



**DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE
"INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY"**

**IDENTIFICAZIONE DI UNA PUTATIVA PROTEINA NEL VELENO DI
TOXONEURON NIGRICEPS**

Settore scientifico-disciplinare AGR/11

Coordinatore:

Prof. Francesco PENNACCHIO

Candidato:

Genoveffa Ciancio

Relatore:

Dott.ssa Patrizia FALABELLA

Correlatori:

Angharad Gatehouse

Carla Malva

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

INDICE

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1 GLI INSETTI PARASSITOIDI	7
1.1.1 <i>Classificazione dei parassitoidi</i>	9
1.2 IL RAPPORTO OSPITE-PARASSITOIDE	12
1.2.1 <i>Fattori di regolazione del rapporto ospite-parassitoide</i>	15
1.3 IL SISTEMA OSPITE - PARASSITOIDE OGGETTO DI STUDIO: <i>Heliothis virescens</i> - <i>Toxoneuron nigriceps</i>	21
1.3.1 <i>Interazioni ospite-parassitoide</i>	24
1.4 I VELENI DEGLI INSETTI PARASSITOIDI	28
1.5 ERA POST-GENOMICA: TRASCRITTOMICA, PROTEOMICA, MODIFICOMICA, VENOMICA.	32
1.5.1 <i>La trascrittomica</i>	32
1.5.2 <i>La proteomica</i>	35
1.5.3 <i>La modificomica</i>	37
1.5.4 <i>La venomica</i>	39
1.6 SCOPO DELLA TESI	42
BIBLIOGRAFIA	44
2.TECNICHE SPERIMENTALI	58
2.1 L'ELETTROFORESI	58
2.1.1 <i>Analisi elettroforetica SDS-PAGE</i>	60

2.1.2 <i>Analisi elettroforetica bidimensionale 2D-SDS-PAGE</i>	63
2.1.3 <i>Visualizzazione dei risultati</i>	66
2.2 LA DIGESTIONE TRIPTICA	67
2.3 LA SPETTROMETRIA DI MASSA	69
2.4 LE SORGENTI IONICHE IN PROTEOMICA	71
2.4.1 <i>Sorgente ESI</i>	73
2.5 L'ANALIZZATORE A RISONANZA IONICA CICLOTRONICA	76
2.5.1 <i>Orbita ionica ciclotronica: frequenza e raggio</i>	80
2.5.2 <i>Eccitazione e rivelazione del segnale ICR</i>	83
2.5.3 <i>Trasformata di Fourier</i>	86
2.6 RNA-SEQUENCING	89
BIBLIOGRAFIA	93
3.MATERIALI E METODI	98
3.1 MATERIALI UTILIZZATI	98
3.1.1 <i>Soluzioni</i>	98
3.2 ALLEVAMENTO INSETTI	99
3.2.1 <i>Heliothis virescens su dieta artificiale</i>	99
3.2.2 <i>Composizione della dieta artificiale</i>	101
3.2.3 <i>Toxoneuron nigriceps</i>	103
3.3 LA TRASCRITTOMICA	105
3.3.1 <i>Raccolta delle ghiandole del veleno ed estrazione del veleno</i>	105
3.4 ANALISI BIOINFORMATICA	107

3.4.1	<i>Allineamento e annotazione funzionale</i>	108
3.4.2	<i>Blast2GO</i>	111
3.4.3	<i>CLUSTAL-W</i>	112
3.4.4	<i>SignalP 4.0</i>	113
3.4.5	<i>mMass 5.5.0 e PFIA</i>	115
3.5	LA PROTEOMICA	116
3.5.1	<i>Analisi elettroforetica del veleno (SDS-PAGE)</i>	116
3.5.2	<i>Analisi elettroforetica bidimensionale del veleno (2D-E)</i>	117
3.5.2	<i>Isoelettrofocalizzazione (prima dimensione separativa)</i>	118
3.5.2	<i>SDS-PAGE (seconda dimensione separativa)</i>	119
3.5.3	<i>Digestione triptica in gel delle proteine risolte</i>	120
3.5.	<i>Analisi di spettrometria di massa del digerito triptico del veleno</i>	120
	BIBLIOGRAFIA	124
	4. RISULTATI E DISCUSSIONE	125
4.1	ANALISI DEL TRASCRITTOMA	127
4.2	ANALISI DEL PROTEOMA DI <i>TOXONEURON NIGRICEPS</i>	160
4.2.1	<i>Separazione elettroforetica</i>	160
4.2.2	<i>Analisi di massa ESI(+)-FT ICR</i>	163
4.2.3	<i>Analisi di massa tandem ESI(+)-FT ICR-MS/MS con CID</i>	165
4.3	IDENTIFICAZIONE DI UNA PUTATIVA PROTEINA PRESENTE NEL VELENO: L'EPARANASI	170
4.4	SVILUPPI FUTURI	173
	BIBLIOGRAFIA	175
	RINGRAZIAMENTI	178

CAPITOLO 1

RIASSUNTO

Gli insetti parassitoidi compiono il loro sviluppo larvale a spese di insetti ospiti.

Durante l'ovideposizione nell'ospite, la femmina del parassitoide inietta un veleno, al fine di regolarne la fisiologia e favorire lo sviluppo della propria prole.

Il presente progetto di dottorato ha avuto come scopo l'identificazione delle proteine del veleno dell'imenottero *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera, Braconidae), parassitoide endofago di stadi larvali di *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera, Noctuidae). La composizione biochimica e le attività tossiche di questo veleno risultano tutt'oggi completamente sconosciute.

L'intero trascrittoma della ghiandola del veleno di *Toxoneuron nigriceps* è stato sequenziato e analizzato mediante strumenti bioinformatici. Tale analisi ha evidenziato un'ampia varietà in termini di composizione proteica del veleno.

Il lavoro sperimentale è stato suddiviso in due fasi: nella prima, denominata "bioinformatica", si è analizzato, mediante tools bioinformatici, il trascrittoma *de novo* delle ghiandole del veleno, realizzato ed assemblato con l'impiego della tecnologia 'RNA-Sequencing' (RNA-Seq). Nella seconda fase, denominata "analitica", il veleno è stato dapprima quantificato e successivamente sottoposto ad uno stadio di separazione mediante elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE) e bidimensionale (2D-PAGE). Gli spot sono stati escissi e sottoposti, nella fase identificativa, ad analisi di

spettrometria di massa ESI MS-MS previa digestione con tripsina. Le analisi effettuate hanno permesso di identificare inequivocabilmente una proteina denominata "Heparanase". Si tratta di un'endoglicosidasi che taglia l'eparan solfato (HS) e partecipa quindi alla degradazione e al rimodellamento della matrice extracellulare. Molte eparanasi sono coinvolte nel miglioramento dell'Akt signaling, nella migrazione cellulare mediata dal fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) e dalla chinasi p38, e nella sovraregolazione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), proteine presenti nei veleni degli Imenotteri studiati.

INTRODUZIONE

Le complesse reti alimentari dei diversi ecosistemi sono caratterizzate dalla presenza di numerose specie d'insetti che, come consumatori primari e secondari, giocano un ruolo rilevante nel mantenimento dei delicati equilibri che regolano l'esistenza di ogni ecosistema.

Nel rapporto con l'uomo e le sue attività, gli insetti rappresentano quasi sempre un problema enorme; come consumatori primari, essi sono infatti responsabili di gravi danni alle coltivazioni. Molte specie sono parassite di piante o di animali, compreso l'uomo, e trasmettono microrganismi responsabili di gravi malattie infettive che hanno un impatto enorme sul benessere delle popolazioni delle zone in cui sono endemiche.

Il controllo demografico degli insetti è di fondamentale importanza per la salvaguardia dell'ecosistema e la qualità dei prodotti alimentari, ed è per questo, sempre maggiore, l'interesse nei confronti dell'applicazione di tecniche di controllo degli insetti fitofagi o nocivi per la salute umana.

L'obiettivo è che gli interventi siano i più possibili selettivi e privi di effetti

collaterali dannosi per l'ambiente, per altri organismi e per l'uomo.

L'uso indiscriminato dei pesticidi di origine chimica comporta, infatti, pericolosi effetti collaterali e richiede costantemente la necessità di definire strategie alternative di intervento.

Dal secondo dopoguerra, con la nascita dell'industria chimica e la produzione d'insetticidi sintetici formulati in modo da esplicare la massima azione tossica, si è sviluppata l'idea di aver risolto definitivamente il problema riguardante gli insetti nocivi. Si è mirato all'eradicazione dei fitofagi impiegando insetticidi a largo spettro e strategie di lotta cautelative, ed effettuando trattamenti periodici dettati da fasi fenologiche delle colture senza valutare la presenza del fitofago, l'entità della popolazione o in generale l'effettivo rischio per la coltivazione e per l'entomofauna indifferente o utile.

Ciò ha prodotto innumerevoli effetti collaterali come l'induzione della resistenza dei fitofagi a numerosi insetticidi e l'alterazione degli equilibri biologici. Quest'ultima ha comportato la trasformazione di specie fitofaghe di secondaria importanza in specie dannose, la scomparsa o la riduzione di specie utili, la produzione di un considerevole inquinamento ambientale e di conseguenza un incremento delle spese aziendali e dei rischi per la salute della popolazione.

É stato necessario quindi un processo di razionalizzazione nell'uso dei mezzi chimici iniziato con l'applicazione della lotta guidata e l'introduzione del concetto di soglia d'intervento o economica, ossia il livello, espresso in termini di densità di popolazione del fitofago, in corrispondenza del quale il potenziale danno arrecato alla coltura è superiore al costo che si deve sostenere per eseguire il trattamento. Questo concetto si è evoluto con l'impiego della lotta integrata che ottimizza l'utilizzo di tutti i fattori e le

tecniche di controllo disponibili (mezzi chimici, fisici, agronomici, biologici, biotecnologici, ecc.) al fine di mantenere le popolazioni dei fitofagi al di sotto della soglia d'intervento.

Attualmente l'Unione Europea, con il Regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005, ha stabilito che è possibile utilizzare prodotti fitosanitari che abbiano un adeguato livello di efficacia e siano privi di effetti nocivi nei confronti dell'uomo e dell'ambiente. Si è stabilito inoltre il limite massimo di residuo (LMR), ossia il livello più alto di residuo per un pesticida legalmente consentito negli alimenti o nei mangimi. L'Unione europea impone inoltre di ridurre al minimo l'impatto globale dei pesticidi sulla salute e sull'ambiente razionalizzandone l'uso; per questo motivo nel 2006 la commissione europea ha proposto una strategia per migliorare le modalità di utilizzo dei pesticidi e favorire l'applicazione di programmi di lotta biologica ed integrata (Direzione generale per la Salute e i consumatori, Commissione Europea B-1049 Bruxelles, 2008).

Da ora e negli anni a venire sarà necessario razionalizzare l'uso degli insetticidi di sintesi chimica utilizzando strategie di controllo dei fitofagi che siano ecocompatibili.

La Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009, nella prospettiva della ormai necessaria implementazione e affermazione delle strategie di controllo integrato degli insetti dannosi (Integrated Pest Management, IPM) impone di realizzare un uso sostenibile dei pesticidi riducendone i rischi e gli impatti sulla salute umana e sull'ambiente e promuove l'applicazione di tecniche di lotta alternative a quella chimica.

Negli ultimi anni il concetto di lotta agli insetti dannosi ha subito un'inversione di marcia, grazie al rilevante sviluppo delle "biotecnologie entomologiche" che ogni giorno forniscono strumenti di studio ed applicazione, sempre più sofisticati. Per biotecnologie entomologiche si intendono "tutte quelle tecnologie che in fase di sviluppo e/o applicazione si basano su tecniche e conoscenze a livello molecolare di fisiologia, sviluppo, riproduzione e comportamento degli insetti e dei meccanismi che regolano le loro relazioni simbiotiche con altri organismi." (Pennacchio *et al.*, 2001).

Le biotecnologie entomologiche studiano quindi le interazioni tra insetti ed altri organismi loro antagonisti e contribuiscono all'individuazione di nuove molecole in grado di alterare lo sviluppo, l'accrescimento, la riproduzione ed il comportamento degli insetti.

Tali molecole sono potenzialmente sfruttabili per la produzione di *bioinsetticidi*, i quali agiscono contro i fitofagi salvaguardando l'ambiente e tutti gli organismi non target, compreso l'uomo.

L'impiego dei bioinsetticidi rappresenta un importante mezzo di lotta che, nel rispetto dell'ecosistema, funge da efficace deterrente contro i fitofagi. Per il raggiungimento di questo obiettivo è stato inevitabilmente necessario un lavoro integrato tra varie professionalità tra cui biologi, entomologi e chimici, al fine di comprendere l'etologia, la fisiologia e la biologia degli insetti e delle loro interazioni con altri organismi; tutto ciò ha consentito di individuare nuovi geni, molecole bioattive e meccanismi implicati.

In particolar modo, lo studio della fisiologia degli insetti ha permesso l'identificazione di una serie di molecole fondamentali per la regolazione della crescita, dello sviluppo fino allo stadio adulto e infine della riproduzione. Tra queste molecole sono inclusi gli ormoni, una serie di peptidi ad azione ormonale ma anche i neuropeptidi in grado di regolare la

produzione dei primi (Beckage, 2000; Predel & Eckert, 2000; Gade & Hoffman, 2005). Sono state ipotizzate interessanti strategie di utilizzo di queste molecole e di molecole in grado di mimarne l'azione, comunemente denominate IGRs (Insect Growth Regulators), come pesticidi ad alta specificità e basso impatto ambientale (Stall, 1982).

L'approfondimento relativo alle interazioni tra diverse specie animali inoltre ha consentito di chiarire l'azione di organismi patogeni degli insetti come batteri, virus, miceti e protozoi all'interno di un meccanismo che si esplica mediante il rilascio di tossine, rendendo l'insetto più facilmente sfruttabile come substrato nutritivo; tali molecole possono essere utilizzate per la produzione di bioinsetticidi. Sono già presenti in commercio fitofarmaci basati su alcune specie di batteri quali *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* e *Serratia entomophila* (Grimont & Grimont, 1978) (Tanada & Kaya, 1993; Flexner & Belnavis, 2000). In particolare, i bioinsetticidi ad oggi maggiormente sfruttati sono basati su un principio attivo (delta endotossina) derivato dal batterio *Bacillus thuringiensis* (Peferoen, 1997) (Mackenzie, 1998). Attualmente sono note anche molte specie di virus in grado di infettare gli insetti (Tanada & Kaya, 1993; Martignoni & Iwai, 1986). Tra queste, alcune appartenenti alla famiglia Baculoviridae sono attualmente utilizzate come agenti di controllo di lepidotteri ed Imenotteri dannosi in ambito forestale.

L'interazione biologica tra ospite e agente dannoso non si limita al regno animale e può manifestarsi anche tra membri appartenenti a regni differenti. E' il caso di piante che hanno sviluppato diverse strategie difensive efficaci contro i fitofagi, come prodotto di lunghi processi coevolutivi. Spesso, in seguito all'attacco di fitofagi, la produzione *de novo* e/o l'incremento del livello di molecole tossiche nei tessuti rende molte specie vegetali

inappetibili agli insetti; sono proprio tali molecole ad avere un potenziale come bioinsetticidi o come modelli utili per la produzione di analoghi di sintesi in grado di mimarne l'azione (Weinzierl, 2000).

Infine, un'interessante parte degli studi inerenti la fisiologia delle specie entomofaghe dannose riguarda l'ampia gamma di sostanze che sia parassitoidi che predatori hanno la capacità di produrre; tali composti hanno la specifica funzione di favorire lo sfruttamento degli insetti come fonte di nutrimento. Il più semplice gruppo di questi composti è costituito dai veleni e la loro attività è per lo più attribuibile a molecole di natura proteica, sia in forma di peptidi che di proteine, anche molto complesse.

La loro produzione è realizzata da diversi apparati; alcuni veleni hanno la funzione di immobilizzare le prede, altri di facilitarne l'assimilazione favorendone ad esempio la digestione extraorale (Cohen, 1995). Altri invece hanno la funzione di fronteggiare le numerose strategie difensive sviluppate dalle proprie prede e dai propri ospiti, strategie che possono essere sia esterne, legate cioè alle caratteristiche fisiche e comportamentali della preda o dell'ospite, sia interne, come la produzione di tossine, la coagulazione dell'emolinfa e la risposta del sistema immunitario dell'ospite (Vinson, 1990; Dahlman & Vinson, 1993; Strand & Pech, 1995).

1.1 GLI INSETTI PARASSITOIDI

Gli insetti parassitoidi presentano caratteristiche comuni sia ai parassiti in senso stretto che ai predatori.

Durante lo sviluppo larvale mostrano forme di adattamento che li rendono simili per complessità e integrazioni fisiologiche ai veri parassiti, ma in

seguito agiscono come i predatori determinando, con il completamento del loro sviluppo giovanile, la morte della propria vittima.

I parassiti in senso stretto, infatti, compiono il loro ciclo vitale a spese di uno o più ospiti senza determinarne la morte. I parassitoidi invece, nella quasi totalità dei casi conosciuti, dopo aver completato lo sviluppo giovanile determinano la morte della propria vittima (Doutt, 1964).

Un insetto parassitoide è un organismo che vive libero da adulto, ma che mostra lo sviluppo degli stadi giovanili a carico di altri insetti.

La femmina seleziona l'ospite dal quale la propria progenie dovrà prelevare tutti i nutrienti necessari e lo utilizza per l'ovideposizione; gli stadi giovanili del parassitoide, infatti, molto spesso non hanno la possibilità di muoversi o cercare le proprie risorse nutritive autonomamente.

Il parassitoide solitamente sceglie un ospite appartenente alla stessa classe tassonomica con dimensioni simili a quelle proprie; inoltre non cambia ospite fino alla fine del ciclo vitale.

La specializzazione al parassitoidismo è strettamente associata all'evoluzione dell'olometabolia; il parassitoidismo, infatti, si riscontra solo in ordini di insetti olometaboli.

In particolare, al solo ordine Hymenoptera appartiene l'80% del totale delle specie caratterizzate da questa strategia riproduttiva (Quicke, 1997).

Negli Imenotteri, l'evoluzione del parassitoidismo sembra essere un carattere ancestrale comune agli Apocrita e anche ai Symphita (Orussoidea) (Pennacchio & Strand, 2006). Infatti, sono presenti parassitoidi in varie famiglie di Imenotteri apocriti, appartenenti soprattutto alle superfamiglie Ichneumonoidea (Ichneumonidae, Braconidae) e Chalcidoidea (Leucospididae, Chalcididae, Torymidae, Ormydae, Eurytomidae, Pteromalidae, Eupelmidae, Encyrtidae, Eulophidae, Aphelinidae,

Trychogrammatidae, etc.), ma anche tra i Proctotrupoidea, Platygastroidea, Cinipoidea, Stephanoidea, Magalyroidea, Trigonalioidea, Aculeata, Evanioidea, Ceraphronoidea, Chrysidoidea.

Tra i Symphita, rinveniamo parassitoidi nella famiglia Orussidae (Quicke, 1997; Gauld & Bolton, 1988; Pennacchio & Strand, 2006).

Anche i Ditteri annoverano un alto numero di specie di parassitoidi, appartenenti alle famiglie Cecydomiidae, Acroceridae, Bombyliidae, Phoridae, Pipunculidae, Chloropidae, Sciomyzidae, Calliphoridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae, Tachinidae (Feener & Brown, 1997; Smith, 1989).

Sono presenti inoltre alcune specie di parassitoidi anche tra i Coleotteri, ad esempio in Meloidae, Rhipiphoridae, Carabidae, Staphilinidae (Read, 1962; Maus *et al.*, 1998; Luckmann & Assmann, 2005; Weber *et al.*, 2006), tra i Tricotteri (Wells, 2005) e tra i Lepidotteri, in specie appartenenti alla famiglia Epipyropidae, parassitoidi di Omotteri Fulgoroidei (Misra e Krishna, 2005).

L'ordine Strepsiptera è infine composto esclusivamente da parassitoidi con caratteristiche che li avvicinano ai parassiti veri (Kathirithamby, 1989).

Gli stadi larvali dei parassitoidi sono apodi e dipendono completamente dal loro ospite. Lo stadio dell'ospite attaccato è generalmente quello larvale-pupale, ma sono presenti numerosi esempi di parassitoidismo anche a danno di uova (Strand *et al.*, 1985; 1986) e di insetti adulti, come nel caso di molte specie di Ditteri appartenenti alla famiglia Tachinidae (Wood, 1987).

1.1.1 Classificazione dei parassitoidi

I parassitoidi vengono classificati in relazione:

- *All'ampiezza dello spettro di ospiti suscettibili al loro attacco.*

Vengono distinti in monofagi, oligofagi e polifagi.

- *Allo stadio vitale dell'ospite che viene attaccato e da cui sfarfalla l'adulto.*

Si individuano quindi gli oofagi, gli ovo-larvali, i larvali, i larva-pupali, i pupali e quelli che parassitizzano l'adulto;

- *Al numero di uova deposto dalla femmina nell'ospite.*

Li distinguiamo in solitari, se l'ospite è in grado di sostenere lo sviluppo di una sola larva, oppure gregari se in seguito ad una singola deposizione ad opera di una femmina, o a deposizioni successive, siano introdotte più uova all'interno di un solo ospite, in modo che questo possa consentire il raggiungimento dell'impupamento almeno di una certa parte di esse;

- *Alla modalità nutrizionale.*

Distinguiamo, indipendentemente dalla modalità di ovideposizione, gli ectoparassitoidi, che si nutrono dall'esterno del corpo dell'ospite, e gli endoparassitoidi, che si nutrono invece dall'interno del corpo dell'ospite (Askew, 1971; Godfray, 1994) .

Sono comunque possibili anche transizioni durante lo sviluppo larvale, dall'esterno all'interno dell'ospite (Gelman *et al.*, 2005) o viceversa (Linsley *et al.*, 1952).

- *Al tipo di ospite.*

Se l'ospite attaccato è un fitofago i parassitoidi sono detti rispettivamente parassitoidi primari; se è un altro parassitoide prendono il nome di iperparassitoidi (Askew, 1971; Godfray, 1994) .

Sono noti anche casi in cui un parassitoide può svilupparsi a spese di uno stadio della sua stessa specie, come accade in *Encarsia pergandiella* (Hymenoptera: Aphelinidae) (Bogran & Heinz, 2002). In tal caso si parla di autoparassitoidismo.

- *Alle caratteristiche dell'interazione instaurata con l'ospite.*

Si distinguono: gli idiobionti ed i coinobionti.

Gli IDIOBIONTI uccidono rapidamente l'ospite utilizzandolo come substrato nutrizionale inerte e instaurando con esso uno scarso grado di integrazione funzionale; in tal caso, la parassitizzazione coincide con l'uccisione dell'ospite.

All'atto di parassitizzazione corrisponde generalmente l'iniezione da parte della femmina di un veleno che blocca lo sviluppo dell'ospite, di enzimi che facilitano la digestione dell'ospite da parte delle proprie larve e fattori atti alla sua preservazione quale risorsa nutritiva.

Sono generalmente idiobionti i parassitoidi di stadi sessili dell'ospite quali uova e pupe o in alcuni casi di stadi larvali protetti (che non vivono a contatto con l'ambiente esterno) che vengono generalmente paralizzati o bloccati nello sviluppo (Beard, 1978; Shaw, 1981; Rivers & Denlinger, 1994).

Sono noti sia ecto- che endoparassitoidi idiobionti.

Nei parassitoidi COINOBIONTI l'interazione con l'ospite risulta molto più complessa.

La parassitizzazione si verifica su stadi dell'ospite precoci e che inizialmente non sono in grado di supportare il completo sviluppo del parassitoide (Mackaeur & Sequeira, 1993) ma l'ospite non viene immediatamente ucciso.

Il parassitoide è infatti spesso in grado di regolare finemente la fisiologia dell'ospite in modo da non perturbarne inizialmente l'attività trofica e di accrescimento; allo stesso tempo ne veicola le vie metaboliche a proprio vantaggio. Il risultato di questa forma di interazione è un incremento del valore nutrizionale dell'ospite fino ad un massimo necessario e sufficiente a garantire il completamento dello sviluppo del parassitoide (Pennacchio &

Strand, 2006), al che fa seguito l'uccisione del primo ed il suo consumo indiscriminato.

I parassitoidi coinobionti, in base alla modalità di interazione con l'ospite, si distinguono in due categorie: “*conformers*” e “*regulators*” (Vinson & Iwantsch, 1980; Lawrence, 1986; Lawrence & Hagendron, 1986).

I *regulators* indirizzano a proprio vantaggio il programma di sviluppo dell'ospite attraverso vie ormonali o neurormonali, modificando anche i livelli di ormoni importanti quali gli ecdisteroidi e l'ormone giovanile (JH).

Diversamente, i *conformers* adattano il proprio sviluppo alle variazioni fisiologiche dell'ospite.

In genere, i coinobionti sono endoparassitoidi larvali, oolarvali o di ospiti adulti ma sono note anche specie di coinobionti ectoparassitoidi di stadi larvali non protetti, ad esempio *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) (Weaver *et al.*, 1997).

1.2 IL RAPPORTO OSPITE-PARASSITOIDE

Il parassitoide è in grado di raggiungere lo stadio immaginale solo dopo aver superato notevoli difficoltà quali: i meccanismi di difesa interna dell'ospite, la competizione con altri parassitoidi, la presenza di tossine dannose, l'incapacità dell'ospite di fornire nutrimento adeguato e la competizione con il sistema di regolazione ormonale dell'ospite.

L'insetto ospite risponde all'attacco del parassitoide con un meccanismo di difesa basato su un sistema immunitario innato (Schmidt *et al.*, 2001).

L'*incapsulamento* è una reazione cellulare operata dagli emociti che circondano e isolano ogni materiale estraneo che invada l'emocele (Vinson e Iwantsch, 1980) e rappresenta una tipica reazione immunitaria presente

nelle larve degli insetti. Si verifica quando le particelle introdotte all'interno del corpo dell'ospite sono troppo grandi per essere fagocitate dagli emociti e consiste nella stratificazione degli emociti intorno al corpo estraneo che verrà poi eliminato per asfissia e/o per intossicazione con melanina e composti citotossici nell'ambito della melanogenesi (Vinson & Iwantsch, 1980; Nappi *et al.*, 2000; Lemaitre & Hoffman, 2007). Alcuni parassitodi sistemano la propria progenie all'interno di tessuti (Salt, 1968) o di stadi dell'ospite come le uova (Strand, 1986) nei quali non si è sviluppato un sistema immunitario efficiente; così evadono in modo passivo i meccanismi interni di difesa dell'ospite.

Il *mimetismo molecolare*, caratteristico di altre specie, consiste nella presenza sulla superficie esterna del parassitoide di strutture molecolari che non vengono riconosciute come estranee o che non consentono l'adesione degli emociti dell'ospite (Asgari *et al.*, 1998; Davies & Vinson, 1986; Hayakawa & Yazaki, 1997). Talvolta la risposta immunitaria dell'ospite può essere vantaggiosa per il parassitoide. Nel caso di alcuni ditteri tachinidi questa risposta risulta addirittura vitale per il parassitoide in quanto il manicotto di cellule derivato dalla reazione immunitaria viene da questi utilizzato come tubo respiratorio (Wood, 1987). *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) iniettando veleno nel suo ospite causa la formazione di una capsula che viene poi usata per penetrarlo e svilupparsi durante i primi due stadi (Gelman *et al.*, 2005).

Un altro ostacolo da superare è la *competizione con altri parassitoidi per lo sfruttamento di un ospite*, sia appartenenti ad altre specie che alla propria. Tale competizione può avvenire secondo diverse modalità: in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) la femmina adulta del parassitoide causa direttamente la morte di eventuali uova di competitori tramite

devitalizzazione con l'ovopositore (Arakawa, 1987) o nutrendosene (Hardy & Blackburn, 1991; Mayhew, 1997).

Le femmine di alcuni parassitoidi iniettano nell'ospite sostanze tossiche o particolari fattori che ne alterano la fisiologia, inibendo lo sviluppo di altri parassitoidi (Vinson & Iwantch, 1980; Mackauer, 1991).

A volte, la larva del parassitoide compete direttamente con altre larve per lo sfruttamento dell'ospite, sia attraverso mezzi fisici come l'uso diretto delle mandibole che fisiologici (De Moraes *et al.*, 1999; Uka *et al.*, 2006).

Pare che alcune specie di parassitoidi traggano vantaggio dall'ovideporre in ospiti molto giovani, in quanto il primo parassitoide presente in un ospite sembra avere maggiori probabilità di svilupparsi (Vinson & Hegazi, 1998; Vinson & Mourad, 2000). Alcuni parassitoidi tipicamente larvali-pupali ovidepongono, infatti, nell'uovo dell'ospite, inibendo la possibilità di schiusa delle uova successivamente ovideposte da altre specie. *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) ovidepone nelle uova di varie specie di ditteri tefritidi frugivori e sfarfalla poi dai pupari di questi (Bautista & Harris, 1997; Wharton & Gilstrap, 1983). Pare che la sua larva possa addirittura schiudere nell'uovo dell'ospite (Moretti & Calvitti, 2003).

La soppressione fisiologica di uova competitive sembra poter avvenire anche per liberazione di enzimi citolitici secreti dalle larve al momento della schiusa (Spencer, 1926).

Perché un parassitoide possa sopravvivere all'interno di un ospite sono fondamentali quantità e qualità dei nutrienti da questo resi disponibili e presenza di livelli sufficienti di fattori di crescita accessori (Vinson & Iwantsch, 1980).

L'insufficienza nutrizionale può infatti causare morte, insuccesso nello sfarfallamento del parassitoide ed effetti a lungo termine, come riduzione di longevità e fecondità.

I parassitoidi hanno sviluppato la capacità di sfruttare ospiti completamente idonei; sono in grado infatti di attestarne lo stato e scegliere quelli di migliore qualità. Hanno inoltre messo in atto meccanismi di regolazione del sesso della propria prole poiché al sesso sono collegate differenti esigenze nutrizionali; molte specie di Imenotteri aplo-diploidi controllano la fecondazione delle proprie uova e quindi in questo modo il sesso della propria progenie (Flanders, 1956).

1.2.1 Fattori di regolazione del rapporto ospite-parassitoide

Abbiamo visto come alcuni parassitoidi si adeguano ai sistemi di regolazione fisiologica interna dell'ospite e ne sfruttano le risorse in quanto tali mentre altri invece, operano un'azione di regolazione dell'ospite a proprio vantaggio. Le interazioni tra ospite e parassitoide possono essere a volte molto complesse.

Molte specie di parassitoidi, in modo particolare i coinobionti, sono in grado di modificare le funzioni fisiologiche e biochimiche dell'ospite creando un ambiente favorevole allo sviluppo delle proprie larve.

La parassitizzazione determina infatti l'impossibilità per l'ospite di usufruire di preziose risorse nutritive che vengono invece utilizzate dalla larva del parassitoide per il completamento del proprio sviluppo.

L'accrescimento dell'ospite si arresta quando le sue dimensioni sono tali da poter garantire al parassitoide i nutrienti e le condizioni ambientali necessarie e sufficienti ad ultimare il ciclo vitale.

I parassitoidi utilizzano fattori di regolazione che possono avere diverse origini.

Il veleno può essere in alcuni casi l'unico responsabile della regolazione dell'ospite ma spesso altri fattori di origine materna, embrionale o larvale coadiuvano l'azione del veleno assumendo un ruolo determinante nello sviluppo del parassitoide.

- *Fattori di origine materna (veleno, secreti ovarici, polidnavirus)*

Le femmine di alcuni ectoparassitoidi, prima dell'ovideposizione, iniettano nell'ospite veleni prodotti da specifiche ghiandole annesse all'apparato riproduttore. Questi, da soli, sono in grado di svolgere innumerevoli funzioni. *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) produce un veleno a potente azione paralizzante (è sufficiente una parte su 200 milioni di emolinfa dell'ospite) attivo contro le larve di quasi tutte le specie di Lepidotteri (Drenth, 1974).

Nel genere *Euplectrus* (Hymenoptera: Eulophidae) il veleno non paralizza l'ospite ma ne arresta lo sviluppo, inibendo alcune fasi del processo di muta (apolisi e/o ecdisi a seconda di quando viene iniettato); induce inoltre il prematuro accumulo di proteine nell'emolinfa a vantaggio delle larve dei parassitoidi (Coudron & Brandt, 1996).

Nasonia vitripennis (Hymenoptera: Pteromalidae) iniettando il suo veleno nell'ospite *Sarcophaga bullata* (Diptera: Sarcophagidae) arresta lo sviluppo dell'ospite, deprime il sistema immunitario inibendone definitivamente il funzionamento, deprime il metabolismo respiratorio ed incrementa il livello di lipidi nell'emolinfa e nel corpo grasso (Rivers & Denlinger, 1994; 1995; Rivers *et al.*, 2006).

Un veleno ad azione paralizzante e capace di bloccare la sintesi proteica dell'ospite è prodotto da *Eupelmus orientalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) (Doury *et al.*, 1997). Gli stessi autori hanno dimostrato che tale veleno presenta attività fosfolipasica (negli adulti e nelle larve) mentre è stata rilevata attività ialuronidasica soltanto nel veleno iniettato dalle femmine adulte. Entrambe queste attività determinano lisi cellulare o tissutale e contribuiscono a rendere l'ospite più facilmente sfruttabile dalla larve del parassitoide in sviluppo.

Il braconide *Asobara tabida*, pur essendo un endoparassitoide interagisce con l'ospite esclusivamente tramite l'uso di un veleno ad azione paralizzante (Moreau *et al.*, 2002).

Le neanidi di I o II età dell'afide *Acyrtosiphon pisum*, esposte all'azione del veleno di *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) mostrano castrazione completa (Pennacchio *et al.*, 1995; Digilio *et al.*, 1998; 2000).

Negli endoparassitoidi di larve di lepidotteri appartenenti alle famiglie Braconidae ed Ichneumonidae, gli ovari delle femmine sono associati a Polidnavirus (PDVs). Il genoma di questi virus è integrato nel DNA genomico dell'imenottero che li ospita e la sua replicazione avviene esclusivamente nelle cellule dell'epitelio del calice ovario di quest'ultimo (Fleming & Summers, 1991). Dopo la replicazione si verifica la lisi delle cellule e la dispersione dei virioni nel lume dell'ovario. Con la parassitizzazione, insieme al veleno ed alle uova, anche i virioni vengono trasferiti nell'ospite (Webb, 1998; Webb & Strand, 2004). Il PDV infetta i tessuti dell'ospite (inclusi gli emociti circolanti) dove esprime specifici geni, apparentemente senza andare incontro a replicazione. L'espressione di questi geni ha come bersaglio diverse cellule e tessuti dell'ospite e determina l'alterazione del

sistema immunitario e di quello neuroendocrino con conseguenze sul metabolismo e lo sviluppo dell'ospite stesso.

Nel sistema *Campoletis sonorensis* – *Heliothis virescens* le ghiandole protoraciche dell'ospite vengono distrutte dai trascritti virali (Dover *et al.*, 1998).

Nei generi *Ascogaster* e *Chelonus* (parassitoidi oo-larvali chelonini) i trascritti virali determinano diminuzione dei livelli di ormoni coinvolti nella metamorfosi (JH e JHE) interrompendo lo sviluppo dell'ospite (Jones, 1996). In queste specie i PDVs risultano, insieme al veleno, coinvolti anche nella castrazione dell'ospite (Brown & Kainoh, 1992).

Nel genere *Cotesia*, i PDVs associati ai parassitoidi agiscono in corrispondenza dell'ultima età larvale, inducendola a protrarsi oltre il limite naturale. Questi mantengono alta la concentrazione dell'ormone giovanile e le larve ospiti pur superando significativamente le dimensioni usuali non riescono ad impuparsi. I parassitoidi, ultimato il loro sviluppo, sfarfallano direttamente dalle larve (Beckage *et al.*, 1994).

Per il sistema *Toxoneuron nigriceps* - *Heliothis virescens* è stato possibile, attraverso un modello dettagliato, descrivere le basi molecolari del blocco dello sviluppo indotto dalla parassitizzazione. I polidnavirus associati (TnBV) risultano in questo caso coinvolti nell'inattivazione delle ghiandole protoraciche delle larve ospiti (Pennacchio *et al.*, 1998a; 1998b; Falabella *et al.*, 2003).

- *Fattori embrionali (teratociti)*

I teratociti sono cellule di grosse dimensioni derivanti dalla dissociazione della membrana embrionale del parassitoide; si diffondono nell'emolinfa dell'ospite non appena la larva del parassitoide schiude (Dahlman & Vinson, 1993). I teratociti liberi non si dividono ma si accrescono in maniera notevole

e possono divenire poliploidi. Hanno la superficie ricoperta di microvilli, il che dimostra che possono assorbire nutrienti dall'emolinfa e secernere proteine, proprietà che si conservano anche nelle colture in vitro.

Le funzioni dei teratociti non sono ancora completamente conosciute ma è ormai nota la loro azione di regolazione della fisiologia e della biochimica dell'ospite al fine di creare un ambiente favorevole allo sviluppo del parassitoide.

I teratociti rappresentano anche una fonte diretta di cibo per la larva del parassitoide, soprattutto alla fine dello sviluppo (Dahlman & Vinson, 1993).

Producono, inoltre, proteine a funzione nutritiva e di accumulo, evidenziando un ruolo nutritivo indiretto.

Nel sistema *Cotesia kariyai* – *Pseudaletia separata* i teratociti favoriscono la capacità del parassitoide di nutrirsi a spese dell'ospite (Nakamatsu *et al.*, 2002) e durante le prime fasi della parassitizzazione, insieme a veleno e secrezioni ovariche, prevengono l'incapsulamento interferendo con l'azione degli emociti (Tanaka & Wago, 1990).

Nel sistema *Microplitis croceipes* – *H. virescens* si è visto che alcune alterazioni nella fisiologia dell'ospite, quali il ritardo nello sviluppo, la ridotta proliferazione del fat body e, da parte di questo, ridotte sintesi di proteine e rilascio di JHE, sono associate alla presenza di proteine secrete dai teratociti (Zhang *et al.*, 1992; 1997).

Anche nel sistema *T. nigriceps* – *H. virescens* i teratociti bloccano lo sviluppo dell'ospite, convertendo il 20-idrossiecdisone presente nell'emolinfa in metaboliti polari inattivi (Pennacchio *et al.*, 1994).

