



Analisi Proteomica dei Tessuti dell'Orata da Maricoltura

- Aspetti di Benessere, Qualità ed Ittiopatologia -

Maria Filippa Addis

Tramariglio, 30 giugno 2009



I campionamenti



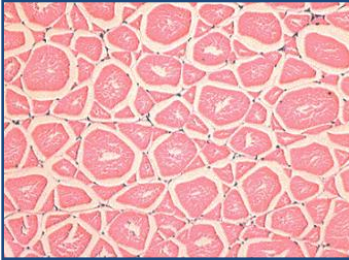
4 Allevamenti *off-shore*
di orata



2 Campionamenti di
orata selvatica

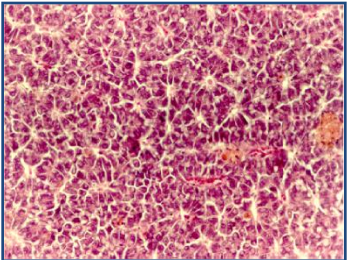


I tessuti campionati e sottoposti ad analisi proteomica



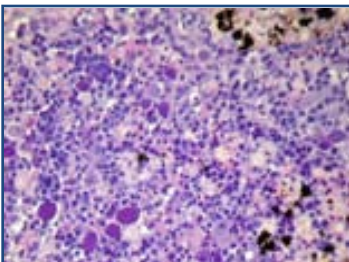
Muscolo

Il muscolo è la parte edibile e rappresenta il prodotto commerciale. Il corretto sviluppo e la salute di questo tessuto sono fondamentali per la qualità del prodotto



Fegato

Il fegato è l'organo che maggiormente riflette le variazioni nello stato di benessere del pesce e nella tipologia di alimentazione somministrata in allevamento



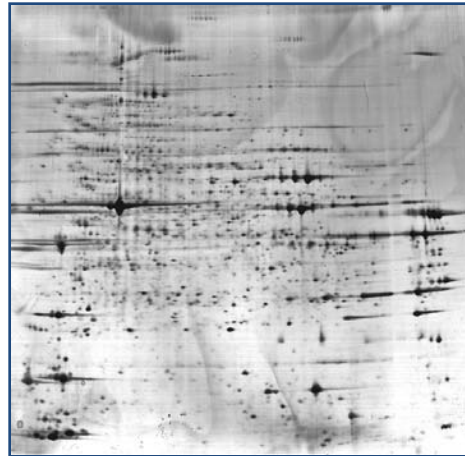
Rene

In quest'organo si sono manifestati alcuni dei pochi eventi di colonizzazione batterica rilevati negli allevamenti

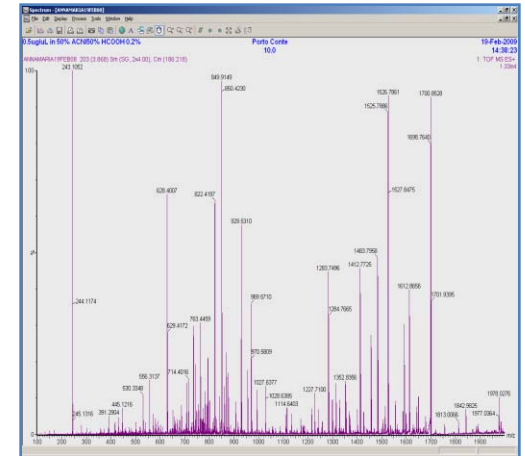
Il percorso dell'analisi proteomica: dal tessuto alla proteina



tessuto



mappa



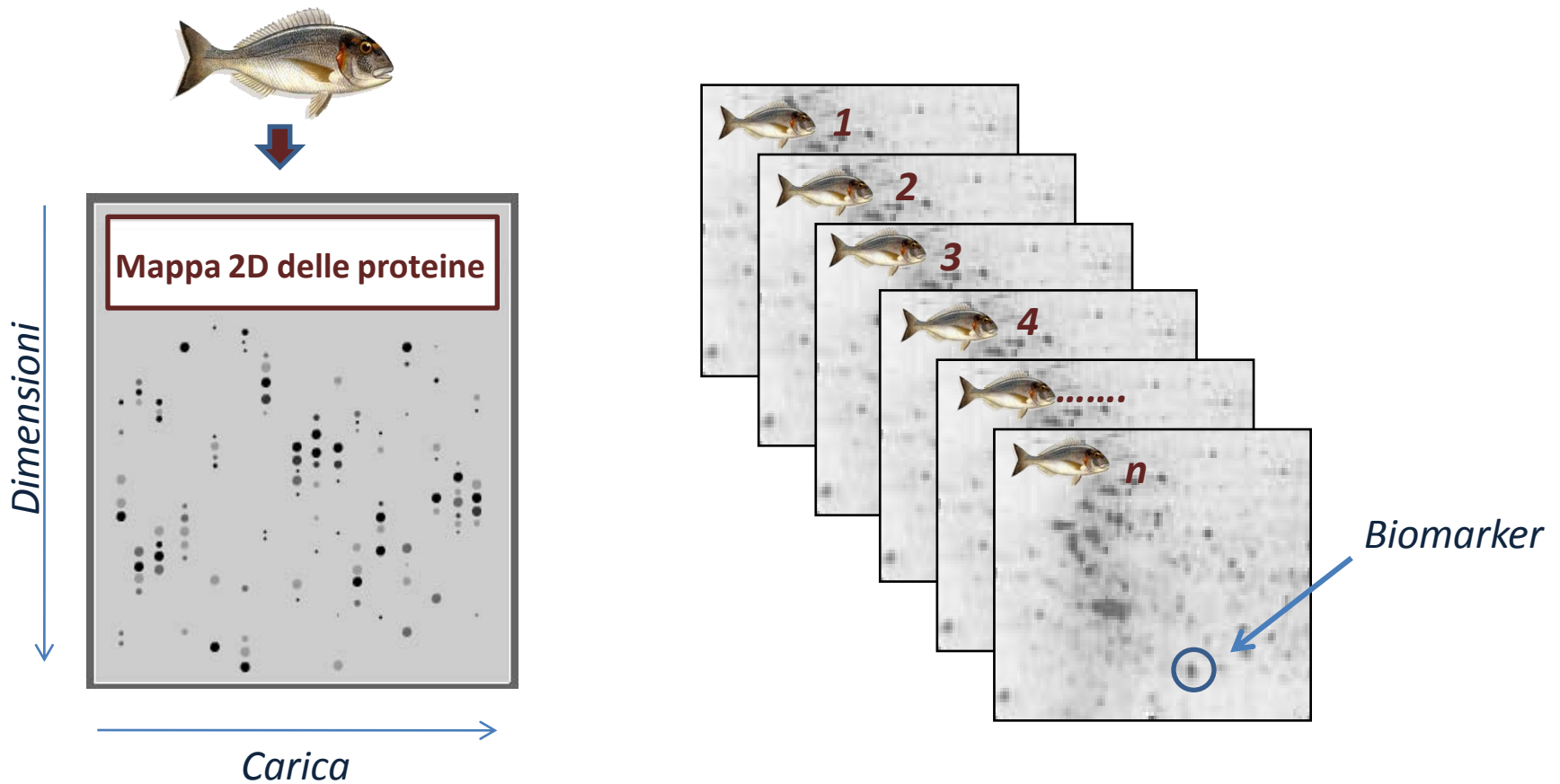
proteina

Con l'analisi proteomica si "scompono" un tessuto nei suoi costituenti proteici principali, in modo da caratterizzarlo in dettaglio e di studiarne le differenze a livello molecolare

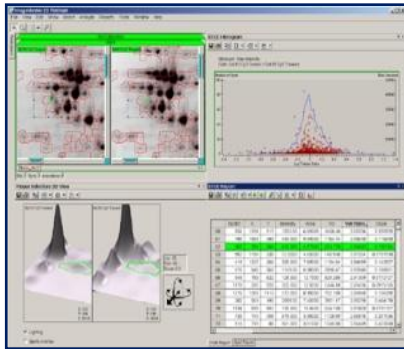


Gel-based proteomics

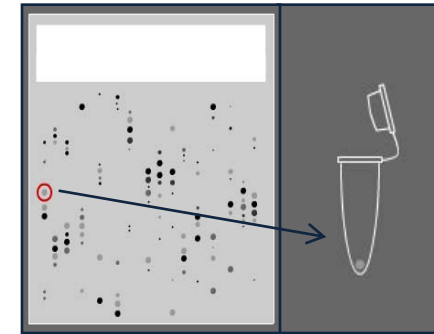
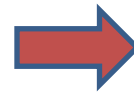
La tecnica di elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) consente di “ordinare” le proteine secondo criteri di dimensione e carica, e rende così possibile confrontare il quadro di espressione delle proteine in diversi campioni



