotidica. La sequenza è disponibile presso il database EMBL/GenBank/DDBJ con il codice di accesso HF562344.

La sequenza nucleotidica è composta di 1767 nucleotidi: la regione 5'-UTR è formata da 63 basi, la regione codificante da 1485 basi, la regione 3'-UTR da 219 basi. Quest'ultima, presentando il segnale di poliadenilazione, 28 nt a monte della fine del trascritto, si può considerare completa.

La sequenza aminoacidica, costituita di 494 aa, presenta un peso molecolare dedotto di 53,8 kDa e un punto isoelettrico pari a 5. I residui di cisteina sono scarsi e costituiscono solo l'1,8% degli amino acidi totali.

L'analisi bioinformatica con i programmi *BlastP* e *HMMER* indica che la proteina appartiene alla famiglia delle citocheratine di tipo I (acidiche). Anche in questo caso i valori di *e-value* sono molto bassi. Possiede un'identità pari al 67 e 66% con le citocheratine di tipo I di *Bos taurus* e *Homo sapiens*, mentre per quanto riguarda i Rettili presenta un'identità del 50% con una alfa-cheratina (alfa-cheratina 10) isolata dall'epidermide delle dita del *G. gecko* (Hallahan *et al.*, 2009) e un'identità del 58% con la citocheratina 12-like di *Anolis carolinensis*. Non sono state trovate informazioni

riguardo all'identità aminoacidica con la tartaruga a guscio duro *Chrysemys picta bellii* il cui genoma, da poco disponibile, è in corso di annotazione.

A questo punto sono state scelte delle nuove coppie di oligo in modo tale da amplificare non solo un frammento genico appartenente ad As-AK2, ma anche il frammento corrispondente al putativo gene ortologo presumibilmente presente nella tartaruga a guscio duro. Un risultato positivo è stato ottenuto con la coppia As-AK2-F1 e As-AK2-R1 (Fig. 20), la quale è stata usata anche in seguito per condurre degli esperimenti di *PCR* quantitativa. Questi *primers* sono stati utilizzati anche su DNA genomico in entrambe le specie di tartarughe al fine di verificare la presenza di almeno un introne all'interno della regione di interesse. I frammenti amplificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni. La presenza dell'introne è necessaria per poter discriminare, durante le analisi di *RT-PCR*, gli amplificati derivanti dal cDNA (RNA retroscritto) da quelli dovuti ad eventuali contaminazioni da parte di DNA genomico. Infatti, in quest'ultimo caso la lunghezza del frammento generato è maggiore.

Lo studio ha messo in evidenza che l'introne non solo è collocato nella medesima posizione nelle due specie prese in considerazione (Fig. 22), ma presenta anche un'identità molto elevata (pari all'82%) tra le due specie.

```

As-AK2      CGTAGAGTCTAGATGACCTAACTATCACCAGATCCAATCTGGAAGCAGAACCTGAAAGCCTGACTGAAGAGCTAATATATCTTAAGAAG
Pn-AK2      CGTAGAGTCTAGATGACCTGACTATGACAAGATCCAACCTGGAAGCACAGCTTGAAAGCCTGACTGAGGAGCTAGTGTATCTTAAGAAG
*****
As-AK2      AACCATGAAGAGgt aagatctttgccttcctatttgtaaatataggtcctaagttcctccaatgaagtcaactagagcctttccattta
Pn-AK2      AACCATGAGGGAgt aagatctttgccttccttttgcaaatataggtcccagtcctcaactcccactgaagtcaatgagagctttccattta
*****
As-AK2      aaaatagtttaaactggaatggtttatgggtcaacataatatttcaaaacattctgattttgacacacagtcatttttagtagtttgattt
Pn-AK2      aaagtggtttaaagtgaatgatttatgggcaatttactatttcaaaacattcagattttgacacttaagatttcagttatttaattt
*** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * *****
As-AK2      ttctctgcttctgcagttgcaatgtattttaaataat-----cttgtcttccatttaaccagGAACTGAAACAAGCCAGCATGGCTC
Pn-AK2      ttccctgcttctgcaattgcaatataatattttaaataatctccttgtcttcttatttaaccagGAAATGAAAAGCTCCAGCATGGCTC
*** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * *****
As-AK2      TACAGGTGAAGTGAATGTAGAAATGAATGCTGCTCCAGGAGTTGATCTAATGAAGACTCTGAATGACATGAGAACTCAGTATGAAATCCT
Pn-AK2      TACGGGTGAAGTGAATGTAGAAATTAATGCTACTCCAGGAGTTGATCTAACAAGCTTCTTAATGAGATGAGAGCTCAGTATGAAATACCT
** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * *****
As-AK2      TGCTGACCAAAATCGTAGGG
Pn-AK2      TGCTGACCAAAATCGTAGGG
*****

```

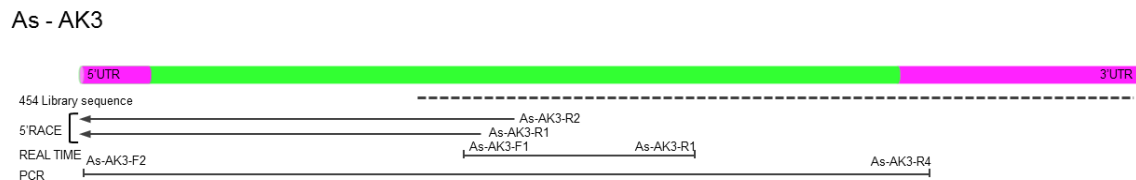
**Figura 22.** Allineamento tramite *ClustalW* delle sequenze nucleotidiche del frammento di alfa-cheratina AK2 amplificato mediante i *primers* As-AK2-F1/As-AK2-R1 a partire dal DNA genomico di entrambe le tartarughe. La sequenza dell'introne è in carattere minuscolo con i siti donatore e accettore di *splicing* (gt e ag) evidenziati in grassetto. Le sequenze codificanti sono in carattere maiuscolo. In grassetto sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi senso e antiseno.

Anche la regione codificante presenta un'identità molto elevata che è pari all'87% a livello nucleotidico e all'80% a livello aminoacidico tra le due specie di tartarughe. L'analisi bioinformatica condotta utilizzando la sequenza di Pn-AK2 e i programmi *HMMER* e *BlastP*, fornisce gli stessi risultati ottenuti con la sequenza As-AK2. E'

quindi verosimile che la coppia di *primers* sia in grado di amplificare lo stesso gene in entrambe le specie rendendo possibile il confronto dei livelli di espressione dell'alfa-cheratina 2 tramite *Real time PCR* assoluta.

### 29.1.1.3. Alfa-cheratina 3 (As-AK3)

Come visto precedentemente per le altre alfa-cheratine, anche in questo caso la sequenza fornita dalla libreria di cDNA dei margini del carapace della tartaruga a guscio molle corrisponde a una parziale regione codificante e a una regione 3'-*UTR* completa. Per ottenere la regione mancante sono state effettuate delle reazioni di *PCR* utilizzando gli oligonucleotidi adattatori 5'-*RACE outer* e 5'-*RACE inner* da abbinare agli oligonucleotidi, disegnati sulle regioni note, As-AK3-R2 e As-AK3-R1 (Fig. 23). Nel primo passaggio sono stati accoppiati gli oligo 5'-*RACE outer* e As-AK3-R2. Il prodotto di questa reazione è stato utilizzato come template per la seconda reazione di *PCR* che ha visto implicati i *primers* 5'-*RACE inner* e As-AK3-R1. Il prodotto così ottenuto è stato successivamente clonato, sequenziato e allineato con la rispettiva regione del sequenziamento 454. In questo modo è stato possibile ottenere la sequenza completa (o quasi) (Fig. 23) la cui identità è stata confermata dopo amplificazione di tutta la regione codificante mediante la coppia di *primers* As-AK3-F2 e As-AK3-R4, selezionati a monte e a valle del sito di inizio e di fine della traduzione.



**Figura 23.** Illustrazione schematica delle reazioni che hanno condotto al sequenziamento completo del trascritto codificante la proteina As-AK3 in *A. spinifera*.

Il trascritto risultante è lungo 1745 pb: 101 pb formano la regione 5'-*UTR*, 1047 pb costituiscono la regione codificante e infine 327 pb fanno parte della regione 3'-*UTR*. Un sito di poliadenilazione è presente in quest'ultima regione e si trova 26 nucleotidi a monte della fine della sequenza che può quindi essere considerata completa (Fig. 24).

```

gagggcgtggt - 101
ggcggctttgggtgggtgggtttgacttttgggtgcccctgggtggcggtggcggggatggaggcttgcctaactggaatgaaaagataact - 90
atgcagaaacctgaacgatcgtctggcttccatctctggacaaggtgcgagctctggagcaagcaataaccgatctagagatcaaaatccga + 90
M Q N L N D R L A S Y L D K V R A L E Q A N T D L E I K I R + 30
gactggtatcagaagcaaggtcccactagtcagatcgtgactacagtcattattacaagataattgaggaactccgagacaagatcctt + 180
D W Y Q K Q G P T S P D R D Y S H Y Y K I I E E L R D K I L + 60
gcagctactattgacaattccagagtcattttggagattgacaatgctaggtggctgcagatgatttcagactgaaatagagaacgag + 270
A A T I D N S R V I L E I D N A R L A A D D F R L K Y E N E + 90
ttgttccttcgcccagagtggtggaggcggacatcaatggcctgctgtagggtcctggatgagctgaccctggccagagctgacctggagatg + 360
L F L R Q S V E A D I N G L R R V L D E L T L A R A D L E M + 120
cagattgaaagcctgaaagaagagctggcttacctcaagaagaaccacgaggagaaatgaaagaatacagcaatcagctgggtggaaaa + 450
Q I E S L K E E L A Y L K K N H E E E M K E Y S N Q L G G K + 150
gtcagcgtagagatggatgctgctcctggcgtgcatctcaccagatctcctgctgagatgagagagcaaatgaaacactggctgacaag + 540
V S V E M D A A P G V D L T S I L S E M R E Q Y E T L A D K + 180
aacctgagatgctgaggcctggttctataaacagactgaagagctgaaccgtgaagtagctaccaatactgaacagctacagactggc + 630
N R R D A E A W F Y K Q T E E L N R E V A T N T E Q L Q T G + 210
aagagcagatcacagaactgagacgcacattgcaaggcctagaatagagctccaatcccagctcagcatgaaagctgggttggaaagcc + 720
K S E I T E L R R T L Q G L E I E L Q S Q L S M K A G L E A + 240
aactgggcagaaacagaagagatactgacacagctagcacaatacccaggccatgatcaccggcattgaggagcaattggctgagctt + 810
N L A E T E G R Y C A Q L A Q I Q A M I T G I E E Q L A E L + 270
agatgtgacatggcggcagaaccaagaatacaggatgctcctggacatcaaaaccagattagagcaagagattgccacttaccgcagg + 900
R C D M E R Q N Q E Y R M L L D I K T R L E Q E I A T Y R R + 300
cttttggaaagccaagattcccagatgctgggatggagcagcaagatgcatcccttagtaccagcagcagctccagtagagttcgcattc + 990
L L E G Q D S Q M S G W S S K D A S L S T S S S S R V R I + 330
agtgtggaagattcagtagatgaaaagttagtttctaccaggaaagaaaatacggatccccctcaccacctgagaccacctgtattgt + 1080
S V E D S V D G K V V S T Q E R K Y * + 348
accagttctgaagacagcagcagcctctgagaggagaatcctgaaacaccagccaacatagtagtaggaaatctactcagtagtagtag + 1170
aaaatgccaatggaatgtaattatgtagtagcacaacagtgtaatccaatagtgacacaacagcttgggtgtctttcttacaatttctctg + 1260
tcttttacactgtgtattcttaagctctgggtgaaagggctgttttactgcataccagcagctctagtatatgtaatcagctcggat + 1350
t.aaaatttttctctgcttgaaaaa + 1374

```

**Figura 24.** Sequenza nucleotidica del trascritto As-AK3. In rosso sono evidenziati il codone di inizio (ATG) e di fine (TGA) della traduzione e il segnale canonico di poliadenilazione (AATAAA). La sequenza aminoacidica è riportata sotto la sequenza nucleotidica. La sequenza è disponibile presso la *database* EMBL/GenBank/DBJ con il codice di accesso HF562345.

La proteina As-AK3 possiede un pI di 4,8 ed è formata da 348 aa. Il peso molecolare dedotto è di soli 40 kDa, ma rientra nel *range* delle citocheratine di tipo I (acide), il cui peso varia tra i 40 e i 55 kDa. La sequenza comunque non sembra essere del tutto completa, ciò nonostante, in modo analogo ad AK1, il primo codone ATG è stato considerato come codone di inizio della traduzione. Il contenuto in cisteina corrisponde solo allo 0,6% degli amminoacidi presenti.

Le analisi bioinformatiche indicano che anche questa proteina, come le precedenti, appartiene alla famiglia delle citocheratine di tipo I (acidiche), con valori di *e-value* molto bassi.

As-AK3 presenta una sequenza aminoacidica molto simile a quella della cheratina 19 della scimmia *Callithrix jacchus* (90% di identità). Mostra inoltre alti livelli di identità aminoacidica con la cheratina 15 (77% di identità con *H. sapiens* e 82% con *Gallus gallus*). Quest'ultima cheratina è espressa in tutti gli strati di epidermide umana ma non mostra un *partner* specifico relativamente alle citocheratine di tipo II (basiche), come invece sembra accadere normalmente (Waseem *et al.*, 1999). Per quanto concerne i Rettili la proteina in questione presenta elevate identità di sequenza aminoacidica in particolare con citocheratine rinvenute nell'*Anolis carolinensis*: cheratina citoscheletrica di tipo I simile alla 15 (83%), cheratina citoscheletrica di tipo I simile alla 19 (76%), alfa-cheratine aHAS3 (57%) (Eckhart *et al.*, 2008).

Per effettuare degli esperimenti di tipo quantitativo sono stati scelti, mediante prove di amplificazioni con coppie diverse di *primers*, degli oligonucleotidi in grado di amplificare lo stesso frammento di sequenza genica in entrambe le tartarughe. I *primers* che hanno dato risultati positivi sono: As-AK3-F1 e As-AK3-R1 (Fig. 23). Anche in questo caso gli oligonucleotidi sono stati testati su DNA genomico e i prodotti amplificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni. All'interno della regione amplificata sono presenti due introni localizzati nelle stesse posizioni in entrambe le specie. Il primo introne però è risultato essere molto più lungo in *A. spinifera* (1008 nt) rispetto a quello trovato in *P. nelsonii* (302 nt). Il secondo introne è invece più lungo di soli 18 nt nella tartaruga a guscio duro rispetto alla tartaruga a guscio molle. Le regioni di sovrapposizione comunque presentano un'identità di sequenza molto alta tra le due specie: 77,6% per il primo introne e 70,6% per il secondo introne (Fig. 25).

Per quanto riguarda la regione codificante, essa mostra un'identità di sequenza nucleotidica pari al 94% e un'identità di sequenza aminoacidica pari al 92% tra le due tartarughe. L'analisi bioinformatica condotta con *HMMER* e *BlastP* utilizzando la parziale sequenza aminoacidica di Pn-AK3 fornisce gli stessi risultati ottenuti con la sequenza As-AK3.

Anche per AK3 c'è quindi una buona probabilità che i frammenti amplificati appartengano allo stesso gene in tutte e due le specie animali.

```

As-AK3 TCACCGTAGAGATGGATGCTGCTCCTGGCGTTGATCCCACCAGTATCCTGTCTGAGATGAGAGAGCAATATGAAACTGGCTGACAAGA
Pn-AK3 TCACCGTAGAGATGGATGCTGCTCCTGGGGTTGATCTCACCAGTATCCTGTCTGAGATGAGAGAGCAATATGAAATACTGGCTGATAAGA
*****
As-AK3 ACCGTCGAGATGCTGAGGCCTGGTTCTATAAACAGgt atggctactccaatgaacaaataaactggtgcactatgagc---tcaccatg
Pn-AK3 ACCGTCGAGATGCTGAGGCCTGGTTCTATAAACAGgt atggctatccaatgaacaaataaattgatgcattaaccacctcatcatggcc
*****
As-AK3 ccaatttctgcacaacactcctgcttttgcacatcagtttctacatttggtaagaagctaagtgtcctaagacacctaccaagattttaa
Pn-AK3 ccagtttcttgcacaacactactgcatattgctgatcagtttctcattcggttaagacactaagagccctgatacacctaccaagattttag
*** *****
As-AK3 atatttactcctcttttcaccactggaccagtgggggttctcaggacaaatatttgggcagcctcagagtgtggccaccaattcttctgtgt
Pn-AK3 acattatcctcttttcaccattggaccattgcttagaattaga-----
* ** *****
As-AK3 tgccactcacacttttctctaaaatattcaattagctttagggaaaaacaaataatgacatatatggttctgaatcattgcagtg
Pn-AK3 -----
As-AK3 atttattgcccagctagtaagtctgttgttaaaactggtattaaacaaacataaacgtatcacttctcagaagacttactcagctatggc
Pn-AK3 -----
As-AK3 tagcctggagactaataaagcctggataggagtaggttagctaatggagtgaaggaaacagggagagcagcagcagcctgaagccc
Pn-AK3 -----
As-AK3 tgacgcccagaaacaaatcccctgggttagggagcagggagagcctgaagctcgtgtgatggagcctcaggatggagctaaaagccc
Pn-AK3 -----
As-AK3 gcagccaaagctgcacccccaccaactcggggaaggtgggaattcaagctgcagctcgttccctccagttgacccctagctgtctct
Pn-AK3 -----
As-AK3 ggaggaagagtcagggcttaaccctgcttactgctccagctgtctccagaagatgagggggcagcacccaaaccctgcttagagccc
Pn-AK3 -----
As-AK3 cagtagataaacgacagcagcgtatccaagagcaacaggaaggagaggagagatgctccccacctccatcactgtacaggaggctat
Pn-AK3 -----
As-AK3 ggttgcaagaaaagccaccgggtgtacatttgagaaacactccaaagcaagcagcaccacagcaatgaggatggcccttttctttt
Pn-AK3 -----tccaaagcaagcagcaccatgacggtgattagaatggtactttccattt
*****
As-AK3 tggagtaaaact-ggtaatccaatgtgcatgatttttgg-----ttgttttcttccagACTGAAGAGCTGAACCGTGAAGTAGC
Pn-AK3 gggaaataaaacttggcaatccaatttgcatttttattgtatttggtttttcttccagACTGAGGAGCTGAACCGTGAAGTAGC
*** *****
As-AK3 TACCAATACTGAACAGCTACAGACTGGCAAGAGCGAGATCACAGAAGCTGAGACGCACATTGCAAGGCCTAGAAAATAGAGCTCCAATCCCA
Pn-AK3 CACCAGTACTGAACAGATCCATACCAGCAAGAGTGAATACAGAAGCTGAGACGCACATTGCAGGCCTGGAGATAGAATCCAATCCCA
*****
As-AK3 GCTCAGCATgt atgtggctgttctatgcatacaataatcacacttcccct-----tcattctactatggaaagaa
Pn-AK3 GCTCAGCATgt atgtggctgttccatgcacacaataagtcaactattagcacatgcctcccctttgatctcttctactacggaatgaa
*****
As-AK3 tctgtgtaataatcagctttaaatttggttttatattagAAAGCTGGGTGGAAGCCAAGCTGGCAGAAACAGAAGGATACTGCGCAC
Pn-AK3 tctgcataataacccactttaaacttcgttttatattagAAAGCTGGGTGGAAGCCAAGCTGGCAGAAACAGAAG-AAGATACTGTGCAC
*** *****
As-AK3 AGCTAGCACAAATCC
Pn-AK3 AGCTAGCACAAATCC
*****

```

**Figura 25.** Allineamento tramite *ClustalW* delle sequenze nucleotidiche dei frammenti di alfa-cheratine AK3 amplificati mediante i *primers* As-AK3-F1/As-AK3-R1 a partire dal DNA genomico di entrambe le tartarughe. La sequenza dell'introne è in caratteri minuscoli con i siti donatore e accettore di *splicing* (gt e ag) evidenziati in grassetto. Le sequenze codificanti sono in caratteri maiuscoli. In grassetto viene riportata anche la sequenza del *primer* senso e antisenso.