Nel sistema *A. ervi* - *A. pisum* i teratociti mobilizzano i nutrienti immagazzinati nei tessuti ed interagendo con i batteri simbiotici dell'ospite ne aumentano l'attività biosintetica di aminoacidi essenziali. Questi teratociti

rappresentano, inoltre, una nuova categoria di cellule che esprimono un'enzima extracellulare, che consenta l'invasione dei tessuti dell'ospite da parte della larva del parassitoide mediante l'attivazione del sistema plasminogeno - plasmina. Un'interazione tra i teratociti ed i batteriociti appare essenziale per ottenere un notevole incremento della biosintesi degli aminoacidi da parte dei batteri endosimbionti, in parte utilizzati dai teratociti per la produzione di due proteine inizialmente denominate come p15 e p45 in relazione al loro peso molecolare (Falabella *et al.*, 2007), successivamente denominate *Ae-ENO* e *Ae-FABP* (Pennacchio *et al.*, 1999)

I teratociti inoltre, contribuiscono alla castrazione dell'ospite mediante azione citolitica sugli embrioni già formati (Falabella *et al.*, 2000).

- *Fattori larvali (peptidi, ormoni)*

Lo stadio larvale di alcune specie di parassitoidi è in grado di alterare la fisiologia e la biochimica dell'ospite rilasciando, attraverso meccanismi diversi, determinati prodotti secretori. Le larve di alcuni parassitoidi rilasciano nell'emolinfa dell'ospite Juvénil Hormone ed ecdisteroidi al fine di modificarne i livelli a proprio vantaggio.

La larva di *C. congregata* produce attivamente ecdisteroidi in modo da mantenere il titolo di questi ormoni nell'ospite, all'interno di un range ben definito (200-400 pg/μl); in tal modo ne blocca lo sviluppo senza alterare quello proprio (Cole *et al.*, 2002).

Nel caso di *Chelonus inanitus*, le larve inducono invece la metamorfosi precoce del loro ospite (Pfister-Wilhelm & Lanzrein, 1996) e, insieme a veleno e secreti ovarici, contribuiscono alle modificazioni osservate nella fisiologia, biochimica e comportamento dell'ultimo stadio larvale dell'ospite. In *C. inanitus*, l'induzione della metamorfosi dell'ospite *Spodoptera littoralis*

è stata associata alla secrezione di una specifica proteina di circa 212 kDa (Hochuli *et al.*, 1999).

Negli ectoparassitoidi, non essendo presenti né PDVs né teratociti, le secrezioni larvali svolgono un ruolo di primaria importanza .

Le larve di *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) agiscono direttamente contro gli emociti dell'ospite, riducendone il numero ed alterandone la morfologia e la funzione (Richard & Edwards, 2002).

In *Eupelmus orientalis* (Hymenoptera: Eupelmidae) l'azione congiunta del veleno della femmina ovideponente e delle secrezioni larvali induce l'arresto dello sviluppo dell'ospite (Doury *et al.*, 1995; 1997).

1.3 IL SISTEMA OSPITE - PARASSITOIDE OGGETTO DI STUDIO: *HELIOTHIS VIRESCENS* - *TOXONEURON NIGRICEPS*

Heliothis virescens (Fabricius) (Lepidoptera:Noctuidae), detto anche bruco della gemma del tabacco, è una specie che si ritrova nell'est e nel sud-ovest degli Stati Uniti.

Le femmine normalmente producono da 300 a 500 uova, ma circa 1000-1500 uova per femmina vengono deposte da esemplari allevati su dieta artificiale (Fye & McAda, 1972). *H. virescens* presenta 5-7 stadi larvali a seconda delle condizioni ambientali. Le giovani larve hanno una colorazione giallo-verdastra e presentano il capo di colore marrone. Gli stadi più avanzati sono verdastri con bande laterali e dorsali biancastre che possono essere strette e incomplete; di solito è presente un'ampia banda laterale biancastra. Le crisalidi hanno dimensioni medie di 18 mm di lunghezza e 5 mm di larghezza. Sono lucide, di colore bruno-rossastro, e tendono al marrone scuro in prossimità dello sfarfallamento dell'adulto. La trasformazione della larva in crisalide avviene nel terreno.



Fig. 1 *Heliothis virescens*. Uova, stadi larvali, crisalide e adulto.

Gli adulti sono di colore marrone - verdastro; le ali anteriori mostrano tre bande scure delimitate da confini biancastri o color crema; solitamente le femmine sono più scure.

Heliothis virescens attacca soprattutto il tabacco ma può infestare anche altre colture come l'erba medica, il trifoglio, il cotone, il lino e la soia .

In caso di forti infestazioni può rappresentare un problema anche in floricoltura e frutticoltura (Capinera J.L., 2012).

Toxoneuron nigriceps (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) è un parassitoide endofago di *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Questo parassitoide, coinobionte regulator, depone l'uovo in tutti gli stadi larvali del suo ospite (Fig. 2); pur consentendogli di raggiungere lo stadio di larva matura, ne inibisce il successivo incrisalidamento (Pennacchio et al., 1993). Le larve mature dell'ospite bloccate nello sviluppo vengono completamente divorate dalla larva di *T. nigriceps*, che, raggiunta la maturità, fuoriesce all'esterno e si impupa in un bozzolletto sericeo. La larva parassitizzata di *H. virescens* mostra una complessa sindrome patologica caratterizzata da soppressione della risposta immunitaria ed alterazione dell'equilibrio

endocrino. In Figura 3 è riportato l'intero apparato riproduttore di una femmina di *T. nigriceps* in cui sono riconoscibili i calici ovarici (A) nei quali sono secrete le particelle del polydnavirus (*TnBV*) e le proteine ovariche e l'ovopositore (B), al quale sono connessi, anche se non visibili, le ghiandole ed il serbatoio del veleno. La Figura 4 mostra, con maggiore dettaglio, la ghiandola del veleno (A) ed il relativo serbatoio (B).



Fig. 2 Parassitizzazione di una larva di *H. virescens* da parte di *T. nigriceps*.

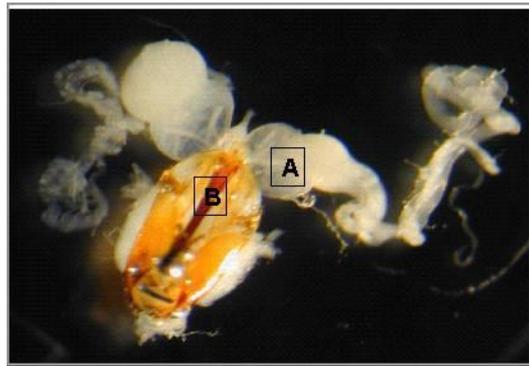


Fig. 3 Apparato riproduttore della femmina di *T. nigriceps*. A) calice ovarico; B) ovopositore.

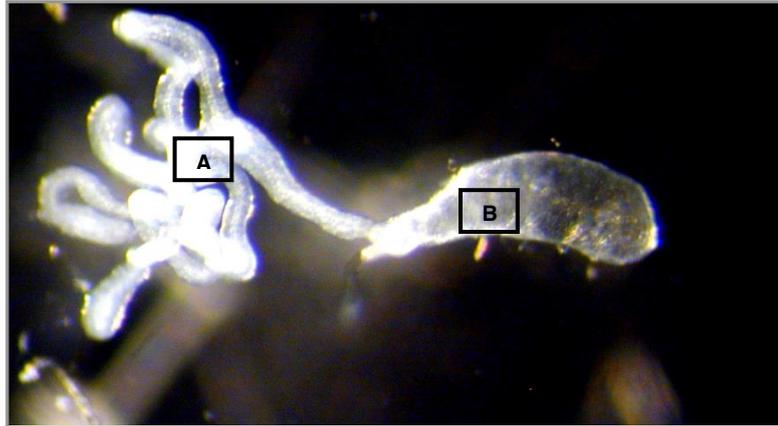


Fig. 4 A) ghiandola del veleno; B) serbatoio.

1.3.1 Interazioni ospite-parassitoide

Le alterazioni della fisiologia dell'ospite sono indotte da fattori parassitari di origine materna che il parassitoide inietta al momento dell'ovideposizione al fine di creare le condizioni ottimali per lo sviluppo dell'uovo fino allo stadio di adulto. I fattori di derivazione materna comprendono il veleno, prodotto dalle ghiandole del veleno associate all'apparato riproduttore della femmina del parassitoide, ed il fluido del calice ovarico, un secreto denso prodotto dalle cellule del calice ovarico e contenente le proteine ovariche e un virus simbiote appartenente al genere polydnavirus (famiglia polydnviridae) denominato *T. nigriceps* Bracovirus (*TnBV*).

Alla schiusa dell'uovo del parassitoide, completato il suo sviluppo embrionale, la membrana serosale o più precisamente i poli terminali della stessa (Fig. 5) si dissociano in singole cellule dette teratociti.

I teratociti costituiscono fattori parassitari di derivazione embrionale, che si accrescono senza dividersi divenendo altamente poliploidi e restando nell'emolinfa dell'ospite insieme alla larveta del parassitoide durante tutto il suo sviluppo (Pennacchio *et al.*, 1994).

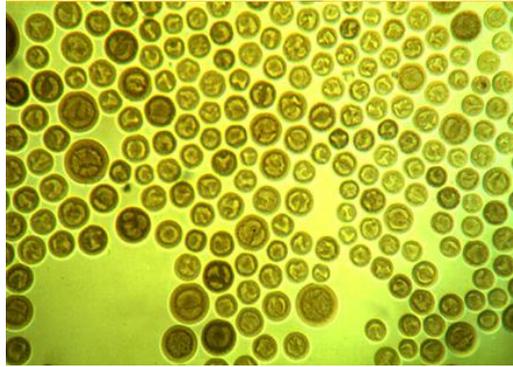


Fig. 5 Teratociti ottenuti dalla schiusa dei poli terminali della membrana serosale.

Affinché l'uovo deposto dal parassitoide completi il proprio sviluppo nella larva ospite fino allo stadio di adulto, è necessario *in primis* inattivare le difese immunitarie di quest'ultimo (Schmidt et al., 2001; Glatz et al., 2004).

Ancora poco è noto sui meccanismi fisiologici e molecolari coinvolti nella soppressione attiva del sistema immunitario di *H. virescens* in seguito alla parassitizzazione.

A livello fisiologico è stata dimostrata una riduzione del numero di emociti circolanti nell'emolinfa di larve parassitizzate assieme a forti alterazioni morfologiche e strutturali a carico degli emociti vitali, quali disaggregazione dei filamenti di actina e perdita della capacità di adesione (Ferrarese *et al.*, 2005). Un ruolo cruciale nell'immunosoppressione dell'ospite è svolto dal polydnavirus *TnBV*. Alcuni geni con una putativa funzione nella soppressione della risposta immunitaria sono stati infatti individuati sulla base dell'omologia con geni implicati nel sistema immunitario degli insetti stessi o di altri organismi.

Le alterazioni della fisiologia della larva ospite parassitizzata sono legate inoltre ad una forte modificazione degli equilibri endocrini della stessa, in cui si nota una notevole riduzione del titolo emolinfatico di ecdisteroidi e un'alterazione del classico profilo biosintetico osservato nelle larve sane (Tanaka & Vinson, 1991; Pennacchio *et al.*, 1992).

La conseguenza di tale alterazione è l'arresto dello sviluppo che si osserva nell'ultimo stadio larvale. I fattori parassitari di origine materna ed embrionale sono alla base di questa sindrome patologica di origine neuro-endocrina (Pennacchio *et al.*, 2001). Il polydnavirus determina l'inattivazione funzionale delle ghiandole protoraciche nelle larve ospiti mature, senza alterare la produzione dell'ormone protoracicotropico (PTTH), che continua ad essere normalmente rilasciato dal cerebro delle larve ospiti parassitizzate (Tanaka & Vinson, 1991).

I teratociti, invece, trasformano il 20-idrossiecdisone, ovvero l'ecdisone attivato dalle monoossigenasi del tessuto adiposo, in metaboliti polari inattivi (Pennacchio *et al.*, 2001).

Queste alterazioni ormonali determinano un rallentamento dello sviluppo e un'inibizione dell'incrisolidamento con conseguente arresto dello sviluppo della larva parassitizzata all'ultimo stadio.

Contemporaneamente, a livello cellulare, è stata osservata una riduzione nella fosforilazione delle proteine regolatrici del meccanismo di trasduzione del segnale del PTTH e un arresto trascrizionale della sintesi di proteine dell'ospite e dell'ecdisteroidogenesi (Pennacchio *et al.*, 1998).

A sostegno di queste osservazioni è stato dimostrato il coinvolgimento di una tirosin-fosfatasi codificata da *TnBV* (*TnBVPTP7*) nell'inattivazione delle ghiandole protoraciche di larve ospiti parassitizzate (Falabella *et al.*, 2006).

La marcata riduzione del titolo emolinfatico del 20-idrossiecdisone in larve mature di *H. virescens* parassitizzate da *T. nigriceps*, non solo inibisce l'incrisolidamento ma modifica profondamente anche la normale biosintesi e mobilizzazione delle proteine larvali prodotte in preparazione alla metamorfosi. Infatti, l'assenza del picco di 20-idrossiecdisone, che normalmente induce l'impupamento, determina il persistere della biosintesi

delle proteine di riserva e, contemporaneamente, l'inibizione del loro assorbimento e accumulo nei corpi grassi, dove, in condizioni normali, andrebbero a costituire le riserve proteiche per la fase pupale.

Questi processi, indotti dai fattori parassitari, evitano l'impoverimento nutrizionale dell'emolinfa dell'ospite, che diventa un substrato alimentare disponibile ed altamente energetico di cui si nutre la larva del parassitoide fino alla sua fuoriuscita quando raggiunge lo stadio di adulto.

La strategia di parassitizzazione di *H. virescens* da parte di *T. nigriceps* sfrutta gli sforzi metabolici di preparazione alla metamorfosi dell'ospite.

Al fine di utilizzare l'enorme potenziale biosintetico della larva nella fase pre-pupale, il parassitoide consente alla sua vittima di raggiungere l'ultimo stadio larvale, qualsiasi sia lo stadio in cui è avvenuta la parassitizzazione.

Al contrario del polydnavirus, il ruolo del veleno nel processo di regolazione dell'ospite è ancora debolmente esplorato, è stato testato solamente il suo impatto sulla difesa immunitaria dell'ospite, sia cellulare sia umorale.

È noto che nelle specie in cui sono presenti i polydnavirus, il veleno ha un effetto complementare all'azione più specifica del virus e può arrivare a modulare l'espressione genica dello stesso nei diversi tessuti dell'ospite (Zang *et al.*, 2004a; Zang *et al.*, 2004b; Asgari, 2006). Nel sistema *T. nigriceps* – *H. virescens* è stato osservato che il veleno esercita un notevole effetto di inibizione a carico dell'attività fenolossidasi presente nell'emolinfa dell'ospite (Ferrarese *et al.*, 2005).

L'identificazione delle componenti del veleno responsabili di tale inibizione consentirà di definire il meccanismo attraverso cui tale alterazione parassitaria si realizza.

1.4 I VELENI DEGLI INSETTI PARASSITOIDI

Alcune specie di artropodi predatori hanno sviluppato la capacità di produrre composti aventi la specifica funzione di favorire lo sfruttamento di altri insetti come fonte di nutrimento.

Il più semplice gruppo di questi composti è costituito da veleni, aventi la funzione di immobilizzare le prede o di facilitarne l'assimilazione, favorendone ad esempio la digestione extraorale (Cohen, 1995).

Questa caratteristica è diffusa nelle larve di alcune specie appartenenti agli ordini Coleoptera, Diptera, Heteroptera e Neuroptera e negli adulti dei ditteri Asilidi (Schmidt, 1982) mentre risulta rara tra quelle degli Imenotteri (Doury *et al.*, 1995; 1997).

Negli Imenotteri aculeati la produzione di veleno dipende invece da ghiandole specifiche associate al pungiglione; tale apparato costituisce un sistema utile sia nella predazione che nella difesa.

In molte specie di formiche, pur non essendo presente il pungiglione, il veleno viene comunque prodotto da ghiandole analoghe, accumulato e spruzzato all'occorrenza (Schoeters & Billen, 1998).

Questi veleni hanno in genere un ampio spettro d'azione e la loro attività è generalmente attribuibile a molecole di natura proteica sia in forma di peptidi che di proteine anche molto complesse. Nei veleni possono essere presenti anche bassi livelli di enzimi come fosfolipasi e ialuronidasi (Schmidt, 1982). Nei parassitoidi si è raggiunto il livello di specializzazione più spinto nella produzione di molecole attive contro gli ospiti ed in molti casi oltre alla capacità di produrre veleno si sono evolute specializzazioni che hanno messo a disposizione di alcune specie un vero e proprio arsenale di molecole biologicamente attive che, oltre all'immobilizzazione dell'ospite, possono

contribuire all'inattivazione del suo sistema immunitario, al dirottamento delle sue vie metaboliche per aumentarne la qualità quale substrato trofico per il parassitoide ed al condizionamento del suo sistema ormonale e neurormonale (Pennacchio *et al.*, 2001; Beckage & Gelman 2004). Gli Imenotteri endoparassitoidi, al momento dell'ovideposizione, iniettano molte sostanze all'interno del corpo dell'ospite allo scopo di favorire lo sviluppo della progenie, incluso il fluido velenoso.

Il veleno è sempre stato considerato un fluido tossico che provoca una morte improvvisa o la paralisi dell'ospite/preda ma di recente viene definito come una secrezione, rilasciata attraverso una ferita, che interferisce con i normali processi fisiologici dell'ospite facilitando la difesa o l'alimentazione dell'animale che lo produce.

Nel caso degli Imenotteri endoparassitoidi consiste in una complessa miscela di composti sia proteici che non proteici, coinvolti nella regolazione dell'ospite.

La modalità d'azione delle proteine del veleno degli Imenotteri parassitoidi dipende dalla loro strategia di vita.

Gli ectoparassiti incollano le uova all'esterno del corpo dell'ospite e, le larve che ne fuoriescono, si alimentano esternamente fino ad impuparsi. Ciò richiede l'immobilizzazione dell'ospite e di conseguenza il veleno causa una paralisi a lungo termine dell'ospite ed un arresto del suo sviluppo dopo la parassitizzazione (idiobionti). In alcuni casi la paralisi è transitoria ma l'arresto dello sviluppo dell'ospite è permanente.

Alcuni studi hanno dimostrato che il veleno degli ectoparassitoidi interferisce anche con il sistema immunitario degli insetti.

Gli endoparassitoidi ovidepongono invece all'interno della cavità emocelica dell'ospite e le loro larve crescono, permettendo all'ospite di proseguire nel

suo sviluppo (koinobionti).

In questo caso il veleno non causa paralisi ma è coinvolto nella regolazione del sistema immunitario dell'ospite, facilitando ad esempio l'ingresso di virus simbiotici o ritardando/arrestando lo sviluppo dell'ospite allo stadio larvale.

I veleni degli Imenotteri parassitoidi sono ricche fonti di biomolecole contenenti piccoli peptidi, neurotossine, amine ed enzimi dal peso molecolare medio-alto, coinvolti nella modificazione della fisiologia dell'ospite.

Simili alle proteine del veleno di altri animali velenosi, sono generalmente secretive, esistono nelle famiglie delle proteine, mostrano somiglianza con le proteine del corpo ed hanno una struttura molecolare stabile. In generale, la dimensione dei polipeptidi dei veleni negli Imenotteri parassitoidi è maggiore rispetto a quella delle comuni vespe sociali e predatrici; questi polipeptidi sono inoltre prevalentemente acidi in natura (Leluk *et al.*, 1989; Krishnan *et al.*, 1994; Jones, 1996; Parkinson & Weaver, 1999). L'analisi dei veleni degli Imenotteri parassitoidi ha dimostrato che i peptidi segnale non sono inusuali (Jones *et al.*, 1992; Moreau & Gullot, 2005).

I polipeptidi maggiormente rappresentati nei veleni degli Imenotteri parassitoidi sono enzimi, inibitori delle proteasi e fattori di paralisi.

Le proteine con un dominio enzimatico conservato costituiscono la componente principale del veleno, queste possono essere coinvolte nella regolazione dell'ospite o nel metabolismo delle ghiandole del veleno. I fattori paralizzanti sono per lo più presenti nel veleno degli Imenotteri ectoparassitoidi, questi ultimi infatti immobilizzano il loro ospite e ne causano la morte rapida (Quistad *et al.*, 1994). Anche negli endoparassitoidi non associati a polydnavirus (PDV) sono noti casi di paralisi letali (Parkinson *et al.*, 1999) o transitorie (Moreau *et al.*, 2002) degli ospiti indotte dal

veleno. Scarsi effetti di paralisi, così come effetti non letali, sono invece osservati in risposta all'iniezione di veleno da parte di Imenotteri associati a PDV (Asgari *et al.*, 2006) o dal veleno di specie che attaccano esclusivamente stadi pre-adulti e adulti di omotteri (Pennacchio & Strand, 2006).

Il veleno è iniettato nell'ospite al momento dell'ovideposizione e agisce principalmente sul sistema immunitario e sul sistema neuroendocrino del proprio ospite. A livello del sistema immunitario risultano inibite le difese dell'ospite, quali l'incapsulamento e la melanizzazione: infatti sono state isolate proteine come la P4 dal veleno di *L. bouhardi* o VPr3 isolata dal veleno di *P. hypochondriaca* (Labrosse *et al.*, 2005; Dani *et al.*, 2009), con dominio Rho-GAP che inibiscono l'adesione emocitaria e l'incapsulamento poiché danneggiano il citoscheletro, impedendo la polimerizzazione dei filamenti di actina (Bourne *et al.*, 1991). Proteine come Vn50, isolata da *C. rubecula*, invece, impediscono la melanizzazione inattivando la fenolossidasi, enzima responsabile dell'attivazione della cascata di segnali coinvolti in tale processo (Zhang *et al.*, 2004).

Un altro ruolo importante delle proteine del veleno è quello di rendere disponibili i nutrienti dell'ospite per lo sviluppo del parassitoide. Il veleno di *P. hypochondriaca* contiene numerose idrolasi, tra cui la fosfatasi acida che è associata alla liberazione di carboidrati nell'emolinfa dell'ospite o la lipasi che agisce a livello del fat body dell'ospite stimolando il rilascio dei nutrienti (Kroemer & Webb, 2004; Dani *et al.*, 2005; Nacamatsu *et al.*, 2007). La γ -glutamyltranspeptidasi invece è responsabile di una drastica riduzione dell'attività riproduttiva dell'ospite e stimola l'apoptosi delle cellule dei tessuti riproduttivi dell'ospite al fine di indirizzarne gli sforzi metabolici verso lo sviluppo della progenie del parassitoide (Falabella *et al.*, 2007).

A livello neuroendocrino, per lo più negli insetti parassitizzati da endoparassitoidi, si osservano alterati i titoli di alcuni ormoni coinvolti nello sviluppo, quali l'ecdisone e l'ormone giovanile (JH), pertanto gli insetti parassitizzati rimangono nello stadio di larva fino alla morte. Tuttavia gli effettivi pathways cellulari coinvolti nell'arresto dello sviluppo non sono ancora del tutto chiari.

1.5 ERA POST-GENOMICA: TRASCRIPTOMICA, PROTEOMICA, MODIFICOMICA, VENOMICA.

La post-genomica studia tutti quei processi che sono conseguenza delle sequenze genomiche, e quindi: l'insieme degli RNA messaggeri presenti in un sistema biologico in un particolare stato fisiologico (trascrittoma), il conseguente insieme di proteine (proteoma) e infine lo studio delle modificazioni post-traduzionali (modificomica).

1.5.1 La trascrittomica

La trascrittomica è una disciplina che studia l'intero corredo dei geni espressi che si trovano in una cellula o tessuto in un particolare insieme di circostanze. Il termine trascrittoma è definito come il set completo di trascritti in una cellula e la loro quantità ad uno specifico stadio di sviluppo e in precise condizioni fisiologiche (Wang *et al.*, 2009). La quantificazione del trascrittoma può essere utile per comprendere quali geni possano essere attivati nelle diverse fasi del ciclo cellulare o nello sviluppo di particolari condizioni. I principali obiettivi della trascrittomica sono:

- catalogare tutte le tipologie di trascritti inclusi gli mRNAs, gli RNAs non codificanti e i piccoli RNAs;

- determinare la struttura trascrizionale dei geni, cioè i loro siti di inizio, le estremità 5' e 3', i profili di splicing e altre modifiche post-trascrizionali;
- quantificare le variazioni dei livelli di espressione di ciascun trascritto durante lo sviluppo e/o in diverse condizioni.

Un interessante approccio della trascrittomica quantitativa si basa sull'analisi differenziale dell'espressione genica, ottenuta confrontando i profili trascrizionali di uno o più campioni. Ad esempio, informazioni sui trascritti di larve parassitizzate e larve sane consentono di rilevare quali geni sono vengono espressi in maniera significativamente diversa e quindi consentono di evidenziare differenze che la condizione di parassitizzazione comporta. La stessa metodica può inoltre essere applicata anche su un unico campione valutando, ad esempio, l'effetto della parassitizzazione nel tempo. L'analisi del trascrittoma può avvenire secondo due tecnologie: quelle basate su ibridazione e quelle, più recenti, basate su sequenziamento. L'ibridazione si basa sulla proprietà dei nucleotidi di appaiarsi con i loro complementari fissati su un supporto. Di questa categoria fanno parte i microarray, da anni largamente utilizzati per ottenere informazioni sull'espressione genica. Sono costituiti da un supporto solido a cui sono ancorate delle sonde di DNA, dette probe, in numero molto elevato per ogni gene e disposte in posizioni note. L'RNA estratto dalla cellula viene retrotrascritto, marcato con sostanze fluorescenti e ibridato con il microarray. L'intensità della fluorescenza è una misura di quante molecole hanno ibridato la probe, ovvero di quanto il gene associato alla probe è espresso nella cellula. Questa tecnica presenta numerosi limiti: la necessità di conoscere a priori le sequenze geniche per la progettazione delle probe e il limitato range dinamico (cioè il rapporto fra i livelli di massima e minima espressione genica misurabili), dovuto al rumore

di fondo e al fenomeno di saturazione del segnale. Per sequenziamento si intende invece l'identificazione della sequenza di un acido nucleico fornito in input alla strumentazione. Una tecnica recente per la misura del trascrittoma basata sul sequenziamento è l'RNA sequencing (RNA-seq) (Nagalakshmi *et al.*, 2008), basata sulle tecnologie di sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing). Il protocollo di un esperimento di RNA-seq varia in base alla tecnologia utilizzata ma è comunque possibile descriverne in linea generale i passaggi principali. I campioni di RNA sono estratti dalle cellule in analisi e retrotrascritti in DNA. Il DNA ottenuto viene sequenziato ad alto throughput per ottenere frammenti a sequenza nota, detti read, di lunghezza variabile in base alla tecnologia del sequenziatore. Le reads sono quindi le sequenze, ottenute dal sequenziatore, che identificano l'ordine in cui si susseguono le basi nei frammenti di DNA. Le read vengono mappate su un genoma o un trascrittoma di riferimento per identificare quali geni siano espressi nel campione. Infatti, più numerose sono le molecole di un trascritto, più probabilità avrà quel trascritto di essere sequenziato e di generare read. Il totale delle read allineate su un gene (o su un trascritto o un esone), detto count, può essere quindi visto come una misura del livello di espressione del gene stesso. Rispetto ai microarray, l'RNA-Seq presenta una serie di vantaggi (Wang *et al.*, 2008): è applicabile anche ad organismi di cui non sia disponibile il genoma/trascrittoma di riferimento, permette elevata risoluzione delle misure e un più ampio range dinamico, oltre a offrire buona riproducibilità e bassa differenza sistematica tra repliche tecniche (Marioni *et al.*, 2008) e costi relativamente contenuti.

1.5.2 La proteomica

Il termine proteoma è stato inizialmente coniato per descrivere l'insieme delle proteine codificate dal genoma, la proteomica invece è la disciplina scientifica che si occupa della caratterizzazione e dell'analisi delle proteine, delle eventuali modificazioni post-traduzionali, oltre che delle interazioni tra di esse (J.Issaq, 2001). Gli studi sul proteoma possono essere divisi essenzialmente in due settori, il *proteoma di espressione* che tende alla definizione quantitativa dell'aumento e/o diminuzione dei livelli di proteine, e il *proteoma funzionale* che tenta di identificare componenti di compartimenti cellulari, complessi multiproteici e vie di trasduzione del segnale. In entrambi i casi il processo analitico prevede un'iniziale separazione delle proteine che costituiscono il proteoma, che solitamente avviene utilizzando due diverse dimensioni separative (2D), e la successiva identificazione individuale mediante tecniche di spettrometria di massa (MS) (Mann *et al.*, 2001), (Patterson & Aebersold, 1995). La spettrometria di massa riveste un ruolo fondamentale nell'identificazione delle molecole biologiche, specie nel campo della proteomica, il quale ha potuto progredire proprio grazie all'affermarsi di tale tecnica di identificazione e caratterizzazione. Ovviamente affinché la spettrometria di massa possa fornire le informazioni ricercate è necessario che il campione sottoposto all'analisi soddisfi una serie di criteri fondamentali; deve essere quindi un frammento peptidico o la proteina stessa, e deve poter essere trasformato in uno ione in fase gassosa (Reid & McLuckey, 2002). Lo sviluppo di nuove tecniche di ionizzazione adoperate in spettrometria di massa, in particolare l'affermarsi della ionizzazione per elettro-nebulizzazione (electrospray ionization-ESI) e della ionizzazione per desorbimento laser assistito da matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization-MALDI), ha permesso un

ampliamento dell'intervallo di massa rilevabile e un miglioramento della risoluzione, consentendo quindi l'analisi di molecole biologiche caratterizzate da elevati pesi molecolari. Una classica analisi di proteomica prevede un'iniziale fase separativa della miscela proteica d'interesse. Le tecniche separative impiegate dovrebbero essere quelle in grado di fornire la maggior risoluzione con la minor quantità di materiale.

I punti che è necessario valutare per effettuare una scelta tra le possibili tecniche utilizzabili nella fase separativa di un'analisi chimica sono i seguenti:

1. potere risolutivo e/o capacità della tecnica (aspetti determinati a seconda che la separazione sia su larga scala o analitica).
2. proprietà fisiche della sostanza, ad esempio la sua solubilità, volatilità, peso molecolare e carica.
3. stabilità della sostanza nel corso di un certo procedimento.
4. esame critico delle procedure di separazione simili, eventualmente presenti in letteratura.
5. disponibilità di apparecchiature e di personale qualificato.
6. costo del procedimento.

Tali parametri sono le linee guida per la scelta della tecnica separativa più adeguata che solitamente nel caso delle proteine è l'elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti mono- (SDS-PAGE) o bi-dimensionale (2D-PAGE), adoperate rispettivamente per miscele semplici e complesse. L'elettroforesi bidimensionale utilizza l'elettrofocalizzazione in un gradiente naturale di pH, ossia un processo di isoelettrofocalizzazione (Isoelettrofocusing, IEF), per la separazione nella prima dimensione, e i gel di poliacrilamide in presenza del sodio dodecilsolfato (SDS) come supporto per la separazione elettroforetica delle proteine nella seconda dimensione. Si sfruttano quindi essenzialmente due parametri caratteristici delle proteine,

vale a dire la carica netta valutata in termini di punto isoelettrico (pI) e la grandezza molecolare valutata in termini di peso molecolare (Mw, Molecular weight). La 2-DE possiede molteplici caratteristiche e proprietà che hanno reso difficile la ricerca di una valida alternativa che possa sostituirla negli studi volti alla mappatura del proteoma. A tutt'oggi, non esiste un'altra tecnica che possa fornire informazioni ricche e dettagliate su una particolare proteina in esame in termini di quantità relativa, modifiche post-traduzionali (PTMs), pI, peso molecolare e solubilità. L'utilizzo di tale tecnica ha dato inizio ad un'era nel campo scientifico, permettendo un'analisi globale delle proteine presenti in varie cellule e tessuti, che ha condotto alla costruzione sistematica di banche dati. Tale tecnologia è diventata la tecnica di maggior rilievo per la separazione di miscele proteiche particolarmente complesse permettendo infatti di risolvere più di 1800 proteine in un singolo gel (Choe & Lee, 2000). Il risultato della separazione elettroforetica su gel è l'ottenimento di bande o spot, evidenziati mediante metodi colorimetrici e corrispondenti a singole proteine, che vengono successivamente escissi e sottoposti a proteolisi *in situ*, solitamente con tripsina, producendo una miscela peptidica che può essere infine analizzata mediante spettrometria di massa.

1.5.3 La modificomica

La struttura primaria di una molecola proteica e conseguentemente la sua funzionalità possono essere alterate se le proteine sono soggette a delle modifiche post-traduzionali (PTMs). In primis un singolo gene può dare origine, attraverso il processo di splicing alternativo (processo che subisce l'mRNA prima di essere tradotto in proteina: le regioni non codificanti (introni) vengono eliminate così che la sequenza nucleotidica risultante è

quella codificante per la specifica proteina) a molteplici mRNA che sono tradotti in proteine simili ma ben distinte. La creazione del carattere individuale di una proteina prosegue durante il processo di sintesi, secrezione o localizzazione nel suo sito target specifico, tutti step durante i quali la molecola può essere ulteriormente modificata. Alcune PTMs, come ad esempio la fosforilazione o la metilazione, possono essere transienti o avere una natura permanente, altre restano invece immutate una volta apportate come nel caso del processamento proteolitico. Tra tutte le possibili modifiche che oggi si conoscono (Krishna & Wold, 1993) solo alcune sono state studiate in maniera sistematica (Mann & Jensen, 2003). La 2-DE si è ben adattata allo studio delle PTMs perché permette di avere una visualizzazione delle modifiche e allo stesso tempo di ottenere una stima semi-quantitativa dell'ammontare delle stesse. Nei processi di mappatura su larga scala, esistono due modi per valutare le PTMs. Il primo metodo, può essere definito come "globale" e prevede la preventiva identificazione delle proteine in base ai peptidi non modificati, seguita dalla ricerca per tali molecole dei possibili peptidi modificati (MacCoss *et al.*, 2002). La seconda metodica, che invece si può indicare come "orientata", focalizza l'attenzione su uno specifico tipo di PTM che può essere a carico di tutte le proteine del campione in esame. Ciò che spesso complica l'analisi relativa alle PTMs è la bassa stechiometria, il basso fattore di risposta dei peptidi portanti la modificazione o la natura labile della stessa (Aebersold & Goodlett, 2001). E' per queste ragioni che le tecniche impiegate si basano per lo più su una selezione d'affinità per la modificazione di interesse. Di certo la PTM maggiormente studiata fino ad ora è stata la fosforilazione per la cui identificazione diverse strategie sono state elaborate e largamente utilizzate. Una prima metodica usa anticorpi specifici per gli amminoacidi fosforilati che

permettono di realizzare un'immunoprecipitazione ed il conseguente arricchimento delle proteine modificate a partire da una miscela proteica complessa come può essere un lisato cellulare (Pandey *et al.*, 2000). Altre modificazioni, come ad esempio le glicosilazioni, iniziano ad essere sistematicamente studiate utilizzando colonne cromatografiche con lectina immobilizzata, in grado di interagire specificatamente con i gruppi glucidici. I campioni arricchiti in glicoproteine, tramite quest'approccio, sono poi digeriti ed i glicopeptidi, selezionati attraverso un secondo step di interazione con la lectina. Generalmente, il gruppo saccaridico viene distaccato per procedere alle ulteriori caratterizzazioni utilizzando un'ampia gamma di enzimi. Per i carboidrati N-legati il sito di modificazione può essere determinato attraverso la deglicosilazione in un tampone contenente il 50% di H₂O. A seguito di tale processo, l'asparagina inizialmente glicosilata viene trasformata in un residuo di aspartato ed il peptide corrispondente può essere identificato grazie alla presenza nello spettro di massa di un doppietto con una differenza di 2 Da, permettendo una sicura localizzazione della glicosilazione. E' anche possibile analizzare modificazioni a carico di proteine solo attraverso la spettrometria di massa tandem senza realizzare nessun processo di derivatizzazione o arricchimento. Questo approccio è basato sul fatto che diverse modificazioni danno origine a frammenti ionici marker dopo dissociazione indotta da collisione (collision-induced dissociation CID).

1.5.4 La venomica

Per veleno si intende una sostanza che, assunta da un organismo vivente, ha effetti dannosi temporanei o permanenti, fino a letali, attraverso un meccanismo chimico. Parallelamente all'espansione nel campo della proteomica, lo sviluppo delle nuove tecniche di spettrometria di massa e di

tecnologie per lo studio delle proteine, ha determinato la nascita e l'affermazione di un nuovo campo d'indagine: la *Venomica*. Per venomica si intende lo studio dell'intero venoma, ossia l'intero "pull di peptidi" e proteine di uno specifico veleno. Sebbene infatti, elementi costitutivi del veleno siano anche numerose molecole organiche, come ad esempio gli alcaloidi e le acil-poliамmine, i componenti maggiormente presenti in esso sono di natura peptidica e proteica (Escoubas *et al.*, 2008). Ad oggi, la spettrometria di massa è la tecnica d'eccellenza che può permettere la caratterizzazione globale del profilo costitutivo del veleno; questo tipo di studi possono essere eseguiti sia sul veleno grezzo non frazionato, solitamente effettuando analisi MALDI-TOF (matrix laser desorption/ionization-time of flight), sia su frazioni individuali risultanti da un iniziale stadio separativo. Numerosi studi in questo ambito utilizzano la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS); è comunque molto diffuso l'impiego dell'elettroforesi mono- e bi-dimensionale su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti come stadio separativo prima dell'analisi di spettrometria di massa. Uno dei principali obiettivi nell'analisi di veleni, oltre alla sua completa caratterizzazione, è l'individuazione di naturali cambiamenti composizionali. Così come in tutti i fluidi biologici, anche nel veleno c'è una naturale variazione sia quantitativa che qualitativa legata a diversi fattori come ad esempio l'età, il sesso, la dimensione, la dieta, la distribuzione geografica, e l'eterogeneità genetica. Questa variabilità rappresenta il problema principale per la riproducibilità delle analisi, soprattutto in studi miranti alla purificazione di un componente bioattivo. Diversi studi di "profiling" venomico realizzati impiegando sia la MS che la MS/MS hanno dimostrato che varie classi di proteine velenifere, in una stessa specie come ad esempio nei serpenti *Sistrurus* (Escoubas *et al.*,

2008), mostrano una variabilità strettamente collegata alla dieta, oltre che all'età e allo stadio di sviluppo. Interessanti studi svolti recentemente hanno dimostrato invece come, nei serpenti elapidi australiani, il venoma si modifichi non solo in termini composizionali, ma anche per differenti modifiche post-traduzionali come ad esempio le N-glicosilazioni. Meno sviluppato, ma altrettanto promettente, è l'utilizzo del "mass fingerprint" per la differenziazione tassonomica delle specie mediante la venomica, infatti, quando gli animali sono molto simili in forma e aspetto, a causa di variazioni genetiche naturali e/o speciazione incompleta, la corretta identificazione basata su sottili variazioni morfologiche è estremamente difficile, così che lo studio mediante MS della variabilità proteica totale, e venomica in particolare, rappresenta uno strumento molto potente, che permette di accertare l'origine e l'identità del veleno. Una branca importante degli studi di venomica è quella della caratterizzazione biochimica del veleno degli Imenotteri, sia quelli sociali (Perein *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2011) ossia le vespe, le api e le formiche, che quelli solitari (Asgari *et al.*, 2003; Rivers *et al.*, 2005; Crawford *et al.*, 2008), che non fanno parte di un'organizzazione sociale. Se lo studio del venoma dei primi è importante soprattutto per ricerche immunologiche e allergologiche, quello dei secondi, invece, è importante specialmente nell'ambito della lotta biologica integrata. Il veleno degli Imenotteri è costituito da una complessa miscela di proteine, un gruppo di peptidi policationici, e tossine a bassa massa molecolare. Le principali classi di proteine contenute in tali tipi di veleno sono le fosfolipasi, l'antigene 5, le ialuronidasi e le serinproteasi. Molto poco si conosce ancora sui veleni degli Imenotteri parassitoidi rispetto a quelli delle specie sociali, il più studiato è quello dell'endoparassitoide solitario *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). La

disponibilità di una libreria di cDNA (DNA complementare, ossia un DNA a doppia elica sintetizzato a partire da un campione di RNA messaggero maturo) della ghiandola del veleno ha permesso di identificare cDNA codificanti per specifiche fenolossidasi caratteristiche dell'artropode (Parkinson *et al.*, 1999) probabilmente coinvolte nell'attività ossidante della L-3,4-diidrossi-fenilalanina (L-DOPA). Questo è stato il primo di una serie impressionante di proteine del veleno che i cDNA hanno reso disponibili; alcune proteine ottenute da sequenziamento casuale sono la serina proteasi da 28 kDa (Parkinson *et al.*, 2002a), una reprotolysin-type metalloproteasi (Parkinson *et al.*, 2002b), la grande subunità del polipeptide eterodimerico paralitico pimplin (Parkinson *et al.*, 2002c) e le proteine del veleno (vpr) 1-3 che sono enzimi simili alla trealasi e alla laccasi (Parkinson *et al.*, 2003). La caratterizzazione biochimica del veleno degli Imenotteri quindi, basata sull'identificazione delle proteine in esso presenti, può fornire una base solida per comprendere i meccanismi biologici in cui entra in gioco, ed è inoltre un importante prerequisito per lo sviluppo di nuovi composti da poter impiegare nel campo fitofarmaceutico.