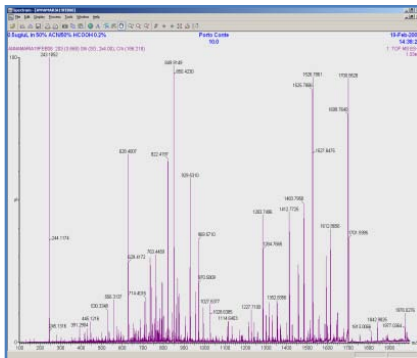
Successivamente, le proteine di interesse possono essere estratte dal gel ed identificate grazie alla spettrometria di massa



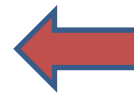
Analisi delle immagini



Taglio degli spot



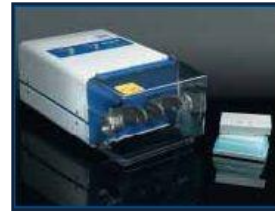
proteina



Spettrometria di massa



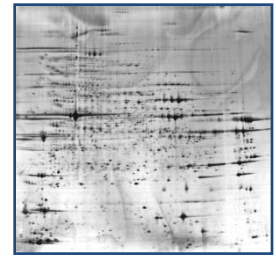
Campione



Lisi ed estrazione



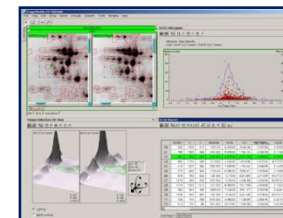
Quantificazione



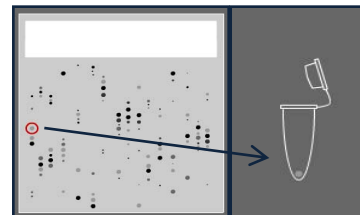
Elettroforesi



Digitalizzazione



Analisi delle immagini



Taglio degli spot di interesse



Identificazione delle proteine

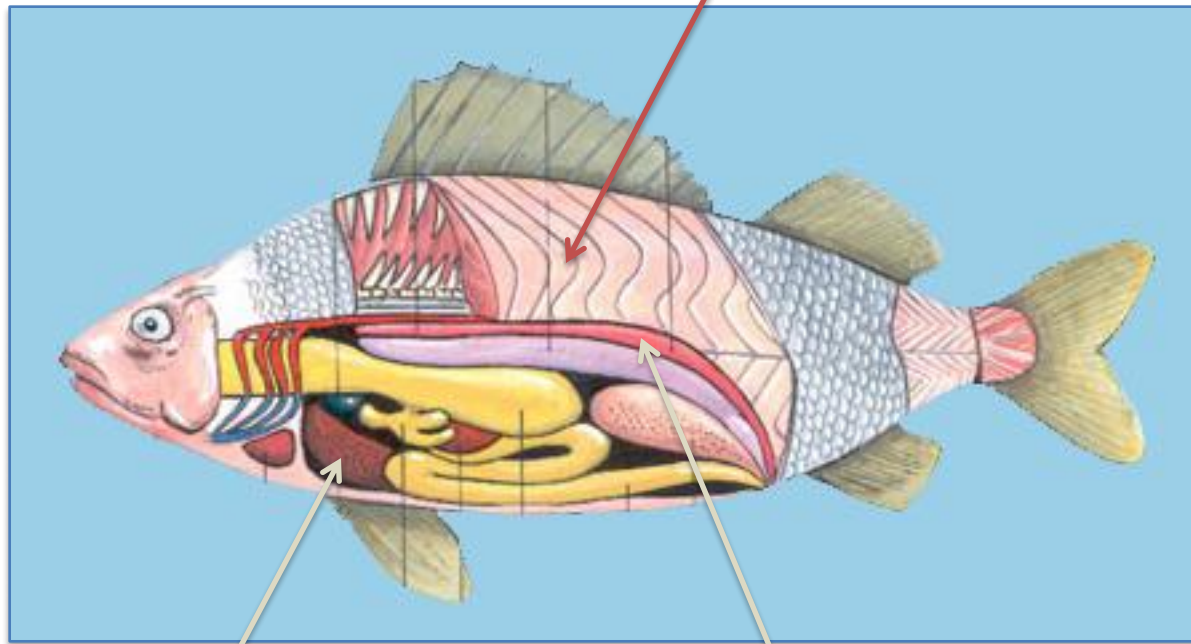


Risultato!

Il percorso dell'analisi proteomica: dal campione al risultato

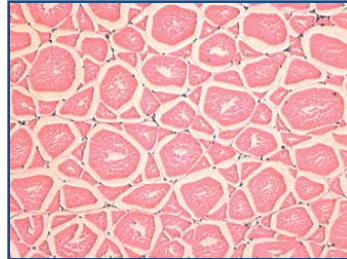


Muscolo



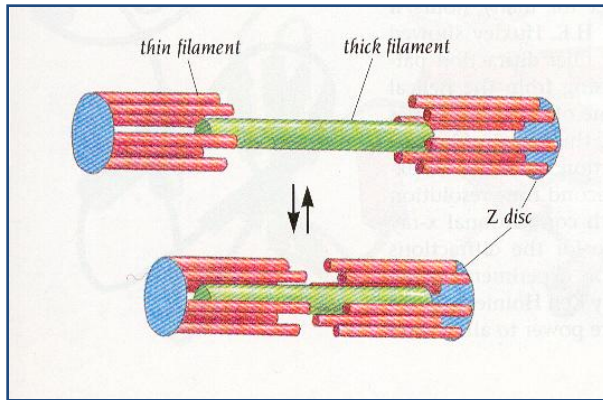
Fegato

Rene



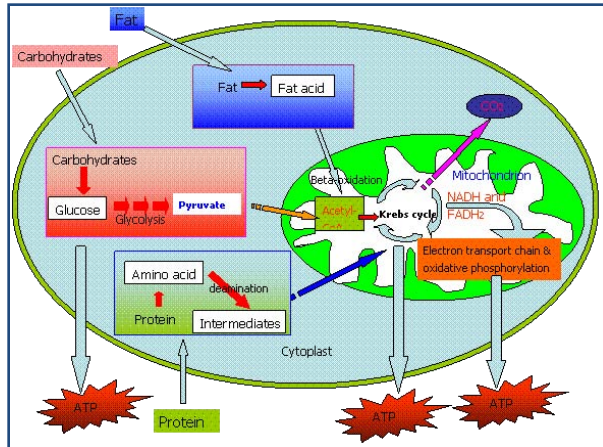
Sono state allestite le mappe di 2D-PAGE del muscolo prelevato a pesci raccolti in campionamenti successivi, con l'obiettivo di valutare le conseguenze dell'allevamento sul tessuto muscolare

Classi di proteine di interesse



Strutturali:

Costituiscono la parte “meccanica” del tessuto e gli conferiscono la consistenza

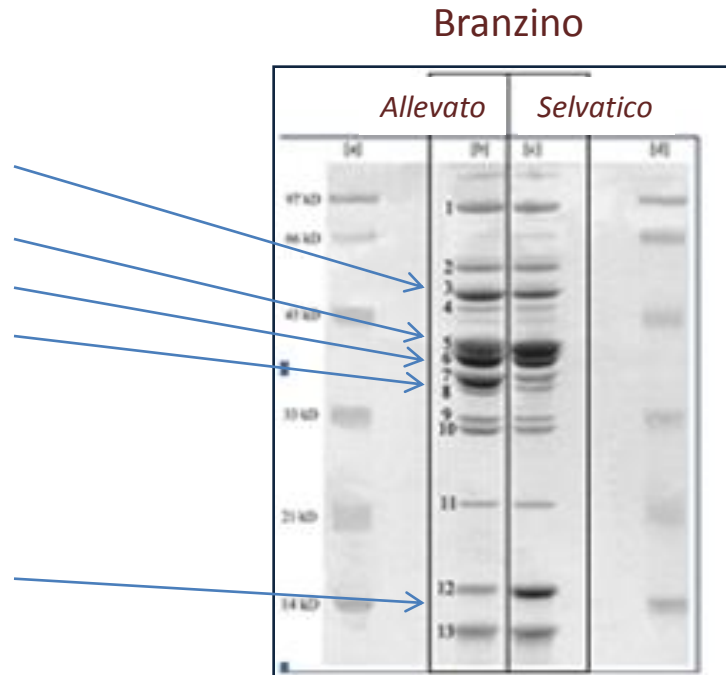


Metaboliche:

Producono i materiali e l’energia da utilizzare per i processi cellulari



Studi precedenti sul muscolo del pesce in allevamento (branzino) riportavano variazioni nell'espressione delle proteine metaboliche