Le tre alfa-cheratine identificate a partire dalla libreria di cDNA del carapace della tartaruga a guscio molle *A. spinifera* appartengono alla famiglia di citocheratine acide di tipo I. L'allineamento tramite il programma *ClustalW* mostra che queste sono conservate, soprattutto per quanto riguarda la porzione centrale. As-AK1 e As-AK3 sono più corte di As-AK2 (Fig. 26) a ulteriore dimostrazione che forse non sono complete nella loro regione N-terminale.

```

As-AK1 -----MSLRsASGSkVSSFSQGGGSVRLSCIGGSFNGSVCGLTGGSVGLGSLRGACGGFGGYCGGFGHVSAGGGYDAYCSSSFGLGSG + 90
As-AK2 -----
As-AK3 -----
As-AK1 -----MQLNDRLASYLEKVRDLEESNADLEKLIKewYTKQGPAA-SLkDYSPYLKEIDDIGKEIVVASVE + 65
As-AK2 FGGVCGGGFGGADGSPLSGGKEtMQLNDRLANYLKVRALeeANGDLEIKIQWYEKHAATAGLGHdYskYYQIIEDLQNLlSATTD + 180
As-AK3 -----MQLNDRLASYLdKVRALeQANTDLEIKIRdWYKQKGpTS-PDRDYSHYYKIEELRDKILAATID + 65
*****.*:* ** * ** * ::* * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
As-AK1 CNKVAVDVDNTKMTIDDFRTKAHEMALRQNVEADINLRPLLDQLTISKSDLEMEYETLKEELISLMKNHEEEIKGLITQTTGDVNVVEV + 155
As-AK2 NANIVLQVDNTKLAADDFRLKYENELFLHQSVeADINLRRLDDLTITRSNLEAELESLEELIYLKKNHEEELKQAQHGSTGEVNVEM + 270
As-AK3 NSRVILEIDNARLAADDFRLKYENELFLRQSVeADINLRRLDELTLARADLEMQIESLKEELAYLKKNHHEEMKEYSNQLGGKVSVEV + 155
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
As-AK1 NAAPGYDLTEALDDMRKEYDAIERNRKEVEQWYAakIAEVNQEVSTSGQDIEINSKQITELRREYQNVIEIQSLSMLQSLQSSLDdT + 45
As-AK2 NAAPGVdLMKTLNDMRTQYELAEQNRREAEeQFNKTSQQLQQQIFHDAGEADsARHEINEIKRTLQTLdIELQSLLAQCSLEGLTLTET + 360
As-AK3 DAAPGVdLTSILSEMREQYETLADKNRRDAEAWFYKQTEELNREvATNTEQLQTKSEITELRRTLQGLEIEIQSLSMKAGLEANLAET + 245
:*** ** . * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
As-AK1 CRYNMQLQMQSVIGSVEEELANIRCEIENQSQEYKLLGIKMQLEQEIAQYRSLLDSGSKDISVAEGVRRGGVSRGGNRRVAGSVPtL + 335
As-AK2 EGNYNVQLSQMQLLISNLEEQLKQIRCIECONGEYEQLLGIKTRLEMEIETYRRLNNGE-----GGGFRAESYRYQDSRVQMKGLPLS + 444
As-AK3 EGRYCQALAQIQAMITGIEEQLAELRCDMERQNEQYRMLLDIKTRLEQEIATYRRLLEG-----QDS--QMSG--WS + 313
* . * * * : * : * . : * : * : * : * * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
As-AK1 PRGGDGVrAGGGGVRVGGESNRTEGGGSVVRGEGSTGGRGEERRSSKSNEsFAYSRRNYE + 396
As-AK2 AKKSSDLGQDSRVQMKEPSKTRVVK----TIVEELVDGKIVSSQVQSVeERPAK----- + 494
As-AK3 SKDAS-----LSTSSSSRVR----ISVEDSVdGKVVSTQERKY----- + 348
: : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

**Figura 26.** Allineamento tramite il software *ClustalW* delle tre sequenze aminoacidiche dedotte delle citocheratine isolate dalla libreria di cDNA. In giallo sono evidenziati i residui di cisteina, i quali sembrano localizzarsi prevalentemente nelle regioni N- e C-terminali. L'asterisco indica identità; i due punti indicano sostituzione conservata; i punti singoli indicano sostituzioni semiconservate.

**29.1.2. Beta-proteine associate alle cheratine**

L'analisi bioinformatica sulle sequenze derivate dal sequenziamento 454 ha evidenziato la presenza di cinque isogruppi di beta-proteine, contenenti ciascuno da 1 a 32 *isotigs*. Le sequenze sono disponibili presso il database EMBL/GenBank/DDBJ con i codici di accesso che vanno da HF562333 a HF562342.

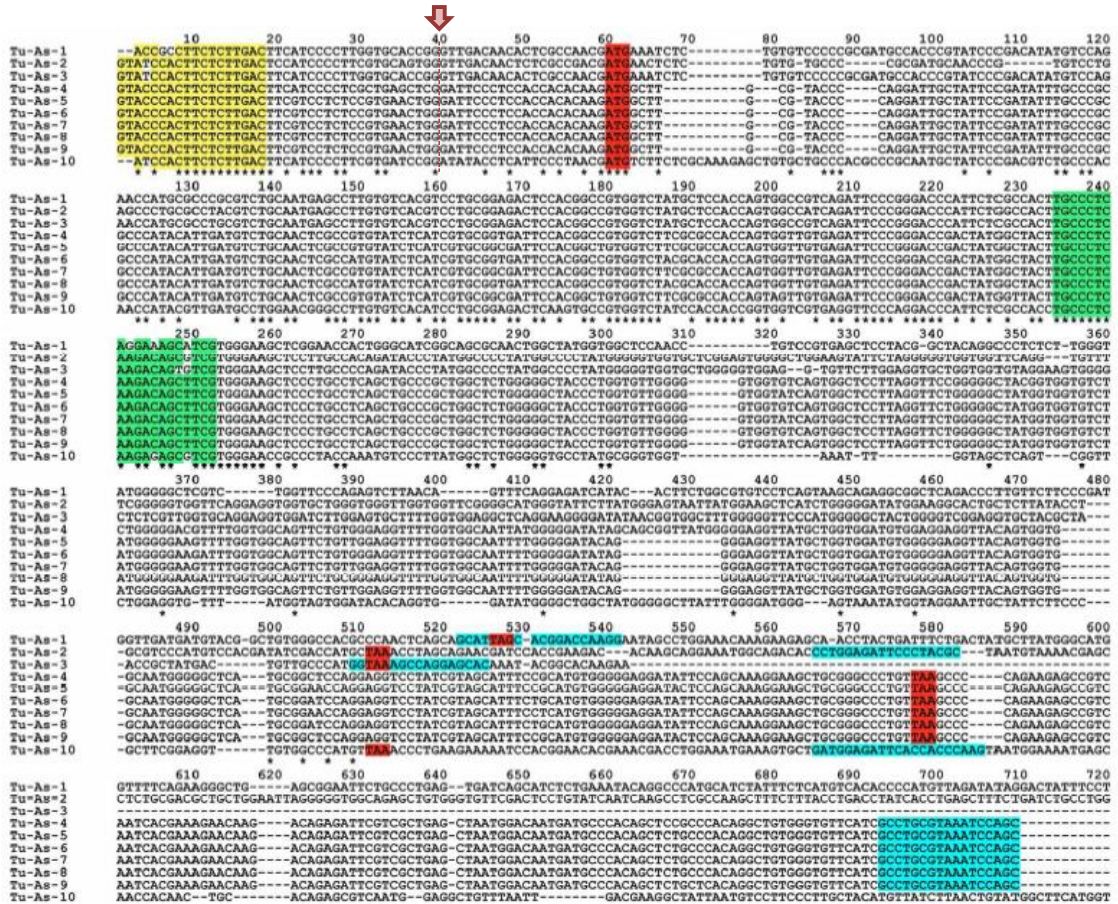
Gli isogruppi nel sequenziamento della libreria rappresentano i geni codificanti queste proteine. Ciascun isogruppo può contenere più *isotig*, cioè più trascritti, in seguito sia a eventi di *splicing* alternativo sia all'appartenenza del gene in questione a famiglie geniche molto conservate. In questo caso la presenza di numerosi trascritti (*isotig*), all'interno dei 5 isogruppi identificati, è dovuta al fatto che le beta-proteine appartengono a famiglie multigeniche derivate da duplicazioni e successive diversificazioni dei geni che possono però, all'interno della stessa specie, essere dotati di elevate identità di sequenza tra loro.

Il primo isogruppo ad essere analizzato conteneva un unico *isotig* e la sequenza (identificata come: *Turtle-Apalone spinifera* e un numero progressivo, Tu-As-X) non era completa. L'analisi tramite 5'-RACE condotta con un *primer* antisenso (Tu-As-1R) accoppiato con gli oligo 5'-RACE *outer* e *inner* in due PCR successive, ha permesso di ottenere l'intera sequenza codificante (Tu-As-1).

Il secondo e terzo isogruppo contenevano un *isotig* ciascuno e le sequenze erano invece complete (Tu-As-2 e Tu-As-3). Gli ultimi due isogruppi contenevano l'uno 32 *isotig* e l'altro 6 *isotig* rispettivamente, molto probabilmente derivanti da geni diversi.

Per isolare i singoli trascritti, ma anche per controllare i risultati bioinformatici del sequenziamento 454, è stato disegnato un *primer* senso in comune con tutte le sequenze identificate in questo studio (Tu-As-F, evidenziato in giallo nella figura 27) localizzato nella porzione 5'-*UTR* e usato in coppia con un *primer* antisenso specifico invece per le sequenze di ciascun isogruppo (evidenziato in azzurro nella figura 27). I rispettivi prodotti di *PCR* sono stati clonati e più cloni per ognuno dei prodotti di *PCR* (fino a 15 per il quarto isogruppo) sono stati sequenziati in entrambe le direzioni. Le analisi del sequenziamento hanno confermato la correttezza delle sequenze dei primi tre isogruppi contenenti un solo *isotig*. All'interno del quarto isogruppo sono stati identificati 6 differenti trascritti. Mentre nell'ultimo isogruppo è stato identificato un solo trascritto. Le varie analisi hanno quindi condotto all'identificazione di dieci sequenze nucleotidiche codificanti beta-proteine (Fig. 27). I trascritti presentano una lunghezza variabile che si aggira attorno ai 980 nt, eccetto Tu-As-3 che è lunga solamente 520 nt. Quest'ultima sequenza infatti possiede una regione 3'-*UTR* molto corta e priva di segnale di poliadenilazione. Tale particolare indica che la sequenza nucleotidica in esame è parziale nella regione 3'-*UTR*. Non essendo la suddetta regione importante per l'analisi delle caratteristiche di queste proteine non è stato ritenuto necessario condurre l'analisi 3'-*RACE* per ottenere la regione mancante.





**Figura 27.** Allineamento mediante *ClustalW* delle dieci sequenze nucleotidiche codificanti beta-proteine nella tartaruga a guscio molle *A. spinifera*. I nucleotidi corrispondenti all'oligonucleotide senso, comune a tutti i trascritti, usato per le analisi di clonaggio e per la *Real Time PCR* assoluta, sono evidenziati in giallo. L'oligonucleotide antisense usato per la *Real Time PCR* assoluta, comune a tutti i trascritti, è evidenziato in verde. La posizione dell'introne è stata marcata con una freccia. Gli oligonucleotidi antisenso specifici per ciascun isogrupo sono evidenziati in azzurro. In rosso sono evidenziati i codoni di inizio (ATG) e di fine della traduzione. L'allineamento è interrotto dopo la regione corrispondente agli oligonucleotidi antisense. Le sequenze complete sono disponibili presso *GenBank* con i codici di accesso che vanno da HF562333 a HF562342.

Allo scopo di poter effettuare degli esperimenti di *RT-PCR* quantitativa anche per le beta-proteine, è stata selezionata una coppia di oligonucleotidi che riuscisse ad amplificare tutte e dieci le proteine identificate. Per questo motivo tali *primers* sono stati disegnati in regioni con sequenze ben conservate. L'oligo senso (Tu-As-F, evidenziato in giallo nella figura 27 e già utilizzato per il clonaggio) è stato selezionato nella regione 5'-*UTR*, in quanto deve necessariamente precedere l'unico introne presente in questa famiglia genica. L'oligonucleotide antisense (Tu-As-R, evidenziato in verde nella figura 27) si trova invece nella regione codificante. Per verificare la presenza dell'introne è stata fatta un'amplificazione con DNA genomico utilizzando la

suddetta coppia di *primers*. Il prodotto di reazione è stato sequenziato e i risultati, sebbene la sequenza presentasse picchi multipli in quanto derivata dall'amplificazione di sequenze leggermente diverse tra loro, hanno infatti indicato la presenza di un introne la cui localizzazione è evidenziata da una freccia nella figura 27. L'introne si trova circa 40 pb a valle dell'inizio del primo esone non tradotto. Quindi la coppia di oligo è stata utilizzata negli esperimenti di *Real Time PCR* assoluta su diversi campioni di cute della tartaruga a guscio molle. In questo caso non è stato possibile servirsi degli stessi *primers* per amplificare il medesimo frammento genico in entrambe le specie di tartarughe a causa delle differenze di sequenza tra i due animali. Per la tartaruga a guscio duro è stata quindi adoperata una coppia di oligonucleotidi, Tu1F e Tu3R, già validata in una precedente ricerca (Dalla Valle *et al.*, 2009b) e in grado di amplificare 16 delle 17 beta-cheratine rinvenute in quest'ultima specie.

Le sequenze aminoacidiche dedotte presentano una lunghezza che varia da 130 a 160 aa. Il peso molecolare va dai 13,9 ai 15,2 kDa. L'allineamento di tali sequenze mediante il programma *ClustalW* ha messo in evidenza che la tipica regione delle beta-proteine, chiamata "core-box", presente in tutte le KAbetaPs isolate sia dai Rettili sia dagli Uccelli, si trova anche nelle beta-proteine della tartaruga a guscio molle *A. spinifera* (Fig. 28, vedere la sezione relativa presente nella discussione per una spiegazione dettagliata).

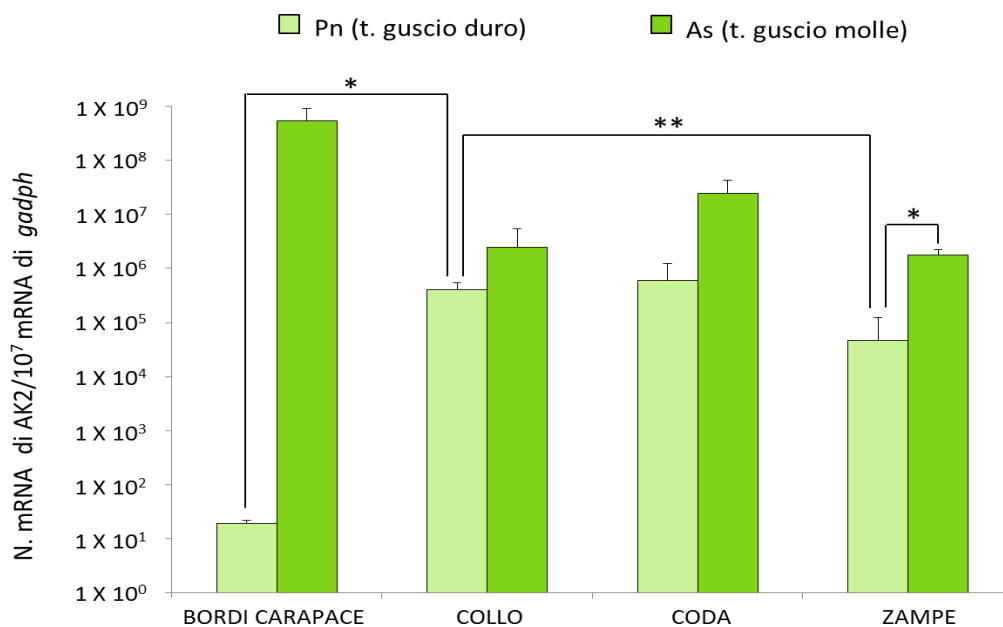
Analisi bioinformatiche hanno dimostrato che queste proteine presentano identità abbastanza elevata con le KAbetaPs isolate in *P. nelsonii* (dal 34 al 41% di identità a livello aminoacidico) (Fig. 28). In particolare, con la beta-proteina Tu-Pn-17, l'identità raggiunge valori del 53%. Quest'ultima presenta infatti una sequenza diversa rispetto alle altre 16 isolate dalla tartaruga a guscio duro (Dalla Valle *et al.*, 2009b). Le beta-proteine ottenute dai bordi del carapace della tartaruga a guscio molle presentano anche identità aminoacidica variabile dal 42 al 43% con tre beta-proteine isolate da *C. niloticus* (Dalla Valle *et al.*, 2009b) e con altre beta-proteine trovate in differenti specie di Coccodrilli (39-40% di identità aminoacidica) (Ye *et al.*, 2010).



trascritti del gene *gadh* in entrambe le specie di tartarughe. Tale specificità è stata verificata tramite sequenziamento del frammento in entrambi i sensi.

### 29.2.1. Confronto dell'espressione di AK2 tra *A. spinifera* e *P. nelsonii*

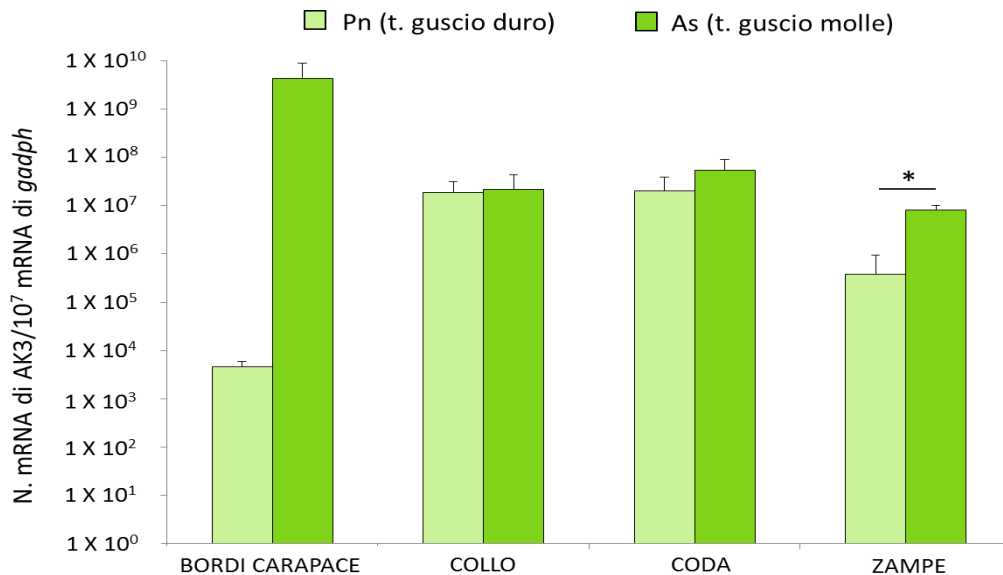
L'analisi quantitativa dei livelli di espressione ha evidenziato che il trascritto codificante la proteina AK2 è presente in tutti i campioni di cute appartenenti alle due specie di tartarughe, ma che è maggiormente espresso in *A. spinifera* rispetto a *P. nelsonii*. La differenza è notevole per quanto riguarda l'espressione a livello dei bordi del carapace, maggiore di sette ordini di grandezza nella tartaruga a guscio molle (Fig. 29). A causa della variabilità nella taglia tra gli animali utilizzati, questa differenza, anche se notevole, non appare comunque statisticamente significativa. Solamente i risultati relativi all'espressione del messaggero codificante questa proteina nell'epidermide delle zampe sono statisticamente significativi. Facendo invece un confronto all'interno della stessa specie per i diversi campioni di cute, sono risultati statisticamente significativi solamente il confronto tra l'espressione di AK2 nei bordi del carapace rispetto all'espressione di AK2 nel collo e il confronto tra l'espressione di AK2 nell'epidermide del collo rispetto all'espressione di AK2 nell'epidermide delle zampe, esclusivamente per quanto riguarda la specie a guscio duro.



**Figura 29.** Quantificazione dei livelli di mRNA codificanti la proteina AK2 in diversi campioni di cute appartenenti alle tartarughe *A. spinifera* e *P. nelsonii* misurati attraverso *qPCR*. L'espressione dell'mRNA di *gadh* è stato usato per normalizzare i risultati. Le differenze tra i campioni appartenenti ai due esemplari risultate statisticamente significative sono indicate dall'asterisco (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 3$ , media  $\pm$ DS).

### 29.2.2. Confronto dell'espressione di AK3 tra *A. spinifera* e *P. nelsonii*

I risultati trovati per i livelli di espressione degli mRNA codificanti la proteina AK3 nei vari campioni di cute sono molto simili a quelli riscontrati per AK2. Anche qui infatti i trascritti sono più numerosi nella tartaruga a guscio molle rispetto alla tartaruga a guscio duro, ed è statisticamente significativa solo la differenza evidenziata nell'epidermide delle zampe. Le differenze sono minori per quanto concerne collo e coda. La diversità è invece rilevante nei margini del carapace (6 ordini di grandezza), dove AK3 si trova molto più espressa in *A. spinifera* rispetto a *P. nelsonii* (Fig. 30). In questo caso il confronto all'interno della stessa specie tra i vari campioni di tegumento non ha evidenziato nessuna situazione di significatività statistica.