1.6 SCOPO DELLA TESI

L'attività di ricerca è stata svolta presso il Dipartimento di Scienze dell'Università degli Studi della Basilicata sotto la guida della Prof.ssa Patrizia Falabella.

Il lavoro è stato condotto in collaborazione con la Dott.ssa Bianco, il Dott. Rocco Rossano, il Dott. Magnus Monnè (Dipartimento di Scienze, Università degli Studi della Basilicata), il Dott. Heiko Vogel (Max Plank Institute for Chemical Ecology di Jena, Germania), la Prof.ssa Vincenza Dolce (Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione

dell'Università degli studi della Calabria), la Dott.ssa Cristiana Labella, la Dott.ssa Simona Laurino, la Dott.ssa Sara Granafei e la Dott.ssa Lucia Dinice (Dipartimento di Scienze Università, degli studi della Basilicata).

Lo scopo del presente lavoro di tesi è l'isolamento del gene codificante la putativa eparanasi quale componente della miscela proteica che costituisce il secreto delle ghiandole del veleno dell'Imenottero *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera, Braconidae) e la caratterizzazione del trascrittoma delle ghiandole del veleno di *Toxoneuron nigriceps*.

BIBLIOGRAFIA

- Aebersold R. & Goodlett D.R.** (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.*, Vol. 101, pp. 269-295.
- Arakawa R.** (1987). Attack on the parasitized host by a primary solitary parasitoid, *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae): the second female pierces with her ovipositor the egg laid by the first one. *Appl. Entomol. Zool.* 22, 644-645. *Insect Sci.* 5: 46, available online: insectscience.org/5.46.
- Asgari S., Theopold U., Wellby C. & Schmidt O.** (1998). A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(7): 3690-3695.
- Asgari S., Zareie R., Zhang G. & Schmidt O.** (2003). Isolation and Characterization of a Novel Venom Protein From an Endoparasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae), Vol. 53, pp. 92–100.
- Asgari S.** (2006). Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. Review , Vol. 61, pp. 56-146.
- Askew R.R.** (1971). Parasitic Hymenoptera. In: *Parasitic Insects* (ed Askew R.R.), Heinemann Educational Books, London, pp. 113-185.
- Bautista R.C. & Harris J.H.** (1997). Effects of multiparasitism on the parasitization behaviour and progeny development of the oriental fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 90(3): 757-764.
- Beard R.L.** (1978). Venoms of Braconidae. In: *Handbuch der Experimentellen Pharmacologie*, Vol. 48, Arthropod Venoms (ed. Bettini S.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 773-800.3:11-21.
- Beckage N.E., Tan F.F., Schleifer K.W., Lane R.D. & Cherubin L.L.** (1994). Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26: 165-195.
- Beckage N.E.** (2000). Insect growth regulators. In: *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*. (eds. Rechcigl J.E & Rechcigl N.A.), Lewis Publishers. pp. 123-137.

- Beckage N.E. & Gelman D.B.** (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: Implication for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 299-330.
- Bogran C.E. & Heinz K.M.** (2002). Host selection by the eteronomous hyperparasitoid *Encarsia pergandiella* multiple-choice tests using *Bemisia argentifolii* as primary host. *Ent. Exp. Appl.* 103: 11-21.
- Bourne H.R., Sanders D.A. & McCormick F.** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanisms. *Nature* 349:117–27.
- Brown J.J. & Kainoh Y.** (1992). Host castration by *Ascogaster* sp. (Hymenoptera: Braconidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*85: 67-71.
- Capinera J.L.** (2012). Tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae), pp. 1-6.
- Choe L.H. & Lee K.H.** (2000). A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: The multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell., *Electrophoresis*, Vol. 21, pp. 993-1000.
- Cohen. A.C.** (1995). Pac-Learning Recursive Logic Programs: Efficient Algorithms, Vol.2, pp 501-539.
- Cole T.J., Beckage N.E., Tan F.F., Srinivasan A. & Ramaswamy S.B.** (2002). Parasitoid-host endocrine relations: self-reliance or co-optation? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1673-1679.
- Coudron T.A. & Brandt S.L.** (1996). Characteristics of a developmental arrestant in the venom of the ectoparasitoid wasp *Euplectrus comstockii*. *Toxicon* 34: 1431-1441.
- Crawford A.M., Brauning R., Smolenski G., Ferguson C., Barton D., Wheeler T.T. & Mcculloch A.** (2008).The constituents of *Microctonus* sp. parasitoid venom., *Insect Molecular Biolog* , Vol. 17, pp. 313–324.
- Dahlman D.L. & Vinson S.B.** (1993). Teratocytes: Developmental and Biochemical Characteristics. *Parasites and Pathogens of Insects*, (eds Beckage N.E., Thompson S.N. & Federici B.A.), Academic Press, Vol. 1, pp. 145-65.

- Dani M.P., Edwards J.P. & Richards E.H.** (2005). Hydrolase activity in the venom of the pupal endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 141:373–81.
- Dani M.P. & Richards E.H.** (2009). Cloning and expression of the gene for an insect haemocyte antiaggregation protein (VPr3), from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 71:191–204.
- Davies D.H. & Vinson S.B.** (1986). Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation in vitro by haemocytes of *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. *J. Insect Physiol.* 32(12): 1003-1010.
- De Moraes C.M., Cortesero A.M., Stapel J.O. & Lewis W.J.** (1999). Intrinsic and extrinsic competitive interactions between two larval parasitoids of *Heliothis virescens*. *Ecol. Entomol.* 24, 402-410.
- Digilio M.C., Pennacchio F. & Tremblay E.** (1998). Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera, Braconidae). *J. Insect Physiol.* 44: 779-784.
- Digilio M.C., Isidoro N., Tremblay E. & Pennacchio F.** (2000). Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *J. Insect Physiol.* 46(6): 1041-1050.
- Doury G., Rojas-Rousse D. & Periquet G.** (1995). Ability of *Eupelmus orientalis* ectoparasitoid larvae to develop on an unparalyzed host in the absence of female stinging behaviour. *J. Insect Physiol.*, 41: 287-296.
- Doury G., Bigot Y. & Periquet G.** (1997). Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary secretions of the ectoparasitoid wasp *Eupelmus orientalis*. *J. Insect Physiol.*, 43: 69-81.
- Doutt R.** (1959). The biology of parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 4: 161-182.
- Dover D.A., Davies D.H. & Vinson S.B.** (1988). Degeneration of last instar *Heliothis virescens* prothoracic glands by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. *J. invertebr. Pathol.* 51: 80-91.
- Drenth D.** (1974). Susceptibility of different species of insects to an extract of the venom gland of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). *Toxicon* 12: 189-92.25-334.

- Escoubas P., Quinton L., Nicholson & G.M.** (2008). Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J Mass Spectrom.*, Vol. 43, pp. 279-295.
- Falabella P., Tremblay E. & Pennacchio F.** (2000). Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. *Ent. Exp. Appl.* 97: 1-9.
- Falabella P., Varricchio P., Gigliotti S., Tranfaglia A., Pennacchio F. & Malva C.** (2003). *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus encodes a putative aspartyl protease highly expressed in parasitized host larvae. *Insect Molecular Biology* 12(1), 9-17.
- Falabella P., Caccialupi P., Varricchio P., Malva C. & Pennacchio F.** (2006). Protein Tyrosine Phosphatases of *Toxoneuron nigriceps* bracovirus as potential disrupters of host prothoracic gland function. *Archives of insect biochemistry and physiology* , Vol. 61, pp. 157-169.
- Falabella P., Riviello L., Caccialupi P., Rossodivita T., Valente M.T., et al.** (2007). A g-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37:453–65.
- Feener D.H. Jr. & Brown B.V.** (1997). Diptera as parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 42:73-97.
- Ferrarese R., Brivio M., Congiu T., Falabella P., Grimaldi A., Mastore M., Perletti G., Pennacchio F., Sciacca I., Tettamanti G., Valvassori R. & de Eguileor M.** (2005). Early suppression of immune response in *Heliothis virescens* larvae by the endophagous parasitoid *Toxoneuron nigriceps*, Vol. 2, pp. 60-68.
- Flanders S. E.** (1956). The mechanism of sex ratio regulation in the (parasitic) Hymenoptera. *Insectes Sociaux* 3: 3.
- Fleming J.G.W. & Summers M.D.** (1991). Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9770-4.
- Flexner J.L. & Belnavis D.L.** (2000). Microbial insecticides. In: Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. (eds. Rechcigl J.E & Rechcigl N.A.), Lewis Publishers. pp. 35-62.

- Fye R.E. & McAda W.C.** (1972). Laboratory studies on the development, longevity, and fecundity of six lepidopterous pests of cotton in Arizona. *Agricultural Research Service* .
- Gade G. & Hoffmann K.H.** (2005). Neuropeptide control of development and reproduction. *Physiol. Entomol.* 30: 103-121.
- Gauld I.D. & Bolton B.** (1988). *The Hymenoptera*. Oxford University Press, Oxford.
- Gelman D.B, Gerling D. & Blackburn M.B.** (2005). Host-parasitoid interactions relating to penetration of the whitefly, *Bemisia tabaci*, by the parasitoid wasp, *Eretmocerus mundus*. *J. Insect Sci.* 5: 46, available online: insectscience.org/5.46.
- Glatz R.V., Asgari S. & Schmidt O.** (2004). Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors. *Trends in Microbiology*, Vol. 12, pp. 545-554.
- Godfray H.C.J.** (1994). *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Grimont P.A.D. & Grimont F.** (1978). The genus *Serratia*. *Annu. Rev. microbiol.* 32:221-228.
- Hardy I.C.W. & Blackburn T. M.** (1991). Brood guarding in a bethylid wasp. *Ecol. Entomol.* 16: 55–62.
- Hayakawa Y. & Yazaki K.** (1997). Envelope protein of parasitic wasp symbiontvirus, polydnavirus, protects the wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect. *Eur. J. Biochem.* 246: 820-826.
- Hochuli A., Pfister-Wilhelm R. & Lanzrein B.** (1999). Analysis of endoparasitoid released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae)-*Spodoptera littoralis* (Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 345 823-833.
- Issaq Haleem.** (2001). The role of separation science in proteomics research., *Electrophoresis*, Vol. 22, pp. 3629-3638.
- Jones D., Sawicki G. & Wozniak M.** (1992). Sequence, structure, and expression of a wasp venom protein with a negatively charged signal peptide and a novel repeating internal structure. *J. Biol. Chem.* 267:14871–78.

- Jones D.** (1996). Biochemical interaction between chelonine wasps and their lepidopteran hosts: after a decade of research the parasite is in control. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 981-996.
- Kathirithamby J.** (1989). Review of the order Strepsiptera. *Systematic Entomology*, 14: 41-92.
- Krishna R.G. & Wold F.** (1993). Post-translational modifications of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, Vol. 67, pp. 265-298. .
- Krishnan A., Nair P.N. & Jones D.** (1994). Isolation, cloning and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *J. Biol. Chem.* 269:20971–76.
- Kroemer J.A. & Webb B.A.** (2004). Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. *Annu. Rev. Entomol.* 49:431–56.
- Labrosse C., Stasiak K., Lesobre J., Grangeia A., Huguet E., et al.** (2005). A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae) - *Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:93–103.
- Lawrence P.O. & Hagendron H.H.** (1986). Relationship between the ecdysteroid titers of a host and those of its parasite. *Insect Biochem.* 16: 163-167.
- Lawrence P.O.** (1986). Host-parasite hormonal interactions: an overview. *J. InsectPhysiol.* 32(4): 295-298.
- Leluk J., Schmidt J. & Jones D.** (1989). Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon* 27:105–14.
- Lemaitre B. & Hoffman J.** (2007). The host defence of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 2007 , Vol. 25, pp. 697-743.
- Linsley E.G., MacSwain J.W & Smith R.F.** (1952). The life history and development of *Rhipiphorus smithi* with notes on their phylogenetic significance (Coleoptera, Rhipiphoridae). *Univ. California Publ. Entomol.*, 9: 291-314.
- Luckmann J. & Assmann T.** (2005). Reproductive biology and strategies of nine meloid beetles from central Europe (Coleoptera: Meloidae). *Journal of Natural History.* 39(48): 4101-4125.

- MacCoss M.J., McDonald W.H., Saraf A., Sadygov R., Clark J.M., Tasto J.J., Gould K.L., Wolters D., Washburn M., Weiss A., Clark J.I. & Yates III J.R.** (2002). Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, Vol. 99, pp. 7900-7905.
- Mackauer M.** (1991). Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. In: *Critical Issues in Biological Control* (eds. Mackauer M., Ehler L.E., & Roland J.), Intercept, Anover, pp. 41–62.
- Mackauer M. & Sequeira R.** (1993). Patterns of development in insect parasites. In: *Parasites and Pathogens of Insects, Vol I* (eds. Beckage N.F., Thompson S.N. & Federici B.A.), Academic. Press, New York, pp. 1-23.
- Mackenzie., Wood.** (1998). Wood Mackenzie agricultural products database. *Wood Mackenzie*.
- Mann M., Hendrickson R.C. & Pandey A.** (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, *Ann. Rev Biochem*, Vol. 70, pp. 437-73.
- Mann M. & Jensen O.N.** (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.*, Vol. 21, 3, pp. 255-261.
- Marioni J. C., Mason E. C. and Shrikant M. M.** (2008) "RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays," *Genome Research*
- Martignoni M.E. & Iwai P.J.** (1986). A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. *USFS Pac. Northwest Res. STN. Ge. Tech. Rep.* PNW-195.
- Maus C., Mittman B. & Peschke K.** (1998). Host records of parasitoid *Aleochara* Gravenhorst species (Coleoptera: Staphylinidae) attacking puparia of cyclorrhaphous Diptera. *Deut. Entomol. Z.* 45: 231-254.
- Mayhew P.J.** (1997). Fitness consequences of ovide in a parasitoid wasp. *Entomol. Exp. Appl.* 84: 115–126.
- Moreau S.J.M., Dingremont A., Doury G. & Giordanengo P.** (2002). Effects of parasitism by *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae) on the development, survival and activity of *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Insect Physiol.* 48: 337-347.

- Moreau A. & Guillot S.** (2005). Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:1209–23.
- Moretti R. & Calvitti M.** (2003). Mortality by parasitization in the association between the oo-pupal parasitoid *Fopius arisanus* and *Ceratitis capitata*. *BioControl* 48: 275-291.
- Nagalakshmi U. Wang Z., Waern K. , Shou C. , Raha D. , Gerstein M. , Snyder M.** (2008). "The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA Sequencing," *Science* 320.
- Nakamatsu Y., Fujii S. & Tanaka T.** (2002). Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *J. Insect Physiol.* 48: 1041–1052.
- Nakamatsu Y., Suzuki M., Harvey J.A. & Tanaka T.** (2007). Regulation of the host nutritional milieu by ectoand endoparasitoid venom. See Ref. 87a, pp. 37–56.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y.,** (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4, 423-430.
- Pandey A., Podtelejnikov A.V., Steen H., Blagoev B., Nielsen M.M., Roche S., Mann M. & Lodish H.F.** (2000). Analysis of receptor signalling pathways by mass spectrometry: identification of Vav-2 as substrate of epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, Vol. 97, pp. 179-184.
- Parkinson N.M. & Weaver R.J.** (1999). Noxious components of venom from the pupa-specific para- endoparasitic wasp. *Pimpla hypochondriaca*. *J. Invertebr. Pathol.* 73:74–83.
- Parkinson N., Richards E.H., Conyers C., Smith I. & Edwards J.P.** (2002a). Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32, pp. 729–735.
- Parkinson N., Conyers C. & Smith I.** (2002b). A venom protein from the endoparasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* is similar to snake venom reprolysin-type metalloproteases. *J. Invertebr Pathol.*, Vol. 79, pp. 129-131.
- Parkinson N., Smith I., Audsley N. & Edwards J.P.** (2002c). Purification of pimplin, a paralytic heterodimeric polypeptide from venom of the parasitoid wasp *Pimpla*

hypochondriaca, and cloning of the cDNA encoding one of the subunits. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32, pp. 1769–1773.

Parkinson N.M., Conyers C.M., Keen J.N., MacNicoll A.D., Smith I. & Weaver R.J. (2003). cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* , Vol. 134, pp. 513–520.

Patterson S.D. & Aebersold R. (1995). Mass spectrometric approaches for the identification of gel separated proteins., *Electrophoresis* , Vol. 16, pp. 1791-814.

Peferoen M. (1997). Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops *Trends Biotechnol.*15:173-177.

Peiren N., Vanrobaeys F., de Graaf D.C., Devreese B., Van Beeumenb J. & Jacobs F.J. (2005). The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta.*, Vol. 1752, 1, pp. 1-5.

Pennacchio F., Digilio M.C. & Tremblay E. (1995). Biochemical and metabolic alterations in *Acyrtosiphon pisum* parasitized by *Aphidius ervi*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30: 351-367.

Pennacchio F., Vinson S.B. & Tremblay E. (1992). Host regulation effects of *Heliothis virescens* (F.) larvae induced by teratocytes of *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Lepidoptera, Noctuidae-Hymenoptera, Braconidae) , Vol. 19, pp. 177-192.

Pennacchio F., Vinson S.B. & Tremblay E. (1994). Morphology and ultrastructure of the serosal cells (teratocytes) in *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) embryos. *Int. J. Insect Morphol.* 23: 93–104.

Pennacchio F., Fanti P., Falabella P., Digilio M.C., Bisaccia F. & Tremblay E. (1999). Development and nutrition of the braconid wasp, *Aphidius ervi* in aposymbiotic host aphids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 40:53-63.

Pennacchio F., Falabella P., Sordetti R., Varricchio P., Malva C. & Vinson S.B. (1998a). Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera, Braconidae). *J. Insect Physiol.* 44(9): 845-857.

- Pennacchio F., Falabella P. & Vinson S.B.** (1998b). Regulation of *Heliothis virescens* prothoracic glands by *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 38(1): 1-10.
- Pennacchio F., Tremblay E., Tranfaglia A., Bin F., Rao R. & Malva C.** (2001). Biotecnologie per il controllo degli insetti fitofagi. *Rendiconti Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Memorie di Scienze Fisiche e Naturali* 119 Vol. XXV: 511-524.
- Pfister-Wilhelm R. & Lanzrein B.** (1996). Precocious induction of metamorphosis in *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) by the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): Identification of the parasitoid larva as the key regulator element and the host corpora allata as the main targets. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32: 511-525.
- Predel R. & Eckert M.** (2000). Neurosecretion: peptidergic systems in insects. *Naturwissenschaften* 87: 343-350.
- Quicke D.L.J.** (1997). Parasitic wasps. Chapman & Hall, London.
- Quistad G.B., Nguyen Q., Bernasconi P. & Leisy D.J.** (1994). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24:955-961.
- Read D.C.** (1962). Notes on the life history of *Aleochara bilineata* (Gyll.) (Coleoptera: Staphylinidae), and on its potential value as a control agent for the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Bouché) (Diptera: Anthomyiidae). *Can. Entomol.* 94: 417-424.
- Reid G.E. & McLuckey S.A.** (2002). 'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* , Vol. 37, pp. 663-675.
- Richards E.H. & Edwards J.P.** (2002). Larvae of the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, release factors which adversely affect haemocytes of their host *Lacanobia oleracea*. *Journal of Insect Physiology* 48(9): 845-855.
- Rivers D.B. & Denlinger D.L.** (1994). Redirection of metabolism in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, following envenomation by the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* and correlation of metabolic effects with the diapause status of host. *J. Insect Physiol.* 40(3): 20.

- Rivers D.B. & Denlinger D.L.** (1995). Venom-induced alterations in fly lipid metabolism and its impact on larval development of the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 66: 104-110.
- Rivers D.B., Crawley T. & Bauser H.** (2005). Localization of intracellular calcium release in cells injured by venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera:Pteromalidae) and dependence of calcium mobilization on G-protein activation. *J Insect Physiol.*, Vol. 51, pp. 149–160.
- Rivers D.B., Uckan F. & Ergin E.** (2006). Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61: 24-41.
- Salt G.** (1968). The resistance of insect parasitoid to the defence reactions of their hosts. *Biol. Rev.* 43: 200-232.
- Santos L.D., Pieroni M., Menegasso A.R.S., Pinto J.R.A.S. & Palma M.S.** (2011). A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. *J vat td.*, Vol. 17, 4, pp. 364-377.
- Shaw M.R.** (1981). Delayed inhibition of host development by the non-paralyzing venoms of parasitic wasps. *J. Invert. Pathol.* 37: 215-221.7-215.
- Schmidt J.O.** (1982). Biochemistry of insect venoms. *Annu. Rev. Entomol.*, 27: 339-368.
- Schmidt O., Theopold U. & Strand M.** (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays* 23(4): 344-351.
- Schoeters E. & Billen J.** (1998). Ontogenetic study of the venom gland in formicine ants, with special reference to the pulvinate convoluted gland (Hymenoptera, Formicidae). *Zoomorphology* 118: 245-253.
- Smith K.G.V.** (1989). An introduction to the immature stages of British flies. *Handbk. Ident. Br. Insects*. Vol. 10, Part.
- Smith R.D., Pasa-Tolic L., Lipton M.S., Jensen P.K., Anderson G.A., Shen Y., Conrads T.P., Udseth H.R., Harkewicz R., Belov M.E., Masselon C. & Veenstra T.D.** (2001). Rapid quantitative measurements of proteomes by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry., *Electrophoresis*, Vol. 22, pp. 1652-1668.

- Spencer H.** (1926). Biology of the parasites and hyperparasites of aphids. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 19: 119–157.
- Stall G.B.** (1982). Insect control with growth regulators interfering with the endocrine system. *Entomol. Exp. Appl.*, 31: 15-23.
- Strand M.R., Quarles J.M., Meola S.M. & Vinson S.B.** (1985). Cultivation of teratocytes of the egg parasitoid *Telenomus heliothis* (Hymenoptera: Scelionidae) *in vitro*. *Cell. Devel. Biol.* 21: 361-367.
- Strand M.R.** (1986). The physiological interactions of parasitoids with their hosts and their influence in reproductive strategies. In: *Insect parasitoids* (eds. Waage J. & Greathead D.), Academic Press, New York, pp. 97-136.
- Strand M.R., Meola S.M. & Vinson S.B.** (1986). Correlating pathological symptoms in *Heliothis Virescens* eggs with development of the parasitoid *Telenomus Heliothidis*. *J. Insect Physiol.* 32: 389-402.
- Strand M.R. & Pech L.L.** (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationship. 1995 , *Annu. Rew. Entomol.* , Vol. 40, pp. 31-56.
- Tanaka T. & Wago H.** (1990). Ultrastructural and functional maturation of teratocytes of *Apanteles kariyai*. *Arch Insect Biochem. Physiol.* 13: 187-197.
- Tanaka T. & Vinson S.B.** (1991). Depression of prothoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps* , Vol. 37, pp. 139-144.
- Tanada Y. & Kaya H.K.** (1993). *Insect Pathology*, Academic Press, San Diego.
- Uka D., Hiraoka T. & Iwabuchi K.** (2006). Physiological suppression of the larval parasitoid *Glyptapanteles pallipes* by the polyembryonic parasitoid *Copidosoma floridanum*. *J. Insect Physiol.* 52: 1137–1142.
- Vinson S.B., Iwantsch G.F.** (1980). Host regulation by insect parasitoids. *Q. Review of Biology*, 1980 , Vol. 55, pp. 65-143.
- Vinson S.B.** (1990). How parasitoids deal with the immune system of their host: an overview. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 13, pp. 3-27.

- Vinson S.B. & Hegazi E.M.** (1998). A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *J. Insect Physiol.* 44: 703-712.
- Vinson S.B. & Mourad A.K.** (2000). The response of *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae) larvae to conspecific competitors. In: *Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control* (eds Austin A.D. & Downton M.), CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 46-49.
- Wang L., Feng Z., Wang X., Wang X. & Zhang X.** (2009). "DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data," *Bioinformatics*.
- Wang Z., Gerstein M., and Michael S., (2008) "RNA-Seq: a revolutionary tool For transcriptomics," *Nature Reviews Genetics*,
- Weaver R.J., Marris G.C., Olieff S., Mosson J.H. & Edwards J.P.** (1997). Role of ectoparasitoid venom in the regulation of haemolymph ecdysteroid titres in a host noctuid moth. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35: 169-178.
- Webb B.A.** (1998). Polydnavirus biology, genome structure and evolution. In: *The Insect Viruses* (eds Miller L.K. & Andrew L.), Plenum Publishing Corporation, N.Y., pp. 135-139.
- Webb B.A. & Strand M.R.** (2004). The Biology and Genomics of Polydnaviruses. In: *Comprehensive Molecular Insect Science* Vol. 6 (eds Gilbert, L. I., Iatrou, and Gill, S. S.). Elsevier, San Diego, CA.
- Weber D.C., Rowley D.L., Greenstone M.H. & Athanas M.M.** (2006). Prey preference and host suitability of the predatory and parasitoid carabid beetle, *Lebia grandis*, for several species of *Leptinotarsa* beetles. 14pp. *J. Insect Sci.* 6:09, available online: insectscience.org/6.0.
- Weinzierl R.A.** (2000). Botanical insecticides, soaps and oils. In: *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests* (eds. Rechcigl J.E & Rechcigl N.A.), *Lewis Publishers*, pp. 101-121 .
- Wells A.** (2005). Parasitism by hydroptilid caddisflies (Trichoptera) and seven new species of Hydroptilidae from northern Queensland. *Australian Journal of Entomology*, 44 (4): 385–391.

- Wharton, R.A. & Gilstrap F.E.** (1983). Key to and status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s. l. (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 721-742.
- Wood D.M.** (1987). Tachinidae. In: Manual of Nearctic Diptera. Volume 2. Chapter 110 (eds McAlpine J.F., Peterson B.V., Shewell G.E., Teskey H.J., Vockeroth J.R. & Wood D.M.). Agriculture Canada Monograph 28, pp. 1193-1269.
- Zhang D., Dahlman D.L. & Gelman D.B.** (1992). Juvenile hormone esterase activity and ecdysteroid titer in *Heliothis virescens* larvae injected with *Microplitis croceipes* teratocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 20: 231–242.
- Zhang D., Dahlman D.L. & Jarlfors U.E.** (1997). Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. *J. Insect Physiol.* 43: 577-585.
- Zhang G., Lu Z.Q., Jiang H. & Asgari S.** (2004a). Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:477–83.
- Zhang G., Schmidt O. & Asgari S.** (2004b). A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes , Vol. 279, pp. 41580-5.

CAPITOLO 2

TECNICHE SPERIMENTALI

2.1 L'ELETTROFORESI

L'elettroforesi è una tecnica analitica separativa basata sul movimento di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato al fluido stesso, mediante una coppia di elettrodi. Pensata e progettata sin dall'inizio per la separazione e l'analisi di proteine, nel corso degli anni ha avuto un impatto sempre maggiore nel settore biochimico, tanto che oggi, è una tecnica ampiamente diffusa in ambito biologico, proprio per la separazione di proteine, peptidi ed acidi nucleici (Russell & Roberts, 2005). La separazione delle molecole si genera per la differenza di velocità di migrazione delle stesse. La mobilità elettroforetica di una specie è direttamente proporzionale alla carica netta dello ione e inversamente proporzionale alle dimensioni della molecola, pertanto, a parità di carica, saranno più veloci nella migrazione molecole più piccole, e a parità di dimensioni, ioni con carica maggiore. La presenza di gruppi polari nella struttura di molecole quali proteine, acidi nucleici, nucleotidi ed amminoacidi rende tali molecole adatte per l'elettroforesi; al contrario molecole come i lipidi non riescono ad essere separate con questa tecnica che richiede l'utilizzo di solventi polari in cui la maggior parte dei lipidi è insolubile (Chhabra, 2011). Nella comune pratica di laboratorio possono essere utilizzate diverse tecniche elettroforetiche per la separazione di miscele proteiche in base alle diverse necessità. La tecnica elettroforetica più utilizzata per analisi di proteine è certamente l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodiododecilsolfato (SDS-PAGE) che separa le molecole

in base al loro peso molecolare, caratterizzata da un alto potere risolutivo ed una buona riproducibilità (Allen *et al.*, 1984). Quando invece si sottopone ad una corsa elettroforetica un gel di proteine in assenza di SDS, la tecnica è definita elettroforesi in condizioni native. In questo caso si sottopongono alla separazione proteine volutamente non denaturate, in modo che esse mantengano la loro attività biologica, con la possibilità di estrarre le proteine ancora attive dopo la separazione ed utilizzarle in altri esperimenti. Per la separazione delle proteine può essere sfruttata anche un'altra proprietà, il punto isoelettrico delle stesse. Nel caso di elettroforesi per isoelettrofocalizzazione (IEF), si utilizza un gel con un determinato gradiente di pH tra le due estremità, in modo che le diverse proteine si fermeranno nel punto in cui il pH corrisponderà al loro punto isoelettrico, cioè nell'istante in cui la carica netta della proteina sarà nulla. Le tecniche separative monodimensionali sono largamente utilizzate nei casi di miscele proteiche non troppo complesse, per la facilità di esecuzione e la richiesta di piccole quantità di campione, nonostante le concentrazioni proteiche totali non siano elevatissime; infatti utilizzando apparati per elettroforesi idonei, e specifici metodi di rivelazione (colorimetrici), la quantità di proteina minima rivelabile è dell'ordine dei nanogrammi (ng). Nell'elettroforesi monodimensionale però proteine aventi lo stesso peso molecolare o stesso punto isoelettrico, non vengono distinte, per cui confluiscono sotto la medesima banda, quindi, nonostante tale tecnica consenta di ottenere l'analisi qualitativa, quantitativa ed il controllo della purezza delle proteine separate, non ha una risoluzione sufficiente per miscele proteiche con pesi molecolari e punti isoelettrici simili. In casi del genere, così come in casi di miscele proteiche molto complesse, è necessario impiegare tecniche di separazione ortogonali, ossia l'elettroforesi bidimensionale che utilizza

l'elettrofocalizzazione in un gradiente naturale di pH, per la separazione nella prima dimensione, e i gel di poliacrilammide in presenza dell' SDS, come supporto per la separazione elettroforetica delle proteine nella seconda dimensione. Si sfruttano quindi essenzialmente entrambi i parametri caratteristici delle proteine alla base delle tecniche separative monodimensionali, quali la carica netta valutata in termini di punto isoelettrico e la grandezza molecolare valutata in termini di peso molecolare. Tale tecnologia è diventata la tecnica di maggior rilievo per la separazione di miscele proteiche particolarmente complesse (O'Farrell, 1975) permettendo infatti di risolvere più di 1800 proteine in un singolo gel (Choe & Lee, 2000).

2.1.1 Analisi elettroforetica SDS-PAGE

Questa metodica consente di separare proteine di diverso peso molecolare mediante la loro migrazione attraverso le maglie di un gel di poliacrilammide sotto l'azione di un campo elettrico. I gel di poliacrilamide si preparano facendo co-polimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di bis-acrilammide. La polimerizzazione avviene secondo la modalità testa-coda e occasionalmente si formano legami crociati, definendo una matrice gelatinosa ben strutturata. Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide è radicalico, e l'iniziatore è l'ammonio persolfato (APS) in presenza della base N,N,N',N'-tetrametildiammina (TEMED) (Fig. 1). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero che innesca la polimerizzazione dell'acrilammide e bis-acrilammide. Dal momento che l'ossigeno rimuove i radicali liberi presenti nella soluzione di preparazione del gel, questa deve essere degassata prima dell'uso. I gel di acrilammide vengono definiti in base alla percentuale (%) totale di acrilammide presente, e le dimensioni dei pori

(o maglie) del gel sono definite in relazione alle concentrazioni di acrilammide e bis-acrilammide (gel a % bassa (es. 3%) possiedono pori di grosse dimensioni, gel a % alta (es. 15%) possiedono invece pori di piccole dimensioni).

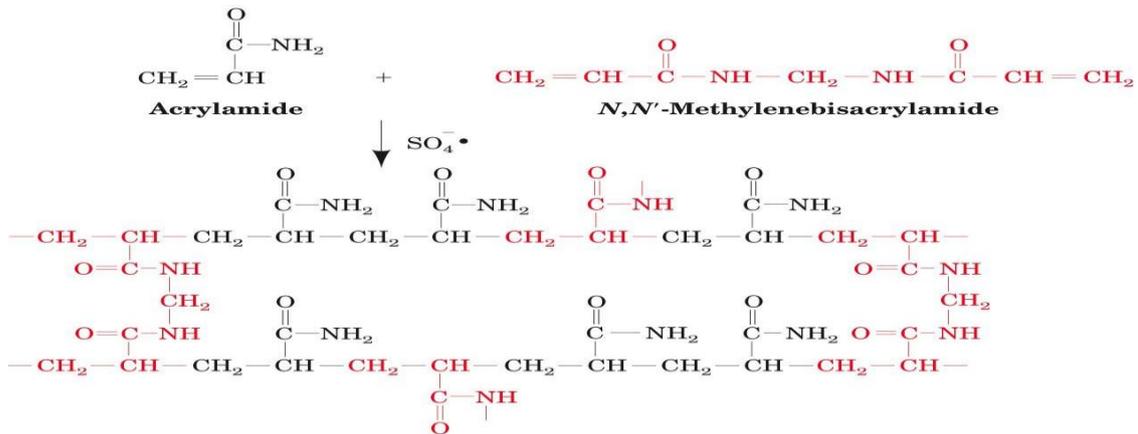


Fig. 1 Polimerizzazione acrilamide e bis-acrilamide.

I campioni da separare vengono caricati su un gel di impaccamento, lo stacking gel, nel quale vengono praticati i pozzetti per il caricamento. Lo stacking gel ha dei pori molto larghi (5% acrilamide) che permettono la libera migrazione delle proteine così che possano impaccarsi in una banda sottile e compatta prima che entrino nel gel di separazione, il running gel, che ha una porosità inferiore. Dopo la polimerizzazione dei gel e prima del caricamento, si deve assemblare l'apparecchiatura elettroforetica che è composta essenzialmente da una cella e un alimentatore. La cella utilizzata (Fig. 2) è di tipo verticale ed è costituita da una vasca in cui si introduce il running buffer, ossia un tampone a pH 8.3 contenente tris - idrossimetil - amminometano (Tris), glicina e SDS, e da un'altra concavità definita tra due coppie di lastre di vetro, che sono montate su un supporto in maniera ermetica, affinché tra di esse venga posto lo stesso tampone. Le lastre di vetro, che costituiscono una coppia, invece, vengono fissate parallelamente e separate da sottili

spaziatori, in modo che al loro interno sia presente il gel. L'alimentatore invece fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica. Le proteine più piccole passano molto più facilmente all'interno dei pori del gel, e sono quindi più veloci, quelle più grandi invece vengono ritardate. Il blu di bromofenolo essendo una molecola piccola non subisce alcun rallentamento, per cui rappresenta il fronte di migrazione, e segna la fine della corsa.

Dopo la corsa il gel viene rimosso dalle due lastre di vetro e messo a colorare in agitazione per tutta la notte in una soluzione contenente un colorante idoneo per le proteine. Generalmente, si adoperano o il Coomassie R, irreversibile, o il Coomassie G, reversibile. A seconda del colorante, il gel viene decolorato o in una soluzione di decolorante, o in acqua milli-Q, in modo che il background risulti trasparente e solo le bande proteiche mostrino una colorazione.

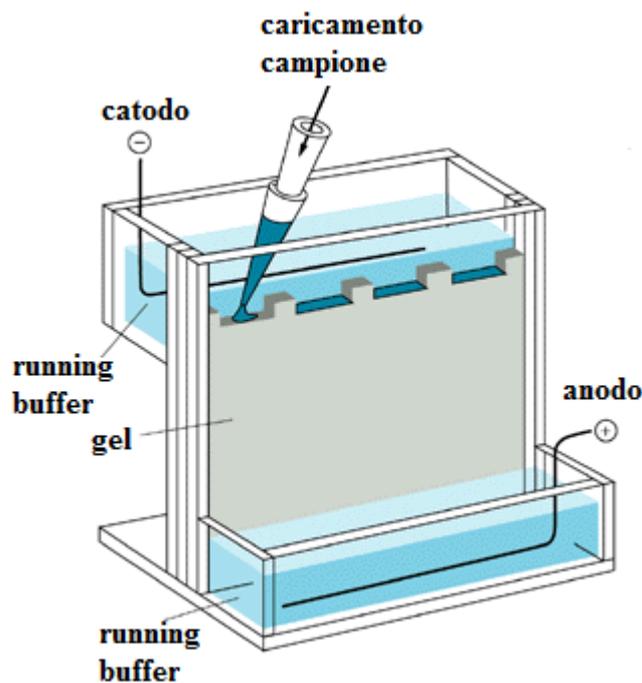


Fig. 2 Cella elettroforetica.