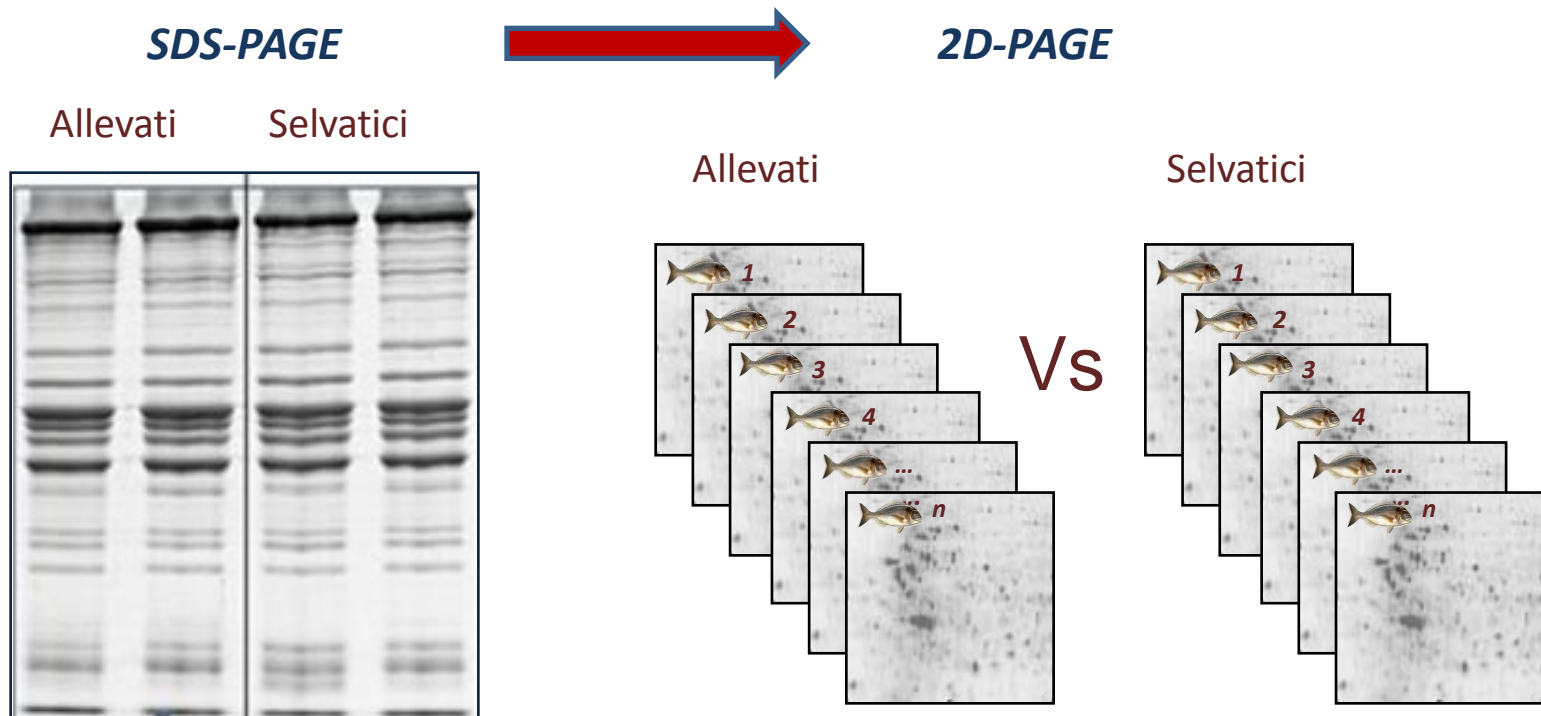
Monti et al. *Anal. Chem.*, 2005

Queste osservazioni indicavano la presenza di differenze nello sviluppo muscolare in condizioni di allevamento



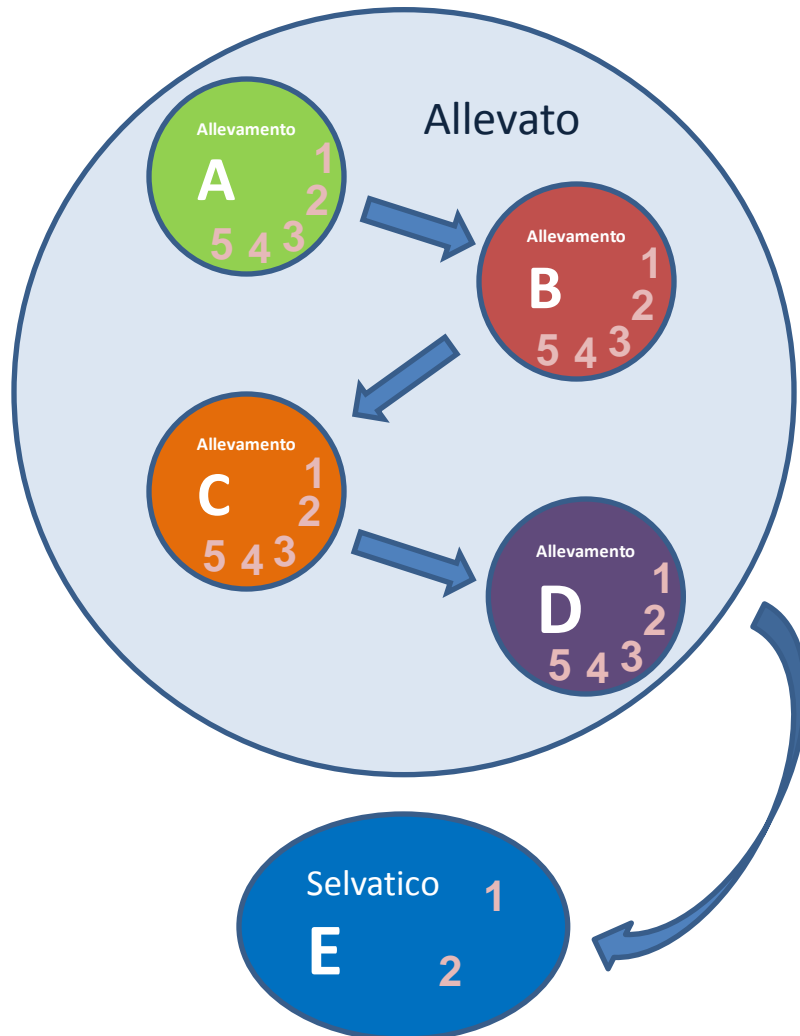
Nel nostro caso, invece.....

Applicando la stessa tecnica (SDS-PAGE), il profilo proteico totale degli individui adulti di orata prodotti con tecniche di maricoltura non sembrava diverso da quello del pesce selvatico

