



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

"Scienze del Farmaco, delle Biomolecole e dei Prodotti per la Salute"

CICLO XXXIV

*Analisi bioinformatica sull'origine e l'evoluzione delle famiglie
di DNasi1 e 2 nei vertebrati*

*Caratterizzazione biochimica della DNasi1L2 umana a scopo
terapeutico*

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Marco Mor

Relatore:

Chiar.mo Prof. Claudio Rivetti

Correlatore:

Dott.ssa Giulia Mori

Dottoranda: Danila Delfino

Anni Accademici 2018/2019 – 2020/2021

INDICE

INDICE	1
Riassunto della tesi	3
Sommario	4
Scopo del lavoro di ricerca	6
Capitolo 1	7
Analisi bioinformatica sull'origine e l'evoluzione delle famiglie di DNasi1 e 2 nei vertebrati	7
Introduzione	8
1. Desossiribonucleasi umane	8
1.1 La famiglia delle DNasi1	8
1.1.1 DNasi1	9
1.1.2 DNasi1L1	11
1.1.3 DNasi1L2	12
1.1.4 DNasi1L3	12
1.2 La famiglia delle DNasi2	13
1.2.1 DNasi2	13
1.2.2 DNasi2b	15
2. Patologie associate alle DNasi	15
Risultati e discussione	19
2.1 Ricerca ed individuazione dei geni delle DNasi1 e DNasi2 nei vertebrati	19
2.2 Origine e conservazione della famiglia delle DNasi1 nei vertebrati	19
2.3 Analisi di sequenza e di struttura della famiglia delle DNasi1 umane	22
2.4 Origine della DNasi1L2 e conservazione del PRD nei vertebrati terrestri	24
2.5 Origine degli ortogruppi DNasi1L1/3/4 nei vertebrati	26
2.6 Origine e conservazione della DNasi2 nei vertebrati	29
2.7 Analisi di sequenza e di struttura della famiglia delle DNasi2 umane	31
2.8 Origine dell'isoforma corta della DNasi2b	32
Conclusione	34
Metodi	38
4.1 Recupero bioinformatico delle sequenze	38
4.2 Allineamento sequenze e analisi filogenetica	38
4.3 Analisi strutturale	39
4.4 Analisi espressione (RNA-seq)	39
Capitolo 2	41
Caratterizzazione biochimica della DNasi1L2 umana a scopo terapeutico	41
Introduzione	42

1. Fibrosi cistica	42
1.1 Difetti e mutazioni di CFTR	42
1.2 Manifestazioni cliniche polmonari correlate alla FC	43
1.3 Trattamento sintomatico della malattia polmonare associata alla FC	44
2. Pulmozyme	45
3. PEGhilazione in DNasi	45
Risultati e discussione	47
2.1 Clonaggio ed espressione della DNasi2b in <i>P. pastoris</i>	47
2.2 Espressione e purificazione della DNasi1L2 in <i>E.coli</i>	50
2.3 Integrazione ed espressione della DNasi1L2 nel genoma di <i>P. pastoris</i>	52
2.4 Purificazione della DNasi1L2	56
2.5 Caratterizzazione dell'attività endonucleasica della DNasi1L2	57
2.5.1 Effetto dei cationi divalenti	57
2.5.2 Effetto del pH	58
2.5.3 Meccanismo di taglio su DNA a doppio filamento	59
2.5.4 Analisi delle cisteine mediante riduzione e alchilazione	60
2.5.5 Inibizione da actina	62
2.6 PEGhilazione della DNasi1L2	65
Conclusione	67
Materiali e metodi	68
4.1 Espressione ricombinante in <i>E. coli</i> della DNasi1L2	68
4.2 Purificazione corpi di inclusione DNasi1L2	68
4.3 Clonazione e integrazione in <i>Pichia pastoris</i>	68
4.4 Espressione ricombinante in <i>Pichia pastoris</i>	69
4.4.1 Espressione su piccola scala	70
4.4.2 Espressione su larga scala della DNasi1L2-S	70
4.5 Purificazione della DNasi1L2-S	71
4.6 Preparazione substrati per saggi di attività endonucleasica in vitro	71
4.6.1 DNA plasmidico	71
4.6.2 Muco artificiale	72
4.7 Saggio di attività endonucleasica della DNasi1L2	72
4.8 Misure di viscosità del muco artificiale	73
4.9 Alchilazione e riduzione delle cisteine	73
4.10 PEGhilazione proteica	73
Materiale supplementare	75
Bibliografia	97

Riassunto della tesi

Questa tesi di dottorato è suddivisa in due capitoli.

Nel primo capitolo sono descritti i risultati di uno studio bioinformatico sulle DNasi dei vertebrati. Il genoma dei vertebrati contiene un ricco repertorio di endonucleasi denominate DNasi in grado di degradare il DNA sia in ambiente intra- che extra-cellulare e di svolgere ruoli chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Nell'uomo esistono due famiglie di queste DNasi: la famiglia delle DNasi1 e la famiglia delle DNasi2. La prima comprende DNasi1, DNasi1L1, DNasi1L2, e DNasi1L3, endonucleasi attive a pH neutro e in presenza di ioni metallici che agiscono come cofattori. La seconda famiglia è costituita da DNasi2 e DNasi2b, che sono invece attive a pH acido e in assenza di cofattori.

Nonostante l'importanza di questi enzimi, risultano ancora poco chiare le origini e l'evoluzione delle DNasi nei vertebrati. Infatti, non vi è una completa ricostruzione filogenetica di ciascuna famiglia e il significato della diversificazione di questi enzimi non è chiaro.

Per questo motivo, sono state investigate l'origine e l'evoluzione delle DNasi nei vertebrati. Le analisi bioinformatiche sono state svolte allo scopo di individuare e classificare tutte le DNasi presenti nei vertebrati, ricostruire l'origine e l'evoluzione delle due famiglie di DNasi1 e 2, e chiarire il significato fisiologico del vasto repertorio delle DNasi nei vertebrati. I risultati ottenuti sono ancora in fase di completamento e saranno pubblicati prossimamente.

Nel secondo capitolo viene descritta la caratterizzazione biochimica a scopo terapeutico di una DNasi umana della famiglia delle DNasi1, la DNasi1L2.

L'attività endonucleasica della DNasi1 umana è impiegata nella terapia della fibrosi cistica. Attualmente, la DNasi1 prodotta in forma ricombinante (rhDNasi1 o Pulmozyme) è l'agente mucolitico più utilizzato per il trattamento delle complicanze polmonari associate a questa malattia genetica rara. La sua somministrazione per inalazione permette di fluidificare il muco grazie alla degradazione delle fibre di DNA extracellulare in esso contenuto. Tuttavia, l'efficacia della rhDNasi1 è compromessa a causa della forte inibizione da actina, della breve permanenza nei polmoni in forma attiva, e della non responsività di alcuni pazienti. Al fine di superare i limiti terapeutici di questo enzima e ampliare il repertorio di agenti mucolitici disponibili, è stato ritenuto utile individuare e caratterizzare dal punto di vista biochimico altre DNasi con proprietà terapeutiche inesplorate. L'attività ottimale a pH acido e la resistenza all'actina mostrate dalla DNasi1L2, rendono questo enzima un valido candidato per una terapia mucolitica alternativa alla rhDNasi1. Alcuni risultati descritti in questo capitolo sono stati pubblicati in:

- ❖ Danila Delfino, Giulia Mori, Claudio Rivetti, Antonella Grigoletto, Gloria Bizzotto, Cristian Cavozzi, Marco Malatesta, Davide Cavazzini, Gianfranco Pasut, and Riccardo Percudani. Actin-resistant DNase1L2 as a potential therapeutics for CF lung disease. *Biomolecules* 2021, 11, 410.

Questo lavoro di tesi fa parte di un progetto di ricerca supportato dalla Fondazione Fibrosi Cistica (FFC Grant Application 2018 PROJECT CODE FFC#9/2018) ed è frutto della collaborazione dei gruppi del Prof. Rivetti e del Prof. Percudani dell'Università di Parma e del Prof. Pasut dell'Università di Padova dove sono stati condotti gli esperimenti di PEGhilazione. Sono inoltre in corso esperimenti ex-vivo per valutare l'attività mucolitica della DNasi1L2 nativa e coniugata con PEG sull'espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica, in collaborazione con il Prof. Castellani dell'ospedale Gaslini di Genova.

Sommario

Capitolo 1 - L'uomo e gli altri animali possiedono enzimi idrolitici denominati desossiribonucleasi o "DNasi", in grado di degradare i filamenti del DNA in corti oligonucleotidi. Questi enzimi differiscono per la specificità del substrato, il meccanismo chimico di catalisi e la funzione biologica e sono presenti nell'ambiente intracellulare ed extracellulare della maggior parte dei tessuti ^{1 2}.

Il DNA extracellulare, proveniente sia da fonti endogene che esogene, è un potente agente infiammatorio e antigenico, in grado di influenzare la dinamica e i meccanismi di generazione di anticorpi anti-DNA e di indurre una risposta antinfiammatoria mediante l'attivazione di recettori che inducono il rilascio di citochine ^{3 4 5}. Per questo motivo, il ruolo delle DNasi è fondamentale per mantenere bassi livelli di DNA e limitare così le risposte auto-infiammatorie e autoimmuni.

Per molti anni, gli studi sulle DNasi si sono concentrati sulla caratterizzazione dell'attività enzimatica e sulle implicazioni patologiche che il malfunzionamento di questi enzimi può determinare. Al contrario, l'origine e il significato della specializzazione di questi enzimi rimangono a tutt'oggi poco studiati.

Nel genoma umano, come anche nei vertebrati, è presente un ampio repertorio di DNasi che fanno parte di due famiglie chiamate DNasi1 e DNasi2. Nello studio bioinformatico riportato in questa tesi sono stati utilizzati dati genomici e trascrittomici per ricostruire la storia evolutiva delle due famiglie geniche nei vertebrati. Le due famiglie di DNasi1 e 2 si sono espanse nei vertebrati a partire da circa 650 milioni di anni fa. La famiglia delle DNasi1 comprende sette geni, quattro dei quali sono presenti nell'uomo. La famiglia delle DNasi2 comprende due geni, entrambi presenti nell'uomo. Tre dei quattro geni umani della famiglia delle DNasi1, *DNasi1*, *DNasi1L1*, e *DNasi1L3*, erano presenti nei vertebrati primitivi, i pesci senza mandibola. Il quarto gene umano della famiglia, *DNasi1L2*, ha avuto origine negli amnioti per duplicazione in tandem del gene *DNasi1*. Il gene più antico della famiglia delle DNasi2, *DNasi2b*, era già presente negli invertebrati ed ha conservato l'associazione sintenica con il gene *Uox* durante l'evoluzione degli animali. Il gene *DNasi2* ha avuto origine per duplicazione del gene *DNasi2b* nei pesci senza mandibola.

All'interno di ogni famiglia gli enzimi si sono differenziati per le caratteristiche strutturali e funzionali fin dalla loro origine. La DNasi1L1 ha acquisito un'ancora GPI al C-terminale che le permette l'associazione alla membrana plasmatica delle cellule muscolari scheletriche e cardiache e delle cellule con capacità migratorie come quelle del sistema immunitario. La DNasi1L2 con un optimum di attività a pH acido e l'espressione nella pelle, svolge un ruolo fondamentale nella degradazione del DNA nucleare durante il differenziamento dell'epidermide. La DNasi1L3, grazie all'acquisizione di un dominio basico al C-terminale, agisce prevalentemente sul DNA associato a microparticelle che vengono generate durante il processo apoptotico. Il gene *DNasi2b* ha subito un cambiamento della struttura del trascritto nei mammiferi placentati che ha portato all'origine di una nuova isoforma.

Capitolo 2 - La fibrosi cistica (FC) è una malattia autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) che codifica un canale di membrana per il cloro. La mancata funzionalità di questo canale comporta la produzione di muco denso nelle vie aeree, con conseguente infiammazione e infezione dei tessuti bronchiali e polmonari e compromessa attività respiratoria. In risposta agli stimoli infiammatori sono richiamati i neutrofili che andando incontro ad apoptosi rilasciano il loro contenuto ricco in DNA e actina filamentosa, contribuendo così all'aumento della viscosità delle secrezioni delle vie aeree con conseguente perdita della funzionalità polmonare.

L'agente mucolitico più utilizzato per il trattamento sintomatico della malattia polmonare della fibrosi cistica è la DNasi1 ricombinante umana (rhDNasi). La sua somministrazione per inalazione permette di fluidificare il muco grazie alla degradazione delle fibre di DNA in esso contenuto. Tuttavia, l'efficacia

della rhDNasi è compromessa a causa della breve residenza nei polmoni e della non responsività di alcuni pazienti. Al fine di trovare nuovi trattamenti farmacologici per la FC è stato esplorato il ricco repertorio di DNasi umane. Tra le DNasi con potenziale terapeutico inesplorato, sono state scelte la DNasi2b e la DNasi1L2 come possibili candidati allo sviluppo di una terapia alternativa. Entrambe le proteine sono resistenti all'actina e hanno un'attività ottimale a pH acido (pH 5.5-6), caratteristico del muco dei pazienti affetti da FC.

Per la produzione delle proteine ricombinanti, inizialmente si è utilizzato un sistema di espressione batterico (*Escherichia coli*) per poi passare ad un sistema di espressione eucariotico (*Pichia pastoris*). La DNasi2b prodotta nelle cellule batteriche si è rivelata poco solubile e quindi difficile da purificare, mentre nelle cellule eucariotiche l'espressione ricombinante non è stata rilevata né nel terreno di coltura né nella frazione intracellulare. La DNasi1L2 prodotta in *E. coli* è risultata totalmente insolubile; al contrario la proteina è stata prodotta in forma solubile nel terreno di coltura del lievito *P. pastoris*. L'attività enzimatica della DNasi1L2 è stata caratterizzata in vitro utilizzando DNA plasmidico superavvolto in soluzione tampone o disperso in un muco viscoso artificiale. In presenza di actina, la DNasi1L2 è risultata più efficiente della DNasi1 con entrambi i substrati. In particolare, concentrazioni nanomolari di DNasi1L2 sono state sufficienti per ridurre del 50% la viscosità del muco in pochi secondi.

L'attività enzimatica della DNasi1L2 è stata caratterizzata anche nella sua forma PEGhilata. La PEGhilazione ha lo scopo di migliorare le proprietà farmacologiche prolungando la permanenza del farmaco nell'organismo e riducendo l'immunogenicità e la sensibilità agli enzimi proteolitici. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che la DNasi1L2 PEGhilata presenta aumentata stabilità e attività in vitro. Esperimenti ex-vivo utilizzando campioni di espettorato di pazienti affetti da FC sono attualmente in corso per valutare l'attività mucolitica della proteina sia nella sua forma nativa che in quella PEGhilata.

Scopo del lavoro di ricerca

Il genoma umano contiene un ricco repertorio di DNasi. Nonostante l'importanza di questi enzimi nel metabolismo cellulare, risultano poco studiate le origini dei geni e la loro evoluzione nei vertebrati. Non vi è infatti una completa ricostruzione filogenetica di ciascuna famiglia genica e il significato della diversificazione di questi enzimi non è chiaro.

Per questo motivo, nella prima parte della tesi sono state condotte analisi bioinformatiche con l'obiettivo di individuare e classificare tutte le DNasi presenti nei vertebrati, ricostruire l'origine e l'evoluzione delle due famiglie di DNasi 1 e 2, e chiarire il significato fisiologico del vasto repertorio delle DNasi nei vertebrati.

I risultati ottenuti hanno inoltre permesso di identificare una DNasi umana le cui proprietà enzimatiche ne suggeriscono un possibile impiego terapeutico nella cura della fibrosi cistica.

Nella seconda parte della tesi, la DNasi IL2 umana prodotta in forma ricombinante, è stata caratterizzata dal punto di vista biochimico, sia in forma nativa che in forma PEGhilata, allo scopo di valutarne l'effetto mucolitico.

Analisi bioinformatica sull'origine e l'evoluzione delle
famiglie di DNasi1 e 2 nei vertebrati

Introduzione

1. Desossiribonucleasi umane

Le DNasi sono degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici e nella regolazione del contenuto di DNA intra- ed extra-cellulare, di conseguenza svolgono un importante ruolo fisiologico in processi quali la differenziazione cellulare, la morte cellulare programmata, la necrosi e la netosi ^{1 6}. Nei mammiferi, le desossiribonucleasi più studiate appartengono alle famiglie delle DNasi1 e DNasi2. Queste DNasi sono classificate in base alle loro proprietà biochimiche, come pH ottimale, attività endonucleasica dipendente o meno da cationi, e in relazione al tipo di estremità generate sul DNA in seguito al taglio. Alla famiglia delle DNasi1 appartengono la DNasi1, la DNasi1L1, la DNasi1L2 e la DNasi1L3, tutte endonucleasi dipendenti da ioni metallici (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e generalmente attive a pH neutro. La famiglia delle DNasi2 comprende la DNasi2 e la DNasi2b, e diversamente dalle DNasi1, sono enzimi che idrolizzano il legame fosfodiesterico in condizioni acide (pH 4.5-5.5) e la cui attività non dipende da ioni metallici ¹.

Sebbene queste DNasi umane rappresentino una piccola parte di desossiribonucleasi presenti in natura, è di fondamentale importanza ampliare le nostre conoscenze relativamente alla loro origine filogenetica e alle loro funzioni biologiche al fine di meglio comprendere le patologie ad esse associate e di prevedere un loro possibile impiego terapeutico.

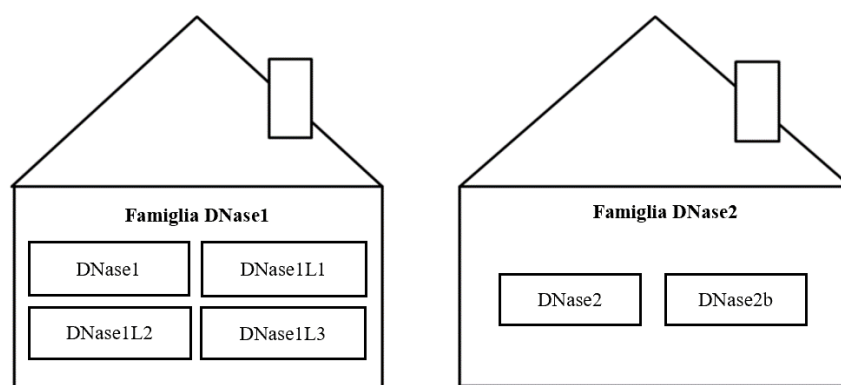


Figura 1: Classificazione delle due famiglie di desossiribonucleasi umane (DNase). La famiglia delle DNasi1 comprende quattro membri: DNasi1, DNasi1L1, DNasi1L2 e DNasi1L3. La famiglia delle DNasi2 comprende due membri: DNasi2, DNasi2b. (Modificato da *Biomolecules*, L. Lauková et al. 2020)

1.1 La famiglia delle DNasi1

La famiglia delle DNasi1 (EC 3.1.21.1) comprende la DNasi1 e tre nucleasi omologhe e per questo denominate “1 like”: DNasi1L1, DNasi1L2 e DNasi1L3, scoperte alla fine degli anni '90 ⁷.

Tutti gli enzimi appartenenti a questa famiglia sono in grado di idrolizzare DNA a doppio filamento producendo frammenti con estremità 3'-OH e 5'-PO₄, e sono attive a pH 6-7, ad eccezione della DNasi1L2 che è attiva a pH 5.5. La loro attività è stata rilevata in presenza di cationi bivalenti, come

Ca^{2+} e Mg^{2+} , o Mn^{2+} o Co^{2+} , che svolgono un ruolo importante nella catalisi e nella stabilità strutturale della proteina ⁸. Tutte le DNasi 1 sono fortemente inibite da Zn^{2+} mentre solo alcune DNasi dei mammiferi sono inibite dalla G-actina. In particolare, questa inibizione è stata riscontrata nella DNasi1 umana, bovina, di coniglio e di topo ⁹.

I membri appartenenti a questa famiglia risultano essere strutturalmente simili con una somiglianza di sequenza del 50% ¹¹⁰. Le DNasi 1 sono principalmente coinvolte in processi apoptotici e/o necrotici ma anche nella patogenesi di malattie autoimmuni ^{11 1 6 8}. La loro espressione non è ubiquitaria, infatti ogni membro risulta essere specificatamente sintetizzato nel distretto associato alla funzione svolta.

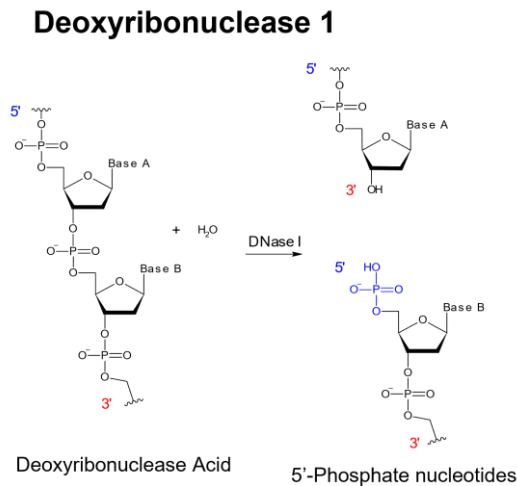


Figura 2: Idrolisi del DNA catalizzata dalle desossiribonucleasi 1. La DNasi1 idrolizza il DNA generando estremità 3'-OH e 5'-PO4. (Modificato da *Nucleic Acids Research*, A. Varela-Ramirez et al. 2017)

1.1.1 DNasi1

Il gene della DNasi1 umana si trova sul cromosoma 16 nella regione p13.3 ed è costituito da nove esoni e otto introni che codificano per una proteina monomericamente di 260 amminoacidi. La presenza di un peptide segnale all'N-terminale e siti di glicosilazione conservati tra i vertebrati, hanno permesso di classificare la DNasi1 come proteina secreta. In particolare, studi su DNasi1 di mammifero rivelano l'alta conservazione di due siti di N-glicosilazione che sono ritenuti essenziali anche per l'attività enzimatica ^{6 12}.

La DNasi1 idrolizza preferibilmente DNA a doppio filamento ma è in grado di agire anche su DNA a singolo filamento. Inoltre, l'attività endonucleasica viene esplicata sulla cromatina ma solo con l'ausilio di eparina che favorisce la rimozione delle proteine associate al DNA ¹³.

Il ripiegamento proteico della DNasi1 consiste di due foglietti β strettamente associati, otto α -eliche e diversi loop disposti sulla superficie della proteina. Tale ripiegamento è stabilizzato dalla presenza di ponti disolfuro tra i residui di cisteina e da due siti in grado di legare uno ione Ca^{2+} con alta affinità ¹⁰. La DNasi1 umana presenta due ponti disolfuro: C101-C104 e C173-C209, conservati tra i vertebrati e localizzati in prossimità dei siti II e I leganti il calcio ^{10 14 15}.

Il ruolo degli ioni metallici nell'attività catalitica della DNasi1 è stato ampiamente caratterizzato e gli studi condotti hanno permesso di stabilire che i cationi sono fondamentali per la catalisi ma anche per il mantenimento di una conformazione strutturale stabile ¹⁰. Studi di dinamica molecolare hanno rivelato la presenza di quattro siti di legame dei cationi sulla superficie della DNasi1, due mostrano affinità per

il calcio e due per il magnesio. Lo ione magnesio partecipa alla catalisi elettrofila dell'idrolisi del legame fosfodiesterico, mentre il Ca^{2+} stabilizza la struttura dell'enzima^{16 17 18}. I siti I e II hanno un'alta affinità per lo ione Ca^{2+} e si trovano in prossimità di due loop importanti per stabilizzare la struttura. Il sito III coordina il Mg^{2+} e si trova vicino al sito I e ai residui di cisteina C173 e C209. Il sito IV è costituito da due sotto-siti, IVa e IVb con affinità per il Mg^{2+} che trovandosi in prossimità del sito attivo coordinando i due residui di istidina catalitica. Tutti i residui coinvolti nei siti di legame cationico IV sono ben conservati tra i membri della famiglia umana della DNasi1, mentre gli altri tre siti mostrano una certa variabilità amminoacidica¹⁰.

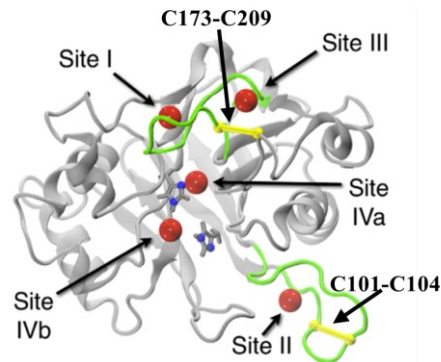


Figura 3: Struttura della bpDNasi1. Quattro siti (sito I-IVa-b) occupati da cationi (sfere rosse). I siti I, II e III si trovano negli anelli L1 e L2 (verde), che contengono ponti disolfuro (giallo). I siti IVa e IVb circondano le istidine catalitiche (catene laterali mostrate in grigio, imidazolo in blu). (Modificato da *PLoS Computational Biology*, M. Guérault et al. 2010)

Il sito attivo delle DNasi1 è caratterizzato dalla presenza di due istidine altamente conservate, tipiche della superfamiglia delle endo-esonucleasi fosfatasi metallo dipendenti a cui appartiene. Studi mutazionali hanno dimostrato il ruolo fondamentale delle istidine catalitiche (H134 e H252) e dei loro rispettivi partner di legame idrogeno E78 e D212 implicati nell'idrolisi del DNA¹⁹. Inoltre, i residui N7, E39, D168 e D251, responsabili del legame del magnesio in prossimità del sito attivo, sono stati ritenuti anch'essi importanti per l'attività della DNasi1^{19 20}. Sulla base di queste evidenze, il meccanismo catalitico delle DNasi1 prevede una catalisi acido-base generale a cui partecipano le coppie di residui E78-H134 e D212-H252 (Fig.4). Una molecola d'acqua attivata da H252 agisce da nucleofilo attaccando il fosforo reso elettrofilo grazie alla stabilizzazione delle cariche negative degli ossigeni da parte di due cationi divalenti coordinati dai residui di E39 e D168 (Fig.4a)^{21 20 10 22}.

Recentemente, è stato proposto un meccanismo denominato "modello di catalisi dell'acido carbossilico a singolo catione", elaborato sulla base della struttura cristallografica della DNasi1 in complesso con i cationi divalenti e uno ione fosfato. Delle due istidine del sito attivo, H134 è coinvolta nella protonazione di un ossigeno del fosfato mentre H252, unitamente ad un catione Mg^{2+} coordinato da E39, stabilizza gli altri ossigeni del fosfato. In questo modello, il residuo di D168 agisce da base catalitica strappando un protone ad una molecola d'acqua¹⁷ (Fig.4b). È interessante notare che i meccanismi catalitici proposti sono coerenti con quello proposto per la endonucleasi umana apurinica/apirimidinica (hAPE1), e potrebbero rappresentare un punto di partenza per chiarire il meccanismo catalitico anche degli altri membri della famiglia, dato che i residui catalitici sono altamente conservati²³.

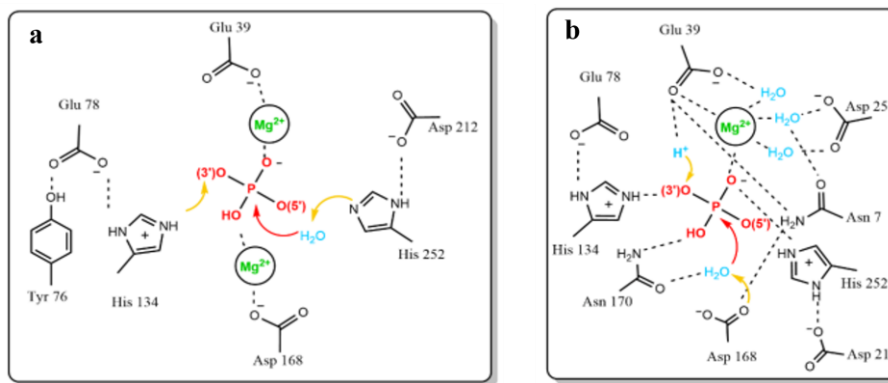


Figura 4: Meccanismi catalitici proposti per la DNasi1. a) Meccanismo del doppio catione e b) Meccanismo dell'acido carbossilico a singolo catione, basata sulla recente struttura della DNasi1 risolta e sulle somiglianze riscontrate con la superfamiglia delle hAPE. (Modificato da *Encyclopedia*, M. Engavale et al. 2021)

Per quanto riguarda gli inibitori, diverse sono le molecole in grado di inibire l'attività della DNasi1, ma l'inibizione da actina è quella maggiormente studiata. L'actina esiste in forma globulare (G-actina) o filamentosa (F-actina) in equilibrio tra loro; la prima lega una molecola di ATP mentre la seconda lega una molecola di ADP. La G-actina forma un complesso stechiometrico (1:1) con la DNasi1 che limita l'accesso del DNA nel sito attivo, inibendo così l'attività endonucleasica. Allo stesso tempo la DNasi1 è in grado di promuovere la depolimerizzazione dell'actina filamentosa (F-actina) formando un complesso con questa²⁴. I residui amminoacidi della DNasi1 coinvolti nel legame con l'actina sono E13, Y65, V67, e A114 che non risultano conservati tra i membri della famiglia^{8 19}.

La DNasi1 è prodotta principalmente da organi del sistema digestivo, nei mammiferi in base alla diversa distribuzione dei tessuti, sono stati classificati tre tipi di DNasi1. La DNasi1 pancreatica, presente in uomo e suino, è molto sensibile a pH acidi. Quella di tipo parotideo, presente in ratto e topo maggiormente attiva nella parotide e infine quella pancreatica-parotide o mista, presente in bovini e conigli²⁵. Inizialmente si pensava che la DNasi1 svolgesse un ruolo principale nella degradazione del DNA contenuto negli alimenti nel tratto digestivo, ma la sua presenza è stata riscontrata anche in fluidi corporei come plasma e urina, dove è impiegata nella degradazione del DNA extracellulare libero²⁶. Inoltre, la generazione di topi transgenici con delezione del gene della DNasi1 ha permesso di dimostrare i diversi ruoli e implicazioni della DNasi1 nella regolazione dell'omeostasi cellulare. La DNasi1 è risultata essere capace di degradare il DNA proveniente da NETs in vitro e in vivo²⁷.

1.1.2 DNasi1L1

La desossiribonucleasi 1-like 1 (DNasi1L1), inizialmente nota come DNasi X, si trova nella regione q28 del cromosoma umano X. Condivide il 38% di identità con la DNasi1 umana e il 40% con la DNasi1L2 e DNasi1L3²⁸.

La sequenza umana della DNasi1L1 codifica per una proteina di 302 amminoacidi. Tutte le proteine DNasi1L1 di mammifero contengono un peptide segnale all' N-terminale e un potenziale sito di N-glicosilazione (Asn243). Una caratteristica unica tra i membri della famiglia delle DNasi1 dei mammiferi è la presenza di un tratto idrofobico nella regione C-terminale che rappresenta la sequenza segnale per l'attacco del glicosilfosfatidilinositolo (GPI), permettendo alla proteina di rimanere ancorata alla membrana cellulare. E' stato dimostrato che la funzione di ancoraggio della GPI, oltre a prevenire la secrezione della DNasi1L1, conferisce all'enzima la capacità di fungere da barriera per inibire il

trasferimento endocitosi-mediato di DNA estranei, idrolizzandoli in vescicole endocitiche ²⁹. È interessante notare che la DNasi1L1 umana, così come la DNasi1, è inibita da actina, anche se i residui coinvolti nel legame con l'inibitore non risultano essere conservati ⁸.

L'espressione della DNasi1L1 risulta essere anch'essa unica nella famiglia delle DNasi1, infatti è abbondante nel cuore e nel muscolo scheletrico dove invece le DNasi1 sono difficilmente rilevabili ⁸. Sulla base di queste caratteristiche è plausibile pensare che la DNasi1L1 abbia un ruolo fisiologico distinto che la differenzia dagli altri membri della famiglia.

1.1.3 DNasi1L2

Il gene umano della DNasi1L2 si trova nella regione p13.3 del cromosoma 16 umano ed ha una somiglianza di sequenza del 56% con DNasi1 ³⁰.

A differenza degli altri membri della DNasi1 che hanno un'elevata attività a pH neutro, la DNasi1L2 mostra un'attività ottimale in condizioni acide con un massimo a pH 5.6, ed è l'unico enzima della famiglia ad avere una sequenza aggiuntiva nella regione centrale della proteina che prende il nome di PRD (Proline Rich Domain). Questo dominio ricco di proline è codificato da un introne che può essere mantenuto o rimosso durante lo splicing alternativo, generando così due trascritti diversi. La presenza del peptide segnale all'N-terminale suggerirebbe che entrambe le isoforme possano essere secrete ma ciò è stato dimostrato solo per il polipeptide più corto ³¹. Diversamente dalla DNasi1, la DNasi1L2 risulta essere resistente all'actina ma è fortemente inibita da elevate concentrazioni saline ^{8 31}.

Alti livelli di espressione della DNasi1L2 sono stati rilevati nella pelle, in particolare nei cheratinociti, suggerendo che ci sia una correlazione tra la sua espressione e la differenziazione dell'epidermide. Bassi livelli di espressione sono stati rilevati anche nel colon, nei polmoni e nella placenta. Analisi di RT-PCR hanno rilevato il trascritto più corto, privo del PRD, nei leucociti del sangue periferico ³¹.

Diversi studi hanno inoltre dimostrato il coinvolgimento della DNasi1L2 nella degradazione di biofilm batterici e il suo ruolo nel differenziamento terminale dei cheratinociti ^{32 33 34}.

Fisher et al. (2007) hanno dimostrato che la DNasi1L2 è una endonucleasi cheratinocita-specifica che svolge un ruolo essenziale nella degradazione del DNA nucleare durante la differenziazione terminale dei cheratinociti epidermici. Bassi livelli di espressione della DNase1L2 sono stati osservati nell'epidermide paracheratosica, come nelle lesioni psoriasiche e in altre patologie specifiche della pelle ³⁵. In alcune linee cellulari la produzione della DNasi1L2 viene indotta da citochine infiammatorie e risulta essere implicata anche nella degradazione del DNA nucleare nei sebociti ^{31 36}.

1.1.4 DNasi1L3

La DNasi1L3 o DNasi gamma, codifica per una proteina di 306 amminoacidi, il cui gene si trova nella regione p14.3 del cromosoma 3 umano. La DNasi1L3 umana è una proteina non glicosilata con una massa molecolare di circa 32 kDa che taglia il DNA a pH 7 in presenza di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} . La sequenza primaria differisce da quella della DNasi1 per la presenza di un dominio basico ricco in Arginine (BD: Basic Domain) al C-terminus e un segnale di localizzazione nucleare (NLS) ^{8 37 38}.

L'NLS è stato ritenuto fondamentale per il trasferimento nel nucleo della DNasi1L3 in seguito a stimoli apoptotici ³⁸. Il dominio extra al C-terminale è costituito da una alfa-elica che conferisce all'enzima la capacità di traslocare nel nucleo durante l'apoptosi per promuovere la frammentazione del DNA ^{37 38 39}, per degradare il DNA nucleosomico senza l'ausilio di proteasi helper e per degradare il DNA incapsulato nei liposomi ^{39 37}. La DNasi1L3 è in grado di idrolizzare sia il DNA "nudo" che il DNA associato a proteine, consentendo la frammentazione internucleosomale del DNA (INDF) durante

l'apoptosi e necrosi. La DNasi1L3 è inoltre in grado di regolare l'abbondanza di numerose fonti di DNA endogeno extracellulare, limitando la lunghezza dei filamenti di DNA e riducendo la sua esposizione alle particelle macrofagiche (MP) derivate da cellule apoptotiche ⁴⁰.

Recentemente è stato riportato che la sostituzione R206C nella DNasi1L3 potrebbe indurre una instabilità strutturale dell'enzima e determinare la formazione di un ponte disolfuro errato con una delle cisteine impegnate in un legame S-S essenziale, poiché la sostituzione causa una ridotta secrezione della proteina e quindi una ridotta attività ⁴¹.

L'espressione della DNasi1L3 è stata riscontrata principalmente nel fegato, nella milza e in cellule mieloidi tra cui cellule dendritiche e macrofagi ^{39 42}, ma livelli di espressione più bassi sono stati rilevati anche nei linfonodi, timo e midollo osseo ^{8 43}.

1.2 La famiglia delle DNasi2

La famiglia delle DNasi2 (EC 3.1.21.1) comprende la DNasi2 e la DNasi2b, endonucleasi attive in assenza di ioni metallici e a pH acido. Le DNasi2 sono enzimi in grado di idrolizzare il doppio filamento del DNA in corti oligonucleotidi con estremità 3'-PO₄ e 5'-OH, mediante un meccanismo di "nick" sul singolo filamento ^{44 45 46}. Fondamentali per l'attività delle DNasi2 sono due residui di istidina presenti nel sito attivo e altamente conservati. La DNasi2 è inibita da ioni zinco e ioni rame ^{45 46}.

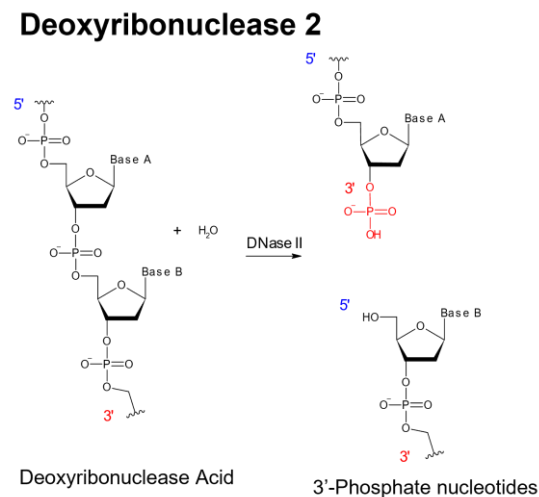


Figura 5: Idrolisi del DNA catalizzata dalle desossiribonucleasi 2. La DNasi2 idrolizza il DNA generando estremità 5'-OH e 3'-PO₄. (Modificato da *Nucleic Acids Research*, A. Varela-Ramirez et al. 2017)

1.2.1 DNasi2

Il gene umano della DNasi2 si trova nella regione p13.2 del cromosoma 19, contiene sei esoni e si estende su circa 6 kbp di sequenza genomica ^{44 47 48}. La proteina di 344 amminoacidi presenta un peptide segnale all'N-terminale e quattro siti di N-glicosilazione ritenuti fondamentali per la localizzazione lisosomiale dell'enzima e per il suo indirizzamento alla via di secrezione. La produzione della DNasi2 priva del peptide segnale ha generato una proteina non glicosilata e inattiva, mentre l'over-espressione di mutanti della DNasi2 priva di glicosilazioni singole o multiple ha prodotto proteine con attività ridotta ^{49 50 51}. Inoltre, la DNasi2 contiene sei residui di cisteina molto conservati tra i vertebrati, che formano

tre ponti disolfuro (C19-C159, C308-C327, e C267-C347) ritenuti indispensabili per il mantenimento del folding. Infatti, la mutazione di uno dei residui di cisteina determina una ridotta attività dell'enzima⁴⁹. L'attività della DNasi2 è totalmente inibita da alte concentrazioni saline (0.4M NaCl) ed è fortemente ridotta in presenza di cationi come lo zinco, il rame, il magnesio e il calcio^{52 53 54}.