2.1.2 Analisi elettroforetica bidimensionale 2D-SDS-PAGE

Questa tecnica combina l'isoelettrofocalizzazione (IEF) che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico, con la SDS-PAGE, in cui la separazione avviene in base alla massa. I campioni da separare vengono sottoposti ad un processo di pretrattamento che consente di purificarli, desalinizzarli e risolubilizzarli nella soluzione adeguata per la separazione elettroforetica. La presenza dei sali è uno dei fattori più comuni che porta a una insufficiente focalizzazione dello spot che si traduce in strisciate orizzontali sul gel. Gli acidi nucleici portano invece ad un aumento di viscosità, e in caso di alto peso molecolare a rischio di otturazione dei pori del gel. I lipidi possono formare complessi con certe proteine soprattutto di membrana portando oltre a diminuzione di solubilità a variazioni di pH e pI. Il metodo di pretrattamento dipende dallo scopo dell'analisi, oltre che dalle caratteristiche e dalla complessità del campione, ed è la chiave del successo dell'esperimento (Rabilloud, 1999; Macri *et al.*, 2000; Molloy 2000).

La frazione proteica che deve essere separata in un gel 2D viene solubilizzata in un tampone a bassa forza ionica denaturante, in modo da mantenere la carica delle proteine native. Tale tampone contiene quantità variabili di agenti caotropici, detergenti, anfiliti e agenti riducenti. I principali agenti caotropici sono l'urea e la tiourea, che rompono i legami idrogeno in grado di generare aggregazioni e strutture secondarie non volute, le quali alterano la mobilità delle proteine. I detergenti sono aggiunti come distruttori delle interazioni idrofobiche e per aumentare la solubilità delle proteine, inoltre essi devono essere non ionici o zwitteronici in modo da permettere a quest'ultime di migrare in base alla loro carica.

Una caratteristica delle proteine è che precipitano una volta raggiunto il loro punto isoelettrico, e quindi in presenza di detergenti sono necessarie

notevoli quantità di sali per mantenerle in soluzione, ciò però limita il voltaggio che può essere applicato senza produrre elevate correnti, e di conseguenza aumenta il tempo necessario per focalizzare le stesse. Per questo motivo si introducono nel tampone gli anfolti che aiutano a contrastare l'effetto di una insufficiente presenza di sali, ma ad una concentrazione non troppo elevata, altrimenti rallentano la IEF. Gli agenti riducenti invece come il ditiotreitolo (DTT) o la tributilfosfina (TBP) sono aggiunti per rompere i ponti disolfuro.

Le proteine vengono separate nella prima dimensione in base al loro punto isoelettrico, quindi mediante IEF (Fig. 3), su IPG gel-strips caratterizzate da un gradiente di pH immobilizzato. Solitamente i punti isoelettrici (pI) delle diverse proteine cadono in un range di pH 3-12.



Fig. 3 Isoelettrofocalizzazione su IPG-strip.

Quando le proteine sono poste nel gradiente di pH e vengono sottoposte ad un campo elettrico, iniziano a muoversi verso l'elettrodo di carica opposta. Durante la migrazione nel gradiente acquistano o perdono protoni, così che la carica netta diminuisce e le proteine rallentano, fino a diventare non-

cariche in corrispondenza del valore del pH che coincide con il pI. L'utilizzo delle IPG strips, piuttosto che soluzioni di anfolti per la IEF presenta numerosi vantaggi, in particolare l'elevata riproducibilità, la semplicità d'utilizzo e la velocità di focalizzazione.

I gradienti di pH per le IPG strips sono creati con serie di tamponi di acrilamide, i quali si ottengono da derivati di acrilamide contenenti sia doppi legami reattivi che gruppi tampone, come il gruppo carbossilico o un'ammina terziaria, che vengono incorporati covalentemente durante la polimerizzazione e possono produrre, almeno concettualmente, ogni possibile gradiente (Righetti, 1990).

Successivamente tali strips, su cui si sono isoelettrofocalizzate le proteine, si pongono in un equilibration buffer, addizionato prima con tributilfosfina (TBP), e successivamente con iodoacetamide (IAA), in modo da ridurre i ponti disolfuro e alchilare i risultanti gruppi tiolici delle cisteine residue. Simultaneamente, le proteine vengono trattate con SDS per la successiva separazione in base al peso molecolare.

La seconda dimensione, ossia la separazione su gel di poliacrilamide viene svolta analogamente ad una elettroforesi monodimensionale, in questo caso però non è presente lo stacking gel, per cui la migrazione delle proteine avviene dalla strip che viene bloccata al running mediante un gel 1.5% di agarosio a basso punto di fusione in running buffer, contenete all'interno blu di bromofenolo che indica lo svolgimento della corsa migrando nel gel. Al termine della corsa i gel vengono posti a colorazione e successivamente vengono decolorati in acqua. A differenza del monodimensionale, in un gel 2D non appaiono delle bande, ma delle macchie (spot) circolari ciascuna corrispondente ad una singola proteina avente un determinato pI e MW. I

gel vengono infine scansionati e conservati in modo analogo a quelli monodimensionali.

2.1.3 Visualizzazione dei risultati

Se l'elettroforesi bidimensionale è la tecnica principale per la separazione della maggior parte delle proteine, la visualizzazione resta uno stadio delicato che determina la sensibilità finale. Le caratteristiche principali per orientarsi nella scelta del tipo di colorazione sono:

- la sensibilità;
- un range lineare per la quantificazione;
- semplicità nell'utilizzo;
- compatibilità con la spettrometria di massa (Winkler, 2007).

Tra le colorazioni più classiche vi sono la colorazione all'argento (Silver staining) e la Blu Coomassie. Tra queste la colorazione con nitrato d'argento è la più sensibile ma rispetto a quella con il Blu Coomassie non testimonia l'esatta stechiometria delle proteine presenti e risulta inoltre essere dipendente dalle proprietà intrinseche delle proteine (Giometti *et al.*, 1991). Infatti gli ioni argento sono complessati dagli amminoacidi delle proteine e la forza del complesso dipende dall'affinità tra gli ioni e gli amminoacidi (Rabilloud 1990; Shevchenko *et al.*, 1996), con il risultato che se gli ioni sono troppo complessati la proteina può essere persa per l'analisi in massa. Tale colorazione è infatti incompatibile con la MS e il suo utilizzo richiede speciali protocolli che lascino parte delle proteine non colorate e disponibili all'analisi (Richert *et al.*, 2004). Per quanto riguarda la linearità, la colorazione con Silver lo è per concentrazione da 0.004 a 2 ng/mm² mentre per il Blu Coomassie la linearità va da 10 a 200 ng/mm² con l'inconveniente di essere 50 volte meno sensibile rispetto alla colorazione all'argento.

L'utilizzo della colorazione Blu Colloidale rappresenta un variante della Blu Coomassie con una migliore sensibilità (al di sotto dei 100 ng/proteina) (Westermeier, 2006). Tale colorazione permette di avere un'ottima riproducibilità, cosa che con la colorazione Silver è possibile solo con una grande esperienza: la visualizzazione è quindi ristretta alle proteine maggioritarie ma si garantisce una buona riproducibilità essenziale per le analisi specie quando la componente comparativa tra gel è il punto chiave. Citando altre colorazioni in uso, vi è la colorazione a fluorescenza SYPRO™ con l'utilizzo di sonde organiche o al rutenio (Yan *et al.*, 2000; Rabilloud *et al.*, 2001), che ha una sensibilità superiore al Blu Coomassie ed è MS compatibile (Yan *et al.*, 2000) ma richiede apparecchiature piuttosto onerose (scanner a fluorescenza).

2.2 LA DIGESTIONE TRIPTICA

La digestione proteica è un importante e, a volte, indispensabile strumento per l'identificazione, caratterizzazione e quantificazione delle proteine stesse (Angel *et al.*, 2012), ed in proteomica rappresenta il passaggio chiave nella preparazione del campione. Gli approcci classici per la digestione proteica sono: la digestione enzimatica, che prevede l'utilizzo di enzimi proteolitici, e la digestione non enzimatica, che sfrutta prodotti chimici (Switzar *et al.*, 2013). Nella maggior parte dei casi, riguardanti studi di proteomica, si ricorre alla digestione enzimatica, in particolare all'utilizzo dell'enzima tripsina. Essa idrolizza solo i legami peptidici in cui il gruppo carbonilico è seguito da arginina (Arg/R) o lisina (Lys/K), ad eccezione dei casi in cui questi due amminoacidi siano legati all'acido aspartico (Asp/D) o sono seguiti da prolina (Pro/P). Il sito attivo della tripsina è composto da una sequenza specifica di tre amminoacidi che prende il nome di triade catalitica, ovvero istidina (57),

acido aspartico (102) e serina (195). Sebbene i tre amminoacidi della triade catalitica siano distanti tra di loro nella struttura primaria, essi si ritroveranno ad essere molto vicini nella forma attiva dell'enzima a seguito di numerosi ripiegamenti che subisce la tripsina. Ogni amminoacido nella triade esegue un compito specifico nel processo di idrolisi: la serina agisce da nucleofilo legando con il suo gruppo $-OH$ il carbonio carbonilico del legame peptidico del substrato; l'istidina accetta l'idrogeno del gruppo $-OH$ della serina coordinando così l'attacco del legame peptidico e l'acido aspartico lega selettivamente i residui amminoacidici di arginina e lisina in modo da esplicare l'attività enzimatica della triade catalitica.

Questa alta specificità dell'enzima tripsina nel tagliare i legami peptidici di arginina e lisina deriva dal fatto che il sito attivo della tripsina si trova all'interno di una "tasca" creata dalla struttura terziaria dell'enzima, all'interno della quale si trova un residuo di acido aspartico carico negativamente, con cui legano bene le catene laterali di arginina e lisina che presentano un gruppo amminico basico. Le caratteristiche che rendono la tripsina competitiva rispetto ad altre proteasi sono l'elevata specificità di taglio, la limitata quantità di prodotti di autolisi, la sua massa molecolare di circa 24 kDa che ne facilita la penetrazione nel gel, oltre che la sua attività costante in diversi solventi ed agenti denaturanti e la formazione di peptidi in un range di massa tra i 500 e i 3000 Da, appropriato per l'analisi di massa (Hustoft *et al.*, 2012). La digestione triptica, a seconda dell'approccio scelto per l'identificazione proteica, può essere condotta in gel o in soluzione. Per approcci basati sulla separazione elettroforetica mono o bi-dimensionale delle proteine è richiesta necessariamente una digestione in gel, che consiste in un processo lungo e tedioso (Lopez-Ferrer *et al.*, 2006). Approcci basati sulla separazione cromatografica delle proteine, invece, richiedono la

digestione in soluzione, caratterizzata in genere da procedure più veloci e più semplici in termini di manipolazione del campione (Capelo *et al.*, 2009).

2.3 LA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che trova applicazione in svariati ambiti in quanto capace di fornire informazioni circa la composizione qualitativa e quantitativa di analiti in miscele complesse, la struttura di specie molecolari, nonché i rapporti isotopici degli elementi costituenti il campione. Un altro grande vantaggio che depone a favore di questa tecnica è la quantità di campione molto limitata (in alcuni casi meno di un picogrammo) e concentrazioni molto basse in miscele complesse (fino a una parte per mille miliardi). Le sue caratteristiche come l'ottima sensibilità e il limite di rivelazione, pongono la spettrometria di massa in una rilevante posizione tra le tecniche analitiche (Raffaelli, ASMS, 2005). Anche se i principi della spettrometria di massa sono utilizzati in vasti campi di applicazione, la maggior parte degli esempi di analisi riguardano la classe di molecole organiche (Hesse *et al.*, 2010).

Il principio di funzionamento di uno spettrometro di massa consiste nella formazione di ioni a partire dalle molecole neutre del campione e nella loro separazione in funzione del loro rapporto massa su carica (m/z). Le componenti che costituiscono uno spettrometro di massa sono :

- ✓ Sistema di introduzione del campione;
- ✓ Sorgente;
- ✓ Analizzatore;
- ✓ Rivelatore;
- ✓ Sistema da vuoto;
- ✓ Sistema di elaborazione.

Secondo la rappresentazione schematica riportata in Figura 4, uno spettrometro di massa può essere suddiviso in quattro blocchi funzionali (Skoog *et al.*, 2009). Il primo stadio dell'analisi spettroscopica è la produzione di ioni in fase gassosa dei composti da analizzare (DeHoffmann *et al.*, 2007); in una seconda fase gli ioni prodotti arrivano in fase gassosa all'interno di un analizzatore, la cui funzione è quella di separare tutti gli ioni in base al loro rapporto m/z . Una volta separati gli ioni, questi vengono raccolti in un rivelatore che emette un segnale elettrico proporzionale alla quantità di ioni; il segnale elettrico viene poi elaborato fino ad ottenere lo spettro di massa.

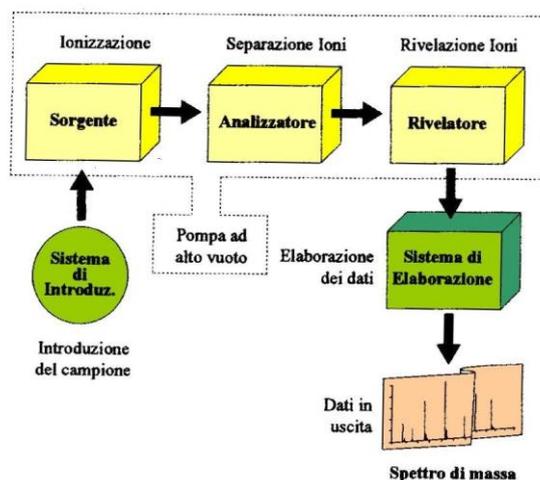


Fig. 4 Schema delle componenti di uno spettrometro di massa.

Questa tecnica analitica è diventata rapidamente uno strumento fondamentale per la moderna biologia e biochimica. La spettrometria di massa è ormai la tecnologia leader per la proteomica grazie allo sviluppo di nuove sorgenti di ioni, quali la ionizzazione elettrospray (ESI) e la ionizzazione per desorbimento laser assistita da matrice (MALDI). Con queste tecnologie è possibile: determinare la sequenza di amminoacidi delle

proteine; trovare le posizione e la struttura di modificazioni post-traduzionali; osservare le interazioni non covalenti di proteine con DNA, substrati o altre proteine (Moyer & Cotter, 2002).

2.4 LE SORGENTI IONICHE IN PROTEOMICA

Le due sorgenti di ioni di spicco nell'ambito della spettrometria di massa applicata alla proteomica, l'ESI e il MALDI, sono per molti aspetti complementari. Il MALDI è utilizzato per campioni solidi e proteine in gel o su altre superfici; l'ESI invece, per campioni in soluzione, ed è ben nota per il suo successo nell'accoppiare cromatografia liquida e spettrometria di massa (O'Farrel 1975). Entrambe sono tecniche di ionizzazione soft ma sfruttando dei meccanismi di ionizzazione del tutto diversi, si differenziano per il tipo di ioni che generano. Sorgenti MALDI producono esclusivamente ioni con carica unitaria per aggiunta o rimozione di un solo protone alla molecola e formazione quindi di addotti mono-protonati o mono-deprotonati: $[M+H]^+$, $[M-H]^+$. Sorgenti ESI invece, producono facilmente non solo addotti mono-protonati e multi-protonati $[M+nH]^{n+}$, ma anche addotti con ioni di metalli alcalini quali sodio, potassio e litio $[M+Me]^+$ (Russel. & Roberts 2005).

Nel caso di miscele complesse come digeriti proteici, spesso è necessario utilizzare entrambe le sorgenti per identificare tutti i componenti della miscela campione. Alma Burlingame, noto professore di chimica e chimica farmaceutica afferma: "Con sorgenti MALDI, i componenti rivelati dipenderanno in modo significativo dalla matrice utilizzata; con sorgenti ESI, se la miscela non viene separata, si identificano pacchetti di componenti, alcuni dei quali già rivelati con la tecnica MALDI, altri no. Solo utilizzando entrambe le tecniche si avrà una maggiore probabilità di trovare e quindi di identificare tutti i componenti della miscela." (Erickson, 2000).

MALDI ed ESI sono sorgenti del tutto differenti nel caso di analisi di peptidi e proteine, ognuna con specifici vantaggi rispetto all'altra. Tra le caratteristiche più importanti delle due sorgenti sono di sicuro incluse la capacità di gestire miscele complesse per il MALDI e la possibilità di essere direttamente interfacciata a cromatografi liquidi per l'ESI. In termini di performance con analizzatori standard (TOF per il MALDI e trappola ionica quadrupolare per l'ESI), le due sorgenti mostrano risultati comparabili per ioni con massa piccola (peptidi), mentre per ioni più pesanti (proteine), la tecnica ESI-quadrupolo garantisce migliore risoluzione e accuratezza (Fig. 5) (Trauger *et al.*, 2002). Le due sorgenti però non sono intercambiabili, in quanto l'ESI lavora a pressione atmosferica, il MALDI in condizioni di vuoto; pertanto per condurre analisi di massa ESI e MALDI è necessario disporre di due differenti spettrometri, ma questo limite appartiene ormai al passato.

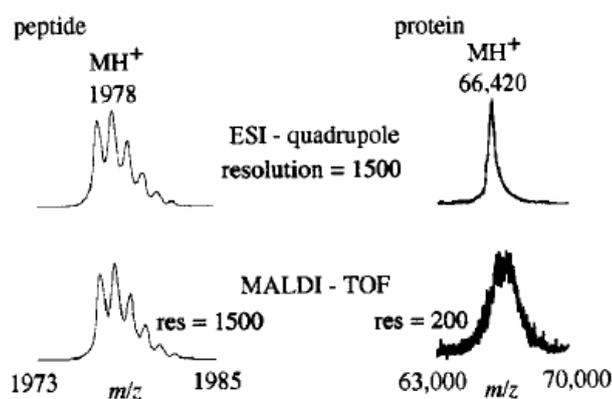


Fig. 5 Confronto diretto di dati di peptide e proteina ottenuti da spettrometri di massa ESI-quadrupolo e MALDI-TOF.

Nel 1999 è stata introdotta una nuova tecnica di ionizzazione a pressione atmosferica, la ionizzazione per desorbimento laser assistito da matrice a pressione atmosferica (API- MALDI) (Creaser & Ratcliff, 2006). Questa tecnica di ionizzazione presenta diverse caratteristiche in comune con le convenzionali sorgenti MALDI che operano sotto vuoto, inclusa la natura

della matrice, le proporzioni tra matrice ed analita, la procedura di preparazione del campione e l'energia del raggio laser incidente. I vantaggi di questa tecnica includono la semplicità di manipolazione del campione in condizioni di pressione atmosferica, una ionizzazione ancora più soft rispetto alla tecnica convenzionale MALDI ed un aumento di risoluzione per i singoli componenti delle miscele complesse di analita. Un'altra caratteristica importante dell'API-MALDI è che si tratta di una sorgente di ioni esterna all'analizzatore di massa; pertanto può essere accoppiata a qualunque spettrometro di massa capace di analizzare gli ioni a pressione atmosferica. In particolare, gli strumenti con sorgente electrospray possono essere facilmente convertiti in modalità API-MALDI sostituendo la sorgente esterna, con la possibilità di ottenere uno strumento "all in one", capace di utilizzare differenti tecniche di ionizzazione a pressione ambiente, dall'elettrospray alla ionizzazione chimica a pressione ambiente (ESI, APCI, API-MALDI) (Laiko *et al.*, 2000).

2.4.1 Sorgente ESI

Nel corso dell'ultimo decennio, la spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS) (Yamashita & Fenn, 1984) si è affermata come potente strumento di analisi di molecole non volatili ad alto peso molecolare, soprattutto in ambito biochimico. Questa tecnica di ionizzazione è ormai ampiamente utilizzata per analisi di molecole biologiche, specialmente peptidi e proteine (Fenn *et al.*, 1990; Abersold & Mann, 2003). È un dispositivo di ionizzazione a flusso continuo capace di ionizzare facilmente sia proteine ad alto peso molecolare che piccoli peptidi leggeri.

In un dispositivo ESI standard (Fig. 6), una soluzione contenente l'analita di interesse viene iniettata in un tubo capillare, a cui viene applicato un elevato

potenziale, e finemente nebulizzata. L'applicazione del potenziale, porta alla deposizione di un elevato numero di cariche per ogni gocciolina generata dalla nebulizzazione, formando così uno spray di goccioline cariche. Quando la repulsione elettrostatica tra le goccioline cariche diventa più forte delle forze coesive del liquido, si verifica un fenomeno definito esplosione coulombiana, per cui il solvente evapora e gli ioni dell'analita passano in fase gassosa. Il processo di ionizzazione è a bassa energia e permette di ionizzare, senza decomporli, anche molecole termolabili e non volatili. La ionizzazione ESI può essere utilizzata per ogni composto che in soluzione forma degli ioni addotto (ad esempio addotti con ioni H^+ , Na^+ o NH_4^+) e può fornire sia ionizzazione positiva che negativa. Gli ioni che si formano durante il processo di elettronebulizzazione ESI possono essere mono-carica o multi-carica a seconda delle caratteristiche degli analiti e del solvente di trasporto (la scelta di queste variabili è quindi importante). Per ottenere una ionizzazione ESI efficiente è necessario non utilizzare soluzioni contenenti sali, ottimizzare il pH del sistema solvente costituito da soluzioni organiche e/o acquose con acidi e basi volatili e usare flussi non superiori a 200 $\mu l/min$.

Tuttavia, sebbene la ionizzazione ESI sia applicata ordinariamente per un'ampia varietà di indagini analitiche, esistono dei casi limite che evidenziano i limiti di questa tecnica rispetto ad una efficiente ionizzazione dell'analita e quindi alla sua rivelazione. Ad esempio, non è ancora possibile ottenere, con tale tecnica, un'efficiente ionizzazione di composti idrofili, utilizzando le condizioni standard di velocità di flusso (Tang & Kebarle, 1993).

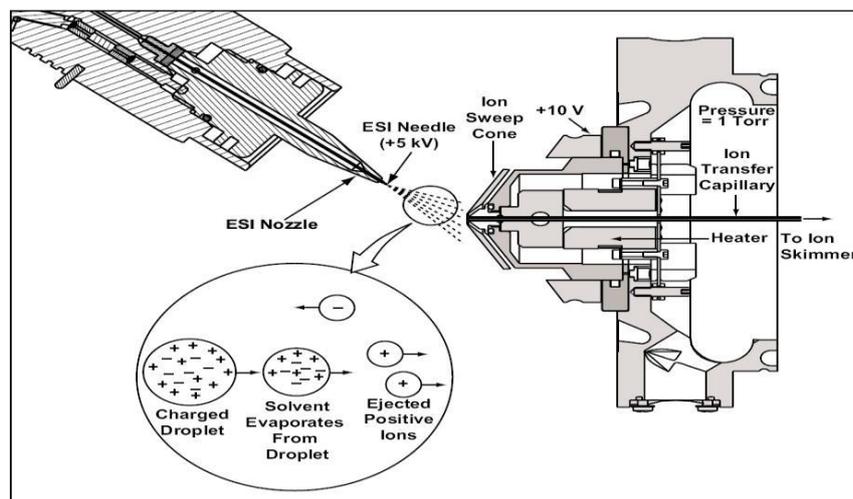


Fig. 6 Processo ESI nella modalità di ionizzazione positiva.

Sono molti i casi per cui le velocità di flusso tipicamente ottenute con normali pompe a siringa e le dimensioni standard degli aghi impiegati non garantiscono un'efficiente ionizzazione. L'efficienza di ionizzazione dipende fortemente dalle dimensioni delle goccioline cariche generate nella sorgente: maggiore saranno le dimensioni delle gocce, maggiore dovrà essere il numero di esplosioni coulombiane necessarie per la formazione di ioni in fase gassosa. Le dimensioni delle goccioline dipendono a loro volta dalle condizioni di ionizzazione come dimensione dell'ago e velocità di flussi di iniezione dell'analita. Con la necessità di avere sensibilità sempre maggiore, direttamente connessa all'efficienza di ionizzazione, sono stati sviluppati aghi per la ionizzazione di dimensioni ridotte (Emmet & Caprioli, 1994) e nuove varianti nella tecnica di ionizzazione. Wilm e Mann hanno sviluppato la tecnica di ionizzazione nanoelettrospray (nano-ESI) (Wilm & Mann, 1994) che ha la particolare caratteristica di utilizzare velocità di flusso, per l'introduzione del campione, molto ridotte. Operando con basse velocità di flusso, le gocce cariche generate hanno dimensioni iniziali molto più piccole, e questo garantisce una migliore efficienza di ionizzazione. Questa tecnologia offre vantaggi importanti rispetto alla metodologia classica quali la riduzione

di consumo del campione, un aumento della sensibilità ed elevata velocità di analisi, oltre che la possibilità di automatizzazione del sistema (Schmidt *et al.*, 2003).

2.5 L'ANALIZZATORE A RISONANZA IONICA CICLOTRONICA

L'analizzatore di massa a risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier, ha fatto la sua prima comparsa nel 1974 (Comisarow & Marshall, 1974). Sviluppato da Comisarow e Marshall all'Università della British Columbia, nel corso degli anni ha assunto un'importanza sempre maggiore, in quanto fin da subito sono state riconosciute le enormi potenzialità di questo strumento in ambito analitico. Le caratteristiche che hanno reso questa tecnica vincente sono di sicuro l'alta risoluzione sulle misure di massa e l'ampio range di masse rivelabili.

Lo spettrometro di massa a risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR) è un particolare analizzatore di massa per la determinazione del rapporto massa carica (m/z) degli ioni, che sfrutta la frequenza di ciclotrone degli stessi in un campo magnetico costante (Marshall *et al.*, 1998).

Lo spettrometro FT-ICR, rappresentato in Figura 7, rientra nella categoria degli analizzatori a trappola, in quanto gli ioni vengono confinati elettrostaticamente in una cella posta all'interno di un campo magnetico costante (Fig. 8). L'applicazione di un impulso a radiofrequenza tra due piastre della cella, che fungono da trasmettitore (piastre di eccitazione), induce un moto orbitale coerente degli ioni. Gli ioni in moto orbitale generano una debole "corrente immagine" che viene raccolta da altre due piastre della cella che fungono da ricevitore (piastre di rivelazione). La frequenza del segnale generato da un particolare ione sarà la medesima

della sua frequenza orbitale che a sua volta è inversamente proporzionale al rapporto massa/carica. Invece l'intensità del segnale, per una data radiofrequenza, è proporzionale al numero di ioni aventi il corrispondente rapporto massa/carica.

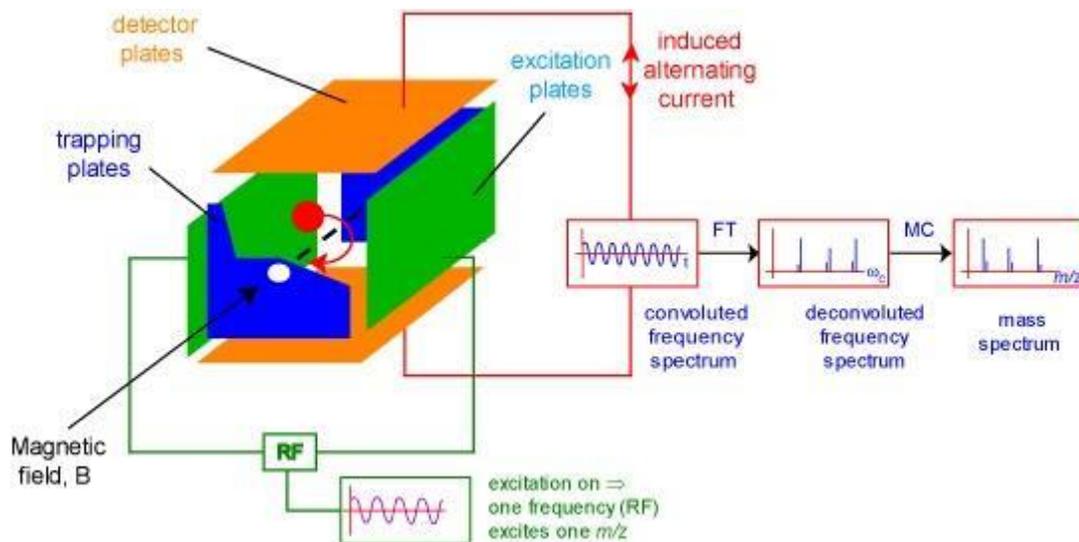


Fig. 7 Spettrometro FT-ICR.

Gli ioni vengono intrappolati all'interno di una cella cubica sotto l'influenza di bassi potenziali e di un campo magnetico costante; la frequenza del segnale misurato alla piastra di rivelazione è inversamente proporzionale alla massa dello ione.

Negli analizzatori FT-ICR è importante mantenere la pressione interna molto bassa (10^{-8} - 10^{-9} Torr) in modo da garantire il moto orbitale degli ioni per un tempo più lungo possibile e misurare la frequenza numerose volte per ottenere un'accuratezza molto elevata (Raffaelli ASMS, 2005). Analizzatori a risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier hanno di per sé un'elevatissima accuratezza nelle misure di massa, dovuta al fatto che la frequenza può essere misurata molto più accuratamente rispetto ad altre proprietà fisiche, proprie di altri analizzatori di massa (Wineland 1984).

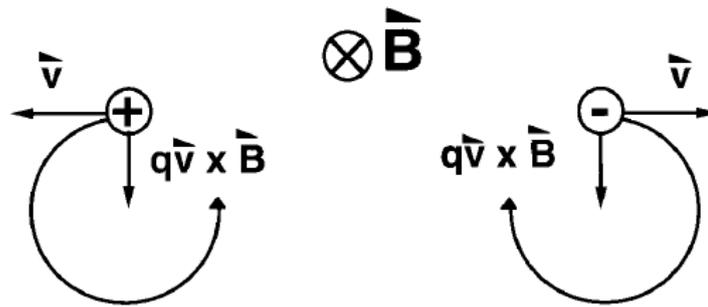


Fig. 8 Movimento ionico ciclotronico di ioni positivi e negativi in presenza di un campo magnetico.

I componenti essenziali di analizzatore di massa in trasformata di Fourier sono il magnete e la cella di intrappolamento, oltre al sistema da vuoto e quello di elaborazione dei dati, comuni anche ad altri spettrometri di massa.

I magneti utilizzati per analizzatori a risonanza ionica ciclotronica, sono magneti superconduttori in quanto garantiscono campi magnetici di intensità molto più elevata rispetto ai normali magneti. Essi permettono di lavorare con campi magnetici che vanno dai 3 fino ai 9.4 Tesla (T). Ciò si rivela essere importante ai fini delle performance dello strumento, le quali dipendono sensibilmente dalla forza del campo magnetico stesso.

Il componente che rappresenta il cuore dello strumento è la cella, dove gli ioni vengono intrappolati, eccitati ed infine rivelati. Le prime celle sviluppate erano celle chiuse di forma cubica, costituite da sei piatti elettroodici disposti proprio a forma di cubo. Le celle di forma cubica, mostrate in Figura 9 B, normalmente sono disposte, rispetto al magnete, in modo che una coppia di piatti elettroodici sia ortogonale al vettore campo magnetico e le altre due coppie di piatti parallele ad esso. I piatti perpendicolari al campo magnetico sono definiti "trapping plates", uno di essi è caratterizzato da un foro per l'ingresso e l'uscita di ioni all'interno della cella. I restanti quattro piatti

elettrodi, paralleli al vettore campo magnetico, hanno il compito di eccitare e rivelare gli ioni presenti nella cella.

In tempi più recenti sono state sviluppate celle con forme e configurazioni differenti, come le celle cilindriche (Fig. 9 A). In apparenza quest'ultime differiscono dalle convenzionali celle cubiche ma svolgono la medesima funzione. Queste celle sono orientate in modo che l'asse principale del cilindro sia allignato col vettore campo magnetico. Sono costituite anch'esse da due "trapping electrodes", che in questo caso hanno forma cilindrica e sono disposti alle estremità della cella. La parte centrale della cella cilindrica è costituita invece da quattro elettrodi, che svolgono le medesime funzioni dei piatti di eccitazione e rivelazione nel caso della cella cubica. Oggigiorno questa configurazione di cella aperta cilindrica è la più diffusa ed utilizzata, in quanto presenta il grande vantaggio di facilitare molto l'ingresso degli ioni nella cella, facendo migliorare molto l'efficienza di pompaggio nonché di intrappolamento degli ioni e la rivelazione degli stessi (Amster, 1996).

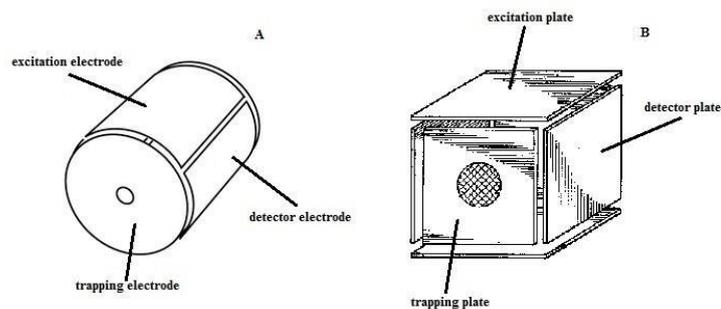


Fig. 9 A) Cella cilindrica; B) cella cubica.

2.5.1 Orbita ionica ciclotronica: frequenza e raggio

E' noto che una particella carica che si muove in un campo magnetico di intensità costante risentirà di una certa forza che avrà direzione perpendicolare al piano definito dal vettore velocità dello ione e dal vettore

campo magnetico. L'intensità di questa forza, definita forza di Lorentz dipenderà dalla carica e dalla velocità dello ione, nonché dall'intensità del campo magnetico. In presenza della forza di Lorentz, ioni con velocità costante che non subiscono urti con altre particelle, descriveranno traiettorie perfettamente circolari sul piano perpendicolare al vettore campo elettrico (Fig. 10).

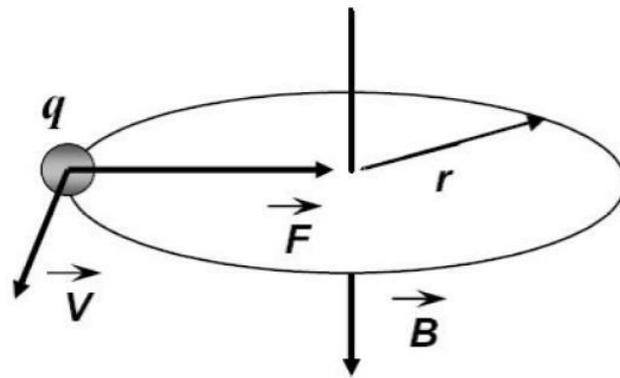


Fig. 10 Rotazione di uno ione in un campo magnetico.

Particelle che si muovono in moto circolare uniforme sono soggette ad una accelerazione il cui modulo è uguale al rapporto tra il quadrato della velocità e il raggio della circonferenza descritta.

$$\alpha = v_{xy}^2 / r$$

Sostituendo l'equazione dell'accelerazione nell'equazione della forza di Lorentz avremo:

$$m = v_{xy} / r = qB_0 / q B$$

Dato che la velocità angolare lungo l'asse z è definita $\omega = v_{xy} / r$, l'equazione precedente diventa:

$$\omega_c = qB_0 / m$$

Questa equazione è nota come equazione di ciclotrone, in cui la frequenza ciclotronica di uno ione imperturbato è definita ω_c . La frequenza è inversamente proporzionale al rapporto massa/carica dello ione; ogni ione con un certo rapporto m/z descriverà traiettorie circolari all'interno della cella con una propria frequenza. La caratteristica da sottolineare di questa equazione è quella per cui tutti gli ioni con un certo rapporto massa/carica hanno la medesima frequenza di ciclotrone indipendentemente dalla loro velocità. Questa proprietà fa della risonanza ionica ciclotronica uno strumento particolarmente utile per la spettrometria di massa, in quanto non è necessario focalizzare l'energia traslazionale degli ioni per una precisa determinazione del rapporto massa/carica.

Vero è che la frequenza ciclotronica degli ioni è indipendente dalla loro velocità, però la velocità dello ione influisce in modo direttamente proporzionale al raggio della traiettoria dello ione stesso. Il raggio della traiettoria di un certo ione cresce proporzionalmente con la velocità; se il raggio diventa più grande di quello della cella, che è di qualche centimetro, lo ione viene espulso, non può essere confinato nella cella e rivelato (DeHoffmann *et al.*, 2007).

Fortunatamente nell'equazione compare al denominatore anche il modulo del vettore campo magnetico; ciò vuol dire che maggiore è l'intensità del campo magnetico più piccola sarà il raggio dell'orbita percorsa dallo ione. In pratica, gli ioni sono confinati in celle con dimensioni di qualche centimetro, in presenza di un campo magnetico costante con intensità che varia tipicamente dai 3 ai 9.4 T. La scelta di utilizzare campi magnetici di intensità compresa in questo intervallo dipende da tre fattori principali. Con ioni con masse tra i 15 e i 10000 Da, tipiche di molecole organiche, con questi valori di intensità del campo magnetico, si ottengono frequenze di ciclotrone in un

range che va da pochi kHz a pochi MHz, facile da gestire dai componenti elettronici commercialmente disponibili (Fig. 11).

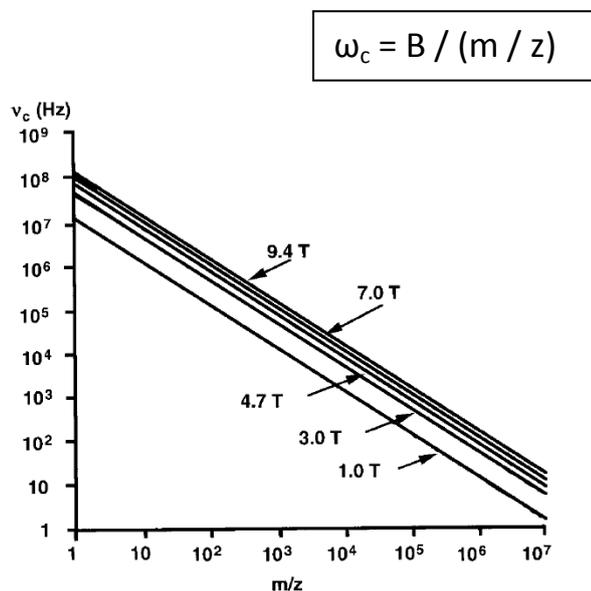


Fig. 11. Frequenza ICR (ν_c), in Hz, come funzione del rapporto massa/carica a differenti valori di intensità di campo magnetico, si noti come la frequenza ICR per ioni con rapporti massa/carica usuali ($\sim 15 < m/z < 10000$) sia compresa tra pochi kHz e pochi MHz.