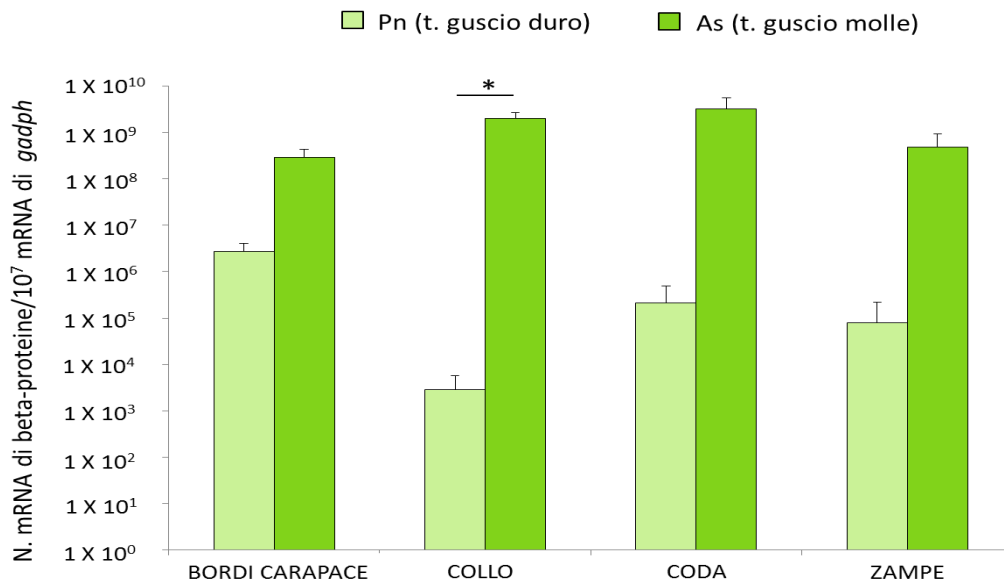
**Figura 30.** Quantificazione dei livelli di mRNA codificanti la proteina AK3 in diversi campioni di cute appartenenti alle tartarughe *A. spinifera* e *P. nelsonii* misurati attraverso *qPCR*. L'espressione dell'mRNA di *gadph* è stato usato per normalizzare i risultati. Le differenze tra i campioni appartenenti ai due esemplari risultate statisticamente significative sono indicate dall'asterisco (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , media  $\pm$ DS).

### 29.2.3. Confronto dell'espressione di beta-proteine tra *A. spinifera* e *P. nelsonii*

Sorprendentemente, date le premesse illustrate nell'introduzione e all'inizio dei risultati, le beta-proteine si trovano maggiormente espresse nella tartaruga a guscio molle, *A. spinifera*, rispetto alla tartaruga a guscio duro, *P. nelsonii*. Queste proteine sembrano essere uniformemente espresse, in termini di messaggero, nei margini del carapace, coda, collo e zampe della *A. spinifera*. Nella *P. nelsonii*, al contrario, le beta-proteine mostrano un'espressione differenziale: esse infatti sembrano essere molto più numerose nei bordi del carapace rispetto a quelle presenti in coda, zampe e collo.

Questi risultati potrebbero spiegarsi se si tengono in considerazione le diverse composizioni strutturali dell'epidermide delle due tartarughe (vedere discussione).

Tra le due specie di tartarughe la differenza è statisticamente significativa solo a livello del collo (Fig. 31). Il confronto intraspecifico tra i diversi campioni di cute non ha mostrato invece nessun tipo di significatività.



**Figura 31.** Quantificazione dei livelli di mRNA codificanti beta-proteine in diversi campioni di cute appartenenti alle tartarughe *A. spinifera* e *P. nelsonii* misurati attraverso *qPCR*. L'espressione dell'mRNA di *gadph* è stato usato per normalizzare i risultati. Le differenze tra i campioni appartenenti ai due esemplari risultate statisticamente significative sono indicate dall'asterisco (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , media  $\pm$ DS).

Nella tabella I si è voluto confrontare il rapporto tra l'espressione di beta-proteine e alfa-cheratine per ogni tipo di cute all'interno della stessa specie di tartaruga.

<b>Tartaruga</b>	<b>Campioni di cute</b>	<b>Beta-proteine/AK2</b>	<b>Beta-proteine/AK3</b>
<b>Pn</b>	BORDI CARAPACE	140.000	590
	COLLO	0,007	0,00015
	CODA	0,35	0,0105
	ZAMPE	1,72	0,21
<b>As</b>	BORDI CARAPACE	0,54	0,068
	COLLO	810	92
	CODA	132	61
	ZAMPE	273	60

**Tabella I.** Confronto del rapporto di espressione tra beta-proteine e alfa-cheratine all'interno della stessa specie di tartaruga.

Da questo confronto risulta evidente che nella tartaruga a guscio duro *P. nelsonii*, nei bordi in accrescimento del carapace, le beta-proteine sono molto più espresse rispetto ad entrambe i tipi di alfa-cheratine, in particolare per quanto riguarda AK2. I rapporti invece si invertono nei campioni di collo e coda dove AK2 e soprattutto AK3 risultano essere più presenti. Nelle zampe invece alfa-cheratine e beta-proteine sembrano quasi espresse allo stesso modo.

Per quanto riguarda invece la tartaruga a guscio molle *A. spinifera*, nei bordi marginali del carapace AK3 è molto più espressa rispetto alle beta-proteine, mentre AK2 mostra un livello di espressione simile a quello delle KAbetaPs. Invece nei campioni di cute di collo, coda e zampe le beta-proteine sono più espresse rispetto ad AK3 e soprattutto rispetto ad AK2.

Il dato, che appare chiaramente soffermandosi ad analizzare il rapporto tra beta-proteine e alfa-cheratine anziché il valore assoluto per queste proteine nei vari tessuti, è che l'espressione di beta-proteine contro alfa-cheratine nei bordi del carapace è maggiore nella tartaruga a guscio duro rispetto alla tartaruga a guscio molle, mentre in valore assoluto sembrano essere presenti più beta-proteine nei bordi del carapace nella *A. spinifera* rispetto alla *P. nelsonii*.

### **30. Lucertola verde americana *Anolis carolinensis***

#### **30.1. Analisi quantitativa dell'espressione di alfa-cheratine e beta-proteine nel tegumento normale e in rigenerazione di *A. carolinensis***

Per questo studio si è deciso di confrontare i livelli di espressione di alcune alfa-cheratine e beta-proteine, tutte espresse a livello di epidermide, nella coda normale e nella coda in rigenerazione di *A. carolinensis*.

A tale scopo è stata prelevata la punta della coda da quattro esemplari. Questo è stato possibile tramite l'induzione del processo di autotomia che in natura avviene spontaneamente nelle lucertole per sfuggire ai predatori (Bellairs e Briant, 1985). Dall'epidermide delle regioni apicali delle code così ottenute (circa cinque-sei centimetri) è stato estratto l'RNA totale che poi è stato retrotrascritto in cDNA da utilizzare successivamente nelle analisi quantitative. La coda entra poi in una fase di rigenerazione e dopo aver iniziato a produrre il primo anello di squame (chiamato verticillo) nella cute a ridosso del moncone di coda normale, a circa quaranta giorni dall'autotomia, è stata eseguita una seconda autotomia, a monte della precedente, in modo da ottenere la coda con la pelle in fase di formazione delle prime squame. Ciò ha permesso di estrarre l'RNA totale anche dal tegumento in rigenerazione, RNA che è stato estratto e successivamente retrotrascritto in cDNA.

La quantificazione dei trascritti è stata misurata mediante *Real Time PCR* assoluta. L'espressione del gene *gadh* è servita a normalizzare la quantità di cDNA utilizzata in ciascun campione. La coppia di oligonucleotidi disegnati nella precedente ricerca sulle tartarughe per amplificare un frammento di questo gene è stata testata anche sull'*Anolis*, fornendo un risultato positivo. La specificità di amplificazione è stata verificata tramite sequenziamento.

##### **30.1.1. Alfa-cheratine**

Per condurre analisi di tipo quantitativo su epidermide normale e in rigenerazione di *A. carolinensis* sono state scelte quattro alfa-cheratine identificate mediante il processo di annotazione del genoma di questa specie animale (i codici di accesso alle sequenze proteiche e le rispettive posizioni cromosomiche sono rispettivamente per la citocheratina 14A: XP\_003222513.1, chr6:70844974-70856046; per la citocheratina 14B: XP\_003222514.1, chr6:70865559-70875351; per la citocheratina 75A: XP\_003217072.1, chr2:95440262-95457119 e, infine, per la citocheratina 75B: XP\_003217078.1, chr2:95666735-95685009). Due sono isoforme della citocheratina 14 (Ac-Ker14A e Ac-Ker14B) e appartengono alla famiglia di alfa-cheratine di tipo I (acidiche) e due sono isoforme della citocheratina 75 (Ac-Ker75A e Ac-Ker75B) di tipo



II (basiche). Le prime hanno un peso molecolare che si aggira attorno ai 50 kDa, le seconde sono invece più pesanti essendo caratterizzate da un PM di circa 64 kDa. Il programma di predizione usato per ricavare i dati è *PROTPARAM* reperibile presso il sito internet <http://web.expasy.org/protparam/>.

L'allineamento tramite *ClustalW* di tutte e quattro le alfa-cheratine mostra che queste proteine sono diverse tra loro e parzialmente conservate nella porzione centrale. Tali citocheratine contengono pochissimi residui di cisteina che si localizzano prevalentemente alle estermità N- e C-terminali (Fig. 32).



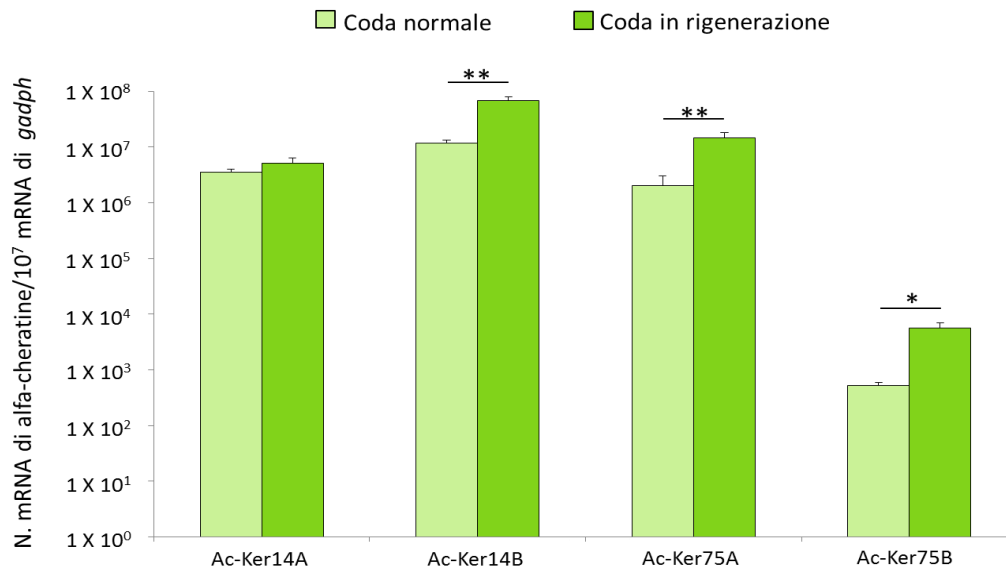
**Figura 32.** Allineamento tramite il *software ClustalW* delle quattro sequenze aminoacidiche dedotte della citocheratina 14 (isoforma A e isoforma B) e citocheratina 75 (isoforma A e isoforma B). In giallo sono evidenziati i residui di cisteina, i quali sembrano localizzarsi prevalentemente nelle regioni N- e C-terminali. L'asterisco indica identità; i due punti indicano sostituzione conservata; i punti singoli indicano sostituzioni semiconservate.

Tramite l'utilizzo di programmi bioinformatici quali *BLASTp* e *HMMER* è emerso che tutte e quattro le citocheratine presentano buoni valori di identità aminoacidica con citocheratine di Uccelli e Mammiferi. La proteina Ac-Ker14A, per quanto riguarda *H. sapiens*, presenta il 76% di identità con la citocheratina di tipo I 17 e il 72% di identità con la citocheratina di tipo I 14. Mostra inoltre il 74% di identità sempre con la

citocheratina di tipo I 14 di *G. gallus*; presenta anche identità di sequenza con la citocheratina di tipo I simile alla 42 di *Equus caballus* (68%) e di *Mus musculus* (69%). La Ac-Ker14B evidenzia, per *H. sapiens*, il 78% di identità aminoacidica con la citocheratina di tipo I 17 e il 70% di identità con la citocheratina di tipo I 14, il 70% di identità con la citocheratina di tipo I 14 di *G. gallus*, il 67% con la citocheratina di tipo I simile alla 42 di *Equus caballus* e il 68% con la cheratina 42 di *Mus musculus*. Per quanto concerne la Ac-Ker75A, essa presenta rispettivamente il 65% e 67% di identità aminoacidica con le citocheratine di tipo II 5 e 1 di *H. sapiens*, il 72% di identità con la citocheratina di tipo II 5 di *G. gallus* e, sempre con la stessa proteina, il 61% con *Rattus norvegicus*. La proteina Ac-Ker75B mostra identità aminoacidica con la citocheratina di tipo II 5 di *H. sapiens* (67%), di *Macaca mulatta* (67%) e di *Xenopus tropicalis* (60%).

In laboratorio non erano disponibili coppie di oligonucleotidi per amplificare i trascritti in esame. In questi ultimi è stata quindi identificata la posizione degli introni mediante confronto della sequenza codificante contro il genoma di *Anolis*, confronto condotto con il programma *Blat* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>), in modo tale da poter scegliere i *primers* in regioni che dovevano trovarsi necessariamente a cavallo di almeno un introne. Questa condizione, come spiegato in precedenza per il lavoro sulle tartarughe, è indispensabile per essere in grado di distinguere nelle analisi di *qPCR* l'amplificato che deriva dal cDNA da quello prodotto a causa di eventuali contaminazioni da DNA genomico. Le coppie di *primers* sono state successivamente testate su cDNA e la loro specificità è stata verificata tramite sequenziamento.

L'analisi quantitativa ha messo in evidenza che i trascritti codificanti tutte e quattro le proteine sono più numerosi nel tegumento della coda in rigenerazione rispetto a quello della coda normale. La differenza di espressione è però molto lieve per l'isoforma A della citocheratina 14, mentre è più consistente per l'isoforma B della citocheratina 75. L'isoforma B della cheratina 14 e l'isoforma A della 75 mostrano una simile differenza di espressione. Da questi risultati quindi emerge chiaramente che l'espressione dell'isoforma B della cheratina 14 e l'espressione di entrambe le isoforme di cheratina 75 risultano maggiori nell'epidermide in rigenerazione. Queste ultime tre differenze risultano statisticamente significative (Fig. 33).



**Figura 33.** Quantificazione dei livelli di mRNA codificanti 2 isoforme di citocheratina 14 (Ac-Ker14A e Ac-Ker14B) e due isoforme di citocheratina 75 (Ac-Ker75A e Ac-Ker75B). I trascritti di ciascuna alfa-cheratina sono stati confrontati in coda normale e in rigenerazione mediante *qPCR*. L'espressione del gene *gadph* è stata usata per normalizzare i risultati. Le differenze statisticamente significative tra coda normale e coda in rigenerazione sono indicate dall'asterisco (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 4$ , media  $\pm$  DS).

### 30.1.2. Beta-proteine

Per le analisi quantitative tramite *qPCR* di beta-proteine sono state scelte tre beta-proteine isolate dall'*Anolis* in un precedente lavoro (Dalla Valle *et al.*, 2010): Li-Ac-24 (anche nota come HgGC-16), Li-Ac-25 (o HgGC-10) e Li-Ac-35 (o HgG-15). Le prime due appartengono al gruppo di beta-proteine ricche in glicina e cisteina, l'ultima invece appartiene al gruppo di beta-proteine ricche solo in glicina. Tutte e tre hanno un peso molecolare che si aggira attorno ai 10 kDa. Per quanto riguarda il punto isoelettrico, Li-Ac-24 e Li-Ac-35 sono neutre, mentre Li-Ac-25 è acida. Anche in questo caso il programma di predizione usato per ricavare i dati è *PROTPARAM* reperibile presso il sito internet <http://web.expasy.org/protparam/>.

Dall'allineamento delle sequenze aminoacidiche delle tre beta-proteine prese in considerazione per l'analisi (Fig. 34) si osserva che Li-Ac-24 e Li-Ac-25 sono molto simili tra loro, mentre Li-Ac-35 è di circa 20 amminoacidi più corta e differisce in più punti rispetto alle altre due sequenze. E' inoltre evidente il maggior contenuto in cisteine delle prime due proteine.

