

LE METALLOTIONEINE NEI PROTOZOI

F. BOLDRIN, G. SANTOVITO, E. PICCINNI

ester.piccinni@unipd.it

Dip. di Biologia, Univ. degli Studi di Padova, Via Ugo Bassi 58/B, 35131 Padova, Italy

Gli ioni metallici giocano ruoli fondamentali in molte pathways metaboliche in un vasto range di phyla. Tuttavia, anche metalli essenziali come zinco e rame, possono avere effetti tossici quando presenti a livelli elevati. Si sono quindi evoluti meccanismi molecolari che regolano l'ingresso, la distribuzione e la detossificazione dei metalli pesanti all'interno dell'organismo. Le pathways di detossificazione si basano soprattutto sulla presenza delle metallothioneine (MT), un gruppo di proteine dal basso peso molecolare che possono legare i metalli di transizione dei gruppi Ib e IIb, formando dei clusters metallo-tiolati mediante i numerosi residui cisteinici di cui sono ricche. Una delle proprietà più importanti delle MT consiste nell'essere trascrizionalmente indotte dai metalli pesanti e da altri agenti stressori. Le MT sono ampiamente distribuite in natura e possiedono una vasta gamma di possibili funzioni associate all'assorbimento/escrezione dei metalli, l'omeostasi ed il metabolismo dei metalli, lo scavenging dei radicali liberi, la detossificazione dei metalli, l'apoptosi e la modulazione del bilanciamento redox intracellulare. Generalmente, nella maggior parte degli organismi sono presenti isoforme multiple, inoltre cellule diverse esprimono isoforme distinte con differenti livelli di espressione ed inducibilità. La presenza di isoforme multiple nello stesso organismo suggerisce che queste proteine possiedano funzioni specializzate, che dipendono dalle condizioni e dai tipi cellulari nei quali sono espresse.

Nel nostro laboratorio ci siamo inizialmente interessati allo studio dell'induzione della sintesi delle MT nei flagellati. Abbiamo isolato da *Euglena* ed *Ochromonas* molecole chelanti fisiologicamente analoghe, anche se strutturalmente differenti, alle tipiche MT per la capacità di legare i metalli. Inoltre abbiamo dimostrato che tali molecole incrementavano la tolleranza di *Euglena* e *Ochromonas* sia ai metalli non-essenziali che ad un eccesso di metalli essenziali (PICCINNI *et al.*, 1985; PICCINNI, 1989). In seguito abbiamo iniziato lo studio di molecole detossificanti nei ciliati, come *Stylonychia* ed *Oxytricha* (PICCINNI *et al.*, 1987, 1992).

Il nostro gruppo di ricerca è stato il primo ad avere identificato le MT in *Tetrahymena*. In *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* sono stati caratterizzati i geni delle isoforme MT-1 e MT-2, che sono espressi differenzialmente in seguito a trattamento rispettivamente con Cd e Cu (SANTOVITO *et al.*, 2001; BOLDRIN *et al.*, 2002). Sono stati identificati, sino ad ora, dodici geni di MT nel genere *Tetrahymena*, cinque dei quali in *T. thermophila*, ed un'isoforma in *Paramecium* (SANTOVITO *et al.*, 2007; GUTIERREZ *et al.*, 2009). Queste

proteine possiedono una sequenza insolitamente lunga, con ripetizioni interne prodotte da episodi di duplicazione genica. Inoltre le MT di *Tetrahymena* presentano una bassa correlazione filogenetica con le MT identificate in altri organismi (PICCINNI *et al.*, 1999; GUTIERREZ *et al.*, 2009).

Una caratteristica generale ed importante dei geni delle MT è la presenza di particolari elementi nei promotori che controllano la trascrizione genica in risposta ai metalli pesanti. Queste regioni, chiamate Metal Responsive Elements (MRE), sono molto conservate dagli invertebrati ai vertebrati. Relativamente poco è conosciuto riguardo ai promotori dei ciliati in generale, inoltre, l'estrema ricchezza in A e T del genoma di *Tetrahymena* rende molto difficile l'identificazione in silico di elementi regolatori. La comunità scientifica ha recentemente preso in notevole considerazione l'utilizzo di *T. thermophila* per la produzione di proteine ricombinanti a scopi biotecnologici e come tool per la ricerca di base, dal momento che nessun sistema (es. batteri, funghi, linee cellulari di insetto e di mammifero) è universalmente utilizzabile per l'espressione di geni eterologhi. In questa prospettiva, recentemente i promotori di *MTT1*, *MTT2* ed *MTT5* sono stati proposti come tools efficaci per l'espressione di proteine ricombinanti.

Nei geni delle MT di *Tetrahymena*, la presenza di putativi MRE è stata approfonditamente studiata mediante analisi in silico (BOLDRIN *et al.*, 2003, DIAZ *et al.*, 2007). Solo recentemente, un elemento che risponde al Cd, TtCdRE (*Tetrahymena thermophila* Cadmium-Response-Element), è stato identificato nelle regione 5'-fiancheggiante il gene *MTT5* (FORMIGARI *et al.*, in press).

I dati sulle MT di *Tetrahymena* evidenziano che lo studio di queste proteine è rilevante sia da un punto di vista evolutivo, sia in prospettiva biotecnologica e per la ricerca di base..