Inoltre con questi valori di intensità di campo magnetico, a temperatura ambiente, è possibile confinare anche ioni di molecole grandi, in orbite con raggi ragionevolmente piccoli (Fig. 12 a), nonché eccitarli ad elevate energie traslazionali ($> 1 \text{ keV}$) lasciando il raggio dell'orbita entro paragonabili alle dimensioni delle celle ($\sim 1 \text{ cm}$) (Fig. 12 b).

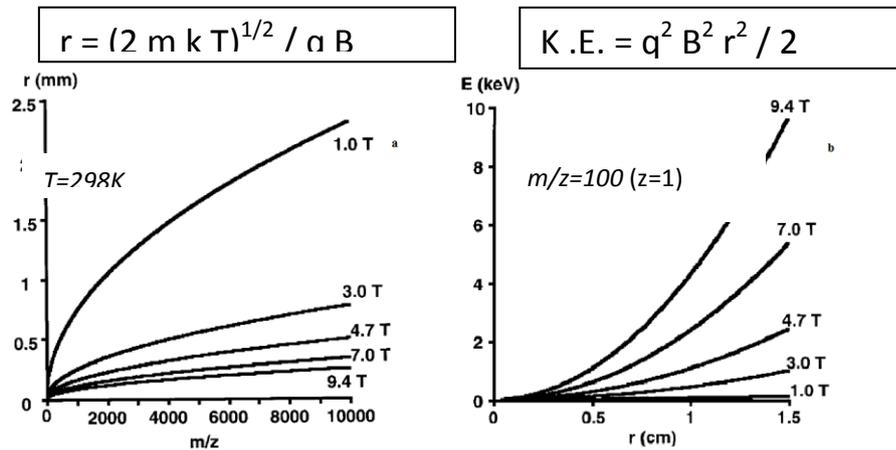


Fig. 12 a) Raggio ICR (r) in funzione del rapporto massa/carica a 298K a differenti valori di intensità di campo magnetico, si noti come anche gli ioni più pesanti siano confinati in orbite convenientemente piccole; b) energia cinetica traslazionale (E) in funzione del raggio ICR a differenti valori di intensità di campo magnetico, si noti come gli ioni riescano ad essere accelerati ad energie relativamente alte pur rimanendo confinati in orbite relativamente piccole (~ 1 cm).

2.5.2 Eccitazione e rivelazione del segnale ICR

Sebbene gli ioni in presenza di un campo magnetico statico eseguano un movimento circolare, ponendoli semplicemente tra una coppia di elettrodi di rivelazione non produrranno alcun segnale; è necessario eccitare un pacchetto di ioni con un determinato rapporto massa/carica coerentemente fino ad un'orbita ciclotronica di raggio maggiore, in modo che il pacchetto di ioni induca una differenza oscillante di cariche tra i due elettrodi di rivelazione opposti (Marshall & Grosshans, 1991). L'eccitazione dei pacchetti di ioni è prodotta per applicazione di un campo elettrico oscillante, spazialmente uniforme, con frequenza uguale o simile a quella di ciclotrone degli ioni con un particolare rapporto massa/carica. Quest'eccitazione è utilizzata in tre possibili differenti modi in spettrometria di massa: per accelerare gli ioni coerentemente fino al massimo raggio orbitale possibile e rivelarli; per far aumentare l'energia cinetica degli ioni oltre la loro soglia di dissociazione causando la dissociazione degli ioni e/o delle molecole reagenti; per accelerare gli ioni fino ad un'orbita ciclotronica con raggio

maggiore di quello della trappola per espellere gli ioni stessi dall'analizzatore (Fig. 13).

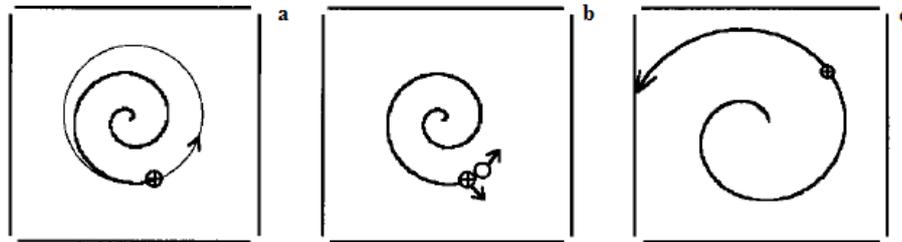


Fig. 13 Uso dell'eccitazione ionica ciclotronica. a) accelerazione di ioni; b) frammentazione di ioni; c) espulsione di ioni.

Il campo elettrico applicato è spazialmente uniforme ma oscillante nel tempo, lungo il piano perpendicolare al vettore campo magnetico. E' generato per applicazione di voltaggio $\pm V_0$ ai due elettrodi di eccitazione posti ad una certa distanza d tra loro ed avrà intensità E_0 :

$$\mathbf{E}(t) = E_0 \cos \omega_c t \mathbf{j}$$

$$E_0 = 2V_0/d$$

Uno ione con frequenza di ciclotrone ω_c in presenza di un campo elettrico oscillante con la medesima frequenza assorbirà una quantità di energia pari al prodotto tra vettore campo elettrico, vettore velocità dello ione e carica dello ione.

$$A(t) = q\mathbf{E}(t)\mathbf{v}_{xy}$$

In questo modo aumenta la velocità dello ione, quindi il raggio della sua orbita ciclotronica. Lo ione descriverà una traiettoria ad spirale fintanto che è applicato il campo elettrico oscillante. Rimosso il campo elettrico oscillante, il pacchetto di ioni interessato continua il moto orbitalico su una traiettoria con raggio costante.

$$r = E_0 T_{excite} / 2B_0$$

È importante notare come dopo l'eccitazione del pacchetto di ioni, nell'equazione del raggio orbitalico, non c'è dipendenza dal rapporto massa/carica. Ciò vuol dire che tutti gli ioni, indipendentemente dal loro rapporto m/z , possono essere eccitati fino a descrivere orbite ciclotroniche col medesimo raggio. Per ottenere ciò non basta però fare una normale scansione della frequenza del campo elettrico oscillante, bensì è necessario scansionare la frequenza variando contemporaneamente l'intensità E_0 del campo elettrico.

Con l'azione combinata del campo magnetico ed elettrico, il movimento degli ioni in una trappola ICR, non è più il solo moto ciclotronico con frequenza ciclotronica, ma una combinazione di un'oscillazione assiale e due moti circolari: moto del ciclotrone e moto del magnetrone, come mostrato in Figura 14.

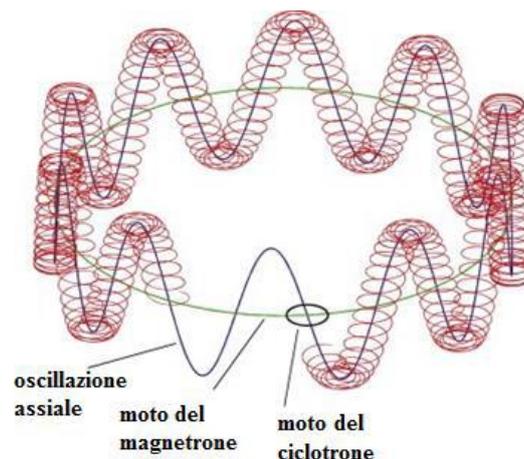


Fig.14 Moto ionico nella trappola ICR.

Il moto circolare degli ioni in prossimità degli elettrodi che costituiscono la cella genera a sua volta una debole corrente capacitiva che viene raccolta dai due elettrodi di rivelazione (Fig. 15). Questa corrente definita corrente immagine è frutto della differenza netta di carica indotta dagli ioni sui due elettrodi. Quando un pacchetto di ioni positivi passa vicino ad uno dei due elettrodi di rivelazione induce il flusso di elettroni del circuito esterno verso quell' elettrodo e, continuando il suo moto verso l'elettrodo opposto, causerà un'inversione del flusso elettronico del circuito esterno. Si ottiene così una corrente alternata la cui frequenza dipenderà dalla frequenza di ciclotrone dello ione quindi dal suo rapporto massa/carica e la cui intensità dipenderà in modo proporzionale dal numero di ioni con quel determinato rapporto m/z .

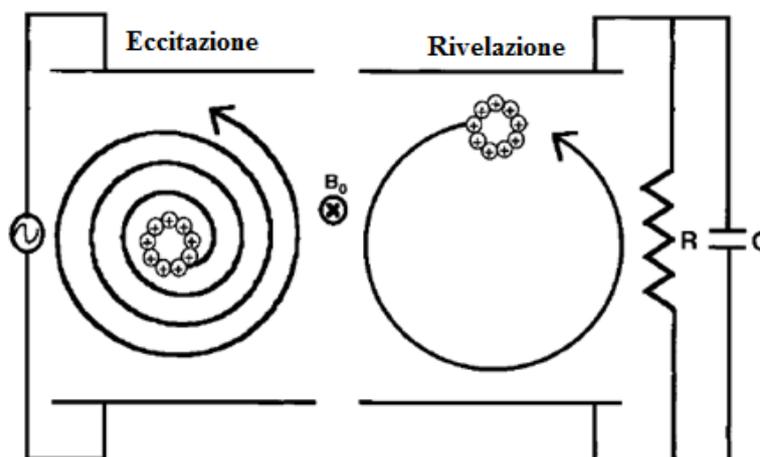


Fig. 15 Elettrodi di rivelazione

2.5.3 Trasformata di Fourier

La corrente immagine raccolta dai due elettrodi di rivelazione, è una corrente capacitiva che diminuisce esponenzialmente nel tempo. Il segnale

di corrente alternata ottenuto sarà proporzionale al rapporto m/z del pacchetto di ioni e al numero di ioni presenti con lo stesso rapporto m/z , ma registrato nel dominio del tempo (funzione $h(t)$). Per ottenere lo spettro di massa, dove è riportata l'intensità del segnale in funzione del rapporto m/z , è necessario trasformare il segnale transiente dal dominio del tempo a quello delle frequenze (funzione $H(f)$).

Ciò è possibile realizzarlo tramite uno specifico operatore matematico. Esso consiste in una trasformata integrale che trova molte applicazioni nella fisica e nell'ingegneria; trasforma una funzione matematica definita nel dominio del tempo in una nuova funzione il cui argomento è la frequenza e viceversa. L'operatore matematico che consente di ottenere la risposta in frequenza è definito trasformata di Fourier.

$$H(f) = \int_{-\infty}^{\infty} h(t) \exp\{-j 2\pi f t\} dt$$

Questo operatore permette di ottenere, da un'onda descritta dalla funzione nel dominio del tempo, i valori di frequenza e ampiezza di tutte le sottoonde che la compongono. Consente di calcolare ampiezza, fase e frequenza di onde sinusoidali che, sommate tra loro, danno origine all'onda nel dominio del tempo. Nell'esempio riportato in Figura 16, viene applicata la trasformata di Fourier ad una funzione rettangolo nel dominio del tempo ottenendo un'onda sinusoidale nel dominio delle frequenze. I due grafici indicano la stessa funzione ma solo in due modalità diverse, una variabile nel tempo l'altra variabile nella frequenza.

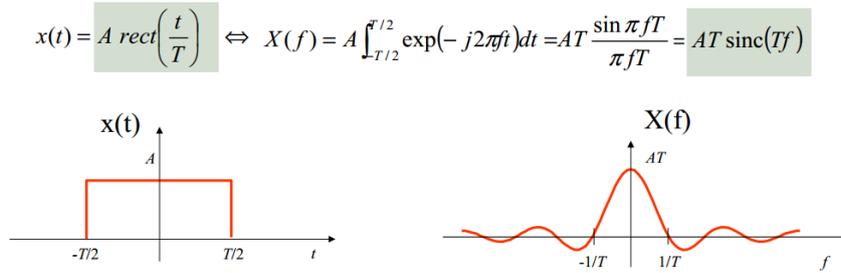


Fig.16 Applicazione dell'operatore trasformata di Fourier alla funzione rettangolo nel dominio del tempo.

Nella spettrometria di massa a trappola ionica ciclotronica, come in tutte spettroscopie a trasformata di Fourier, il tempo di acquisizione assume importanza notevole, in quanto condiziona direttamente la risoluzione dei picchi dello spettro. La risoluzione di un analizzatore di massa R_{FWHM} è definita come il rapporto tra la massa dello ione e l'ampiezza del picco a metà altezza.

$$R_{FWHM} = m / \Delta m_{50\%}$$

Nel caso specifico dell'analizzatore di massa a risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier, nella definizione di risoluzione compare anche la variabile tempo.

$$R = f_c T / 2$$

Maggiore è il tempo di acquisizione della corrente immagine, migliore sarà la risoluzione dei picchi. Quindi, sebbene la risoluzione decresca all'aumentare del rapporto m/z , prolungando il periodo di acquisizione della corrente nel dominio del tempo, la risoluzione cresce notevolmente, come mostrato nel grafico di Figura 17. Per ottenere tempi di acquisizione lunghi è necessario che gli ioni all'interno della cella abbiano un moto stabile e duraturo, quindi è necessario che non subiscano urti. Questo impone che all'interno della cella ci sia una condizione di vuoto spinto.

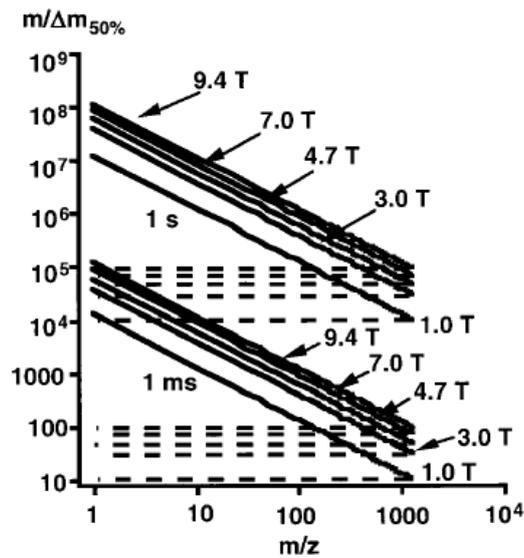


Fig. 17 Potere risolvete dello spettrometro di massa FT ICR a 1.0, 3.0, 4.7, 7.0 e 9.4 T come funzione del rapporto m/z , per tempi di acquisizione di 1 ms e 1 s.

2.6 RNA-SEQUENCING

Di recente, lo sviluppo di nuove metodologie di sequenziamento del DNA ha fornito un nuovo strumento per la mappatura e la quantificazione del trascrittoma. Un innovativo metodo, denominato RNA-Sequencing (RNA-Seq) mostra chiari vantaggi rispetto agli approcci esistenti, ed è previsto che rivoluzioni in breve tempo la metodologia di analisi dei trascrittomi degli eucarioti. Questa innovativa metodologia ha la capacità di fornire una “fotografia istantanea” della presenza e della quantità di RNA di una cellula in un determinato istante (Chu & Corey, 2012).

La metodologia RNA-Sequencing (RNA-Seq) utilizza le piattaforme di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) per quantificare l’abbondanza delle molecole di RNA (trascritti) e quindi per ottenere una misura del livello di espressione dei geni corrispondenti, in un campione biologico. Idealmente, la pipeline di un esperimento RNA-Seq dovrebbe

prevedere la sola estrazione dell'RNA dalla cellula di interesse e il suo diretto sequenziamento, senza manipolazioni che possano introdurre artefatti. In realtà, gli esperimenti di RNA-sequencing basati sui sequenziatori di seconda generazione prevedono un protocollo che include diverse fasi di manipolazione. Per prima cosa, l'RNA estratto dalla cellula viene frammentato in sequenze di dimensione inferiore, compresa tra i 200 e i 500 bp, per ottenere frammenti di dimensione compatibile con i sequenziatori in uso. Il processo di frammentazione è realizzato tramite idrolisi o nebulizzazione. Ottenuti i frammenti di RNA, questi vengono retrotrascritti in DNA. La retrotrascrizione (o trascrizione inversa) è il processo di sintesi di un filamento di DNA complementare a partire da un RNA. Nel processo di retrotrascrizione, dopo l'annealing di un primer al filamento di RNA, l'enzima trascrittasi inversa sintetizza un filamento di DNA complementare all'RNA stampo. Terminata la sintesi, si ottiene una molecola ibrida (un filamento di DNA e uno di RNA) di cui viene degradato parzialmente il filamento di RNA. I frammenti rimanenti di RNA servono allora da primer per sintetizzare il secondo filamento, producendo una molecola di DNA a doppio filamento, detta DNA complementare (cDNA). La retrotrascrizione dell'RNA in cDNA è resa necessaria dal fatto che i sequenziatori oggi disponibili sono in grado di sequenziare DNA e non direttamente RNA. Nei protocolli di RNA-seq oggi in uso, la retrotrascrizione viene effettuata dopo la frammentazione e non viceversa poiché in questo modo il bias (l'errore) introdotto è minore e il coverage (recupero) del trascritto risulta più uniforme. Le molecole di cDNA vengono quindi amplificate, aumentando il numero di copie di ciascun frammento, e fornite in input ai sequenziatori. Il sequenziatore ad oggi più utilizzato per applicazioni RNA-seq è il Genome Analyzer di Illumina. Il sequenziatore "legge" i frammenti in input, identificando l'ordine in cui le

basi nucleotidiche si susseguono. Le sequenze lette dai sequenziatori sono dette “read”. Le read NGS sono molto corte e presenti in numero elevato (si parla di milioni di read per singola run dello strumento). In un esperimento RNA-Seq, le read rappresentano i dati grezzi dai quali ricavare l’informazione sul livello di espressione dei geni del campione. Più numerose sono le copie di un trascritto in un campione, più probabilità avrà quel trascritto di essere sequenziato e di generare read. Per quantificare il numero di read riferite a ciascun gene, le read di ogni campione sono mappate su un genoma o un trascrittoma di riferimento. La fase di allineamento delle read sul riferimento presenta un aspetto critico: idealmente si vorrebbe trovare l’unica posizione del genoma in cui il riferimento sia identico alla read. In realtà il riferimento non sarà mai una rappresentazione perfettamente identica del campione biologico, a causa di errori di sequenziamento e/o di imperfetta similarità tra le sequenze del campione d’interesse e quelle del riferimento. Lo scopo dell’allineamento diventa quindi l’identificazione della posizione del genoma in cui ogni read ottiene il miglior match con il riferimento. Una volta determinate le posizioni delle read sul riferimento, è possibile contare il numero di read allineate su un gene (o trascritto o esone). Il totale delle read allineate su un gene è detto appunto “count” e può essere inteso come una misura del livello di espressione del gene stesso (Fig. 18). I count sono i dati finali di un esperimento di RNA-seq per la quantificazione del trascrittoma e sono memorizzati in matrici in cui le righe rappresentano i diversi geni e le colonne i diversi campioni sequenziali.

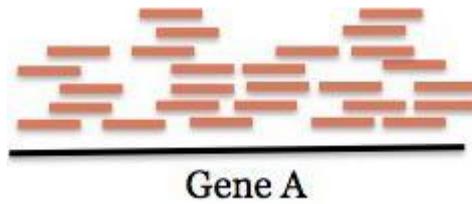


Fig. 18 Rappresentazione grafica di un count. Le read (indicate con le barrette arancioni) vengono allineate sul gene di riferimento. Il numero di read mappate è detto count. Nella rappresentazione grafica, il count del gene A è 27, cioè il numero di barrette arancioni associate al gene A.

Per la loro stessa definizione, dal punto di vista statistico i count rappresentano una somma di eventi aleatori indipendenti. Possono quindi essere descritti da una variabile aleatoria che segue una determinata distribuzione statistica.

BIBLIOGRAFIA

Abersold R. & Mann M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, 422, 198-207.

Allen R.C., Savaris C.A. & Maurer H.G. (1984). Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins, De Gruyter, Berlin.

Amster J. (1996). Fourier Transform Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 31, 1325-1337.

Angel T.E., Aryal U.K., Hengel S.M., Baker E.S., Kelly R.T., Robinson E.W. & Smith R.D. (2012). Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 3912-3928.

Capelo J., Carreira R., Diniz M., Fernandes L., Galesio M., Lodeiro C., Santos H.M., & Vale G. (2009). Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry based techniques, *Analytica Chimica Acta*, 650, 151-159. 2. Tecniche sperimentali

Chhabra N. Electrophoresis-a brief review, pubblicato il 6 Novembre 2011 su www.namrata.co.

Choe L.H. & Lee K.H. (2000). A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: The multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell, *Electrophoresis*, 21, 993-1000.

Chu Y. & Corey D.R. (2012). RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation, *Nucleic Acid Ther.*, 22, 271-274.

Comisarow M.B. & Marshall A.G. (1974). Frequency-sweep fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chemical Physics Letters*, 26, 489-490.

Creaser C.S. & Ratcliffe L. (2006). Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: A Review, *Current Analytical Chemistry*, 2, 9-15.

DeHoffmann E., Charette J. & Stroobant V. (2007). Mass Spectrometry principles and applications, John Wiley & Sons, Chichester.

Emmett M.R. & Caprioli R.M. (1994). Micro-electrospray mass spectrometry: Ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5, 605-613.

Erickson B. (2000). Atmospheric pressure MALDI, *Anal. Chem.*, 72, 186A-186A.

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. & Whitehouse C.M. (1990). Electrospray ionization-principles and practice, *Mass Spectrom. Rev.*, 9, 37-70.

Giometti C. S., Gemmell M.A., Tollaksen S.L. & Taylor J. (1991). Quantitation of human leukocyte proteins after silver staining: a study with two-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis*, 12, 536-543.

Hesse M., Meier H. & Zeeh B. (2010). Metodi spettroscopici in Chimica Organica, II ed., Edises, Napoli.

Hustoft H.K., Malerod H., Wilson S.R., Reubsaet L., Lundanes E. & Greibrokk T. (2012). A critical review of Trypsin digestion for LC-MS based proteomics, *Integrative proteomics*, H.C. Leung, 73-92.

Laiko V.V., Moyer S.C. & Cotter R.J. (2000). Atmospheric Pressure MALDI/Ion Trap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 5239-5243.

Lopez-Ferrer D., Canas B., Vazquez J., Lodeiro C., Capelo J., Rial-Otero R. & Moura I. (2006). Sample treatment for protein identification by mass spectrometry based techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25, 996-1005.

Macri J., McGee B., Thomas J.N., Du P., Stevenson T.I., Kilby G. W. & Rapundalo S.T. (2000). Cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal proteins separated by two-dimensional electrophoresis: surfactant effects on membrane solubilization, *Electrophoresis*, 21, 1685-1693.

Marshall A.G. & Grosshans P.B. (1991). Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: the teenage years, *Anal. Chem.*, 63, 215-229.

Marshall A.G., Hendrickson C.L. & Jackson G.S. (1998). Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, *Mass Spectrom. Rev.*, 17, 1-35.

- Molloy M.P.** (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilizer pH gradients, *Anal. Biochem.*, 280, 1-10.
- Moyer S.C., & Cotter R.J.** (2002). Atmospheric Pressure MALDI, *Anal. Chem.*, 74, 468A-476A.
- O'Farrell P.H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol.Chem.*, 250, 4007-4021.
- Rabilloud T.** (1990). Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis, *Electrophoresis*, 11, 785-794.
- Rabilloud T.** (1999). Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis, *Methods Mol. Biol.*, 112, 9-91.
- Rabilloud T., Strub J.M., Luche S., van Dorselaer A. & Lunardi J.** (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels, *Proteomics*, 1, 699-704.
- Rabilloud T., Strub J.M., Luche S., Van Dorselaer A. & J. Lunardi.** (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels, *Proteomics*, 1, 699-704
- Raffaelli A.** Che cos'è la spettrometria di massa, traduzione da "What is mass spectrometry, *ASMS (American Society for Mass Spectrometry)*.
- Richert S., Luche S., Chevallet M., Van Dorselaer A., Leize-Wagner E., & Rabilloud T.** (2004). About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry, *Proteomics*, 4, 909-916.
- Righetti P.G.** (1990). Recent developments in electrophoretic methods, *J. Chromatogr.*, 516, 3-22.
- Russell C.A. & Roberts G.K.** (2005). Chemical history: reviews of the recent literature, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Schmidt A., Karas M. & Dulcks T.** (2003). Effect of Different Solution Flow Rates on Analyte Ion Signals in Nano- ESI MS, or: When Does ESI Turn into Nano- ESI?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 492-500.

- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., & Mann M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.*, 68, 850-858.
- Skoog D.A., Holler F.J. & Crouch S.R.** (2009). Chimica analitica strumentale, II ed., Edises, Napoli.
- Switzar L., Giera M. & Niessen W.M.A.** (2013). Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, *J. Proteome Res.*, 12, 1067-1077.
- Tang L. & Kebarle P.** (1993). Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution, *Anal. Chem.*, 65, 3654-3668.
- Trauger S.A., Siuzdak W.W. & G. Siuzdak** (2002). Peptide and protein analysis with mass spectrometry, *Spectroscopy*, 16, 15-28.
- Westermeier R.** (2006). Sensitive, Quantitative, and Fast Modifications for Coomassie Blue Staining of Polyacrylamide Gels, *Proteomics*, 6, 61-64.
- Wilm M.S. & Mann M.** (1994). Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last?, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 136, 167–180. 2. Tecniche sperimentali
- Wineland D.J.** (1984). Trapped Ions, Laser Cooling, and Better Clocks, *Science*, 226, 395-400.
- Winkler C., Denker K., Wortelkamp S., & Sickmann A.** (2007). Silver-and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS, *Electrophoresis*, 28, 2095-2099.
- Yamashita M. & Fenn J.B.** (1984). "Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme", *J. Chem. Phys.*, 88, 4451–4459.
- Yan J.X., Harry R.A., Spibey C. & Dunn M.J.** (2000). Postelectrophoretic staining of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes, *Electrophoresis*, 21, 3657-3665.
- Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H. & M.J. Dun.** (2000), A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with

matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry, *Electrophoresis*, 21, 3666-3672.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI UTILIZZATI

Tutti i reagenti impiegati ed i composti chimici, sono stati acquistati dalle ditte Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) Bio-Rad e Fluka-Chemika (Buchs, Switzerland). L'acqua distillata è stata prodotta dal distillatore Elix 3 (Millipore) e l'acqua ultrapura dal bidistillatore MILLIPORE simplicity (Millipore).

3.1.1 Soluzioni:

Soluzione fisiologica di Pringle: 9 g/l NaCl, 4 g/l glucosio, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l CaCl₂.

Coomassie brilliant blue: 25 g/l Coomassie brilliant blue, 45% [v/v] metanolo, 45% [v/v] H₂O, 10% [v/v] acido acetico glaciale.

Stacking gel 5%: 5% [v/v] acrilammide, 0.126 M Tris HCl pH 6.8, 0.1% [v/v] SDS, 0.1% [v/v] ammonio persolfato, 0.1% [v/v] TEMED.

Running gel 12.5%: 12.5% [v/v] acrilammide, 0.390 M Tris HCl pH 8.8, 1% [v/v] SDS, 1% [v/v] ammonio persolfato, 0.05% [v/v] TEMED.

Tampone di Laemmli 4X: 0.0625M Tris HCl pH 6.8, 10% [v/v] glicerolo, 2% [w/v] SDS, 5% [v/v] β-mercaptoetanololo, 0.05% blu di bromofenolo.

Tampone di corsa per proteine: Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%.

Destaining solution: 45% [v/v] metanolo, 45% [v/v] H₂O, 10% [v/v] acido acetico glaciale.

Soluzione di reidratazione della strip: 7M Urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 1% TRITON X 100.

Equilibration buffer 1: 6M Urea, 2% SDS, 0.05 Tris HCl pH 8.8, 20% glicerolo.

Running gel 10%: 10% [v/v] acrilammide, 0.375 M Tris HCl pH 8.8, 0.1% [v/v] SDS, 0.1% [v/v] ammonio persolfato, 0.04% [v/v] TEMED.

Fissativo: 40% [v/v] Metanolo, 10% [v/v] Acido acetico.

Coomassie Colloidale: 12% [p/v] Coomassie g-250, 10% [p/v] Ammonio solfato, 10% [v/v] Acido fosforico, 20% [v/v] Metanolo.

3.2 ALLEVAMENTO INSETTI

3.2.1 *Heliothis virescens* su dieta artificiale

Gli adulti di *Heliothis virescens*, Lepidoptera Noctuidae (Fig. 1) si alimentano, si accoppiano e ovidepongono in contenitori di vetro.

Ai bordi del contenitore si fissano alcune strisce di carta assorbente; questa si usa anche per rivestire il fondo e per chiudere il recipiente, fissandola con un elastico (Fig. 2).

Gli adulti vengono alimentati con acqua e miele che si preparano in un piccolo contenitore di plastica con il tappo forato; nel foro si sistema della carta assorbente e il liquido risale per capillarità (Fig. 3).

Per separare il contenitore dalle strisce di carta si usa un foglio di alluminio.

Appena il contenitore è pronto i vecchi adulti vengono trasferiti insieme a quelli neo sfarfallati (Fig. 4).

Questa operazione si effettua tre volte alla settimana (lunedì – mercoledì – venerdì). Gli adulti del lunedì e del mercoledì si sistemano in cella climatica a 29°; quelli del venerdì si sistemano a 20 °C.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

Figure 1-4 Materiale per l'allevamento di *H. virescens*

Gli adulti ovidepongono sulla carta (Fig. 5).

Dopo il trasferimento la carta del vecchio contenitore si raccoglie e si lava con acqua e candeggina, poi si adagia su di una griglia e si lascia asciugare a temperatura ambiente (Fig. 6).

3.2.2 Composizione della dieta artificiale

Macroelementi:

Farina di fagioli 600 gr.

lievito di birra deamarizzato 120 gr.

fibra di cellulosa 19 gr.

Microelementi:

Cloramfenicolo 4,5 gr.

Acido sorbico 1,95 gr.

Metyl paraben 9 gr.

Propyl paraben 1,5 gr.

Colesterolo 2,25 gr.

Acido ascorbico 12 gr.

Cisteina 0,15 gr.

Mioinositolo 0,45 gr.

Colina 0,9 gr.

Gli ingredienti si miscelano con acqua distillata; si aggiungono olio di germe di grano, agar preventivamente autoclavato e miscela vitaminica. Si versa in contenitori di plastica e si lascia raffreddare; si conserva in frigo (Fig. 7).

La dieta si distribuisce ai lati di un contenitore di plastica.

La carta con le uova si taglia a strisce e si sistema nel contenitore (Fig. 8); questo si chiude poi con un foglio di carta, uno di tulle e un coperchio forato.

Le uova vengono trasferite in cella climatica a 29° C dopo aver riportato la data dell'operazione sul contenitore.

Dopo tre – quattro giorni con le larve di 2° età vengono trasferite in tubi di plastica con dieta.

Tagliamo la dieta a pezzettini di circa 8 gr. e ne sistemiamo uno per provetta. Preleviamo le larvette con l'aiuto di un pennellino e ne sistemiamo una per provetta; tappiamo con ovatta (Fig. 9) e trasferiamo in cella climatica a 29°C (Fig. 10).



Fig. 7



Fig. 8



Fig. 9



Fig. 10

Figure 1-4 Materiale per l'allevamento di *H. virescens*

Da uovo a crisalide passano 2 settimane. Una volta formate, le crisalidi vengono raccolte, lavate con acqua e candeggina al 50% e sistemate in un contenitore (Fig. 11). Si trasferiscono quindi in cella a 29° C.

Dopo circa una settimana iniziano a sfarfallare gli adulti (Fig. 12); questi vengono trasferiti in un contenitore di vetro e alimentati con acqua e miele.

Qui si accoppieranno e ovideporranno, dando inizio ad una nuova generazione.



Fig. 11



Fig. 12

Figure 11-12 Crisalidi di *H. virescens*

3.2.3 *Toxoneuron nigriceps*

I maschi e le femmine di *Toxoneuron nigriceps* Hymenoptera: Braconidae (Fig. 13) vengono separati e alimentati con acqua e miele (Fig. 14).

Si spostano in cella a 29° C per 30 minuti dopo di che si procede all'accoppiamento (Fig. 15).

Sotto una capsula petri si sistema una coppia di adulti. Dopo il primo accoppiamento il maschio si sostituisce per la seconda copula.

In seguito le femmine si sistemano a 20° C e i maschi si eliminano.



Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15

Figure 13-14 *T. nigriceps*

Le femmine fecondate verranno utilizzate per parassitizzare le larve di *Heliothis virescens* (Fig. 16).

La parassitizzazione si può effettuare solo dopo 24 ore dall'accoppiamento.

Le femmine si trasferiscono a 29°C per 30 minuti e si posizionano poi sotto una capsula petri (5 femmine e 3 larve di *H. virescens*).

Prima di iniziare la parassitizzazione prepariamo delle provette in cui sistemiamo piccoli pezzi di dieta (3-4 gr.).

Ogni larva deve essere parassitizzata almeno due volte e sistemata poi nella provetta che viene chiusa con l'ovatta (Fig. 17).



Fig. 16



Fig. 17

Figure 16 e 17 Parassitizzazione di larve di *H. virescens*

Le provette si sistemano in cella a 29° C sistemando nel contenitore anche un foglietto con la data dell'operazione, della pulizia delle larve e dello

sbozzolamento. La pulizia si effettua dopo circa una settimana e lo sbozzolamento dieci giorni dopo la pulizia.

Pulizia: le larve si tolgono dalle provette e si lavano con acqua e candeggina al 10%. Si sistemano in provette pulite e tappate con ovatta posizionandole a testa in giù in modo da permettere alla larva di penetrare nell'ovatta per imbozzolarsi (Fig. 18).



Fig. 18



Fig.19

Figure 18 e 19 Bozzoletti di *T. nigriceps*

Nell'arco di 10 giorni, la larva del parassitoide si nutrirà del contenuto interno del suo ospite fino a consumarlo e si costruirà il bozzoletto (Fig. 19).

I bozzoletti appena formati vengono liberati dall'ovatta e sistemati di nuovo a 29° C.

Dopo una decina di giorni quasi tutti gli adulti saranno sfarfallati.

I maschi e le femmine vengono separati, alimentati e preparati per l'accoppiamento: inizia un nuovo ciclo.

3.3 LA TRASCRIPTOMICA

3.3.1 Raccolta delle ghiandole del veleno ed estrazione del veleno

La raccolta delle ghiandole del veleno è stata eseguita utilizzando femmine di *T.nigriceps* di varie età. Sotto cappa è stata preparata una piastra Petri con

una goccia da 30 μ l di acqua sterile nella quale sono state trasferite 30 ghiandole del veleno, la raccolta è stata effettuata in modo che il rapporto gh/volume fosse di 1gh/1 μ L. In un'altra piastra Petri è stata posta una goccia di soluzione fisiologica Pringle's da utilizzare per la dissezione delle femmine. Le pinzette da dissezione, così come le minuzie (aggetti), sono state pulite con soluzione alcolica (70% etanolo). Prima di effettuare la dissezione le femmine di *T. nigriceps* sono state addormentate in ghiaccio, dopodiché è stata disposta sul microscopio la piastra Petri contenente la goccia di Pringle's nella quale è stata immersa la femmina, mantenendola con le pinzette, con l'addome verso l'alto. Con le pinzette sono stati tirati gli ultimi uriti dell'addome ed è stata trasferita l'intera ghiandola nella goccia di acqua sterile. Le ghiandole del veleno, dette anche ghiandole acide nelle quali viene prodotto il veleno, comprese del serbatoio, nel quale questo viene accumulato, sono state separate dall'apparato riproduttore che è stato allontanato dalla goccia di acqua. Successivamente le ghiandole sono state separate dal serbatoio ed utilizzate per l'estrazione di RNA mentre i serbatoi sono stati utilizzati per la raccolta del veleno. Le ghiandole sono state raccolte direttamente in tubi da centrifuga da 1,5 ml (Eppendorf), in ghiaccio, contenenti 40 μ l di Tri reagent. In ogni tubo sono state trasferite 5 ghiandole del veleno. Le ghiandole sono state lisate con l'ausilio di un pestello, precedentemente sterilizzato e conservate a -80°C fino all'utilizzo. I serbatoi sono stati rotti con pinzette e minuzie. Terminata la raccolta la goccia di acqua contenente il veleno è stata prelevata con una pipetta, trasferita in un'ependorf e quantificata in volume. Dopo aver centrifugato a 5000 rpm a 4°C per 5', al fine di eliminare i frammenti di tessuto, è stato trasferito il surnatante (veleno) in un'ependorf pulita. L'aliquota è stata conservata a -80°C

3.4 ANALISI BIOINFORMATICA

Il problema fondamentale che la ricerca biochimica oggi deve affrontare è quello di disporre di una quantità considerevole e crescente di dati sulle sequenze geniche e proteiche accumulata dagli studi di genomica e proteomica. Nel Giugno del 2003 per esempio il database NCBIInr conteneva 1.446.218 entry delle quali quasi il 50% accumulate nell'anno precedente. È quindi necessario disporre di un adeguato supporto informatico e di programmi in grado, non solo di immagazzinare i dati ma anche di analizzarli in tempi ragionevolmente brevi, per comparare sequenze, predire strutture secondarie e terziarie ecc., e costruire modelli molecolari. Importantissima inoltre è una continua interazione fra la bioinformatica e la ricerca, sia di base sia applicata, con un continuo flusso d'informazioni dall'una all'altra. Le piattaforme bioinformatiche sono in genere costituite da un sistema di database interno, banche dati e collegamenti all'esterno (pubblici o privati), una serie di software scelti in base agli obiettivi biologici d'interesse e degli algoritmi per esplorare e correlare le informazioni. Senza i software specifici per l'interpretazione e il confronto degli spot su gel 2D, nonché per l'analisi delle masse ottenute con la spettrometria di massa (MS), o ancora, come vedremo in questo capitolo, per il confronto con le banche dati, la proteomica non avrebbe avuto il notevole sviluppo degli ultimi anni.

La caratterizzazione proteica e le analisi software giocano un ruolo centrale nell'individuazione delle proteine escisse da gel bidimensionali e identificate con analisi di spettrometria di massa. Il confronto di informazioni sperimentali, come ad esempio le peak list ottenute in MS, con quelle riportate nei database proteici consente di risalire alla sequenza di una proteina già nota oppure permette l'identificazione di suoi frammenti. D'altra parte l'interrogazione dei database e dei software con sequenze

proteiche o con frammenti di queste permette di reperire informazioni utili nell'investigazione sperimentale, come ad esempio punti isoelettrici e masse molecolari teoriche. Tali processi sono dunque complementari (Gasteiger *et al.* 2005).