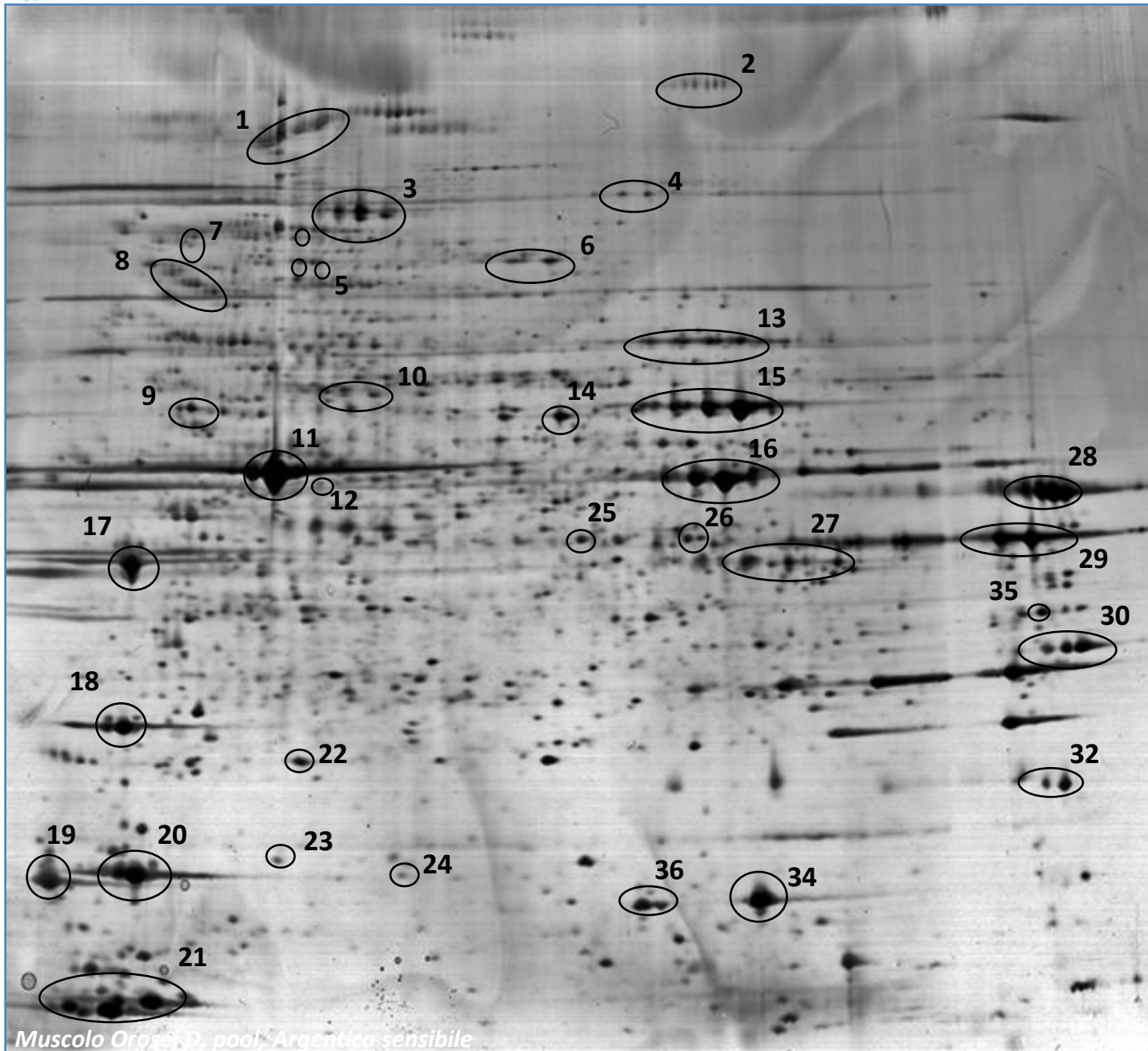




Le mappe di 2D-PAGE sono state comparate:



1. *Nell'ambito dello stesso allevamento* all'interno di ogni campionamento e fra campionamenti condotti in tempi diversi
2. *Fra allevamenti diversi* effettuando un confronto crociato che tenesse conto della taglia e della stagione di campionamento
3. *Fra pesce allevato e pesce selvatico* utilizzando animali di taglia comparabile

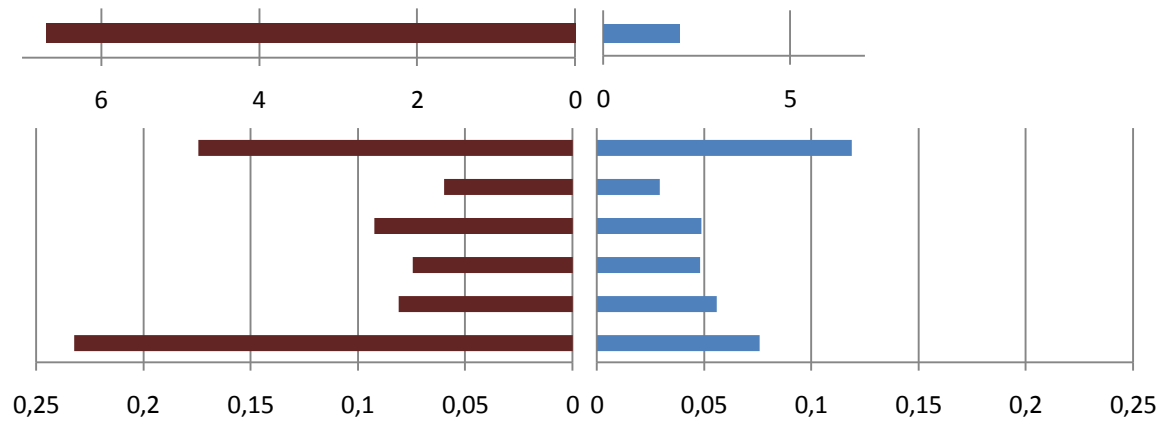


Spot Proteina

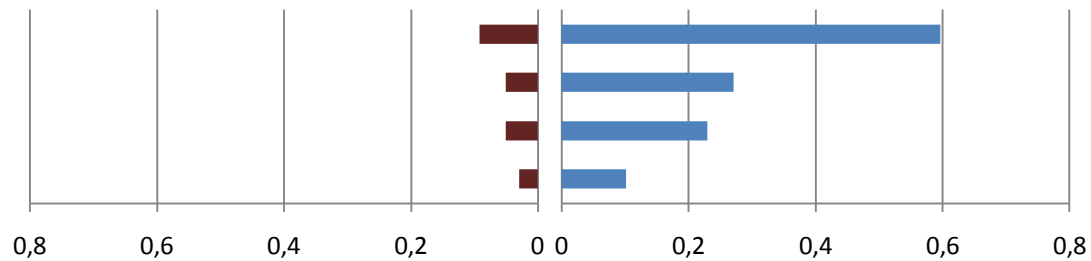
- 1 Miosina Catena Pesante (MHC)
- 2 Miomesina
- 3 Proteina H legante la miosina
- 4 Glicogeno fosforilasi
- 5 MHC frammenti
- 6 Transferrina
- 7 GRP78
- 8 WTARP
- 9 ATP sintasi subunità Beta
- 10 Desmina
- 11 Actina
- 12 Cheratina (*Danio rerio*)
- 13 Fosfoglucomutasi
- 14 Piruvato chinasi
- 15 Enolasi
- 16 Creatina Chinasi 1 (muscolo)
- 17 Tropomiosina
- 18 Myosin light chain (MLC) 1
- 19 MLC 2
- 20 MLC 3
- 21 Parvalbumina isoforme
- 22 PEBP-like
- 23 Troponina T (a)
- 24 Troponina T (e)
- 25 Aldolasi A
- 26 Nucleoside difosfato chinasi
- 27 GAPDH
- 28 Fruttosio difosfato aldolasi
- 29 GAPDH
- 30 Fosfoglicerato mutasi 2
- 31 Creatina chinasi M2 Frg
- 32 Troponina I
- 33 Troponina I
- 34 Nucleoside difosfato chinasi
- 35 Voltage dpt. anion channel 2