Nel 2005 Cymerman et al. furono i primi a proporre una associazione strutturale della DNasi2 con la famiglia delle fosfolipasi D (PLD)⁵⁵. Successivamente, in seguito alla risoluzione della struttura della DNasi2 batterica, è stato possibile dimostrare le somiglianze tra le due famiglie. Un tratto distintivo della famiglia di enzimi PLD è la presenza di un sito attivo pseudo-simmetrico costituito da due motivi "HKD". Questi enzimi catalizzano l'idrolisi di diversi substrati fosforilati, usando lo stesso meccanismo catalitico^{56 57}. La DNasi2 di *B.thailandensis* ha una struttura quaternaria dimerica e ogni monomero si mostra simile e sovrapponibile a quello della fosfolipasi D ed altre fosfolipasi. Risulta interessante notare come i residui catalitici dei membri della famiglia PLD siano ben allineati con i residui catalitici della DNasi2 umana. Ciò ha permesso di proporre un meccanismo catalitico anche per le DNasi2 in cui l'istidina H100 di BthDNasi II attacca il legame fosfodiesterico generando un intermedio covalente e rilasciando il filamento con estremità 5'-OH. In un secondo momento, l'istidina H279 attiva una molecola d'acqua che agisce sul fosfato dal lato opposto, generando un legame covalente per rilasciare H100 e il filamento di DNA 3'-PO4. Vista l'asimmetria del sito attivo, è stato ipotizzato che la DNasi2 idrolizzi i due filamenti del dsDNA con eventi catalitici diversi⁵⁷. In prossimità del motivo "HKD" presente nel sottodominio C-terminale della DNasi2 è presente un residuo di cisteina in posizione 299 che non partecipa alla formazione di un legame disolfuro, ma se sostituito influenza l'attività dell'enzima. Esperimenti di mutagenesi hanno permesso di dimostrare che la sostituzione di C299 con residui carichi positivamente (C299R o C299K) annulla l'attività della DNasi2; la stessa sostituzione con residui carichi negativamente riduce l'attività mentre la sostituzione C299A determina un aumento dell'attività⁵⁸.

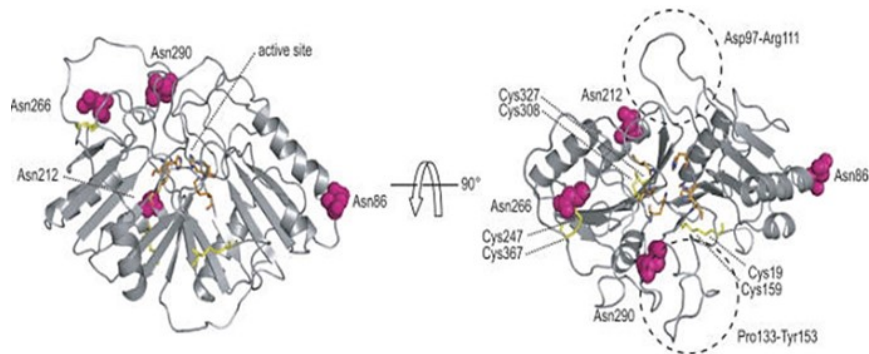


Figura 6: Struttura monomerica della DNasi2 con architettura pseudo-dimerica. I due motivi PLD nei domini N- e C-terminale contengono residui cataliticamente rilevanti (arancione), che insieme formano un singolo sito attivo. In giallo, i residui di Cys e possibili ponti disolfuro. In magenta, residui N-glicosilati. Cerchiati, probabili loops che interagiscono con il DNA (Modificato da *Protein Science*, P. SCHÄFER et al. 2006)

In un primo tempo era stata ipotizzata per le DNasi2 una preferenza di taglio per le sequenze puriniche, ma alterando la struttura del DNA con DMSO è stato dimostrato che la preferenza effettiva per la scissione idrolitica da parte delle DNasi2 viene maggiormente influenzata dalla struttura del substrato e non dalla presenza di sequenze puriniche o pirimidiniche⁵⁷.

La DNasi2 è stata rilevata in più di 20 linee cellulari umane tra cui fluidi corporei, tessuto epiteliale e seppur a basse concentrazioni anche in linee cellulari emopoietiche^{50 51}.

1.2.2 DNasi2b

Il gene della DNasi2b umana, detta anche “DNase2-like acid DNase” o DLAD, si trova sul cromosoma 1p22.3. La sequenza della DNasi2b presenta un peptide segnale all’N-terminale, nove residui di cisteina e mostra omologia con la DNasi2 sia a livello di sequenza amminoacidica che di struttura ^{59 47}.

Nell’uomo e in altri vertebrati, la DNasi2 sembra aver subito un evento di duplicazione genica che ha portato all’evoluzione di due geni strettamente correlati: *DNasi2* e *DNasi2b*. Se da una parte la DNasi2 è espressa in tutti i tipi cellulari con livelli abbastanza uniformi, dall’altra, la DNasi2b è stata riscontrata in molti organismi nel fegato, nei polmoni e negli occhi ⁵⁹. Negli occhi la DNasi2b è coinvolta nella degradazione del DNA nucleare durante il differenziamento terminale delle cellule delle fibre oculari ^{60 61}.

Il gene della DNasi2b condivide un promotore bidirezionale con il gene dell’urato ossidasi (Uox) che è stato inattivato nel corso dell’evoluzione nelle scimmie antropomorfe da un evento di pseudogenizzazione. Nell’uomo il gene *Uox* è stato perso mentre la DNasi2b è stata mantenuta funzionale spostando però il suo pattern di espressione dal fegato ai polmoni. Quindi, indipendentemente dall’inattivazione del gene dell’urato ossidasi nelle scimmie antropomorfe, nei primati si è evoluta una trascrizione alternativa del gene della DNasi2b ^{62 63}.

Come nel caso della DNasi2, l’organizzazione strutturale dell’isoforma lunga è rappresentata da due domini PLD simili, ognuno contenente una triade di residui catalitici. La proteina presenta una struttura pseudo-dimerica con il sito attivo localizzato nell’interfaccia tra i due domini PLD. L’isoforma corta invece risulta troncata all’N-terminale e corrisponde solo del secondo dominio PLD (PLD2).

2. Patologie associate alle DNasi

La famiglia delle DNasi1 e delle DNasi2 sono in genere coinvolte in processi fisiologici cellulari in cui si necessita di una clearance intra- ed extracellulare del DNA. Alcune di queste DNasi sono espresse in un numero limitato di tessuti o cellule, ma data la loro natura enzimatica anche livelli di espressione molto bassi potrebbero essere biologicamente rilevanti.

Le DNasi rappresentano uno dei diversi meccanismi atti ad impedire lo sviluppo di risposte auto-infiammatorie e autoimmuni. Gli acidi nucleici svolgono un ruolo cruciale nell’immunità dato che il loro rilevamento da parte del sistema immunitario induce la produzione di citochine infiammatorie. Come il DNA, anche le proteine istoniche inducono una segnalazione pro-infiammatoria che porta al rilascio di citochine mediante interazione e attivazione con i recettori toll-like (TLRs). Questa attivazione a cascata nel suo complesso genera una risposta infiammatoria ^{5 2}. Inoltre, il DNA extracellulare è in grado di determinare lo sviluppo di anticorpi anti-DNA che legandosi al DNA promuovono infiammazione e danneggiamento del tessuto in cui si accumulano. Per questo motivo la degradazione del DNA extracellulare è ritenuta di fondamentale importanza per la prevenzione dell’autoimmunità e il mantenimento dell’omeostasi cellulare ^{3 64}. Il contenuto di DNA extracellulare libero proviene da processi di morte cellulare come l’apoptosi, la necrosi e la netosi, ma anche da cellule del sangue e da cellule viventi attraverso una secrezione attiva ^{65 10}.

La risposta infiammatoria e immunitaria generata dal DNA extracellulare è stata dimostrata mediante rilevamento di elevate concentrazioni di DNA nel plasma di pazienti affetti da malattie infiammatorie ⁶⁵. Alti livelli di DNA extracellulare presenti nel circolo sanguigno sono anche associati all’accumulo

di trappole extracellulari del neutrofilo (NETs) che costituiscono un importante meccanismo immunitario messo in atto dai neutrofili per la cattura di batteri al fine di garantire immunità antimicrobica^{4 66}. I neutrofili attivati, in seguito ad uno specifico processo di morte cellulare chiamato netosi, rilasciano il loro contenuto di DNA sotto forma di reti fibrose che si protendono dalla membrana formando trappole extracellulari. Studi suggeriscono che uno sbilanciamento tra netosi e degradazione dei NETs potrebbe essere associata allo sviluppo di malattie autoimmuni. Infatti, elevati livelli di NETs sono stati associati a malattie come la psoriasi, il lupus eritematoso sistemico (LES) e la pancreatite^{4 67}. Il DNA extracellulare viene inizialmente degradato da DNasi intra-cellulari che effettuano le prime scissioni all'interno delle cellule e in seguito da DNasi extracellulari che continuano la frammentazione del DNA. I principali regolatori di NETs e dei livelli di DNA extracellulare sono la DNasi1 e DNasi1L3, la cui carenza porta spesso alla persistenza di DNA e cromatina in circolo come avviene per esempio nel LES^{67 4}.

Il lupus eritematoso sistemico è una malattia cronica di natura autoimmune, che può colpire diversi organi e tessuti. Come accade nelle altre malattie autoimmuni, è caratterizzata dalla produzione di alti livelli di autoanticorpi diretti contro il DNA che causano infiammazione e danno tissutale^{68 26}. Delezioni della DNasi1 e DNasi1L3 sono associate a un fenotipo LES, la DNasi1 sembra essere associata a LES con esordio in pazienti adulti, mentre la DNasi1L3 è associata a LES in pazienti pediatrici. Inoltre, è stato riscontrato che la DNasi1 in assenza di DNasi1L3 non è in grado di migliorare le condizioni patologiche della malattia, per questo motivo è stato ritenuto che la DNasi1L3 possa avere delle proprietà uniche nel prevenire il lupus, probabilmente conferite dal dominio extra C-terminale che consente all'enzima di tagliare DNA nucleare complessato a lipidi e proteine^{26 27}.

La DNasi1 è in grado di tagliare il DNA "nudo", il DNA dei NETs e il DNA nucleosomico in presenza di eparina e/o plasmina^{69 70}. La DNasi1, contrariamente alla DNasi1L3, svolge la sua attività prevalentemente in ambiente extracellulare in quanto nel citosol la sua attività è fortemente inibita dall'actina. La DNasi1L3 sembra agire principalmente nella prevenzione dell'autoimmunità essendo capace di degradare il DNA sia in ambiente extracellulare che intracellulare. Il dominio C-terminale, unico nella famiglia delle DNasi1, conferisce all'enzima la capacità di agire da barriera di trasfezione e di degradare microparticelle apoptotiche che permettono di prevenire lo sviluppo di anticorpi anti-dsDNA e le conseguente infiammazione^{39 40}.

Delezione del gene della DNasi1L3 in topo e uomo causa accumulo di DNA extracellulare e, a differenza dei topi con delezione su DNasi1 che mostravano un aumento di autoanticorpi rivolti verso il DNA, in quelli con knock-out sulla DNasi1L3 hanno mostrato anche modifiche significative del DNA extracellulare, tra cui elevati livelli di lunghi frammenti polinucleosomici. Questa differenza ha permesso di dimostrare la capacità della DNasi1L3 di ridurre il potere immunogeno del DNA extracellulare libero, riducendo la lunghezza e la sua esposizione a microparticelle derivanti da cellule apoptotiche^{40 71}.

Per la DNasi1L1 non è stata trovata nessuna associazione con malattie correlate a malfunzionamenti nei processi apoptotici e/o necrotici attraverso la riduzione o abolizione dell'attività endonucleasica in vivo. Delezioni nella regione 3' dell'esone 9 del gene *DNasi1L1* sono state rilevate in pazienti con la malattia di Pompe e delezioni parziali del gene sono state riscontrate in pazienti affetti da sindrome di Barth, ma non è stata resa nota nessuna abolizione dell'attività della DNasi1L1 che potrebbe essere coinvolta nell'eziologia di queste malattie^{72 73}. Invece, recenti studi hanno suggerito un collegamento tra l'attività della DNasi1L1 con il diabete, la schizofrenia e la vasculite associata all'anca^{73 74 75}.

Il ruolo della DNasi1L1 è stato comunque associato alla sede di espressione, poiché topi privi del gene hanno mostrato una ridotta tolleranza alla fatica e danni alle fibre muscolari. Il muscolo scheletrico è costituito da strutture specializzate come i tubuli T e le caveolae, che sono state proposte essere siti di ingresso per il DNA esogeno e sensori antinfiammatori coinvolti nei processi di infiammazione muscolare^{76 77}.

Nei macrofagi la DNasi1L1 funge da recettore cellulare per il patogeno *Ehrlichia chaffeensis*⁷⁸, un batterio gram-negativo appartenente alla famiglia delle Anaplasmataceae nell'ordine Rickettsiales, in grado di provocare ehrlichiosi dei monociti umani (HME), una zoonosi emergente trasmessa dalle zecche⁷⁹. È stata infatti dimostrata la capacità della DNasi1L1 di interagire con proteine di superficie del patogeno (EtpE) facilitandone l'ingresso nella cellula ospite⁸⁰⁻⁸¹.

La DNasi1L2 è maggiormente espressa nella pelle e risulta essere associata a malattie come la psoriasi e la paracheratosi. La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica della pelle caratterizzata da un iperproliferazione dei cheratinociti, mentre la paracheratosi è caratterizzata dalla presenza di cellule nucleate nello strato corneo. La formazione dello strato corneo è appunto determinata dal differenziamento dei cheratinociti, che andando incontro a morte cellulare programmata richiedono l'attività della DNasi per degradare il DNA nucleare. Topi con delezione della DNasi1L2 hanno mostrato ritenzione di DNA nucleare non solo nella pelle ma anche nei capelli, unghie ed esofago, confermando l'importante ruolo della DNasi1L2 in questi tessuti^{34 32}.

È stato riscontrato che la DNasi1L2 ha un impatto negativo sulla formazione di biofilm batterici; Fisher et al. (2007) hanno dimostrato la capacità della DNasi1L2 di degradare biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* conferendo una barriera protettiva contro infezioni della pelle³³.

Inoltre, è stato proposto un coinvolgimento della DNasi1L2 nella degradazione del DNA durante stati infiammatori, poiché la sua espressione risulta essere indotta da citochine infiammatorie, e insieme alla DNasi2 è stata ritenuta indispensabile per la degradazione del DNA nucleare nei sebociti^{31 36}.

Per il mantenimento dell'omeostasi cellulare della pelle oltre alla DNasi1L2 risulta coinvolta un'altra DNasi acida, la DNasi2. Knockdown della DNasi2 ha determinato una ridotta attività dell'enzima in modelli di pelle umana, permettendo di identificare il suo coinvolgimento nello strato corneo³⁵.

La DNasi2 risulta essere principalmente coinvolta in processi apoptotici, svolgendo un ruolo importante nel metabolismo e nella protezione dell'organismo, in relazione alla sua localizzazione nei lisosomi e il pH acido ottimale⁸².

Topi con delezione del gene della DNasi2 hanno mostrato fenotipi di malattia autoimmune, principalmente grave anemia e infiammazione causate dai nuclei degli eritrociti non espulsi. Questa situazione viene generata dalla mancata degradazione dei nuclei dei globuli rossi durante il loro normale sviluppo, in cui i nuclei estrusi vengono degradati dai macrofagi in cui risiede maggiormente la DNasi2⁸³. Questa evidenza conferma l'importanza dello smaltimento del DNA e l'essenziale ruolo delle DNasi nella sua degradazione. Polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del gene della DNasi2 sono stati associati all'artrite reumatoide e al rischio di patologia renale nei pazienti affetti da LES. Pertanto, è stato possibile considerare la DNasi2 come un enzima fondamentale nella regolazione dei livelli di DNA, in grado di limitare reazioni infiammatorie e danni cellulari sia in topo che in uomo. Questi risultati hanno permesso di supporre che gli SNP del gene della DNasi2 potrebbero essere utilizzati come fattori di rischio genetico nella fisiopatologia delle malattie autoimmuni e infiammatorie⁸⁴.

A differenza della DNasi2, la DNasi2b ha una localizzazione più circoscritta, essendo principalmente espressa nelle lenti, in cui risulta essere implicata nella degradazione del DNA, regolando il differenziamento delle cellule del cristallino. Topi con delezione della DNasi2b hanno sviluppato la cataratta, ma non è stata osservata alcuna infiammazione, probabilmente dovuta ai bassi livelli di espressione della DNasi che non sono in grado di attivare il rilevamento delle nucleasi⁶⁰. Il meccanismo di azione della DNasi2b nella lente non è stato del tutto chiarito, ma è stato evidenziato che la trascrizione della DNasi2b viene regolata da un fattore trascrizione (HSF4) specifico per la lente, topi che portano delezione di HSF4 sviluppano la cataratta, come accade in assenza della DNasi2b, e mostrano una bassa espressione e attività della DNasi2b^{85 86}. È interessante notare che non tutti gli organismi utilizzano la DNasi2b durante il differenziamento della lente. È stata recentemente riscontrata nella lente di zebrafish la presenza di un ortologo della famiglia delle DNasi1, la DNasi1L3l, la quale risulta svolgere un ruolo fondamentale nella degradazione del DNA durante lo sviluppo della lente⁸⁷.

Poche evidenze sono emerse, invece, riguardo il ruolo della DNasi2b nelle ghiandole salivari e nei polmoni nell'uomo.

Un altro aspetto rilevante delle DNasi è la loro associazione con la presenza e sviluppo di cellule tumorali. Pazienti affetti da cancro mostrano aumentati livelli di DNA in circolazione, causato da cellule tumorali in proliferazione e ridotta attività delle DNasi extracellulari, generando anche un elevato contenuto di NETs principalmente dovuto allo sviluppo di metastasi. Somministrazione di DNasi1 ricombinante in modelli murini con cancro ha permesso di inibire la formazione di metastasi, mentre la DNasi1L3 capace di regolare i livelli di DNA extracellulare libero, risulta essere poco espresso in diversi tipi di tumori, per esempio in pazienti con carcinoma epatico è stata rilevata un'associazione tra la ridotta espressione della DNasi1L3 e la breve aspettativa di vita^{88 89}. Questi dati potrebbero suggerire una correlazione tra la crescita di cellule tumorali e lo sviluppo di metastasi con la compromissione delle attività delle DNasi extracellulari.

Come le DNasi1, anche la DNasi2 lisosomiale sembrerebbe svolgere un ruolo antitumorale, apportando un miglioramento alla risposta immunitaria antitumorale. È stata dimostrata la capacità della DNasi2 di regolare negativamente la produzione di citochine infiammatorie indotte dalla morte di cellule tumorali da parte dei macrofagi, bloccando quindi il processo immunostimolante⁹⁰.

Data l'associazione tra la presenza di DNA extracellulare libero e lo sviluppo di patologie, è stato possibile considerare il DNA un buon biomarcatore per alcune malattie, consentendo di riconoscere una risposta immunitaria attiva. La DNasi1 e la DNasi1L3 sono considerati potenziali biomarcatori principalmente per malattie autoimmuni e cancro, ma anche per altre patologie^{91 92 93}.

Oggi, le DNasi costituiscono una strategia terapeutica nel trattamento di diversi tipi di malattie respiratorie, come la fibrosi cistica (FC), asma, e infezione da COVID-19^{11 94}.

Risultati e discussione

2.1 Ricerca ed individuazione dei geni delle DNasi1 e DNasi2 nei vertebrati

Per ottenere maggiori informazioni sull'evoluzione e ricostruire l'origine dei geni delle DNasi presenti nei vertebrati, sono state raccolte le sequenze delle DNasi1 e DNasi2 disponibili e complete nei database NCBI ed Ensembl, relative ai principali gruppi dei metazoi al fine eseguire analisi filogenetiche.

È stata effettuata una prima ricerca di omologia nei genomi completi dei vertebrati a partire dalle sei DNasi umane (DNasi1/1L1/1L2/1L3/2/2b). La ricerca è stata ripetuta con le DNasi di gallo (*Gallus gallus*) e di zebrafish (*Danio rerio*). Tutte le sequenze individuate sono state analizzate tramite allineamenti multipli, classificate e confermate mediante filogenesi.

Dalle ricerche condotte è emerso che le banche dati principali, come NCBI, Ensembl e UNIPROT, non mostrano sempre una nomenclatura unica per lo stesso gene nei diversi organismi e spesso le annotazioni sono errate o ambigue, per cui è stato necessario esaminare tutte le sequenze ritenute complete e ridefinire la classificazione dei diversi ortogruppi sulla base delle caratteristiche conservate e della ricostruzione filogenetica (tabella S1,S2).

Le DNasi risultano ampiamente distribuite nei vari organismi presi in considerazione, anche se nei vertebrati il repertorio di DNasi risulta essere più ampio rispetto ai metazoi non vertebrati. In particolare, negli invertebrati sono presenti solo un gene *DNasi1* e un gene *DNasi2b*. Nei vertebrati sono stati invece individuati sette ortogruppi appartenenti alla famiglia delle DNasi1, dei quali tre non presentano ortologhi nell'uomo e sono chiamati DNasi1L1-2, DNasi1L4 e DNasi1L4-2. La famiglia delle DNasi2 presenta due ortogruppi entrambi presenti nell'uomo.

2.2 Origine e conservazione della famiglia delle DNasi1 nei vertebrati

Per comprendere l'evoluzione delle proteine appartenenti alla famiglia delle DNasi1 nei vertebrati, il set di sequenze utilizzato include mammiferi, uccelli, rettili e pesci (comprese o escluse le sequenze di anfibi). Nelle principali banche dati (NCBI, Ensembl e UNIPROT), la maggior parte delle sequenze di anfibi risultano tronche o incomplete, per cui quando incluse nella filogenesi, cambiano drasticamente la ricostruzione (Fig.S1b). L'albero filogenetico è stato costruito comprendendo anche sequenze di invertebrati, appartenenti a cordati basali (Fig.S1a-b).

Le sequenze dei sette ortogruppi delle DNasi1 sono state allineate utilizzando il programma ClustalX e successivamente l'allineamento è stato utilizzato per costruire un albero di massima verosimiglianza con PhyML, validato mediante analisi di bootstrap con 100 ripetizioni. Il set finale di DNasi prese in considerazione includeva 214 sequenze di DNasi1.

Le sequenze degli invertebrati sono raggruppate tutte insieme e sono state quindi utilizzate per inserire la radice all'albero (Fig.1a; Fig.S1a). Nei vertebrati le DNasi si dividono principalmente in due rami, uno che raggruppa le DNasi1 e DNasi1L2 e l'altro con DNasi1L1, DNasi1L1-2, DNasi1L3, DNasi1L4 e DNasi1L4-2. Questa ramificazione viene supportata dall'analisi bootstrap e dalla heatmap (Fig.1a; Fig.S1a e Fig.1b), in cui le sequenze delle DNasi presenti in tre organismi rappresentativi (uomo, gallo e zebrafish) sono state utilizzate per creare una mappa di identità. Analizzando l'albero in dettaglio, il supporto di bootstrap è per lo più buono in tutte le ramificazioni, mentre valori meno confortanti sono stati rilevati nella ramificazione interna della DNasi1L1/1L1-2 e DNasi1L3/1L4.

La prima ramificazione è costituita dalla DNasi1 che risulta essere un gruppo parafiletico con la DNasi1L2 al suo interno. La DNasi1 è la più ancestrale ed è presente in tutti gli organismi presi in esame, mentre la DNasi1L2, che forma un gruppo monofiletico, è assente nei pesci e negli anfibi, suggerendo una duplicazione negli amnioti. Alla base della seconda ramificazione troviamo una DNasi di lampreda di mare (*P.marinus* - vertebrato senza mandibole) classificata come DNasi1L1-2 in base alle caratteristiche di sequenza (vedi paragrafi successivi; Fig.1a; Fig.S1a). Si evidenziano altre due ramificazioni in cui sono raggruppate la DNasi1L3 con la DNasi1L4 e la DNasi1L1 con la ramificazione interna della DNasi1L1-2 monofiletica. La DNasi1L4 è presente solo nei pesci cartilaginei e ossei, mentre la DNasi1L3 è presente in tutti i vertebrati ma risulta essere assente nei pesci ossei. La DNasi1L1-2 è presente nei pesci e nei rettili ma assente nella maggior parte dei tetrapodi, mentre la DNasi1L1 non è presente in alcuni uccelli, nello gnathostoma più ancestrale (*C.milii*) e negli agnati, suggerendo una duplicazione negli gnatostomi, in particolare tra i pesci cartilaginei e ossei.

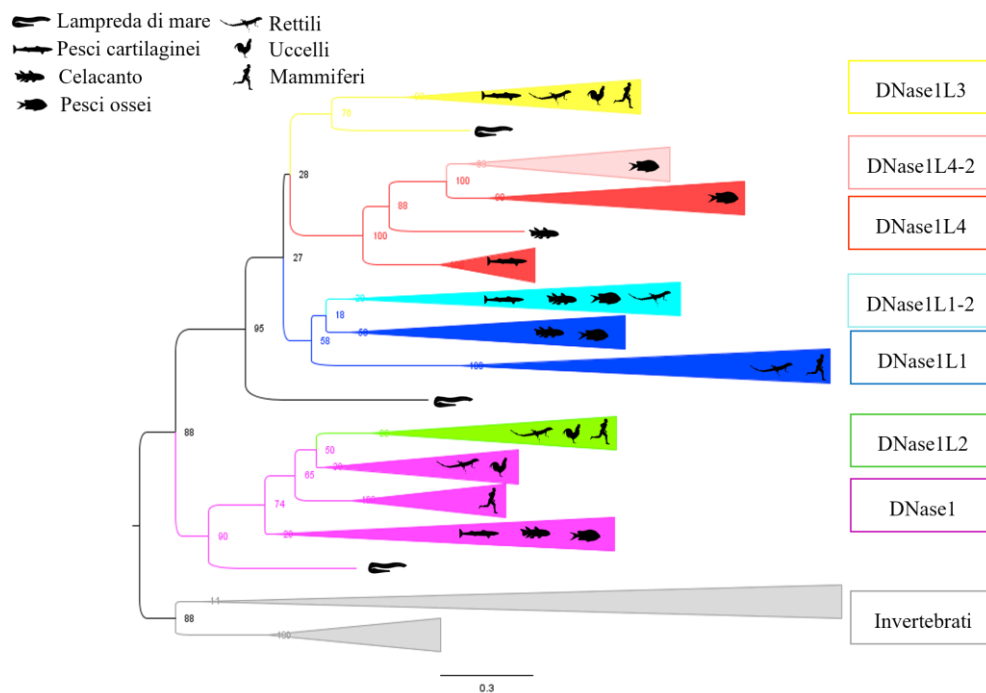


Figura 1a Albero filogenetico di massima verosimiglianza di 203 proteine della famiglia delle DNasi1. Albero con ramificazioni collassate e sequenze di invertebrati utilizzate come outgroup e fissate come radice dell'albero. I valori bootstrap sono mostrati sui nodi interni. Scala bar, sostituzione/ sito. L'albero completo è mostrato in Fig.S1.

Figura 1c: Allineamento della famiglia delle DNasi1. Un set di 21 sequenze di vertebrati considerate rappresentative è stato utilizzato per l'allineamento, che mostra la conservazione in sequenza dei residui catalitici (triangoli verso l'alto), legame al Mg^{2+} , (cerchi pieni); legame al Ca^{2+} , (cerchi vuoti), legame del DNA (triangoli verso il basso); legame dell'actina, (quadrati); le cisteine conservate nella famiglia, (stelle). La numerazione dei residui segue la sequenza della DNasi1 umana.

2.3 Analisi di sequenza e di struttura della famiglia delle DNasi1 umane

Tra le proteine umane della famiglia delle DNasi1 era stata riscontrata un'alta somiglianza in sequenza e in struttura^{19 17}. Le sequenze mostrano infatti una forte conservazione dei residui implicati nella catalisi (E78, H134, D168, N170, D212 e H252) e nel legame del magnesio (N7, E39 e D251). Un allineamento multiplo di 21 sequenze di DNasi1 rappresentative (Fig.1c) mostra che i residui catalitici sono conservati in tutti i vertebrati. Poco conservati sono invece i residui implicati nel legame al DNA e quelli coinvolti nell'interazione con actina (Fig.1c). Ciò suggerisce una diversa affinità all'actina e/o al DNA da parte dei diversi membri della famiglia delle DNasi1.

Inoltre, tutte le DNasi1 presentano un peptide segnale all'N-terminale e una coppia di cisteine molto conservata (C195 e C231), con l'eccezione della DNasi1L4 e 1L4-2, che non conservano nessuna di queste caratteristiche. La conservazione delle cisteine e dei rispettivi ponti disolfuro hanno facilitato l'individuazione e classificazione delle DNasi1 in accordo con la ricostruzione filogenetica (Fig.1a,c; Fig.2a). Tre ponti disolfuro sono caratteristici della famiglia delle DNasi1: il ponte C195-C231 presente in tutti i membri della famiglia, il ponte C123-C126 conservato solo nei vertebrati e il ponte C26-C54 conservato nella DNasi1L3, DNasi1L1 e DNasi1L1-2 (Fig.2a).

Per approfondire le conoscenze strutturali di questa famiglia e per meglio comprendere la conservazione dei residui fondamentali per la catalisi, per il legame del DNA e per l'interazione con l'actina, sono stati costruiti dei modelli strutturali di omologia della DNasi1L1, 1L2 e 1L3 umane, con il server SWISS-MODEL, utilizzando la struttura della DNasi1 (PDB: 4AWN). Per quanto riguarda il sito attivo, sono stati analizzati i residui di istidina 134 e 252 con i loro partner di legame idrogeno E78 e D212, il residuo D168 che funge da base catalitica e N170 che interagisce con il gruppo fosfato del DNA. Sono stati inoltre inclusi i residui che coordinano il magnesio, fondamentali per la catalisi (N7, E39 e D251). Tutte le DNasi1 mostrano una forte conservazione dei residui coinvolti nella catalisi (Fig.2b). Scenario diverso è stato evidenziato per l'interazione con l'actina e il legame al DNA in cui i residui risultano essere poco conservati (Fig.2c). I modelli della DNasi1L1, DNasi1L2 e DNasi1L3 umane sono stati sovrapposti alla struttura del complesso DNasi1-actina di *Bos taurus* (PDB: 1ATN) per ispezionare l'interfaccia di legame DNasi1-actina, tenendo in considerazione gli esperimenti di mutagenesi condotti. L'interazione della DNasi1 con l'actina comporta legami idrofobici, elettrostatici e idrogeno. I residui Y65, V66 e V67 di DNasi1 sono impegnati in interazioni idrofobiche con i residui G42, V43 e M44 di actina, posizionati su due filamenti β paralleli, di cui il filamento β_3 di DNasi1. L'area di contatto idrofoba si estende fino al β -strand 6 (β_6) di DNasi1 con la catena laterale del residuo A114, che contatta la catena laterale di V45 di actina, mediante legami di van der Waals. Le interazioni polari circondano questa regione idrofoba centrale, comprendendo i residui D53, E69, H44 ed E13 di DNasi1. E13 e H44 sono coinvolti in interazioni elettrostatiche rispettivamente con T203 ed E207 di actina e risultano essere implicati anche nel legame con il DNA.

Gli esperimenti di mutagenesi sui residui coinvolti nel legame con l'actina dimostrando che l'introduzione di residui carichi o polari nella regione idrofoba, come nei mutanti DNasi1 V67D, V67K e Y65R, determina un legame di actina notevolmente ridotto, mentre le sostituzioni che non

hanno influenzato l'affinità di legame sono state V67M/A e Y65W. La sostituzione D53E, nonostante il mantenimento della carica negativa, potrebbe alterare la distanza per un corretto legame con R39 e H40 di actina. Invece, le mutazioni di A114 che introducono residui carichi, alifatici o aromatici hanno portato a varianti resistenti all'actina con una forte riduzione dell'affinità di legame actina rispetto al DNasi1 di tipo selvatico. Mutazioni sui residui implicati nelle interazioni polari D53, E69, H44 ed E13 hanno mostrato un minimo effetto sull'interazione con l'actina^{19 95 96}. Ulteriori dati sperimentali hanno rilevato, inoltre, che solo la DNasi1 e la DNasi1L1 risultano essere inibite da actina, mentre la DNasi1L3 e DNasi1L2 sono resistenti. D. Shiokawa et al. (2001) hanno mostrato l'abbattimento dell'attività della DNasi1L1 in presenza di ad alte concentrazioni di actina⁸.

In tutte e tre le DNasi (1L1, 1L2 e 1L3) i residui sul filamento β 3 (sovrapposti a Y65 e V67 della DNasi1) coinvolti nelle interazioni idrofobiche non sono molto conservati, eccetto per la DNasi1L3 che ha due residui su tre uguali alla DNasi1 (Y65Y e V66V) e il terzo V67I che non altera il legame idrofobico con M44 di actina. Rispetto la DNasi1, la DNasi1L1 ha una sostituzione Y65S e una V66T, mentre la DNasi1L2 ha una sostituzione Y65F e V67S. Tra queste, nella DNasi1L2 la sostituzione V67S con un residuo con catena laterale polare potrebbe alterare il contatto idrofobico, mentre le altre sostituzioni potrebbero non alterare le interazioni. Inoltre, in posizione 114, l'alanina risulta essere sostituita con fenilalanina nella DNasi1L1, 1L2 e 1L3. Questa sostituzione (A114F), sulla base degli studi di mutagenesi dovrebbe conferire resistenza all'actina, poiché in DNasi1 ha ridotto l'affinità di legame con l'actina^{19 96}.

Per quanto riguarda i contatti polari, i residui D53, E69, H44 ed E13, sono anch'essi poco conservati. Nella DNasi1L1 il residuo D53 è sostituito con una arginina, mentre nelle DNasi1L2 e 1L3 con glutammato, mantenendo la carica negativa. In DNasi1 il mutante D53R ha mostrato una costante inibitoria (K_i) nei confronti dell'actina più alta rispetto al tipo selvatico (1.3nM wild type e 47nM D53R)¹⁹, quindi la sostituzione D53R potrebbero giustificare una maggiore resistenza della DNasi1L1 rispetto la DNasi1 e quindi l'inibizione ad alte concentrazioni. L'introduzione di una carica opposta e quindi positiva in posizione 53 (D53R), dovrebbe interrompere il legame ionico formato con Arg39 e i legami idrogeno con His40 di actina.

Inoltre, è interessante notare tra le interazioni polari i residui E13 e H44 coinvolti anche nel legame al DNA. Gli studi di mutagenesi suggeriscono che sostituzioni in queste posizioni dovrebbero apportare principalmente alterazioni all'attività dell'enzima. Con il mutante E13D è stato riscontrato che introducendo una carica negativa, l'attività veniva ridotta di circa 2 volte rispetto quella della DNasi di tipo selvatico, mentre i mutanti E13A/K/R mostravano un aumento dell'attività della DNasi. La sostituzione H44D in DNasi1 ha abbattuta l'attività di circa 20 volte⁹⁵.

Nella DNasi1L1 in posizione 13 il glutammato è sostituito da una leucina (L31) e in posizione 44 troviamo una serina (S62) e non una istidina, mentre la DNasi1L2 in entrambe le posizioni ha un aspartato. L'introduzione di cariche negative tra questi residui posti in prossimità del DNA potrebbe generare delle repulsioni di carica e impedire il legame al fosfato. Nella DNasi1L2 i residui D13 e D44 giustificerebbero una ridotta attività, se paragonata alla DNasi1. La sostituzione con la leucina (E13L) in DNasi1L1 potrebbe diminuire l'affinità di legame al DNA, anche se non ci sono evidenze sperimentali.

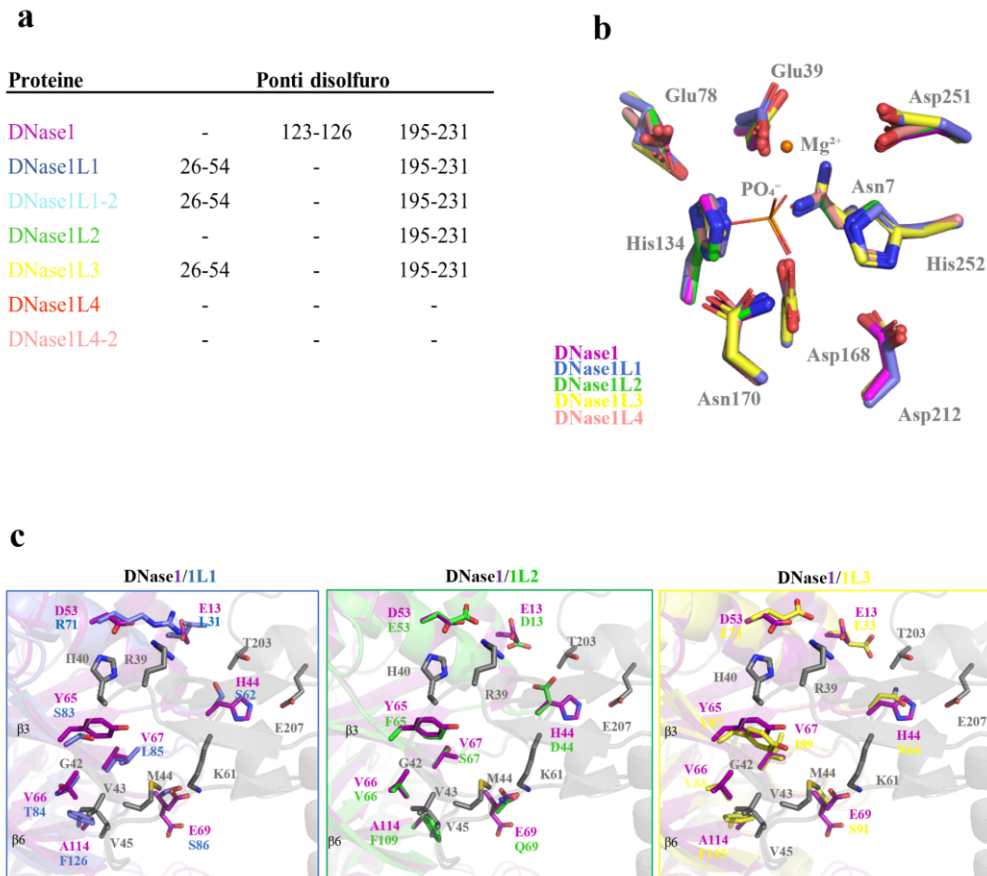


Figura 2: Omologie e differenze tra i membri della famiglia delle DNasi1. a) Tabella riassuntiva dei putativi ponti disolfuro conservati nei vertebrati; b) Conservazione del sito attivo; sovrapposizione del sito attivo della struttura della DNasi1 umana (PDB:4AWN, viola) con i modelli di omologia della DNasi1L1 (blu), DNasi1L2 (verde), DNasi1L3 (gialla) e DNasi1L4 (rossa) in presenza del magnesio (sfera arancio) e il fosfato (arancio), la numerazione dei residui fa riferimento alla sequenza della DNasi1 umana. c) Sovrapposizione della struttura della DNasi1 umana (4AWN; viola) con i modelli omologhi di DNasi1L1 (blu), DNasi1L2 (verde), e DNasi1L3 (gialla), e il complesso DNasi1-actina (1ATN; grigia), che mostra i residui coinvolti nell'interazione DNasi1-actina, mostrati in stick.