Per arrivare all'identificazione di una proteina si deve passare, quindi, dall'ottenimento dello spettro di massa al trattamento dei dati che da esso se ne ricavano. A questo scopo gli spettri devono subire un certo numero di trattamenti (processi come la sottrazione della linea di base o lo smoothing, la deconvoluzione nel caso dell'ESI, il calcolo della massa monoisotopica) per arrivare ad ottenere la peak list, ovvero la lista delle masse osservate, che sarà in seguito utilizzata per inoltrare delle ricerche tramite Internet. Tali ricerche si basano sull'uso di alcuni portali via web o locali se il laboratorio ne è equipaggiato. Vi sono diversi motori di ricerca che possono essere utilizzati come Global Server (Micromas), ProFound (http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe), Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>), ma soprattutto Mascot Protein Identification System (<http://www.matrixscience.com>) che è in grado di integrare le caratteristiche di tutti gli altri. In questo lavoro di tesi si è creato un database in cui è stata confrontata la peak list ottenuta sperimentalmente.

3.4.1 Allineamento e annotazione funzionale

Il punto di partenza per poter effettuare l'annotazione funzionale di una proteina mediante confronto con le sequenze presenti nei diversi database è l'allineamento. Per allineamento si intende quel processo mediante il quale uno specifico software confronta una stringa (nel caso specifico la sequenza amminoacidica), componente per componente, con una serie di stringhe di

riferimento. Le possibilità che possono essere osservate in un processo di allineamento sono:

- Le componenti delle due stringhe coincidono, si parla di match;
- Le componenti non coincidono, si parla di mismatch.

Legati al concetto di allineamento ci sono anche quelli di omologia e similitudine.

L'omologia è un carattere qualitativo che posseggono quelle sequenze che derivano da un antenato comune in seguito al processo evolutivo, le quali o sono omologhe o non lo sono, in quanto concettualmente non esiste una percentuale di omologia.

La similitudine, invece, è un carattere quantitativo che si origina da un allineamento. Il grado di identità che si determina tra i residui allineati o il fatto che residui simili possano corrispondere in un allineamento, può essere quantificato mediante un numero.

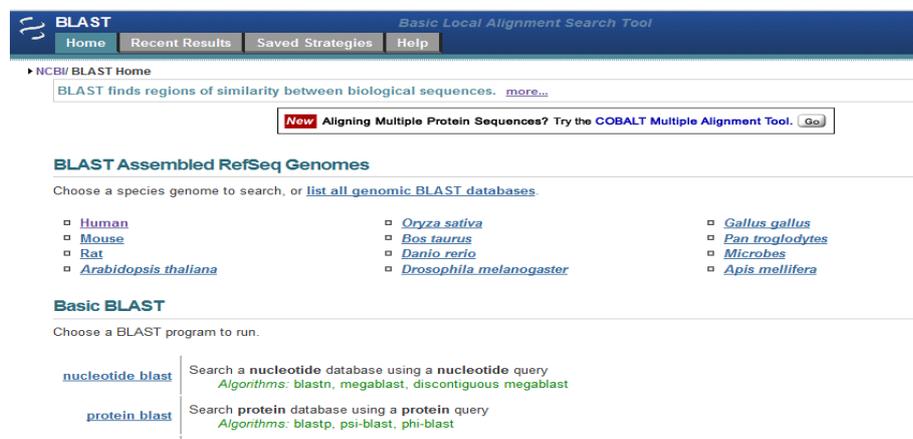


Fig 20 . Home page di BLAST

La ricerca di una proteina in una banca dati per ottenere l'annotazione funzionale viene conseguita mediante sistemi di ricerca per similarità come BLAST (fig. 20). BLAST è basato su un algoritmo di selezione rapida delle sequenze e d'individuazione della Maximal Segment Pair (MSP), cioè la

coppia di segmenti di identica lunghezza tra quelli contenuti in due sequenze i quali allineati mostrano il massimo punteggio (score) possibile. I due segmenti quindi rappresentano la zona di massima somiglianza locale tra le due sequenze. BLAST generalmente opera su database che contengono milioni di sequenze, questo fa sì che non tutti gli allineamenti prodotti abbiano una rilevanza biologica, ovvero non tutte le sequenze in output saranno omologhe alla sequenza query (sottoposta a confronto con le sequenze nel database). Dunque, è necessaria una valutazione statistica degli allineamenti prodotti. Per tale motivo aggiunge ad ogni sequenza presente nell'output il suo E-Value, valore che, opportunamente interpretato dal ricercatore, indicherà quanto è probabile che lo score indichi una correlazione biologica fra le due sequenze (fig. 21). Un E-value inferiore a 10^{-5} indica una buona probabilità di corrispondenza (ossia una buona probabilità di score) tra le sequenze allineate.

[Related Structures](#)

Sequences producing significant alignments:

	Score (bits)	E Value	
gi 6754190 ref NP_034554.1 hemochromatosis [Mus musculus] ...	419	e-117	L
gi 26354116 dbj BAC40688.1 unnamed protein product [Mus mu...]	419	e-117	
gi 12844463 dbj BAB26373.1 unnamed protein product [Mus mu...]	419	e-117	L
gi 25742831 ref NP_445753.1 hemochromatosis [Rattus norveg...]	412	e-115	L
gi 2624957 gb AAB86597.1 hereditary hemochromatosis protei...	366	e-101	L
gi 2072657 emb CAA73197.1 HFE (HLA-H) [Mus musculus]	345	7e-95	L
gi 5734363 gb AAD49965.1 AF176534.1 hemochromatosis gene pr...	303	2e-82	L
gi 1930010 gb AAB51504.1 hereditary haemochromatosis prote...	247	1e-65	L
gi 2225995 emb CAA74333.1 MHC class I alpha chain [Rattus ...]	173	4e-43	L
gi 2851391 sp P16391 HA12 RAT RT1 class I histocompatibilit...	171	1e-42	L

Fig. 21 Output BLAST. 1) Elenco delle sequenze nucleotidiche del database scelto che producono allineamenti significativi con la sequenza query. Le sequenze sono ordinate in base all'E-value (riquadro contrassegnato con 3), e in base al punteggio (core - riquadro contrassegnato con 2) ottenuto nell'allineamento. Per ciascuna sequenza sono mostrati i diversi accession number. A destra, per una data sequenza è inoltre eventualmente presente il link a LocusLink [L](#), database contenente informazioni sulle sequenze (riquadro contrassegnato con 4).

In questo lavoro di tesi le annotazioni funzionali sono state ricavate con il programma Blast2GO, mentre gli allineamenti tra le sequenze

amminoacidiche ottenute in seguito traduzione e quelle dei frammenti sperimentali con il programma CLUSTAL-W.

3.4.2 Blast2GO

Blast2GO suite (Gotz *et al.*, 2008) è un programma che permette di effettuare, in maniera automatizzata e con alto rendimento, annotazioni funzionali di sequenze nucleotidiche o amminoacidiche utilizzando il vocabolario di Gene Ontology. Le caratteristiche maggiori di questo programma sono:

- . la combinazione di varie strategie di annotazione tra cui BLAST e strumenti di controllo inerenti il tipo e la specificità dell'annotazione stessa;
- . le numerose funzionalità come ad esempio la visualizzazione grafica GO per il profiling e la descrizione di set di geni;
- . le funzionalità generali di management;
- . l'alta capacità di rendimento.

3.4.3 CLUSTAL-W

CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) è un programma che permette di effettuare l'allineamento multiplo tra più sequenze. ClustalW è il programma migliore se nell'allineamento non ci sono troppi gaps e se la similarità media è superiore al 50%. Questo programma opera nel seguente modo:

- 1) tutte le possibili coppie di sequenze sono allineate tra loro applicando un algoritmo dinamico classico.

2) Si misura il grado di somiglianza tra tutte le coppie di allineamenti mediante sistemi di misura della percentuale dei residui identici oppure di quelli diversi. Si crea una matrice di distanze con le misure in ogni cella.

3) La matrice delle distanze è utilizzata per creare un albero guida (grafico che raggruppa le sequenze in base al grado di somiglianza) tramite il metodo del neighbor joining (massima parsimonia) (fig. 22).

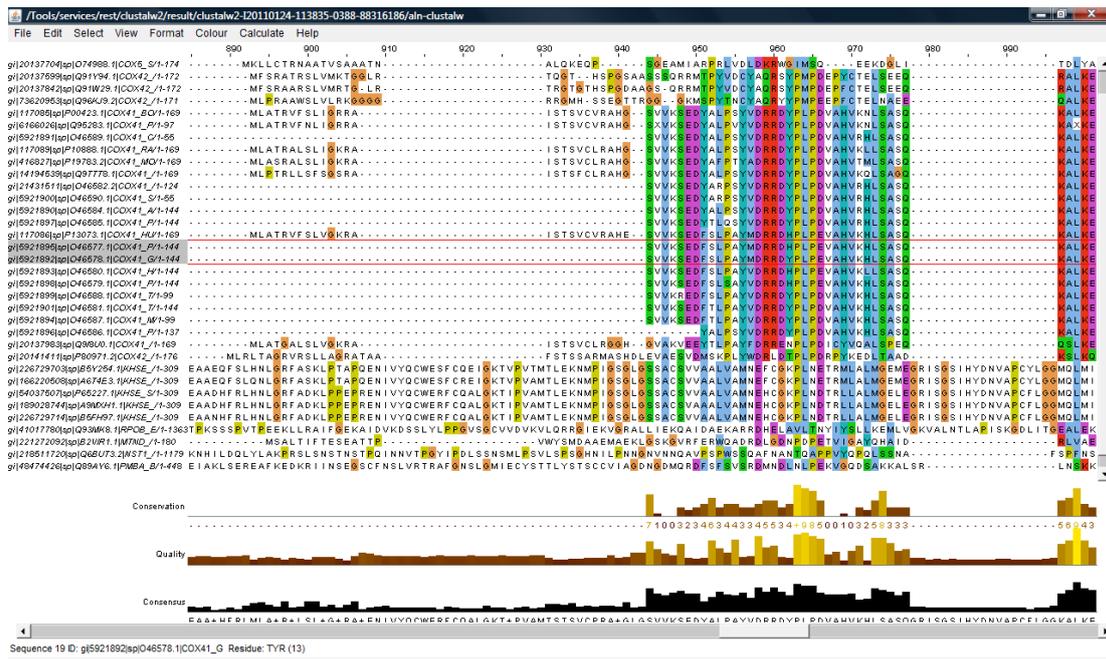


Fig. 22 Allineamento multiplo delle sequenze aminoacidiche di molteplici proteine. I diversi colori individuano gli aminoacidi ed evidenziano i siti conservati.

3.4.4 SignalP 4.0

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) è il più popolare programma che consente di individuare le proteine secrete. Questo software si basa su due differenti algoritmi di predizione basati su modello Markov i quali predicono rispettivamente la presenza del peptide segnale e i siti di taglio effettuati da peptidasi I, mentre il programma per la predizione dei siti di taglio effettuati da peptidasi II nelle lipoproteine è ancora in fase di

elaborazione in tre differenti classi di organismi: Eucarioti, Gram-positivi e Gram-negativi.

Nel grafico fornito in output sono mostrati tre differenti score C, S e Y. Nella tabella sono inoltre presenti due ulteriori parametri S-mean e il D-score.

La discriminazione tra proteine secrete e non secrete è riportata in base ad un parametro individuato come C-score (cleavage score). L' Y-max è la derivata matematica dello C-score, combinato con S-score risultante dalla migliore predizione del sito di taglio per il primo C-score. È sottolineato il primo C-score in quanto per una stessa sequenza possono essere individuati più di un picco intenso di C-score, ma solo uno è il vero sito che viene assegnato nel punto d'incontro dell'Y-max con le intensità massime di C-score ed S-score (fig. 23 e 24).

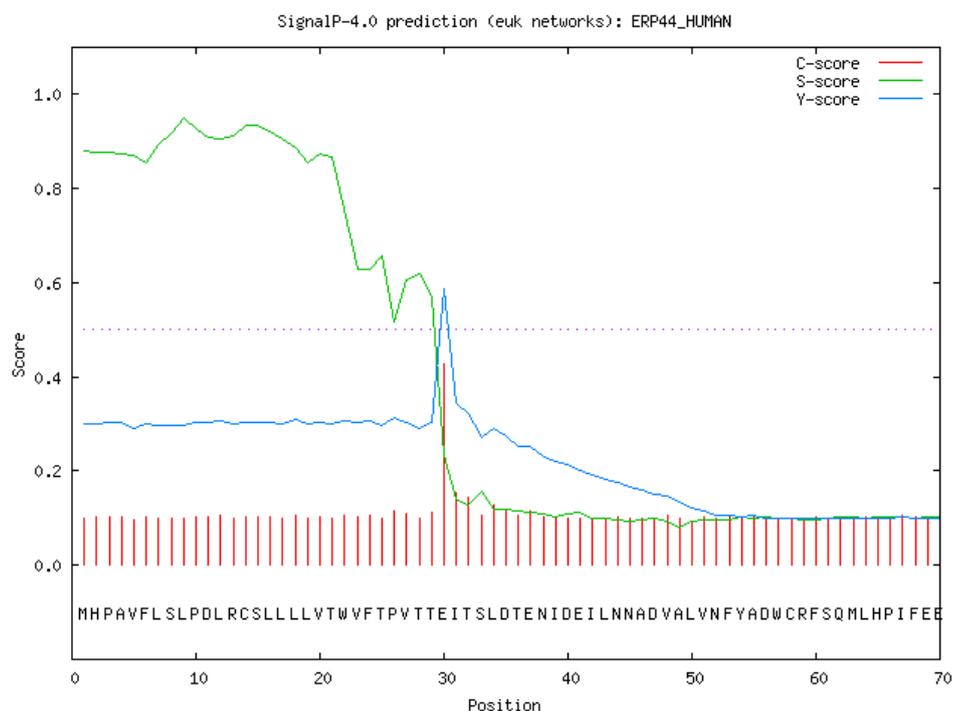


Fig. 23 Esempio dell'output ottenuto di default da SignalP 4.0 per una proteina secreta.

```

>10076      12-ott-2012  Strand_ WS  Length_ 302 Check_  8
# Measure Position Value  Cutoff  signal peptide?
max. C  14   0.306
max. Y  14   0.495
max. S   7   0.884
mean S  1-13  0.795
D  1-13  0.657  0.450  YES
Name=10076  SP='YES' Cleavage site between pos. 13 and 14: TAA-EF D=0.657 D-cutoff=0.450
Networks=SignalP-noTM

```

Fig. 24 Esempio della tabella ottenuta di default in output da SignalP 4.0.

3.4.5 mMass 5.5.0 e PFIA

I software utilizzati come supporto per una precisa ed affidabile interpretazione degli spettri di massa e degli spettri di massa tandem sono rispettivamente mMass 5.5.0 e PFIA (Peptide Fragmentation Ion Analyser).

mMass 5.5.0 (Strohalm *et al.*, 2010), (Strohalm *et al.*, 2008) è un software disponibile gratuitamente in rete che fornisce tutti gli strumenti per l'analisi di spettri di massa (Fig. 25). Si è dimostrata particolarmente utile ed interessante la funzione dedicata all'identificazione di proteine, che contempla anche la possibilità di realizzare la digestione enzimatica virtuale di sequenze amminoacidiche. Un'altra caratteristica importante di questo programma è rappresentata dalla capacità di visualizzare e quantificare la percentuale di copertura della proteina. Tale parametro permette di valutare quanto il set di masse dei peptidi ottenuti sperimentalmente sia rappresentativo della proteina assegnata.

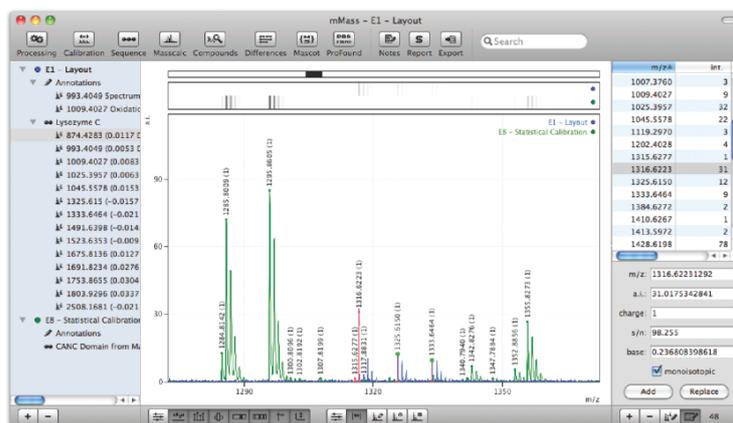


Fig. 25 L'interfaccia del software mMass mostra a sinistra il pannello dei documenti, al centro lo spettro di massa e a destra il pannello riportante la peak list.

Il software PFIA (Jagannath & Sabareesh, 2007) permette l'analisi e l'interpretazione di spettri di massa tandem di sequenze peptidiche. Esso è costituito da due differenti programmi. Il primo (PFIA I), da noi utilizzato, elenca le diverse possibili combinazioni di amminoacidi costituenti il peptide di cui si conosce esclusivamente il rapporto m/z ($z=1$), indicando anche il tipo di ione prodotto. Il limite di questo software è rappresentato dal fatto che non è in grado di fornire combinazioni con più di quattro amminoacidi. Pertanto può essere utilizzato solo per valori di massa non troppo grandi associabili a peptidi costituiti da non più di quattro residui amminoacidici. Il secondo programma (PFIA II), invece, permette di visualizzare il pattern di frammentazione e le specifiche sequenze degli ioni prodotto dell'addotto protonato selezionato. La caratteristica unica di tale software risiede nella capacità di gestione anche di peptidi ciclici. L'utilizzo dei due programmi combinati può rivelarsi utile per l'assegnazione dei picchi dello spettro di massa tandem a sequenze di peptidi non noti.

3.5 LA PROTEOMICA

3.5.1 Analisi elettroforetica del veleno (SDS-PAGE)

L'analisi qualitativa delle proteine del veleno è stata effettuata mediante elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli U.K., 1970).

Le aliquote di veleno di *T. nigriceps* conservate a -80°C sono state separate caricando su gel di concentrazione pari al 12,5% di poliacrilammide con un volume calcolato in base alla concentrazione dell'estratto in termini di contenuto proteico totale. Prima di caricare le proteine, a ciascun campione è stato aggiunto il tampone di Laemmli fino ad ottenere una concentrazione finale quattro volte più diluita e successivamente è stato bollito per 5 minuti. La corsa elettroforetica SDS-PAGE è stata condotta usando uno "stacking gel" al 5% e, come anticipato, un "running gel" al 12.5% in tampone di corsa. La separazione è stata condotta a temperatura ambiente ed a voltaggio costante, rispettivamente 100 V nel running e 150 V nello stacking usando un mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories).

Al termine della corsa lo stacking gel è stato separato dal running gel, quest'ultimo è stato trattato con Coomassie brilliant blue, colorante che si fissa irreversibilmente alla maggior parte delle proteine. Il gel, posto in una capsula Petri ed immerso in Coomassie brilliant blue, è stato incubato in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

Il gel è stato poi decolorato immergendolo in una soluzione di decolorazione (destaining solution) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente fino a completa decolorazione. Tale soluzione consente di allontanare dal gel il colorante che invece resta legato solo alle proteine, evidenziandone così il profilo elettroforetico.

3.5.2 Analisi elettroforetica bidimensionale del veleno (2D-E)

Per eliminare i detergenti e i sali ad aliquote da 100 μ L di campione (veleno), poste in eppendorf da 1.5mL, sono stati aggiunti 500 μ L di acetone conservato a -20°C (Jiang *et al.*, 2004). L'acetone consente la precipitazione delle proteine che quindi formano un pellet sul fondo della eppendorf. Tale processo è stato condotto a -20°C per tutta la notte. Il giorno successivo dopo aver centrifugato a 13000 rpm a 4°C per 10 min è stato rimosso il surnatante e l'acetone è stato eliminato in Speed Vac. Il pellet è stato risospeso nella soluzione di reidratazione della strip. Sono state utilizzate gel strip 3-10L (Ready Strip IPG strips 7 cm, pH 3-10, Bio-Rad Laboratories) e strip 3-10NL (Ready Strip IPG strips 7 cm, pH 3-10, Bio-Rad Laboratories). Le IPG strip sono state reidratate con il campione contenente la soluzione di deidratazione (e blu di bromofenolo per rendere visibile il processo) per 12h all'interno di tubi in plastica (ricavati da pipette monouso) chiusi mediante parafilm (Fig. 26).

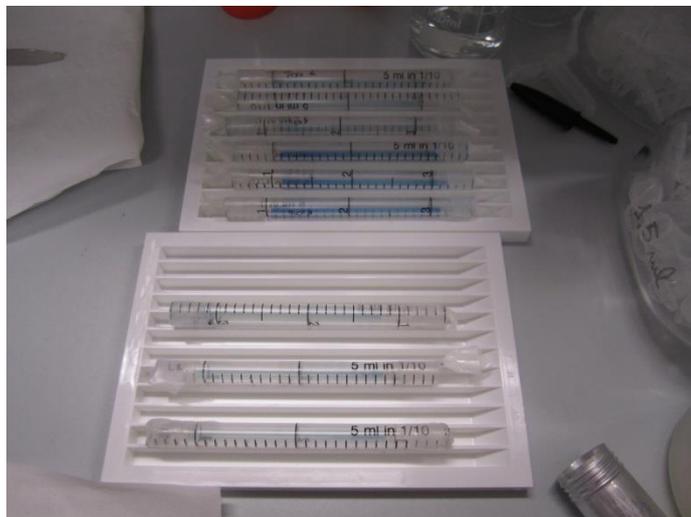


Fig. 26 Processo di reidratazione delle IPG strip mediante la soluzione di reidratazione contenente il campione. Le strip sono disposte all'interno dei tubi con il gel rivolto verso il basso in modo che le proteine presenti nella soluzione possano essere caricate al suo interno.

3.5.2 Isoelettrofocalizzazione (prima dimensione separativa)

L'isoelettrofocalizzazione (IEF) è stata condotta usando PROTEAN IEF cell (Bio-Rad Laboratories) con il seguente programma di focalizzazione che prevede 50 μ A per strip con un primo step a 1000 V (per ogni strip) rapido, 2500 V (per ogni strip) orari e 200 V (per ogni strip) rapido per mantenere la focalizzazione (Fig. 27).

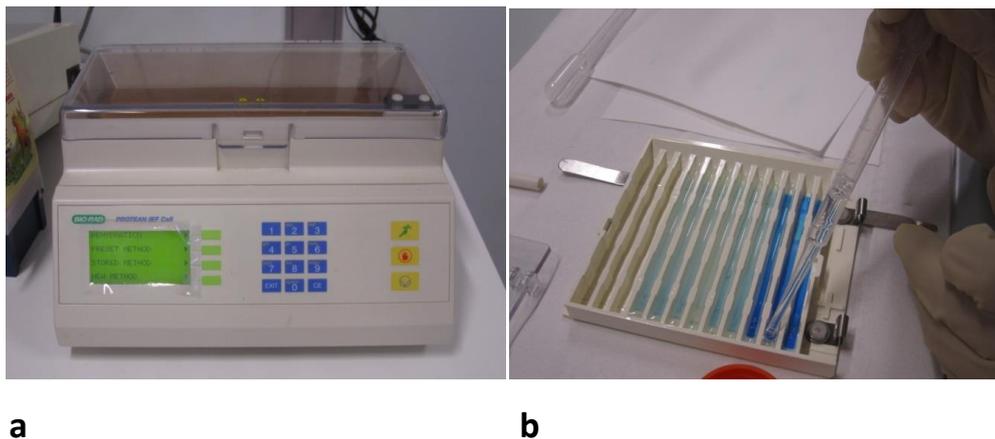


Fig. 27 a) strumento utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione PROTEAN IEF cell; b)assemblaggio delle strip caricate all'interno dell'apposito supporto.

Successivamente le strip sono state equilibrate prima con l'equilibration buffer 1 (l) contenente una concentrazione 5 mM di ditiotreitolo (DTT) per 15 min, e successivamente con equilibration buffer 2? contenente iodoacetamide (IAA) a concentrazione 20 mM per 15 min.

3.5.2 SDS-PAGE (seconda dimensione separativa)

È stata preparata una soluzione 1.5% di agarosio (basso punto di fusione) in tampone di corsa a cui è stata aggiunta qualche goccia di blu di bromo fenolo in modo da visualizzare la corsa.

Sono stati preparati i gel aventi una percentuale di poliacrilamide pari al 10% sui quali è stata posizionata la strip che successivamente è stata assemblata a tale gel con il gel di agarosio preparato in precedenza.

È stata fatta correre la seconda dimensione utilizzando un Mini PROTEAN 3 Dodecs Cells (Bio-Rad Laboratories) (Fig. 28).



Fig. 28 Seconda dimensione separativa svolta utilizzando il Mini PROTEAN 3 Dodecs Cell (Bio-Rad).

Le condizioni di corsa sono state 5 mA/gel per 1 h, 10 mA/gel per 1 h, 20 mA/gel per 1 h. Quando il bromofenolo ha raggiunto l'anodo i gel sono stati fissati (K) per 1 h e colorati con Coomassie colloidale (L) per tutta la notte. La decolorazione è stata svolta in acqua e infine i gel sono stati scannerizzati, quindi sono stati essiccati in fornello tra fogli di cellofan oppure sono stati conservati in acqua.

3.5.3 Digestione triptica in gel delle proteine risolte

Lo spot di interesse è stato escisso dal gel bidimensionale e posto in un'Eppendorf da 1 ml, in cui è stata aggiunta dell'acqua per reidratare lo spot stesso, ed è stato decolorato overnight con 200 μ l di soluzione decolorante di bicarbonato di ammonio (NH_4HCO_3) (25 mM) in acetonitrile (ACN) 50% per tutta la notte. Dopo questa fase il surnatante è stato allontanato e lo spot è stato posto prima in 100 μ l di acetonitrile per farlo disidratare, poi in 100 μ l di una soluzione 25 mM di bicarbonato di ammonio per altri 20 min, ed infine, nuovamente in acetonitrile per altri 20 min (Shevchenko *et al.*, 1996). Dopo aver rimosso la fase liquida, il pezzetto di gel

è stato asciugato in speedvac, e la proteina digerita per tutta la notte a 37°C con tripsina (Promega, Madison, WI; modified trypsin). La miscela di peptidi proteolitici è stata estratta in 500 µl di una soluzione 50% acetonitrile e 1% acido formico; centrifugata a 10000 rpm per 20 min ed analizzata tramite spettrometria di massa ESI-FT ICR/MS.

3.5.4 Analisi di spettrometria di massa del digerito triptico del veleno

Gli spettri di massa presenti in questo lavoro di tesi sono stati registrati utilizzando uno spettrometro di massa ThermoFisher SCIENTIFIC (Bremen, Germany) (Fig. 29) (Griep *et al.*) corredato di:

- . pompa a siringa costituita da un pistone a motore che spinge lo stantuffo della siringa comprimendo il volume (plug) con una velocità pari all'1% del volume della siringa al minuto;
- . rivelatore a spettrometria di massa (MS) Linear Ion Trap (trappola lineare quadrupolare, LTQ) composto da: una serie di sistemi di controllo e indicatori;
- . sorgenti di ionizzazione a pressione atmosferica (API) e precisamente elettrospray ionization (ESI), atmospheric pressure photoionization (APPI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI), sorgente matrix Assisted laser desorption ionization (MALDI);
- . ottiche di trasferimento ionico;
- . analizzatore di massa a trappola ionica lineare;
- . sistema di rivelazione degli ioni;
- . sistema da vuoto;
- . ventole di raffreddamento;
- . assemblaggi elettronici;

La trappola ionica lineare è configurata inoltre anche come sistema di introduzione degli ioni nel secondo analizzatore, la cella ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR). La cella ICR è al centro di un campo magnetico (7T) fornito da un magnete a superconduttore. I due analizzatori sono collegati tramite un sistema di guida ionico ad alta trasmissione. La parte strumentale FT-ICR è collegata al sistema da vuoto utilizzato anche per la trappola ionica.

La strumentazione LTQ-FT combina la robustezza, versatilità e capacità MS^n dello spettro di massa LTQ con la capacità di misura delle masse accurate dell'analizzatore a risonanza ionica ciclotronica (FT-ICR). Le specifiche della strumentazione sono:

risoluzione:

100000 FWHM (*full width at half maximum*) a m/z 400 con una velocità di ripetizione di scansione di 1 secondo, mentre acquisisce un intervallo di massa di m/z 200-2000.

Una risoluzione massima maggiore di 500000 a m/z 400 è garantita (FWHM);

intervallo di masse analizzato:

m/z 50-4000.

Un ordine di grandezza di singola scansione (es. m/z 200-2000);

accuratezza di massa:

2 ppm RMS (root mean square) con calibrazione esterna;

MS/MS:

CID (collision induced dissociation);

IRMPD (infrared multi-photon dissociation).

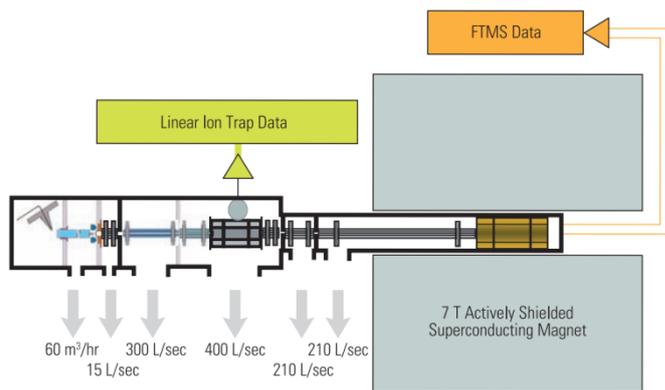


Fig. 29 Diagramma dello spettrometro di massa Thermo Scientific.

Tutti componenti della strumentazione sono collegati tramite una rete secondaria Ethernet ad un Personal Computer e controllati tramite software Xcalibur 2.0. I campioni sono stati iniettati nella sorgente ESI tramite pompa a siringa con velocità di flusso di iniezione di 2 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Lo spettrometro di massa FT-ICR è stato calibrato secondo le istruzioni del produttore, utilizzando una soluzione di caffeina (m/z 195), del peptide MRFA (m/z 524) e il mix Ultramark (m/z 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822).

BIBLIOGRAFIA

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R.D. & Bairoch A.(2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The proteomics Protocols Handbook*.

Griep-Raming¹ J., Metelmann-Strupat W., Horning S., Muenster H., Baumert M., & Henion J. Fully Automated High Throughput Accurate Mass Determination using FT-ICR Mass Spectrometry. *Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany*.

Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Williams T.D., Nagaraj S.H., Nueda M.J., Robles M., Talon M., Dopazo J.& Conesa A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*.Vol. 36, 10, p. 3420-3435.

Jagannath S. & Sabareesh V. (2007). Peptide Fragment Ion Analyser (PFIA): a simple and versatile tool for the interpretation of tandem mass spectrometric data and de novo sequencing of peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 3033-3038.

Jiang L., He L. & Fountoulakis M.(2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chroma A.*, Vol. 1023, p. 317-320.

Leammler U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227, p. 680-685.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. & Mann M.(1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.*,Vol. 68, p. 850-858.

Strohalm M., Hassman M., Kosata B. & Kodicek M.(2008). mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 22: 905-908.

Strohalm M., Kavan D., Novak P.& Volny Havlicek M. (2010). mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal. Chem.*, 82: 4648-4651.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

Toxoneuron nigriceps è un imenottero braconide endoparassitoide degli stadi larvali del lepidottero notturno *Heliothis virescens*. Al momento della parassitizzazione la femmina inietta nella larva ospite l'uovo, da cui si svilupperanno gli stadi giovanili della progenie a spese dei tessuti dell'ospite, e i secreti (polidnavirus, proteine ovariche e veleno) che, insieme ad altri fattori di origine embrionale (teratociti) consentiranno di realizzare l'ambiente nutrizionalmente più adatto allo sviluppo degli stadi giovanili del parassitoide, garantendo il successo della parassitizzazione. Nella parte iniziale di questo lavoro di tesi è stato descritto il veleno prodotto dall'endoparassitoide *T. nigriceps*. Come ampiamente discusso, il veleno degli insetti parassitoidi è una secrezione prodotta da ghiandole specializzate. Questo veleno contiene una miscela complessa di proteine selettivamente espresse nella ghiandola, che contribuisce a sottomettere, uccidere e/o digerire la preda (Pennacchio & Strand, 2006). La composizione biochimica e le attività tossiche del veleno di *T. nigriceps* ad oggi sono completamente sconosciute.

In questo lavoro di tesi, la venomica, cioè una strategia proteomica sviluppata e ampiamente applicata per l'analisi dei veleni di vertebrati ed invertebrati fra cui serpenti (Yanes *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2001), tarantole (Liao *et al.*, 2007), scorpioni (Batista *et al.*, 2006) è stata applicata per caratterizzare il profilo proteico del veleno di *T. nigriceps* al fine di identificare le sue principali componenti ottenendo anche, là dove possibile, indicazioni circa un possibile ruolo funzionale. Sistemi biologici, ospite-parassitoide, assumono importanza rilevante nell'ambito della lotta biologica

integrata, metodologia di controllo che prevede l'uso di insetticidi alternativi a quelli chimici, e/o comunque l'integrazione di diverse strategie di lotta, con l'obiettivo della salvaguardia dell'ambiente e di tutti gli organismi non target ivi presenti, tra cui l'uomo. Questi insetticidi alternativi non sono altro che molecole prodotte in "natura", nel caso specifico veleni di specie parassitoidi, che hanno effetto mirato contro le specie fitofaghe dannose. L'impiego razionale ed affidabile di tali bioinsetticidi, oltre all'isolamento e alla caratterizzazione delle singole molecole bioattive, necessita di uno studio preliminare del sistema ospite parassitoide, per individuare i processi biologici su cui intervengono tali molecole e comprenderne i meccanismi d'azione. Ciò comporta uno studio integrato e multidisciplinare nel quale si inserisce il presente lavoro di tesi.

Il lavoro sperimentale è stato suddiviso in due fasi:

- Nella prima fase, denominata "bioinformatica", si è analizzato, mediante tools bioinformatici, il trascrittoma *de novo* delle ghiandole del veleno, realizzato ed assemblato con l'impiego della tecnologia 'RNA-Sequencing' (RNA-Seq);
- Nella seconda fase, denominata "analitica", il veleno è stato dapprima quantificato e successivamente sottoposto ad uno stadio di separazione mediante elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE) ed elettroforesi bidimensionale in condizioni denaturanti su gel di poliacrilamide (2D-PAGE), gli spot sono stati escissi e sottoposti, nella fase identificativa, ad analisi di spettrometria di massa ESI MS-MS previa digestione con tripsina.

4.1 ANALISI DEL TRASCRITTOMA

La caratterizzazione del veleno dell'imenottero *T. nigriceps*, ha previsto dapprima l'assemblaggio *de novo* del trascrittoma delle ghiandole del veleno utilizzando la tecnologia dell' "RNA-Seq", ciò ha permesso di ottenere informazioni necessarie circa le putative proteine espresse nel tessuto di interesse. Tali informazioni sono state successivamente incrociate con i dati sperimentali ottenuti dalla fase analitica di tipo proteomico. È necessario quindi poter disporre di banche dati con cui confrontare i dati ottenuti. Queste banche dati devono necessariamente contenere informazioni quali masse dei peptidi, ottenibili per digestione enzimatica, sequenze amminoacidiche delle proteine del sistema studiato o di sistemi molto simili, nonché informazioni come annotazione funzionale, punto isoelettrico e peso molecolare delle stesse. Ad oggi sono disponibili on line (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) banche dati per insetti come formiche (Formicidae), api (Apis), e vespe (Vespidae). Nel caso della specie *T. nigriceps* oggetto di studio di questo lavoro di tesi, non si dispone di alcuna informazione circa il suo corredo proteico, in quanto il genoma della specie non è ancora del tutto noto. Inoltre i pochi veleni di cui ad oggi si conosce almeno parzialmente la composizione risultano estremamente variabili nella loro composizione e, quindi, in molti casi, non forniscono informazioni utili. L'intero trascrittoma delle ghiandole del veleno dell'insetto è stato ottenuto mediante l'approccio "RNA-Seq", grazie alla collaborazione col gruppo di ricerca del Dott. Heiko Vogel del Max Plank Institute for Chemical Ecology di Jena (Germania). L'RNA messaggero, una volta isolato dall'RNA totale, estratto dalle ghiandole velenifere, è convertito in DNA complementare

(cDNA). Il successivo assemblaggio di tutte le diverse sequenze di cDNA ottenute ha fornito 19966 sequenze nucleotidiche uniche, ognuna delle quali codifica una proteina putativa. Ottenuto il trascrittoma delle ghiandole del veleno di *T.nigriceps*, tramite il programma Blast2Go (Basic Local Alignment Search Tool), è stato possibile assegnare ad ognuna delle 19968 proteine putative l'annotazione funzionale (cioè la funzione della proteina). Blast2Go è uno strumento "all in one" che assegna in modo automatizzato annotazioni funzionali a sequenze amminoacidiche o nucleotidiche non note utilizzando il "vocabolario" Gene Ontology (Conesa *et al.*, 2005). L'annotazione funzionale di proteine nuove avviene mediante confronto con sequenze già note contenute nei diversi database tramite il processo di allineamento. Blast2Go ricerca le similarità fra nuove sequenze, con funzione e struttura sconosciuta e sequenze già archiviate nelle banche dati quali National Center of Biotechnology Information (NCBI), la cui struttura e funzione è già nota. In particolare si è ricorso all'uso dell'algoritmo Blastx del software Blast2Go, il quale cerca sequenze amminoacidiche note all'interno dei database, a partire da sequenze nucleotidiche. Ad ogni risultato è associato un valore definito score, il quale indica la misura di similarità tra la sequenza cercata e la sequenza nota che le viene associata. Comprensibilmente il programma restituirà esclusivamente l'allineamento con lo score maggiore per ogni sequenza. Al punteggio di score di ogni proteina trovata è associato l'indice e-value, misura della probabilità di quanto l'allineamento ottenuto sia casuale. Valore di e-value uguale a 0.0, indica la corrispondenza perfetta tra le due sequenze (cercata e trovata). L'assegnazione dell'annotazione funzionale delle sequenze nucleotidiche del trascrittoma di *T. nigriceps* è stata effettuata impostando 10^{-5} come limite massimo del valore di e-value.