Pesci in accrescimento

Proteine strutturali



Enzimi della glicolisi

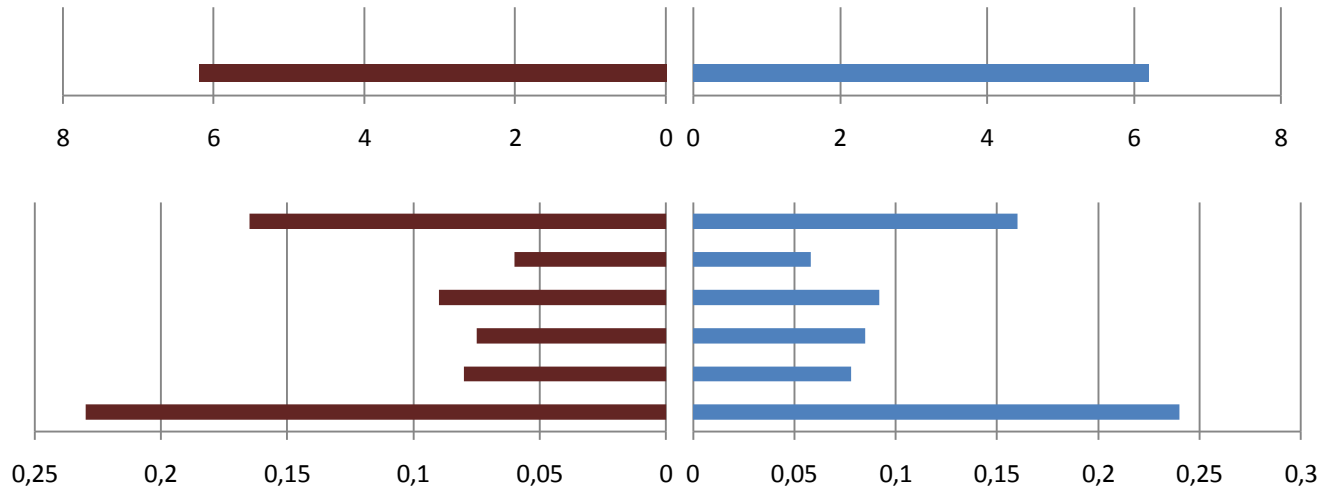


Selvatici

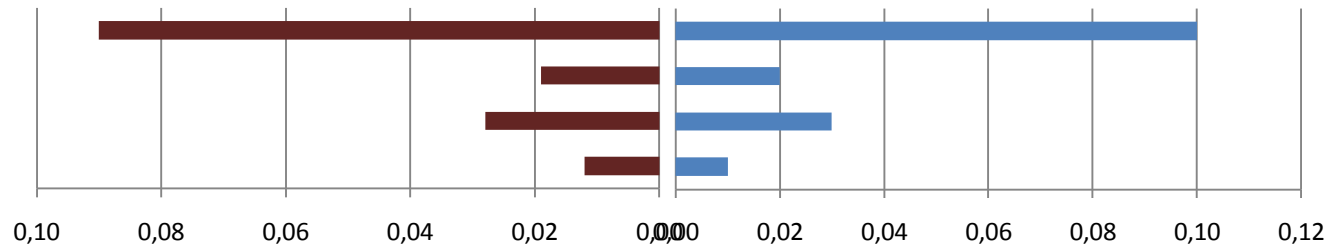
Allevati

Pesci a taglia commerciale

Proteine strutturali



Enzimi della glicolisi



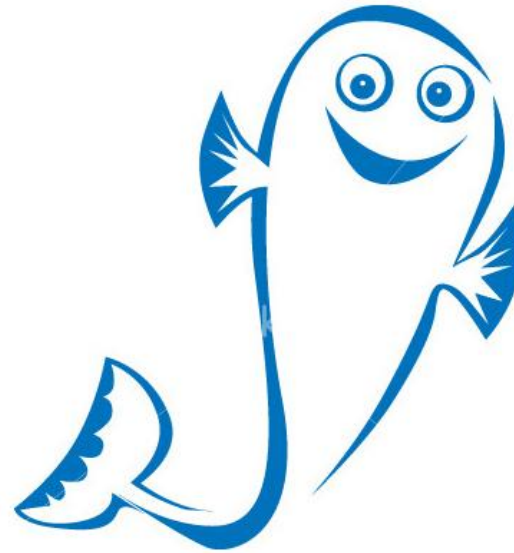
Selvatici

Allevati



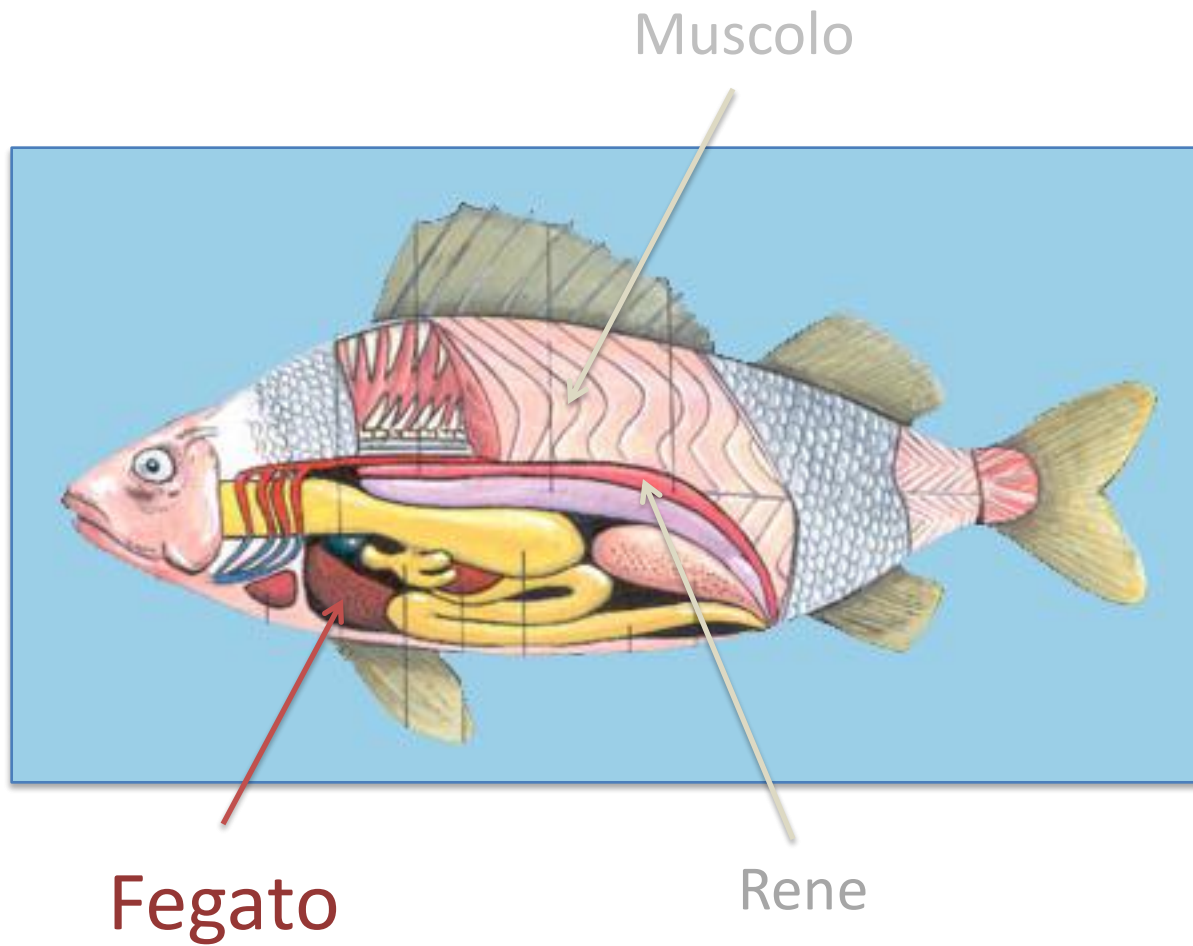
*Il muscolo del pesce
prodotto con le tecniche di
maricoltura si sviluppa in
modo simile
al pesce selvatico*

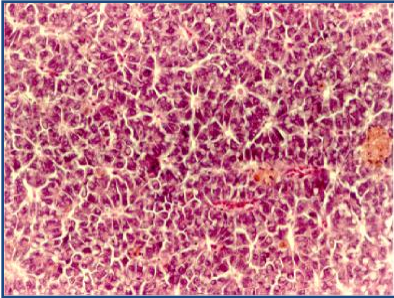
Le migliori condizioni di crescita, più vicine a quelle naturali, permettono al pesce di svilupparsi correttamente e di raggiungere una struttura muscolare analoga a quella del pesce selvatico; fattori come la maggiore attività fisica, le correnti marine e il minore affollamento sono probabilmente determinanti



*Il risultato finale è quindi molto positivo:
nel pesce adulto di taglia simile*

*l'assetto proteomico del muscolo del pesce di acquacoltura
prodotto in Sardegna è comparabile a quello del pesce selvatico*



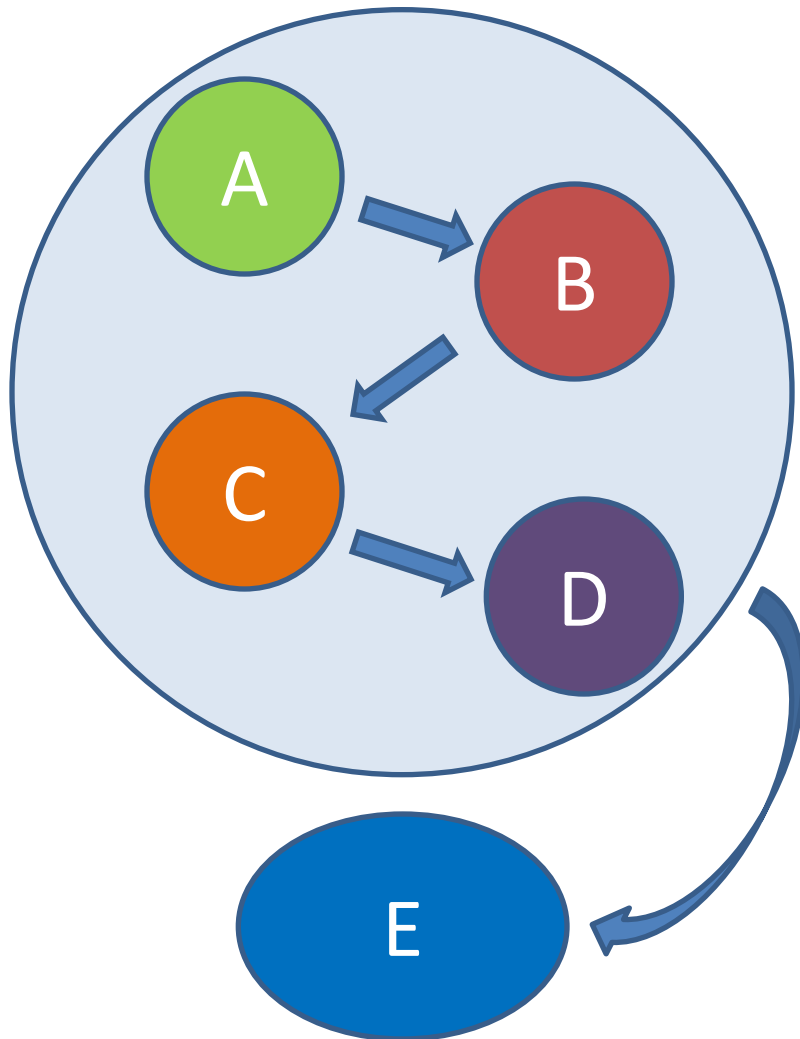


Il fegato è l'organo che maggiormente riflette lo stato di benessere del pesce e la qualità della dieta somministrata in allevamento.