2.4 Origine della DNasi1L2 e conservazione del PRD nei vertebrati terrestri

All'interno del gruppo delle DNasi1, si nota la separazione del gruppo monofiletico delle DNasi1L2. Il gene *DNasi1L2* non è stato trovato nei pesci e negli anfibi, suggerendo una duplicazione genica avvenuta negli amnioti (Fig.1a; Fig.S1a). Analizzando la localizzazione genica, si osserva che nei genomi dell'uomo e del gallo i geni *DNasi1* e *DNasi1L2* si trovano sullo stesso cromosoma e hanno lo stesso orientamento. Sul cromosoma 16 umano i due geni sono distanti circa 1370 kbp, mentre sul cromosoma 14 del gallo i due geni sono in tandem, separati da circa 630 bp (Fig.3a).

Negli allineamenti multipli, le sequenze di DNasi1L2 possono essere facilmente distinte dalle sequenze di DNasi1 per l'assenza di una porzione che comprende cinque residui amminoacidici. Questo frammento, caratteristico delle DNasi1, contiene due cisteine (C123-C126) che formano un ponte disolfuro nella struttura della DNasi1 (Fig.1c; Fig.2a)¹⁰. Queste evidenze suggeriscono che il gene *DNasi1L2* ha avuto origine circa 330 milioni di anni fa negli amnioti, prima della separazione tra

sauropsidi e mammiferi, in seguito a duplicazione in tandem del gene *DNasi1* con delezione di 15 nucleotidi corrispondenti alla regione 122-126 della sequenza proteica.

La sequenza della DNasi1L2 umana possiede un segmento aggiuntivo di circa 20 amminoacidi ricco in proline. Questo segmento, chiamato PRD (*proline-rich domain*), corrisponde ad un introne del gene umano *DNase1L2* che in alcuni trascritti viene ritenuto in seguito a splicing alternativo³¹. Questo ha come risultato l'esistenza di due isoforme diverse: un'isoforma corta, priva dell'introne, che codifica per una proteina priva del PRD, e un'isoforma lunga, che codifica per una proteina contenente il dominio PRD. L'analisi dell'occorrenza del PRD nelle sequenze di DNasi1L2 dei vertebrati ha permesso di dimostrare che il dominio è presente solo in alcune sequenze dei mammiferi ed è assente nelle sequenze sauropsidi (Fig.3b). Le sequenze di DNasi1L2 dei mammiferi che mostrano il PRD sono state utilizzate per generare un grafico di frequenza (Fig.3c) che mostra la conservazione dei residui amminoacidi in questo dominio.

La DNasi1L2 è abbondante nella pelle e nelle appendici cutanee dei mammiferi, dove svolge un ruolo essenziale nella degradazione del DNA nucleare durante la differenziazione terminale dei cheratinociti epidermici. Infatti, topi con delezione del gene *DNase1L2* hanno mostrato patologie legate alla pelle, come la paracheratosi^{32 34}.

Sono stati analizzati i dati di RNA-seq presenti nel database NCBI, per confermare l'espressione del gene umano nella pelle ed osservare l'espressione dei geni *DNase1L2* di altri organismi. L'espressione del gene *DNase1L2* è stata riscontrata nelle piume degli uccelli (*Gallus gallus*), nelle squame dei rettili (*Alligator sinensis*) e nella pelle dei mammiferi (*Homo sapiens*, *Halichoerus grypus* e *Globicephala melas*) (Fig.S3).

Per comprendere il ruolo della DNasi1L2 nell'evoluzione dei vertebrati sono state osservate le differenze nella pelle dei vertebrati. La pelle negli amnioti è caratterizzata dalla presenza di uno strato più esterno denominato strato corneo e da appendici cutanee come i peli nei mammiferi o le piume negli uccelli. Lo strato corneo è costituito da molti strati di corneociti, cellule anucleate che derivano da un processo di differenziamento dei cheratinociti. La pelle dei vertebrati non amnioti non presenta uno strato corneo pluristratificato. I pesci necessitano di una pelle ben idratata e hanno uno strato esterno costituito da cuticola mucosa, mentre gli anfibi, mostrano uno strato corneo monocellulare⁹⁷.

Le evidenze riportate suggeriscono che la DNasi1L2 ha acquisito, fin dall'origine, una funzione specifica nella pelle dei vertebrati terrestri, che la distingue dalla DNasi1.

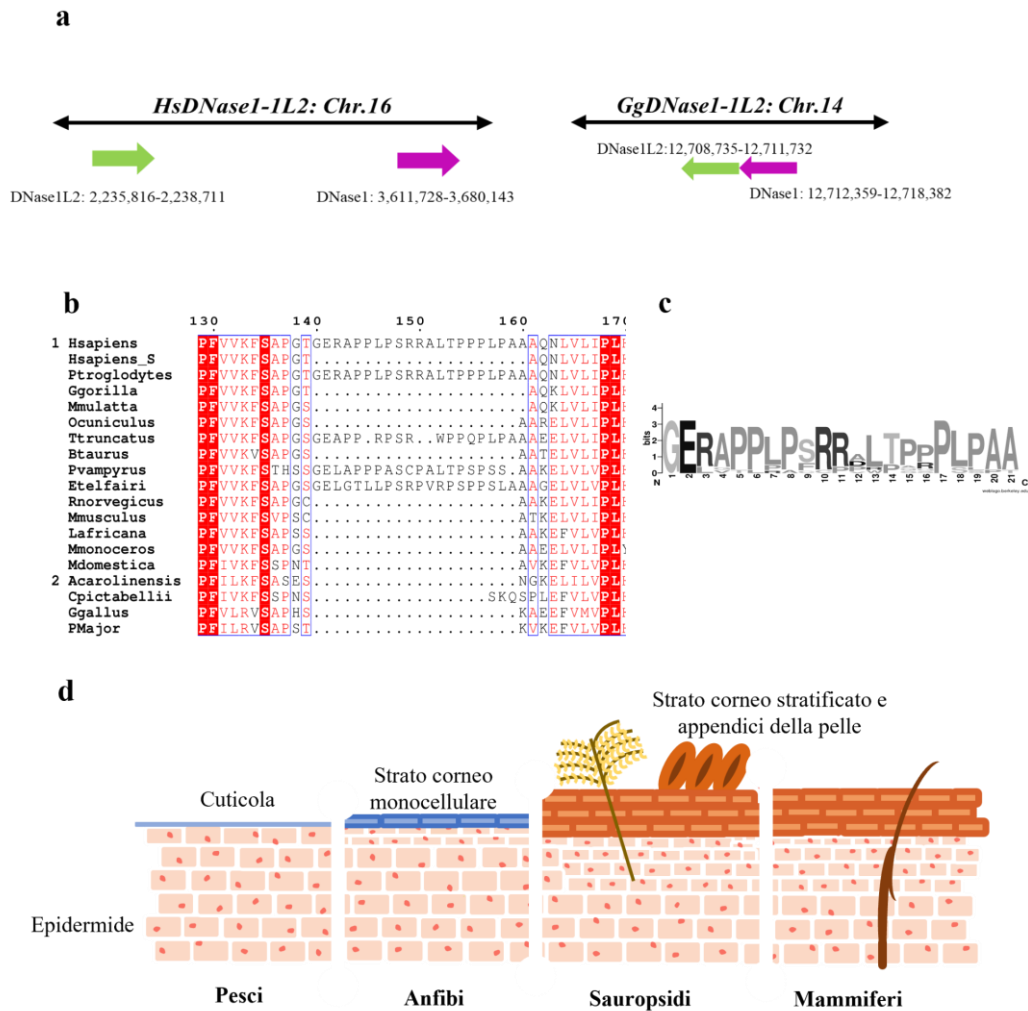


Figure 3: Origine della DNasi1L2. a) Organizzazione dei geni *DNasi1* e *DNasi1L2* sul cromosoma 16 di *Homo sapiens* e sul cromosoma 14 di *Gallus gallus*. b) Porzione di allineamento multiplio di sequenze di DNasi1L2 di mammiferi e sauropsidi, per individuare la presenza e conservazione del “Proline Rich Domain” (PRD). L’allineamento completo è mostrato in Fig.S2. c) Grafico di frequenza del PRD che mostra la forte conservazione dei residui tra le sequenze che lo contengono. d) Illustrazione schematica che mostra gli strati di epidermide dei vertebrati.

2.5 Origine degli ortogruppi DNasi1L1/3/4 nei vertebrati

Il cluster DNasi1L1/1L1-2/1L3/1L4 dell’albero (Fig.1a; Fig.S1a) è ben supportato dall’analisi di bootstrap, nonostante le ramificazioni interne siano incerte; L’albero suggerisce una vicinanza maggiore tra le sequenze di DNasi1L3 e DNasi1L4 rispetto alle sequenze di DNasi1L1/1L1-2. La conservazione di una porzione extra al C-terminale in alcuni di questi gruppi di DNasi ha permesso di capire meglio l’origine e la diversificazione delle DNasi1L1, 1L1-2, 1L3 e 1L4, (Fig.1a; Fig.S1a; Fig.4a).

Le sequenze di DNasi1L1 dei mammiferi avevano mostrato una forte conservazione di un tratto idrofobico nella regione C-terminale corrispondente a un segnale di attacco del glicosilfosfatidilinositolo (GPI). L’ancoraggio della GPI conferisce all’enzima la capacità di rimanere legato alla membrana fungendo da barriera per il trasferimento endocitosi-mediato del DNA²⁹. La predizione del segnale di attacco del GPI sul set di sequenze DNasi1L1 e 1L1-2 incluse nello studio, mostra la presenza del segnale nelle sequenze delle DNasi1L1, e la sua assenza nelle sequenze delle

DNasi1L1-2 (Fig.4b). Tra le DNasi1L1 fa eccezione la sequenza di *P.marinus*, supportando l'ipotesi che possa essere una DNasi1L1-2.

Questa caratteristica ha permesso di distinguere le DNasi1L1 dal gruppo paralogo delle DNasi1L1-2 (Fig.4b).

Le caratteristiche di sequenza delle due DNasi paraloghe e la loro distribuzione negli organismi suggeriscono che il gene *DNasi1L1* abbia avuto origine nei pesci ossei circa 400 Mya fa per duplicazione in tandem del gene *DNasi1L1-2*. L'Analisi di localizzazione genica nei genomi dei pesci ha permesso di evidenziare la presenza di questi due geni paraloghi in tandem solo in *Lepisosteus oculatus*, indicando che la separazione dei due geni possa essere avvenuta in maniera indipendente nei teleostei e nell'antenato dei Sarcopterygii (Fig.4d).

Tutte le sequenze delle DNasi1L3 dei vertebrati mostrano una forte conservazione di un dominio basico (BD), carico positivamente al C-terminale (Fig.4a). Studi sulla DNasi1L3 umana hanno dimostrato che il BD forma un' alfa elica che permette all'enzima di degradare DNA nucleosomico e DNA associato a microparticelle derivanti da processi apoptotici ⁴⁰. Il dominio basico risulta essere presente anche nelle DNasi1L4/1L4-2 con l'eccezione di alcune DNasi1L4 (Fig.4b) rafforzando l'ipotesi di una relazione evolutiva tra i due geni. Questo suggerisce una possibile attività di degradazione del DNA associato a microparticelle anche per le DNasi1L4/1L4-2.

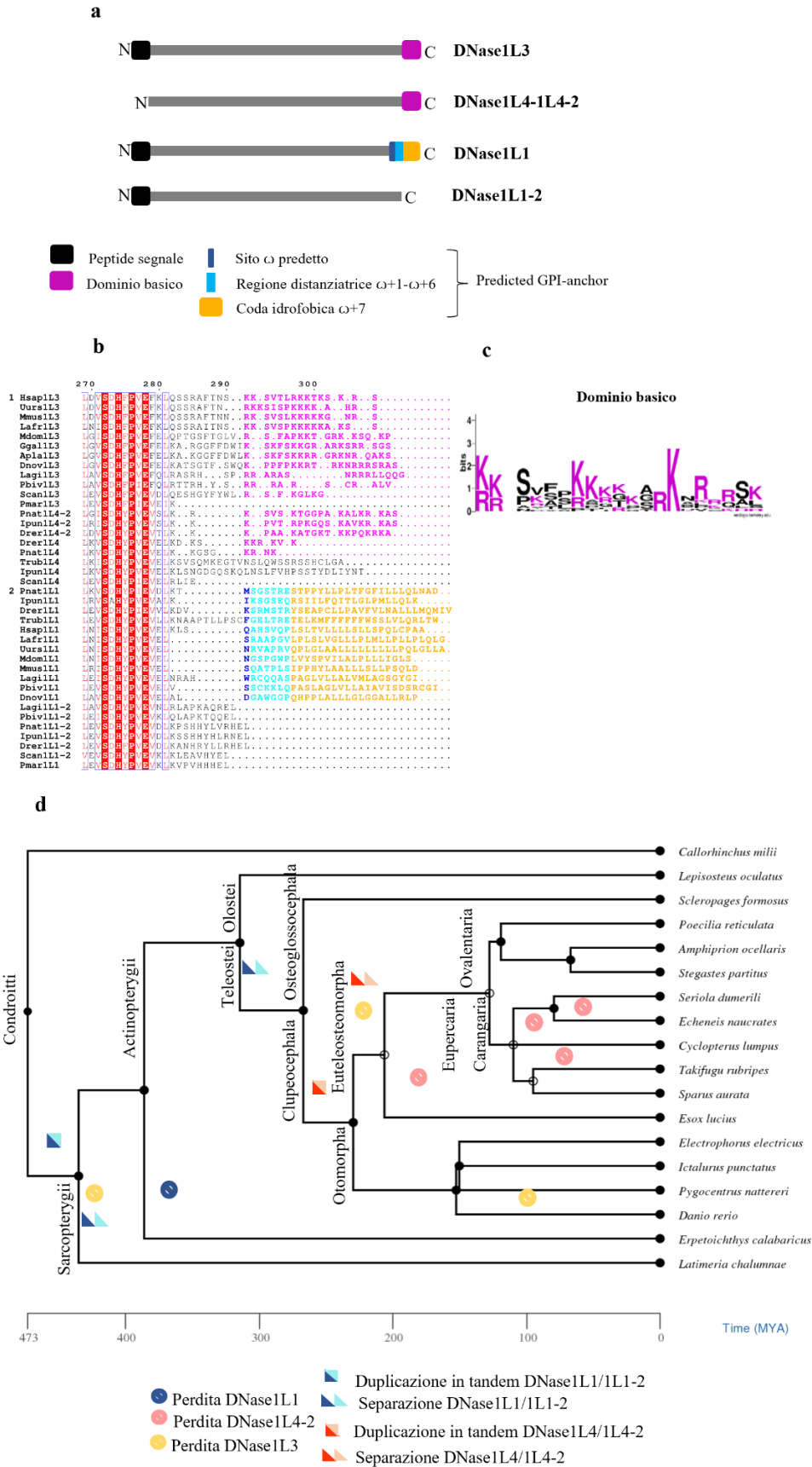


Figura 4: Origine e classificazione del clade delle DNasi1L1-1L3-1L4. a) Rappresentazione grafica delle sequenze primarie delle DNasi1L1, DNasi1L1-2, DNasi1L3, DNasi1L4 e DNasi1L4-2 dei vertebrati. b) Porzione di allineamento multiplo delle sequenze delle DNasi1L1, DNasi1L1-2, DNasi1L3, DNasi1L4 e DNasi1L4-2 dei vertebrati, che mostra le differenze all'estremità C-terminale dei quattro sottogruppi. L'allineamento è stato modificato manualmente per evidenziare al meglio la conservazione del dominio basico tra DNasi1L3 e DNasi1L4 e mettere in evidenza la GPI predetta tra le DNasi1L1. Gli amminoacidi colorati in rosa indicano i residui basici, in blu il sito ω predetto, in celeste la regione distanziatrice (da $\omega+1$ a $\omega+6$), e in arancio la coda idrofobica (fino a $\omega+7$). L'allineamento completo è mostrato in figura S4. c) Grafico di frequenza dell'allineamento del dominio basico di 17 sequenze di DNasi1L3, 1L4 e 1L4-2 di vertebrati. d) Cronogramma della filogenesi di gnatostomi derivato da Timetree. Sui rami sono mappate le duplicazioni in tandem della DNasi1L1-2 (1L1-2 - 1L1) e DNasi1L4 (1L4 - 1L4-2) e separazione successive, la perdita di 1L1, 1L4-2, 1L3.

2.6 Origine e conservazione della DNasi2 nei vertebrati

Per comprendere l'origine e l'evoluzione della famiglia della DNasi2 è stata eseguita un'analisi di sintenia. Il gene della DNasi2b è divergente rispetto al gene *Uox* con il quale condivide un promotore bidirezionale. Questa disposizione dei geni della DNasi2b e *Uox* è stata osservata in quasi tutti i cordati e anche negli invertebrati inclusi nello studio, che comprendono emicordati (i.e. *Saccoglossus kowalevskii*) e brachiopodi (i.e. *Lingula anatina*), suggerendo che la sintenia tra i due geni potrebbe aver avuto origine prima della divisione tra protostomi e deuterostomi (Fig.5a). Ciò fa supporre che la DNasi2b sia l'antenato della famiglia delle DNasi2, di conseguenza le sequenze di invertebrati sono state classificate come DNasi2b.

Per la ricostruzione filogenetica è stato utilizzato un set di 86 sequenze che comprendono le DNasi2b e DNasi2 di vertebrati, e DNasi2b di invertebrati. Come per le DNasi1, le sequenze delle DNasi2 selezionate sono state allineate mediante ClustalX e utilizzate per costruire un albero di massima verosimiglianza (Fig.5b; Fig.S5). Le sequenze degli invertebrati sono state utilizzate come outgroup per l'inserimento della radice. L'albero mostra una evidente separazione in tre ramificazioni, il primo clade basale include le sequenze delle DNasi2b degli invertebrati ed è fortemente supportato dall'analisi di bootstrap, mentre gli altri gruppi all'interno dei vertebrati (DNasi2 e 2b) risultano essere monofiletici e con valori di bootstrap bassi nel clade della DNasi2 (Fig.5b; Fig.S5).

Le sequenze delle DNasi2b dei vertebrati si separano dalla sequenza del vertebrato ancestrale con un braccio più lungo rispetto alle sequenze delle DNasi2 e mostrano un raggruppamento con un alto valore di bootstrap, questo fa supporre che nelle DNasi2b il tasso evolutivo potrebbe essere più veloce. Tra le DNasi2 la sequenza della lampreda di mare si trova nel cluster dei pesci ossei e ciò suggerisce che la famiglia delle DNasi2 si sia originata prima della separazione tra agnati e gnatostomi, mentre la DNasi2b è stata persa negli agnati e mantenuta negli gnatostomi.

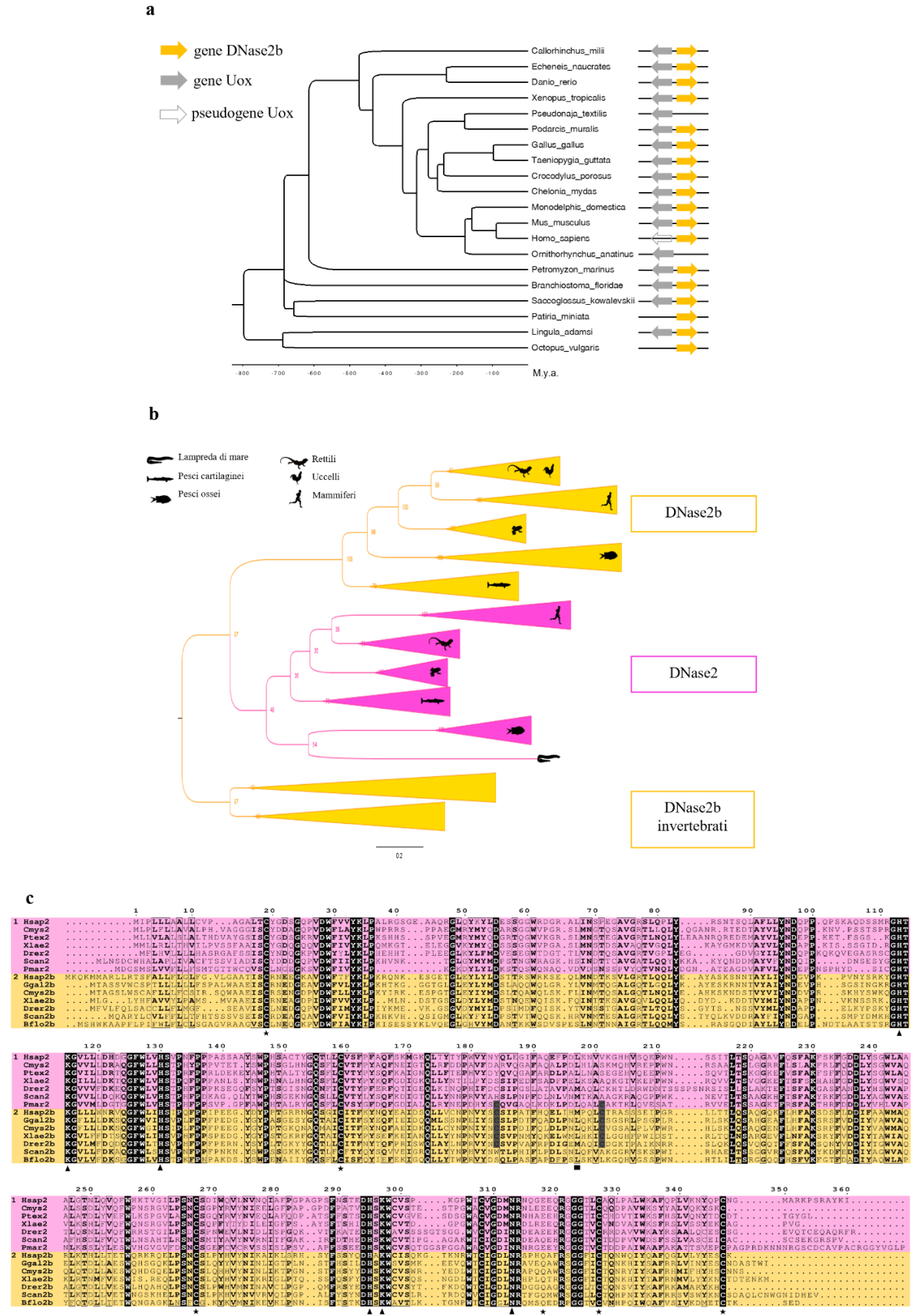


Figura 5. Origine e conservazione della famiglia delle DNase2 nei vertebrati. a) Cronogramma di filogenesi di metazoi derivato da Timetree. Le specie, *Lingula adamsi* e *Octopus vulgaris* sono state

utilizzate al posto di *Lingula anatina* e *Octopus sinensis*, rispettivamente. Ai nodi terminali viene rappresentata l'organizzazione genomica del locus DNasi2b nelle diverse specie, mostrando un'ampia conservazione della sintenia Uox-DNasi2b. Le specie che mostrano solo uno dei due geni rappresentano delle eccezioni. b) Albero filogenetico di massima verosimiglianza di 86 proteine della famiglia DNasi2. L'albero è mostrato con i rami collassati in sottogruppi che rappresentano la DNasi2 e DNasi2b nei diversi gruppi di organismi. Le sequenze di invertebrati sono state usate come radice dell'albero. I valori di bootstrap, su 100 ripetizioni, sono mostrati ai nodi interni. Scala bar, sostituzione/sito. L'albero completo è mostrato in Fig.S5. c) Allineamento multiplo di 14 sequenze della famiglia delle DNasi2 da specie rappresentative. I residui catalitici dei domini PLD sono indicati con triangoli; le coppie di cisteine conservate che formano legami disolfuro sono indicate con la stella, e la coppia di cisteine conservata solo in DNasi2b è evidenziata in grigio; la prima metionina di DNasi2b-S è indicata con un quadrato.

2.7 Analisi di sequenza e di struttura della famiglia delle DNasi2 umane

La DNasi2 e la DNasi2b mostrano una notevole identità in sequenza e in struttura; entrambe le proteine sono costituite da due domini PLD (PLD1 e PLD2), caratteristici della famiglia delle fosfolipasi D. Un tratto distintivo della famiglia di enzimi PLD è la presenza di un sito attivo pseudo-simmetrico costituito da due motivi "HxK" ⁵⁷. Nei modelli strutturali della DNasi2 e DNasi2b ottenuti con AlphaFold, si osserva la conservazione del sito attivo con i residui (H,K,H/N) che costituiscono la triade catalitica (Fig.5b).

La sequenza della DNasi2 umana presenta quattro siti di N-glicosilazione e un segnale di secrezione all'N-terminale, per l'indirizzamento lisosomiale ⁴⁵. La sequenza del peptide segnale all'N-terminale risulta conservata in tutta la famiglia delle DNasi2. La predizione dei siti N-glicosilati con NetGly, sulla sequenza della DNasi2b umana, mostra quattro siti di glicosilazione (N81, N103, N119, N278) (Fig.6a). Le due sequenze di DNasi2 e DNasi2b hanno quindi in comune un solo sito, N266/N278, che si trova nel dominio PLD2; a differenza della DNasi2, nella DNasi2b i siti predetti si trovano per la maggior parte nel dominio PLD1. La conservazione del peptide segnale all'N-terminale e dei siti N-glicosilati in tutte le sequenze delle DNasi2 e DNasi2b dei vertebrati suggerisce che la localizzazione lisosomiale, che è stata dimostrata per la DNasi2, può essere attribuita anche alla DNasi2b.

Nella famiglia delle DNasi2 risultano conservate tre coppie di cisteine, coinvolte probabilmente nella formazione di ponti disolfuro. Le sequenze di DNasi2b mostrano la conservazione di una quarta coppia di cisteine (C196 e C212). Questa coppia è conservata anche nelle sequenze della DNasi2 della lampreda di mare e dei pesci ossei, in accordo con la loro posizione filogenetica basale all'interno del cluster delle DNasi2 (Fig.5b; Fig.S5). Le cisteine C196 e C212 non risultano conservate nelle sequenze della DNasi2b degli invertebrati e dell'anfiosso, suggerendo una probabile acquisizione del ponte disolfuro nei vertebrati.

L'analisi delle strutture mostra che due ponti disolfuro (C19/32-C159/171, C308/321-327/340) sono intra-dominio in entrambe le DNasi, mentre i residui C196-C213 legano i due domini PLD1 e PLD2 nella DNasi2b, stabilizzando molto probabilmente la struttura pseudo-dimerica (Fig.5c-d).

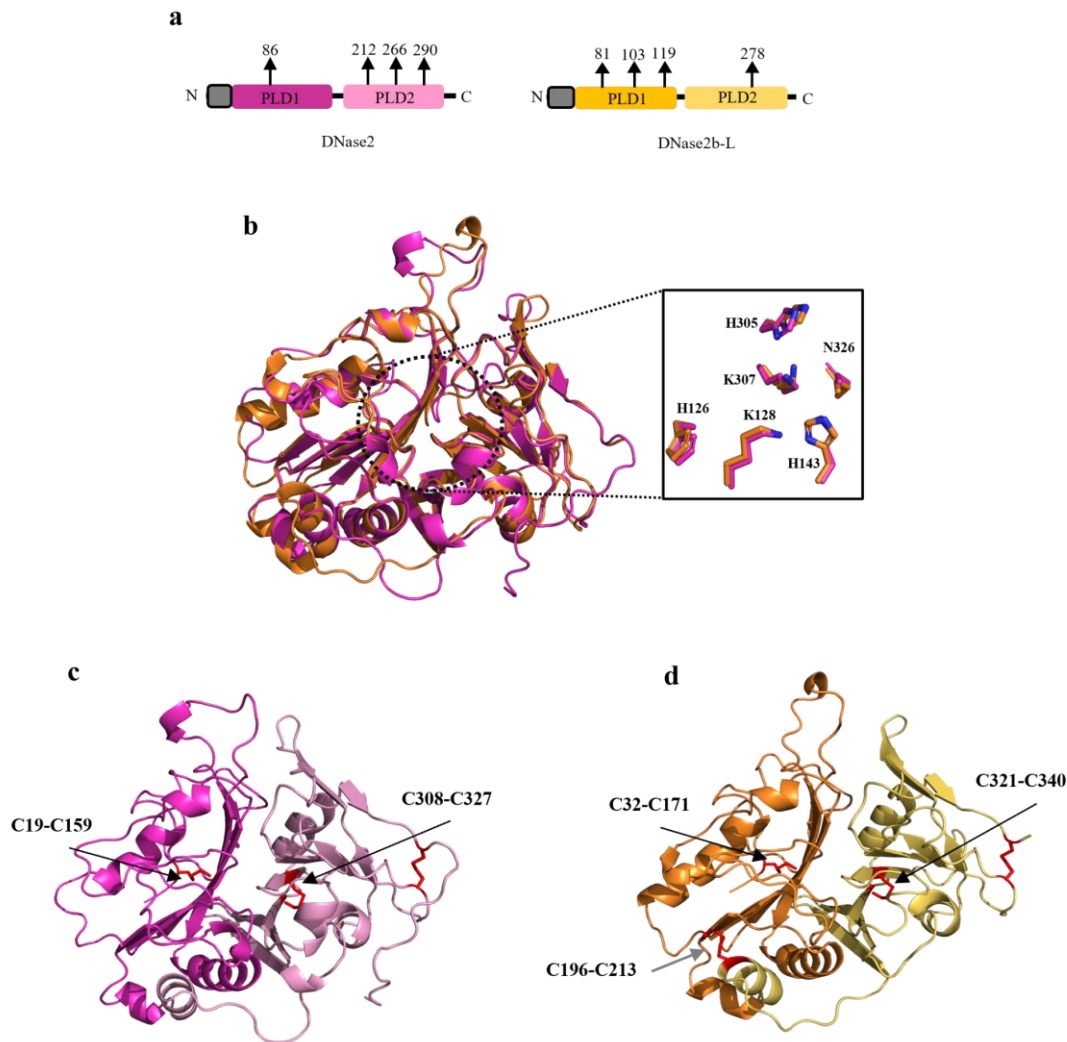


Figura 6: Omologie in struttura nella famiglia delle DNasi2. a) Rappresentazione grafica delle sequenze primarie della DNasi2 e DNasi2b umana, con indicazione dei siti N-glicosilati. b) Sovrapposizione dei modelli di struttura della DNasi2 (magenta) e DNasi2b (arancio) umana, che mostra la conservazione dei residui della triade catalitica indicati come stick. Modello di struttura della DNasi2 (c) e DNasi2b (d) che mostra i ponti disolfuro conservati, indicati in stick rossi. I residui di cisteina indicati dalle frecce nere sono coinvolti nella formazione di ponti intra-catena. Tutte le strutture sono mostrate in cartoon e i domini PLD1 e PLD2 all’N- e C-terminale, rispettivamente, sono evidenziati con due tonalità diverse.

2.8 Origine dell’isoforma corta della DNasi2b

Il gene *DNasi2b* condivide un promotore bidirezionale con l’urato ossidasi (*Uox*), gene che è stato inattivato durante l’evoluzione delle scimmie antropomorfe. Nell’uomo, la perdita dell’associazione tra *DNasi2b* e *Uox* è stata correlata con lo spostamento dell’espressione del gene *DNasi2b* dal fegato, tessuto in cui è maggiormente espresso *Uox*, ai polmoni⁶². Inoltre, è stata identificata un’isoforma del gene *DNasi2b* più corta (DNase2b-S) che si origina a partire da un sito di trascrizione alternativo situato all’interno del secondo introne del gene⁶².

Osservando e analizzando i dati di RNA-seq, presenti nel database NCBI, è stata confermata la presenza del trascritto del gene *DNasi2b* nel fegato dei mammiferi, (es. *Mus musculus*), che è correlata alla presenza del trascritto del gene *Uox* (Fig.S6c). Inoltre, è stata riscontrata la presenza dell’isoforma corta

del gene *DNase2b* nei primati e in altri mammiferi non primati, ma non nel topo (Fig.S6a-b). Dall'analisi delle sequenze delle DNasi2 e 2b è emerso che le DNasi2b dei mammiferi placentati, con l'eccezione di alcuni roditori, mostrano un residuo di metionina (M209 nella sequenza di uomo) conservato, che corrisponde al primo amminoacido della DNasi2b-S (Fig. 7).

Quindi, la presenza del trascritto corto del gene *DNasi2b* e la conservazione della prima metionina della DNasi2b-S nelle sequenze dei mammiferi placentati suggerisce che l'isoforma corta ha avuto origine in questo gruppo di organismi, e sia stata probabilmente persa nei roditori.

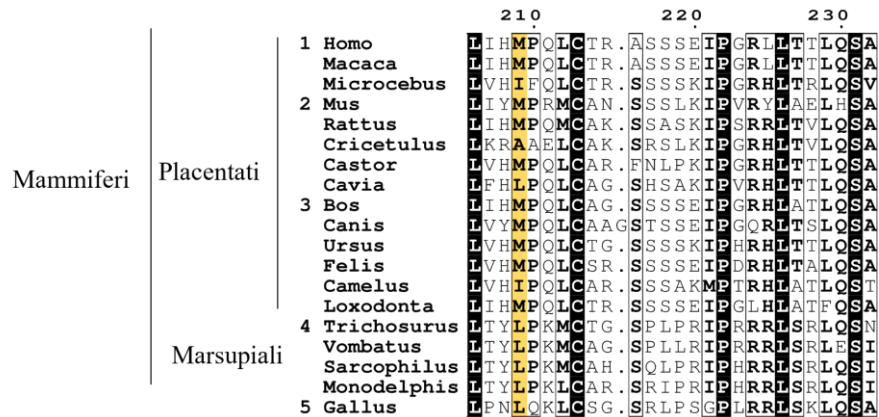


Figura 7: Porzione di allineamento delle sequenze di DNasi2b di mammiferi. L'allineamento mostra la conservazione della prima metionina (M209) del trascritto corto della DNasi2b nei mammiferi placentati, evidenziata in arancio. Le sequenze sono raggruppate in primati gruppo 1, 2 roditori, 3 placentati vari, 4 marsupiali e 5 sauropsidi. L'allineamento completo è mostrato in figura S7.

Conclusione

La ricostruzione filogenetica della famiglia delle DNasi1 e DNasi2, l'analisi degli allineamenti multipli e l'analisi di sintenia hanno permesso di rivelare l'origine e l'evoluzione delle due famiglie nei vertebrati.

Sono stati individuati sette ortogruppi appartenenti alla famiglia delle DNasi1: DNasi1, DNasi1L1, DNasi1L2 e DNasi1L3 che sono presenti nell'uomo e nella maggior parte dei vertebrati; DNasi1L1-2 e DNasi1L4 che sono stati individuati nei pesci e negli anfibi; DNasi1L4-2 che si trova solo nei pesci ossei. La famiglia delle DNasi2 presenta due ortogruppi che si trovano entrambi nell'uomo e nella maggior parte dei vertebrati. La storia evolutiva di entrambe le famiglie è stata ricostruita ripercorrendo l'acquisizione e la perdita dei diversi geni nei vertebrati. La presenza della DNasi1 e DNasi2b nei metazoi basali, permette di datare la loro comparsa già circa 700 Mya fa (Fig.8). La posizione ancestrale della DNasi2b, all'interno della famiglia, è stata determinata dall'analisi di sintenia tra i geni *DNasi2b* e *Uox*, in quanto l'associazione dei due geni si è stabilita prima della comparsa della DNasi2. Il gene *DNasi2* ha avuto origine nei vertebrati.

Numerosi eventi di espansione delle due famiglie geniche si sono succeduti durante l'evoluzione dei vertebrati. Le prime duplicazioni geniche avvenute circa 650 Mya fa, prima della separazione tra agnati e gnatostomi, hanno determinato l'origine dei geni *DNasi1L3*, *DNasi1L1-2* e *DNasi2*. L'espansione della famiglia delle DNasi1, dopo la divergenza tra agnati e gnatostomi è proseguita con l'origine dei geni *DNasi1L1* e *DNasi1L4*, che può essere datata tra 600 e 500 Mya fa. Gli altri membri della famiglia delle DNasi1 hanno avuto origine per duplicazione genica in tandem: *DNasi1L1* ha avuto origine per duplicazione di *DNasi1L1-2* nei vertebrati ossei (T1L1), *DNasi1L2* ha avuto origine per duplicazione di *DNasi1* negli amnioti (T1L2) e *DNasi1L4-2* ha avuto origine per duplicazione di *DNasi1L4* nei pesci ossei (T1L4) (Fig.8).

Nel corso dell'evoluzione, alcuni di questi geni sono stati persi in alcuni gruppi di organismi. *DNasi1L1* è stato perso nella maggior parte degli uccelli; *DNasi1L1-2* è stato perso in tutti gli uccelli e nei mammiferi placentati; *DNasi1L3* è stato perso nella maggior parte dei pesci ossei; *DNasi1L4* è stato perso negli amnioti; *DNasi2b* è stato perso negli agnati, nei serpenti e nei mammiferi monotremi; *DNasi2* è stato perso negli uccelli.

Dopo aver ricostruito lo scenario evolutivo delle due famiglie, e identificato le caratteristiche strutturali che distinguono i vari membri, è stato possibile chiarire alcuni aspetti della funzione delle diverse DNasi anche in relazione al pattern di espressione osservato nei dati di RNA-seq.

Nell'uomo, sono presenti due DNasi extracellulari che si ritrovano nel circolo sanguigno, la DNasi1 e DNasi1L3. In accordo con i dati di RNA-seq (Fig.9), la DNasi1 è abbondante nell'intestino, ma viene rilevata in diversi organi, mentre la DNasi1L3 è abbondante nel fegato e nella milza. Inizialmente, nei mammiferi la DNasi1 era stata riscontrata solo nel sistema digerente, e per questo è considerata un enzima principalmente implicato nella digestione; in seguito, è stata dimostrata anche un'attività di degradazione del DNA derivato da processi apoptotici e necrotici. La DNasi1L2 ha assunto un ruolo diverso dalla DNasi1. I dati di RNA-seq mostrano che viene prodotta principalmente nella pelle dei vertebrati terrestri (Fig.9).