Il programma Blast2GO, ha restituito come output una tabella (Tab. 4.1) contenente le seguenti informazioni:

- Nome della sequenza, identificato mediante il numero del contig che individua in maniera univoca tale sequenza nucleotidica;
- La descrizione della funzione associata a tale sequenza (ad es. protein sarah-like);
- La lunghezza della sequenza analizzata in termini di numero di nucleotidi;
- L'“accession number” che permette di risalire alla proteina che è caratterizzata da una più elevata similarità con la proteina target oggetto di indagine e che è già riportata nelle banche dati con una nota funzione all'interno del sistema in cui è stata scoperta (ed es. gi|307195536|gb|EFN77422.1|Protein sarah [Harpegnathos saltator]);
- E-value ottenuto (ad esempio il valore di e-value più piccolo è 0.00, che indica la corrispondenza perfetta) ;
- La similarità cioè il valore calcolato come la media dei singoli valori di similarità per tutte le annotazioni funzionali di una data sequenza;
- Lo score (il più alto valore di similarità);
- La lunghezza dell'allineamento (lunghezza dell'allineamento più lungo);

Sequence name	Sequence desc.	Sequence length	Hit desc.	Hit ACC	E-Value	Similarity	Score	Alignment length
19	prostaglandin synthase 2	666	gi 332026259 gb EG166398.1 Prostaglandin synthase 2 [Acromyrmex echinator]	EG166398	2.97E-164	79	2.09E+01	392
20	serine threonine-protein kinase 16-like isoform 1	562	gi 156547996 ref XP_001605375.1 PREDICTED: serine/threonine-protein kinase 16-like isoform 1 [Nasonia vitripennis]	XP_001605375	0.00E+00	88	5.26E+05	318
21	serine threonine-protein kinase 3	659	gi 383847106 ref XP_003699196.1 PREDICTED: serine/threonine-protein kinase 3-like [Megachile rotundata]	XP_003699196	0.00E+00	93	5.63E+05	297
22	zinc transporter foi-like	772	gi 380027597 ref XP_003697508.1 PREDICTED: zinc transporter foi-like [Apis florea]	XP_003697508	0.00E+00	83	6.22E+05	501
23	enhancer of rudimentary homolog	298	gi 383850967 ref XP_003701035.1 PREDICTED: enhancer of rudimentary homolog [Megachile rotundata]	XP_003701035	8.39E-63	99	2.17E+05	103
24	PREDICTED: hypothetical protein LOC100577836 [Apis mellifera]	453	gi 328776979 ref XP_003249251.1 PREDICTED: hypothetical protein LOC100577836 [Apis mellifera]	XP_003249251	1.05E-27	63	5.61E+00	233
25	wd repeat-containing protein 24-like	485	gi 345490329 ref XP_001605545.2 PREDICTED: WD repeat-containing protein 24-like [Nasonia vitripennis]	XP_001605545	1.85E-72	83	2.68E+05	171
26	protein sarah-like	488	gi 307195536 gb EFN77422.1 Protein sarah [Harpegnathos saltator]	EFN77422	3.95E-113	85	3.58E+05	242
27	39s ribosomal protein mitochondrial-like	330	gi 340708813 ref XP_003393015.1 PREDICTED: 39S ribosomal protein L34, mitochondrial-like [Bombus terrestris]	XP_003393015	5.67E-09	77	7.20E+05	54
28	ct004 protein	657	gi 156551139 ref XP_001603971.1 PREDICTED: uncharacterized protein C20orf4 homolog [Nasonia vitripennis]	XP_001603971	5.38E-159	79	4.86E+05	371
29	nadh dehydrogenase	840	gi 307183938 gb EFN70526.1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial [Camponotus floridanus]	EFN70526	0.00E+00	86	7.36E+05	470
30	dnaJ homolog subfamily c member 22-like	653	gi 156537787 ref XP_001608048.1 PREDICTED: dnaJ homolog subfamily C member 22-like [Nasonia vitripennis]	XP_001608048	1.55E-162	82	4.95E+05	351
31	synaptosomal-associated protein 29-like	532	gi 340728921 ref XP_003402760.1 PREDICTED: synaptosomal-associated protein 29-like [Bombus terrestris]	XP_003402760	7.27E-90	78	3.00E+05	280
32	transmembrane protein 147	565	gi 307169632 gb EFN62215.1 Transmembrane protein 147 [Camponotus floridanus]	EFN62215	6.23E-111	89	3.54E+05	229
33	broad-complex core protein isoform 6	577	gi 328791204 ref XP_394600.4 PREDICTED: hypothetical protein LOC411126 [Apis mellifera]	XP_394600	6.10E-154	84	4.74E+05	322
34	ubiquitin-conjugating enzyme e2 l3	428	gi 307200710 gb EFN80807.1 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 [Harpegnathos saltator]	EFN80807	1.92E-97	97	3.12E+05	156
35	vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog	733	gi 322787442 gb EFZ13530.1 hypothetical protein SINV_05600 [Solenopsis invicta]	EFZ13530	1.83E-128	78	4.11E+05	393
36	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	832	gi 307199103 gb EFN79813.1 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 [Harpegnathos saltator]	EFN79813	0.00E+00	74	7.00E+05	569
37	PREDICTED: hypothetical protein LOC100114386 [Nasonia vitripennis]	431	gi 156544968 ref XP_001607781.1 PREDICTED: hypothetical protein LOC100114386 [Nasonia vitripennis]	XP_001607781	1.16E-16	58	9.90E+05	150
38	ap-2 complex subunit mu-1-like	789	gi 48097876 ref XP_391965.1 PREDICTED: AP-2 complex subunit mu-1 isoform 1 [Apis mellifera] >gi 340723846 ref XP_003400299.1 PREDICTED: AP-2 complex subunit mu-1-like [Bombus terrestris]	XP_391965	0.00E+00	98	8.80E+05	442
39	tudor and kh domain-containing	696	gi 350406063 ref XP_003487642.1 PREDICTED: AP-2 complex subunit mu-1-like [Bombus impatiens] gi 380022723 ref XP_003695188.1 PREDICTED: tudor and KH domain-containing protein-like [Apis florea]	XP_003695188	1.40E-84	62	3.03E+05	349
40	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit b	1155	gi 340724912 ref XP_003400822.1 PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B-like isoform 1 [Bombus terrestris] >gi 350422045 ref XP_003493038.1 PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B-like isoform 1	XP_003400822	0.00E+00	92	4.95E+01	682
41	hig1 domain family member 2a	350	gi 389610209 dbj BAM18716.1 HIG1 domain family member 2A [Papilio xuthus]	BAM18716	3.08E-14	62	9.01E+05	93
42	v-type proton atpase subunit e 2-like	327	gi 66524947 ref XP_624787.1 PREDICTED: v-type proton ATPase subunit e 2-like [Apis mellifera]	XP_624787	5.98E-34	88	1.43E+05	84

Tabella 4.1. Output da BLAST2GO riportante le annotazioni funzionali delle proteine e i rispettivi E-value.

In definitiva partendo da sequenze nucleotidiche ed effettuando il confronto è stato ottenuta l'annotazione funzionale delle singole proteine putative. Complessivamente il 61% (12033 contings) delle sequenze mostra similarità con geni o proteine presenti nel database NCBI. (Figura 1) La rimanente parte dei trascritti corrisponde dunque a proteine non note e quindi da caratterizzare.

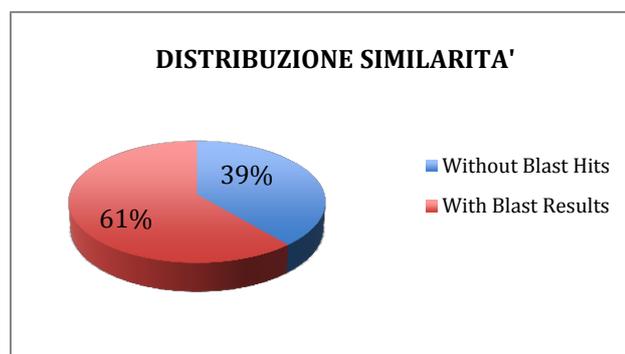


Fig. 1 Distribuzione di similarità. Il 61% delle sequenze mostra similarità con geni e\o proteine presenti nel NCBI database.

La distribuzione delle specie (Blast Top-Hits) evidenzia come un'alta percentuale dei geni delle ghiandole del veleno di *T. nigriceps* dia similarità con geni appartenenti a diverse specie, in particolare, con i geni di *Megachile rotundata* Imenottero apoideo. (Figura 2)

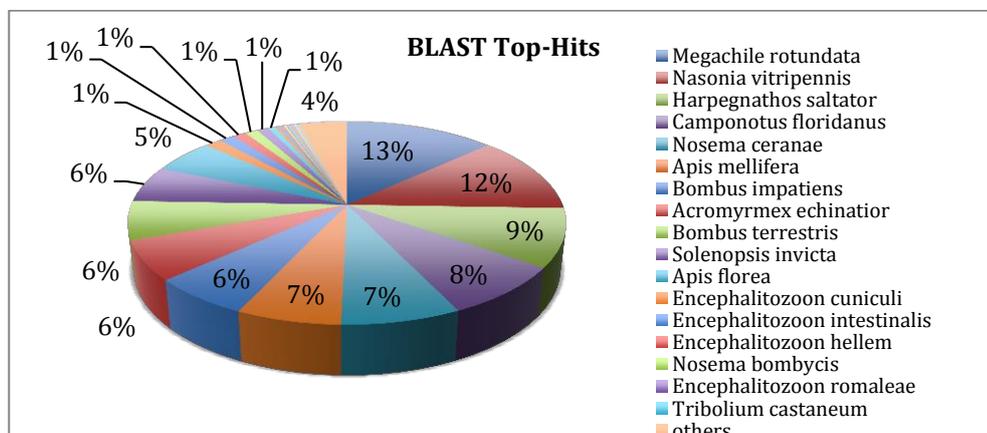
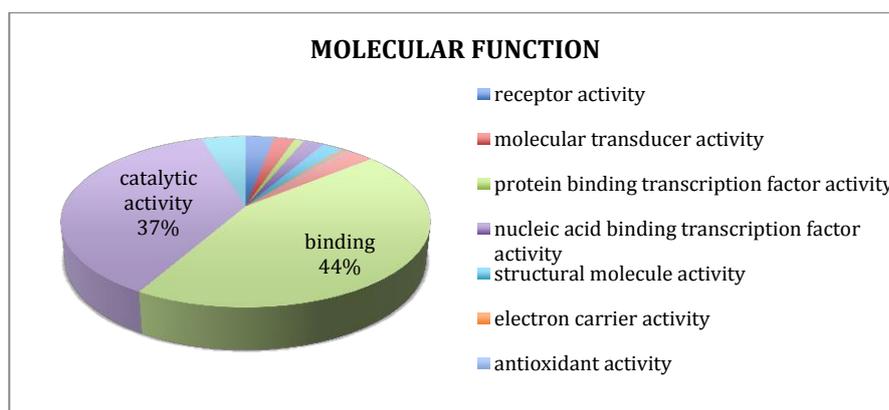


Fig. 2 Distribuzione delle specie. Differenti colori rappresentano diverse specie. Sono mostrate specie con percentuale di similarità maggiore dell'1%.

Per l'interpretazione funzionale del trascrittoma, è stata eseguita l'annotazione delle sequenze tramite il database Gene Ontology, presente all'interno del software Blast2GO, il quale fornisce una definizione precisa del ruolo svolto dalle singole proteine tramite un "vocabolario delle ontologie" (termini) che consente di definire in modo corretto e non arbitrario i processi biologici nei quali potenzialmente una proteina partecipa, le sue funzioni molecolari, e la sua localizzazione cellulare (Nucleic Acids Reserch The Gene Ontology project in 2008).

La Gene Ontology è divisa in tre categorie: molecular function, biological process e cellular component ([Http://www.geneontology.org](http://www.geneontology.org))

Una volta associato un termine Gene Ontology, è stato possibile valutare quali fossero i più rappresentativi all'interno delle tre categorie. (Figura 3)



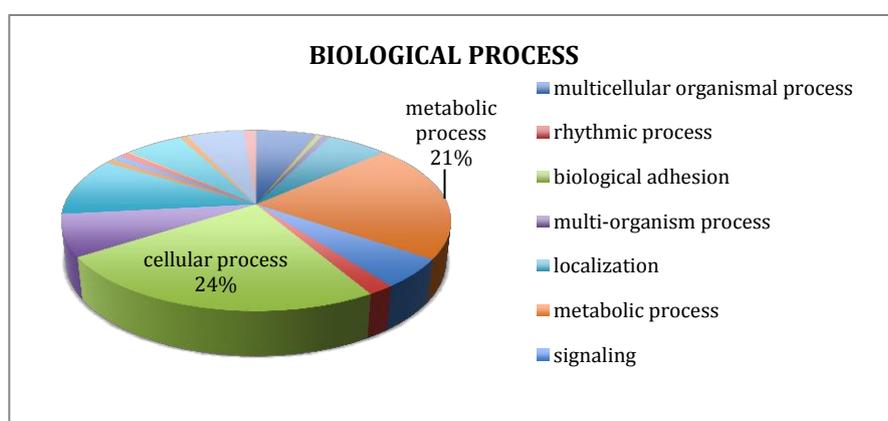
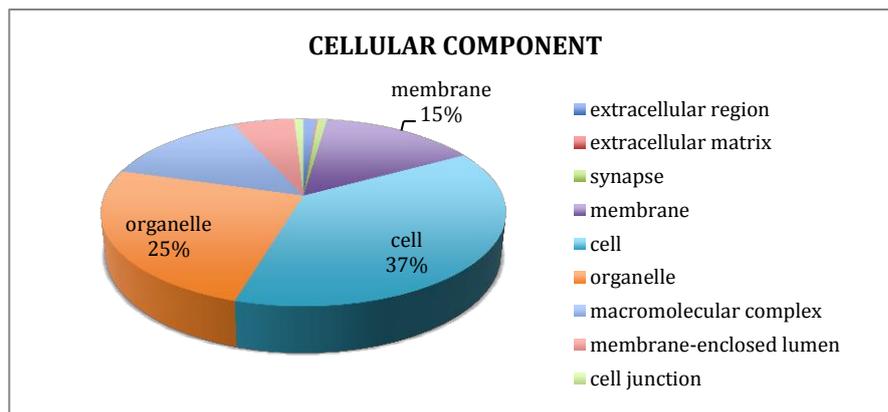


Fig. 3 Annotazione funzionale (Livello 2) 19969 sequenze sono state annotate attraverso il software B2GO.

I prodotti genici più espressi, circa le funzioni molecolari, sono proteine con attività di legame (44%) ed attività catalitica (37%). I compartimenti cellulari dove c'è maggiore attività dei prodotti genici espressi sono: il nucleo e gli organuli; in misura leggermente minore, le membrane cellulari. Lo scenario riguardante i processi biologici è più variegato, con "processi cellulari" e "processi metabolici" che rappresentano i due termini più abbondanti. Come ulteriore analisi, al fine di individuare le putative proteine secrete, fra le quali, presumibilmente si potrebbero annoverare le proteine del veleno, è stato impiegato il programma SignalP ([Http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/))

disponibile on-line che ha consentito di individuare in ciascuna putativa proteina la presenza di un eventuale peptide segnale e sito di taglio. SignalP permette di ottenere come output:

1. i numeri di contig associati alle proteine aventi il peptide segnale;
2. la probabilità di presenza di tale target (peptide segnale);
3. la posizione e la probabilità del taglio per la rimozione del peptide segnale effettuato da peptidasi I e le rispettive sequenze amminoacidiche prive dello stesso (sequenze mature).

La possibilità di identificare le putative proteine secrete dalle ghiandole del veleno, da impiegare per l'analisi dei dati ottenuti in spettrometria di massa, necessita la disponibilità di informazioni aggiuntive, in particolare la sequenza amminoacidica di ciascuna proteina.

Al fine di ottenere questa informazione, è stato dapprima impiegato il programma Seqtools. Sottoponendo in Seqtools tutte le sequenze nucleotidiche, è stato ottenuto per ogni contig e per ciascuna delle sei frame, la traduzione del frammento avente la sequenza amminoacidica più lunga e quindi sono stati ottenuti come risultato 19669 file di estensione FASTA, ciascuno dei quali contiene i sei possibili tradotti (ossia le possibili sequenze ottenibili considerando che il sistema di conversione "tripletta nucleotidica-amminoacido" inizi dal primo, dal secondo o dal terzo nucleotide sia in direzione 5'-3' che in direzione 3'-5'). Da 19968 contigs il programma ha restituito come output (putative proteine secrete) 577 sequenze. In tabella 4.1 sono riportate le annotazione funzionali di alcune di queste proteine, le quali mostrano similarità con proteine che in studi precedenti sono state identificate nel venoma di altri parassitoidi quali *Nasonia vitripennis* (Rivers *et al.*, 2005) e *Microplitis mediator* (Asgari & Rivers 2011).

Annotazione funzionale (BLAST2GO)
13.7 kDa midgut protein [Phlebotomus papatasi]
26S protease regulatory subunit 4 [Camponotus floridanus]
4-amino-4-deoxychorismate lyase [Clostridium novyi NT] gb
60S ribosomal protein L3 [Aspergillus terreus NIH2624] gb
60S ribosomal protein L8 [Encephalitozoon intestinalis ATCC 50506] gb
ABC-2 type transporter [Shewanella sediminis HAW-EB3] gb
AF250387_2 RNA polymerase beta-prime subunit [Candidatus Carsonella ruddii]
AGAP003247-PA [Anopheles gambiae str. PEST] gb
AGAP007949-PA [Anopheles gambiae str. PEST] gb
Alanine aminotransferase 2 [Harpegnathos saltator]
Ankyrin-2 [Harpegnathos saltator]
antigen 5 precursor [Dolichovespula maculata]
AP-1 adaptor complex accessory protein, putative; trans-Golgi network (TGN)-endosome transport protein, putative [Candida dubliniensis CD36] emb
Apolipoprotein D [Camponotus floridanus]
Apoptosis regulator Bcl-X [Harpegnathos saltator]
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [Harpegnathos saltator]
ATPase family AAA domain-containing protein 1-B [Harpegnathos saltator]

beta13-galactosyltransferase [Schistosoma mansoni] emb
Bromodomain-containing protein 7 [Harpegnathos saltator]
C6 transcription factor, putative [Aspergillus flavus NRRL3357] gb
C6 transcription factor, putative [Aspergillus flavus NRRL3357] gb
calreticulin [Cotesia rubecula]
carboxylesterase clade B, member 2 [Nasonia vitripennis]
cdc2-related protein kinase [Cryptosporidium parvum Iowa II] emb
chemosensory protein [Heliiothis virescens]
chemosensory protein 1 [Microplitis mediator]
Chitinase domain-containing protein 1 [Harpegnathos saltator]
chloramphenicol-sensitive RarD protein [Bacillus cereus F65185] gb
Chondroitin proteoglycan-2 [Harpegnathos saltator]
Circadian clock-controlled protein [Harpegnathos saltator]
Clp (C?) [Plasmodium falciparum] emb
conserved hypothetical protein [Bacteroides sp. 2_2_4] gb
conserved hypothetical protein [Candida tropicalis MYA-3404] gb
conserved hypothetical protein [Enterococcus faecium 1,230,933] gb
conserved hypothetical protein [Glyptapanteles indiensis]
conserved hypothetical protein [Leptotrichia hofstadii F0254] gb
conserved hypothetical protein [Listeria seeligeri FSL N1-067]
conserved hypothetical protein [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP] gb
conserved Plasmodium membrane protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7] emb

conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7] emb
CRE-SRW-108 protein [Caenorhabditis remanei] gb
CRE-TTR-18 protein [Caenorhabditis remanei] gb
C-type lectin [Helicoverpa armigera]
cuticular protein analogous to peritrophins 3-B [Apis mellifera]
Cysteine-rich motor neuron 1 protein [Camponotus floridanus]
cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I [Paenibacillus larvae subsp. larvae BRL-230010]
cytochrome P450 6AS30 [Nasonia vitripennis]
decapentaplegic protein [Athalia rosae]
defensin [Apis cerana japonica]
Diacylglycerol O-acyltransferase 1 [Camponotus floridanus]
Di-heme cytochrome c peroxidase [Geobacter sp. M21] gb
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial [Camponotus floridanus]
DNA polymerase zeta catalytic subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7] gb
DNA replication licensing factor Mcm4 [Encephalitozoon intestinalis ATCC 50506] gb
DnaJ-like protein subfamily C member 3 [Harpegnathos saltator]
ecdysone-induced protein 75 [Apis mellifera] dbj
egl nine homolog 1 [Xenopus (Silurana) tropicalis] emb
ELAV-like protein 4 [Camponotus floridanus]
Exosome component 10 [Camponotus floridanus]
Exportin-5 [Camponotus floridanus]

extracellular Cu/Zn superoxide dismutase [<i>Lasius niger</i>]
FAD synthetase [<i>Camponotus floridanus</i>]
Fatty acid desaturase, type 2 [<i>Prochlorococcus marinus</i> str. AS9601] gb
ferritin heavy chain [<i>Asobara tabida</i>]
Ferritin heavy chain [<i>Harpegnathos saltator</i>]
Furin-like protease 1, isoforms 1/1-X/2 [<i>Camponotus floridanus</i>]
GD13933 [<i>Drosophila simulans</i>] gb
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 1 [<i>Harpegnathos saltator</i>]
GE17950 [<i>Drosophila yakuba</i>] gb
GF10972 [<i>Drosophila ananassae</i>] gb
GJ14161 [<i>Drosophila virilis</i>] gb
Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 [<i>Camponotus floridanus</i>]
Glucose dehydrogenase [acceptor] [<i>Camponotus floridanus</i>]
Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit [<i>Harpegnathos saltator</i>]
glycoside hydrolase, family 57 [<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i> 1221n] gb
glycosyltransferase [<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56'] emb
gramicidin s synthetase ii [<i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2] gb
Growth factor receptor-bound protein 10 [<i>Camponotus floridanus</i>]
HEAT repeat-containing protein 5B [<i>Harpegnathos saltator</i>]
heat shock protein 90 [<i>Microplitis mediator</i>]
Hemocytin [<i>Harpegnathos saltator</i>]
Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase [<i>Harpegnathos</i>]

saltator]
homeotic protein distal-less [Athalia rosae]
Homer protein-like protein 1 [Camponotus floridanus]
hymenoptaecin-1 isoform 2 [Nasonia vitripennis]
hypothetical membrane protein [Candida dubliniensis CD36] emb
hypothetical protein [Entamoeba histolytica HM-1:IMSS] gb
hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2] emb
hypothetical protein [Plasmodium berghei strain ANKA] emb
hypothetical protein [Plasmodium chabaudi chabaudi] emb
hypothetical protein [Plasmodium yoelii yoelii str. 17XNL] gb
hypothetical protein [Theileria annulata strain Ankara] emb
hypothetical protein [Theileria parva strain Muguga] gb
hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3] gb
hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener] gb
hypothetical protein AaeL_AAEL002033 [Aedes aegypti] gb
hypothetical protein AaeL_AAEL003832 [Aedes aegypti] gb
hypothetical protein Adeh_2755 [Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-C] gb
hypothetical protein AND_05494 [Anopheles darlingi]
hypothetical protein AND_13978 [Anopheles darlingi]
hypothetical protein ARALYDRAFT_474773 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] gb
hypothetical protein BC1002_6390 [Burkholderia sp. CCGE1002] gb
hypothetical protein BC1G_08399 [Botryotinia fuckeliana B05.10] gb

hypothetical protein BP951000_2160 [Brachyspira pilosicoli 95/1000] gb
hypothetical protein C10G8.4 [Caenorhabditis elegans] gb
hypothetical protein CLOBOL_04069 [Clostridium bolteae ATCC BAA-613] gb
hypothetical protein CRE_07055 [Caenorhabditis remanei] gb
hypothetical protein CRE_15911 [Caenorhabditis remanei] gb
hypothetical protein DDB_G0270056 [Dictyostelium discoideum AX4] gb
hypothetical protein DDB_G0292942 [Dictyostelium discoideum AX4] sp
hypothetical protein EAG_02047 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_04207 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_04387 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_05088 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_06120 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_06222 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_08513 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_09683 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_10354 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_11649 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_12398 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_14746 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_15272 [Camponotus floridanus]
hypothetical protein EAG_15527 [Camponotus floridanus]

hypothetical protein EAI_00430 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_00579 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_00945 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_00949 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_00962 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_01055 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_01657 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_01976 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_03786 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_04259 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_05467 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_07922 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_08444 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_10197 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_11040 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_11788 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein EAI_16903 [Harpegnathos saltator]
hypothetical protein ECU09_1170 [Encephalitozoon cuniculi GB-M1] emb
hypothetical protein Eint_020130 [Encephalitozoon intestinalis ATCC 50506] gb
hypothetical protein Eint_080530 [Encephalitozoon intestinalis ATCC 50506] gb
hypothetical protein F36A2.8 [Caenorhabditis elegans] emb

hypothetical protein F47B8.1 [Caenorhabditis elegans] emb
hypothetical protein FN1934 [Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586] gb
hypothetical protein GobsU_13077 [Gemmata obscuriglobus UQM 2246]
hypothetical protein Kpol_1058p4 [Vanderwaltozyma polyspora DSM 70294] gb
hypothetical protein lhv_2041 [Lactobacillus helveticus DPC 4571] gb
hypothetical protein LOAG_12173 [Loa loa] gb
hypothetical protein LOAG_16041 [Loa loa] gb
hypothetical protein MGG_09633 [Magnaporthe oryzae 70-15] gb
hypothetical protein Mhun_2698 [Methanospirillum hungatei JF-1] gb
hypothetical protein Mtub2_02392 [Mycobacterium tuberculosis 210]
hypothetical protein Mtub2_10695 [Mycobacterium tuberculosis 210]
hypothetical protein NCER_100049 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100098 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100135 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100174 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100290 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100323 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100374 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100428 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100482 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100493 [Nosema ceranae BRL01] gb

hypothetical protein NCER_100509 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100671 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_100727 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101009 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101069 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101512 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101540 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101622 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101663 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101708 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101719 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101810 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101889 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101922 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein NCER_101994 [Nosema ceranae BRL01] gb
hypothetical protein PGTG_17216 [Puccinia graminis f. sp. tritici CRL 75-36-700-3]
hypothetical protein protein [Bacillus cereus G9241] gb
hypothetical protein PROVALCAL_02885 [Providencia alcalifaciens DSM 30120] gb
hypothetical protein sce4949 [Sorangium cellulosum 'So ce 56'] emb
hypothetical protein Spy49_1499c [Streptococcus pyogenes NZ131] gb
hypothetical protein TcasGA2_TC008914 [Tribolium castaneum]

hypothetical protein TcasGA2_TC015989 [Tribolium castaneum]
hypothetical protein TTHERM_00316480 [Tetrahymena thermophila] gb
hypothetical protein TTHERM_00922980 [Tetrahymena thermophila] gb
hypothetical protein Y69H2.3 [Caenorhabditis elegans] emb
hypothetical protein, conserved in Plasmodium species [Plasmodium knowlesi strain H] emb
hypothetical protein, unlikely [Trypanosoma brucei gambiense DAL972]
Hypoxia up-regulated protein 1 [Harpegnathos saltator]
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta [Harpegnathos saltator]
Insulin receptor [Camponotus floridanus]
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain [Camponotus floridanus]
Insulin-like peptide receptor [Harpegnathos saltator]
Integral membrane protein DGCR2/IDD [Harpegnathos saltator]
Integrator complex subunit 5 [Harpegnathos saltator]
Integrin beta-PS [Camponotus floridanus]
Iron/zinc purple acid phosphatase-like protein [Camponotus floridanus]
juvenile hormone epoxide hydrolase [Athalia rosae]
Kazal type serine protease inhibitor-like venom protein 2 [Nasonia vitripennis]
Kinetochore protein NDC80-like protein [Harpegnathos saltator]

Laccase-3 [Camponotus floridanus]
Larval cuticle protein A3A [Camponotus floridanus]
Lipase 3 [Harpegnathos saltator]
LOC797832 protein [Danio rerio]
Low affinity cationic amino acid transporter 2 [Harpegnathos saltator]
major facilitator superfamily MFS_1 [Halorhabdus utahensis DSM 12940] gb
mannonate dehydratase [Roseburia intestinalis L1-82] gb
mCG142175 [Mus musculus]
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 24 [Camponotus floridanus]
Mesoderm development candidate 2 [Harpegnathos saltator]
Metalloproteinase inhibitor 3 [Harpegnathos saltator]
methyl-accepting chemotaxis sensory transducer [Geobacter sp. M21] gb
Methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis [Gordonibacter pamelaee 7-10-1-b]
Mitochondrial 39S ribosomal protein L23 (L23mt) (MRP-L23) [Schistosoma mansoni] emb
mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 2 [Apis cerana cerana] gb
Mitochondrial tumor suppressor 1-like protein [Harpegnathos saltator]
Mothers against decapentaplegic-like protein 4 [Harpegnathos saltator]
multidrug resistance-associated protein [Paracoccidioides brasiliensis]

Pb18]
Multiple coagulation factor deficiency protein 2-like protein [Harpegnathos saltator]
N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase [Harpegnathos saltator]
N-acetyltransferase 5 [Camponotus floridanus]
NADH dehydrogenase subunit 4 [Daktulosphaira vitifoliae]
NADH dehydrogenase subunit 4 [Pseudosquilla ciliata]
NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1 [Camponotus floridanus]
Nicastrin [Camponotus floridanus]
NnaC [Escherichia coli]
novel protein (zgc:91841) [Danio rerio]
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 [Camponotus floridanus]
odorant binding protein [Heliothis virescens]
odorant-binding protein 3 [Microplitis mediator]
odorant-binding protein 4 [Microplitis mediator]
olfactory receptor, family 51, subfamily F, member 2 (predicted) [Otolemur garnettii]
ORF001 [Staphylococcus phage 2638A] gb
Os02g0470400 [Oryza sativa Japonica Group] dbj
Permease of the major facilitator superfamily protein [Marinobacter sp. ELB17] gb
phage-related tail protein [Listeria welshimeri serovar 6b str. SLCC5334] emb
phosphoenolpyruvate carboxykinase [Bacillus coahuilensis m4-4]

Plasma alpha-L-fucosidase [Harpegnathos saltator]
Plasma glutamate carboxypeptidase [Camponotus floridanus]
plasmid maintenance protein [Cryptosporidium muris RN66] gb
Pogo transposable element with KRAB domain [Camponotus floridanus]
Polycomb protein Scm [Camponotus floridanus]
predicted protein [Ajellomyces dermatitidis ER-3]
predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624] gb
predicted protein [Nematostella vectensis] gb
predicted protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb01] gb
predicted protein [Populus trichocarpa] gb
PREDICTED: GI11945-like [Danio rerio]
PREDICTED: hypothetical protein [Apis mellifera]
PREDICTED: hypothetical protein [Gallus gallus]
PREDICTED: hypothetical protein [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: hypothetical protein [Tribolium castaneum]
PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Apis mellifera]
PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Apis mellifera]
PREDICTED: hypothetical protein, partial [Apis mellifera]
PREDICTED: mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 homolog [Xenopus (Silurana) tropicalis]
PREDICTED: oocyte zinc finger protein XICOF8.4-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]

PREDICTED: RE1-silencing transcription factor [Danio rerio]
PREDICTED: similar to 16 kDa salivary protein [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to 5-hydroxytryptamine receptor 3 subunit C [Canis familiaris]
PREDICTED: similar to A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs like [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to activin receptor IIA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to activin receptor type I, putative [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Adenylyl cyclase 78C CG10564-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to apolipoprotein D, putative [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to AT09608p [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to B0238.12 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to bab2 CG9102-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to beta-N-acetylglucosaminidase NAG2 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to BTG3 protein (Tob5 protein) (Abundant in neuroepithelium area protein) [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type (Calcium pump) isoform 1 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Calmodulin-binding transcription activator CG8809-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Calnexin 99A CG11958-PB, isoform B isoform 1 [Apis mellifera]

PREDICTED: similar to calyntenin-1 CG11059-PA, isoform A, partial [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to cathepsin F like protease [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Caveolin-3 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to ceramidase [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to CG10075-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG10217-PA, isoform A [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG10413-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG10670-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to CG10671-PA, isoform A [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG12014-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG12121-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG13318-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG13654-PA, partial [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG13664-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to CG14650-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG16771-PA isoform 1 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG16959-PA, isoform A, partial [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG17509-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG18066-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG2145-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to CG2519-PA, isoform A [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to CG30045-PA [Apis mellifera]

PREDICTED: similar to CG30197-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG3168-PA, isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG32052-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG32512-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG3305-PA isoform 2 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG3344-PA [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to CG4203-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG4484-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG5976-PB, isoform B [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG7023-PA, isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG7359-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG7460-PB [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG7460-PB isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG8272-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG8444-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG8507-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG8603-PA, isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG9171-PA, isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG9520-PB, isoform B [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG9578-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to CG9760-PB [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to conserved hypothetical protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to cop-coated vesicle membrane protein P24

[<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to core 1 UDP-galactose:n-acetylgalactosamine-alpha-r beta 1,3- galactosy [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to Dnajc10 protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to dtdp-glucose 4-6-dehydratase [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ecdysteroid regulated 16 kDa [<i>Tribolium castaneum</i>] gb
PREDICTED: similar to Ect3 CG3132-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000006758 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000011487 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000012173 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000012317 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000012893 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000017479 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000018364 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000021503 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000021763 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000021852 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000027587 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to ENSANGP00000031916 [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to Epididymal secretory protein E1 precursor (Niemann-Pick disease type C2 protein) (hE1) [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to Ero1L CG1333-PB, isoform B [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to ERp60 CG8983-PA, isoform A isoform 2 [<i>Apis</i>]

mellifera]
PREDICTED: similar to esterase D/formylglutathione hydrolase [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Fasciclin 2 CG3665-PB, isoform B isoform 1 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to female neotenic-specific protein 1 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to ftz transcription factor 1 CG4059-PB, isoform B [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to GA10941-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to GA13759-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to GA19584-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to GA21170-PA [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to glucose dehydrogenase [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to glycoprotein 25l [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to GM20958p [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Grasp65 CG7809-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to guanine nucleotide-binding protein beta 5 (g protein beta5) [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to heparanase [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to heparanase-like protein [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to homologue of Sarcophaga 26,29kDa proteinase [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Hsc70/Hsp90-organizing protein HOP [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Imaginal disc growth factor 4 CG1780-PA,

isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to importin 11 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to inorganic phosphate cotransporter, putative [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to klingon CG6669-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to L(3)mbt-like 3 (<i>Drosophila</i>) [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to laccase 1, partial [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to lethal (1) G0232 CG32697-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to lethal (2) k05819 CG3054-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to lethal (2) NC136 CG8426-PA [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to LOC100037210 protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to metalloproteinase inhibitor 3 [<i>Tribolium castaneum</i>] gb
PREDICTED: similar to MGC53320 protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to MGC85327 protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to MGC89016 protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to mitotic protein phosphatase 1 regulator, putative [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase precursor (Glycosylasparaginase) (Aspartylglucosaminidase) (N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)-L-asparagine amidase) (AGA) isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
PREDICTED: similar to NFAT, putative [<i>Nasonia vitripennis</i>]
PREDICTED: similar to odorant-binding protein 1 [<i>Nasonia</i>

vitripennis]
PREDICTED: similar to ORF1p [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to pacifastin-related serine protease inhibitor [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to peroxiredoxins, prx-1, prx-2, prx-3 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to phd finger protein [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to phosphatidylethanolamine-binding protein [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to predicted protein [Hydra magnipapillata]
PREDICTED: similar to Probable dolichyl pyrophosphate Glc1Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase (Dolichyl-P-Glc:Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl glucosyltransferase) (Asparagine-linked glycosylation protein 8 homolog) [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to protein disulfide isomerase [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to protein disulfide isomerase [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Protein FAM60A (Tera protein) [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to putative secreted salivary protein [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to RAN binding protein 9 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Ran-specific GTPase-activating protein (Ran-binding protein 1) (RANBP1) (HpaII tiny fragments locus 9a protein) [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to receptor for activated C kinase, putative [Nasonia vitripennis]

PREDICTED: similar to receptor protein-tyrosine phosphatase 10d, partial [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to replication factor C (activator 1) 5 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Replication Protein A 70 CG9633-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to reticulocalbin [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to ribonuclease T2 family [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Ribosomal protein L13A CG1475-PB isoform 2 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Sel-1 homolog precursor (Suppressor of lin-12-like protein) (Sel-1L) [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Serine palmitoyltransferase subunit I CG4016-PA, isoform A [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to signalosome subunit [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to skuld CG9936-PD, isoform D [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Smrter CG4013-PA, isoform A [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to sodium/solute symporter [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to sol i 3 antigen [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to ssrp2 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to Stromal interaction molecule homolog precursor isoform 1 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to tartan CG11280-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to tetratricopeptide repeat protein 37 [Tribolium castaneum]
PREDICTED: similar to thickveins CG14026-PD, isoform D [Apis

mellifera]
PREDICTED: similar to Transcript 48 CG5507-PA, partial [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to transmembrane 9 superfamily protein member 4 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to trophinin isoform 2 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to tropomodulin CG1539-PA, isoform A isoform 1 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to Trypsin-2 precursor (Trypsin II) (Anionic trypsinogen) (Serine protease 2) [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to two pore channel 1 [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to ubiquitin ligase E3 alpha [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to UDP-galactose transporter [Nasonia vitripennis]
PREDICTED: similar to unc-13 CG2999-PC [Tribolium castaneum]
PREDICTED: similar to Vacuolar protein sorting 11 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to vestigial like 4 [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to XTP3-transactivated protein B [Apis mellifera]
PREDICTED: similar to yellow-h CG1629-PA [Apis mellifera]
PREDICTED: synaptic vesicle glycoprotein 2c-like [Saccoglossus kowalevskii]
Pre-mRNA-splicing factor 18 [Camponotus floridanus]
Probable dolichyl-P-Man:Man(7)GlcNAc(2)-PP-dolichyl-alpha-1, 6-mannosyltransferase [Harpegnathos saltator]
Probable histone-lysine N-methyltransferase ASH1L [Camponotus floridanus]

Probable RNA-binding protein 18 [Camponotus floridanus]
Prolyl 3-hydroxylase 1 [Camponotus floridanus]
prophenoloxidase-2 [Heliothis virescens]
Protein big brother [Harpegnathos saltator]
Protein EFR3-like protein cmp44E [Camponotus floridanus]
Protein halfway [Harpegnathos saltator]
Protein phosphatase methylesterase 1 [Camponotus floridanus]
Protein Shroom [Harpegnathos saltator]
Protein takeout [Camponotus floridanus]
Protein toll [Harpegnathos saltator]
Protein yellow [Camponotus floridanus]
Putative cysteine proteinase CG12163 [Camponotus floridanus]
putative dna topoisomerase i (omega-protein) [Lactobacillus crispatus CTV-05] gb
putative efflux protein, MATE family [Eubacterium rectale M104/1]
putative emulsan repeating unit flippase [Acinetobacter lwoffii]
putative glutamine synthase III [Sodalis glossinidius str. 'morsitans'] dbj
Putative GPI-anchor transamidase [Camponotus floridanus]
Putative protein tag-53 [Camponotus floridanus]
putative sensor histidine kinase [Clostridium butyricum E4 str. BoNT E BL5262] gb
putative thiosulfate sulfurtransferase [Clostridium perfringens CPE str. F4969] gb
RabGAP/TBC domain-containing protein [Polysphondylium pallidum]

PN500]
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma [Camponotus floridanus]
Regulatory-associated protein of mTOR [Harpegnathos saltator]
reverse transcriptase, putative [Pediculus humanus corporis] gb
Rh-like protein [Apis mellifera] gb
Rho-guanine nucleotide exchange factor [Harpegnathos saltator]
Ribosomal protein L25/L23 [Ammonifex degensii KC4] gb
RING finger protein 11 [Camponotus floridanus]
RING finger protein 126 [Harpegnathos saltator]
RING finger protein 13 [Camponotus floridanus]
RING finger protein 165 [Camponotus floridanus]
RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase [Camponotus floridanus]
RS3A_LYSTE RecName: Full=40S ribosomal protein S3a gb
sensory box/ggdef family protein [Nautilia profundicola AmH] gb
serine protease 64 [Nasonia vitripennis]
serine protease homolog 42 isoform 1 [Nasonia vitripennis]
Serine proteinase stubble [Harpegnathos saltator]
Serine/threonine-protein kinase Doa [Harpegnathos saltator]
SGP1_SCHGR RecName: Full=Serine protease inhibitor I/II; Contains: RecName: Full=Protease inhibitor SGPI-1; AltName: Full=Schistocerca gregaria trypsin inhibitor; Short=SGTI; Contains: RecName: Full=Protease inhibitor SGPI-2; AltName: Full=Schistocerca gregaria chymotrypsin inhibitor; Short=SGCI; Flags: Precursor emb

SH3 domain-containing RING finger protein 3 [Harpegnathos saltator]
SH3, pleckstrin-like and PDZ/DHR/GLGF domain-containing protein [Monosiga brevicollis MX1] gb
Sialin [Harpegnathos saltator]
Signal peptidase complex subunit 1 [Camponotus floridanus]
Solute carrier family 46 member 3 [Camponotus floridanus]
Solute carrier organic anion transporter family member 5A1 [Harpegnathos saltator]
Sorting nexin-8 [Harpegnathos saltator]
Ste24 endopeptidase [Candidatus Ruthia magnifica str. Cm (Calyptogena magnifica)] gb
Ste24 endopeptidase [Lutiella nitroferrum 2002] gb
sun protein [Bacillus coahuilensis m4-4]
SWP25_NOSBO RecName: Full=Spore wall protein 25; Flags: Precursor gb
Synaptogyrin-2 [Camponotus floridanus]
TBC1 domain family member 24 [Camponotus floridanus]
T-cell immunomodulatory protein [Camponotus floridanus]
teratocyte released chitinase [Toxoneuron nigriceps]
Thioredoxin domain-containing protein 5 [Harpegnathos saltator]
THO complex subunit 1 [Harpegnathos saltator]
TM2 domain-containing protein CG11103 [Camponotus floridanus]
Torsin-like protein [Camponotus floridanus]
TPR Domain containing protein [Tetrahymena thermophila] gb
Transmembrane 9 superfamily member 3 [Harpegnathos saltator]

Transmembrane and TPR repeat-containing protein 4 [Harpegnathos saltator]
Transmembrane channel-like protein 7 [Harpegnathos saltator]
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 [Camponotus floridanus]
Transmembrane protein 214-A [Camponotus floridanus]
Transmembrane protein 62 [Harpegnathos saltator]
Trehalase [Camponotus floridanus]
tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase [Camponotus floridanus]
Trophoblast glycoprotein [Camponotus floridanus]
trypsin [Glossina morsitans morsitans]
Trypsin-1 [Harpegnathos saltator]
Uncharacterized protein C1orf85-like protein [Camponotus floridanus]
Uncharacterized protein C6orf64 [Harpegnathos saltator]
Uncharacterized protein KIAA0241 [Harpegnathos saltator]
unnamed protein product [Blastocystis hominis]
unnamed protein product [Oikopleura dioica]
unzipped [Apis mellifera] gb
UPF0510 protein C19orf63-like protein [Harpegnathos saltator]
venom protein L [Nasonia vitripennis]
venom protein Q [Nasonia vitripennis]
venom protein V [Nasonia vitripennis]
WAP four-disulfide core domain protein 2 [Harpegnathos saltator]

WD repeat-containing protein 40A [Camponotus floridanus]
WD repeat-containing protein 82 [Camponotus floridanus]
Zinc finger FYVE domain-containing protein 28 [Harpegnathos saltator]

Tabella 4.1. Annotazioni funzionali delle proteine secrete dalla ghiandola velenifera di *T. nigriceps*; in verde sono evidenziate le proteine che in studi precedenti sono state identificate nel venoma di altri insetti parassitoidi.