La proteomica può aiutarci a monitorare le conseguenze delle condizioni di allevamento, alimentazione e ambiente sulla qualità del pesce allevato?



È stato confrontato il fegato di pesci a taglia commerciale, campionati nello stesso periodo dell'anno ma in diverse sedi



1. *Fra allevamenti diversi* su pesci di taglia simile e campionati nello stesso periodo dell'anno
2. *Fra pesce allevato e pesce selvatico* di taglia simile e campionato nello stesso periodo dell'anno



Lo studio proteomico del fegato ha permesso di valutare diversi parametri di interesse. Alcuni esempi:

Benessere

In allevamento si osserva un aumento di espressione della perossiredossina, degli enzimi della via dei pentosi fosfati e della epossido idrolasi, suggerendo la presenza di stress ossidativo

Alimentazione

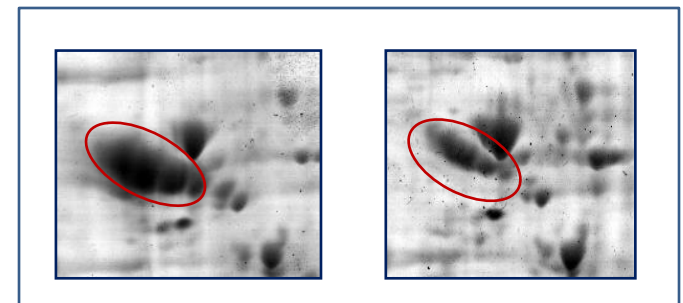
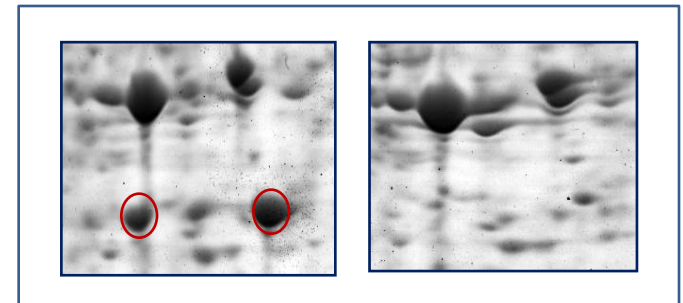
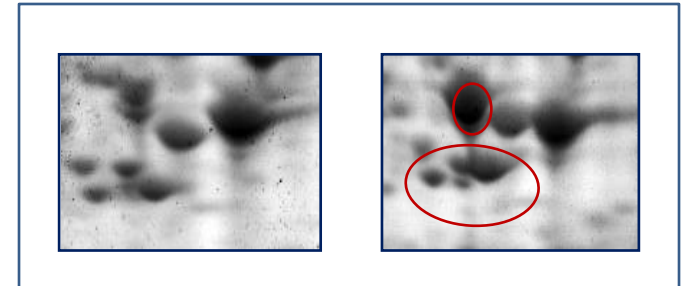
In allevamento si osserva una diminuzione dell'espressione degli enzimi biosintetici

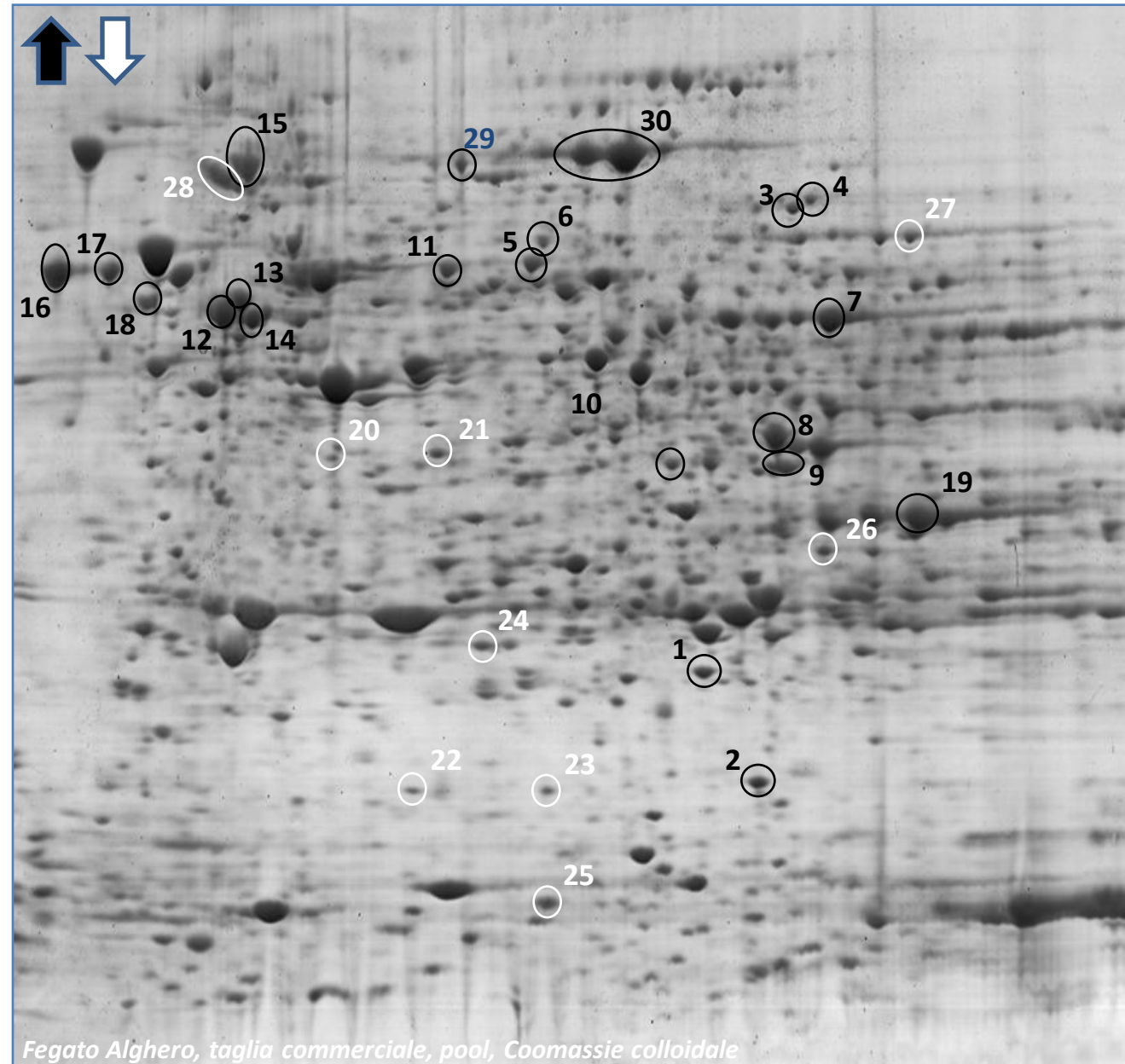
Ambiente

Notevoli variazioni nell'espressione di alcune proteine di acclimatamento durante l'allevamento in mari più freddi

Selvatico

Allevato





Spot	Protein
1	Peroxiredoxin 1
2	Nucleoside diphosphate kinase A
3	Bifunctional purine biosynthesis protein
4	Transketolase
5	UDP-glucose dehydrogenase
6	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
7	Enolasi 3
8	Fructose-biphosphate aldolase
9	Cytosolic malate dehydrogenase thermostable form
10	Transaldolase
11	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase theta
12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
13	Tubulin beta-1 chain
15	glucose-regulated protein 78
16	calreticulin like
17	Calrl protein
18	Calreticulin precursor
19	Fructose-bisphosphate aldolase B (Liver-type aldolase)
20	methionine adenosyltransferase I
24	Betaine homocysteine methyltransferase
28	warm temperature acclimation-related 65 kDa protein
29	Iron-responsive element-binding protein 1