```

Li-Ac-24  MSCCPPPCCCPPSCVVPSCSSSPCIGIGAQKCGSTSSACLGAVPGVTPCCINQLPAAE 60
Li-Ac-25  MSCCQPSCCG--PSCVVPSCSSTPCCIGIGAQRCGSTSSCCLGTVPGVVPSCITQLPASE 58
Li-Ac-35  MSRSG-GYGG--NQCYAS-C---PASTVTIQ-----PPPFVLN-IPGPALYCPDQ-PFRI 46
          ** .          . * .. *          * . : *          ... * . : ** . * * *

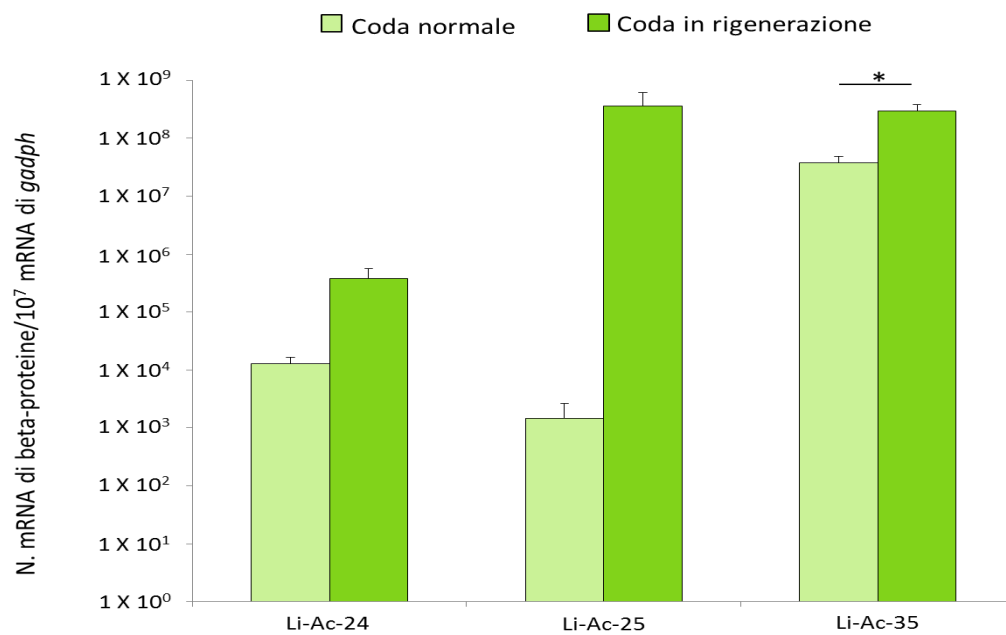
Li-Ac-24  MVVQPPCIIVTFPGPIMSASCEPIQVGGTAPCAIAGSCCKP---CCKPCK 107
Li-Ac-25  MVIQPPAVVMTIPGPIMSASCEPIAVGGTTPCAVAGGCSGIRGIGCSFCY 108
Li-Ac-35  EQFNP-----CAGRGVRGGNALYASGGSNFSEFYTPALPSNNFNYSY- 89
          .:*          . * : ..          **: . . .          ..

```

**Figura 34.** Allineamento tramite il software *ClustalW* delle tre sequenze aminoacidiche dedotte dalle beta-proteine Li-Ac-24 e Li-Ac-25, ricche in glicina e cisteina, e Li-Ac-35, ricca solamente in glicina. In giallo sono evidenziati i residui di cisteina, in azzurro i residui di glicina, due amminoacidi chiave per la funzione di queste proteine. In rosso è evidenziata la regione del “core-box”. L’asterisco indica identità; i due punti indicano sostituzione conservata; i punti singoli indicano sostituzioni semiconservate.

Per condurre gli esperimenti di *Real Time PCR* assoluta è stato necessario disegnare coppie di oligonucleotidi specifiche per ognuna delle tre proteine, selezione difficile visto che le beta-proteine appartengono a famiglie multigeniche e che quindi presentano tra loro un’elevata identità di sequenza. L’oligo senso è stato disegnato obbligatoriamente nella regione 5’-UTR dal momento che deve precedere l’unico introne presente, sempre localizzato nella regione non tradotta in questa classe di proteine. L’oligo antisense è stato scelto invece nella regione codificante. Le coppie di *primers* sono state testate su cDNA di *Anolis* e la loro specificità è stata in seguito verificata tramite sequenziamento.

Lo studio quantitativo ha messo in evidenza anche per le beta-proteine una maggiore espressione nella coda in rigenerazione rispetto alla coda normale (Fig. 35), come era accaduto prima con le alfa-cheratine. Una differenza più grande si nota per le proteine Li-Ac-25 e Li-Ac-24, che appartengono allo stesso gruppo di proteine ricche in glicina e cisteina. La differenza è lieve invece per la beta-cheratina Li-Ac-35, la cui sequenza differisce maggiormente rispetto alle altre due. Tale differenza è risultata statisticamente significativa.



**Figura 35.** Quantificazione dei livelli di mRNA codificanti beta-proteine. I trascritti di ciascun gene sono stati confrontati in coda normale e in rigenerazione mediante *qPCR*. L'espressione del gene *gadph* è stata usata per normalizzare i risultati. Le differenze statisticamente significative tra coda normale e coda in rigenerazione sono indicate dall'asterisco (\* $p < 0.05$ ,  $n = 4$ , media  $\pm$  DS).

## 40. Analisi bioinformatica del promotore genico di *A. carolinensis*

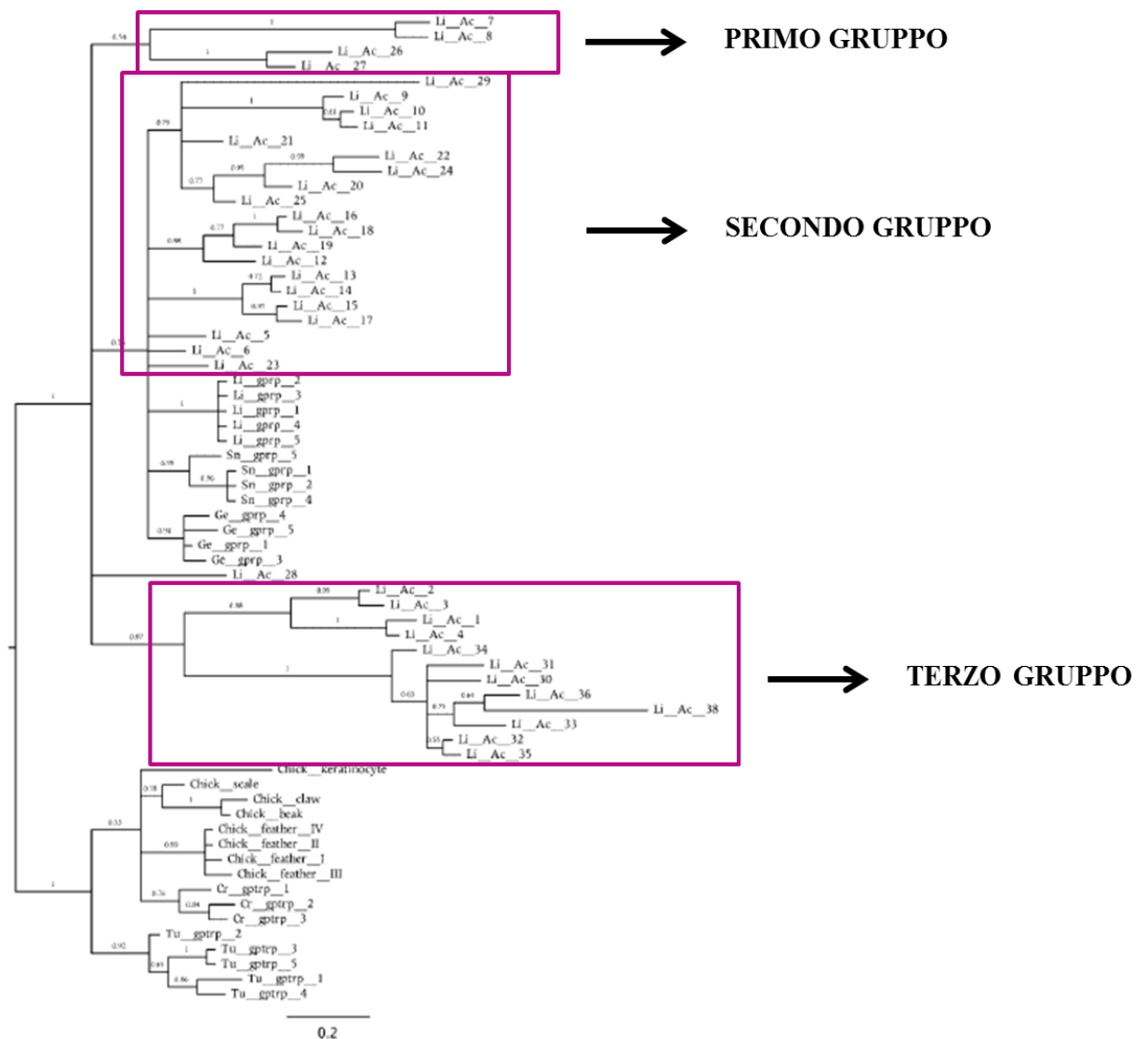
Grazie alla conoscenza del genoma completo di *A. carolinensis* è stato possibile isolare tutti i geni codificanti beta-proteine (Dalla Valle *et al.*, 2010). Questo ha permesso l'identificazione della struttura genica e la conseguente determinazione delle regioni promotrici di ciascuno dei 40 geni trovati. In tali porzioni di DNA è infatti possibile reperire specifici siti di legame per fattori di trascrizione, i quali, grazie alla loro interazione con il DNA, innescano il reclutamento di altri componenti del macchinario necessario all'attivazione o alla repressione della trascrizione genica. Al fine di capire i meccanismi molecolari che stanno alla base di questo processo è molto importante l'utilizzo di metodi computazionali deputati alla ricerca di possibili siti di legame per fattori di trascrizione (Kel *et al.*, 2003; Chekmenev *et al.*, 2005). Per l'analisi è stato deciso di prendere in considerazione diecimila nucleotidi a monte del primo esone non tradotto. Lo studio bioinformatico è consistito nel ricercare possibili siti di legame per tali elementi proteici mediante l'utilizzo di tre differenti programmi allo scopo di rendere i risultati il più possibile attendibili. Come già spiegato nel capitolo dei materiali e metodi, gli applicativi utilizzati sono: *TFSEARCH*, disponibile presso il sito <http://www.cbrc.jp/research/db TFSEARCH.html>, *MATCH*<sup>TM</sup> e *P-Match*, le cui versioni pubbliche si trovano nel sito <http://www.gene-regulation.com/pub/programs>.

Nella ricerca sono stati presi in considerazione non solo i fattori di trascrizione riconosciuti da tutti e tre i programmi simultaneamente (evidenziati in rosso nella tabella II), ma anche quelli riconosciuti da due di essi soltanto (evidenziati in giallo nella tabella II).

GENI	SOFTWARE	Nkx2-5	E2F	GATA-1	GATA-3	HNF-3beta	COMP1	Evi-1	MyoD	v-Myb	AP-1	Oct-1	c-Rel	NF-E2	NF-KappaB	c-Ets-1 (p54)	HLF	STAT3	HPH-1	NRF-2	IK-1	IK-3
Li-Ac-6	TFSEARCH	4	2	2	3	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0
	MATCH 1	4	1	0	0	0	5	2	0	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P-Match - Public 1.0	2	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Li-Ac-7	TFSEARCH	7	0	3	3	1	0	1	0	1	9	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
	MATCH 1	6	0	0	1	2	4	0	1	14	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	P-Match - Public 1.0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Li-Ac-14	TFSEARCH	14	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
	MATCH 1	6	0	0	0	1	0	1	0	1	4	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	P-Match - Public 1.0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	8	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Li-Ac-19	TFSEARCH	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MATCH 1	0	1	0	0	1	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P-Match - Public 1.0	1	4	0	0	0	3	6	0	0	0	11	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0
Li-Ac-21	TFSEARCH	3	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	MATCH 1	3	1	1	3	1	1	1	0	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P-Match - Public 1.0	2	2	0	0	0	0	3	0	0	0	4	1	2	0	1	2	0	0	0	0	0
Li-Ac-28	TFSEARCH	2	0	3	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
	MATCH 1	0	0	1	0	1	0	5	1	0	1	13	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	P-Match - Public 1.0	4	0	0	0	0	0	11	0	0	0	8	0	12	0	0	0	1	0	0	0	0
Li-Ac-35	TFSEARCH	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	2	1
	MATCH 1	3	0	0	1	1	2	4	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
	P-Match - Public 1.0	0	2	0	0	0	0	10	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	4	0	1	0
Li-ac-37	TFSEARCH	4	0	4	2	2	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MATCH 1	4	0	0	0	0	3	5	0	2	6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	P-Match - Public 1.0	2	0	0	0	0	9	0	0	0	0	4	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Li-Ac-40	TFSEARCH	5	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	MATCH 1	4	0	0	0	1	9	3	0	1	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	P-Match - Public 1.0	2	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0

**Tabella II.** Risultati dell'analisi bioinformatica di alcune beta-proteine prese come esempio. In rosso sono evidenziate le caselle in cui il fattore di trascrizione è riconosciuto da tutti e tre i programmi; in giallo sono invece evidenziate le caselle in cui il fattore di trascrizione è riconosciuto da due soli programmi.

I risultati ottenuti in questo modo sono stati successivamente confrontati sia secondo l'appartenenza delle beta-proteine a vari rami dell'albero filogenetico, visto nell'introduzione, e suddividendo le KAbetaPs in tre gruppi principali (Fig. 36), sia secondo la loro appartenenza a quattro gruppi in base al contenuto in glicina e cisteina (ricche in glicina, ricche in cisteina, ricche in glicina e in cisteina, povere sia in glicina sia in cisteina, come spiegato nel capitolo dell'introduzione).



**Figura 36.** Albero filogenetico visto precedentemente nell'introduzione (Fig. 14) in cui è evidenziata la suddivisione delle beta-proteine in tre gruppi (immagine modificata da Dalla Valle *et al.*, 2010).

I risultati ottenuti con il primo tipo di confronto sono schematizzati nelle tre seguenti tabelle:

GENI	FATTORI DI TRASCRIZIONE
Li-Ac-7	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, c-Rel, c-Ets-1
Li-Ac-8	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, c-Rel, HLF
Li-Ac-26	<b>Nkx2-5</b> , AP-1, Oct-1, Sox-5
Li-Ac-27	<b>Nkx2-5</b> , AP-1, Oct-1, Sox-5

**Tabella III.** Fattori di trascrizione trovati per le beta-proteine appartenenti al primo gruppo. In grassetto sono evidenziati i fattori di trascrizione riconosciuti da tutti e tre i programmi.

GENI	FATTORI DI TRASCRIZIONE
Li-Ac-29	Evi-1, AP-1
Li-Ac-9	<b>Nkx2-5</b> , GATA-3, Evi-1, STATx
Li-Ac-10	<b>Nkx2-5</b> , <b>E2F</b> , Evi-1, Elk-1, Oct-1, c-Rel, c-Ets-1, Brn-2
Li-Ac-11	<b>Nkx2-5</b> , <b>E2F</b> , Evi-1, Elk-1, Oct-1, c-Rel, c-Ets-1, Brn-2
Li-Ac-21	Nkx2-5, <b>E2F</b> , GATA-1, GATA-3, Evi-1, AP-1, NF-KappaB
Li-Ac-22	Nkx2-5, Evi-1, CREB, CHOP-C/EBPalpha
Li-Ac-24	Nkx2-5, HNF-4
Li-Ac-20	<b>Nkx2-5</b> , GATA-3, Evi-1, v-Myb, Oct-1, c-Rel, NF-KappaB, <b>NRF-2</b> , IK-1
Li-Ac-25	USF, Evi-1, MyoD, <b>c-Rel</b> , <b>HFH-1</b>
Li-Ac-16	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, STATx, HNF-4, IK-1
Li-Ac-18	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, STATx, <b>c-Rel</b>
Li-Ac-19	Nkx2-5, Evi-1, <b>E2F</b> , COMP1
Li-Ac-12	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, STATx, c-Myc/Max, NF-KappaB
Li-Ac-13	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, NF-KappaB, STATx, c-Myc/Max
Li-Ac-14	Nkx2-5, HNF-3beta, Evi-1, AP-1, c-Rel, NF-E2, STATx, <b>HFH-1</b>
Li-Ac-15	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, STATx, HNF-4
Li-Ac-17	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, STATx, <b>c-Rel</b>
Li-Ac-5	<b>Nkx2-5</b> , <b>E2F</b> , c-Rel, Evi-1
Li-Ac-6	Nkx2-5, <b>c-Rel</b> , HNF-4, HNF-3beta, <b>Evi-1</b> , E47, <b>NF-KappaB</b>
Li-Ac-23	Nkx2-5, <b>E2F</b> , <b>c-Rel</b> GATA-X, <b>CDP</b> , Evi-1

**Tabella IV.** Fattori di trascrizione trovati per le beta-proteine appartenenti al secondo gruppo. In grassetto sono evidenziati i fattori di trascrizione riconosciuti da tutti e tre i programmi.



GENI	FATTORI DI TRASCRIZIONE
Li-Ac-2	<b>Nkx2-5</b> , HNF-4, Evi-1, COUP-TF, NF-KappaB
Li-Ac-3	<b>Nkx2-5</b> , HNF-4, OLF-1, Evi-1, Elk-1
Li-Ac-1	<b>Nkx2-5</b> , HNF-4, Evi-1, COUP-TF, NF-KappaB
Li-Ac-4	<b>Nkx2-5</b> , HNF-4, OLF-1, Evi-1, Elk-1, v-Myb, AP-1, COUP-TF
Li-Ac-34	Nkx2-5, GATA-1, Evi-1, Oct-1, <b>c-Rel</b> , STATx
Li-Ac-31	<b>Nkx2-5</b> , <b>E2F</b> , GATA-X, <b>Evi-1</b> , v-Myb, AP-1, <b>c-Rel</b> , <b>NF-E2</b>
Li-Ac-30	Nkx2-5, <b>E2F</b> , Evi-1, E47, v-Myb, c-Rel, STATx
Li-Ac-36	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, c-Rel, Brn-2
Li-Ac-38	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1
Li-Ac-33	Nkx2-5, GATA-1, Evi-1, <b>c-Rel</b> , STATx, Oct-1
Li-Ac-32	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, AP-1, c-Rel
Li-Ac-35	Nkx2-5, Evi-1, AP-1, c-Rel, STATx, <b>NRF2</b> , IK-1, GATA-3, HLF

**Tabella V.** Fattori di trascrizione trovati per le beta-proteine appartenenti al terzo gruppo. In grassetto sono evidenziati i fattori di trascrizione riconosciuti da tutti e tre i programmi.

Da questi risultati si nota che il fattore di trascrizione Nkx2-5 è quasi sempre presente, tranne in Li-Ac-25 e Li-Ac-29. Inoltre si nota un *pattern* abbastanza ricorrente per altri tre fattori: Evi-1, AP-1 e c-Rel.

I risultati ottenuti invece confrontando i fattori di trascrizione trovati nelle beta-proteine in base all'appartenenza a uno dei quattro gruppi in cui sono state suddivise a causa del loro contenuto in glicina e cisteina sono schematizzati nella tabella VI. Per ogni singolo fattore preso in considerazione è stata indicata la beta-proteina nella regione promotrice della quale il TF è stato trovato (seconda colonna). Nella terza colonna invece è indicata la tipologia a cui le beta-proteine della seconda colonna appartengono. In giallo sono evidenziati i fattori di trascrizione trovati nel gruppo di beta-proteine ricche in glicina e cisteina. In verde sono evidenziati i TF trovati nel gruppo di beta-proteine ricche solamente in glicina. In azzurro sono colorati i fattori di trascrizione trovati nei gruppi di beta-proteine ricche in glicina e cisteina e ricche solamente in glicina. In viola sono indicati i TF trovati nelle regioni del promotore delle beta-proteine ricche in glicina e cisteina, ricche in glicina e povere sia in glicina sia in cisteina. In rosa pallido sono evidenziati i fattori di trascrizione identificati nelle regioni del promotore di tutti e quattro i gruppi in cui sono state suddivise le quaranta beta-proteine.

Fattori di Trascrizione	Li-Ac-X	Tipologia di beta-proteine
COUP-TF	2, 1, 3	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
OLF-1	3	
ELK-1	3	
c-Ets-1 (p54)	7	
USF	25	
MyoD	25, 28	
c-Myc/Max	12, 13	
COMP1	19	
E47	30	
CHOP-C/EBPalpha	22	
CREB	22	
Sox-5	26, 27	RICCHE IN GLICINA
HNF-3beta	14	
NF-E2	14	
IK-1	35, 20	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	16	RICCHE IN GLICINA
HNF-4	2, 1, 3, 24	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	16, 15	RICCHE IN GLICINA
NF-KappaB	2, 1, 20, 21, 28	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	13, 12	RICCHE IN GLICINA
v-Myb	3, 20	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	30	RICCHE IN GLICINA
AP-1	3, 8, 7, 21, 28	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	27, 26, 13, 14, 12, 16, 15, 17, 18, 35, 32	RICCHE IN GLICINA
HLF	8	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	35	RICCHE IN GLICINA
HFH-1	<u>25</u>	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	<u>14</u>	RICCHE IN GLICINA
GATA-3	20, 21	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	35	RICCHE IN GLICINA

<b>Fattori di Trascrizione</b>	<b>Li-Ac-X</b>	<b>Tipologia di beta-proteine</b>
NRF-2	<u>20</u>	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	<u>35</u>	RICCHE IN GLICINA
E2F	<u>21</u>	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	<u>5, 19, 30</u>	RICCHE IN GLICINA
GATA-1	21, 28	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	33	RICCHE IN CISTEINA
	34	POVERA DI GLICINA E DI CISTEINA
STATx	13, 14, 12, 16, 15, 17, 18, <u>35</u> , 30	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	33	RICCHE IN CISTEINA
	34	POVERA DI GLICINA E DI CISTEINA
Evi-1	2, 1, 3, 8, 7, 25, 20, <u>28</u> , 22, 21	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	5, 13, 14, 12, 16, 15, 17, 19, 18, 35, 32, 30	RICCHE IN GLICINA
	33	RICCHE IN CISTEINA
	34	POVERA DI GLICINA E DI CISTEINA
c-Rel	8, 7, <u>25</u> , <u>20</u> , 28	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	5, 14, <u>17</u> , <u>18</u> , 35, 32, 30	RICCHE IN GLICINA
	<u>33</u>	RICCHE IN CISTEINA
	<u>34</u>	POVERA DI GLICINA E DI CISTEINA
Oct-1	20, 28	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	27, 26	RICCHE IN GLICINA
	33	RICCHE IN CISTEINA
	34	POVERA DI GLICINA E DI CISTEINA
Nkx2-5	<u>2</u> , <u>1</u> , <u>3</u> , 7, 8, <u>20</u> , 21, 28, 22, 24	RICCHE IN GLICINA E CISTEINA
	<u>5</u> , <u>27</u> , <u>26</u> , <u>13</u> , <u>12</u> , <u>16</u> , <u>15</u> , <u>14</u> , <u>17</u> , <u>18</u> , 19, <u>32</u> , 30, 35	RICCHE IN GLICINA
	33	RICCHE IN CISTEINA
	34	POVERA DI GLICINA E DI CISTEINA

**Tabella VI.** Fattori di trascrizione trovati nelle beta-proteine in base al loro contenuto in glicina e cisteina. Le KAbetaPs sono sottolineate quando riconosciute da tutti e tre i programmi.

I risultati ottenuti con questa seconda tipologia di confronto sono stati riassunti nella tabella VII. Nella seconda colonna sono indicati i fattori di trascrizione ritrovati nella regione del promotore delle beta-proteine appartenenti esclusivamente al gruppo di beta-proteine ricche in glicina e cisteina, indicato tra parentesi come gruppo A. Nella terza colonna sono indicati i fattori di trascrizione identificati nella regione del promotore delle beta-proteine appartenenti esclusivamente al gruppo di beta-proteine ricche in glicina, indicato tra parentesi come gruppo B. Nella quarta colonna sono indicati i TF rinvenuti nella regione del promotore delle beta-proteine appartenenti esclusivamente al gruppo di beta-proteine ricche in cisteina, indicato tra parentesi come gruppo C. Nella quinta colonna sono indicati i TF rinvenuti nella regione del promotore delle beta-proteine appartenenti esclusivamente al gruppo di beta-proteine povere sia in glicina sia in cisteina, indicato tra parentesi come gruppo D. Negli ultimi due casi non sono stati trovati TF che rispondessero a tali caratteristiche di esclusività. Nella sesta colonna sono indicati tutti quei fattori che sono stati trovati contemporaneamente nel gruppo di beta-proteine ricche in glicina e cisteina (gruppo A) e nel gruppo ricco solo in glicina (gruppo B). Nella nona colonna è indicato il TF trovato contemporaneamente nel gruppo di beta-proteine ricche in glicina e cisteina (gruppo A), nel gruppo ricco solo in glicina (gruppo B) e nel gruppo di beta-proteine povere sia in glicina sia in cisteina (gruppo C). Nell'ultima colonna, infine, sono indicati i TF contemporaneamente presenti in tutti e quattro i gruppi (A, B, C e D).

<b>BE TA- PRO TEI NE</b>	<b>ricche in glicina e cisteina (= gruppo A)</b>	<b>ricche in glicina (= gruppo B)</b>	<b>ricche in cisteina (= gruppo C)</b>	<b>povere sia in glicina sia in cisteina (= gruppo D)</b>	<b>A+B</b>	<b>A + B + C</b>	<b>A + B + D</b>	<b>A + C + D</b>	<b>A+B+C+ D</b>
<b>FAT TORI DI TRA SCRI ZIO NE</b>	COUP-TF, Olf-1, Elk-1, c-Ets-1, USF, MyoD, c- Myc/Max, COMP1, E47, CHOP- C/EBPalpha, CREB	Sox-5, HNF- 3beta, NF-E2	/	/	IK-1, HNF-4, NF- KappaB, v-Myb, AP-1, HLF, HFH-1, GATA-3, NRF-2, E2F	/	/	G A T A- 1, S T A T x	Nkx2-5, Evi-1, c-Rel, Oct-1

**Tabella VII.** Tabella riassuntiva dei risultati confrontati secondo l'appartenenza delle beta-proteine a quattro gruppi in base al loro contenuto in glicina e cisteina.

Finora ci si è concentrati sui fattori di trascrizione comuni, ma di maggiore interesse sono invece i fattori di trascrizione specifici, perché potrebbero spiegare la tessuto-specificità che le beta-proteine sembrano avere.