È interessante poter ritrovare fra le putative proteine secrete (veleno) di *T. nigriceps* sequenze dotate di annotazioni funzionali quali idrolasi, laccasi, serin-proteasi (Tabella 4.1) le quali, in accordo con quanto riportato in letteratura risultano costituenti del veleno di molti endoparassitoidi.

Al fine di ottenere una rapida e corretta identificazione delle proteine del veleno, i dati ottenuti dall'analisi del trascrittoma sono stati incrociati con quelli derivanti dall'analisi del proteoma.

4.2 ANALISI DEL PROTEOMA DI *TOXONEURON NIGRICEPS*.

L'analisi del proteoma del veleno di *T. nigriceps*, ha previsto la separazione delle singole proteine e la successiva analisi mediante spettrometria di massa ESI-FTICR. Ogni singola aliquota del veleno di *T. nigriceps*, raccolta con un rapporto di una ghiandola estratta per μl di acqua (1Gh:1 μl) e conservata a -80°C, è stata scongelata in ghiaccio poco prima della fase analitica (separazione elettroforetica, digestione triptica ed analisi mediante spettrometria di massa).

4.2.1 Separazione elettroforetica

Per avere una prima indicazione circa i pesi molecolari delle proteine del veleno, la miscela proteica è stata dapprima sottoposta ad una separazione elettroforetica monodimensionale SDS-PAGE.

Per la separazione monodimensionale è stato seguito il protocollo di Leammli (Leammli, 1970), ottenendo il profilo monodimensionale riportato in Figura 1. La separazione elettroforetica monodimensionale è stata realizzata caricando su gel al 12.5% di poliacrilammide il surnatante dei campioni di veleno, ottenuto portando i campioni di veleno ad ebollizione per 5 min e centrifugandoli per 1 min a 5000 rpm. Il profilo elettroforetico monodimensionale ha evidenziato come il veleno di *T. nigriceps* sia costituito da una complessa miscela proteica con pesi molecolari compresi fra 220 KDa e 10KDa. L'analisi effettuata non ha consentito di evidenziare la presenza di eventuali peptidi di massa inferiore. Sono state osservate numerose bande a pesi molecolari prossimi tra loro e piuttosto intense, soprattutto nella regione tra i 100 kDa e i 30 kDa. Considerando che l'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione proteica, è stato possibile affermare che le proteine maggiormente presenti nella miscela sono quelle aventi pesi molecolari intorno a 130 kDa (1 banda), 75 kDa (2 Bande), 37 kDa (2 bande) e 14 KDa (1 banda). Figura 4.

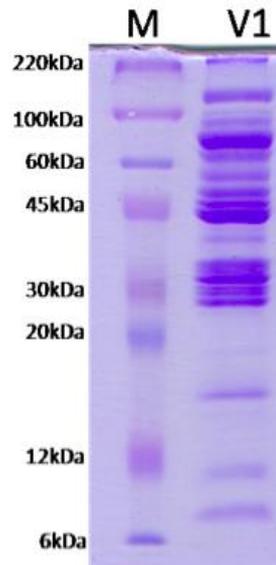


Fig. 4 Analisi elettroforetica monodimensionale (SDS-PAGE 12.5%) del veleno di *T. nigriceps* estratto da femmine parassitoidi. A sinistra sono riportati i pesi molecolari del marker (color burst electrophoresis marker).

Per risolvere la miscela proteica in modo efficace, prima dell'analisi di spettrometria di massa, è stato necessario impiegare una tecnica di separazione ortogonale, ossia l'elettroforesi bidimensionale.

La separazione elettroforetica bidimensionale è stata condotta su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti 2D-PAGE, tecnica con potere risolutivo sufficiente a garantire la completa separazione di miscele anche molto complesse.

Le proteine sono state separate dapprima rispetto al loro punto isoelettrico adoperando come substrato per l'isoelettrofocalizzazione (IEF) delle IPG Dry Strips (Amersham Biosciences) da 13 cm con gradiente di pH 3-10 lineare (L). Per la seconda dimensione, le strips IGP sono state posizionate su un gel al 12.5% di poliacrilammide omogeneo. L'impiego di queste condizioni ha permesso di ottenere il gel elettroforetico del veleno di *T.nigriceps* riportato in Figura 5, che mostra la presenza di ben 80 spots.

Nell'ambito del presente lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata sulla caratterizzazione di uno degli spot più intensi e meglio separati. La scelta, oltre che da aspetti meramente tecnici, è stata supportata dai dati riportati nella letteratura in merito, secondo la quale, generalmente, nei veleni sono le proteine a maggiore concentrazione quelle dotate delle più importanti funzioni biologiche. Il profilo elettroforetico (Fig. 5) mostra come la maggior parte delle proteine del veleno siano concentrate nella finestra di pI circa pari a 6-8 e di MW 97-31 kDa. In Figura 5 è riportato il gel elettroforetico del veleno di *T. nigriceps* ottenuto impiegando le condizioni separative ottimizzate, e dal quale è possibile osservare che le proteine aventi un pI compreso nell'intervallo centrale della strip (pH 5-7) e pesi molecolari tra i 66.3 e i 36.5 kDa appaiono come spot intensi e nettamente distinti gli uni dagli altri.

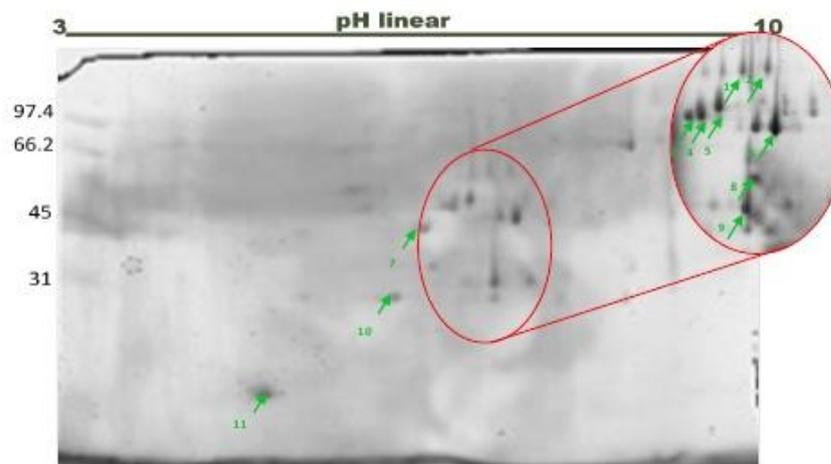


Fig. 5 Analisi elettroforetica bidimensionale (2D-PAGE 10%, gel strip PH3-10L) del veleno di *T. nigriceps*. A sinistra sono riportati i pesi molecolari del marker espressi in kDa. Le frecce verdi associate ai rispettivi numeri indicano gli spot che sono stati escissi e sottoposti a successivo trattamento.

4.2.2 Analisi di massa ESI(+)-FT ICR

Lo spot selezionato numero 1 è stato escisso dal gel, decolorato e poi sottoposto a digestione proteolitica. L'enzima utilizzato è la tripsina che

effettua tagli proteolitici sul sito carbossilico del legame peptidico di arginina (R) e lisina (K) in modo altamente selettivo e specifico. L'enzima risulta inattivo quando i due amminoacidi (R e K) sono seguiti da prolina (P), o nel caso in cui modifiche post-traduzionali rendano i siti di taglio "inaccessibili" all'enzima stesso (Siepen et al., 2007).

La digestione triptica è una fase che ha una durata compresa fra 16 e 18 ore. Nel caso specifico il digerito triptico è stato ripreso con 500 μl di una miscela acqua, acetonitrile ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) (1:1) acidificato con l' 1% di acido formico (Chen et al., 2011) e centrifugato a 10000 rpm per 20 minuti. La miscela così ottenuta è stata iniettata tramite pompa a siringa nello spettrometro di massa a trappola ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR-MS), e ionizzata mediante sistema di ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità positiva. In Figura 6 è riportato lo spettro di massa ESI-FT ICR del digerito triptico dello spot 1.

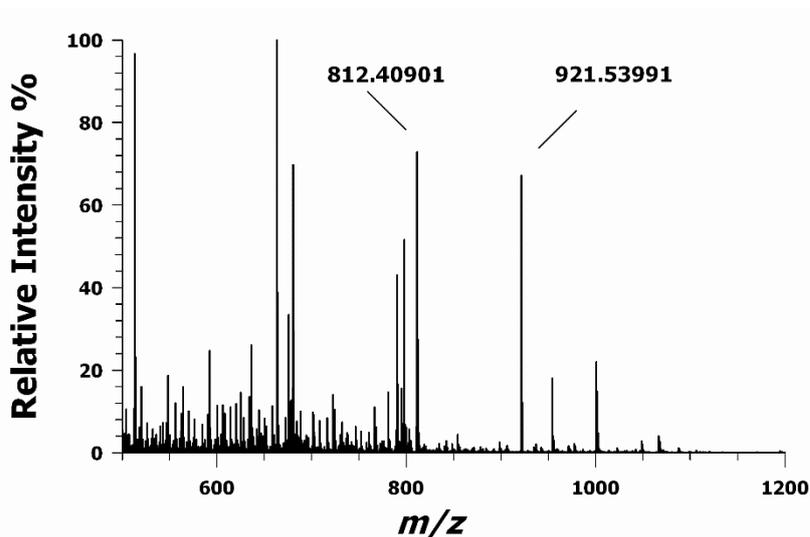


Fig. 6 Spettro ESI-FTICR della miscela triptica della proteina dello spot n°1 in $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ 1:1 acidificata con l' 1% di acido formico ottenuto tramite ESI(+)-FRICR. Analisi con iniezione in flusso, velocità di iniezione 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nella figura sono evidenziati i segnali dei peptidi di cui è stata effettuata l'analisi di massa tandem.

Dalla figura 6 si evince che lo spettro di massa dell'intera miscela triptica risulta

molto complesso e da tale spettro non è possibile ricavare alcuna informazione utile all'identificazione proteica. In questo lavoro di tesi per l'identificazione della proteina dello spot 1 del veleno di *T. nigriceps* è stato applicato il metodo identificativo sviluppato da Mann e Wilm (Mann & Wilm, 1994), il quale prevede la determinazione di specifiche sequenze amminoacidiche di peptidi proteolitici tramite analisi di spettrometria di massa tandem e la successiva ricerca di tali sequenze tra le diverse sequenze amminoacidiche complete del proteoma oggetto di studio. In questo modo, combinando informazioni quali la massa dell'intera proteina e dei singoli frammenti proteolitici con specifiche sequenze amminoacidiche è possibile fare assegnazioni altamente specifiche.

E' stato quindi necessario, per poter identificare la proteina, ricorrere all'analisi di frammentazione indotta per collisione (CID).

4.2.3 Analisi di massa tandem ESI(+)-FT ICR-MS/MS con CID

La spettrometria di massa tandem è spesso utilizzata per l'identificazione di proteine, in quanto capace di generare frammenti ionici che risultano essere caratteristici di specifiche sequenze amminoacidiche e quindi di grande utilità per la comprensione dell'intera sequenza proteica. Questo tipo di analisi richiede però la combinazione di misure di massa accurate e l'impiego di specifici tagli enzimatici della proteina sottoposta all'analisi. La frammentazione di un peptide può verificarsi per rottura di tre diversi tipi di legame della sequenza amminoacidica: i legami NH-CH, CH-CO e CO-NH. Per rottura di ciascuno di questi legami, si possono ottenere due diversi frammenti carichi, rivelati successivamente nello spettro di massa tandem. In Figura 7a-b è mostrata la struttura chimica di un peptide con le tre possibili rotture di legame

e la “nomenclatura”, secondo Roepstorff- Fohlmann-Biemann, dei possibili ioni frammento che si vengono a formare (Roepstorff & Fohlmann, 1984). Essi sono convenzionalmente indicati con le lettere –a per rottura del legame CH~CO, -b (NH~CO) e –c (NH~CH) se la carica è trattenuta nel frammento N-terminale e con le lettere –x (CH~CO), -y (NH~CO) e –z (NH~CH) se la carica è mantenuta nel frammento C-terminale. Di conseguenza la perdita per frammentazione di un singolo residuo amminoacidico della catena può generare sei possibili ioni prodotti: gli ioni di tipo –a, -b e –c, con carica elettrica sul frammento N-terminale, e gli ioni di tipo –x, -y e –z, con carica sul frammento C-terminale. Quando un peptide viene frammentato all’interno di uno spettrometro di massa con tecniche di frammentazione a bassa energia, come la dissociazione indotta da collisione (CID), la rottura del legame avviene seguendo il cammino di minima energia, pertanto interesserà i legami più deboli della molecola, nel caso specifico di peptidi, il legame peptidico (Polce *et al.*, 2000). Come detto in precedenza, la rottura del legame peptidico porta alla formazione di ioni di tipo -b se la carica è trattenuta dal gruppo amminico terminale, di tipo -y quando la carica è trattenuta dal gruppo carbossilico terminale (Chawner *et al.*, 2012).

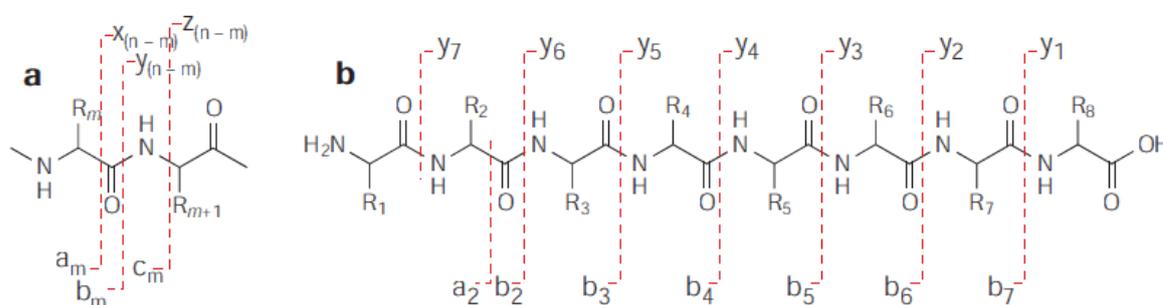


Fig. 7 a) Tre possibili frammentazioni della catena amminoacidica e rispettiva nomenclatura dei sei possibili frammenti ionici che ne derivano; **b)** frammentazioni successive di un peptide ottenute con tecniche di frammentazione a bassa energia (CID).

E' stata eseguita l'analisi di massa tandem dei peptidi triptici a m/z 812.41 ($z = +2$) e 921.54 ($z=+1$) col fine di risalire alla sequenza amminoacidica e quindi in seguito identificare la proteina.

In Figura 8 è riportato lo spettro MS/MS dello ione 812.41 ($z = +2$) frammentato mediante dissociazione indotta per collisione (CID) nella trappola ionica (finestra di isolamento delta $m/z = 6$, energia di collisione 20 eV); gli ioni prodotto sono convogliati attraverso un campo elettrico verso la trappola ionica ciclotronica e lì rivelati.

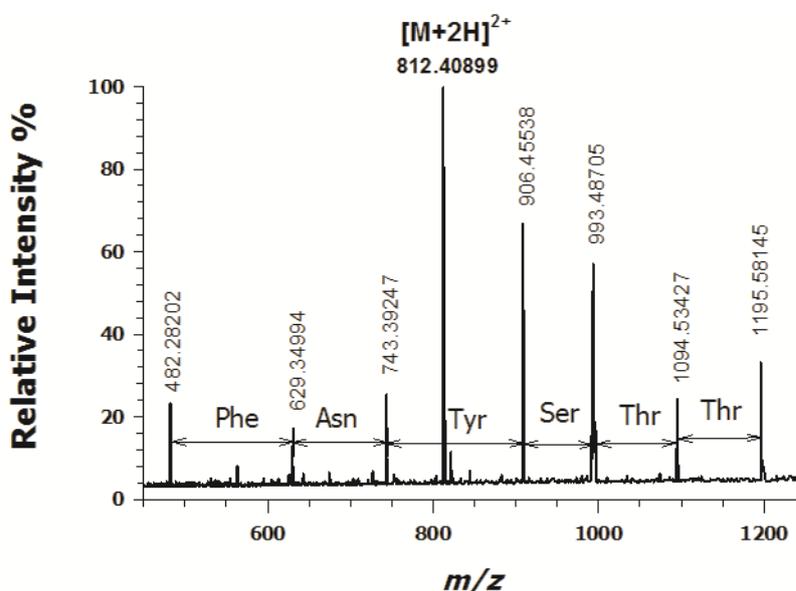


Fig. 8 Spettro di massa tandem CID dello ione a m/z 812.40 ($\Delta m/z = 3.0$) derivato dalla digestione triptica dello spot 1 ottenuto con un energia collisionale di 18eV.

Mediante la differenza fra i segnali, è stato possibile identificare l'identità dell'amminoacido perso durante la frammentazione (Tabella 4.2).

$(m/z)_1/(m/z)_2$	$\Delta m/z$	Amino acid	Exact mass	Error (mmu)
1196-1095	101.04718	Thr	101.04768	-0.50
01094-993	101.04722	Thr	101.04768	-0.46
993-906	87.03167	Ser	87.03203	-0.36
906-743	163.06291	Tyr	163.06333	-0.42
743-629	114.04253	Asn	114.04293	-0.40
629-482	147.06792	Phe	147.06841	-0.49

Tabella 4.2. Elenco delle differenze fra i segnali e identità degli amminoacidi persi con relativo errore relativo allo spettro in Figura 8.

La perdita graduale di amminoacidi lungo la catena principale del peptide, genera una serie di segnali dalla cui differenza è possibile ricavare l'identità dell'amminoacido perso. Tuttavia esistono due sensi di lettura della sequenza amminoacidica ricavata a seconda se gli ioni generatisi siano di tipo y (C-terminali), e in questo caso la sequenza è TTSYNF, o di tipo b (N-terminali), e in questo caso la sequenza è FNYSTT (Tabb *et al.*, 2003). Per comprendere a quale tipo di ioni appartengono quelli generati nello spettro MS/MS in Figura 8, è stato utilizzato il programma Peptide Fragmentation Ion Analyser (PFIA) (S. Jagannath *et al* 2007) con cui è possibile calcolare quale sia la composizione amminoacidica di uno ione prodotto; inserendo in input il valore di m/z di uno ione prodotto, il software PFIA restituisce in output tutto l'elenco delle possibili combinazioni di amminoacidi che potrebbero comporre quel determinato ione. In questo caso specifico è stata ricercata la composizione amminoacidica dello ione prodotto a m/z 482.28202 con un errore di $\Delta m/z = \pm 0.002$. Il software ha restituito due possibili composizioni amminoacidiche di tipo y: G,H,I,R e G,H,L,R. Se lo ione a m/z 482 è di tipo y, allora anche gli altri ioni nello spettro in Figura 7 sono di tipo y e la sequenza amminoacidica ricavata va letta nel

verso TTSYNF. Nel database proteico di *T. nigriceps* ottenuto dalla traduzione bioinformatica del trascrittoma delle ghiandole del veleno dell'insetto, è stata ricercata la sequenza TTSYNF. Tale sequenza è stata trovata in un'unica proteina identificata dal numero di contig **18626** e annotata come heparanase. Inoltre nella proteina **18626**, la sequenza TTSYNF è seguita dalla sequenza GHIR come previsto dal programma PFI, quindi la sequenza identificata è composta da dieci amminoacidi: TTSYNFGHIR. Poiché è sufficiente una sequenza di 8 amminoacidi per poter identificare univocamente una proteina (Blueggel *et al*, 2004), si potrebbe già affermare con certezza che la proteina oggetto di tale studio, sia effettivamente una heparanase; tuttavia per avere un'ulteriore conferma sull'identità della proteina, si è proceduto con l'analisi di massa tandem di un altro peptide.

Analogamente è stato analizzato il peptide triptico a m/z 921.534 ($z=+1$) di cui è mostrato lo spettro MS/MS in Figura 9.

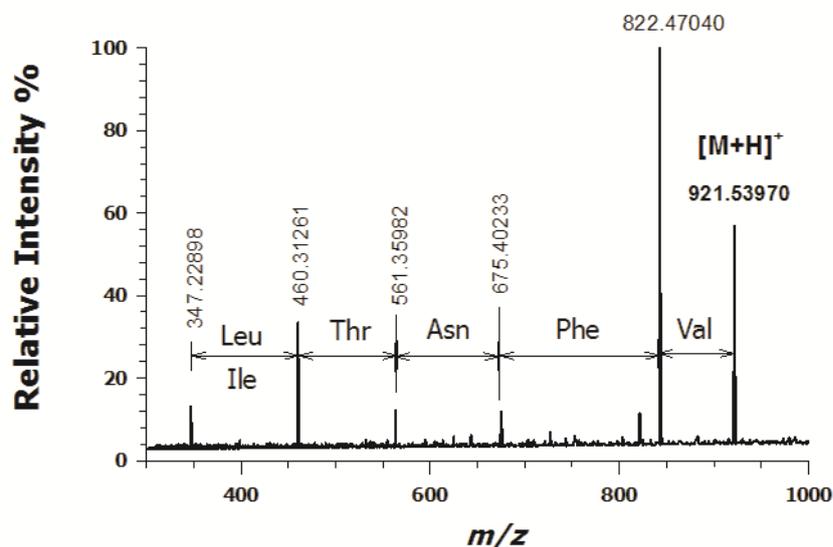


Fig. 9 Spettro di massa tandem CID dello ione a m/z 921.54 ($\Delta m/z = 3.0$) derivato dalla digestione triptica dello spot 1 ottenuto con un'energia collisionale di 16eV.

Mediante la differenza fra i segnali, è stato possibile identificare l'identità dell'amminoacido perso durante la frammentazione (Tabella 4.3).

$(m/z)_1/(m/z)_2$	$\Delta m/z$	Amino acid	Exact mass	Error (mmu)
921-822	99.06930	Val	99.06841	-0.89
822-675	147.06807	Phe	147.06841	-0.34
675-561	114.04251	Asn	114.04293	-0.42
561-460	101.04721	Thr	101.04768	-0.47
460-347	113.08363	Ile/Leu	113.08406	-0.43

Tabella 4.3. Elenco delle differenze fra i segnali e identità degli amminoacidi persi con relativo errore relativo allo spettro in Figura 9.

Anche in questo caso per comprendere se gli ioni generatisi sono di tipo y o b, è stato necessario ricorrere all'utilizzo del software PFIA tramite cui è stata calcolata la composizione amminoacidica dello ione a m/z 347.22898 con un errore di $\Delta m/z = \pm 0.002$. Il software ha restituito in output tre risultati tutti ioni y: I, S, K – L, S, K – K, T, V. Se lo ione a m/z 347 è uno ione di tipo y, anche gli altri devono essere necessariamente ioni di tipo y, quindi il verso di lettura della sequenza ricavata dall'interpretazione dello spettro di massa tandem è VFNTL/I. L'identità dell'ultimo amminoacido non è nota perché esistono due amminoacidi con la stessa massa, cioè 113.08406. Nella sequenza della proteina identificata nel database dal contig **18626**, sono state cercate entrambe le sequenze VFNTL e VFNTI ed è stata ritrovata la sequenza VFNTL seguita dagli amminoacidi Serina, Isoleucina e Lisina (SIK) come previsto dal software PFIA. Quindi l'intera sequenza del peptide triptico di m/z 921.53991 è VFNTLSIK.

L'individuazione di due sequenze amminoacidiche all'interno della sequenza **18626**, ottenute dall'analisi di massa tandem di due peptidi triptici dello spot 1, ha permesso di identificare inequivocabilmente la proteina come una putativa heparanase.

4.3 IDENTIFICAZIONE DI UNA PUTATIVA PROTEINA PRESENTE NEL VELENO:L'EPARANASI.

L'eparanasi (HPSE) è un endo- β -D-glucuronidasi che degrada le catene laterali di eparan solfato (HS) degli eparan solfato proteoglicani (HPSGs), a livello di un limitato numero di siti specifici intra-catena, generando frammenti di circa 5-7 kDa e partecipando alla degradazione e al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), (Ilan *et al.*, 2006).

Gli HPSGs sono membri della famiglia dei glicosamminoglicani, una classe di molecole che consistono di unità disaccaridiche ripetute, non ramificate, legate al core delle proteine. I proteoglicani sono presenti essenzialmente in tutti i compartimenti tissutali, localizzati nella ECM, sulla superficie cellulare, intracellularmente nei granuli e anche nei nuclei.

Le catene laterali degli HPSGs legano un'ampia varietà di proteine che includono i maggiori componenti della ECM come il collagene IV, la laminina e la fibronectina, contribuendo all'integrità strutturale, all'autoassemblaggio e all'insolubilità della ECM e della membrana basale. Numerosi enzimi, fattori di crescita, citochine e chemochine vengono sequestrate dagli HSPGs sulla superficie cellulare e nella ECM, molto spesso come molecole inattive. Il taglio degli HSPGs rilascerebbe questi polipeptidi e li convertirebbe in mediatori bioattivi, assicurando così una rapida risposta tissutale alle variazioni locali dell'ambiente e un controllo dei processi fisiologici e fisiopatologici, tra i quali

la morfogenesi, la riparazione dei tessuti, l'infiammazione, l'autoimmunità, le metastasi tumorali e l'angiogenesi. (Levy-Adam *et al.*, 2005).

L'espressione dell'eparanasi è stata osservata inizialmente in placenta umana. Successivamente è stata identificata in una varietà di cellule e tessuti normali e tumorali, quali citotrofoblasti, cellule endoteliali (ECs), piastrine, mastociti, neutrofili, macrofagi, linfociti T e B, e linfomi, melanomi e carcinomi. (Vlodavsky & Friedmann, 2001).

È stato dimostrato che, nei mammiferi, solo un gene (HPSE-1) codifica la proteina con l'attività dell'eparanasi ed è localizzato a livello del cromosoma 4q21.3; ha una lunghezza complessiva di 50 kb e contiene 14 esoni separati da 13 introni. (Vlodavsky *et al.*, 1999).

Il cDNA dell'eparanasi contiene una ORF di 1629 bp che codifica un polipeptide di 543 aminoacidi con un peso molecolare di 61.2 kDa. (Vlodavsky & Friedmann, 2001).

L'enzima viene sintetizzato in una forma "pre-pro" che viene processata ad una forma inattiva di 65kDa (pro-enzima) e questo avviene in seguito della rimozione del peptide segnale di indirizzamento al reticolo endoplasmatico (Met1-Ala35) all'estremità N-terminale. Il pro-enzima subisce un ulteriore processamento che lo converte nella forma attiva. In particolare viene tagliato un peptide intermedio di 6 kDa (Ser110-Gln157) ad opera della catepsina-L. L'enzima maturo attivo è un eterodimero costituito da due polipeptidi di 8 kDa (Gln36-Glu109) e 50 kDa (Lys158-Ile543), uniti tra loro non-covalentemente mentre l'attività enzimatica è garantita solo dall'associazione dei due monomeri costituenti la proteina. (Fux *et al.*, 2009)

La biosintesi ed il processamento dell'eparanasi sono strettamente correlati alla sua localizzazione intracellulare, alla veicolazione nell'ambiente esterno ed

al suo riassorbimento. La pre-pro eparanasi viene trasportata al reticolo endoplasmatico grazie al peptide segnale localizzato nella regione N-terminale. Nel reticolo il peptide viene rimosso e la proteina viene N-glicosilata.

Dal reticolo il pro-enzima passa all'apparato del Golgi dove viene internalizzato in vescicole che ne veicolano la secrezione nello spazio extracellulare. All'esterno della cellula la pro-eparanasi interagisce con gli HSPG di membrana come il sindecano-1. Il complesso eparanasi-HSPG subisce un'endocitosi e si accumula negli endosomi. La conversione degli endosomi in lisosomi determina un ulteriore processamento ed attivazione dell'enzima che può quindi partecipare a sua volta alla degradazione delle catene di HS all'interno del lisosoma. I lisosomi sono organelli citoplasmatici caratterizzati da un pH acido (pH 4-5) che consente l'azione di molteplici enzimi degradativi, come nucleasi, lipasi, glicosidasi e proteasi. In particolare a questo livello agisce la catepsina L, la proteasi responsabile della completa rimozione del peptide intermedio Ser110-Gln157 e della conseguente attivazione dell'enzima. L'eparanasi è generalmente presente nei lisosomi perinucleari, dai quali viene traslocata al nucleo, dove può interferire con la trascrizione genica. Nelle cellule normali l'enzima è raramente secreto nell'ambiente extracellulare ad eccezione delle piastrine e dai mastociti, nei quali l'enzima si accumula all'interno dei granuli secretori ed è rilasciato in risposta all'attivazione delle cellule ed alla loro degranulazione. La forma latente che viene secreta può inoltre interagire con specifiche proteine che attivano delle vie di segnalazione intracellulari come AKT, p38, Src, Pyk2 e integrine che mediano effetti come la migrazione e l'adesione cellulare, l'espressione di VEGF e l'angiogenesi.

L'attività dell'eparanasi è principalmente correlata con il potenziale metastatico delle cellule tumorali, dovuto all'aumentata disseminazione cellulare come conseguenza della degradazione dell'HS e del rimodellamento della matrice

extracellulare. Similmente, è stato dimostrato che l'attività dell'eparanasi è coinvolta nella neovascolarizzazione, nell'infiammazione e nell'autoimmunità, sostenendo la migrazione delle cellule endoteliali vascolari e delle cellule del sistema immunitario nonché nella nefropatia diabetica (Parish *et al.*, 2001).

La sua predominante espressione nei tumori umani la mette, quindi, in relazione alla progressione tumorale in base alle sue proprietà pro-invasive e pro-angiogeniche. La degradazione dei vari costituenti dell'ECM, inclusi gli HSPGs, rappresenta un elemento fondamentale nei processi di invasione tumorale e metastasi.

4.4 SVILUPPI FUTURI

L'approccio eseguito in dettaglio per l'analisi dello spot 1 sarà applicato, nel prosieguo di questo lavoro scientifico, anche all'analisi mediante spettrometria di massa tandem ESI(+)-FT ICR-MS/MS degli altri spot escissi (in totale 13).

Studi futuri mireranno alla caratterizzazione completa del proteoma di *T. nigriceps*.

L'obiettivo sarà quello di applicare l'approccio descritto anche allo studio delle proteine ovariche di *T. nigriceps* che, insieme al veleno, sono iniettate nelle larve ospiti al momento della parassitizzazione. Inoltre si potrà ampliare il campo di applicazione ai secreti di origine materna di altri endoparassitoidi in studio nel laboratorio in cui è stato svolto questo lavoro sperimentale.

BIBLIOGRAFIA

- Asgari S. & Rivers D.B.** (2011). Venom proteins and their role in host parasite interaction. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 313 – 335.
- Batista C.V., D'Suze G., Gómez-Lagunas F., Zamudio F.Z., Encarnación S., Sevcik C., Possani L.D.** Proteomic analysis of Tityus discrepans scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics*. 2006 Jun;6:3718-27.
- Blueggel M, Chamrad D, Meyer H.** (2004) Bioinformatics in proteomics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2004, 5: 79–88.
- Chawner R., Gaskell S.J. & Eyers C.E.** (2012) Proposal for a common nomenclature for peptide fragments generated following sequence scrambling during collision-induced dissociation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26: 205-206.
- Chen J., Canales L. & Neal R.E.** (2011) Multi-Segment Direct Inject nano-ESI-LTQ-FT-ICR MS/MS for Protein Identification. *Proteome Science*, 9: 38-4.
- Conesa A., Gotz S., J.M. Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M., & Robles M.** (2005). Blast2Go: a universal tool annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676.
- Fernández J., Alape-Girón A., Angulo Y., Sanz L., Gutiérrez J.M., Calvete J.J. & Lomonte B.**(2011). Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J Proteome Res.*, Vol. 4, 10, pp. 1816-27.
- Fux L., Feibish N., Cohen-Kaplan V., Gingis-Velitski S., Feld S., Geffen C., Vlodavsky I. & Ilan N.** (2009) Structure-function approach identifies a COOH-terminal domain that mediates heparanase signaling. *Cancer Res.*, 69(5):1758-1767.
- Ilan N., Elkin M. & Vlodavsky I.** (2006) Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J. Biochem Cell Biol.*, 38(12): 2018-39.
- Leammler U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 :680-685.
- Levy-Adam F., Abboud-Jarrous G., Guerrini M., Beccati D., Vlodavsky I. & Ilan N.** (2005) Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase. *J. Biol. Chem.*, 280: 20457-20466.
- Liao Z., Cao J., Li S., Yan X., Hu W., He Q., Chen J., Tang J., Xie J. & Liang S.**(2007). Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics.*, Vol. 7, 11, pp. 1892-907.

Mann M. & Wilm M. (1994) Error-Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags. *Anal. Chem.*, 66: 4390-4399.

Pennacchio F. & Strand M.R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 2006, Vol. 51: 233-258 .

Polce M.J. Da Ren S. & Wesdemiotis C. (2000) Dissociation of the peptide bond in protonated peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 35 : 1391-1398.

Roepstorff P. & Fohlmann J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, 61: 977-1010.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O.& Mann M. (1996). Mass spectrometry sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68: 850-858.

Siepen J.A., Keevil E.J., Knight D. & Hubbard S.J. (2007) Prediction of Missed Cleavage in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 6: 399-408.

Tabb D.L., Smith L.L., Breci L.A. Wysocki V.H, Lin D. & Yates JR 3rd (2003) Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. *Anal. Chem.* 75(5):1155-63.

Vlodavsky I. & Friedmann Y. (2001) Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 108(3):341-7.

RINGRAZIAMENTI

Per questo lavoro desidero *in primis* ringraziare la Prof.ssa Patrizia Falabella, che si è dedicata a me con tutte le sue energie, guidandomi con pazienza e dedizione.

Vorrei ringraziare anche il Prof. Francesco Pennacchio che seppur lontano è riuscito a seguirmi.

Vorrei inoltre ringraziare tutti i membri del laboratorio che in varie misure hanno contribuito a questo lavoro con grande disponibilità ed entusiasmo: la Dott.ssa Simona Laurino, la Dott.ssa Cristiana Labella, la Dott.ssa Lucia Dinice, il Dott. Alessandro Buchicchio, la Dott.ssa Sara Granafei, la Dott.ssa Carmen Scieuzo e la Dott.ssa Rosanna Salvia.

Ringrazio per le preziose collaborazioni il Dott. Heiko Vogel del Max Planck Institute for Chemical Ecology di Jena (Germania), il Dott. Rocco Rossano dell'Università degli Studi della Basilicata e la Dott.ssa Annalisa Grimaldi dell'Università degli Studi dell'Insubria.