La DNasi1L2 ha un'attività ottimale a pH acido (5.5) che corrisponde proprio al pH della pelle. Gli amnioti possiedono, a livello della pelle, un multistrato esterno, chiamato strato corneo, con appendici cutanee annesse, che funge da barriera protettiva e si è originato in seguito alla conquista dell'ambiente terrestre. Studi in vivo hanno dimostrato che la DNasi1L2 svolge un ruolo essenziale nella maturazione dello strato corneo^{34 35}. Sulla base delle analisi filogenetiche, si può quindi ipotizzare che l'origine del gene *DNasi1L2* sia stata funzionale per l'adattamento degli amnioti alla vita sulla terra.

L'evoluzione delle DNasi1L1/1L3/1L4 è correlata alla diversificazione delle sequenze amminoacidiche nelle regioni N- e C-terminali, che ha portato ad una differenziazione funzionale delle proteine. Il dominio basico al C-terminale è un tratto distintivo della sequenza della DNasi1L3, che conferisce all'enzima la capacità di degradare il DNA associato a microparticelle; queste derivano da un processo di turnover delle cellule mieloidi e sono state rilevate in abbondanza nel plasma dell'uomo e del topo, dove il gene *DNasi1L3* è principalmente espresso⁴⁰. L'assenza del dominio basico nella sequenza della DNase1L3 della lampreda fa supporre che questa caratteristica sia emersa negli gnatostomi. La presenza dello stesso dominio nelle sequenze delle DNasi1L4 e DNasi1L4-2 suggerisce un'attività simile in queste due proteine (Fig.4a-b). Le DNasi1L4/1L4-2 differiscono però dalla DNasi1L3 per l'assenza del segnale di secrezione all'N-terminale della sequenza amminoacidica, e questo potrebbe indicare un loro ruolo intra-cellulare. Il segnale idrofobico all'estremità C-terminale della sequenza della DNasi1L1 permette alla proteina l'ancoraggio in membrana tramite GPI. Questa caratteristica è conservata in tutte le sequenze di DNasi1L1 dei vertebrati e conferisce all'enzima la capacità di inibire il trasferimento di DNA dall'esterno all'interno della cellula. La DNasi1L1 è abbondante nei tessuti muscolari scheletrici e cardiaci, ma, come dimostrano i dati di RNA-seq, è prodotta anche in numerosi altri tessuti del corpo umano (Fig.9). Le sequenze della DNasi1L1-2 dei vertebrati non mostrano alcun dominio distintivo al C-terminale. Questa proteina, che è stata persa negli uccelli e nei mammiferi, è stata studiata nei pesci (*Danio rerio*) e sembra avere un ruolo nella degradazione del DNA nucleare durante lo sviluppo del cristallino^{87 99}.

La DNasi2 è prodotta in quasi tutti i tessuti umani e svolge un ruolo chiave nella degradazione lisosomiale del DNA derivante da fagocitosi. È inoltre essenziale nel processo di eritropoiesi poiché è responsabile della degradazione del DNA nucleare durante la maturazione degli eritrociti (anucleati)⁸³. Questo ruolo è stato acquisito molto probabilmente nei mammiferi, perché gli eritrociti maturi dei vertebrati non-mammiferi sono nucleati.

Il gene *DNasi2b* condivide un promotore bidirezionale con il gene *Uox* e pertanto i due geni sono co-espressi nel fegato dei mammiferi non-primati. Nell'uomo e negli altri primati, la pseudogenizzazione di *Uox* ha portato alla perdita dell'espressione epatica del gene *DNasi2b*. Nell'uomo è stata inoltre identificata un'isoforma corta che è prodotta a partire da un sito di trascrizione alternativo all'interno del secondo introne del gene. Dall'analisi dei dati di RNA-seq è stata confermata la presenza dell'isoforma corta nell'uomo, in particolare nelle ghiandole salivari e nei polmoni. L'isoforma corta è stata osservata anche in altri mammiferi non primati, escludendo la possibilità che abbia avuto origine a seguito della pseudogenizzazione di *Uox*. Un'ulteriore evidenza a supporto dell'origine dell'isoforma short prima della differenziazione dei primati è la conservazione della prima metionina della proteina corrispondente, DNasi2b-S, nelle sequenze di DNasi2b dei mammiferi placentati. Si può quindi ipotizzare che l'isoforma corta abbia avuto origine in questo gruppo di organismi.

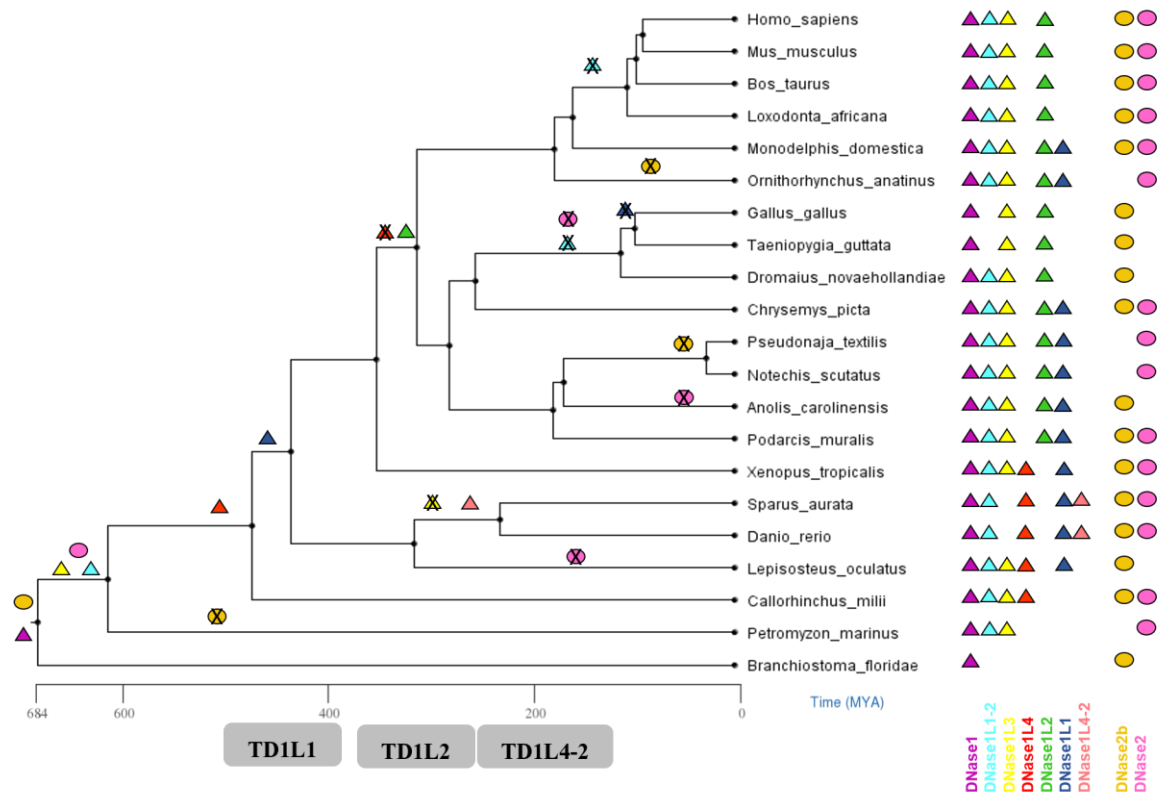


Figura 8: Storia evolutiva della famiglia delle DNase1 e DNase2. 21 specie di cordati sono state scelte per ripercorrere l'evoluzione delle due famiglie, le specie sono indicate sui nodi terminali, sui rami è indicata l'acquisizione (triangoli, DNase1; cerchi, DNase2) o perdita dei geni (triangoli barrati, DNase1; cerchi barrati, DNase2). Le relazioni filogenetiche e i tempi di divergenza sono state ricostruite con Timetree.

Sample	DNase1		DNase1L1		DNase1L2		DNase1L3		DNase2		DNase2b	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Adrenal gland	0.62	2	1	4	0.04	0.23	5	15	0	9	0.03	0.02
Brain	0.82	2	0.54	2	0.27	0.6	0.05	0.04	1	8	0.01	0.04
Heart	0.8	2	2.82	7	0.02	0.04	0.33	4	1	7	0	0.01
Kidney	2	5	2	5	0.06	0.42	2	14	2	7.77	0	0.03
Liver	0.67	1	0.42	2	0.01	0.08	32.14	62	3	9	0.01	0.09
Lung	0.58	2	2	6	0.01	0.16	1	9	5	17	0.36	0.45
Pancreas	N.A.	3	N.A.	0.65	N.A.	0.1	N.A.	0.11	N.A.	4	N.A.	0.04
Placenta	0.54	2	0.87	5	0.11	0.44	0.69	3	1	10	0	0.02
Prostate	1.22	3	1	4	0.08	0.35	0.31	0.81	3	13	0.4	1
Salivary gland	0.44	1	0.6	2	0.09	0.13	0.16	0.39	2	6.24	5	19
Skeletal muscle	0.94	N.A.	5	N.A.	0.13	N.A.	0.07	N.A.	1	N.A.	0.04	N.A.
Skin	N.A.	2	N.A.	2	N.A.	3	N.A.	2	N.A.	8.68	N.A.	0
Small intestine	4	11.6	0.92	4	0.03	0.15	5	20	2	6	0.01	0.03
Spleen	0.54	2	0.91	7	0.05	0.36	26	118	1	10	0.02	0.05
Stomach	0.81	2	0.75	4	0.08	0.22	1	2	2	11	0.02	0.03
Testis	N.A.	3	N.A.	2	N.A.	0.28	N.A.	2.39	N.A.	4	N.A.	0.11
Thymus	2	N.A.	0.62	N.A.	0.31	N.A.	3.56	N.A.	2	N.A.	0	N.A.
Thyroid	0.74	2	1	6.61	0.16	0.47	1	5	4	23	0.43	0.03
Trachea	0.38	N.A.	0.57	N.A.	0.03	N.A.	0.47	N.A.	2	N.A.	0.05	N.A.
Uterus	0.64	N.A.	0.69	N.A.	0.02	N.A.	0.19	N.A.	2	N.A.	0	N.A.

RPKM: reads per kilobase per million reads placed

A: RNA-seq su totale RNA da 20 tessuti umani

B: HPA RNA-seq tessuti normali

Figura 9: Profilo di espressione genica della famiglia delle DNasi1 e DNasi2 umane. I dati di RNA-seq derivano da due set di esperimenti diversi indicati nella legenda e scaricati dal database NCBI e mostrano il pattern di espressione delle DNasi1 e DNasi2.

Metodi

4.1 Recupero bioinformatico delle sequenze

Per comprendere lo stato evolutivo delle DNasi 1 e DNasi 2 nei vertebrati, sono state ricercate tutte le putative sequenze proteiche in diverse specie di metazoi per ogni famiglia. Le sequenze proteiche complete sono state estratte dal database Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La ricerca degli ortologhi e dei paraloghi è stata condotta in primo luogo nel database di Ensembl, ma non tutte le sequenze di DNasi dei vertebrati trovate risultavano corrette. Per migliorare la completezza delle nostre ricerche, i geni di *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, e *Danio rerio* sono stati utilizzati come query per ulteriori cicli di ricerche BLAST contro il genoma della stessa specie per trovare ulteriori geni DNasi. Le sequenze scaricate sono state verificate e dopo aver rimosso tutte quelle tronche o ridondanti, è stata corretta la nomenclatura genica rispetto al database delle proteine NCBI nr.

Le sequenze DNasi utilizzate per le analisi, la descrizione, la classificazione e i rispettivi numeri di adesione sono disponibili nella tabella supplementare S1 e S2.

4.2 Allineamento sequenze e analisi filogenetica

Le sequenze codificanti DNasi1 e DNasi2 raccolte sono 214 e 86, rispettivamente. Il set completo di sequenze è stato combinato in un file FASTA e caricato su ClustalX 2.1¹⁰⁰, programma di allineamento a sequenza multipla, utilizzato per eseguire tutti gli allineamenti delle sequenze di proteine. L'allineamento è stato generato utilizzando i parametri predefiniti. La risorsa online Esript¹⁰¹ è stata utilizzata per visualizzare e descrivere gli allineamenti di sequenza e incorporare informazioni sulla conservazione o diversità riscontrate.

L'allineamento del dominio ricco in proline delle sequenze delle DNasi1L2 dei mammiferi e dell'estremità C-terminale delle DNase1L1, 1L1-2, 1L3, 1L4 e 1L4-2 è stato perfezionato manualmente per meglio evidenziare la conservazione dei residui. L'albero evolutivo è stato dedotto dagli allineamenti multipli delle sequenze proteiche usando il metodo di massima verosimiglianza, la robustezza dell'analisi filogenetica è stata validata con il metodo bootstrap, con 100 repliche (100 campionamenti dai dati di sequenza). Gli alberi sono stati costruiti con il software PhyML¹⁰² e visualizzati e annotati con il programma Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Per riassumere i guadagni e le perdite geniche durante l'evoluzione delle due famiglie, sono state scelte 21 specie di cordati per ricostruire le relazioni filogenetiche ed i tempi di divergenza. Per la ricostruzione del cronogramma dei pesci sono state utilizzate 18 sequenze di gnatostomi. Timetree è stato utilizzato per costruire i cronogrammi¹⁰³.

Le sequenze di consenso del PRD delle DNasi1L2 e del C-terminale delle DNasi 1L1/1L1-2/1L3/1L4 sono state illustrate con Weblogo¹⁰⁴.

Per l'analisi del contesto genomico dei geni della DNasi1L2 e DNasi2b-Uox sono state utilizzate come riferimento le banche dati NCBI ed Ensembl.

I siti di N-glicosilazione sulla sequenza della DNasi2b umana sono stati predetti con il server NetNGlyc 1.0¹⁰⁵. PredGPI è stato utilizzato per la predizione del segnale di ancoraggio del GPI nelle sequenze delle DNase1L1 e 1L1-2⁹⁸.

4.3 Analisi strutturale

La struttura della DNasi1 umana è stata scaricata dalla banca dati delle proteine (PDB), mentre le strutture dei paraloghi sono state costruite con il server SWISS-MODEL¹⁰⁶ utilizzando l'omologia tra modelli, basato sulle strutture cristalline sperimentalmente determinate della proteina omologa DNasi1 e recuperate da PDB (ID 1ATN, 4AWN e 3W3D). I modelli di struttura tridimensionali della DNasi2 e DNasi2b umana sono stati generati con il programma di intelligenza artificiale Alphafold, che determina il fold della proteina sulla base della sequenza amminoacidica^{107 108}.

Gli allineamenti di struttura sono stati eseguiti usando il sistema di grafica molecolare Pymol V.2.2 (Schrödinger, LLC) (<http://www.pymol.org>) basato sull'ottimizzazione della deviazione quadratica media (RMSD), ovvero sulla misura della distanza media tra gli atomi della spina dorsale delle proteine sovrapposte e sull'allineamento di sequenza.

Tutte le figure raffiguranti modelli 3D sono state generate utilizzando il sistema di grafica molecolare Pymol V.2.2 (Schrödinger, LLC) (<http://www.pymol.org>).

4.4 Analisi espressione (RNA-seq)

I dati RNA-seq riportati in questo studio sono stati scaricati dal database NCBI e comprendono due diversi set di esperimenti, per poter includere più distretti possibili. L'espressione RNA-seq è stata osservata e analizzata in 20 tessuti, i dati sono stati analizzati e scaricati dalla collezione del sequenziamento dell'RNA totale da 20 tessuti umani e dalla collezione di dati di RNA-seq ottenute da campioni di tessuti di 95 individui umani che rappresentano 27 diversi tessuti, al fine di determinare la specificità dei tessuti di tutti i geni di codifica delle proteine. I dati raccolti sono calcolati dagli allineamenti RNA-seq rispetto ai più recenti modelli genici di Refseq sul genoma di riferimento, e poi normalizzati da RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads).

Capitolo 2

Caratterizzazione biochimica della DNasi1L2 umana a scopo terapeutico

Introduzione

1. Fibrosi cistica

1.1 Difetti e mutazioni di *CFTR*

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica, causata da mutazioni nel gene del regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), il più comune disturbo ereditario autosomico recessivo con limitazione della vita nelle persone caucasiche. Il gene *CFTR* codifica per un canale anionico espresso nelle cellule epiteliali di molti organi in cui trasporta ioni cloro attraverso la membrana apicale; il canale modula l'attività di altri canali ionici, principalmente del sodio, e quindi il passaggio dell'acqua attraverso la barriera epiteliale; infine, il canale trasporta bicarbonato che è cruciale per la regolazione del pH, la difesa dell'ospite e la protezione contro gli agenti nocivi^{109 110 111}. CFTR è una glicoproteina appartenente alla superfamiglia delle proteine trasportatrici ABC (ABC = ATP-Binding Cassette), costituita da due domini transmembrana (MSD), due domini per il legame dell'ATP (NBD) e un dominio di regolazione citoplasmatico (R) (Fig.7). L'attivazione di CFTR avviene in seguito a fosforilazione del dominio R che induce un cambiamento conformazionale dei domini MSD, favorendo l'associazione dell'ATP. La successiva idrolisi di una delle due molecole di ATP in ADP e Pi determina la chiusura del canale. Inoltre, l'apertura/chiusura del canale può essere regolata anche attraverso la fosforilazione di serine presenti nel dominio di regolazione^{111 112}.

Le proteine appartenenti a questa superfamiglia in genere utilizzano l'idrolisi dell'ATP per trasportare i substrati contro gradiente di concentrazione. CFTR è l'unica proteina ABC che funziona come canale ionico per il cloruro^{111 113 114}.

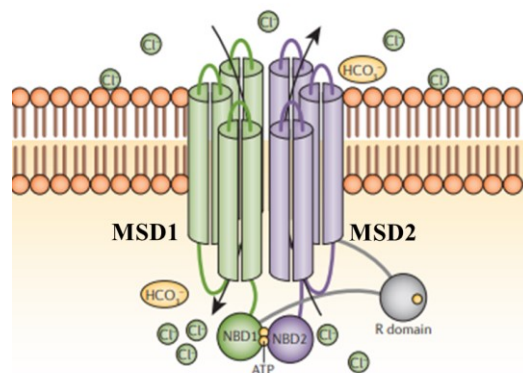


Figura 7: Struttura del canale cloro. La proteina CFTR è costituita da due domini di legame per i nucleotidi (NBD1 e NBD2) e due domini transmembrana (MSD1 e MSD2), ognuno composto da sei regioni che attraversano la membrana, e il dominio regolatore (R). Il canale si apre quando il suo dominio R è fosforilato dalla proteina chinasi A e quando ATP è vincolato alle NBD. (Modificato da *Cystic fibrosis*, F. Ratjen 2015)

Le mutazioni che colpiscono il gene *CFTR* sono varie e sono state raggruppate in sette classi in base alle conseguenze funzionali che determinano la gravità della malattia. La classe I è caratterizzata da

mutazioni che portano ad una sintesi difettosa della proteina CFTR mediante l’inserimento prematuro di un codone di stop. Le mutazioni di classe II inibiscono la traslocazione della proteina sulla superficie cellulare. Le mutazioni di classe III causano un “gating” difettoso del canale. Quelle di classe IV alterano la conduttanza del canale ed il conseguente passaggio degli ioni. Nelle mutazioni di classe V vi è una ridotta sintesi della proteina dovuta a difetti di splicing, mentre nelle mutazioni di classe VI vi è una ridotta stabilità della proteina che risulta facilmente degradabile. Infine, la classe VII è caratterizzata da altre mutazioni, tra cui per esempio mutazioni di frameshift con conseguenti alterazioni di lunghi tratti di polipeptide ^{115 116}.

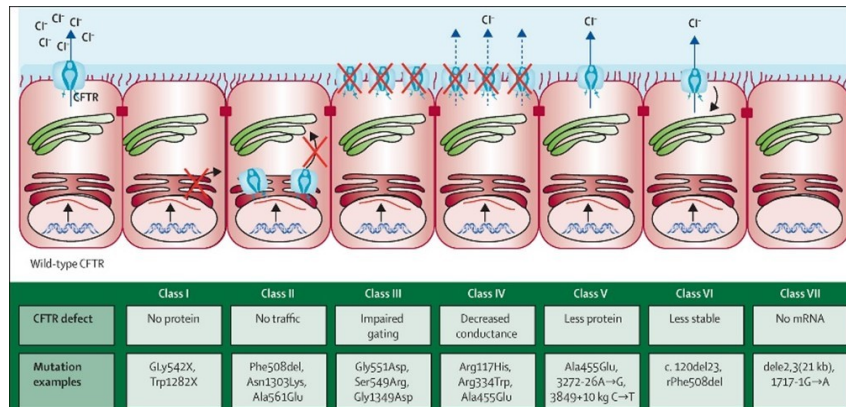


Figura 8: Classificazione mutazioni CFTR. Le mutazioni CFTR aggiornate sono state raggruppate in sette classi funzionali. (Modificato da *Acta Paediatrica*, K. De Boeck, 2020)

La mutazione CFTR più comune tra i pazienti affetti da FC è la delezione F508 di classe II, che produce una proteina mal ripiegata che viene impropriamente glicosilata e degradata prima di raggiungere la superficie apicale dell'epitelio.

1.2 Manifestazioni cliniche polmonari correlate alla FC

La fibrosi cistica colpisce diversi organi tra cui: i polmoni, il pancreas, l'intestino, il sistema endocrino, il fegato e gli organi sessuali, sebbene le complicanze a livello polmonare siano la principale causa di mortalità e morbilità ¹⁰⁹.

Il malfunzionamento del canale cloro compromette il trasporto mucociliare negli epitelii delle vie aeree, determinando una riduzione di secrezione di cloruro e bicarbonato. Inoltre, la carenza di CFTR porta ad una disidratazione delle vie aeree superficiali, determinando una maggiore viscosità del muco che altera il battito ciliare creando un ambiente favorevole ad infezioni batteriche con conseguente infiammazione tissutale ^{117 118}. Le infezioni che più frequentemente si riscontrano in pazienti affetti da FC sono quelle da *Pseudomonas aeruginosa* e da *Staphylococcus aureus*, quest'ultimo riscontrato in pazienti che soffrono di una forma più aggressiva della malattia ¹¹⁹. Alla gravità della malattia contribuiscono anche i neutrofili che, in risposta agli stimoli infiammatori, rilasciano grandi quantità di DNA (3- 14 mg/mL) sotto forma di NETs, che incrementano ulteriormente la viscosità delle secrezioni ¹²⁰.

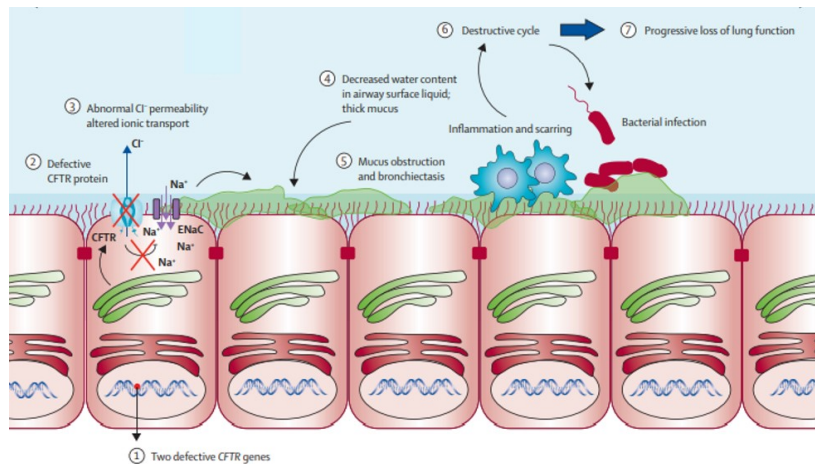


Figura 9: La cascata patogenetica causa delle complicanze polmonari della fibrosi cistica. Le mutazioni sul gene *CFTR* generano una grave deficienza polmonare che innesca un circolo vizioso che determina la progressiva perdita della funzionalità polmonare. (Modificato da *Cystic fibrosis*, F. Ratjen 2015)

1.3 Trattamento sintomatico della malattia polmonare associata alla FC

I trattamenti utilizzati per controllare la malattia polmonare della fibrosi cistica sono specifici per il tipo di mutazioni CFTR e comprendono l'uso di agenti mucolitici, antibiotici, farmaci antinfiammatori e terapie di reidratazione superficiale delle vie aeree^{123 124}.

Un tipo di trattamento prevede l'uso per inalazione di una soluzione di cloruro di sodio ipertonica al fine di aumentare il liquido sulla superficie endo-bronchiale, permettendo così un incremento della clearance mucociliare, un miglioramento della reologia del muco e stimolando la tosse. E' stata inoltre dimostrata l'efficacia di questo trattamento nel contrastare l'infezione da *P. aeruginosa*, favorendo ceppi meno virulenti e lacerando il biofilm protettivo¹²⁶.

Anche l'uso di agenti mucolitici facilita l'espettorazione delle secrezioni polmonari, riducendo la frequenza di infezione e i danni alle vie aeree causati da infiammazione. Nel 1990 Shak et al. hanno dimostrato che la desossiribonucleasi I (rhDNasi) umana ricombinante è in grado di ridurre la viscoelasticità delle secrezioni di pazienti FC idrolizzando il DNA extracellulare¹²⁷. La rhDNasi1, disponibile in commercio con il nome di Pulmozyme® (Roche, Basilea, Svizzera), è raccomandata per tutti i casi di FC indipendentemente dalle mutazioni CFTR e a tutt'oggi è l'agente mucolitico di riferimento per pazienti con malattia polmonare da lieve a grave.

Nei pazienti affetti da fibrosi cistica il Pulmozyme ha effetti clinici benefici ben documentati sui componenti di ostruzione e infezione del processo patologico e ha anche mostrato effetti positivi sui marcatori di infiammazione¹²².

Infine, il trattamento con antibiotici (ciprofloxacina, azitromicina, tobramycin, colistina e aztreonam¹³⁰) risulta essere efficace per la prevenzione e l'eradicazione precoce delle infezioni, come terapia per le infezioni croniche e per ridurre le esacerbazioni, contribuendo ad aumentare l'aspettativa di vita nei pazienti.

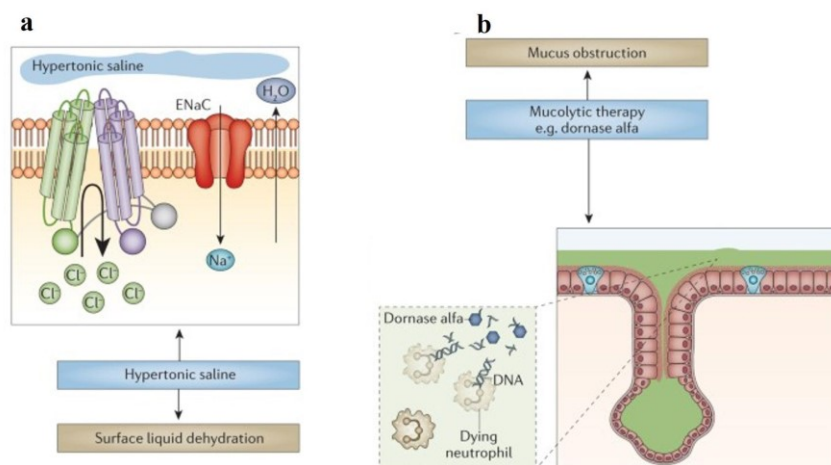


Figura 9: Trattamento per le complicanze polmonari. a) Effetto della soluzione salina ipertonica, con azione idratante. b) Effetto della Dornase alpha o rhDNase1, con azione mucolitica e fluidificante. (Modificato da *Cystic fibrosis*, F. Ratjen 2015)

2. Pulmozyme

Il principio attivo del Pulmozyme è l'enzima desossiribonucleasi 1 ricombinante (rhDNasi1), denominato anche “dornase-alpha”, prodotto da Genentech, Inc. (South San Francisco, CA, USA). La rhDNasi1 è prodotta in cellule geneticamente modificate di ovaia di criceto cinese con codifica del DNA per la proteina umana nativa e formulata come soluzione acquosa sterile contenente: 1,0 mg/mL di rhDNasi, 0,15 mg/mL di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 8,77 mg/mL di cloruro di sodio (NaCl) a pH 6,3¹³¹.

La rhDNasi1 è prescritta alla maggior parte degli individui con fibrosi cistica, in associazione con terapie standard per la malattia polmonare.

La dose giornaliera raccomandata è di 2.5 mg di rhDNasi1, anche se pazienti adulti potrebbero beneficiare del doppio della dose giornaliera per ridurre il rischio di esacerbazione. RhDNasi1 viene somministrata attraverso nebulizzazione ottenendo una deposizione polmonare omogenea dell'enzima in particelle di dimensioni comprese tra 1 e 6 μm ^{128 132}.

Sebbene diversi siano gli studi che hanno dimostrato miglioramenti significativi della funzionalità polmonare nei pazienti con FC, il trattamento con rhDNasi1 presenta alcune limitazioni.

In particolare, circa il 30% dei pazienti trattati con Pulmozyme non risponde al trattamento, probabilmente a causa della presenza di actina globulare che ne inibisce l'attività enzimatica e della bassa concentrazione di ioni Mg^{2+} nell'espettorato, non sufficienti ad attivare l'attività endonucleasica dell'enzima¹³⁴.

3. PEGhilazione in DNasi

La PEGhilazione consiste nel legame covalente del polietilenglicole (PEG) a farmaci o proteine terapeutiche al fine di migliorarne l'efficacia. La presenza del PEG apporta diversi benefici: i) conferisce un effetto schermante alla molecola coniugata, ottimizzando le sue proprietà farmacocinetiche; ii) incrementa la solubilità del farmaco grazie alla idrofilicità del polietere; iii) riduce la clearance renale aumentando il suo volume idrodinamico del principio attivo; iv) riduce l'immunogenicità; v) riduce la degradazione proteolitica delle proteine^{135 136}.

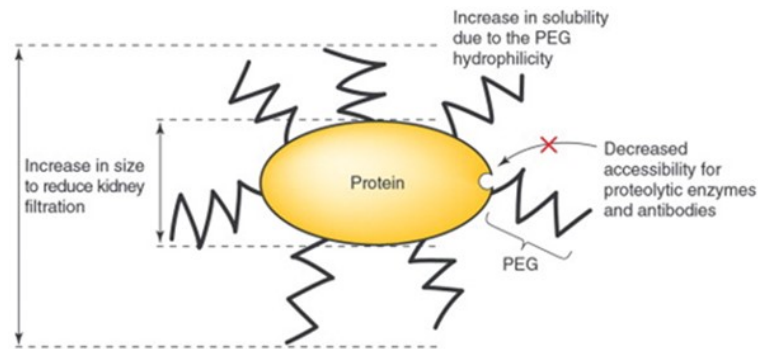


Figura 10: Principali vantaggi della PEGhilazione. (Modificato da *Drug Discovery Today*, F. M. Veronese 2005)

La PEGhilazione della rhDNasi1 è stata eseguita con PEG-20, PEG-30 e PEG-40 attraverso la coniugazione sito-specifica all’N- terminale che ha permesso di preservare la conformazione e la piena attività enzimatica della proteina. L’attività mucolitica del coniugato PEGhilato della rhDNasi1 nell’espettorato di paziente FC è rilevante, con un miglioramento dell’attività enzimatica ex vivo nell’espettorato FC ed una diminuzione dell’inibizione da actina^{137 138}.

Recentemente, in modelli murini è stato valutato l’impatto della PEGhilazione sul trasporto attraverso le cellule epiteliali polmonari della rhDNasi1. I risultati hanno mostrato una prolungata presenza del coniugato nei polmoni dovuta ad un minore assorbimento attraverso le cellule epiteliali e un minore assorbimento da parte dei macrofagi alveolari rispetto alla proteina nativa^{139 140}.

Ad oggi, l’unica proteina PEGhilata approvata per la somministrazione polmonare è la rhDNasi1 umana I (rhDNasi, Pulmozyme®) per la cura sintomatica della FC¹⁴¹.

Risultati e discussione

Per la ricerca e individuazione di DNasi alternative alla rhDNasi1 è stato osservato il repertorio di geni umani appartenenti alla famiglia delle DNasi1 e DNasi2. Nella tabella 1 sono indicate la sede di espressione dei membri delle due famiglie, e le proprietà catalitiche delle proteine corrispondenti.

La famiglia delle DNasi1 comprende endonucleasi attive a pH neutro e in presenza di metalli che agiscono come cofattori. La DNasi1L2 fa eccezione poiché ha un'attività ottimale a pH acido (5.5-6).

La famiglia delle DNasi2 comprende endonucleasi attive a pH acido e in assenza di cofattori.

Per la caratterizzazione biochimica sono state scelte la DNasi2b e la DNasi1L2, due endonucleasi resistenti all'inibizione da actina e con un'attività ottimale a pH acido. Le secrezioni polmonari dei pazienti affetti da fibrosi cistica sono infatti più acide rispetto a quelle dei soggetti sani e contengono elevate quantità di actina che viene secreta, insieme al DNA, a seguito dei processi di apoptosi e necrosi a cui vanno incontro le cellule del sistema immunitario coinvolte nella risposta antinfiammatoria.

	DNase1	DNase1L1	DNase1L2	DNase1L3	DNase2	DNase2b
Prodotto genico	DNase1	DNase1-like1	DNase1-like2-L DNase1-like2-S	DNase1-like3	DNase2	DNase2-β-L DNase2-β-S
Espressione	Intestino Rene Timo	Muscolo scheletrico Cuore	Pelle	Fegato Milza	Polmone Tiroide Prostata	Ghiandole salivari Polmone
cofattori	Metallo- dipendente	Metallo- dipendente	Metallo- dipendente	Metallo- dipendente	Metallo- indipendente	Metallo- indipendente
Attività						
pH	pH neutro	pH neutro	pH acido	pH neutro	pH acido	pH acido
Inibizione da actina	Si	Si	No	No	No	No

Tabella 1: La famiglia delle DNasi1 e DNasi2 umane. Nella tabella sono state raggruppate le DNasi presenti nell'uomo e le caratteristiche principali di ogni membro.

2.1 Clonaggio ed espressione della DNasi2b in *P. pastoris*

Nel database Ensembl sono annotati due trascritti del gene *DNasi2b* di lunghezza differente, che corrispondono alle due isoforme proteiche (DNasi2b-L e DNasi2b-S) presenti nell'uomo. Le due proteine differiscono nella struttura primaria. La sequenza della DNasi2b-L è formata da due domini PLD (PLD1 e PLD2) e contiene un peptide segnale all'N-terminale, mentre la sequenza della DNasi2b-S è formata da un solo dominio PLD (PLD2) e non contiene un peptide segnale. Dallo studio bioinformatico presentato nel capitolo 1 è emerso che la DNasi2b-S è l'isoforma prevalente nel tessuto polmonare dell'uomo.

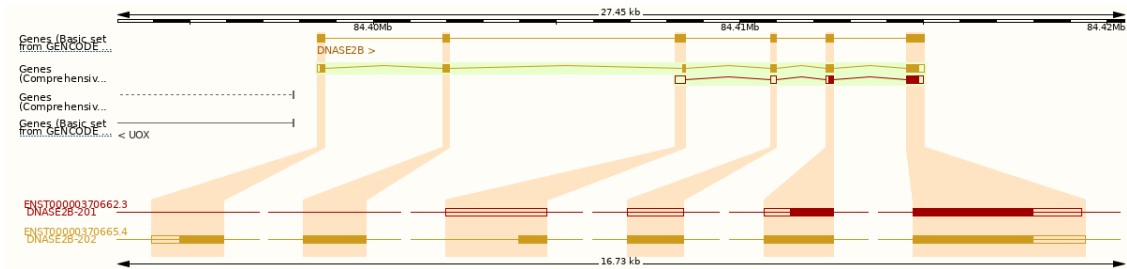


Figura 1: Trascritti del gene umano della DNase2b annotate sul database Ensembl. Il gene umano *DNase2b* (ENSG00000137976) ha annotati due trascritti, in arancio il trascritto lungo (ENST00000370665.4), in rosso quello corto (ENST00000370662.3), in grigio è evidenziato lo pseudogene *UOX*.

Inizialmente, è stata valutata l'espressione del gene *DNase2b* nel batterio *E.coli*. Il clonaggio dei due trascritti del gene umano è stato progettato in modo da produrre le due proteine, DNase2b-L e DNase2b-S fuse alla *Maltose binding protein*. Nonostante siano state testate diverse condizioni di induzione, modificando temperature, tempi e concentrazioni di IPTG, le due proteine sono state prodotte in forma insolubile.

L'insolubilità delle proteine ricombinanti potrebbe essere dovuta all'incapacità di *E.coli*, di apportare modifiche post-traduzionali, che potrebbero impedire il corretto ripiegamento delle proteine, causando la loro precipitazione. La DNase2b presenta infatti quattro siti N-glicosilati ritenuti essenziali per la stabilità strutturale e per l'attività. È stato quindi deciso di produrre la DNase2b-S in un sistema di espressione eucariotico, in particolare nel lievito metilotrofico *Pichia pastoris*, ampiamente utilizzato per l'espressione di proteine ricombinanti e già utilizzato per la produzione di DNase umane³³.

Un vantaggio dell'utilizzo di *P. pastoris* come ospite per la produzione di proteine eterologhe è la sua capacità di eseguire modifiche post-traduzionali come la glicosilazione.

Pichia pastoris ha due geni che codificano per l'enzima alcol ossidasi (*AOX1* e *AOX2*) sotto il controllo di due promotori diversi, entrambi attivati da metanolo. A seconda del sito di integrazione del gene eterologo nel genoma di *P. pastoris*, può essere generato un clone ricombinante con fenotipo a crescita lenta (MutS; integrazione nel gene *AOX1*), oppure un clone ricombinante con fenotipo a crescita normale (Mut+; integrazione nel gene *AOX2*).