Dal momento che in *Gallus gallus* le KAbetaPs hanno la stessa organizzazione strutturale presente nei Rettili, e la loro tessuto-specificità è stata individuata chiaramente essendo state raggruppate in varie tipologie quali: beta-proteine di squama, di becco, di artiglio, di penna e simili a quelle delle penne, si è deciso di condurre l'analisi del promotore genico anche per un campione rappresentativo di 40 delle 140 KAbetaPs isolate in questo organismo (Dalla Valle *et al.*, ricerca ancora in corso; Greenwold e Sawyer, 2010; Greenwold e Sawyer, 2011) per poter effettuare un confronto tra fattori di trascrizione presenti nelle regioni regolatrici delle beta-proteine tessuto-specifiche del pollo e quelli invece trovati in *A. carolinensis* per poter rilevare eventuali omologie almeno per quanto riguarda squame e artigli.

Le analisi sono state condotte, come per l'*Anolis*, su diecimila nucleotidi a monte del primo esone non tradotto e con gli stessi programmi bioinformatici.

I risultati trovati sono elencati nella seguente tabella:

<b>BETA-PROTEINE <i>Gallus gallus</i></b>		
<b>TIPOLOGIA di ANNESSO CUTANEO</b>	<b>BETA-PROTEINE</b>	<b>FATTORI DI TRASCRIZIONE</b>
<b>Artiglio</b>	GGA25_Clav1	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, v-Myb, c-Rel, CP2
	GGA25_Clav2	Nkx2-5, CRE-BP1/c-Jun, CREB
	GGA25_Clav3	/
	GGA25_Clav4	CRE-BP1/c-Jun, CREB
	GGA25_Clav5	Nkx2-5, CRE-BP1/c-Jun, CREB
	GGA25_Clav6	<b>Nkx2-5</b> , <b>Evi-1</b> , MyoD, c-Rel, myogenin/NF-1
	GGA25_Clav7	<b>Nkx2-5</b> , <b>E2F</b> , <b>Evi-1</b> , MyoD, AP-1, Oct-1, c-Rel, myogenin/NF-1
	GGA25_Clav8	Nkx2-5, CRE-BP1/c-Jun, CREB
<b>Penne</b>	GGA1_FK1	<b>Nkx2-5</b> , <b>E2F</b> , HNF-3beta, <b>Evi-1</b> , AP-1, <b>c-Rel</b> , HFH-1
	GGA2_FK1	Nkx2-5, USF, CDP, AP-1, ARP-1
	GGA2_FK2	Nkx2-5, AP-1, ARP-1
	GGA2_FK4	Nkx2-5, USF, NF-E2, CRE-BP1/c-Jun, CREB
	GGA2_FK5	USF, GATA-1
	GGA25_FK1	HNF-3beta, Elk-1, AP-1, c-Ets-1
	GGA25_FK2	<b>Nkx2-5</b> , HNF-3beta, AP-1, Oct-1
	GGA25_FK3	<b>Nkx2-5</b> , Oct-1, <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK4	<b>Nkx2-5</b> , <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK5	Nkx2-5, <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK6	Nkx2-5, <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK7	Nkx2-5, <b>c-Rel</b> , CP2
	GGA25_FK8	<b>Nkx2-5</b> , Oct-1
	GGA25_FK9	<b>Nkx2-5</b> , Oct-1, <b>c-Rel</b> , CP2
	GGA25_FK10	<b>Nkx2-5</b> , Oct-1, <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK11	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, Oct-1, <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK12	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, Oct-1
	GGA25_FK14	Nkx2-5, Evi-1, Oct-1, <b>c-Rel</b>
	GGA25_FK15	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, Elk-1, Oct-1, <b>c-Rel</b> , STATx, CP2
	GGA27_FK4	Nkx2-5, GATA-3, Evi-1, AP-1, c-Rel, HLF
GGA27_FK15	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, MyoD, v-Myb, AP-1, CRE-BP1/c-Jun, AREB6	
GGA27_FK18	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, v-Myb, AP-1, NF-Kappa B, CRE-BP1/c-Jun	
GGA27_FK21	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, MyoD, v-Myb	
GGA27_FK23	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, v-Myb, <b>c-Rel</b> , STATx	
GGA27_FK27	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, HLF	
GGA27_FK37	<b>Nkx2-5</b> , Evi-1, MyoD	
<b>Cheratinociti</b>	GGA25_Keratinocyte	Evi-1, HLF
<b>BKJ</b>	GGA6_BKJ_1	<b>Nkx2-5</b> , C/EBP, USF, GATA-3, Evi-1, v-MyB, AP-1, <b>c-Rel</b> , <b>NK-Kappa B</b> , <b>NF-E2</b> , ARP-1
	GGA6_BKJ_2	<b>Nkx2-5</b> , USF, Evi-1, AP-1, <b>c-Rel</b> , <b>NF-Kappa B</b> , <b>NF-E2</b>
	GGA6_BKJ_3	<b>Nkx2-5</b> , USF, AP-1, <b>c-Rel</b> , <b>NF-Kappa B</b> , <b>NF-E2</b>
<b>Squama</b>	GGA25_Scale1	Nkx2-5, HNF-3beta, <b>Evi-1</b> , AP-1, Oct-1, ARP-1
	GGA25_Scale2	Nkx2-5, Evi-1, E47, MyoD, AP-1, Oct-1, XFD-3
	GGA25_Scale3	<b>Nkx2-5</b> , HNF-3beta, Olf-1, <b>Evi-1</b> , Elk-1, <b>Oct-1</b>
	GGA25_Scale4	Nkx2-5, HNF-3beta, <b>Evi-1</b> , AP-1, Oct-1, ARP-1

**Tabella VIII.** Risultati dell'analisi del promotore genico per 40 beta-proteine di *Gallus gallus*. In grassetto sono riportati i fattori riconosciuti da tutti e tre i programmi. Per “cheratinociti” si intendono le beta-proteine isolate da cheratinociti di Uccelli in coltura. BKJ, sta per beta-proteine isolate da fibroblasti di Uccelli trasformati attraverso un oncogene Jun chimerico (Hartl e Bister, 1995; Greenwold e Sawyer, 2010).

Anche qui, come in *Anolis*, si può notare una presenza quasi costante del fattore di trascrizione Nkx2-5 associato alla presenza di altri fattori che si trovano molto spesso, come Evi-1, AP-1, c-Rel.

I risultati ottenuti possono essere riassunti nelle seguenti tabelle:

<b>TF GENERICI</b>	<b>TIPOLOGIE di KAbetaPs nei diversi ANNESSI CUTANEI</b>
Nkx2-5	artiglio, penna, BKJ, squama (non presente nei cheratinociti)
Evi-1	artiglio, penna, BKJ, squama, cheratinociti
c-Rel	artiglio, penna, BKJ (non presente in cheratinociti e squama)
AP-1	artiglio, penna, BKJ, squama (non presente nei cheratinociti)

**Tabella VIII.** Tabella riassuntiva che indica le tipologie di beta-proteine appartenenti ai diversi annessi cutanei dove si trovano i fattori di trascrizione generici.

<b>TIPOLOGIE di KAbetaPs nei diversi ANNESSI CUTANEI</b>	<b>TF SPECIFICI</b>
<b>Artiglio</b>	myogenin/NF-1
<b>Penna</b>	HFH-1, CDP, GATA-1, c-Ets-1, STATx, AREB6
<b>Squama</b>	E47, XFD3, Olf-1
<b>BKJ</b>	C/EBP

**Tabella IX.** Tabella riassuntiva che indica i fattori di trascrizione specifici caratteristici della regione del promotore di beta-proteine dei diversi annessi cutanei.

In base a tutte queste analisi sono molti i TF specifici che potenzialmente potrebbero andare ad influenzare la regolazione della trascrizione (vedere la sezione relativa nel capitolo della discussione per i dettagli).





## Discussione

Verranno trattati i due principali filoni di ricerca svolta, uno relativo alle proteine coinvolte nel processo di corneificazione nei Cheloni, l'altro sulle proteine prodotte nel corso della rigenerazione epidermica di lucertola. I dati acquisiti nel corso di queste ricerche forniscono ulteriori elementi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari operanti nel corso del differenziamento epidermico nei Rettili e più in generale negli Amnioti. Verrà inoltre discussa brevemente la parte relativa all'analisi delle regioni promotoriali delle beta-proteine.

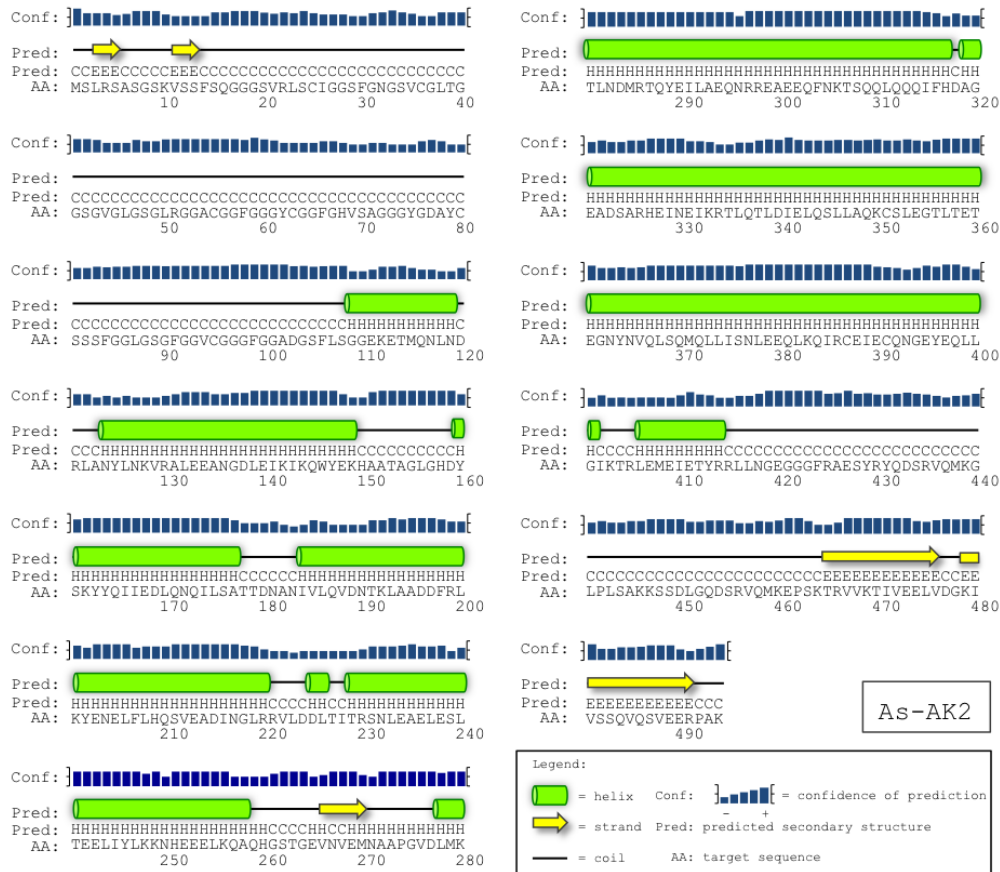
### 41. Corneificazione nei Cheloni

#### 41.1. Tipi e ruolo delle alfa-cheratine

L'analisi della libreria di cDNA a partire dall'RNA estratto dai margini in accrescimento del carapace della tartaruga a guscio molle *A. spinifera*, assieme ai dati ottenuti mediante metodiche molecolari classiche, ha portato all'isolamento e caratterizzazione di tre nuovi trascritti codificanti alfa-cheratine. Non è stato possibile determinare la parte iniziale delle regioni N-terminali di AK1 e AK3 ma questo non dovrebbe creare grossi problemi essendo la regione centrale quella maggiormente coinvolta nella formazione dei filamenti. Queste proteine, sulla base delle analisi condotte mediante programmi bioinformatici quali *BlastP* e *HMMER*, appartengono al gruppo di citocheratine del tipo I (acide), dato avvalorato anche dal basso *range* di PM in cui esse sono comprese (40-54 kDa). L'allineamento con il programma *ClustalW* delle sequenze aminoacidiche dedotte (Fig. 26 dei risultati) ha messo in evidenza che tali proteine presentano una regione centrale ben conservata mentre le estremità N- e C-terminali risultano maggiormente variabili, come avviene generalmente nell'ambito della famiglia delle alfa-cheratine (Steinert e Freedberg, 1991; Fuchs e Weber, 1994). In particolare AK1, AK2 e AK3 sono caratterizzate dall'aver un basso contenuto di residui di cisteine che si localizzano preferenzialmente nelle regioni terminali. Questi amminoacidi sono coinvolti nella formazione di legami crociati disolfuro che si presume leghino le alfa-cheratine mediante legami intermolecolari (*cross-linking*). Se i legami disolfuro sono numerosi, questo processo di *cross-linking* determina la formazione di aggregati rigidi che donano consistenza e durezza ai tessuti in cui sono contenuti. Si ritiene che siano le estremità delle molecole di alfa-cheratina ad essere coinvolte nel processo di aggregazione dei monomeri in dimeri di alfa-cheratine (Fuchs *et al.*, 1987; Steinert e Freedberg, 1991; Coulombe e Omary, 2002), ma il processo di

ossidazione delle cisteine avviene in seguito alla formazione dei filamenti iniziali (Fraser *et al.*, 1972; Steinert *et al.* 1993).

Utilizzando il programma di predizione della struttura secondaria *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, McGuffin *et al.*, 2000) si è visto che la regione centrale delle proteine appena identificate assume la tipica conformazione ad alfa-elica, mentre le estremità N- e C-terminali mostrano una struttura *random-coiled* (Fig. 36).



**Figura 36.** Rappresentazione della struttura secondaria predetta di As-AK2 ottenuta tramite il programma *PSIPRED* disponibile presso il sito <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (McGuffin *et al.*, 2000).

In AK2 è stata anche trovata una lunga regione con conformazione a foglietto beta all'estremità C-terminale, deputata all'assemblaggio delle molecole in strutture altamente specifiche (Fraser e Parry, 2009).

Per le analisi di tipo quantitativo riguardo alla differente espressione delle alfa-cheratine è stato necessario identificare almeno un frammento dei rispettivi putativi geni orloghi nella tartaruga a guscio duro, *P. nelsonii*. Purtroppo questo non è stato possibile per la proteina AK1. La proteina in questione infatti potrebbe non essere espressa in questa specie di tartaruga o potrebbe avere differenze nucleotidiche tali che ne hanno reso difficile l'identificazione con l'approccio che si è qui utilizzato.

E' quindi stato possibile confrontare dal punto di vista quantitativo solamente le proteine AK2 e AK3. Entrambi i trascritti sono risultati essere maggiormente espressi in *A. spinifera* rispetto a *P. nelsonii* (Fig. 29 e 30 del capitolo dei risultati). La differenza più rilevante è stata evidenziata a livello dei bordi del carapace. Tutti i dati finora raccolti avvalorano quindi l'ipotesi che le citocheratine acidiche di tipo I, povere di residui di cisteina, sono presenti in maniera preponderante nell'epidermide morbida. Questa tipologia di citocheratina si trova anche nel guscio duro di *P. nelsonii* ma in bassissime quantità, come rilevato dalle analisi. Queste proteine sono poi mascherate dalla massiccia presenza di beta-proteine che aggregandosi tra loro in modo tipico originano un'epidermide molto più dura (Dalla Valle *et al.*, 2012).

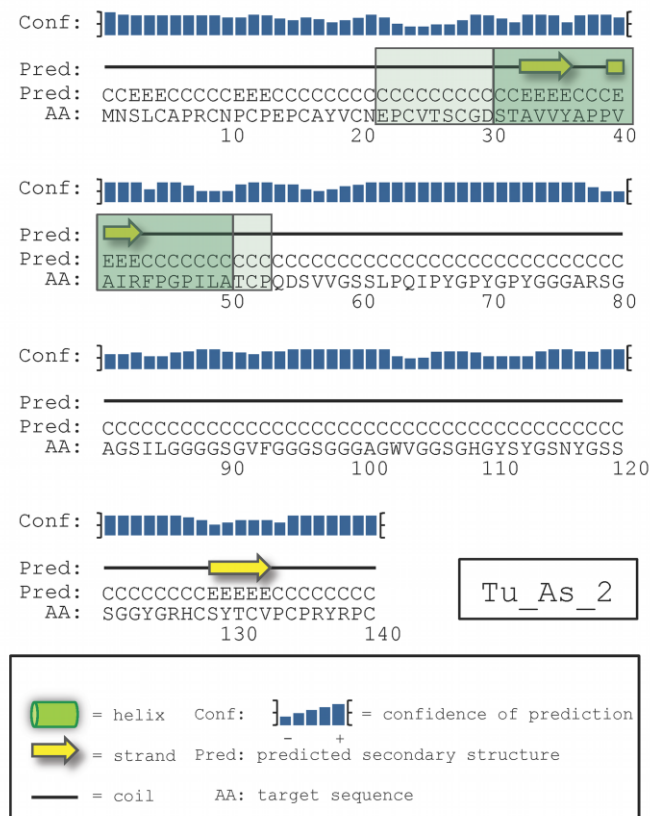
#### **41.2. Tipologie e ruolo delle beta-proteine (beta-proteine associate alle cheratine o KAbetaPs)**

L'analisi della libreria di cDNA costruita a partire dai bordi del carapace in accrescimento della tartaruga a guscio molle ha permesso di isolare e caratterizzare dieci diversi trascritti codificanti beta-proteine, un tempo note come beta-cheratine (Baden e Maderson, 1970; Fraser *et al.*, 1972; Gregg e Rogers, 1986; Fraser e Parry, 1996; Sawyer *et al.*, 2000).

Come già ampiamente spiegato nel capitolo dei risultati, precedenti studi avevano portato ad ipotizzare la modificazione di particolari regioni delle beta-proteine di *A. spinifera*. Si ipotizzava infatti fosse proprio la mancanza della regione del "core-box" ad impedire la formazione dei tipici aggregati di beta-proteine.

Con la presente tesi è stato invece dimostrato non solo che tutte le dieci beta-proteine caratterizzate in *A. spinifera* sono dotate di "core-box", tra l'altro molto ben conservato, ma anche che queste proteine sono molto più espresse rispetto alle 16 precedentemente isolate nella tartaruga a guscio duro *P. nelsonii* (Dalla Valle *et al.*, 2009b). Per entrambe le specie comunque questi dati sono ancora parziali in quanto per conoscere il numero effettivo di tutte le beta-proteine presenti e la loro tipologia bisognerebbe analizzare l'intero genoma come è stato finora fatto solo per la lucertola *A. carolinensis* (Dalla Valle *et al.*, 2010). Nonostante queste limitazioni, i risultati ottenuti nel presente lavoro di ricerca sulla tartaruga a guscio molle e sulla tartaruga a guscio duro hanno fornito molti nuovi risultati ed interessanti acquisizioni. Infatti le beta-proteine isolate presentano tutte le caratteristiche tipiche di tale famiglia genica: hanno un peso molecolare molto più basso (compreso tra i 14 e i 15 kDa) rispetto alle alfa-cheratine, come ci si aspetta infatti per queste piccole proteine (Wyld e Brush, 1979, 1983; Sawyer *et al.*, 2000; Toni *et al.*, 2007), sono dotate di un unico introne, localizzato nella regione 5'-UTR e hanno una regione codificante ininterrotta. Il

programma *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, McGuffin *et al.*, 2000) di predizione della struttura secondaria ha messo in evidenza la presenza di almeno due foglietti beta nella regione del “core-box” (Fig. 37).



**Figura 37.** Rappresentazione della struttura secondaria predetta per la beta-proteina Tu-As-2 mediante l’utilizzo del programma *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, McGuffin *et al.*, 2000). Il riquadro evidenziato in verde intenso mostra la regione “core-box”, la circostante area ombreggiata in verde chiaro indica la regione di 32 aa con conformazione a foglietto beta.

Inoltre l’utilizzo di altri programmi bioinformatici, *HMMER* e *BLASTp*, ha rilevato una elevata identità aminoacidica tra le beta-proteine isolate in *A. spinifera* e quelle presenti negli altri Rettili, come si osserva anche dalle numerose sequenze depositate nei *database* quali ad esempio *Genbank*, *Swiss prot* etc. In particolare è interessante notare che l’identità maggiore tra le 10 beta-proteine di *A. spinifera* si riscontra con la beta-proteina Tu-Pn-17, isolata dalla tartaruga a guscio duro *P. nelsonii* (Dalla Valle *et al.*, 2009b). Tale proteina ha una sequenza e di conseguenza una struttura che si discosta notevolmente dalle rimanenti 16 beta-proteine sempre isolate in questa specie e utilizzate per condurre le analisi di *Real Time PCR*.

Nella tartaruga a guscio duro le beta-proteine sono maggiormente espresse nei bordi del carapace rispetto agli altri campioni di cute morbida presi in considerazione (Fig. 31 dei

risultati), confermando così che tali molecole sono prodotte principalmente a livello della componente cornea di tale rigida corazza.

I dati emersi dal confronto tra l'espressione di beta-proteine contro alfa-cheratine (tabella I dei risultati) indicano che è presente una maggiore quantità di AK2 e AK3 rispetto alle beta-proteine nei bordi del carapace della tartaruga a guscio molle rispetto ai bordi del carapace di *P. nelsonii*. Tali dati contribuiscono a fornire spiegazioni sulla consistenza molle tipica del guscio presente nella famiglia *Trionichyidae*. Si può infatti ipotizzare che sia la quantità relativa di beta-proteine su alfa-cheratine, e non il valore assoluto di queste proteine, ad influenzare la formazione degli aggregati di beta-proteine che, fondendosi tra loro, originerebbero uno strato corneo omogeneo, resistente e robusto. Il fatto che in *A. spinifera* ci sia un basso rapporto beta-proteine/alfa-cheratine potrebbe quindi in parte spiegare come mai non si formino i tipici aggregati di KAbetaPs. Mentre in *P. nelsonii* l'elevato rapporto, contrariamente al valore assoluto preso singolarmente per entrambe queste proteine nelle due tartarughe, è indice di maggiore presenza e conseguentemente di accumulo di tali aggregati che fondendosi originerebbero un guscio molto resistente. Inoltre va anticipato che la resistenza e la non cedevolezza dello strato corneo di *P. nelsonii* sono ulteriormente incrementate dall'ammassarsi dei corneociti nella parte superficiale dello strato corneo esterno in quanto quest'ultimo viene perso solamente 1-2 volte all'anno mentre in *A. spinifera* il processo di rinnovo cellulare dell'epidermide esterna avviene in modo pressoché continuo (Alibardi, 2005, 2006a; Alibardi e Toni, 2006a).

La presente ricerca ha evidenziato che non solo nelle tartarughe a guscio duro ma anche in quelle a guscio molle le beta-proteine sono ubiquitarie nell'epidermide, sia in quella non squamata di arti, coda e collo ma in particolare in quella del carapace, anche se in minore quantità rispetto alle alfa-cheratine. Questo risultato, sotto determinati aspetti, è simile a quello che ci si aspettava di ottenere dall'analisi di espressione dell'epidermide che riveste il rigido tegumento del guscio di *P. nelsonii* e rispecchia presumibilmente la situazione che si trova in tutti gli altri gruppi di Rettili, dove la produzione di KAbetaPs non sarebbe limitata unicamente agli strati beta ma è invece presente anche negli strati alfa (Alibardi *et al.* 2009; Alibardi *et al.*, 2012).

La presenza nella tartaruga a guscio molle di beta-proteine canoniche e quindi non modificate nella regione del “core-box”, coinvolta nel processo di polimerizzazione, non chiarisce ancora completamente perché nello strato pre-corneo e corneo dell'epidermide di *A. spinifera* non si formino i tipici aggregati di beta-cheratine. Tale evidenza suggerisce che il processo di differenziamento dell'epidermide dei Cheloni avvenga con modalità diverse tra tartarughe molli e dure, non solo relativamente alla

quantità di proteine prodotte ed accumulate nei corneociti ma anche al numero e tipo di proteine coinvolte e probabilmente non ancora identificate nella tartaruga. La presenza di numerose proteine cornee è stata precedentemente trovata per le cheratine dure e per le cheratine ricche in cisteina nelle lucertole, serpenti ed altri Rettili (Eckhart *et al.*, 2008; Dalla Valle *et al.*, 2011). Quindi, la produzione di peculiari proteine che si associano alle KAbetaPs e alle alfa-cheratine durante il processo di corneificazione potrebbe giocare un ruolo chiave nel diverso grado di durezza che si trova nell'epidermide dei Rettili. Tale possibilità rimane completamente aperta per ricerche future.