Applicazione della tecnologia 2D-DIGE

Marcatura

Standard
interno



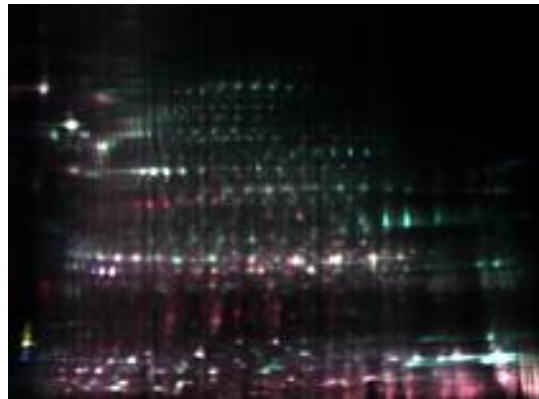
Allevati



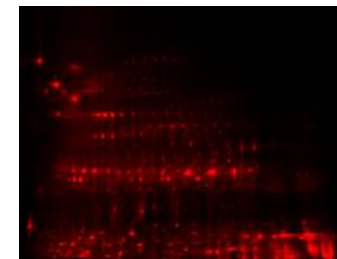
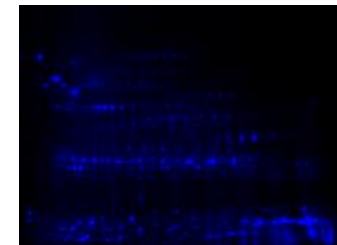
Selvatici



Pooling e 2D-PAGE nello stesso gel



Acquisizione delle immagini separate





Nei pesci allevati si osservano quindi, a diversi livelli :



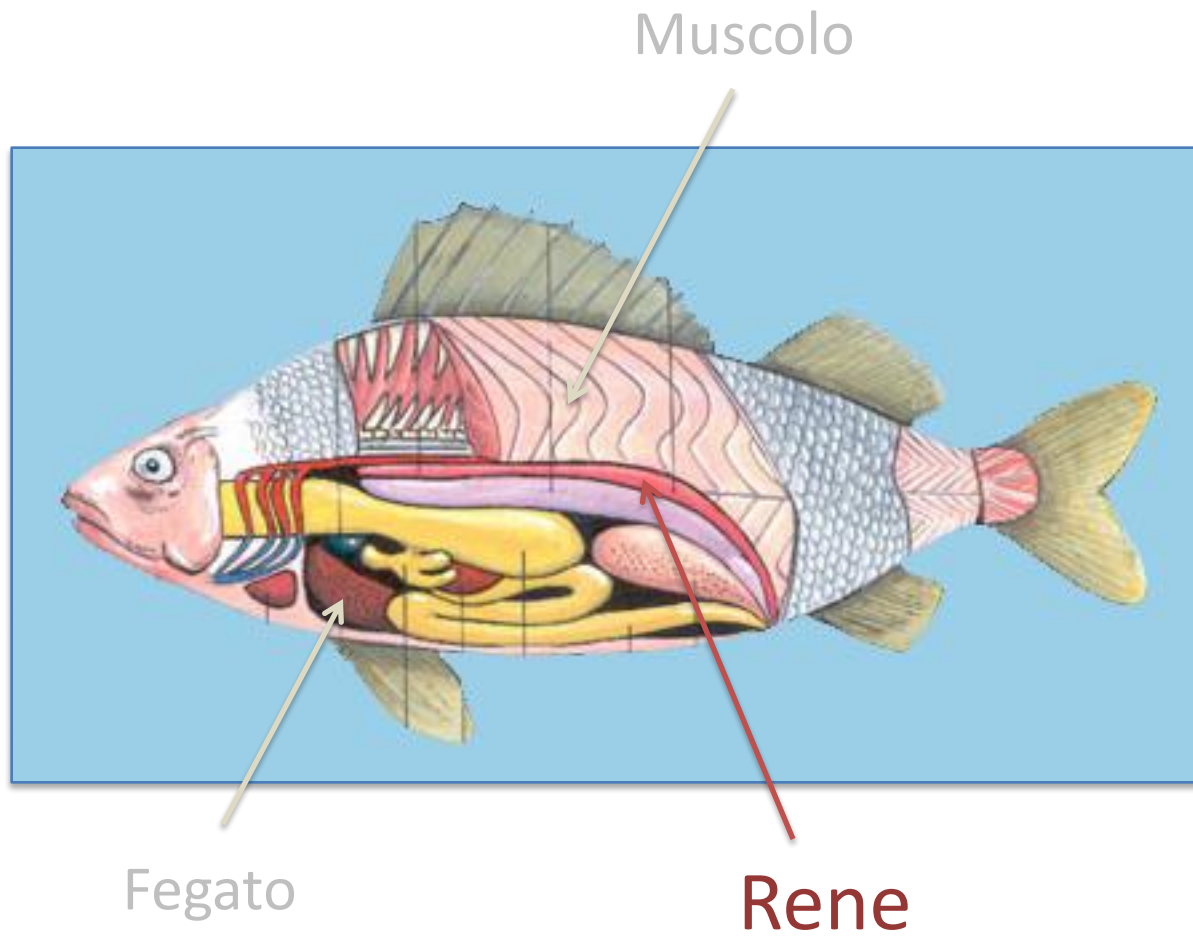
1. Stress ossidativo e segni di sovraccarico sul fegato
2. Aumento delle vie di utilizzo delle molecole per produzione di energia (lipidi, carboidrati)
3. Diminuzione delle vie di biosintesi delle molecole strutturali (aminoacidi)

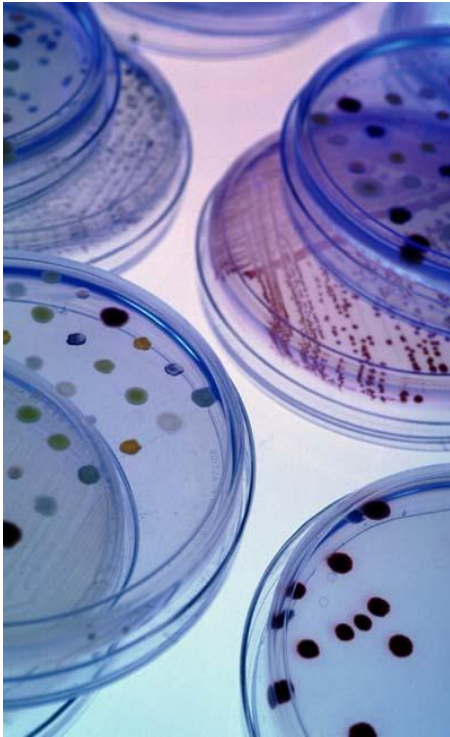


*La ricca dieta somministrata ai pesci allevati ha un prezzo:
Il fegato del pesce allevato subisce alterazioni negli enzimi dello
stress ossidativo e della detossificazione, e tende alla steatosi*

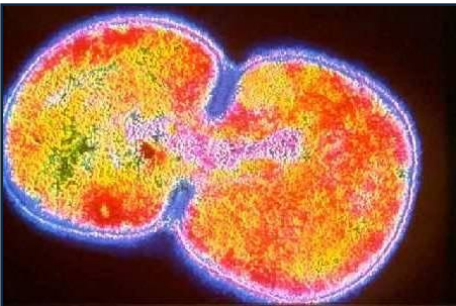
*Queste alterazioni hanno livelli di gravità differenti nei diversi
allevamenti, e probabilmente riflettono il tipo di alimentazione e
le modalità di somministrazione*

*Le proteine individuate in questo studio possono avere una
notevole utilità per monitorare la qualità dell'alimentazione e il
benessere del pesce*





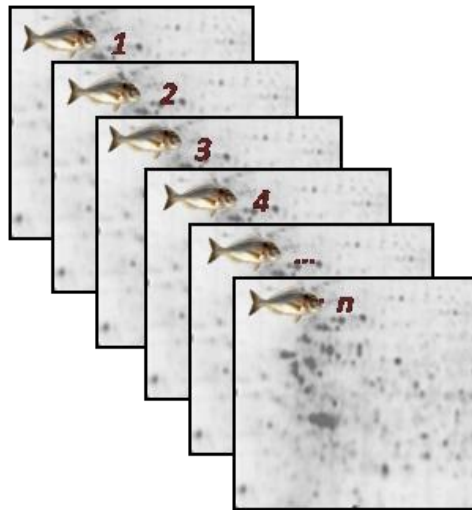
Gli organi interni di tutti i pesci inclusi nello studio sono stati sottoposti ad analisi microbiologica



Alcuni campioni di rene sono risultati positivi all'esame colturale per Moraxella spp., un batterio Gram-negativo