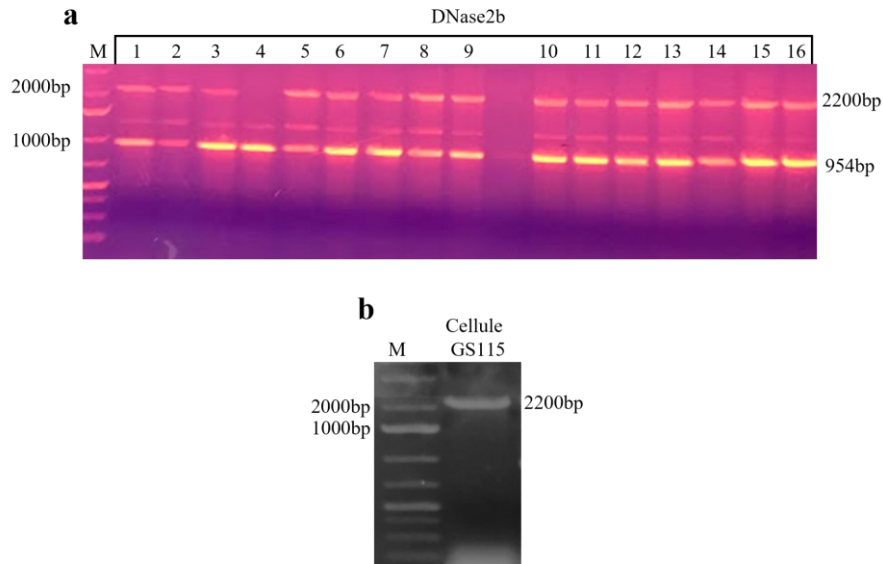


Figura 2: Verifica dell'integrazione della DNase2b nel genoma delle cellule GS115 di *P.pastoris*. L'integrazione è stata confermata mediante PCR utilizzando i primer 5'AOX1 e 3'AOX1. a) Verifica dell'integrazione di alcuni cloni del costrutto pPIC9K-DNase2b nel genoma delle cellule GS115 di *P.pastoris*. M: Marker DNA, lane 1-16: prodotti di PCR di *P.pastoris* trasformati con pPIC9K-DNase2b. Quasi tutti i cloni mostrano due bande di 2200 bp e 954bp che corrispondono rispettivamente a AOX1 e alla DNase2b integrato al locus *his4* (Mut+); la lane 4 mostra una banda di 954 bp che corrisponde alla DNase2b integrato al locus AOX1 (MutS). b) Verifica sulle cellule GS115: prodotto di PCR del ceppo di *P.pastoris* non trasformato mostra una banda di 2200 bp che corrisponde alle dimensioni di AOX1 nel genoma di *P.pastoris*.

Il clonaggio dei due trascritti del gene *DNase2b* umano è stato progettato in modo da produrre le due proteine, DNase2b-L e DNase2b-S fuse a un peptide di secrezione (fattore alfa di lievito). La secrezione nel terreno di coltura migliora la stabilità delle proteine eterologhe e ne favorisce il corretto folding. Inoltre, poiché *P. pastoris* secerne bassi livelli di proteine endogene, la proteina eterologa secreta risulta predominante nel terreno facilitandone così la purificazione senza dover ricorrere all'uso di un tag¹⁴⁴. Per entrambi i geni e i mutanti analizzati, le espressioni sono state monitorate per 72h, ogni giorno è stata aggiunta la quantità necessaria di metanolo per mantenere l'induzione e un campione è stato prelevato per le analisi elettroforetiche ogni 24h. Le analisi eseguite sulla frazione secreta (Fig.3a) e su quella intracellulare (Fig.3b) non hanno mostrato livelli di espressione di *DNase2b*.

Le procedure di clonaggio ed espressione sono state ripetute 3 volte, ottenendo sempre risultati negativi. Per la produzione della DNase2b umana potrebbe essere necessario un sistema eucariotico diverso, come ad esempio le cellule di mammifero. In letteratura è riportata l'espressione ricombinante del gene *DNase2b* in cellule umane⁴⁷.

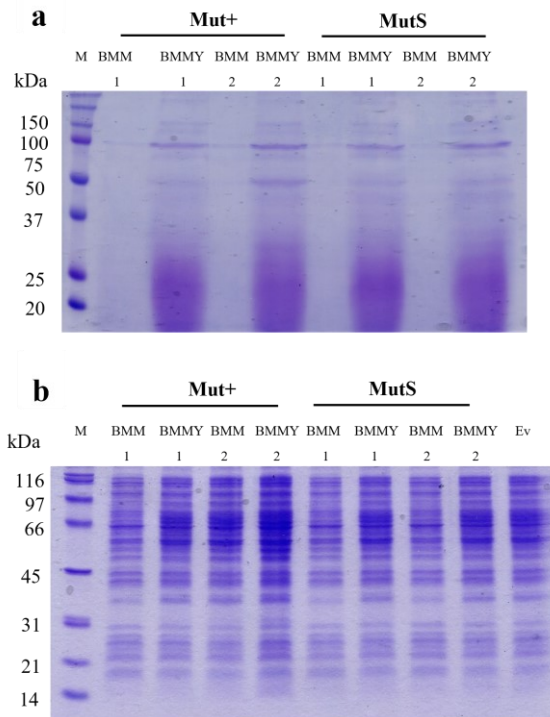


Figura 3: Espressione ricombinante della DNase2b in *P.pastoris*. Analisi su SDS-PAGE al 12% delle proteine extracellulari (a) ed intracellulari (b) prodotte dalle cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il costrutto pPIC9K-DNase2b. L'espressione è stata indotta nel terreno BMM e BMMY per 72h con 0.5% di metanolo. M: marker DNA; Ev: vettore pPIC9K vuoto trasformato in cellule GS115 di *P.pastoris* espresse in BMMY per 72h.

2.2 Espressione e purificazione della DNase1L2 in *E.coli*

Nel database Ensembl sono annotati sei trascritti del gene *DNase1L2*. Tre trascritti codificano per l'isoforma lunga (DNase1L2-L), due trascritti codificano per l'isoforma corta (DNase1L2-S), e l'ultimo trascritto è incompleto al C-terminale. I due trascritti completi differiscono per la presenza di un introne di 63 bp che codifica per un dominio ricco in proline (PRD)³¹.

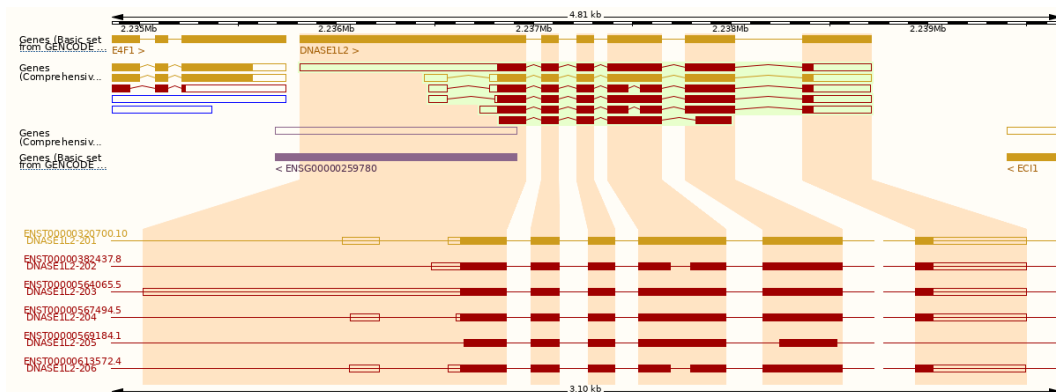


Figura 4: Trascritti del gene umano della DNase1L2 annotate sul database Ensembl. Il gene umano *DNase1L2* (ENSG00000167968) ha annotati sei trascritti, quelli corrispondenti al trascritto lungo sono ENST00000320700.10- ENST00000564065.5- ENST00000567494.5, quelli corrispondenti al trascritto corto sono ENST00000613572.4 e ENST00000382437.8.

La DNasi1L2-L è abbondante nella pelle, mentre la DNasi1L2-S è stata rilevata nei leucociti del sangue periferico.^{33 6}

Entrambe le proteine sono state inizialmente prodotte in *E. coli*. Nonostante siano state testate diverse condizioni di induzione, modificando temperature, tempi e concentrazioni di IPTG, le due proteine sono state prodotte in forma insolubile. Si è quindi proceduto con la purificazione dai corpi di inclusione dalla quale sono state ottenute proteine prive di attività.

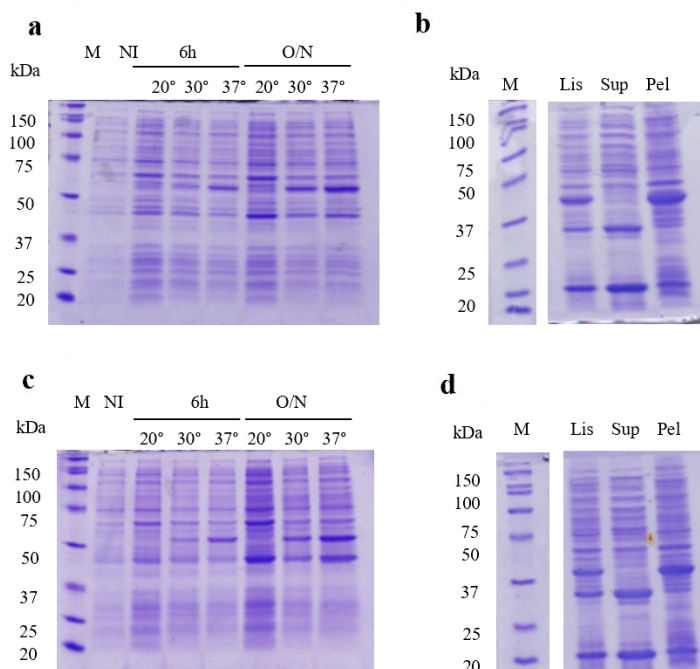


Figura 5: Espressione ricombinante della DNasi1L2-L e DNasi1L2-S nel sistema di espressione procariotico *E.coli*. Analisi su SDS-PAGE delle espressioni della DNasi1L2-L (a) e DNasi1L2-S (c) indotte a diverse temperature, tempi di induzione e con 0.5mM IPTG. Analisi solubilità su SDS-PAGE mostrano la presenza della DNasi1L2-L(b) e la DNasi1L2-S(d) nella frazione insolubile, le colture sono coltivate a 37°C. M:marker, NI: non indotto, Lys: estratto cellulare ottenuto dopo lisi, Sup: surnatante, frazione solubile, Pel: pellet, frazione insolubile

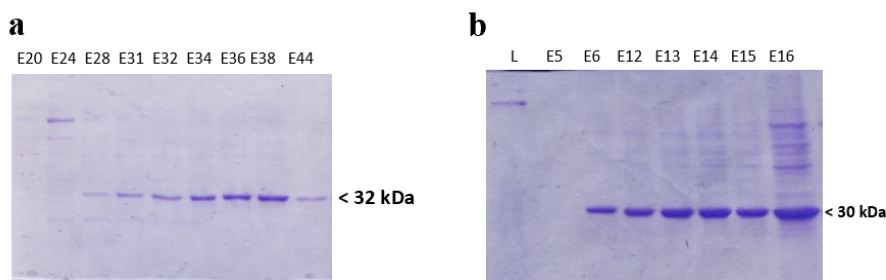


Figura 6: Purificazione della DNasi1L2-L e DNasi1L2-S dai corpi di inclusione in *E.coli*. Anali su SDS-PAGE della cromatografia a scambio anionico della DNasi1L2-L (a) e della DNasi1L2-S (b). La banda corrisponde al peso molecolare atteso di 32 kDa per l'isoforma lunga e di 30 kDa per quella corta. (M = marker; L=surnatante caricato E = eluito).

A seguito dei risultati ottenuti nel sistema di espressione batterico, è stato ritenuto opportuno cambiare il sistema di espressione. Come per la DNasi2b, è stato scelto *P. pastoris*, comunemente utilizzato per l'espressione e la produzione di proteine ricombinanti anche a scopo terapeutico. La DNasi1L2, inoltre, era già stata prodotta in *P. pastoris* ³³.

2.3 Integrazione ed espressione della DNasi1L2 nel genoma di *P. pastoris*

Per il clonaggio della DNasi1L2 è stato seguito lo stesso approccio utilizzato per la DNasi2b, illustrato nei materiali e metodi.

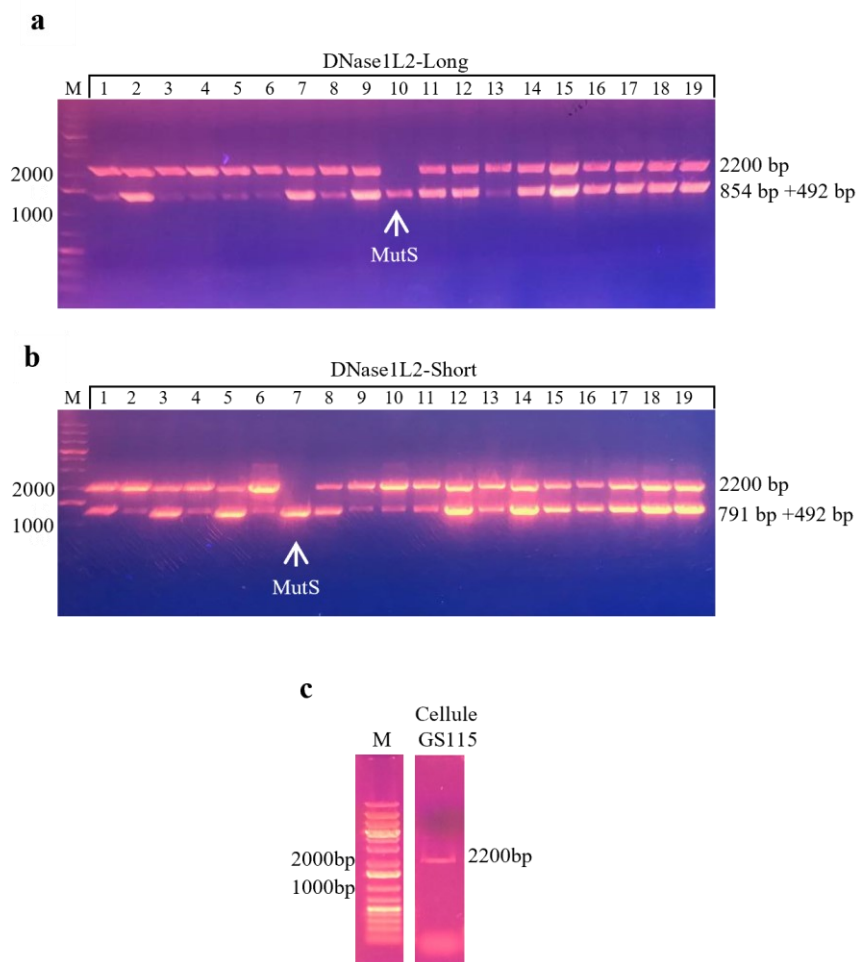


Figura 7: Verifica dell'integrazione della DNasi1L2 nel genoma delle cellule GS115 di *P.pastoris*. L'integrazione è stata confermata mediante PCR utilizzando i primer 5'AOX1 e 3'AOX1. a) Verifica integrazione di alcuni cloni del costrutto pPIC9K-DNasi1L2-L nel genoma delle cellule GS115 di *P.pastoris*. M: Marker DNA, lane 1-19: prodotti di PCR di *P.pastoris* trasformati con pPIC9K-DNasi1L2-L. Quasi tutti i cloni mostrano due bande di 2200 bp e 1346 bp che corrispondono rispettivamente a AOX1 e alla DNasi1L2-L integrato nel locus his4 (Mut+); la lane 10 mostra una banda di circa 1300 bp che corrisponde alla DNasi1L2-L integrato al locus AOX1 (MutS). b) Verifica integrazione di alcuni cloni del costrutto pPIC9K-DNasi1L2-S nel genoma delle cellule GS115 di *P.pastoris*. M: Marker DNA, lane 1-19: prodotti di PCR di *P.pastoris* trasformati con pPIC9K-DNasi1L2-S. Quasi tutti i cloni mostrano due bande di 2200 bp e 1283 bp che corrispondono rispettivamente a AOX1 e alla DNasi1L2-S integrato nel locus his4 (Mut+); la lane 7 mostra una banda di circa 1300 bp che corrisponde alla DNasi1L2-S integrato al locus AOX1 (MutS). c) Verifica sulle cellule GS115: prodotto di PCR del ceppo di *P. pastoris* non

trasformato mostra una banda di 2200 bp che corrisponde alle dimensioni di AOX1 nel genoma di *P. pastoris*.

Dopo avere verificato l'integrazione in *P. pastoris* e determinato il fenotipo ricombinante, sono state analizzate le condizioni di espressione ottimale per entrambe le isoforme della DNasi1L2.

Al fine di ottenere le migliori condizioni di espressione delle proteine ricombinanti, sono stati valutati diversi parametri, come i livelli di metanolo, la temperatura, e i tempi di incubazione. L'espressione è stata analizzata per entrambi i fenotipi mutanti (Mut⁺ contenente pPIC9K-DNasi1L2-L e Mut⁺ contenente pPIC9K-DNasi1L2-S; Mut^S contenente pPIC9K-DNasi1L2-L e Mut^S contenente pPIC9K-DNasi1L2-S).

La DNasi1L2-L non è stata prodotta in nessuna delle condizioni testate, né nel terreno di coltura, né nella frazione intracellulare (Fig.8a-c) (Fig.10).

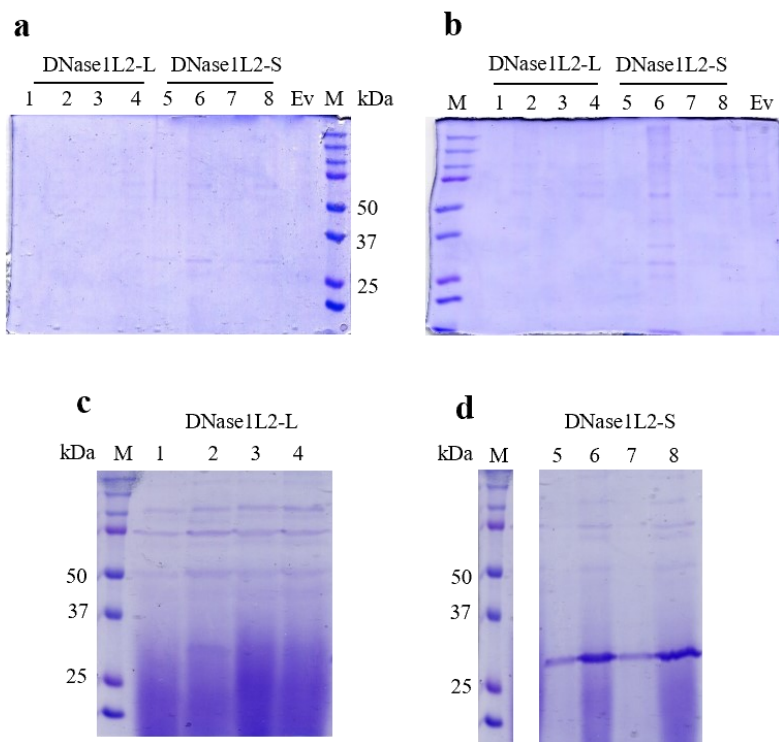


Figura 8: Espressione ricombinante della DNasi1L2 (Mut⁺) in *P.pastoris*. Analisi su SDS-PAGE al 12% sulla frazione secreta prodotta dalle cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il costrutto pPIC9K-DNasi1L2-L e -S e indotte in BMM per 48h (a) e 72h (b). c-d) Frazione secreta prodotta dalle cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il costrutto pPIC9K-DNasi1L2-L (c) e -S (d) e indotte in BMMY per 72h. M: marker DNA; Ev: vettore pPIC9K vuoto trasformato in cellule GS115 di *P.pastoris* espresse in BMM per 72h.

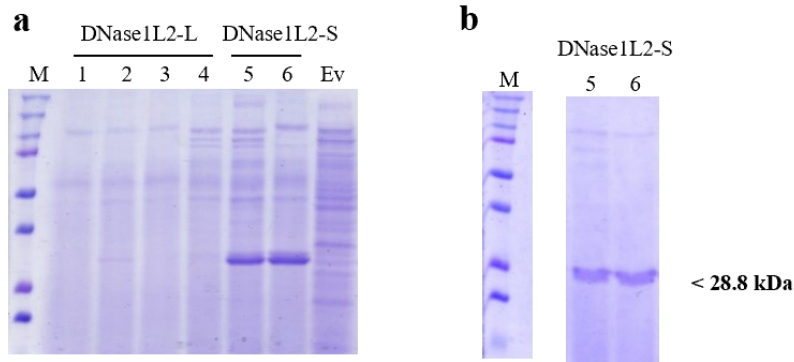


Figura 9: Espressione ricombinante della DNase1L2 (MutS) in *P.pastoris*. Analisi su SDS-PAGE al 12% sulla frazione secreta prodotta dopo 48h dalle cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il costrutto pPIC9K-DNase1L2-L e pPIC9K-DNase1L2-S. b) Frazione secreta prodotta dalle cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il costrutto pPIC9K-DNase1L2-S e indotte per 72h. M: marker DNA; Ev: vettore pPIC9K vuoto trasformato in cellule GS115 di *P.pastoris* espresse in BMMY per 48h.

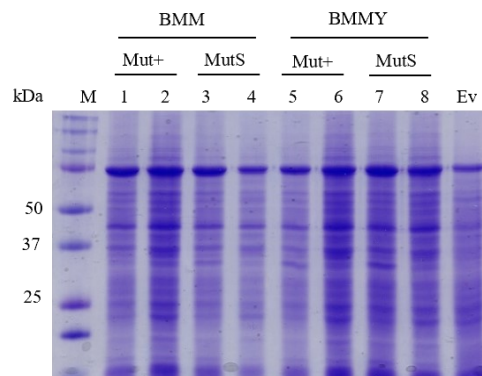


Figura 10: Espressione ricombinante della DNase1L2-L (MutS e Mut+) in *P.pastoris*. Analisi mediante SDS-PAGE al 12% della frazione intracellulare di due Mut+ e due MutS prodotti dalle cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il costrutto pPIC9K-DNase1L2-L. Le colture sono state indotte in terreno BMM e BMMY per 72h aggiungendo 0.5% di metanolo ogni 24h. M: marker DNA; Ev: vettore pPIC9K vuoto trasformato in cellule GS115 di *P.pastoris* espresse in BMMY per 72h.

Al contrario, i risultati ottenuti con la DNase1L2-S sono stati incoraggianti. Entrambi i mutanti sono risultati in grado di produrre la proteina. La produzione su larga scala per entrambi i mutanti è stata condotta in terreno completo. Il monitoraggio dei livelli di espressione nelle 24, 48 e 72h di induzione con metanolo allo 0.5% (Fig.11), ha mostrato un aumento costante nel tempo della proteina ricombinante prodotta, come atteso.

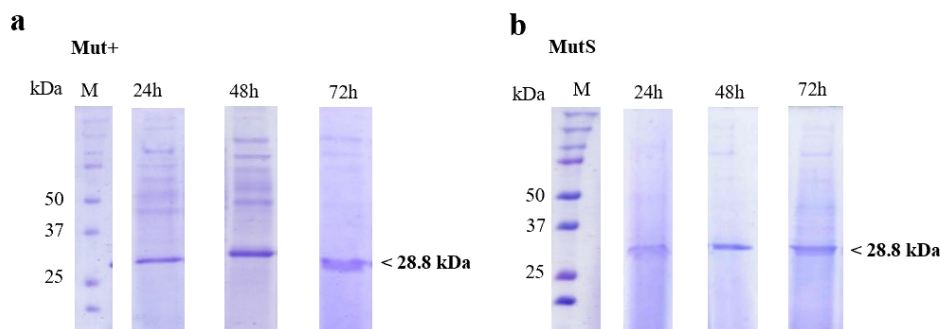


Figura 11: Espressione ricombinante della DNase1L2-S su larga scala. Analisi su SDS-PAGE mostrano i livelli di espressione della proteina prodotta dal clone Mut+ (a) e MutS (b) coltivati in BMMY a 30 °C e indotti con 0,5%MeOH ogni 24h.

La produzione di proteine ricombinanti in *Pichia pastoris* richiede tempi un po' lunghi se paragonati a quelli che occorrono nel sistema batterico, inoltre al fine di ottenere un'alta resa è necessario lavorare con grandi volumi. Per una produzione economica, veloce e riproducibile della DNase1L2 in *P. pastoris*, è stato quindi ottimizzato un processo di coltivazione semi-continua della proteina ricombinante, che consente di raccogliere proteina fresca ogni tre giorni, mantenendo attiva la produzione per un periodo di tempo più lungo.

La produzione semi-continua è un processo piuttosto semplice, che comporta la rimozione periodica della frazione colturale e la sostituzione con un uguale volume di terreno colturale fresco; ogni diluizione riporta la coltura a circa la stessa densità cellulare della precedente.

Entrambi i mutanti della DNase1L2-S sono stati utilizzati per produrre la proteina con il processo semi-continuo: sono stati eseguiti 3 cicli, per un periodo totale di induzione di circa 10 giorni.

La quantità di DNase1L2 prodotta è aumentata progressivamente ad ogni ciclo (Fig.12).

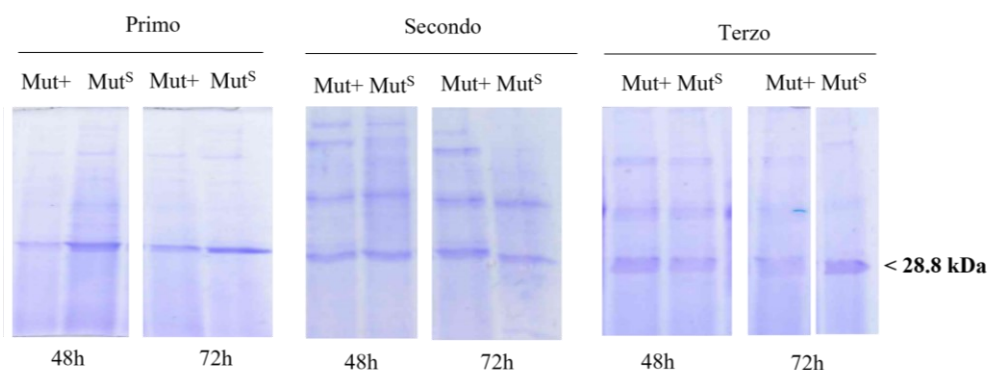


Figura 12: Produzione semicontinua della DNase1L2 in *P. pastoris*. Due cloni per ogni mutante ricombinante (Mut+ e MutS) sono stati coltivati con il metodo di produzione semicontinua. L'analisi su SDS-PAGE al 12% mostra la resa ottenuta ogni ciclo a 48h e 72h di induzione. Il processo è stato ripetuto tre volte.

Questa procedura ha permesso di ridurre i tempi di produzione, ottenendo una proteina ricombinante fresca ogni tre giorni.

2.4 Purificazione della DNasi1L2

La DNasi1L2-S è stata efficacemente prodotta nel terreno di coltura di *P. pastoris* con peso molecolare previsto di circa 28,8 kDa. La proteina è stata purificata mediante cromatografia a scambio anionico, seguita da cromatografia ad esclusione dimensionale.

La DNasi1L2 mostra un pI di 4.5 e la cromatografia a scambio anionico ha permesso di isolare la proteina ricombinante sfruttando la sua carica negativa. Prima del caricamento in colonna, il surnatante è stato concentrato e poi diluito in buffer fosfato per eliminare l'eccesso di sali e migliorare l'efficienza della purificazione. Il terreno di induzione BMMY contiene infatti sali inorganici che diminuiscono l'interazione tra la fase stazionaria della colonna e la proteina.

La cromatografia a scambio anionico è stata condotta a pH 7.4 e la proteina è stata eluita monitorando l'assorbanza a 280 nm, ad alta concentrazione di sale (1M NaCl). Il cromatogramma (Fig.13a) mostra la presenza di contaminanti con assorbimento a 260 nm. Su gel SDS-PAGE è stata rilevata una singola banda corrispondente al peso molecolare atteso, indicando che la preparazione ottenuta contiene come unica proteina la DNasi1L2.

Al fine di eliminare i contaminanti non proteici è stata eseguita una seconda cromatografia, ad esclusione dimensionale. La proteina eluita ha mostrato un picco di assorbimento a 280 nm (Fig.13b).

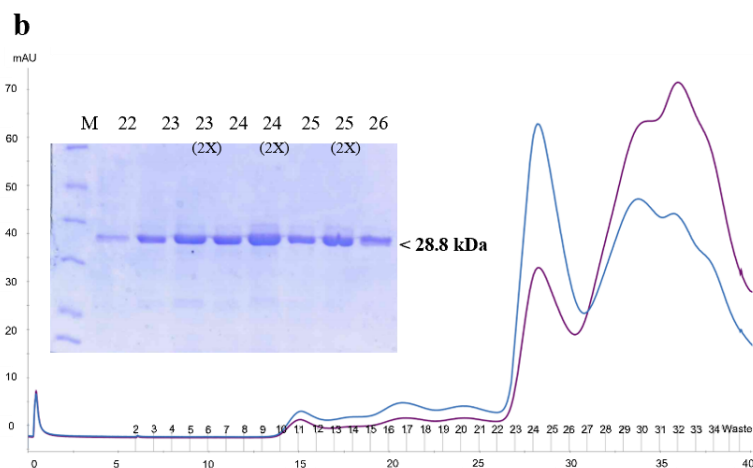
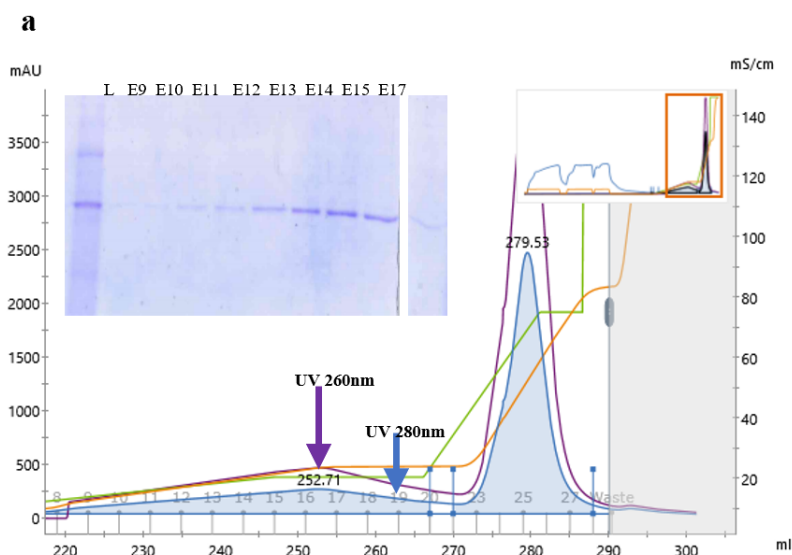


Figura 13: Purificazione della DNasi1L2. Cromatogramma e analisi su SDS-PAGE della cromatografia a scambio anionico (a), mostrano il primo step di purificazione della DNasi1L2; e della cromatografia ad esclusione dimensionale (b) mostrano il secondo step di purificazione della DNasi1L2. L: supernatante caricato, M: Marker, E: eluito. La numerazione dei picchi sui cromatogrammi corrisponde alle lane del gel.

Un'aliquota della proteina eluita è stata ulteriormente sottoposta a gel filtrazione analitica per individuare il corretto peso molecolare e confermare la sua forma monomerica, calibrando la colonna con dei pesi molecolari noti. Il risultato ottenuto dimostra che la DNasi1L2-S ha un peso molecolare di circa 25 kDa molto vicino a quello previsto dalla sequenza amminoacidica (28,8 kDa). Il cromatogramma (Fig. 14) mostra che la proteina, eluita in un singolo picco, è un monomero. Complessivamente, è stata prodotta circa 1 mg/L di DNasi1L2 purificata, la quantità ottenuta dopo tre cicli di produzione semicontinua da un volume di 300mL di coltura .

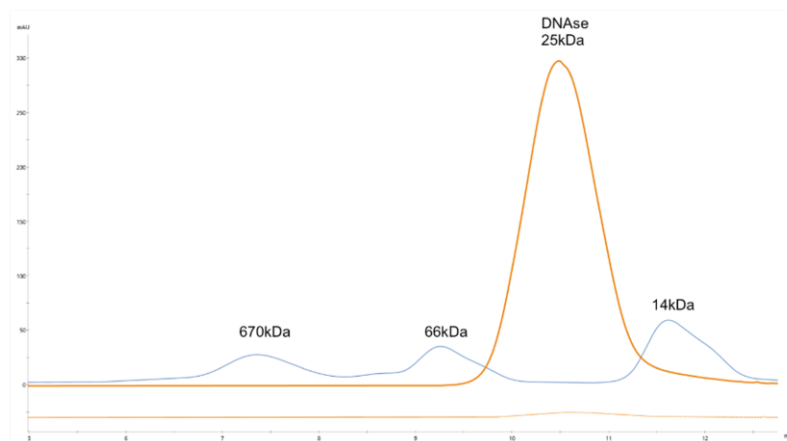


Figura 14: Gel filtrazione DNasi1L2. Il cromatogramma mostra un peso molecolare corrispondente al monomero di DNasi1L2. La colonna è stata calibrata con gli standard di massa molecolare.

2.5 Caratterizzazione dell'attività endonucleasica della DNasi1L2

2.5.1 Effetto dei cationi divalenti

La famiglia delle DNasi1 è formata da endonucleasi con attività metallo-dipendente. In particolare, lo ione Ca^{2+} è fondamentale per l'integrità strutturale della DNasi1, mentre lo ione Mg^{2+} partecipa nel meccanismo catalitico. È stato osservato che altri cationi divalenti, come il Mg^{2+} o Mn^{2+} , possono agire da soli come attivatori dell'enzima^{145 16}.

L'attività della DNasi1L2 è risultata simile a quella della DNasi1 per quanto riguarda la dipendenza dai metalli. Shinowa et. al. (2004) hanno analizzato l'attività della DNasi1L2 in presenza di metalli alcalino-terrosi come il Mg^{2+} e il Ca^{2+} , e metalli di transizioni come il Mn^{2+} e Co^{2+} , dimostrando che la DNasi1L2 è maggiormente efficiente in presenza del solo ione Co^{2+} rispetto a quando vengono forniti Mg^{2+} e Ca^{2+} in combinazione⁸. I metalli di transizioni si trovano comunemente in associazione con nucleasi metallo-dipendenti e sono ritenuti i loro migliori attivatori¹⁴⁵.

L'attività endonucleasica della DNasi1L2 prodotta in forma ricombinante è stata analizzata in vitro utilizzando come substrato il DNA plasmidico superavvolto e diversi cofattori metallici. I metalli sono stati testati in un range da 1 a 12mM, più ampio rispetto alle concentrazioni fisiologiche, tenendo conto che nell'espettorato dei pazienti affetti da fibrosi cistica è stata riscontrata una concentrazione di 1-3 mM per lo ione Mg^{2+} e 2-4 mM per lo ione Ca^{2+} ¹³⁴.

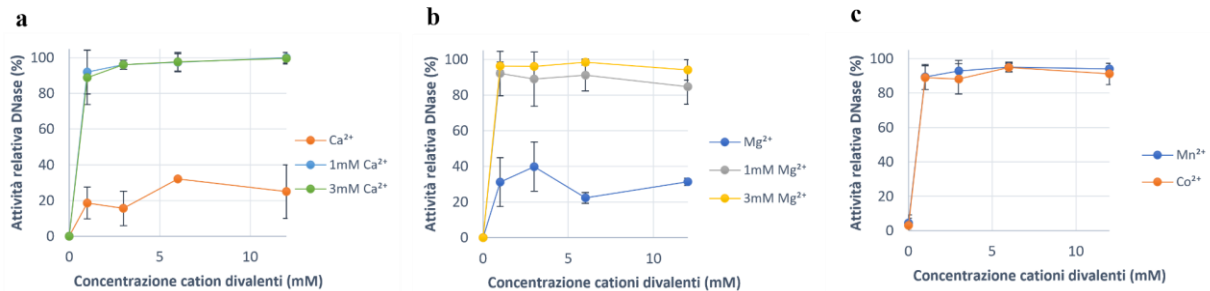


Figura 16: Effetto dei cationi divalenti sull'attività della DNasi1L2. L'attività della DNasi1L2 è stata caratterizzata utilizzando DNA plasmidico superavvolto. I grafici derivano da una analisi densitometrica del substrato rilevato su gel d'agarosio dopo corsa elettroforetica. a) Titolazione magnesio in presenza di 0, 1 e 3 mM $CaCl_2$. b) Titolazione del calcio in presenza di 0, 1 e 3 mM $MgCl_2$. c) Titolazione manganese e cobalto. I valori riportati sui grafici sono le medie dei risultati \pm le deviazioni standard ottenute da tre esperimenti indipendenti.

Per quanto riguarda il Mg^{2+} e il Ca^{2+} , il loro effetto sull'attività è stato analizzato singolarmente e in combinazione, per valutare anche l'effetto sinergico.

La titolazione del Mg^{2+} in presenza di 1 mM o 3 mM $CaCl_2$, mostra che per ottenere il massimo dell'attività enzimatica sono sufficienti in entrambi i casi 3 mM $MgCl_2$ (Fig.16a).

La titolazione del calcio, mostra un effetto inibitorio sull'attività enzimatica in presenza di basse concentrazioni di $MgCl_2$, mentre 3mM sono sufficienti per mantenere massima l'attività dell'enzima (Fig.16b).

Inoltre, in presenza di uno solo di questi metalli le attività rilevate sono molto basse, in presenza di 3mM $MgCl_2$ è possibile raggiungere quasi il 50% dell'attività, ma quando l'enzima è incubato con 6 mM Ca^{2+} l'attività rilevata non è superiore al 40% (Fig.16a-b).

L'effetto inibitorio rilevato a basse concentrazioni di Mg^{2+} è stato già segnalato da Shinowa et al. (2001) e si presume sia dovuto alla presenza dei due siti per il Mg^{2+} posti in prossimità del sito attivo, in cui si potrebbe instaurare una competizione di legame tra il Ca^{2+} e il Mg^{2+} essendo molto simili ^{6 8}.

L'effetto di Mn^{2+} e Co^{2+} è stato analizzato singolarmente. Per entrambi i metalli, basse concentrazioni (1 mM) sono state sufficienti per ottenere il massimo dell'attività enzimatica (Fig.16c).

2.5.2 Effetto del pH

Una caratteristica che distingue la DNasi1L2 dalle altre DNasi1 è il suo optimum di pH, che risulta essere acido. Questo aspetto è rilevante per una possibile terapia per la fibrosi cistica, in quanto è stato riportato che le secrezioni dei pazienti affetti da FC sono generalmente acide ¹⁴⁶.

L'effetto del pH sull'attività endonucleasica della DNasi1L2 è stata analizzata in vitro utilizzando come substrato il DNA plasmidico superavvolto.