### **41.3. L'epidermide della tartaruga a guscio molle subisce un processo di corneificazione diverso rispetto alla tartaruga a guscio duro.**

Il maggior numero di KAbetaPs trovate nella tartaruga a guscio molle rispetto a quelle rinvenute nella specie a guscio duro, in valore assoluto, può trovare una spiegazione anche nella diversa formazione e modalità di rinnovo dello strato corneo che caratterizza il tegumento, ed in particolare il carapace, delle due specie di Cheloni.

Nella tartaruga a guscio duro *P. nelsonii* il processo di muta/desquamazione avviene una volta all'anno, successivamente al periodo di riposo invernale in cui la proliferazione cellulare cessa. I cheratinociti vengono attivamente prodotti nello strato basale profondo durante il periodo di crescita, corrispondente alla stagione primaverile ed estiva, e si accumulano con il passare del tempo fino a fondere parzialmente le loro membrane dando così origine a uno spesso e robusto strato corneo. Conseguentemente anche le beta-proteine si accumulano e raggiungono elevati livelli proteici nella parte esterna dell'epidermide nonostante il livello di produzione dei rispettivi mRNA sia minore rispetto alla tartaruga a guscio molle. In quest'ultima specie i sottili corneociti mantengono contorni ben definiti e sono persi per esfoliazione continua. Tali cellule morte quindi non hanno la possibilità di impaccarsi come invece avviene in *P. nelsonii*. La loro continua perdita richiede una continua trascrizione di beta-proteine e di conseguenza il numero di trascritti può risultare apparentemente maggiore. In questo modo *A. spinifera* riesce a mantenere uno strato corneo sottile, che rinnovato in tempi molto brevi risulta più tenero di quello delle tartarughe a guscio duro (Alibardi 2006a) benché la sintesi di KAbetaPs sia intensa.

La grande differenza di espressione delle beta-proteine nelle due specie di Cheloni è inoltre verosimilmente dovuta al diverso tipo di stratificazione dell'epidermide. Infatti in *A. spinifera* sono molto più numerosi gli strati sopra-basali e pre-cornei rispetto al singolo strato sopra-basale presente generalmente nella cute della corazza della tartaruga a guscio duro in condizioni di riposo. Questi strati, come accennato in

precedenza, aumentano considerevolmente in *P. nelsonii* durante la stagione primaverile ed estiva, soprattutto in peculiari aree di accrescimento (*growing centers*, Alibardi, 2005, 2006a). Evidentemente tali aree non sono però sempre presenti nei campioni utilizzati nella presente ricerca, dando così origine all'elevata variabilità e alla bassa quantità di espressione delle KAbetaPs rilevata in questa specie a guscio duro. Quindi può anche essere che nei centri di crescita la produzione di cheratine e beta-proteine sia più alta di quella rilevata per la tartaruga a guscio duro *P. nelsonii* e che la generazione delle proteine dell'epidermide sia paragonabile nelle due specie.

Da tutto ciò si deduce quindi che il tipo di epidermide dura o più morbida presente nei due *Cheloni* presi in esame non dipende solo dalla varietà di cheratine e proteine associate e dal loro specifico rapporto, ma anche dalla struttura stessa del tegumento e dalla diversa tipologia di stratificazione e di rinnovo dello strato corneo esterno (Fig. 3 e 6). In *A. spinifera*, infatti prevale una maggior velocità nel ricambio cellulare, mentre in *P. nelsonii* è la capacità di accumulare nel tempo specifiche proteine ad influenzare la formazione di uno spesso e robusto strato corneo.

## **42. Proteine coinvolte nella rigenerazione dell'epidermide nella lucertola verde americana *A. carolinensis***

La coda in rigenerazione rappresenta un buon modello di studio per quanto riguarda la produzione di cheratine e proteine associate, perché permette di seguire abbastanza agevolmente come avviene la differenziazione dei diversi strati epidermici nella complessa cute dei Lepidosauri (lucertole e serpenti), dal momento che tale processo è lo stesso che avviene durante lo sviluppo, come pure nel processo ciclico di rinnovo cellulare (ciclo di muta) (Maderson, 1985; Alibardi 1994a,b; Dalla Valle *et al.*, 2005).

Gli studi precedenti avevano indicato la sintesi di alfa-cheratine durante le prime fasi di rigenerazione epidermica, seguita da quella delle beta-cheratine (ora indicate come beta-proteine o KAbetaPs) in concomitanza con la neoformazione delle nuove squame. Quindi negli esperimenti che si sono condotti sulla lucertola si è deciso di analizzare, mediante *qPCR*, gli eventuali cambiamenti di espressione di alcune alfa-cheratine e KAbetaPs nella coda normale e dopo successiva autotomia della stessa. Lo scopo è cercare di spiegare in che modo queste proteine siano specificamente coinvolte nel processo di corneificazione epidermica.

### **42.1. Alfa-cheratine espresse nel corso della rigenerazione epidermica**

Nella presente ricerca sono stati confrontati i livelli di espressione di due tipi di citocheratine (acide e basiche) nella coda normale e in rigenerazione di esemplari adulti di *Anolis carolinensis*. Le citocheratine acide hanno un PM e un contenuto di cisteina

inferiore rispetto alle citocheratine basiche (Fuchs, 1987; Steinert e Freedberg, 1991). Nei Mammiferi, mentre le prime contribuiscono alla maturazione dei corneociti dello strato basale e soprabasale, le seconde intervengono nella maturazione vera e propria e nella produzione dello strato corneo. Nei Rettili il meccanismo non è ancora conosciuto ma si ipotizza sia simile (Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012). Quelle neutre o basiche invece potrebbero costituire una sorta di supporto meccanico alla deposizione di altre proteine specifiche tra cui le stesse beta-proteine. Sia il tipo acido sia il tipo basico sono poi associate alla deposizione di lipidi tra le loro maglie (tali lipidi vengono anche estrusi nello strato pre-corneo e corneo) rappresentando piuttosto una barriera contro la perdita d'acqua (Menon *et al.*, 1996).

Tutte e quattro le citocheratine analizzate presentano buoni valori di identità aminoacidica con citocheratine di Mammiferi e in particolare con le citocheratine di uomo, ad indicare che molto probabilmente le prime fasi di differenziamento cellulare che portano alla successiva cheratinizzazione dell'epidermide sono simili in tutti gli Amnioti.

Sia le cheratine acide sia le cheratine basiche analizzate sono risultate più espresse nella coda in rigenerazione rispetto alla coda in condizioni normali. Questo risultato è dato dalla naturale conseguenza di una maggiore proliferazione e differenziazione cellulare nei tessuti che si devono formare completamente (vedi figura 33 nei risultati; Alibardi, 1994a,b). Di notevole interesse è invece il fatto che ogni trascritto ha mostrato una particolare differenza di espressione pur trattandosi di isoforme (Ac-Ker14A e Ac-Ker14B) codificanti citocheratine di tipo I (acide) e isoforme (Ac-Ker75A e Ac-Ker75B) codificanti citocheratine di tipo II (basiche). Tra le due diverse condizioni (coda normale e in rigenerazione) le isoforme acide, che sono preferenzialmente prodotte negli strati basali profondi, mostrano una più lieve divergenza. Una diversità di espressione più accentuata si nota invece nelle isoforme basiche presenti soprattutto negli strati sopra-basali e pre-cornei. Da questo risultato si potrebbe ipotizzare che i diversi strati epidermici siano costituiti di particolari proteine dotate di una composizione aminoacidica caratteristica a seconda delle esigenze richieste dallo strato epidermico in cui si trovano.

I diversi livelli di espressione delle alfa-cheratine (Fig. 33 nel capitolo dei risultati) potrebbero inoltre essere indicativi di una regolazione peculiare a livello di trascrizione.

## **42.2. Beta-proteine espresse nel corso della neogenesi delle squame**

Nella presente analisi quantitativa sono stati anche confrontati i livelli di espressione in coda normale e in rigenerazione di tre delle 40 KAbetaPs isolate in un precedente lavoro su *A. carolinensis* (Dalla Valle *et al.*, 2010). In quest'ultimo studio erano stati



identificati tutti i geni codificanti beta-proteine, alcuni dei quali espressi sia in condizione normale sia di rinnovo epidermico. Come spiegato precedentemente nel capitolo dei risultati dell'analisi del promotore, in seguito ad analisi biomolecolari e della struttura aminoacidica, tali proteine erano state suddivise in quattro gruppi in base al loro contenuto in glicina e cisteina, due amminoacidi che svolgono un ruolo chiave per la funzione finale delle molecole che li contengono (Fraser *et al.*, 1972; Wyld e Brush, 1983; Fraser e Parry, 1996, 2011). Infatti, la glicina tende a ridurre la solubilità delle proteine, avendo una natura idrofobica, mentre la cisteina, grazie all'atomo di zolfo, è in grado di formare ponti disolfuro che conferiscono resistenza agli aggregati molecolari di cui fanno parte.

In questa ricerca sono state prese in considerazione tre particolari KAbetaPs in base al loro contenuto aminoacidico: Li-Ac-24 (anche nota come HgGC-16), Li-Ac-25 (chiamata anche HgGC10) e Li-Ac-35 (o HgG-15) (Dalla Valle *et al.*, 2010). Le prime due sono caratterizzate dall'appartenere al gruppo di KAbetaPs ricche in glicina e cisteina. L'ultima invece appartiene al gruppo di beta-proteine ricche solamente in glicina e in questo è molto simile alla KAbetaPs nominata HgG5 (o Li-Ac-13). Quest'ultima è una proteina molto espressa e localizzata nello strato beta delle squame (Alibardi *et al.*, 2012).

Le tre proteine prese in considerazione sono caratterizzate dall'aver un basso peso molecolare, che si aggira attorno ai 10 kDa. Li-Ac-24 e Li-Ac-35 hanno un punto isoelettrico neutro, invece Li-Ac-25 ha un pI piuttosto acido.

Negli esperimenti di *Real Time PCR* assoluta le tre KAbetaPs sono risultate maggiormente espresse nella coda in rigenerazione rispetto alla coda normale (Fig. 33 dei risultati), come si era visto con le alfa-cheratine. Anche in questo caso, la spiegazione è data dal maggior grado di proliferazione e differenziamento cellulare che avviene nella coda in rigenerazione, mentre nell'epidermide normale è probabile che non siano presenti molti strati epidermici in corso di crescita e differenziamento (Maderson, 1985; Maderson *et al.* 1998). Le maggiori differenze sono state evidenziate nelle due beta-proteine ricche in glicina e cisteina, che precedenti studi condotti su diverse specie di lucertole e sullo sfenodonte (Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012) avevano rilevato essere presenti pressoché in tutti gli strati epidermici, ma risultavano accumularsi in particolare negli strati alfa profondi. Queste due proteine sono quindi le prime temporalmente ad essere espresse ed è per questo motivo che nell'analisi esse risultano presenti in quantità maggiore nell'epidermide della coda che si sta formando. Ulteriori studi di localizzazione e di espressione tissutale (immunocitochimica ed ibridazione *in situ*) potrebbero evidenziare la localizzazione nei

vari strati epidermici che si susseguono nel corso della rigenerazione (Alibardi, 1994a,b; Alibardi, 2012a,b,c,d).

E' invece presente solo una lieve differenza di espressione tra l'epidermide della coda normale e in rigenerazione per la K $\beta$  ricca solamente in glicina, Li-Ac-35 (Fig. 34 nel capitolo dei risultati). Tale beta-proteina sembra essere espressa piÙ tardi rispetto alle altre due in quanto essa si accumula preferenzialmente negli strati cornei in differenziamento o giÀ differenziati nel corso della rigenerazione (Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012). Tra questi vi sono gli strati *Oberhautchen* e beta che non sono ancora presenti nell'epidermide iniziale della coda in rigenerazione. Infatti nelle prime fasi del processo rigenerativo si forma solo un epitelio molto spesso ma soffice (*wound epithelium*, Maderson, 1985; Alibardi, 1994a,b), il quale per la maggior parte della sua estensione non è ancora organizzato a ricoprire le squame.

Anche in questo caso, come per le alfa-cheratine, è degno di nota il fatto che ciascun gene mostra un diverso livello di espressione tra le code nelle due condizioni, indicando la possibilità di una regolazione particolare a livello di trascrizione. In particolare l'allineamento visto nel capitolo dei risultati (Fig. 34) ha evidenziato una buona similitudine tra le sequenze di Li-Ac-24 e Li-Ac-25 le quali, quindi, potrebbero essere regolate in modo simile. Li-Ac-35 invece presenta una sequenza piÙ corta e differisce abbastanza rispetto alle altre due. Andando ad esaminare inoltre la loro posizione sull'albero filogenetico visto nell'introduzione (Fig. 14) si può constatare che le prime due proteine appartengono allo stesso sotto-gruppo (Dalla Valle *et al.*, 2010), mentre Li-Ac-35 fa parte invece di un altro dei rami principali (Dalla Valle *et al.*, 2010). Nonostante la similitudine di sequenza tra le prime due beta-proteine esaminate, 24 e 25, negli esperimenti di *Real Time PCR* (Fig. 33) si nota che Li-Ac-24 presenta una minor differenza di espressione tra coda normale e in rigenerazione rispetto a Li-Ac-25. Esaminando i risultati dell'analisi del promotore per questi due geni emerge che i fattori di trascrizione rinvenuti tramite analisi bioinformatica sono diversi e questo potrebbe essere uno dei motivi per cui i due geni subiscono una diversa regolazione, a livello della trascrizione. Tutti i dati finora rilevati possono dunque essere molto importanti per cercare di spiegare i diversi livelli di espressione evidenziati dalle tre proteine nei tessuti della coda normale rispetto alla coda in rigenerazione.

In conclusione, i risultati riportati nell'ambito della presente tesi indicano che le variazioni di particolari alfa-cheratine e beta-proteine sono relative ai tempi e agli strati successivi della rigenerazione della complessa epidermide delle lucertole. A partire da queste informazioni si potranno studiare successivamente la peculiare localizzazione tissutale e le caratteristiche chimico-fisiche specifiche delle proteine in questione. Si può ritenere che il presente studio molecolare abbia apportato un piccolo ma nuovo

contribuito alla comprensione dei meccanismi di corneificazione dell'epidermide nelle lucertole. Inoltre, i risultati conseguiti confermano studi precedenti secondo i quali l'epidermide delle squame dei Lepidosauri non presenta alternanza nella produzione di alfa-cheratine e beta-proteine, ma è invece il caratteristico accumulo nel tempo di specifiche citocheratine e beta-proteine associate a determinare la formazione di strati indicati come alfa e beta (Alibardi, 2012a,b,c,d; Alibardi *et al.*, 2012).

### **43. Analisi del promotore genico**

Lo studio del promotore genico è in realtà un tipo di studio molto articolato e complesso e richiede tempi di lavoro molto lunghi. Di fondamentale importanza è un primo approccio di tipo bioinformatico, il quale fornisce un'indicazione essenziale su quali possano essere i possibili siti di *binding* per fattori di trascrizione. In particolare la preliminare analisi bioinformatica che è stata condotta ha evidenziato la presenza di quattro fattori di trascrizione che si trovano regolarmente nelle regioni regolatrici delle 40 KAbetaPs: Nkx2-5, praticamente sempre presente, Evi-1, AP-1 e c-Rel che rispettivamente appaiono in un numero molto alto di regioni promotoriali. Questi potrebbero essere i fattori di trascrizione responsabili del mantenimento di un livello basale della trascrizione nell'epidermide e in tutte le tipologie di annessi cutanei.

Dati di letteratura relativi a questi elementi proteici in relazione ai processi di cheratinizzazione si riferiscono quasi sempre a ricerche condotte su Mammiferi, topo o uomo. Purtroppo molto poco si conosce riguardo ai Rettili.

Il fattore di trascrizione Nkx2-5 era stato in precedenza designato come una proteina specifica del cuore (Csx) appartenente alla famiglia genica dei fattori di trascrizione nucleari Nkx2 contenenti un omeodominio (Harvey, 1996). Nkx2-5 è l'omologo del fattore *tinman* in *Drosophila* ed è essenziale per la normale cardiomiogenesi; inoltre è stato associato alla leucemia T-linfoblastica acuta (Nagel *et al.*, 2003, 2007; Przybylski *et al.*, 2006). Solo di recente è stato suggerito un possibile ruolo di questa proteina nel cambiamento da uno stadio proliferativo a uno stadio differenziativo nei cheratinociti e nell'insorgenza di malattie della pelle dovute a differenziazioni anomale di tali cellule (Hwang *et al.*, 2009). In particolare è stato trovato che l'espressione di Nkx2-5 si differenzia a seconda delle condizioni della cute: aumenta in modo significativo nella psoriasi e nel carcinoma cellulare squamoso, ma diminuisce nella dermatite atopica. Tali scoperte indicano infatti che questo particolare fattore potrebbe giocare diversi ruoli nella patogenesi delle malattie del tegumento, quando questo presenta un malfunzionamento nel processo di differenziazione dei cheratinociti. E' molto probabile che Nkx2-5 eserciti un ruolo come repressore della trascrizione dei geni

correlati alla differenziazione precoce per quanto riguarda K5 e invece per K14 durante i processi di differenziazione terminale (Hwang *et al.*, 2009).

Il secondo fattore maggiormente presente è Evi-1 (*Ectopic viral integration site 1 encoded factor*). Esso è coinvolto in molteplici vie di segnalazione deputate alla corepressione e coattivazione dei geni del ciclo cellulare, ma non è nota finora nessuna sua particolare funzione riguardo alla regolazione della cheratinizzazione.

Un altro fattore di trascrizione ben presente nelle regioni promotoriali delle 40 KAbetaPs è AP-1 (*Activator Protein 1*). Esso rappresenta in realtà un gruppo eterogeneo di proteine che si associano a formare eterodimeri. I membri di questo gruppo appartengono alle famiglie Jun, Fos e ATF. Possono essere molte le combinazioni formanti i dimeri di proteine che costituiscono il fattore AP-1, date dall'unione di c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2. I singoli membri appartenenti alla famiglia AP-1 possiedono una funzione specifica nei processi cellulari, come la proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti, e hanno una specifica distribuzione nei diversi strati dell'epidermide. Inoltre AP-1 regola numerosi geni bersaglio. L'azione che tale fattore esercita su specifici geni dipende dal tipo di subunità che compone l'eterodimero stesso (Angel *et al.*, 2001).