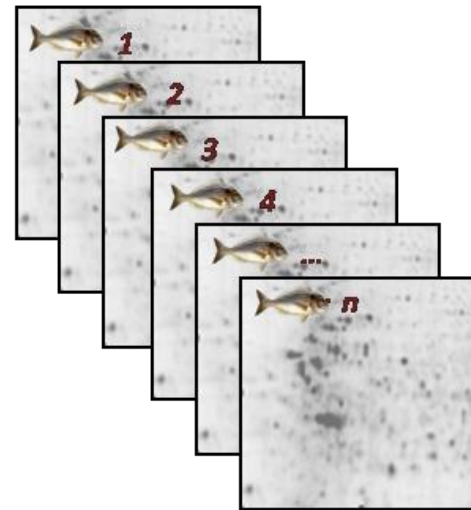


Negativi

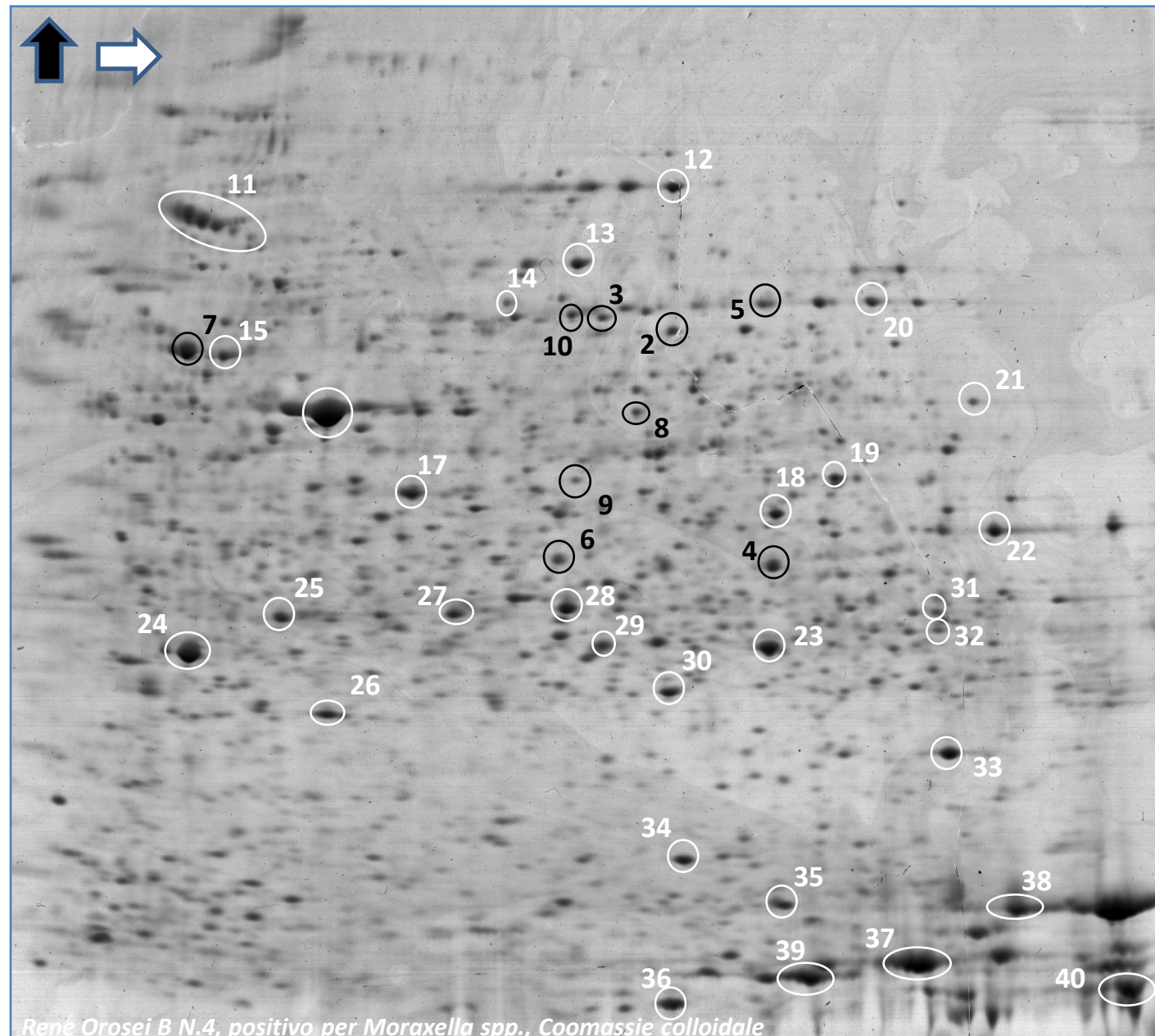


Vs

Positivi



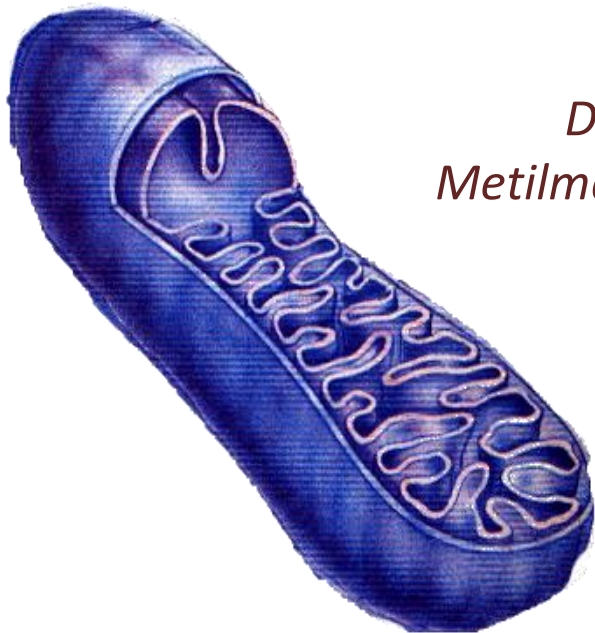
*Il loro profilo proteico è stato confrontato
con quello di individui sani dello stesso
campionamento*



Spot	Protein
2	Alanina aminotransferasi, mt
3	Aldeide deidrogenasi, mt
4	Diidrodipicolinato sintasi-like, mt
5	Metilmalonato semialdeide deidrogenasi, mt
6	Diidrodipicolinato sintasi-like, mt
7	ATP sintasi, mt
8	S-adenosilomocisteina idrolasi
9	Fosfoenolpiruvato carbossichinasi
10	Antiquitina (aldehyde deh. Family)
11	WTARP 65 kDa protein
12	Transferrina putativa
13	Transferrina putativa
15	ATP sintasi beta, mt precursor
16	Gamma actina
17	Actina
21	Acetil-CoA deidrogenasi
22	Fruttosio difosfato aldolasi B
23	Metionina adenosiltransferasi I
25	Flavoproteina alfa
26	PEBP
28	Anidraisi carbonica
29	Perossiredossina 6
30	2-cis-perossiredossina
31	Enoil CoA idratasi short chain
32	Glutatione S-transferasi
34	Cu/Zn superossido dismutasi
35	Globina beta
36	Globina alfa 2
37	Globina alfa 2
38	Globina beta
39	Globina beta
40	Globina beta



Le proteine di cui aumenta l'espressione in corso di infezione sono principalmente enzimi mitocondriali:



*Alanina aminotransferasi
Aldeide deidrogenasi
Diidrodipicolinato-sintasi-like
Metilmalonato semialdeide deidrogenasi
ATP sintasi*

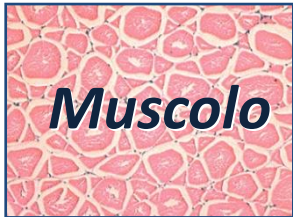


Allo scopo di studiare marcatori precoci di infezione, in passato alcuni ricercatori hanno somministrato a trote iridee in acquario l'endotossina dei batteri Gram-negativi. Nei tessuti aerobici di questi pesci è stato riscontrato un aumento di espressione degli enzimi mitocondriali.

Il nostro lavoro ha evidenziato l'aumento di espressione degli enzimi mitocondriali nel rene in presenza di un'infezione da Moraxella, un batterio Gram-negativo. Si tratta della prima osservazione di questo fenomeno in condizioni di infezione naturale



Riassumendo:



Il pesce allevato in Sardegna con le tecniche di maricoltura ha una struttura muscolare sostanzialmente identica a quella del pesce selvatico. Questo risultato evidenzia chiaramente la qualità del prodotto ottenuto nei nostri mari con questa tecnica di allevamento



*Il pesce allevato ha un sovraccarico sul fegato dovuto al tipo di alimentazione, che si manifesta a gradi di intensità diversi, dipendenti probabilmente dalla dieta
Questo risultato evidenzia l'importanza del fegato per monitorare la qualità della dieta somministrata e migliorare il benessere del pesce*



Sono stati individuati alcuni indicatori della presenza di infezioni batteriche nel rene. La ricerca su queste proteine potrebbe contribuire alla rilevazione tempestiva delle infezioni batteriche nell'allevamento, favorendo gli interventi atti a bloccarne la diffusione



Porto Conte
Ricerche



SARDEGNA
RICERCHE

Hanno collaborato:

Roberto Cappuccinelli

Vittorio Tedde

Daniela Pagnozzi

Salvatore Crobu

Fulvio Salati

Iolanda Viale

Maria Giovanna Lai

Tonina Roggio

Sergio Uzzau