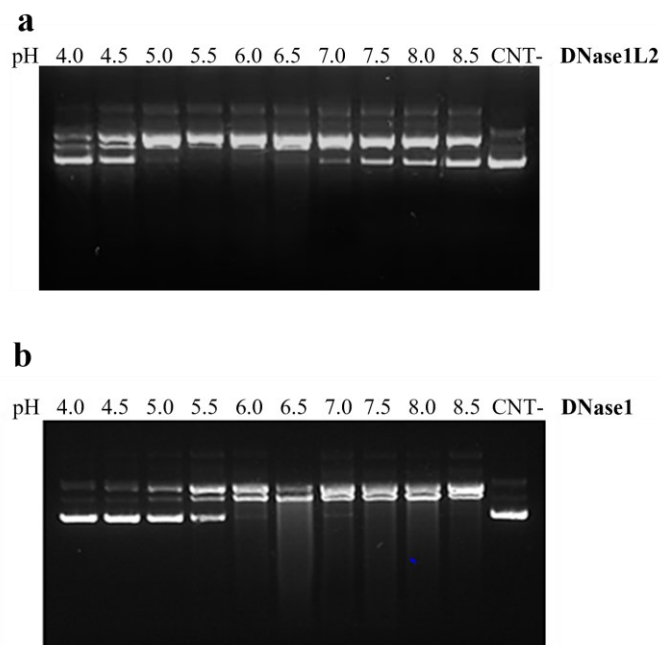


Figura 17: Effetto del pH sull'attività della DNase1L2 e della DNase1. L'attività è stata testata utilizzando DNA plasmidico superavvolto e le reazioni sono state allestite come descritto nella sezione dei materiali e metodi. I gel d'agarosio all'1% mostrano l'effetto del pH sull'attività della DNase1L2 (a) e della DNase1 (b). CNT-: controllo negativo, DNA plasmidico senza enzima a pH 4.

L'attività della DNase1L2 è stata caratterizzata a diversi pH (4.0-8.5), in presenza di Mg^{2+} e Ca^{2+} , e in seguito comparata con l'attività della rhDNase1. La DNase1L2 è risultata attiva in un range di pH tra 5 e 8.5, con un'attività ottimale osservata a pH 5.5 (Fig.17a). La DNase1 è invece risultata attiva a pH più elevati, nel range da 6 a 8.5, mostrando il picco di attività a pH 6.5. (Fig.17b).

2.5.3 Meccanismo di taglio su DNA a doppio filamento

Il DNA a doppio filamento superavvolto è stata già utilizzato per caratterizzare il meccanismo di idrolisi messo in atto dalla DNase1. Il DNA a doppio filamento può essere tagliato su uno solo dei due filamenti, con la formazione di DNA circolare, oppure contemporaneamente su entrambi i filamenti con la formazione di DNA lineare. Il DNA lineare può essere prodotto anche a partire da DNA circolare con un secondo taglio in prossimità (circa 100 bp) del primo. Quindi, durante la degradazione del DNA plasmidico superavvolto con un meccanismo di taglio a singolo filamento la maggior parte del DNA superavvolto scompare rapidamente, mentre si accumula il DNA circolare, che viene convertito in lineare da un secondo taglio in prossimità del primo. Con il meccanismo di taglio a doppio filamento invece, il DNA superavvolto viene convertito direttamente in DNA lineare, e il DNA in forma circolare non viene prodotto.

L'effetto dei metalli sull'idrolisi del DNA da parte della DNase1 è stato ampiamente studiato, ed è stato riportato che la DNase1 è in grado di effettuare tagli sul singolo e sul doppio filamento in presenza di Mg^{2+} e Ca^{2+} o di Mn^{2+} , mentre in presenza del solo Mg^{2+} è in grado di tagliare solo il singolo filamento

Il meccanismo di taglio da parte della DNase1L2 sul DNA a doppio filamento è stato studiato seguendo l'andamento temporale della reazione catalizzata dall'enzima, al pH e alle concentrazioni di Mg^{2+} e Ca^{2+}

ottimali. Dopo la corsa elettroforetica, il substrato rilevato nelle tre conformazioni (superavvolto, circolare e lineare), è stato quantificato separatamente e i dati sono stati plottati nel grafico (Fig.18b). La reazione di taglio della DNasi1L2 è stata seguita fino a 125 min per rilevare la completa degradazione del substrato.

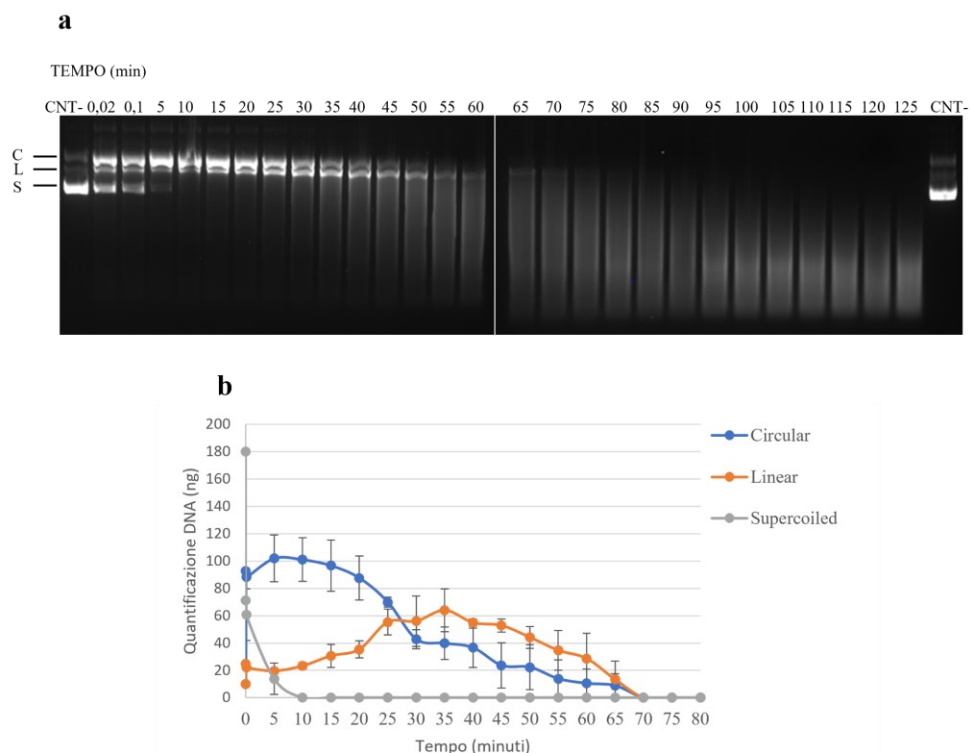


Figura 18: Andamento temporale dell'attività della DNasi1L2. L'andamento dell'attività endonucleasica è stato monitorato utilizzando il DNA superavvolto come substrato e nel range temporale da 1 s a 125 min. 200 ng di DNA plasmidico superavvolto sono stati incubati con 69 pmol (2 ng) di DNasi1L2. a) Corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% mostra l'andamento temporale dell'attività b) Analisi densitometrica del substrato rilevato. I valori riportati sui grafici sono le medie dei risultati \pm le deviazioni standard ottenute da tre esperimenti indipendenti. CNT-: controllo negativo, S: DNA superavvolto, C: DNA circolare, L: DNA lineare.

I risultati mostrano che la DNasi1L2, in presenza di Ca^{2+} e Mg^{2+} agisce sul DNA superavvolto principalmente effettuando tagli sul singolo filamento; il DNA superavvolto scompare in 5 min e la maggior parte del substrato iniziale viene convertito in DNA circolare, mentre il DNA lineare è prodotto in quantità minori (Fig.18). Dal grafico è possibile notare l'aumento graduale del DNA lineare nei primi minuti della reazione; questo potrebbe suggerire che il DNA superavvolto è stato degradato anche con taglio su entrambi i filamenti, ma con frequenza molto minore.

2.5.4 Analisi delle cisteine mediante riduzione e alchilazione

La DNasi1 umana presenta due ponti disolfuro, C101–C104 e C173–C209, localizzati in prossimità dei siti (II e I, rispettivamente) di legame con lo ione Ca^{2+} . Il ponte disolfuro C173–C209 è conservato in tutta la famiglia delle DNasi1 e studi sulla DNasi1 di *Bos taurus* hanno mostrato che lo ione calcio è fondamentale per la stabilità strutturale e per la protezione del legame disolfuro dalla riduzione^{10 17 15 14}. Nella sequenza della DNasi1L2 la regione che comprende le due cisteine C101 e C104 è assente,

mentre le cisteine C167 e C203, che corrispondono ai residui C173 e C209 della DNasi1 sono presenti. Queste caratteristiche risultano essere conservate in tutte le DNasi1L2 dei vertebrati.

Per comprendere il ruolo dei residui di cisteina C167 e C203 nell'attività catalitica della DNasi1L2, sono stati eseguiti esperimenti di riduzione dei legami disolfuro con β -mercaptoetanololo (β ME) e successiva alchilazione dei gruppi tiolici con iodoacetamide (IAM), prima dell'incubazione con DNA plasmidico in presenza di cationi divalenti. Inoltre, gli esperimenti sono stati condotti in presenza e in assenza dello ione Ca^{2+} per investigare il ruolo di questo catione sulla stabilità strutturale e l'attività dell'enzima.

Il trattamento con β ME non ha prodotto cambiamenti significativi dell'attività. Invece il trattamento con IAM, sia in condizioni riducenti che in condizioni non riducenti, in assenza di calcio ha diminuito drasticamente l'attività della DNasi1L2. Lo stesso trattamento in presenza di Ca^{2+} non ha modificato l'attività enzimatica (Fig.19).

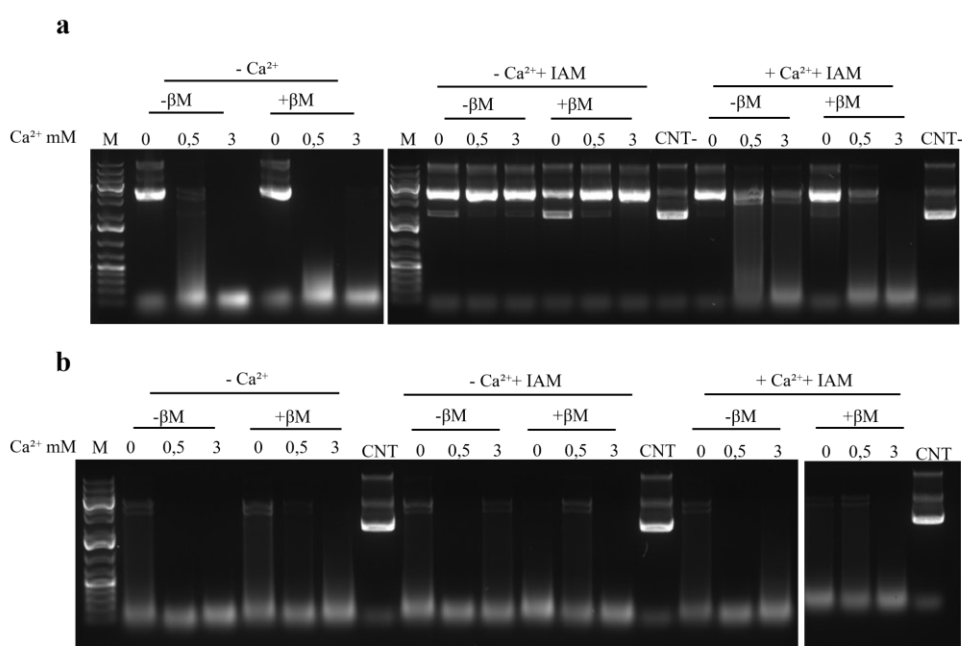


Figura 19: Effetto del calcio sulla riduzione e alchilazione delle cisteine della DNasi1L2. L'elettroforesi su gel di agarosio mostra l'effetto del β -mercaptoetanololo (β ME) e della iodoacetamide (IAM) sulla digestione del DNA plasmidico mediante (a) DNasi1L2 e (b) rhDNasi1. Gli enzimi si trovano in soluzione tampone con l'integrazione o meno di 1 mM CaCl_2 .

I risultati ottenuti suggeriscono che il ponte disolfuro C167-C203 in DNasi1L2 non si forma in modo stabile, l'alchilazione di queste cisteine potrebbe impedire o alterare il legame del Ca^{2+} nel sito I, e quando il Ca^{2+} è legato la proteina è protetta da alchilazione. Questi trattamenti sono stati effettuati anche sulla DNasi1.

L'attività enzimatica della DNasi1 non è influenzata dalla presenza del calcio nel buffer di reazione, per cui il calcio non è ritenuto fondamentale per l'attività e non conferisce protezione al legame disolfuro C173-C209.

Poiché gli esperimenti indicano che la protezione del legame disolfuro nella DNasi1 umana non dipende dal calcio, la stabilità dell'enzima contro la riduzione potrebbe derivare dalla composizione aminoacidica dell'intorno del sito di legame del Ca^{2+} che forma un loop nella struttura 3D.

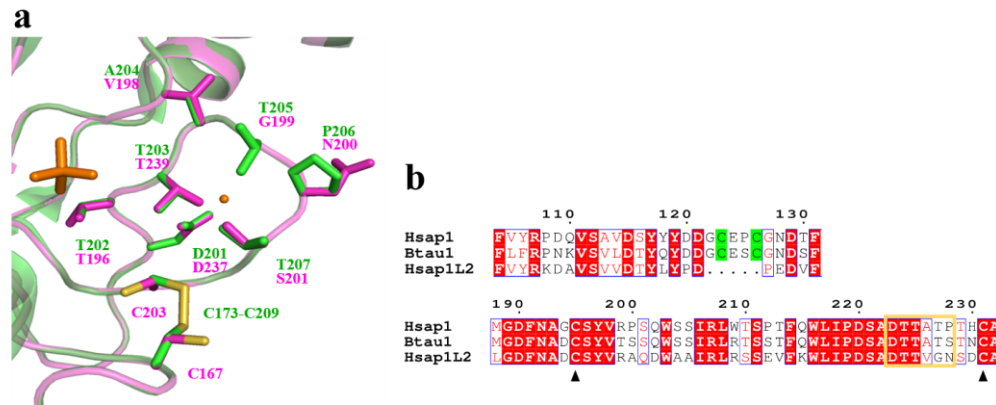


Figura 20: Ruolo dei residui amminoacidici nella protezione del ponte disolfuro. a) Sovrapposizione del modello di struttura della DNasi1L2 (carboni in verde) con la struttura della DNasi1 umana (4AWN; carboni in viola), mostra il sito I di legame al calcio. Il calcio e lo ione fosfato sono indicati in arancio. b) Porzione di allineamento della DNasi1 umana (Hsap1), DNasi1 bovina (Btau1), e DNasi1L2 umana (Hsap1L2). I residui sono numerati seguendo la DNasi1 umana. Le cisteine (C123 e C126) presenti solo nella DNasi1 sono evidenziate in verde, il ponte comune alla famiglia (C173-C209) indicato con triangoli e la regione del loop1 in cui è presente la P206 è evidenziato dal riquadro arancio.

Per studiare la resistenza della DNasi1 al trattamento, è stata analizzata la regione intorno a questo ponte disolfuro. Sono state messe a confronto le sequenze della DNasi1 e DNasi1L2 umana con la DNasi1 di *Bos taurus*, per la quale è stato riportato che il calcio è fondamentale per la stabilità strutturale dell'enzima e per la protezione del ponte disolfuro dalla riduzione.^{15 14}. A differenza della DNasi1 di *Bos taurus*, la protezione del ponte disolfuro nella DNasi1 umana sembra essere conferita dagli amminoacidi presenti nell'intorno (loop in struttura). È stata individuata una prolina in posizione 206 che potrebbe conferire rigidità e stabilità alla struttura del loop, proteggendo il ponte disolfuro. Nella DNasi1L2, non sembra formarsi un ponte disolfuro stabile, e il calcio risulta importante per la protezione dei gruppi tiolici delle cisteine dall'alchilazione che altrimenti comprometterebbe l'attività catalitica.

2.5.5 Inibizione da actina

L'actina, una delle proteine più abbondanti e altamente conservate nelle cellule eucariotiche, è un componente importante del citoscheletro in vari tipi di cellule e svolge un ruolo fondamentale nella motilità cellulare.

L'actina esiste in un equilibrio tra due forme, che sono legate ad un nucleotide ATP (o ADP), essenziale per il mantenimento dello stato nativo della proteina²³. La forma monomerica o G-actina (actina globulare) risulta essere associata all'ATP, mentre la forma polimerica o F-actina (actina filamentosa) all'ADP. La polimerizzazione/depolverizzazione dell'actina è un processo reversibile influenzato da diversi fattori come le concentrazioni di G-actina, la presenza di ATP/ADP e di cationi divalenti, principalmente magnesio e potassio, che promuovono la polimerizzazione^{134 147}.

L'actina è un forte inibitore naturale della DNasi1, la forma monomerica è in grado di inibire efficacemente l'enzima, formando un complesso stechiometrico (1 : 1); a sua volta la DNasi1 risulta essere un inibitore dell'actina, impedendo la polimerizzazione della G-actina^{23 5}.

Le concentrazioni di actina tipicamente rilevate nell'espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica è di 0.08 mg/mL, anche se sono stati riscontrati livelli variabili da 0.1 a 2 mg/mL^{134 148 149}.

La DNasi1L2, contrariamente a quanto riportato per la DNasi1, non risente dell'inibizione da actina. L'effetto inibitorio dell'actina sull'attività della DNasi1L2 è stato già analizzato nel range da 0 a 100µg/mL, e non ha mostrato alterazioni⁷.

Al fine di valutare l'inibizione da actina sulla DNasi1L2 ricombinante, l'enzima è stato incubato con actina a concentrazioni variabili nel range 0.04-0.5 mg/mL, utilizzando come substrati il DNA plasmidico superavvolto e il muco artificiale. L'inibizione è stata valutata anche sull' rhDNasi1.

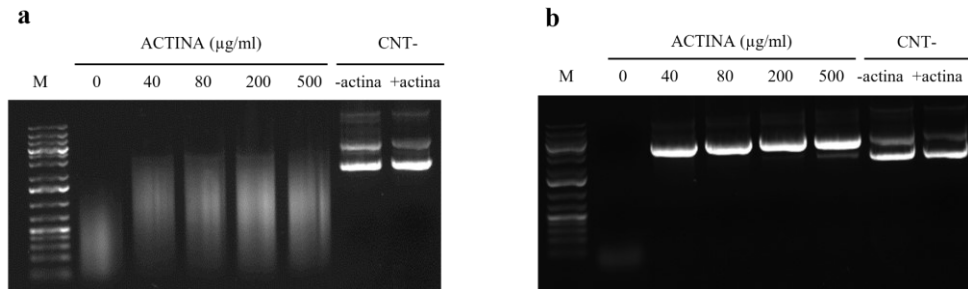
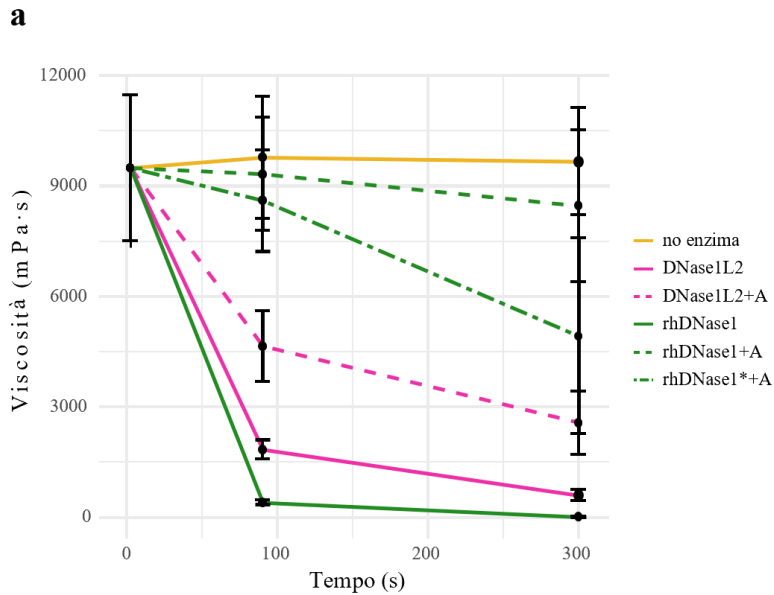


Figura 21: Effetto dell'actina sull'attività della DNasi1L2. L'elettroforesi su gel d'agarosio mostra l'effetto dell'actina sulla digestione del DNA plasmidico superavvolto ad opera delle DNasi. a) Attività endonucleasica della DNasi1L2 (0,5 units; 2 ng/µL). b) Attività endonucleasica della DNasi1 (0,5 units; 0,2 ng/µL). M: Marker DNA, CNT-: DNA plasmidico senza enzima in presenza o assenza di actina (0.2mg/mL).

Le reazioni allestite con DNA plasmidico sono state analizzate su gel d'agarosio; in presenza di 0.5 mg/mL di actina, l'attività della DNasi1L2 risulta diminuita, mentre l'attività della DNasi1 è fortemente inibita già a basse concentrazioni di actina (0.04 mg/mL) .

Per riprodurre le condizioni riscontrate nell'espettorato dei pazienti affetti da FC, è stato scelto di utilizzare il muco artificiale come substrato per la caratterizzazione dell'attività della DNasi1L2. Il muco artificiale, costituito da mucine, DNA, tuorlo d'uovo, sali e aminoacidi, ha una composizione chimico-fisica e un comportamento reologico simili a quelli dell'espettorato di pazienti FC¹⁵⁰.

La viscosità dei campioni di muco artificiale è stata misurata per 5 minuti a 37 °C, in presenza o assenza di 0.2 mg/mL di actina e in presenza o assenza di enzima. I dati ottenuti sono raccolti nella tabella (Fig.22b) e mostrati nel grafico (Fig.22a).



b

	Viscosità mPa·s (mean ± SD)	
	90 s	300 s
no enzima	9783 ± 1656	9667 ± 1457
no enzima + Actina	8141 ± 689	8171 ± 932
DNase1L2	1847 ± 263	603 ± 155
DNase1L2 + Actina	4649 ± 960	2570 ± 865
rhDNase1	410 ± 58	18 ± 16
rhDNase1 + Actina	9330 ± 1537	8469 ± 2068
rhDNase1* + Actina	8606 ± 1377	4925 ± 2663

Figura 22: DNasi1L2 riduce la viscosità del muco artificiale. Le misure di viscosità mostrano l'attività della DNasi1L2 e rhDNasi1 sul muco artificiale (CF-AM). L'attività della DNasi1L2 (5 unità: 20 ng/μL, linea rosa solida e tratteggiata) e rhDNasi1 (5 unità: 2 ng/μL, linea verde solida e tratteggiata, o 50 U: 20 ng/μL, linea verde tratteggiata) è stata testata in presenza (0,2 mg/mL) o assenza di actina (A). T0 indicato l'inizio della misurazione. I dati sono le medie ± SD di almeno due esperimenti indipendenti. I valori di viscosità (mPa s; media±SD) sono riportati nella tabella (b).

Il muco artificiale, utilizzato come controllo, ha mostrato una viscosità di 9.8 ± 1.6 Pa s, valori molto simili a quelli riscontrati nel muco di pazienti¹³⁸. Aggiungendo cinque unità di DNasi1L2 (20 ng/μL; 690 nm), dopo 90s la viscosità è stata ridotta di circa l'80%, mentre con la DNasi1 (5U, 2 ng/μL; 69 nm) è stata diminuita di circa il 95%. In presenza di actina, 5 unità di DNasi1L2 hanno ridotto la viscosità del muco del 50% dopo 90s e del 70% dopo 5 minuti; al contrario 5 unità di DNasi1 hanno ridotto la viscosità del muco del 5% dopo 90s, mentre con 50 unità di DNasi1 la viscosità è stata ridotta del 15% dopo 90s. Questi risultati hanno permesso di dimostrare che seppur la DNasi1 risulti essere più veloce nella fluidificazione del muco, la presenza di actina limita molto la sua attività. La DNasi1L2, invece, in presenza di actina si è mostrata molto più resistente e anche a parità di concentrazione risulta essere maggiormente attiva rispetto alla DNasi1.

2.6 PEGhilazione della DNasi1L2

La PEGhilazione di proteine terapeutiche è un approccio efficiente per estendere l'emivita e migliorare l'attività biologica. L'attacco covalente delle catene di polietilenglicole (PEG) permette di aumentare la massa molecolare della proteina, riducendo così la clearance renale, la degradazione da parte di enzimi proteolitici e l'immunogenicità¹⁵¹.

Inoltre, è stata dimostrata la capacità della PEGhilazione di migliorare l'efficacia di proteine terapeutiche nel trattamento di malattie respiratorie. La PEGhilazione della rhDNasi1 ha aumentato la stabilità dell'enzima nelle secrezioni di pazienti affetti da FC^{138 152}.

La DNasi1L2 ha nove lisine esposte in superficie e la proteina è stata modificata utilizzando una procedura di coniugazione "random" sui gruppi amminici delle lisine disponibili. In un primo esperimento è stato utilizzato un PEG-aldeide (PEG2k) di 2 kDa, e in un secondo esperimento un PEG-NHS di 24 monomeri funzionalizzato ad un estere attivo con NHS (N-idrossisuccinimide) (PEG-24mer) di circa 1.2 kDa. I coniugati sintetizzati sono stati purificati mediante cromatografia ad esclusione dimensionale, che ha permesso di separare la proteina PEGhilata dal PEG libero e dalla proteina non modificata, come mostrato nel cromatogramma (Fig.23a-b). La PEGhilazione è stata confermata e analizzata mediante SDS-PAGE (Fig.23c-d). L'aumento del peso molecolare e la rilevazione della proteina mediante colorazione allo iodio confermano entrambe le PEGhilazioni, con una media di tre/quattro lisine su nove modificate con successo.

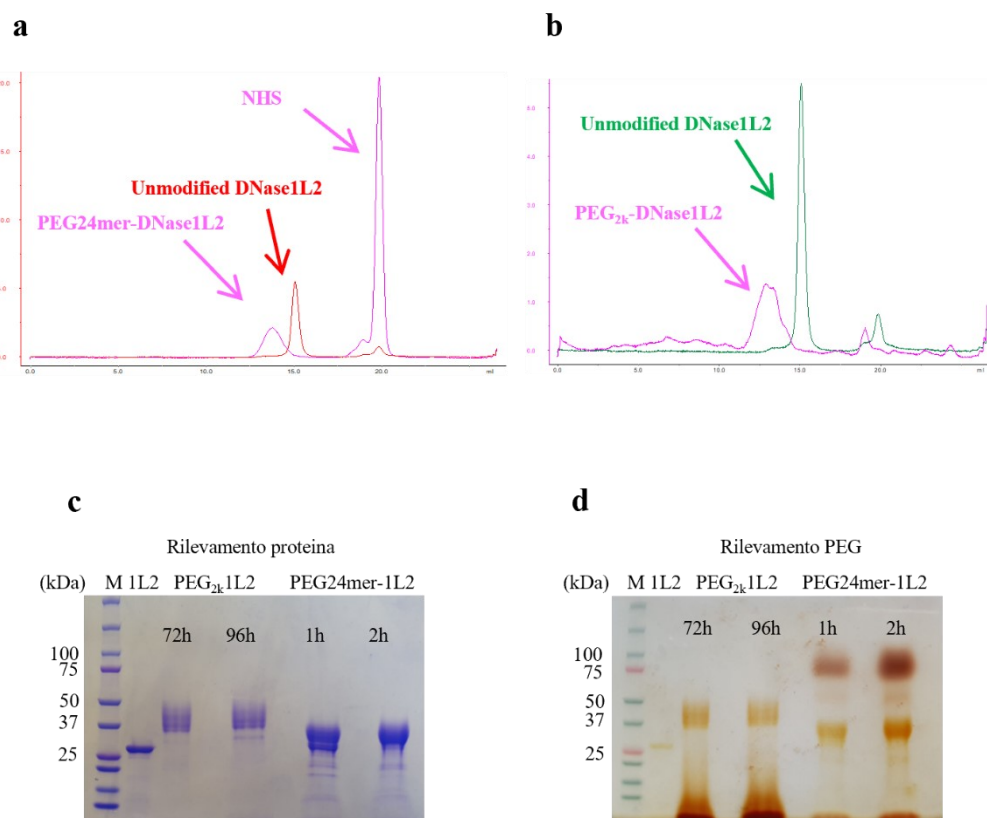


Figura 23: PEGhilazione della rhDNasi1L2. Cromatogramma della purificazione ad esclusione dimensionale della DNasi1L2, coniugata con (a) PEG-NHS: DNasi1L2 (rossa) e miscela di reazione di DNasi1L2 e PEG-NHS (rosa); e con (b) PEG2k: DNasi1L2 (verde) e miscela di reazione di DNasi1L2 e PEG2k (rosa). Nel cromatogramma sono indicati i picchi rappresentativi. Analisi SDS-PAGE della DNasi1L2 nativa e PEGhilate a diversi tempi, rilevate con colorazione Coomassie (c) e PEG-specifico con tintura allo iodio di bario (d). M: marker.

Per entrambi i coniugati (PEG2k -DNasi1L2 e PEG24mer-DNasi1L2) è stata analizzata l'attività endonucleasica su DNA plasmidico. Il coniugato PEG2k-DNasi1L2 ha mostrato una diminuzione dell'attività rispetto alla rhDNasi1L2 non modificata, mentre il PEG24mer-DNasi1L2 ha mostrato un leggero aumento dell'attività rispetto alla proteina nativa, (Fig.24a-c).

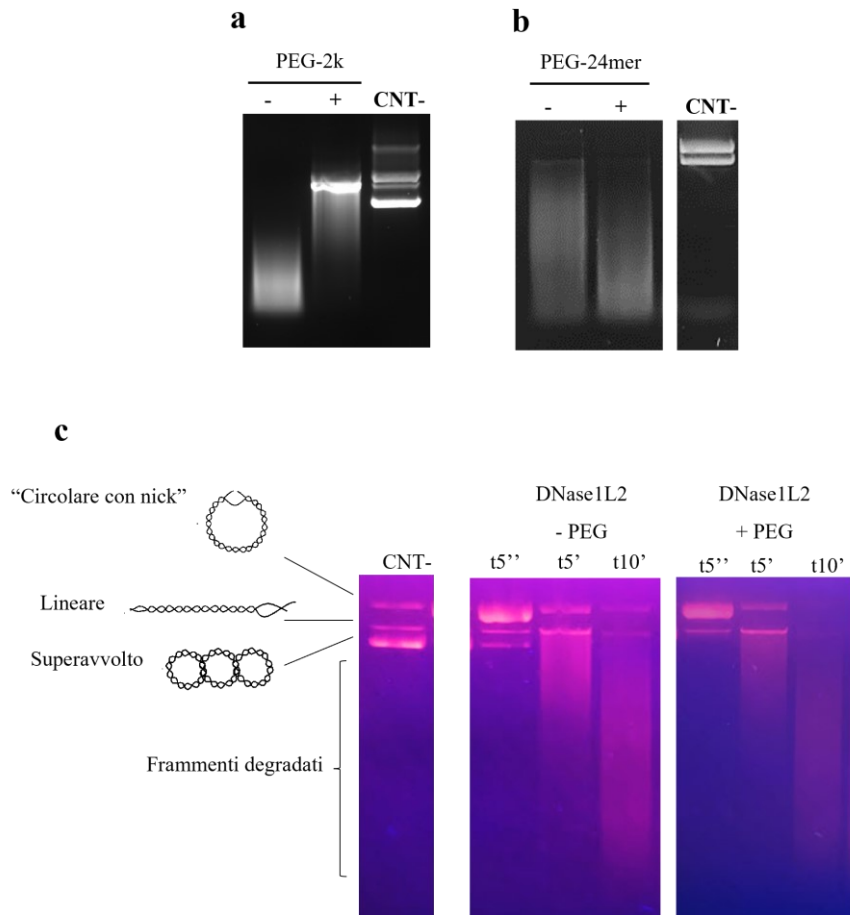


Figura 24: Effetto della PEGhilazione sull'attività della DNasi1L2. L'elettroforesi su gel d'agarosio mostra la degradazione del DNA plasmidico superavvolto. a)Attività sulla DNasi1L2 nativa e coniugata con PEG2k. b) Attività sulla DNasi1L2 nativa e coniugata con PEG-24mer. c)Andamento temporale della DNasi1L2 nativa e coniugata con PEG-24mer, a fianco la rappresentazione delle conformazioni del DNA plasmidico. CNT-:controllo negativo.

Conclusione

L'utilizzo della rhDNasi1 come agente mucolitico nei pazienti affetti da fibrosi cistica ha dato buoni risultati favorendo la fluidificazione e l'eliminazione del muco nelle vie aeree e migliorando la capacità respiratoria. Tuttavia, l'efficacia della rhDNasi1 è limitata dalla presenza di actina nel muco e dalla breve residenza dell'enzima attivo nei polmoni. Per superare questi limiti, sono state messe in atto diverse strategie, tra cui , la sintesi di nuove varianti di DNasi1 resistenti all'actina e di nuove varianti iperattive, e la coniugazione con PEG della rhDNasi1 ^{18 149 95 137}.

È interessante notare che altre DNasi umane potrebbero avere un potenziale terapeutico per la FC e superare le limitazioni della rhDNasi1. La DNasi1L2, essendo naturalmente resistente all'actina e avendo un'attività ottimale a pH acido è stata considerata un candidato promettente. Inoltre, le proprietà favorevoli di questo enzima potrebbero essere migliorate dalla coniugazione con PEG, al fine di aumentare il tempo di permanenza della proteina attiva nei polmoni.

La DNasi1L2 prodotta in forma ricombinante nel lievito *Pichia pastoris* è risultata attiva in un ampio intervallo di pH, da 4 a 8.5, con attività ottimale a pH 5.5-6. L'attività è stata osservata in presenza di ioni metallici (Ca^{2+} e Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}).

Pichia pastoris è un sistema di espressione a basso costo ed efficiente, adatto per la produzione di proteine terapeutiche, e grazie all'ottimizzazione del processo di produzione semicontinua è stato possibile ridurre i tempi di lavoro, senza compromettere la resa finale.

La DNasi1L2, rispetto alla DNasi1, è circa dieci volte più lenta nella degradazione del DNA plasmidico e nella fluidificazione del muco, nonostante ciò, in presenza di actina è risultata più attiva. In particolare, concentrazioni nanomolari di DNasi1L2 sono state sufficienti per ridurre del 50% la viscosità del muco in pochi secondi. La presenza di residui carichi negativamente (D13 e D44) coinvolti nel sito di legame al DNA giustificherebbero la ridotta attività della DNasi1L2 rispetto alla DNasi1 in assenza di actina.

La coniugazione con PEG-24mer ha permesso di mantenere invariata la struttura secondaria e terziaria della proteina. Sorprendentemente, la DNasi1L2 PEGhilata è apparsa più attiva dell'enzima nativo.

La DNasi1L2 sembra essere un ottimo sostituto alla DNasi1 poiché in vitro ha mostrato un'efficace azione mucolitica. Sono in corso esperimenti ex vivo per valutare le proprietà mucolitiche dell'enzima nativo e PEGhilato su campioni di muco di pazienti affetti da fibrosi cistica, in collaborazione con il prof. Castellani dell'ospedale "Gaslini" di Genova.

Considerando il potenziale terapeutico di questi è evidente che la ricerca è importante non solo per meglio comprendere il loro ruolo fisiologico, ma soprattutto per la possibilità di sviluppare nuove strategie terapeutiche per il trattamento di malattie in cui vi è un accumulo anomalo di DNA.

Materiali e metodi

4.1 Espressione ricombinante in *E. coli* della DNasi1L2

La sequenza codificante la DNasi1L2-L (ENST00000320700.10; Q92874-1) e la DNasi1L2-S (ENST00000382437.8; Q92874-2) sono stati acquistati da Genscript (USA Inc.), prive del peptide segnale e clonate nel vettore di espressione pET-29b di *E. coli* fuse all'N-terminale con l'His-tag.

Per il clonaggio e la propagazione plasmidica, i costrutti sono stati elettroporati separatamente nel ceppo XL1B di *E. coli*, cellule competenti a massima efficienza di trasformazione. In seguito, per l'analisi dell'espressione della proteina, i costrutti sono stati trasformati separatamente nelle cellule competenti di *E. coli* BL21 (DE3), cellule competenti ad alta efficienza di espressione di proteine eterologhe, sempre mediante elettroporazione.

Le cellule ricombinanti sono state coltivate nel terreno di coltura Luria-Bertani (LB) (triptone 10 g/L, NaCl 10 g/L ed estratto di lievito 5 g/L), integrate con gli antibiotici appropriati (50 µg/mL di kanamicina e 34 µg/mL di cloramfenicolo). Raggiunto un OD600 tra 0.5-0.7, l'espressione delle proteine è stata indotta con 0.5 mM e 1 mM isopropile β-D-tiogalattoside (IPTG), a diverse temperature (20°C, 30°C, e 37°C), per 6, 16 e 24 ore.

Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 4500 g per 15 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato risospeso in buffer di lisi (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazolo 10 mM pH 7.4) in presenza di lisozima (1 mg/mL) e PIC (100X) (protein inhibitor cocktail), per favorire la rottura della parete cellulare e inibire proteasi interne.

La lisi cellulare è stata eseguita mediante sonicazione con una sonda "macrotip". La sospensione cellulare è stata sottoposta a 30 cicli di sonicazione di 1 secondi l'uno, intervallati da 1 secondi di riposo in acqua e ghiaccio. Fa seguito una centrifuga di 30 minuti a 4 °C a 14000 rpm per separare la componente solubile da quella insolubile. Tutte le frazioni sono state raccolte e caricate su SDS-PAGE al 12% per essere analizzate dopo corsa elettroforetica mediante colorazione di Coomassie blue.

La proteina ricombinante risultata insolubile è stata recuperata dai corpi di inclusione, che sono stati sottoposti a denaturazione e successiva purificazione mediante cromatografia di affinità

4.2 Purificazione corpi di inclusione DNasi1L2

I corpi di inclusione, contenenti la proteina ricombinante sono stati solubilizzati in tampone denaturante con 6 M Urea, 25 mM Tris pH 7.8 e 2 mM β-mercaptoetanolo (βME), e la soluzione è stata caricata nella colonna Hitrap Q HP column (GE Healthcare). La proteina denaturata è stata ripiegata in colonna con un gradiente lineare di urea (6-0M) e purificata mediante cromatografia a scambio anionico con gradiente lineare di NaCl (0-1M).

La proteina eluita è stata raccolta e conservata a 4 °C fino a testare l'attività endonucleasica.

4.3 Clonazione e integrazione in *Pichia pastoris*

Le sequenze codificante la DNasi1L2-L (ENST00000320700.10; Q92874-1), la DNasi1L2-S (ENST00000382437.8; Q92874-2) e la DNasi2b (ENST00000370662.3; Q8WZ79-2), tutte prive del peptide segnale previsto, sono state clonate nel vettore pPIC9K di *P. pastoris*, in frame alla sequenza del fattore alfa ("α-mating factor" di *Saccharomyces cerevisiae*) (Genscript, USA).

I tre costrutti (pPIC9K-DNasi1L2-Long, pPIC9K-DNasi1L2-Short e pPIC9K-DNasi2b) sono stati trasformati, separatamente, nelle cellule XL1B di *E. coli* mediante elettroporazione, per propagare il DNA plasmidico, grazie alla presenza di un'origine PUC di replicazione in pPIC9K. In seguito, i costrutti sono stati estratti e purificati mediante lisi alcalina con kit commerciale (FMB fisher molecular biology).