Infine, l'ultimo fattore molto presente nelle 40 KAbetaPs è la proteina c-Rel. Tale fattore di trascrizione è un membro appartenente alla famiglia Rel/NFkB. Si tratta di un proto-oncogene e contiene un dominio di omologia Rel nella sua porzione N-terminale e due domini di transattivazione nella porzione C-terminale. c-Rel ha un ruolo importante nella sopravvivenza e proliferazione delle cellule B. Il gene REL è amplificato o mutato in diversi linfomi umani. In uno studio di Gugasyan e collaboratori (2004) viene dimostrato che c-Rel assieme a RelA controlla lo sviluppo dell'epidermide e degli annessi cutanei associati durante l'embriogenesi e regola l'omeostasi epidermica dopo la nascita.

Per cercare di spiegare la tessuto-specificità delle 40 KAbetaPs ritrovate nel genoma di *A. carolinensis* i TF trovati in ciascuna delle regioni regolatrici sono stati confrontati in vari modi: innanzitutto in base all'appartenenza delle beta-proteine a vari gruppi in cui è stato suddiviso l'albero filogenetico visto nella sezione dell'introduzione e dei risultati (Fig. 14 e 36 rispettivamente) e successivamente in base alla suddivisione di queste proteine secondo il loro contenuto in glicina e cisteina. Inoltre è stata analizzata anche la regione promotrice di 40 delle 140 KAbetaPs isolate in *Gallus gallus* e specificamente espresse in diverse tipologie di annessi cutanei allo scopo di rilevare eventuali omologie di espressione con l'*Anolis* per squame ed artigli.

Tutte queste analisi hanno evidenziato molti TF specifici potenzialmente coinvolti nella regolazione della trascrizione genica delle beta-proteine di *Anolis*:

- COUP-TF per il gruppo di KAbetaPs che va dalla 1 alla 4 e per il gruppo di beta-proteine ricche in glicina e cisteina. Non è presente nell'analisi del promotore condotta sulle KAbetaPs di *Gallus gallus*;
- Olf-1 per Li-Ac-3 e per il gruppo ricco in gly-cys. Da notare che questo particolare fattore è anche presente in modo specifico nelle KAbetaPs di squama di pollo;
- Elk-1 sempre specifico per la Li-Ac-3 è presente anche nelle regioni promotoriali delle beta-proteine presenti in penna e squama;
- GATA-3 specifico per il gruppo di KAbetaPs comprese tra la 20 e la 25 e presente nei gruppi di beta-proteine ricche in glicina e cisteina e ricche solamente in glicina. Questo fattore è anche specifico per le beta-proteine di penna di *G. gallus*;
- USF specifico per Li-Ac-25 e per il gruppo di proteine ricche in gly-cys. Questo fattore è anche specifico per le beta-proteine di penna del pollo;
- MyoD specifico per Li-Ac-25 e per il gruppo di proteine ricche in gly-cys. Questa proteina è stata trovata anche nelle KAbetaPs di artiglio, penna e squama;
- HFH-1 specifico per Li-Ac-25 e 14 si trova anche nei gruppi di proteine ricche in gly-cys e ricche solamente in gly. Esso è presente solo nelle KAbetaPs rinvenute nelle penne del pollo;
- STAT specifico per il gruppo di beta-proteine dalla 12 alla 19. E' presente nella regione del promotore di penna delle KAbetaPs di pollo;
- c-Myc specifico per Li-Ac-12 e 13 e per il gruppo di proteine ricche in gly-cys. Non è presente nelle regioni del promotore analizzate per *G. gallus*;
- COMP1 specifico per Li-Ac-19 e per il gruppo di proteine ricche in gly-cys. Non è presente nelle regioni del promotore analizzate per *G. gallus*;
- HNF-3beta specifico per Li-Ac-14 e per il gruppo di KAbetaPs ricche solamente in glicina. E' presente nelle regioni promotoriali delle beta-proteine di penna e squama di pollo;
- NF-E2 specifico per Li-Ac-14 e per il gruppo di KAbetaPs ricche solamente in glicina. E' presente nel promotore di KAbetaPs di penna del pollo.

Dai dati di letteratura è noto che la proliferazione e differenziazione dei cheratinociti è regolata da molteplici vie di segnalazioni cellulari come la via Wnt/beta-catenina (Huelsenken *et al.*, 2001) e da numerosi fattori di trascrizione come i membri della famiglia NFkB (Werner e Samola, 2011) e c-Myc (Arnold e Watt, 2001). Quest'ultimo è una onco-proteina coinvolta sia nella regolazione della progressione del ciclo

cellulare sia nel controllo della crescita (Elend e Eilers, 1999) ed è uno tra i pochi geni conosciuti essere il bersaglio della cascata di segnalazione Wnt/beta-catenina (He *et al.*, 1998; Shtutman *et al.*, 1999). In particolare alcuni studi hanno evidenziato che l'espressione di c-Myc negli strati epidermici soprabasali di topi transgenici inducevano iperproliferazione e cambiamenti neoplastici (Waikel *et al.*, 1999; Pelengaris *et al.*, 1999).

Anche i fattori di trascrizione COUP-TF, MyoD, HFH-1 (o FOXJ1), Nkx2-5 e NF-kB sono coinvolti nella via di segnalazione Wnt/beta-catenina. Ma finora non ci sono studi che riguardino una loro particolare funzione nella regolazione della proliferazione e differenziazione dei cheratinociti.

Per quanto concerne GATA-3, esso è ugualmente coinvolto nella cascata del segnale della beta-catenina (Grote *et al.*, 2008). In particolare uno studio condotto da Kurek e collaboratori (2007) ha messo in evidenza che questo fattore di trascrizione è coinvolto nella differenziazione dell'epidermide e del bulbo pilifero tramite la via di segnalazione Wnt/beta-catenina. GATA-3 è un fattore di trascrizione con il dominio di legame al DNA conformato a dita di zinco ed è essenziale per il corretto sviluppo di vari tessuti ed organi (Pandolfi *et al.*, 1995).

STAT3, trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione di tipo 3, è attivato da diverse citochine e fattori di crescita, che si legano ai recettori tirosin chinasi o a recettori associati a recettori tirosin chinasi. Diversi studi hanno messo in luce che questo fattore di trascrizione regola la migrazione dei cheratinociti fino al raggiungimento della pelle ferita e svolge un ruolo importante nell'insorgenza della psoriasi (Sano *et al.*, 1999, 2005). Inoltre uno studio condotto da Hao e collaboratori (2006) ha identificato STAT3 come uno dei bersagli del *pathway* Wnt/beta-catenina. Anche i fattori di trascrizione AP-1 (Angel *et al.*, 2001; Yates e Rayner 2002) e c-Myc (Tsuboi *et al.*, 1990; Waikel *et al.*, 2001; Zanet *et al.*, 2005) con il suo partner Max svolgono un ruolo chiave nella regolazione della ripitelizzazione delle ferite.

Quindi da questi e molti altri studi (Widelitz, 2008) è possibile notare che la via di segnalazione Wnt/beta-catenina svolge un ruolo chiave nel regolare la proliferazione, differenziazione e motilità delle cellule che compongono il tegumento durante la sua morfogenesi. Il ritrovamento di alcuni TF, coinvolti nella via di segnalazione della beta-catenina, nel promotore delle beta-proteine potrebbe suggerire una funzione di questa importante molecola nella regolazione della loro trascrizione.

Un così grande numero di fattori di trascrizione potenzialmente implicati nella regolazione della trascrizione richiede necessariamente una ricerca di tipo sperimentale che porterebbe ad identificare quali proteine siano effettivamente coinvolte. I fattori di trascrizione implicati nella via di segnalazione Wnt/beta-catenina potrebbero essere i

primi ad essere studiati data la loro importanza nella neogenesi della pelle e nella cicatrizzazione delle ferite. Inoltre recentissimi studi ultrastrutturali (dati non ancora pubblicati, Alibardi *et al.*, 2013) hanno evidenziato una massiccia presenza di beta-catenina negli strati alfa della coda in rigenerazione dell'*A. carolinensis*. Questo dato porta ad ipotizzare un possibile ruolo di tale proteina, in genere essenziale nello sviluppo, anche nella rigenerazione epidermica dell'*Anolis*, andando così a confermare l'utilità della coda in rigenerazione come buon modello di studio della differenziazione degli strati alfa e beta in quanto riprodurrebbe gli stadi dello sviluppo embrionale.

In conclusione si può dire che la presente ricerca bioinformatica ha aperto le porte a future indagini sperimentali sui possibili *pattern* di fattori di trascrizione attivati che regolano l'espressione genica delle beta-proteine tessuto-specifiche.





## Bibliografia

- Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 20(19):2413-23.
- Alexander NJ. (1970). Comparison of alpha- and beta-keratin in reptiles. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.*, 110: 153-65.
- Alibardi L. (1994a). Fine autoradiographical study on scale morphogenesis in the regenerating tail of lizards. *Histol Histopathol*; 9(1):119-34.
- Alibardi L. (1994b). Modifications of the dermis during scale regeneration in the lizard tail. *Histol Histopathol*; 9(4):733-45.
- Alibardi L. (1995a). Muscle differentiation and morphogenesis in the regenerating tail of lizards. *J Anat*; 186 ( Pt 1):143-51.
- Alibardi L. (1995b). Development of the axial cartilaginous skeleton in the regenerating tail of lizards. *Bull Assoc Anat (Nancy)*; 79(244):3-9.
- Alibardi L. (1995c). Electron microscopic analysis of the regenerating scales in lizard. *Boll. Zool.*, 62:109-120.
- Alibardi L. (1999). Differentiation of the epidermis of neck, tail and limbs in the embryo of the turtle *Emydura macquarii* (Gray, 1830). *Belg J Zool*; 129:391-404.
- Alibardi L, Thompson MB. (1999a). Epidermal differentiation during carapace and plastron formation in the embryonic turtle *Emydura macquarii*. *J Anat*, 194:531-545.
- Alibardi L, Thompson MB. (1999b). Epidermal differentiation in the developing scales of embryos of the Australian scincid lizard *Lampropholis guichenoti*. *J Morphol*; 241(2):139-52.
- Alibardi L. (2000a). Epidermal structure of normal and regenerating skin of the agamidae lizard *Physignatus lesuerii* (McCoy, 1878) with emphasis on the formation of the shedding layer. *Ann. Sci. Nat. – Zool. Biol. Anim.*, 21:27–36.
- Alibardi L. (2000b). Ultrastructural localization of alpha-keratins in the regenerating epidermis of the lizard *Podarcis muralis* during formation of the shedding layer. *Tiss. Cell*, 32:153–62.
- Alibardi L, Maurizii M, Taddei C. (2000). Immunocytochemical and electrophoretic distribution of cytokeratins in the regenerating epidermis of the lizard *Podarcis muralis*. *J. Morphol.*, 246:179-191.
- Alibardi L. (2001a). Keratohyalin-like granules in lizard epidermis: evidence from cytochemical, autoradiographic and microanalytic studies. *J Morphol* 248:64-79.
- Alibardi L. (2001b). Keratinization in the epidermis of amphibians and the lungfish: Comparison with amniote keratinization. *Tiss & Cell* 33:439–449.

- Alibardi L, Thompson MB. (2001). Fine structure of the developing epidermis in the embryo of the American alligator (*Alligator mississippiensis*, Crocodylia, Reptilia). *J. Anat.*, 198:265–282.
- Alibardi L, Maurizii M, Taddei C. (2001). Immunocytochemical and electrophoretic distribution of cytokeratins in the resting stage epidermis of the lizard *Podarcis sicula*. *J.Exp.Zool.*, 289:409-418.
- Alibardi L. (2002a). Immunoreactivity of alpha- and beta-layers in lizard epidermis. *Belg J Zool*;132:71–81.
- Alibardi L. (2002b). Loricrin-like immunoreactivity during keratinization in lizard epidermis. *J Morphol* ;254:132–8.
- Alibardi L. (2002c). Immunocytochemical observation on the cornification of soft and hard epidermis in the turtle *Chrysemis picta*. *Zoology* ;105:31-44
- Alibardi L, Sawyer RH. (2002). Immunocytochemical analysis of beta-keratins in the epidermis of chelonians, lepidosaurians, and archosaurians. *J Exp Zool*;293:27–38.
- Alibardi L. (2003a). Adaptation to the land: the skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes . *J. Exp. Zoolog.* 298B, 12-41.
- Alibardi L. (2003b). Immunocytochemistry and keratinization in the epidermis of crocodylians. *Zool Stud*;42:346–56.
- Alibardi L, Maderson PFA. (2003). Observations on the histochemistry and ultrastructure of the epidermis of the Tuatara, *Sphenodon punctatus* (Sphenodontida, Lepidosauri, Reptilis): a contribution to an understanding of the lepidosaurian epidermal generation and the evolutionary origin of the squamate shedding complex. *J. Morphol.* 256:111-133.
- Alibardi L, Toni M. (2004). Immuno-cross reactivity of transglutaminase and cornification marker proteins in the epidermis of vertebrates suggests common processes of soft cornification across species. *J Exp Zool B: Mol Dev Evol*; 302:526–49.
- Alibardi L, Spisni E, Frassanito AG, Toni M. (2004). Characterization of beta-keratins and associated proteins in adult and regenerating epidermis of lizards. *Tissue Cell*, 36:333-349.
- Alibardi L. (2005). Proliferation in the epidermis of chelonians and growth of the horny scutes. *J Morphol*, 265:52-69.
- Alibardi L, Toni M. (2005a). Distribution and characterization of proteins associated with cornification in the epidermis of gecko lizard. *Tissue Cell*, 37(6):423-433.
- Alibardi L, Toni M. (2005b). Immunolocalization and characterization of cornification proteins in snake epidermis. *Anat Rec A: Discov Mol Cell Evol Biol*, 282:138–46.

- Alibardi L, Toni M. (2005c). Wound keratins in the regenerating epidermis of lizard suggest that the wound reaction is similar in the tail and limb. *J Exp Zool*, 303(10):845-860.
- Alibardi L, Toni M. (2005d). Immunolocalization and characterization of beta-keratins in growing epidermis of scutes and claws of chelonians. *Tiss Cell* 38:53-63.
- Alibardi L. (2006a). Ultrastructural and immunohistochemical observations on the process of horny growth in chelonian shells. *Acta histochemica*, 108:149-162.
- Alibardi L. (2006b). Structural and immunocytochemical characterization of keratinization in vertebrate epidermis and epidermal derivatives. *Int Rev Cytol*, 253:177-259.
- Alibardi L, Toni M. (2006a). Skin structure and cornification proteins in the soft-shelled turtle *Trionyx spiniferus*. *Zoology (Jena)*, 109(3):182-195.
- Alibardi L, Toni M. (2006b). Cytochemical, biochemical and molecular aspects of the process of keratinization in the epidermis of reptilian scales. *Prog Histochem Cytochem*, 40:73-134.
- Alibardi L, Toni M. (2007). Characterization of keratins and associated proteins involved in the corneification of crocodilian epidermis. *Tissue Cell*; 39(5):311-23.
- Alibardi L, Toni M, Dalla Valle L. (2007). Hard cornification in reptilian epidermis occurs using different keratins and associated proteins than in mammalian epidermis. *Exp Dermatol*, 16:961–976.
- Alibardi L, Dalla Valle L, Nardi A, Toni M. (2009). Evolution of hard proteins in the sauropsid integument in relation to the cornification of skin derivatives in amniotes. *J Anat*, 214:560-586.
- Alibardi L. (2011). Observations on the ultrastructure and distribution of chromatophores in the skin of chelonians. *Acta zoologica*. doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00546.x
- Alibardi L. (2012a). Immunolocalization of keratin-associated beta-proteins in developing epidermis of lizard suggests that adhesive setae contain glycine-cysteine-rich proteins. *J Morphol*. 2012 Oct 9. doi: 10.1002/jmor.20081
- Alibardi L. (2012b). Immunolocalization of keratin-associated beta-proteins (beta-keratins) in scales of the reptiles *Sphenodon punctatus* indicates that different beta-proteins are present in beta- and alpha-layers. *Tissue Cell*;44(6):378-84.
- Alibardi L. (2012c). Immunolocalization of keratin-associated beta-proteins (beta-keratins) in the regenerating lizard epidermis indicates a new process for the differentiation of the epidermis in lepidosaurs. *J Morphol*;273(11):1272-1279.

- Alibardi L. (2012d). Cornification in Reptilian Epidermis Occurs through the Deposition of Keratin-Associated Beta-Proteins (Beta-Keratins) onto a Scaffold of Intermediate Filament Keratins. *J Morphol* 2012 Oct 29. doi: 10.1002/jmor.20081.
- Alibardi L, Segalla A, Dalla Valle L. (2012). Distribution of specific keratin-associated beta-proteins (beta-keratins) in the epidermis of the lizard *Anolis carolinensis* helps to clarify the process of cornification in lepidosaurians. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*;318(5):388-403.
- Arnold I, Watt FM. (2001). c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr. Biol.* 11, 558-568.
- Baden HP, Maderson PFA. (1970). Morphological and biophysical identification of fibrous proteins in the amniote epidermis. *J Exp Zool*, 174:225-232.
- Baden H, Sviokla S, Roth I. (1974). The structural protein of reptilian scales. *J Exp Zool*, 187:287-294.
- Banerjee T, Mittal A. (1978). Histochemistry of the epidermis of the chequered water snake *Natrix piscator* (Colubridae, Squamata). *J Zool (London)*; 185:415–35.
- Beaumont E, Cassier P. (1973). Anatomia comparata dei Vertebrati. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 117-151.
- Bellairs A d'A, Bryant SV. (1985). Autotomy and Regeneration in Reptiles. In *Biology of the Reptiles*, edited by Gans and Billet. Wiley, New York. 15:301-410
- Carver WE, Sawyer RH. (1987). Development and keratinization of the epidermis in the common lizard, *Anolis carolinensis*. *J Exp Zool*;243:435–43.
- Chekmenev DS, Haid C, Kel AE. (2005). P-Match: transcription factor binding site search by combining patterns and weight matrices. *Nucleic Acids Res*; 33(Web Server issue):W432-7.
- Hwang C, Jang S, Choi DK, Kim S, Lee JH, Lee Y, Kim CD, Lee JH. (2009). The Role of Nkx2.5 in Keratinocyte Differentiation. *Ann Dermatol*, 21 (4): 376-381
- Coulombe PA, Omary MB. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 14:110-122.
- Dalla Valle L, Toffolo V, Belvedere P, Alibardi L. (2005). Isolation of a mRNA encoding a glycine-proline-rich beta-keratin expressed in the regenerating epidermis of lizard. *Dev Dyn*, 234:934-947.
- Dalla Valle L, Nardi A, Toffolo V, Niero C, Toni M, Alibardi L. (2007a). Cloning and characterization of scale beta-keratins in the differentiating epidermis of geckoes show they are glycine-prolinerich proteins with a central motif homologous to avian beta-keratins. *Dev Dyn*, 236:374-388.

- Dalla Valle L, Nardi A, Belvedere P, Toni M, Alibardi L. (2007b). Beta-keratins of differentiating epidermis of snake show that they are glycine-proline-rich proteins with an avian-like gene organization. *Dev Dyn*, 236:1939-1953.
- Dalla Valle L, Nardi A, Gelmi C, Toni M, Emera D, Alibardi L. (2009a). Beta-keratins of the crocodilian epidermis: composition, structure, and phylogenetic relationships. *J Exp Zool B*, 312B: 42-57.