Il ceppo di *P. pastoris* GS115 utilizzato ha una mutazione nel gene dell'istidina deidrogenasi (*HIS4*) che inibisce la sintesi di istidina, mentre il plasmide di espressione pPIC9K contiene il gene *HIS4* che reverte la mutazione quando integrato nel genoma del lievito, permettendogli di crescere in un terreno contenente istidina. Le cellule elettrocompetenti GS115 (*HIS4*-) di *P. pastoris* sono state preparate secondo il manuale Easyselect Pichia. Al fine di consentire e aumentare l'efficienza dell'integrazione del DNA plasmidico nel genoma dell'ospite, il costrutto prima di essere introdotto nelle cellule GS115 di *P. pastoris*, è stato linearizzato. Per permettere la generazione di entrambi fenotipi ricombinanti, la linearizzazione del vettore è stata eseguita, sulla regione del promotore AOX1 e all'interno del gene *HIS4*.

20 µg di ogni costrutto sono stati linearizzati con gli enzimi di restrizione Sall e BglII (Thermo Fisher Scientific) per generare ricombinanti Mut+ e MutS. Il vettore (pPIC9K) senza inserto è stato linearizzato con gli stessi enzimi ed è stato utilizzato come controllo negativo. 10 µg di ogni vettore linearizzato è stato trasformato in 80 µl di cellule di *P. pastoris* GS115 elettrocompetenti, secondo il protocollo Invitrogen. Inizialmente, le cellule sono state piastrate su un terreno solido minimo al destrosio, carente in istidina (MD; 0.4 µg/ mL biotina, 1.34% di base di azoto lievito senza amminoacidi, 2% destrosio, e 1.5% agar) e incubato a 30°C per 2 giorni fino a quando sono apparsi i trasformanti His+. Le colonie ottenute sono state analizzate mediante PCR utilizzando i primer di sequenziamento 5'- AOX1 e 3-AOX1 (5'AOX1: 5'-GACTGGTTCCAAT TGACAAGC-3'; 3'AOX1:5'-GCAAATGATTCTGACATCC-3'). In breve, ogni colonia His+ è stata raccolta e risospeso in 25 µL di tampone PCR (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2 mM EDTA). In seguito, il volume è stato regolato per raggiungere un OD600 finale tra 4 e 12, il campione è stato bollito a 96°C per 3 minuti e centrifugato a 14000 giri al minuto per 1 minuto. 2 µL di supernatante è stato utilizzato per la PCR da 50 µL.

Per tutti i costrutti pPIC9K-DNasi1L2-Long, pPIC9K-DNasi1L2-Short e pPIC9K-DNasi2b, nei Mut+ sono state amplificate due bande, uno corrispondente alle dimensioni del gene della DNasi1L2-Long (854 bp), DNasi1L2-Short (791 bp) e DNasi2b (462 bp) più un frammento del gene *AOX1* inserito in pPIC9K (492 bp) (1L2-L: 854 bp + 492 bp, 1L2-S: 791 bp + 492 bp e 2b: 462bp + 492 bp) e l'altro corrispondente al gene *AOX1* nel cromosoma di *P. pastoris* (2.2 kb). Nei MutS è stata amplificata una banda corrispondente alle dimensioni del gene DNasi1L2-Long, DNasi1L2-Short e DNasi2b più il gene *AOX1* inserito in pPIC9K (1L2-L: 854 bp + 492 bp, 1L2-S: 791 bp + 492 bp e 2b: bp + 492 bp). Il controllo negativo utilizzato è il prodotto di PCR delle cellule GS115, con l'amplificazione del gene *AOX1* nel genoma di *P. pastoris* (2.2 kb).

I risultati ottenuti mediante PCR sul costrutto pPIC9K-DNasi2b mostrano la presenza di amplicone non atteso tra 1000-1500 bp. La correttezza della sequenza è stata ulteriormente verificata e confermata mediante sequenziamento Sanger.

4.4 Espressione ricombinante in *Pichia pastoris*

Il protocollo standard di espressione di proteine ricombinanti in *P. pastoris* prevede inizialmente la crescita delle colture in eccesso di glicerolo, reprimendo l'espressione della proteina, seguita da una fase di induzione con metanolo per avviare l'espressione proteica eterologa. BMG, BMM, BMGY e BMMY

sono solitamente usati per esprimere le proteine secrete, particolarmente se il pH è importante per l'attività della proteina, perché essendo tamponi fosfati è possibile utilizzare diversi valori di pH per ottimizzare la produzione della proteina. BMGY e BMMY contengono estratto di lievito e peptone per stabilizzare le proteine secrete e per prevenire o diminuire la proteolisi delle proteine secrete. L'inclusione di estratto di lievito e peptone permette anche una migliore crescita e accumulo di biomassa.

4.4.1 Espressione su piccola scala

L'espressione proteica è stata condotta su piccola scala per individuare le condizioni ottimali di espressione. I cloni giudicati dalla PCR sono stati inoculati e coltivati a 29°C in 5 mL di terreno minimo contenente glicerolo (BMG; 1% glicerolo, tampone potassio fosfato 100 mM pH 6.0, 1.34% di base azotata di lievito, e 0.4 µg/ mL biotina) o terreno minimo complesso contenente glicerolo (BMGY; 1% estratto di lievito, 2% peptone, 1.34% di base azotata di lievito, 0.4 µg/ mL biotina, 1% glicerolo, e 100 mM tampone potassio fosfato pH 6.0) fino a quando le cellule non raggiungono un OD finale a 600 nm di 2-6 (log-fase di crescita). In seguito, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 1500-3000 x g per 6 minuti a temperatura ambiente. Il pellet cellulare è stato risospeso ad OD₆₀₀ di 1.0 per i Mut⁺ e 1/15 del volume iniziale per i Mut^S, con terreno minimo contenente metanolo (BMM; 0.5% metanolo, 100 mM tampone potassio fosfato pH 6.0, 1.34% di base azotata di lievito e 0.4 µg/mL biotina) o in terreno complesso contenente metanolo (BMMY; 1% estratto di lievito, 2% peptone, 0.5% metanolo, 100 mM tampone potassio fosfato pH 6.0, 1.34% di base di azoto lievito, e 0.4 µg/ mL biotina) per indurre l'espressione proteica. L'induzione è stata condotta a 28° e 30° C in un'incubatrice agitando le colture a 250-300 rpm, per 24-120 h, aggiungendo diverse concentrazioni di MeOH (0.5-1.5%) ogni giorno. Per controllare l'espressione di fondo sono state utilizzate le cellule GS115 di *P.pastoris* trasformate con il vettore vuoto e indotte.

Ogni 12-24 ore sono state prelevate delle aliquote di coltura cellulare per monitorare l'espressione intracellulare e secreta. Ogni campione è stato centrifugato, il surnatante recuperato e concentrato con un concentratore centrifugo con filtro da 30 kDa (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA), il pellet di cellule è stato risospeso in 1% SDS e fatto bollire per 10 min. Di ognuno, 50 µL di supernatante concentrato e 10 µL di lisato cellulare sono stati caricati su gel SDS-PAGE al 12% e visualizzati mediante colorazione Coomassie.

Per l'espressione su piccola scala della DNasi1L2-L, della DNasi1L2-S e della DNasi2b sono state testate 20/30 colonie di ogni costrutto. Il clone con il più alto livello di espressione è stato selezionato per l'espressione su larga scala.

Per l'analisi della frazione intracellulare, i pellet cellulari sono stati lisati e in seguito caricati su SDS-PAGE per valutare i livelli di espressione. I campioni analizzati sono stati concentrati di dieci volte per poter osservare anche livelli molto bassi.

4.4.2 Espressione su larga scala della DNasi1L2-S

Per l'espressione su larga scala, una singola colonia del clone selezionato (pPIC9K-DNasi1L2-S, His⁺ Mut⁺) è stata inoculata in 25 mL di BMGY e cresciuta a 30°C over-night in agitazione (250-300 rpm). Il giorno seguente, la coltura è stata utilizzata per inoculare 1L di terreno BMGY fresco e coltivato a 30°C in agitazione (300 rpm). Raggiunto un OD₆₀₀ di 5.0, le cellule sono state raccolte, risospese ad un OD finale di 1.0 per i Mut⁺ e 1/15 del volume iniziale per i Mut^S, nel terreno BMMY e coltivate a 30°C. Per mantenere l'induzione dell'espressione, il metanolo è stato aggiunto ogni 24h ad una concentrazione finale di 0.5% per 3 giorni. Trascorse 72 ore di induzione in MeOH, le cellule sono

state centrifugate a 3.000 g per 10 minuti a temperatura ambiente, il supernatante è stato concentrato con un concentratore centrifugo con filtro da 30 kDa (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) e conservato a 4°C fino alla purificazione.

Per la produzione semicontinua, la proteina è stata espressa secondo le condizioni sopra descritte; trascorse le 72h la coltura è stata centrifugata in modo da separare e prelevare la frazione solubile; il pellet cellulare è stato risospeso in terreno liquido BMMY fresco, aggiungendo MeOH al 3%; quindi, la coltura è stata posta in incubatore per altre 72h.

4.5 Purificazione della DNasi1L2-S

La DNasi1L2-S è stata purificata in due fasi con due cromatografie, la prima a scambio anionico e la seconda ad esclusione dimensionale.

Per la cromatografia a scambio anionico, il supernatante concentrato è stato caricato, ad una portata di 4-5 mL min⁻¹, su una colonna Q Sepharose FF (GE Healthcare) precedentemente equilibrata con NaH₂PO₄ 50 mM a pH 7.5 e purificata con il sistema AKTA FPLC. La colonna è stata lavata con lo stesso tampone e la proteina legata è stata eluita con un gradiente a due stadi di 2 M NaCl. Il primo da 0-12% e il secondo da 12-20%. L'eluizione è stata monitorata attraverso l'assorbanza a 280 nm. I campioni sono stati raccolti in varie fasi durante la purificazione, analizzati su gel SDS-PAGE al 12% e visualizzati con colorazione di Coomassie.

Le frazioni contenenti la proteina purificata sono state raggruppate e concentrate utilizzando un concentratore centrifugo con filtro da 30 kDa (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA). La proteina concentrata è stata sottoposta alla seconda fase di purificazione; quindi, è stata caricata su una colonna di esclusione dimensionale Superdex 200 10/300 HL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), collegata al sistema AKTA FPLC pre-equilibrato con soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) e 1 mM CaCl₂. La cromatografia è stata eseguita ad una portata di 0.5 mL/min, la proteina eluita è stata monitorata mediante assorbanza a 280 nm e analizzata su SDS-PAGE al 12%. Le frazioni proteiche del picco sono state raccolte e concentrate utilizzando un concentratore vivaspin con filtro da 10 kDa (Merck-Millipore). La concentrazione finale di proteine è stata stimata misurando l'assorbanza a 280 nm attraverso spettri UV visibili ($\epsilon = 33\ 114\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La proteina è stata divisa in piccole aliquote e conservata a -20°C.

4.6 Preparazione substrati per saggi di attività endonucleasica in vitro

4.6.1 DNA plasmidico

Il DNA plasmidico pGEM-T di circa 3000 bp è stato trasformato in cellule XL1B di *E. coli* mediante elettroporazione. Le cellule trasformate sono state piastrate in terreno solido LB agar con 50 µg/mL di ampicillina a 37°C over-night.

Il giorno seguente una colonia è stata inoculata in 10 mL di LB fresco addizionato di opportuni antibiotici e fatta crescere tutta la notte a 37°C. La coltura è stata centrifugata a 8000 g e il plasmide isolato dal precipitato cellulare mediante lisi alcalina¹⁵³; quindi, il pellet è stato risospeso in 1,5 mL di tampone TE (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) contenente 100 µg/mL di RNaseA (Sigma, Kawasaki, Giappone), e lisato aggiungendo 1.5 mL di tampone (0.2 M NaOH, 1% SDS). La soluzione viene miscelata per inversione e successivamente neutralizzata aggiungendo 1.5 mL di acetato di potassio 3 M pH 5.5. Segue una centrifuga a 14.000 giri al minuto per 10 minuti a 4 °C. Il supernatante viene recuperato e precipitato con 0.7 volumi di isopropanolo, lavato con etanolo al 70% freddo e

asciugato a 45-50°C. il pellet, infine, viene risospeso in acqua DNasi-free e conservato a -20°C. La qualità e la concentrazione del DNA plasmidico sono state analizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% e analisi spettrofotometriche misurando il rapporto A_{260}/A_{280} per valutare la purezza del campione e A_{260} per la concentrazione.

4.6.2 Muco artificiale

Il muco artificiale mima le condizioni riscontrabili nell'espettorato dei pazienti affetti da fibrosi cistica. Per la preparazione di 10mL di muco artificiale, il primo giorno sono stati sciolti 50 mg di mucina in 2.5mL di acqua priva di DNasi, posti in agitazione per 2h e conservati a 4° C. Il secondo giorno è stato preparato il DNA, 100 mg sono stati dissolti in 6.5mL di acqua priva di DNasi e conservati a 4° C. Infine, dopo 24h le mucine e il DNA sono stati mescolati insieme a 50 mg di NaCl, 22 mg di KCl, 50 µl di emulsione di tuorlo d'uovo e 200 µl di amminoacidi RPMI 1640 (Sigma). La dispersione è stata equilibrata per 2 ore a 25°C ed è stata utilizzata entro 24 ore.

4.7 Saggio di attività endonucleasica della DNasi1L2

L'attività endonucleasica della DNasi1L2 è stata analizzata in vitro utilizzando come substrato il DNA plasmidico superavvolto (pGEM-T plasmid 3000 bp). Le reazioni sono state analizzate in triplicato, il substrato non degradato rilevato è stato quantificato mediante analisi densitometrica e i dati sono stati plottati nel grafico come attività relativa della DNasi.

Il DNA, dopo corsa elettroforetica, è stato visualizzato e fotografato al ChemiDoc® imager (Biorad, Hercules, CA, USA). La quantificazione è stata effettuata mediante analisi densitometrica con Image Lab software (Biorad, Hercules, CA, USA), utilizzando come controllo 200 ng di plasmide superavvolto. L'attività relativa della DNasi è stata espressa come percentuale e calcolata come la differenza di degradazione plasmidica rispetto a un controllo che non contiene DNasi, a cui è stato assegnato il valore di zero (0%). In questo studio, è stato definito che 1 unità di enzima, che corrisponde a 40 ng di DNasi1L2 e 4 ng di rhDNasi (Pulmozyme; Roche, Basel, Switzerland), è richiesta per degradare 200 ng di DNA plasmidico superavvolto in 2 minuti a 37 °C.

L'attività in condizioni standard è stata analizzata con 0.5 unità di DNasi1L2 ricombinante (2 ng/µL; 69 nm), 20 ng/µL di DNA plasmidico pGEM-T, 3 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, in 50 mM Mes-NaOH a pH 5.6. Le reazioni vengono allestite a temperatura ambiente e successivamente con l'aggiunta della DNasi incubate a 37 °C per 10 minuti.

L'attività della DNase1L2 è stata caratterizzata a diverse concentrazioni di cationi divalenti (0, 1, 3, 6 e 12 mM) di MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂ e CoCl₂, e in un intervallo di pH tra 4-8.5, utilizzando i seguenti tamponi: 50 mM sodio acetato (pH 4.0-pH 4.5), 50 mM MES-NaOH (pH 5.0-pH 7.0), e 50 mM Tris-HCl (pH 7.5-pH 8.5).

Per l'analisi dell'effetto inibitorio dell'actina, diverse concentrazioni di G-actina (Biovision, Inc.) (0, 40, 80, 200 e 500 µg/mL) precedentemente risospesa in 5 mM Tris-HCl pH 8, 0.2mM CaCl₂, 0.2mM ATP, sono state incubate con 0.5 unità di DNasi1L2 (2 ng/µL; 69 nm) a temperatura ambiente per 10 minuti. 20 ng/µL di plasmide superavvolto più 3 mM CaCl₂ e 3 mM MgCl₂ sono stati aggiunti alle reazioni e sono stati incubati a 37°C per 10 minuti.

L'attività della rhDNasi1 è stata analizzata con 0.5 unità di Pulmozyme (Roche; 0.2 ng/µL; 6.9 nm), 20 ng/µL di plasmide superavvolto in 50 mM Tris-HCl pH 7 contenente 3 mM CaCl₂ e 3 mM MgCl₂. Alle reazioni è stato aggiunto 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03% blu bromofenolo, 0.03% cianolo xilene, 60% glicerolo, e 60 mM EDTA e aliquote di 10 µl sono state caricate su gel d'agarosio all'1% per analizzarle.

4.8 Misure di viscosità del muco artificiale

Le misure di viscosità sono state effettuate con reometro MCR 302 (Anton Paar, Graz, Austria), con piastre a temperatura controllata a 37 °C e la velocità di taglio fissata a 1 s⁻¹.

Il CF-AM è stato equilibrato a temperatura ambiente, 250 µL del substrato sono stati caricati sulla piastra inferiore del reometro, sono stati aggiunti cinque unità di DNasi1L2 (20 ng/µL; 690 nm) o rhDNasi (2 ng/µL; 69 nm), entrambi in 5 mM di Tris-HCl pH 8, 3 mM di MgCl₂ e 3 mM di CaCl₂, e precedentemente incubati con 200 µg/mL di actina, Rabbit Muscle (Biovision, Inc.) in 5 mM Tris-HCl pH 8, 0.4 mM ATP per 10 minuti a temperatura ambiente. La viscosità dei campioni è stata misurata per 10 min in modo continuo.

4.9 Alchilazione e riduzione delle cisteine

Per analizzare il ruolo delle cisteine presenti in sequenza, aliquote di DNasi1L2 e rhDNasi (Pulmozyme; Roche, Basilea, Svizzera) sono stati scambiati in una soluzione tampone contenente 20 mM Tris-HCl pH 7.5 e 5 mM EDTA, utilizzando le colonne G-25 PD Spintrap (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) per eliminare eventuali presenze di cationi divalenti; quindi 14 µM di DNasi1L2 e rhDNasi in PBS con 1 mM CaCl₂ o in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 e 5 mM EDTA sono stati incubati prima con 0 o 100 mM di βeta-Mercaptoetanolo a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente, i campioni sono stati incubati al buio con 0 o 5 mM di iodoacetamide (IAM) per 30 min. Le miscele di reazione contenenti le proteine sono state poi scambiate in 20 mM Tris-HCl pH7.5, utilizzando colonne PD Spintrap G-25 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). 0.5 unità di enzima trattato sono state incubate con 20 ng/µL di DNA plasmidico, 3 mM CaCl₂ e 3 mM MgCl₂ per analizzare l'attività.

Le concentrazioni di proteine sono state determinate per assorbanza a 280 nm ($\epsilon_{280} = 32890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per DNasi1L2; $\epsilon_{280} = 46090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per rhDNasi), e l'attività delle DNasi è stata visualizzata su gel di agarosio all'1% dopo corsa elettroforetica.

4.10 PEGhilazione proteica

Le reazioni sono state effettuate in fiale, con PEG24mer-NHS (Iris Biotech) precedentemente sciolto in DMSO e mPEG-CHO 2 kDa (Iris Biotech) in PBS pH 7.4. Il PEG24mer-NHS (Iris Biotech) viene aggiunto due volte (al tempo 0 e dopo 1h) alla DNasi1L2 in PBS, con un rapporto molare [PEG]:[proteina] di 50:1, la reazione viene posta in agitazione per 2h a 25 °C. Il mPEG-CHO 2 kDa viene aggiunto alla DNasi1L2 in PBS con un rapporto molare [PEG]:[proteina] di 60:1; dopo 1h, 100 equivalenti di NaCN BH₃ (rispetto la proteina) sono stati aggiunti alla reazione incubata a 37 °C in agitazione per 72h. I coniugati sono stati purificati mediante cromatografia di esclusione dimensionale; quindi, le reazioni sono state caricate, separatamente, ad una portata di 0.5 mL/min su una colonna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) precedentemente equilibrata con PBS e 1 mM CaCl₂ e purificata con il sistema AKTA FPLC (GE Healthcare). I coniugati PEGhilati della DNasi1L2 sono stati eluiti monitorando l'assorbanza a 280 nm e le frazioni raccolte sono state concentrate con Vivaspin 15 PES (cut-off 10 kDa, Sartorius Stedim Lab.). Il grado di PEGhilazione della proteina è stato controllato su SDS PAGE al 12%. Il gel è stato colorato con il colorante Coomassie blue per rilevare la presenza della proteina e con ioduro di bario per il rilevare i coniugati PEGhilati. La concentrazione della proteina coniugata è stata determinata mediante assorbimento a 280 nm utilizzando il coefficiente di estinzione della proteina nativa ($\epsilon_{280} = 32890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). DNasi1L2-

PEG24mer e DNasi1L2-PEG2k sono stati conservati a -20 °C ed è stata analizzata l'attività nelle stesse condizioni di reazione utilizzate per l'enzima nativo.

Materiale supplementare

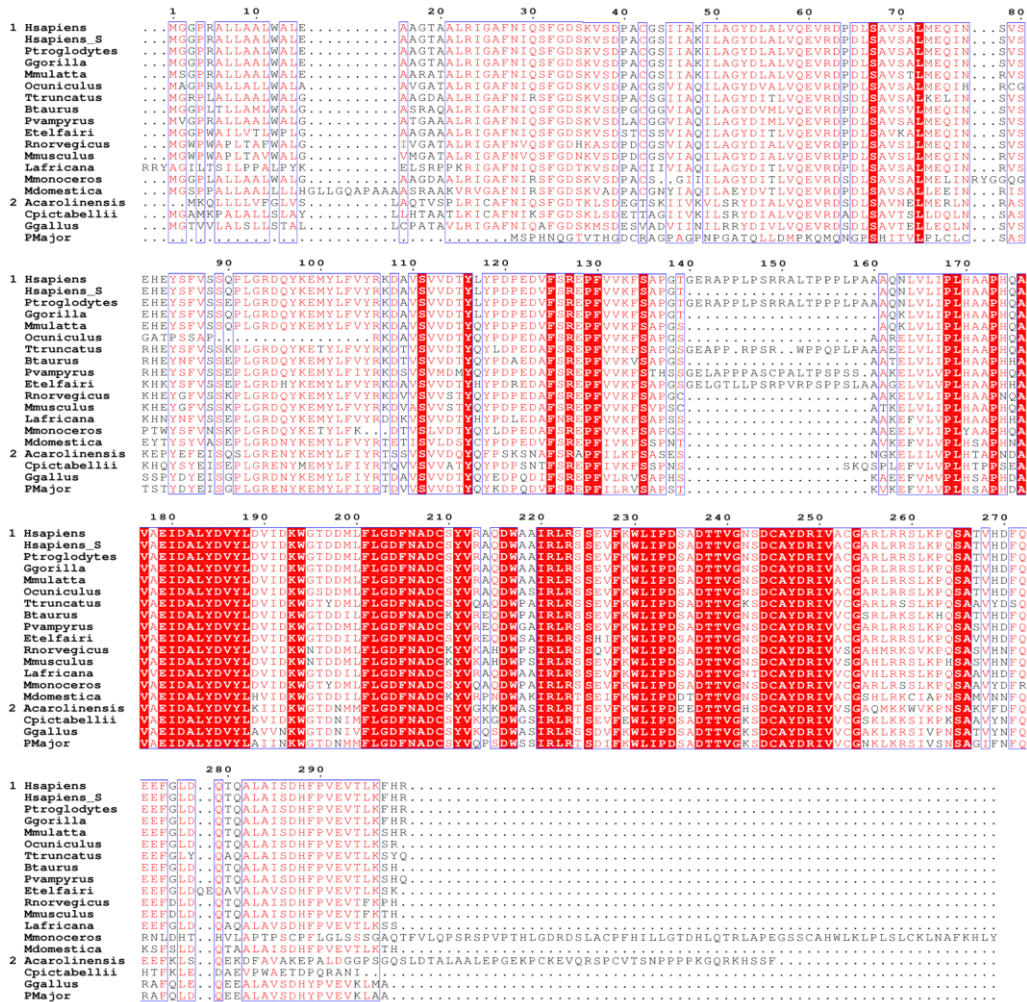
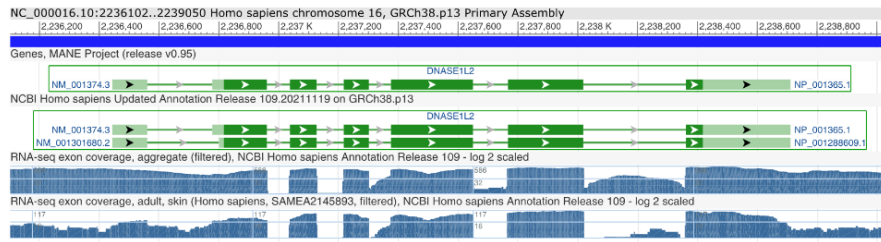
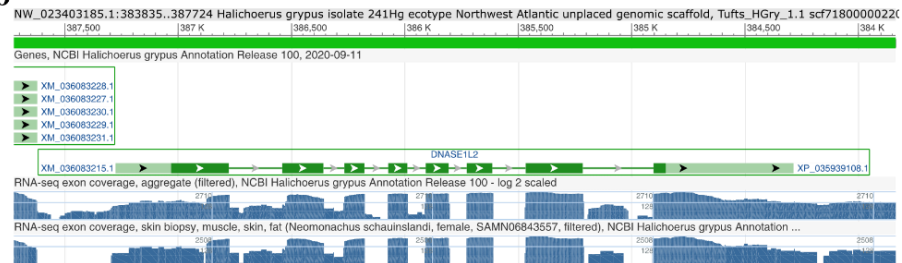


Figura Supplementare S2: Allineamento completo DNase1L2. Allineamento sequenze della DNase1L2 di mammiferi (gruppo 1) e saurospidi (gruppo 2) che mostra la conservazione del dominio ricco in proline presente in alcuni mammiferi. I residui sono numerati seguendo la DNase1L2 umana.

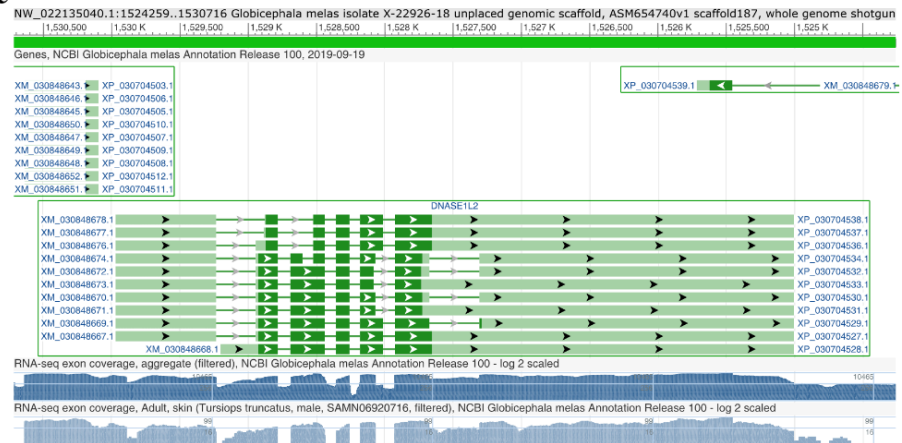
a



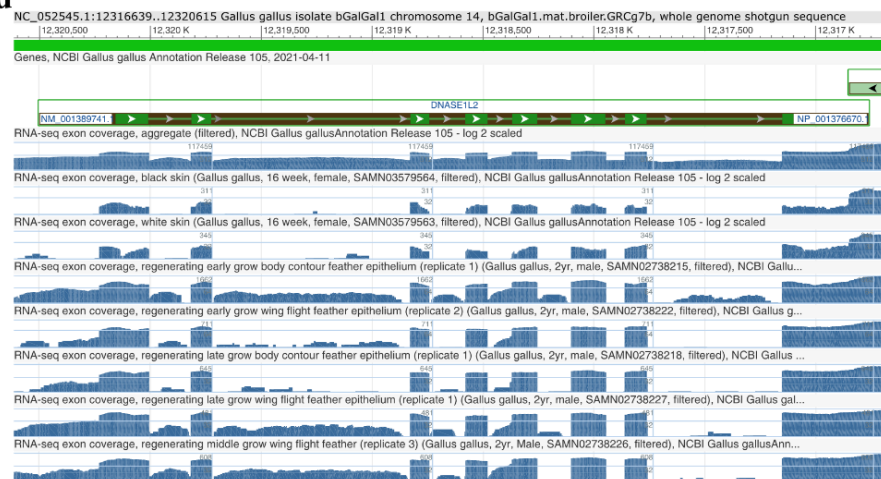
b



c



d



e

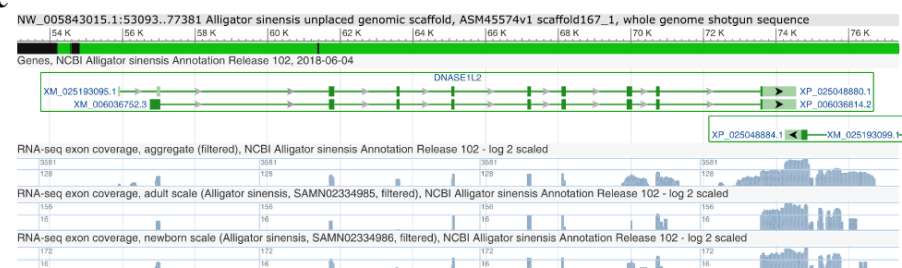


Figura Supplementare S3: Dati RNA-seq DNasi1L2 di mammiferi, uccelli e rettili. Livelli di espressione genica della DNasi1L2 nella pelle di *Homo sapiens* (a), *Halichoerus grypus* (b), *Globicephala melas* (c), nelle piume di *Gallus gallus* (d) e squame di *Alligator sinensis*, derivati da dati di RNA-seq estratti da NCBI.

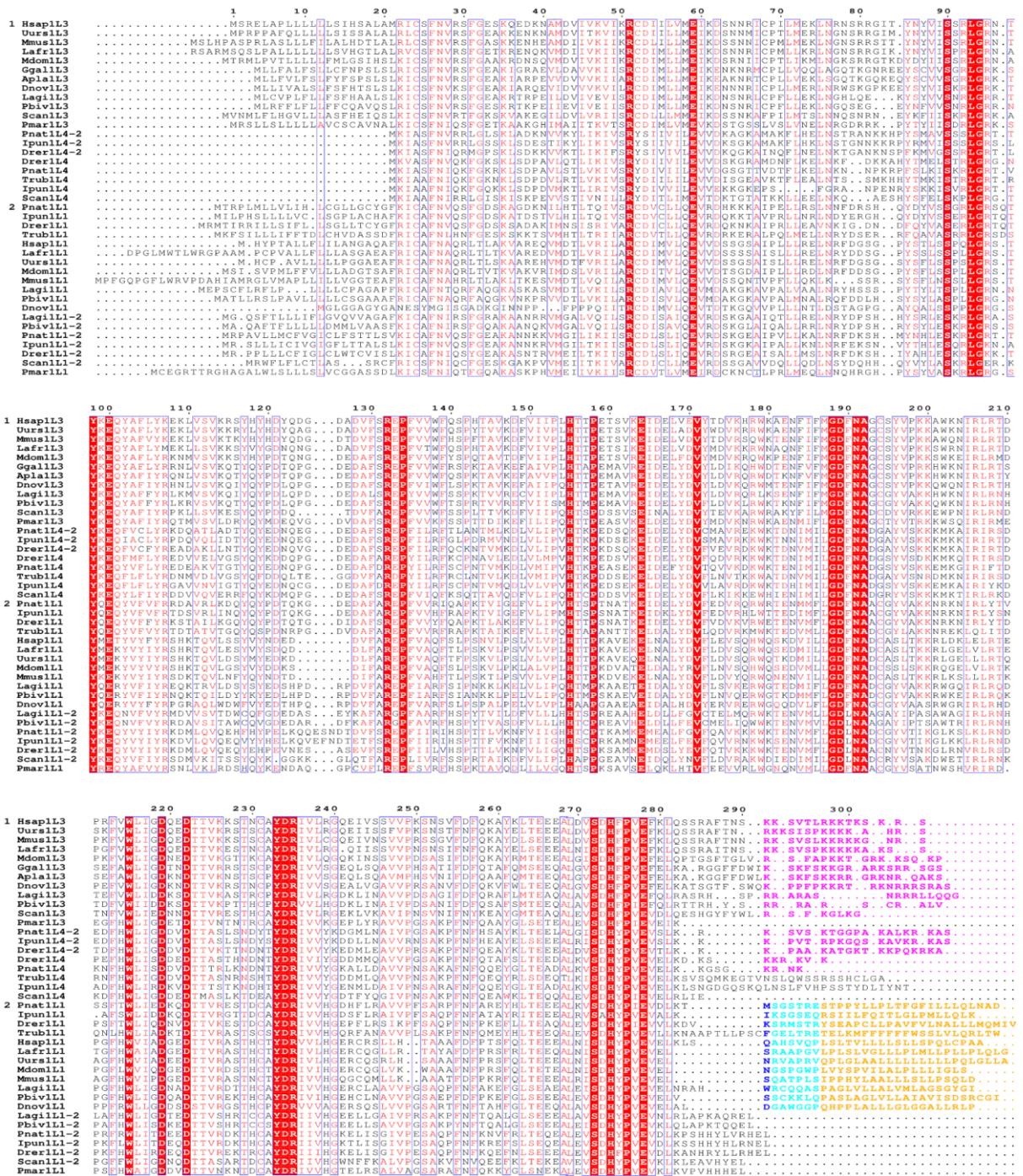


Figura Supplementare S4: Allineamento completo delle sequenze delle DNasi 1L1/1L1-2/1L3/1L4 dei vertebrati. L'allineamento multiplo mostra le differenze all'estremità C-terminale dei quattro sottogruppi. L'allineamento è stato modificato manualmente per evidenziare al meglio la conservazione del dominio basico tra DNasi1L3 e DNasi1L4 e mettere in evidenza la GPI predetta tra le DNasi1L1. Gli amminoacidi colorati in rosa indicano i residui basici, in blu il sito ω predetto, in celeste la regione distanziatrice (da ω+1 a ω+6), e in arancio la coda idrofobica (fino a ω+7).

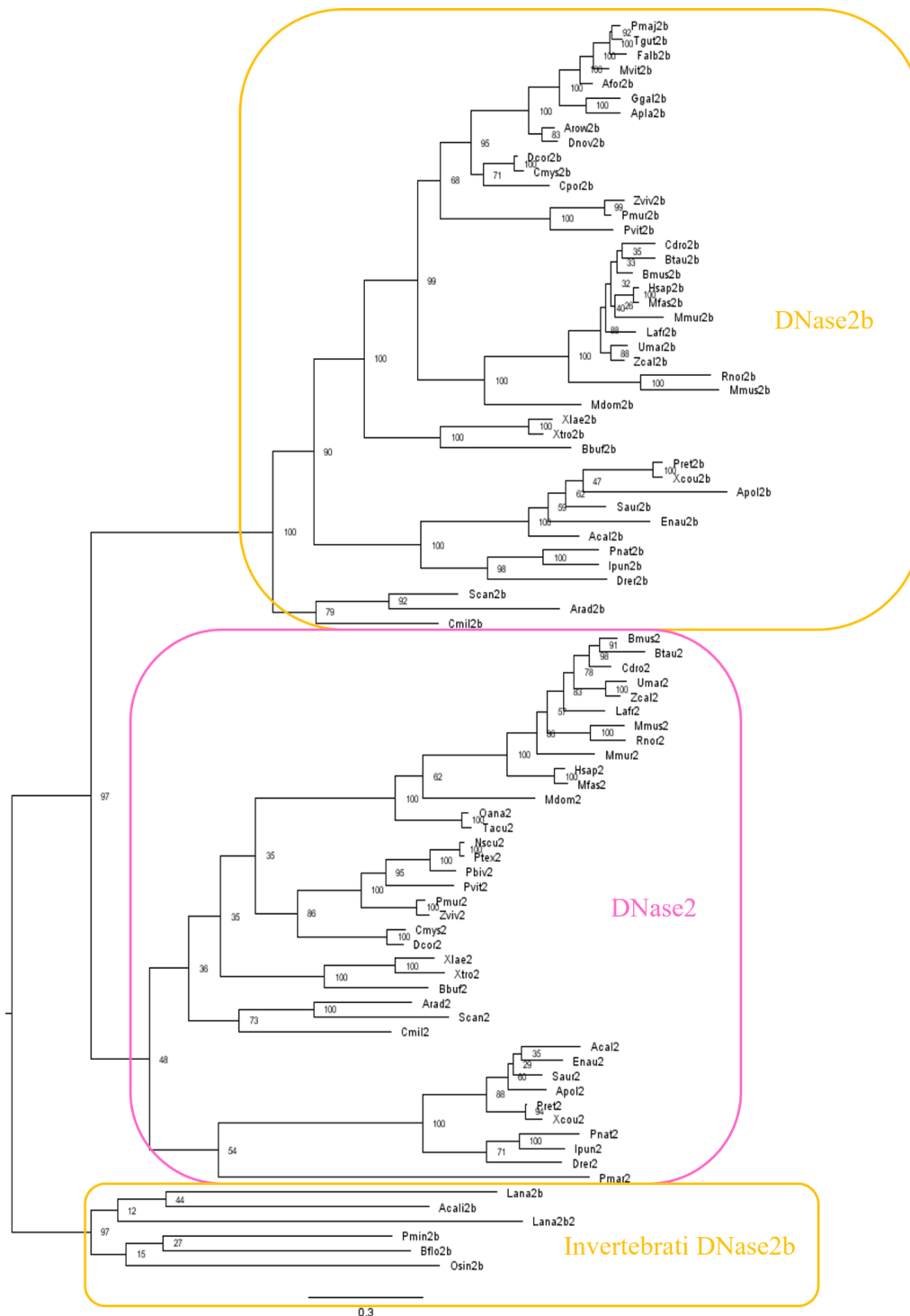


Figura Supplementare S5: Filogenesi famiglia delle DNasi2. Albero di verosimiglianza costruito con 86 sequenze di DNasi2 di metazoi. Le sequenze sono indicate con il nome del taxon abbreviato seguito dal nome della DNasi, in accordo con la nostra classificazione. Sulle sequenze degli invertebrati è stata fissata la radice dell'albero. I valori di Bootstrap sono indicati nei nodi interni. Scala bar, sostituzione/sito.