- Dalla Valle L, Nardi A, Toni M, Emera D, Alibardi L. (2009b). Beta-keratins of turtle shell are glycine-proline-tyrosine rich proteins similar to those of crocodilian and birds. *J Anat*, 214(2):284-300.
- Dalla Valle L, Nardi A, Bonazza G, Zuccal C, Emera D, Alibardi L. (2010). Forty keratin-associated beta-proteins (beta-keratins) form the hard layers of scales, claws, and adhesive pads in the green anole lizard *Anolis carolinensis*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 314(1):11-32.
- Dalla Valle L, Benato F, Rossi C, Alibardi L, Tschachler E, Eckhardt L. (2011). Deleterious mutations of a claw keratin in multiple taxa of reptiles. *J Mol Evol* 72:265-273.
- Eckhart L, Dalla Valle L, Jaeger K, Ballaun C, Szabo S, Nardi A, Buchberger M, Hermann M, Alibardi L, Tschachler E. (2008). Identification of reptilian genes encoding hair keratin-like proteins suggests a new scenario for the evolutionary origin of hair. *Proc Natl Acad Sci*, 105(47):18419-18423.
- Elend M, Eilers M. (1999). Cell growth: downstream of Myc – to grow or to cycle? *Curr. Biol.* 9, R936-R938.
- Fraser RD, MacRae TP, Rogers G. (1972). Keratins: Their Composition, Structure and Biosynthesis. *Springfield, IL, USA*.
- Fraser RD, MacRae TP. (1978). Current views on the keratin complex. In: Spearman, R.I.C., Riley P.A., editors. *Skin In vertebrates*. London: University College, 67-87.
- Fraser RD, Parry DA. (1996). The molecular structure of reptilian keratin. *Int J Biol Macromol*; 19:207-211.
- Fraser RD, Parry DA. (2008). Molecular packing in the feather keratin filament. *J Struct Biol*, 162:1-13.
- Fraser RDB, Parry DAD. (2009). The role of beta-sheets in the structure and assembly of keratins. *Biophys. Rev*, 1:27-35.
- Fraser RD, Parry DA. (2011). The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard beta-keratins. *J Struct Biol*, 173:391-405.
- Fuchs E, Marchuk D. (1983). Type I and type II keratins have evolved from lower eukaryotes to form the epidermal intermediate filaments in mammalian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5857-5861.

- Fuchs E, Tyner AL, Giudice GJ, Marchuk D, RayChaudhury A, Rosemberg M. (1987). The human keratin genes and their differential expression. *Curr Top Dev Biol* 22:5-34.
- Fuchs E, Weber K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:345-382.
- Fukuyama K, Epstein WL. (1968). Protein synthesis by autoradiography in the epidermis of different species. *Am J Anat*; 122:269-274.
- Giavini E, Menegola E. (2010). Manuale di anatomia comparata. EdiSES, 34-39
- Gillespie JM, Marshall RC, Woods EF. (1982). A comparison of lizard claw keratin proteins with those of avian beak and claw. *J. Mol. Evol*, 18:121-9.
- Goslar H. (1958). Beitrage zum Hautungsvorgang der Schlangen. *Acta Histochem*; 5:182-212.
- Goslar H. (1964). Beitrage zum Hautungsvorgang der Schlangen. 2. Mitteilung zur Fermenttopochemie der Keratogenese und Keratolyse am Modell der Peptilienhaut. *Acta Histochem*; 17:1-60.
- Greenwold MJ, Sawyer RH. (2010). Genomic organization and molecular phylogenies of the beta-keratin multigene family in the chicken (*Gallus gallus*) and zebra finch (*Taeniopygia guttata*): implications for feather evolution. *BMC Evol Biol*;10:148.
- Greenwold MJ, Sawyer RH. (2011). Linking the molecular evolution of avian beta-keratins to the evolution of feathers. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.*;316(8):609-16.
- Gregg K, Rogers G. (1986). Feather keratins: composition, structure and biogenesis. In *Biology of the Integument, Vertebrates* (eds Bereither-Hahn, J., Matoltsy, G., Sylvia-Richards, K.), pp. 666-694. *New York: Springer-Verlag*.
- Grote D, Boualia SK, Souabni A, Merkel C, Chi X, Costantini F, Carroll T, Bouchard M. (2008). Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genet.* 4(12):e1000316. doi: 10.1371/journal.pgen.1000316. Epub 2008 Dec 26.
- Gugasyan R, Voss A, Varigos G, Thomas T, Grumont RJ, Kaur P, Grigoriadis G, Gerondakis S. (2004). The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*;24(13):5733-45.
- Hallahan DL, Keiper-Hrynok NM, Shang TQ, Ganzke TS, Toni M, Dalla Valle L, Alibardi L. (2009). Analysis of gene expression in gecko digital adhesive pads indicates significant production of cysteine-and glycine-rich beta-keratins. *J Exp Zool B*, 312B:58-73.

- Hao J, Li TG, Qi X, Zhao DF, Zhao GQ. (2006). WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*; 290(1): 81-91.
- Hartl M, Bister K. (1995). Specific activation in jun-transformed avian fibroblasts of a gene (bkj) related to the avian beta-keratin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92(25): 11731–11735.
- Harvey RP. (1996). NK-2 Homeobox genes and heart development. *Dev Biol*; 178: 203-216.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Henrikson RC, Matoltsy AG. (1970). Turtle epidermis: electron microscopic observations on a granular component of malpighian cells. *Aust J Biol Sci*; 23:241-244
- Heinemeyer E, Wingender I, Reuter H, Hermjakob A, Kel O, Kel E, Ignatieva E, Ananko O, Podkolodnaya F, Kolpakov N, Podkolodny N e Kolchanov N. (1998). Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.*, 26: 364-370.
- Holbrook KA. ( 1989). Biologic structure and function: perspectives on morphologic approaches to the study of the granular layer keratinocyte. *J Invest Dermatol*; 92:84S–104S.
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. (2001). Beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105, 533-545.
- Inglis A, Gillespie JM, Roxburgh C, Whittaker L, Casagrande F. (1987). Sequence of a glycine-rich protein from lizard claw: unusual dilute acid and heptafluorobutyric acid cleavage. In *Protein, Structure and Function* (ed. L'italien J). New York: Plenum Press. 757–764.
- Irish F, Williams E, Seling E. (1988). Scanning electron microscopy of changes in epidermal structure occurring during the shedding cycle in squamate reptiles. *J Morphol*: 197:105-26.
- Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 24:789–800.
- Kel AE, Gösling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis OV, Wingender E. (2003). MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res*; 31(13):3576-9

- Kuchling G. (2005). Bifid tail regeneration in a turtle, *Emydura* sp. (testudines: Chelidae). *Chelon Cons Biol*, 4:935-937.
- Kurek D, Garinis GA, van Doorninck JH, van der Wees J, Grosveld FG. (2007). Transcriptome and phenotypic analysis reveals Gata3-dependent signalling pathways in murine hair follicles. *Development*;134(2):261-72. Epub 2006 Dec 6.
- Landmann L. (1979). Keratin formation and barrier mechanisms in the epidermis of *Natrix natrix* (Reptilia, Serpentes): an ultrastructural study. *J Morph* 162:93-126.
- Landmann L. (1986). The skin of Reptiles: epidermis and dermis In *Biology of the Integument, Vertebrate* (eds Bereither-Hahn J, Matoltsy G, Sylvia-Richards K), pp. 150-187. Berlin: Springer Verlag.
- Liem KF, Bemis WE, Walker WF, Grande L. (2002). Functional Anatomy of the Vertebrates. Ed. Harcourt, Inc. pp:88-95; 216-238.
- Lillywhite HB, Maderson PFA (1982). Skin structure and permeability. Gans C, Pough F, editors. In *Biology of the reptilia, physiology*. London: Academic Press. C12: 397-442.
- Losos JB, Jackman TR, Larson A, de Queiroz K, Rodríguez-Schettino L.(1998). Historical contingency and determinism in replicated adaptive radiations of island lizards. *Science*, 279: 2115-2118.
- Maderson PFA, Flaxman BA, Roth SI, Szabo G. (1972). Ultrastructural contribution to the identification of cell types in the lizard epidermal generation. *J Morphol*, 136,191-209.
- Maderson PFA. (1985). Some developmental problems of the reptilian integument. In: Gans C, Billet F, Maderson PFA, editors. *Biology of Reptilia*, vol 14B. New York: John Wiley & Sons, pp 525-598.
- Maderson PFA, Rabinowitz T, Tandler B, Alibardi L. (1998). Ultrastructural contribution to an understanding of the cellular mechanisms involved in lizard skin shedding with comments on the function and evolution of a unique lepidosaurian phenomenon. *J. Morphol.* 236,1-24
- Matoltsy AG, Huszar T. (1972). Keratinization of the reptilian epidermis: an ultrastructural study of the turtle skin. *J Ultrastruct Res* 38, 87-101.
- Matoltsy AG, Bednarz JA. (1975). Lamellar bodies of the turtle epidermis. *J Ultrastruct Res* 53, 128-132.
- Matoltsy AG. (1986). The skin of mammals. Epidermis. In: Matoltsy AG, Bereiter-Hahn J & Sylvia-Richards K (eds), *Biology of the Integument*, vol B, vertebrates. Springer Verlag: Berlin and New York, pp 255-271.



- Matoltsy AG. (1987). Cell and molecular biology of keratins. Concluding remarks and future directions. In *Topics of Developmental Biology* (RH Sawyer, Ed), Vol 22, pp 255-264. *Academic Press, New York, NY*.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16:404–405.
- Menon GK, Maderson PF, Drewes RC, Baptista LF, Price LF, Elias PM. (1996). Ultrastructural organization of avian stratum corneum lipids as the basis for facultative cutaneous waterproofing. *J Morphol*; 227(1):1-13.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31: 11-24.
- Nagel S, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. (2003). The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t(5;14)(q35.1;q32.2). *Cancer Res*;63:5329-5334.
- Nagel S, Scherr M, Kel A, Hornischer K, Crawford GE, Kaufmann M, Meyer C, Drexler HG, MacLeod RA. (2007). Activation of TLX3 and NKX2-5 in t(5;14)(q35;q32) T-cell acute lymphoblastic leukemia by remote 3'-BCL11B enhancers and coregulation by PU.1 and HMGA1. *Cancer Res*;67:1461-1471.
- O'Guin MW, Galvin S, Shermer A and Sun TT.(1987). Pattern of keratin expression define distinct pathways of epithelial development and differentiation. *Curr Top Dev Biol*, 22:97–125.
- Padoa E. (1998). *Manuale di anatomia comparata dei Vertebrati*. Ed. Feltrinelli, 90-97
- Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* 11, 40-44.
- Parakkal PF, Alexander NJ (1972). *Keratinization: A Survey of Vertebrate Epithelia*. *New York: Academic Press*.
- Pelengaris S, Littlewood T, Khan M, Elia G, Evan G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol. Cell* 3, 565-577.
- Pough FH, Heiser JB, McFarland WN. (1993). *Biologia evolutiva e comparata dei Vertebrati*. Ed. Casa Editrice Ambrosiana. Milano.
- Powel BC, Rogers GE. (1994). Differentiation in hard keratin tissues : Hair and related structures. In: Leigh I, Lane B, Watt F, Editors. *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge: *Cambridge University Press*. pp 401-436

- Presland RB, Whitbread LA, Rogers GE. (1989). Avian keratin genes. II. Chromosomal arrangement and close linkage of three gene families. *J Mol Biol*, 209: 561–576.
- Price RM. (1982). Dorsal scale microdermatoglyphics: ecological indicator or taxonomic tool. *J Herpetol*, 16: 294-306.
- Przybylski GK, Dik WA, Grabarczyk P, Wanzeck J, Chudobska P, Jankowski K, von Bergh A, van Dongen JJ, Schmidt CA, Langerak AW. (2006). The effect of a novel recombination between the homeobox gene NKX2-5 and the TRD locus in T-cell acute lymphoblastic leukemia on activation of the NKX2-5 gene. *Haematologica*;91:317-321.
- Resing KA, Dale BA (1991). Protein of keratohyalin. In: Goldsmith L, ed. *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*. New York and Oxford: *Oxford University Press*; pp. 148–167.
- Romer – Parsons. (1987). *Anatomia comparata dei Vertebrati*. Ed S.E.S. 163-183.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19:1572-1574.
- Roth SI, Jones WA. (1967). The ultrastructure and enzymatic activity of the boa constrictor (*Constrictor constrictor*) skin during the resting phase. *J Ultrastruct Res*; 18:304–23.
- Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. (1999). Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J*. 18:4657–68
- Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ, DiGiovanni J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med*. 11:43–49
- Sawyer RH, Glenn TC, French JO, Mays B, Shames RB, Barnes GL, Rhodes W, Ishikawa Y. (2000). The expression of beta-keratins in the epidermal appendages of reptiles and birds. *Amer. Zool.*, 40:530-539.
- Sawyer RH, Knapp LW. (2003). Avian skin development and the evolutionary origin of feathers. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 298: 57-72.
- Sawyer RH, Salvatore BA, Potylicki TT, French JO, Glenn TC, Knapp LW. (2003). Origin of feathers: feather beta-keratins are expressed in discrete epidermal cell populations of embryonic scutate scales. *J Exp Zool B: Mol Dev Evol*; 295:12–24.
- Sawyer RH, Glenn TC, French JO, Knapp LW. (2005). Developing antibodies to synthetic peptides based on comparative DNA sequencing of multigene families. *Methods Enzymol*; 395:636–52.

- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M., Pestell R, Ben Ze'ev A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5522-5527.
- Spearman R. (1966). The keratinization of epidermal scales, feathers and hairs. *Biol Rev*; 41:59–96.
- Spearman R. (1969). The epidermis of gopher tortoise *Testudo polyphemus* (Daudin). *Acta Zool* 1969; 50:1-9
- Spearman RIC, Riley PA. (1969). A comparison of the epidermis and pigment cells of the crocodile with those in two lizard species. *Zool J Linn Soc*; 48:453–66.
- Steinert PM, Jones JC, Goldman RD. (1984). Intermediate filaments. *J. Cell. Biol.*, 99:22s-27s.
- Steinert PM, Freedberg IM. (1991). Molecular and cellular biology of keratins. In: LA Goldsmith, Editor, *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*, Oxford University Press, New York, Oxford. 1:113–147.
- Steinert PM, Marekov LN, Fraser RD, Parry DA. (1993). Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *J Mol Biol*; 230(2):436-52.
- Steinert PM, Marekov LN. (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*; 270:17702–11.
- Steinert PM, Marekov LN. (1996). Assembly of the cornified cell envelope of terminally differentiating keratinocytes is initiated by the attachment of involucrin to desmoplakin at the site of the desmosome. *J Invest Dermatol*; 106:59.
- Steinert PM. (1998). Structural-mechanical integration of keratin intermediate filaments with cell peripheral structures in the cornified epidermal keratinocyte. *Biol. Bull.*, 194:367–368.
- Strachan T, Read AP. (2006). *Genetica umana molecolare*. Ed. UTET; pp. 261-297
- Sun TT, Eichner R, Nelson WG, Tseng SC, Weiss RA, Jarvinen M, Woodcock-Mitchell J. (1983). Keratins classes: Molecular marker for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol*, 81:109s-115s.
- Toni M, Dalla Valle L, Alibardi L. (2007). Hard (Beta-) keratins in the epidermis of reptiles: composition, sequence, and molecular organization. *J Proteome Res*, 6:3377-3392.
- Tsuboi K, Yamaoka S, Maki M, Ohshio G, Tobe T, Hatanaka M. (1990). Soluble factors including proteinases released from damaged cells may trigger the wound healing process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:1163–70

- Wang H, Parry DAD, Jones LN, Idler WW, Marekov LN, Steinert PM. (2000). In vitro assembly and structure of trichocyte keratin intermediate filaments: a novel role for stabilization by disulfide bonding. *J. Cell. Biol.*, 151:1459–1468.
- Waseem A, Alan Y, Dogan B, White KN, Leigh IM, Waseem NH. (1998). Isolation, sequence and expression of the gene encoding human keratin 13. *Gene*, 215: 69-279.
- Waseem A, Dogan B, Tidman N, Alam Y, Purkis P, Jackson S, Lalli A, Machesney M, Leigh IM. (1999). Keratin 15 expression in stratified epithelia: Downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 112:362-369.
- Waikel RL, Wang XJ, Roop DR. (1999). Targeted expression of c-Myc in the epidermis alters normal proliferation, differentiation and UVB induced apoptosis. *Oncogene* 18, 4870-4878.
- Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR. (2001). Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat. Genet.* 28:165–68
- Werlang PO, Brandelli A. (2005). Characterization of a novel feather degrading *Bacillus* sp. strain. *Appl Biochem Biotechnol*, 120(1):71-79.
- Werner YL. (1971). The ontogenic development of the vertebrae in some gekkonoid lizards. *J morph* 133, 41-92.
- Werner S, Smola H. (2001). Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* 11, 143-146.
- Widelitz RB. (2008). Wnt signaling in skin organogenesis. *Organogenesis*; 4(2): 123–133.
- Willard R, Packard GC, Packard MJ, Tucker JK. (2000). The role of the integument as a barrier penetration of ice into overwintering hatchlings of the painted turtle (*Chrysemys picta*). *J Morphol* 246:150–159.
- Williams EE. (1959). Gadow's arcualia and the development of tetrapode vertebrate. *Q. Rev. Biol.* 34, 1-32
- Williams EE. (1983). Ecomorphs, faunas, island size, and diverse end points in island radiations of *Anolis*. In R. B. Huey, E. R. Pianka and T. W. Schoener, eds. *Lizard Ecology: Studies of a Model Organism*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA; pp. 326-370.
- Winchester L and Bellairs A d'A. (1977). Aspect of of vertebral development in lizards and snakes. *J Zool Lond* 181, 495-525
- Wu P, Hou L, Plikus M, Hughes M, Schemet J, Suksaweang S, Widelitz R, Jiang TX, Chuong CM. (2004). Evo-Devo of amniote integuments and appendages. *Int. J. Dev. Biol.*, 48: 249–70. Wyld J.A., Brush A.H. (1979).
- Wyld JA, Brush AH. (1979). The molecular heterogeneity and diversity of reptilian keratins. *J Mol Evol*, 12:331-347.

- Wyld JA, Brush AH. (1983). Keratin diversity in the reptilian epidermis. *J. Exp. Zool.*, 225:387-396.
- Yates S, Rayner TE. 2002. Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization. *Wound Repair. Regen.* 10: 5–15
- Ye P, Wu X, Yan P, Amato G. (2010). Beta-keratins in crocodiles reveal amino acid homology with avian keratins. *Mol Biol Rep*, 37:1169-1174.
- Zanet J, Pibre S, Jacquet C, Ramirez A, de Alboran IM, Gandarillas A. (2005). Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J. Cell Sci.* 118: 1693–704
- Zangerl R. (1969). The turtle shell. In: Gans C. (ed.), *Biology of the Reptilia*, vol 1, Ch 6, *Accad Press, London-New York*, pp. 311-339.
- Zavanella T, in: Baldaccini NE, Capanna E, Franzoni MF, Giudice G, Mazzi V, Nardi I, Simonetta AM, Vellano C, Zaniolo G, Zavanella T. (1996). *Anatomia comparata. Ed. A. Delfino*, 122-130.
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD. (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 4: 892-897.