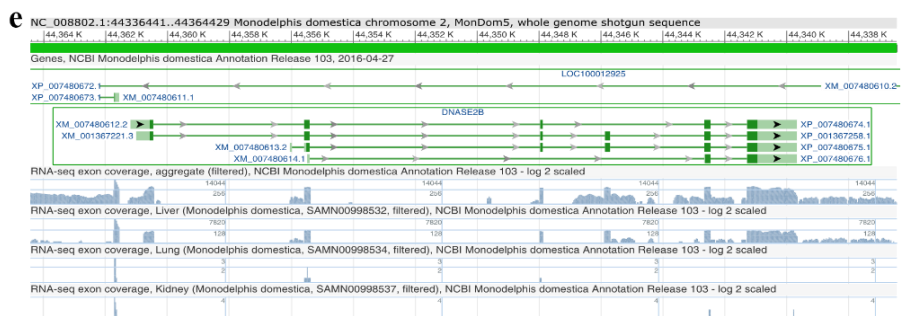
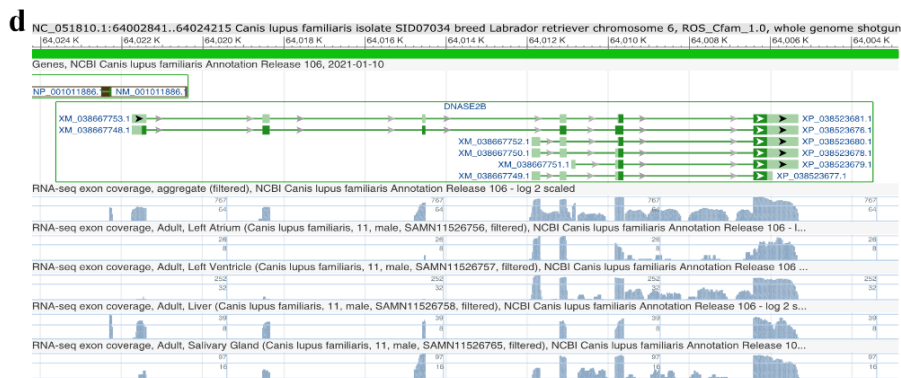
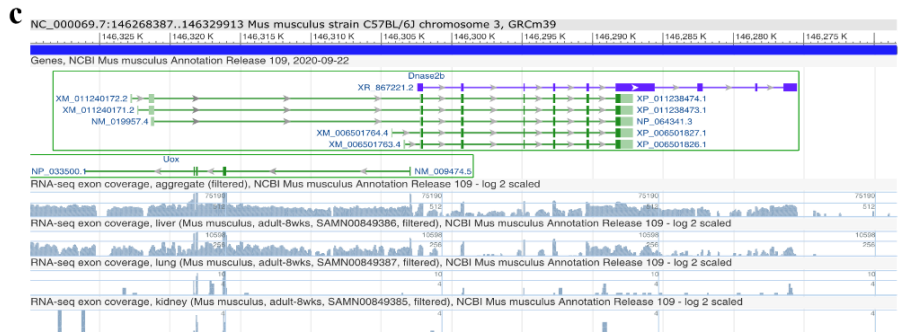
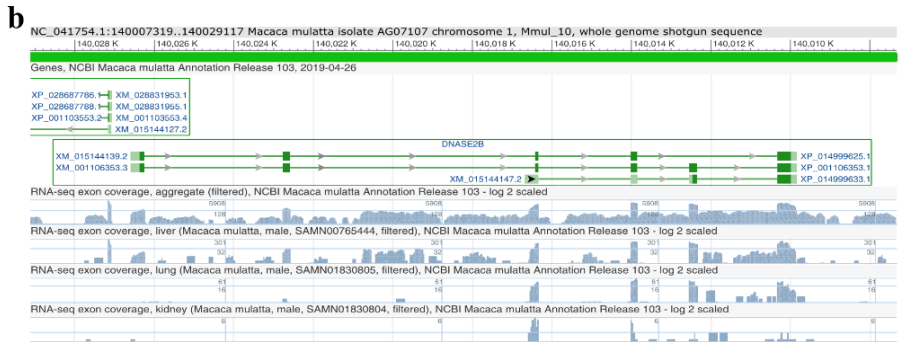
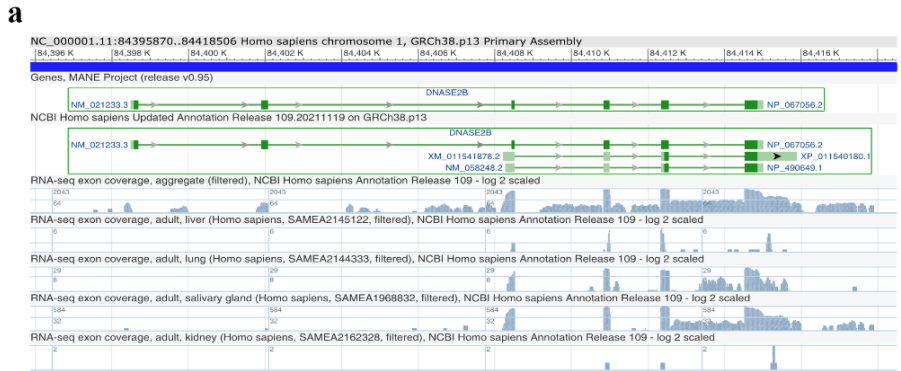


Figura Supplementare S6: Dati RNA-seq DNasi2b. Livelli di espressione genica della DNasi2b nel fegato, polmone, ghiandole salivari e rene di *Homo sapiens* (a), *Macaca mulatta* (b), *Mus musculus* (c), *Canis lupus familiaris* (c) *Monodelphis domestica* (e) derivati da dati di RNA-seq estratti da NCBI.

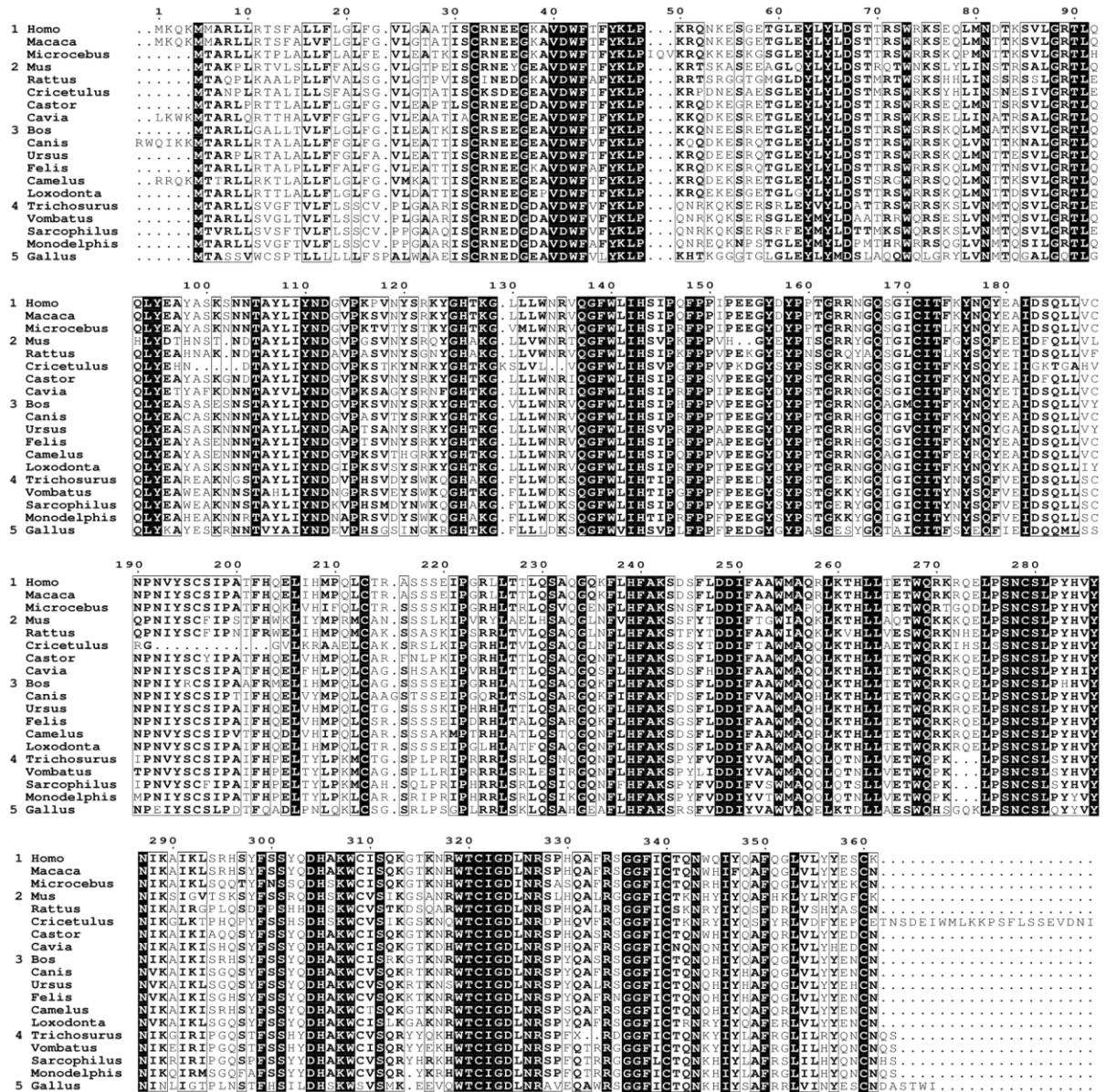


Figura Supplementare S7: Allineamento completo sequenze di DNasi2b di mammiferi. Le sequenze sono state raggruppate in primati (gruppo 1), roditori (gruppo2), altri placentati (gruppo 3), marsupiali (gruppo 4) e sauropsidi (gruppo 5).

ORGANISMS	ENSEMBL ID	NCBI ID	UNIPROT ID	DESCRIPTION	NOMENCLATURE
Homo sapiens	ENSP00000246949	N.A.	P24855	Deoxyribonuclease-1	DNasi1 Hsap1
Homo sapiens	ENSP00000014935	N.A.	P49184	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1 Hsap1L1
Homo sapiens	ENSP000000316938	N.A.	Q92874	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2 Hsap1L2

Homo sapiens	ENSP00000378053	N.A.	Q13609	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Hsap1L3
Mus musculus	ENSMUSP00000006136	N.A.	P49183	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Mmus1
Mus musculus	ENSMUSP00000019232	N.A.	Q9D7J6	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Mmus1L1
Mus musculus	ENSMUSP00000085862	N.A.	Q9D1G0	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Mmus1L2
Mus musculus	ENSMUSP00000026315	N.A.	O55070	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Mmus1L3
Bos taurus	ENSBTAP00000026784	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Btau1
Bos taurus	ENSBTAP00000009806	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Btau1L1
Bos taurus	ENSBTAP00000013142	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Btau1L2
Bos taurus	ENSBTAP00000024347	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Btau1L3
Loxodonta africana	ENSLAFP000000025122	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Lafr1
Loxodonta africana	ENSLAFP000000002912	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Lafr1L1
Loxodonta africana	ENSLAFP000000027192	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Lafr1L2
Loxodonta africana	ENSLAFP000000005281	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Lafr1L3
Rattus norvegicus	ENSRNOP00000009283	N.A.	P21704	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Rnor1
Rattus norvegicus	ENSRNOP000000073157	N.A.	Q2QDE7	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Rnor1L1
Rattus norvegicus	ENSRNOP00000012203	N.A.	D3ZF29	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Rnor1L2
Rattus norvegicus	ENSRNOP00000012532	N.A.	O89107	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Rnor1L3
Camelus dromedarius	ENSCDRP000005010185	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Cdro1
Camelus dromedarius	ENSCDRP000005017547	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Cdro1L1
Camelus dromedarius	ENSCDRP000005022305	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Cdro1L2
Camelus dromedarius	ENSCDRP000005027843	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Cdro1L3
Balaenoptera musculus	ENSBMSP00010020088	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Bmus1
Balaenoptera musculus	ENSBMSP00010029176	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Bmus1L1
Balaenoptera musculus	ENSBMSP00010016353	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Bmus1L2
Balaenoptera musculus	ENSBMSP00010014382	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Bmus1L3
Macaca mulatta	ENSMMUP00000078123	N.A.	F7EHR8	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Mmul1

Macaca mulatta	ENSMMP00000072316	N.A.	F7FYN3	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Mmul1L1
Macaca mulatta	ENSMMP00000053522	N.A.	A0A1D5QZP0	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Mmul1L2
Macaca mulatta	ENSMMP00000057699	N.A.	G7MKZ9	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Mmul1L3
Microcebus murinus	ENSMICP00000008302	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Mmur1
Microcebus murinus	ENSMICP00000019540	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Mmur1L1
Microcebus murinus	ENSMICP00000005382	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Mmur1L2
Microcebus murinus	ENSMICP00000025095	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Mmur1L3
Monodelphis domestica	ENSMODP00000020496	N.A.	F7E8P4	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Mdom1
Monodelphis domestica	ENSMODP00000010905.3	N.A.	F6RGU8	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Mdom1L1
Monodelphis domestica	ENSMODP00000019845	N.A.	A0EQL1	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Mdom1L2
Monodelphis domestica	ENSMODP00000002771	N.A.	F7CVX4	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Mdom1L3
Ornithorhynchus anatinus	ENSOANP00000002141	N.A.	F7F2T5	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Oana1
Ornithorhynchus anatinus	ENSOANP00000049753	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Oana1L1
Ornithorhynchus anatinus	ENSOANP00000046379	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Oana1L2
Ornithorhynchus anatinus	ENSOANP00000045026	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Oana1L3
Zalophus californianus	ENZSCAP00015021442	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Zcal1
Zalophus californianus	ENZSCAP00015037416	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Zcal1L1
Zalophus californianus	ENZSCAP00015015223	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Zcal1L2
Zalophus californianus	ENZSCAP00015020443	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Zcal1L3
Ursus maritimus	N.A.	XP_040491354.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Uurs1
Ursus maritimus	N.A.	XP_008707443.2	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Uurs1L1
Ursus maritimus	N.A.	XP_040491444.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Uurs1L2
Ursus maritimus	N.A.	XP_008701384.2	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Uurs1L3
Gallus gallus	ENSGALP00000062174	N.A.	Q9YG15	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Ggal1
Gallus gallus	ENSGALP00000064712	N.A.	A0A1L1S0S8	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Ggal1L2
Gallus gallus	ENSGALP00000035475	N.A.	Q3Y8N1	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Ggal1L3

Taeniopygia guttata	ENSTGUP0000004320	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Tgut1
Taeniopygia guttata	ENSTGUP00000035493	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Tgut1L2
Taeniopygia guttata	ENSTGUP00000007677	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Tgut1L3
Anas platyrhynchos	ENSAPLP00020027010	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Apl1
Anas platyrhynchos	ENSAPLP00000008276	N.A.	U3IM04	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Apl1L2
Anas platyrhynchos	ENSAPLP00000009569	N.A.	U3IQP6	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Apl1L3
Manacus vitellinus	N.A.	XP_029813780.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Mvit1
Manacus vitellinus	ENSMVIP00005008201	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Mvit1L2
Manacus vitellinus	ENSMVIP00005001497	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Mvit1L3
Parus major	ENSPMJP00000013426	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	PMaj1
Parus major	N.A.	XP_033373831.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	PMaj1L2
Parus major	ENSPMJP00000016961	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	PMaj1L3
Ficedula albicollis	ENSFALP00000004401	N.A.	U3JNP7	Deoxyribonuclease	DNasi1	Falb1
Ficedula albicollis	N.A.	XP_016157319.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Falb1L2
Ficedula albicollis	ENSFALP00000008667	N.A.	U3K0W3	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Falb1L3
Apteryx owenii	ENSAOWP00000017056	N.A.	N.A.	N.A.	DNasi1	Aowe1
Apteryx owenii	ENSAOWP00000015069	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Aowe1L1
Apteryx owenii	ENSAOWP00000017046	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Aowe1L2
Apteryx owenii	ENSAOWP00000021490	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Aowe1L3
Dromaius novaehollandiae	ENSDNVP00000000454	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Dnov1
Dromaius novaehollandiae	N.A.	XP_025978055.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Dnov1L1
Dromaius novaehollandiae	ENSDNVP00000000483	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Dnov1L2
Dromaius novaehollandiae	ENSDNVP00000016232	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Dnov1L3
Anolis carolinensis	N.A.	XP_003228702.2	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Acar1
Anolis carolinensis	ENSACAP00000008007	N.A.	G1KHG5	Endo/exonuclease/phosphatase domain-containing protein	DNasi1L1	Acar1L1
Anolis carolinensis	N.A.	N.A.	G1KY77	Deoxyribonuclease	DNasi1L1-2	Acar1L1-2

<i>Anolis carolinensis</i>	ENSACAP0000000576	N.A.	H9G403	Endo/exonuclease/phosphatase domain-containing protein	DNasi1L2	Acar1L2
<i>Anolis carolinensis</i>	ENSACAP00000037361	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Acar1L3
<i>Chrysemys picta bellii</i>	ENSCPBP00000015869	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Cpbe1
<i>Chrysemys picta bellii</i>	ENSCPBP00000022388	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Cpbe1L1
<i>Chrysemys picta bellii</i>	N.A.	XP_008174635.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Cpbe1L1-2
<i>Chrysemys picta bellii</i>	ENSCPBP00000015855	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Cpbe1L2
<i>Chrysemys picta bellii</i>	ENSCPBP00000019783	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Cpbe1L3
<i>Podarcis muralis</i>	ENSPMRP00000023068	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Pmur1
<i>Podarcis muralis</i>	ENSPMRP00000037209	XP_028567563.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Pmur1L1
<i>Podarcis muralis</i>	N.A.	XP_028562645.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Pmur1L2
<i>Podarcis muralis</i>	ENSPMRP00000015357	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Pmur1L3
<i>Pseudonaja textilis</i>	N.A.	XP_026560283.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	Ptex1
<i>Pseudonaja textilis</i>	ENSPTXP00000009171	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Ptex1L1
<i>Pseudonaja textilis</i>	N.A.	XP_026567400.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L1-2	Ptex1L1-2
<i>Pseudonaja textilis</i>	N.A.	XP_026560276.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Ptex1L2
<i>Pseudonaja textilis</i>	ENSPTXP00000000832	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Ptex1L3
<i>Notechis scutatus</i>	ENSNSUP00000004682	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	Nseu1
<i>Notechis scutatus</i>	N.A.	XP_026532025.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Nseu1L1
<i>Notechis scutatus</i>	N.A.	XP_026539037.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Nseu1L2
<i>Notechis scutatus</i>	N.A.	XP_026532215.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Nseu1L3
<i>Lacerta agilis</i>	N.A.	XP_033023053.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Lagi1
<i>Lacerta agilis</i>	N.A.	XP_033028626.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Lagi1L1
<i>Lacerta agilis</i>	N.A.	XP_033028627.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L1-2	Lagi1L1-2
<i>Lacerta agilis</i>	N.A.	XP_033023829.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Lagi1L2
<i>Lacerta agilis</i>	N.A.	XP_032996892.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Lagi1L3
<i>Python bivittatus</i>	N.A.	XP_007435980.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	Pbiv1

<i>Python bivittatus</i>	N.A.	XP_007420525.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Pbiv1L1
<i>Python bivittatus</i>	N.A.	XP_025021233.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Pbiv1L1-2
<i>Python bivittatus</i>	N.A.	XP_025027389.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1L2	Pbiv1L2
<i>Python bivittatus</i>	N.A.	XP_015743053.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Pbiv1L3
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000020280	N.A.	Q6DG72	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Drer1
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000095198	N.A.	F1QBE2	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Drer1L1
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000033750	N.A.	Q6DH05	Deoxyribonuclease-1-like1-like	DNasi1L1-2	Drer1L1-2
<i>Danio rerio</i>	N.A.	N.A.	Q6AXK0	Deoxyribonuclease-1-like4 tandem duplicate1	DNasi1L4	Drer1L4
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000012226	N.A.	Q6P4U8	Deoxyribonuclease-1-like4 tandem duplicate2	DNasi1L4-2	Drer1L4-2
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUP00000055603	N.A.	A0A3B5KJP9	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Trub1
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUP00000044622	N.A.	H2V5Y8	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Trub1L1
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUP00000032647	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4	Trub1L4
<i>Callorhynchus milii</i>	ENSCMIP00000024093	N.A.	A0A4W3IAT1	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1	Cmil1
<i>Callorhynchus milii</i>	N.A.	XP_007884454.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Cmil1L1-2
<i>Callorhynchus milii</i>	ENSCMIP00000038132	N.A.	V9KNG2	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Cmil1L3
<i>Callorhynchus milii</i>	ENSCMIP00000042053	N.A.	V9KFB6	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Cmil1L4
<i>Scyliorhinus canicula</i>	N.A.	XP_038675172.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1 isoform X2	DNasi1X	Scan1
<i>Scyliorhinus canicula</i>	N.A.	XP_038666427.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L3	Scan1L3
<i>Scyliorhinus canicula</i>	N.A.	XP_038638519.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like isoform X1	DNasi1L1-2	Scan1L1-2
<i>Scyliorhinus canicula</i>	N.A.	XP_038668325.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like isoform X1	DNasi1L4	Scan1L4
<i>Latimeria chalumnae</i>	ENSLACP00000016319	N.A.	H3B348	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1	Lcha1
<i>Latimeria chalumnae</i>	N.A.	XP_014344658.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Lcha1L1
<i>Latimeria chalumnae</i>	ENSLACP00000005136	N.A.	H3A665	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Lcha1L1-2
<i>Latimeria chalumnae</i>	ENSLACP00000017743	N.A.	H3B772	Deoxyribonuclease-1-like4 tandem duplicate1	DNasi1L4	Lcha1L4

Lepisosteus oculatus	ENSLOCP0000007848	N.A.	W5MH19	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Locu1
Lepisosteus oculatus	ENSLOCP00000019070	N.A.	W5NEL1	Deoxyribonuclease-1-like1	DNasi1L1	Locu1L1
Lepisosteus oculatus	ENSLOCP00000019073	N.A.	W5NEL4	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Locu1L1-2
Lepisosteus oculatus	ENSLOCP00000016280	N.A.	W5N6M1	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Locu1L3
Lepisosteus oculatus	ENSLOCP00000016781	N.A.	W5N822	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Locu1L4
Erpetoichthys calabaricus	ENSECRP00000027142	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Ecal1
Erpetoichthys calabaricus	ENSECRP00000027719	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Ecal1L1-2
Erpetoichthys calabaricus	ENSECRP00000027229	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L13	Ecal1L3
Erpetoichthys calabaricus	ENSECRP00000032092	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L14	Ecal1L4
Pygocentrus nattereri	N.A.	XP_037400729.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Pnat1
Pygocentrus nattereri	ENSPNAP00000028665	N.A.	A0A3B4DZ16	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Pnat1L1
Pygocentrus nattereri	ENSPNAP00000034232	N.A.	A0A3B4ECG4	Deoxyribonuclease-1-like1-like	DNasi1L1-2	Pnat1L1-2
Pygocentrus nattereri	ENSPNAP00000021081	N.A.	A0A3B4DDD8	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Pnat1L3
Pygocentrus nattereri	ENSPNAP00000034219	N.A.	A0A3B4EFZ5	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Pnat1L4
Pygocentrus nattereri	ENSPNAP00000017064	N.A.	A0A3B4D2G6	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4-2	Pnat1L4-2
Echeneis naucrates	ENSENLP00000031704	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	Enau1
Echeneis naucrates	ENSENLP00000049294	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Enau1L1
Echeneis naucrates	N.A.	XP_029361292.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L1-2	Enau1L1-2
Echeneis naucrates	ENSENLP00000052642	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4	Enau1L4
Amphiprion ocellaris	ENSAOCP00000015105	N.A.	A0A3Q1BLE7	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Aoce1
Amphiprion ocellaris	ENSAOCP00000028991	N.A.	A0A3Q1DCT1	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Aoce1L1
Amphiprion ocellaris	ENSAOCP00000025230	N.A.	A0A3Q1CEB5	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Aoce1L1-2
Amphiprion ocellaris	ENSAOCP0000000704	N.A.	A0A3Q1AJA1	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4	Aoce1L4
Amphiprion ocellaris	N.A.	XP_023125825.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4-2	Aoce1L4-2

<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000028751	N.A.	A0A2D0SHS8	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Ipun1L1
<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000005550	N.A.	A0A2D0R1F4	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Ipun1L1-2
<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000009405	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L3	Ipun1L3
<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000013874	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Ipun1L4
<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000013904	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4-2	Ipun1L4-2
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010051875	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1	Saur1
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010029456	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Saur1L1
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010002574	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L1-2	Saur1L1-2
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010013249	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4	Saur1L4
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010008339	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4-2	Saur1L4-2
<i>Poecilia latipinna</i>	ENSPLAP00000005412	N.A.	A0A3B3TY29	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	Plat1
<i>Poecilia latipinna</i>	ENSPLAP00000014134	N.A.	A0A3B3UN86	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Plat1L1
<i>Poecilia latipinna</i>	ENSPLAP00000001886	N.A.	A0A3B3TNK3	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Plat1L1-2
<i>Poecilia latipinna</i>	ENSPLAP00000001795	N.A.	A0A3B3TKL4	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Plat1L4
<i>Poecilia latipinna</i>	ENSPLAP00000011808	N.A.	A0A3B3UFV8	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4-2	Plat1L4-2
<i>Seriola dumerili</i>	ENSSDUP00000010478	N.A.	A0A3B4TWW3	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1	Sdum1
<i>Seriola dumerili</i>	ENSSDUP00000018681	N.A.	A0A3B4UJ46	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Sdum1L1
<i>Seriola dumerili</i>	ENSSDUP00000011364	N.A.	A0A3B4TYH1	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1-2	Sdum1L1-2
<i>Seriola dumerili</i>	ENSSDUP00000026388	N.A.	A0A3B4V6K8	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Sdum1L4
<i>Seriola dumerili</i>	ENSSDUP00000013220	N.A.	A0A3B4U5R9	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4-2	Sdum1L4-2
<i>Stegastes partitus</i>	N.A.	XP_008293729.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2	DNasi1	Spar1
<i>Stegastes partitus</i>	ENSSPAP00000000683	N.A.	A0A3B4YV84	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L1	Spar1L1
<i>Stegastes partitus</i>	ENSSPAP00000005777	N.A.	A0A3B4ZVP3	Deoxyribonuclease-1-like3	DNasi1L1-2	Spar1L1-2
<i>Stegastes partitus</i>	ENSSPAP00000009072	N.A.	A0A3B5A5S8	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L4	Spar1L4

<i>Stegastes partitus</i>	N.A.	XP_008303628.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi1L4-2	Spar1L4-2
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	N.A.	F6W656	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Xtro1
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	XP_012826262.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1L	Xtro1L
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	XP_031746664.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L1-2	Xtro1L1-2
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	N.A.	Q6P7K9	Deoxyribonuclease	DNasi1L3	Xtro1L3
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	N.A.	F6VL35	Deoxyribonuclease	DNasi1L4	Xtro1L4
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	N.A.	B7ZRF4	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Xlae1
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	N.A.	A0A1L8EYH2	Deoxyribonuclease	DNasi1L	Xlae1L
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	N.A.	A0A1L8EZN6	Deoxyribonuclease	DNasi1L1	Xlae1L1
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	XP_041430295.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L1-2	Xlae1L1-2
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	N.A.	Q9Y104	Deoxyribonuclease	DNasi1L3	Xlae1L3
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	XP_041420904.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L4	Xlae1L4
<i>Petromyzon marinus</i>	N.A.	XP_032823148.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi1	Pmar1
<i>Petromyzon marinus</i>	N.A.	XP_032809662.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma-like	DNasi1L1	Pmar1L1
<i>Petromyzon marinus</i>	N.A.	XP_032806563.1	N.A.	Deoxyribonuclease gamma	DNasi1L3	Pmar1L3
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	N.A.	XP_002737115.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like2-like	DNasi	Skow_D2
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	N.A.	XP_002737107.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Skow_D1
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	N.A.	XP_006819422.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Skow_D3
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035671427.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D1
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035670618.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D2
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035693506.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D3
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035685231.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D4
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035670063.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D5
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035669754.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D6
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035665500.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Bflo_D7
<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M	N.A.	XP_002679018.1	N.A.	Predicted protein	DNasi	Ngru_D1

Naegleria gruberi strain NEG-M	N.A.	XP_002682045.1	N.A.	Predicted protein	DNasi	Ngru_D2
Naegleria gruberi strain NEG-M	N.A.	XP_002682383.1	N.A.	Predicted protein	DNasi	Ngru_D3
Parasteatoda tepidariorum	N.A.	XP_021004330.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi	Ptep_D1
Priapulid caudatus	N.A.	XP_014680265.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Pcau_D1
Lingula anatina	N.A.	XP_013419185.2	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Lana_D1
Ciona intestinalis	N.A.	XP_002124912.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1	DNasi	Cint_D1
Ciona intestinalis	N.A.	XP_018672106.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Cint_D2
Stylophora pistillata	N.A.	XP_022779341.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Spis_D1
Stylophora pistillata	N.A.	XP_022793292.1	N.A.	Deoxyribonuclease-1-like	DNasi	Spis_D2

Tabella Supplementare S1: Sequenze di metazoi usate per la filogenesi della famiglia delle DNasi1

<u>ORGANISMS</u>	<u>ENSEMBL ID</u>	<u>NCBI ID</u>	<u>UNIPROT ID</u>	<u>DESCRIPTION</u>	<u>NOMENCLATURE</u>	
Homo sapiens	ENSP00000222219	N.A.	A0A024R7F4	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Hsap2
Homo sapiens	ENSP00000359699	N.A.	Q8WZ79-1	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Hsap2b
Mus musculus	ENSMUSP00000003910	N.A.	Q3UM14	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Mmus2
Mus musculus	ENSMUSP00000029836	N.A.	Q9QY48	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Mmus2b
Rattus norvegicus	ENSRNOP00000014887	N.A.	Q9QZK8	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Rnor2
Rattus norvegicus	ENSRNOP00000021861	N.A.	G3V825	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Rnor2b
Bos taurus	ENSBTAP00000007993	N.A.	F1MZ33	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Btau2
Bos taurus	ENSBTAP00000013784	N.A.	F1MMW2	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Btau2b
Loxodonta africana	ENSLAFP00000013547	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Laf2
Loxodonta africana	ENSLAFP00000023791	XP_003411166.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Laf2b
Camelus dromedarius	ENSCDRP000005032612	N.A.	A0A4U5RS46	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Cdro2
Camelus dromedarius	ENSCDRP000005015195	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Cdro2b

<i>Balaenopteramusculus</i>	ENSBMSP00010008189	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Bmus2
<i>Balaenopteramusculus</i>	N.A.	XP_036722911.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Bmus2b
<i>Macaca fascicularis</i>	ENSMFAP00000034341	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Mfas2
<i>Macaca fascicularis</i>	ENSMFAP00000042371	N.A.	I7GM04	Deoxyribonuclease-2-beta		Mfas2b
<i>Microcebus murinus</i>	N.A.	XP_012645898.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Mmur2
<i>Microcebus murinus</i>	ENSMICP00000019901	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Mmur2b
<i>Monodelphis domestica</i>	ENSMODP00000014359	XP_007489195.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Mdom2
<i>Monodelphis domestica</i>	ENSMODP00000000612	N.A.	F6Y5N6	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Mdom2b
<i>Zalophus californianus</i>	N.A.	XP_027440778.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Zcal2
<i>Zalophus californianus</i>	N.A.	XP_027474390.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Zcal2b
<i>Ursus maritimus</i>	N.A.	XP_008709961.2	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Umar2
<i>Ursus maritimus</i>	ENSUMAP00000003046	N.A.	A0A452T4Z3	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Umar2b
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	N.A.	XP_001507235.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Oana2
<i>Tachyglossus aculeatus</i>	N.A.	XP_038627066.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Tacu2
<i>Gallus gallus</i>	ENSGALP000000065393	N.A.	Q2XP49	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Ggal2b
<i>Anas platyrhynchos</i>	N.A.	XP_021130005.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Apla2b
<i>Taeniopygia guttata</i>	ENSTGUP000000006792	N.A.	H0Z889	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Tgut2b
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	ENSDNVP00000018355	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Dnov2b
<i>Manacus vitellinus</i>	ENSMVIP0000005028736	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Mvit2b
<i>Parus major</i>	ENSPMJP00000026635	XP_015491898.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Pmaj2b
<i>Ficedula albicollis</i>	ENSFALP00000023998	N.A.	U3JU33	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Falb2b
<i>Apteryx rowi</i>	N.A.	XP_025913428.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Arow2b
<i>Aptenodytes forsteri</i>	N.A.	XP_009272419.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Afor2b
<i>Dermodochelys coriacea</i>	N.A.	XP_038235018.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Dcor2
<i>Dermodochelys coriacea</i>	N.A.	XP_038269869.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Dcor2b

<i>Chelonia mydas</i>	N.A.	XP_037744047.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Cmys2
<i>Chelonia mydas</i>	N.A.	XP_007068792.2	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Cmys2b
<i>Notechis scutatus</i>	N.A.	XP_026535345.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Nscu2
<i>Pseudonaja textilis</i>	N.A.	XP_026572614.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Ptex2
<i>Python bivittatus</i>	N.A.	XP_007432557.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Pbiv2
<i>Podarcis muralis</i>	ENSPMRP00000036813	XP_028568142.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Pmur2
<i>Podarcis muralis</i>	ENSPMRP00000012365	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Pmur2b
<i>Zootoca vivipara</i>	N.A.	XP_034978814.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Zviv2b
<i>Zootoca vivipara</i>	N.A.	XP_034996487.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Zviv2
<i>Pogona vitticeps</i>	ENSPVIP00000022983	XP_020647346.1	N.A.	deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Pvit2
<i>Pogona vitticeps</i>	ENSPVIP00000025563	XP_020650700.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Pvit2b
<i>Crocodylus porosus</i>	ENSCPRP00005024587	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Cpor2b
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000120160	N.A.	B0JZP5	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Drer2
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000098172	N.A.	F1QKH7	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Drer2b
<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000010116	N.A.	A0A2D0PR36	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Ipun2
<i>Ictalurus punctatus</i>	ENSIPUP00000004625	N.A.	W5ULA1	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Ipun2b
<i>Pygocentrus nattereri</i>	ENSPNAP00000036883	N.A.	A0A3B4EM79	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Pnat2
<i>Pygocentrus nattereri</i>	ENSPNAP00000010239	N.A.	A0A3B4CIB4	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Pnat2b
<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	ENSAPOP00000032187	N.A.	A0A3Q1GXN7	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Apol2
<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	ENSAPOP00000033729	N.A.	A0A3Q1GVH8	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Apol2b
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010036732	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Saur2
<i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010065369	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Saur2b
<i>Poecilia reticulata</i>	ENSPREP00000026892	XP_008429001.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha-like	DNasi2	Pret2
<i>Poecilia reticulata</i>	ENSPREP00000021461	XP_008406259.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Pret2b

<i>Callorhynchus milii</i>	ENSCMIP00000010672	N.A.	A0A4W3H679	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Cmil2
<i>Callorhynchus milii</i>	ENSCMIP00000017991	N.A.	A0A4W3HPG3	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Cmil2b
<i>Scyliorhinus canicula</i>	N.A.	XP_038640808.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha-like	DNasi2	Scan2
<i>Scyliorhinus canicula</i>	N.A.	XP_038649591.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Scan2b
<i>Xiphophorus couchianus</i>	N.A.	XP_027867863.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Xcou2
<i>Xiphophorus couchianus</i>	N.A.	XP_027883353.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta-like	DNasi2b	Xcou2b
<i>Echeneis naucrates</i>	ENSENLP00000018139	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Enau2
<i>Echeneis naucrates</i>	ENSENLP00000042870	N.A.	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2	Enau2b
<i>Astatotilapia calliptera</i>	ENSACL00000013040	N.A.	A0A3P8P7R8	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Acal2
<i>Astatotilapia calliptera</i>	ENSACL00000002437	N.A.	A0A3P8NCC4	Deoxyribonuclease-2-beta-like	DNasi2b	Acal2b
<i>Petromyzon marinus</i>	N.A.	XP_032812716.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha-like	DNasi2	Pmar2
<i>Aplysia californica</i>	N.A.	XP_005092819.1	N.A.	Plancitoxin-1	DNasi2b	Acali2b
<i>Patiria miniata</i>	N.A.	XP_038063607.1	N.A.	Plancitoxin-1-like	DNasi2b	Pmin2b
<i>Octopus sinensis</i>	N.A.	XP_029649552.1	N.A.	Plancitoxin-1	DNasi2b	Osin2b
<i>Branchiostoma floridae</i>	N.A.	XP_035684834.1	N.A.	Plancitoxin-1-like	DNasi2b	Bflo2b
<i>Lingula anatina</i>	N.A.	XP_013418711.1	N.A.	Plancitoxin-1-like	DNasi2b	Lana2b
<i>Lingula anatina</i>	N.A.	XP_023931970.1	N.A.	Plancitoxin-1 isoform X2	DNasi2b	Lana2b2
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	NP_001039073.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Xtro2
<i>Xenopus tropicalis</i>	N.A.	NP_001011305.2	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Xtro2b
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	NP_001086671.1	N.A.	Deoxyribonuclease II, lysosomal L homeolog	DNasi2	Xlae2
<i>Xenopus laevis</i>	N.A.	XP_018116188.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Xlae2b
<i>Bufo bufo</i>	N.A.	XP_040270964.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNasi2	Bbuf2
<i>Bufo bufo</i>	N.A.	XP_040263878.1	N.A.	Deoxyribonuclease-2-beta	DNasi2b	Bbuf2b

Tabella Supplementare S2: Sequenze di metazoi usate per la filogenesi della famiglia delle DNasi2

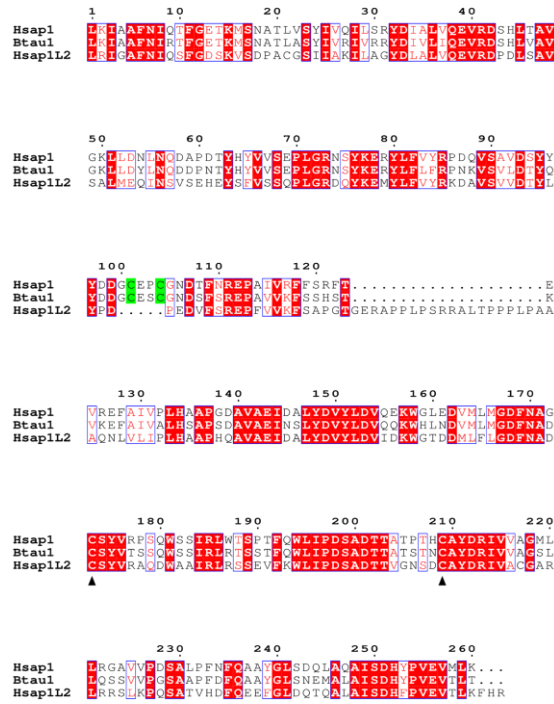


Figura Supplementare S8: Allineamento completo DNasi1 e DNasi1L2. Allineamento sequenze HsapDNasi1 e 1L2 (*Homo sapiens*) e BtauDNasi1 (*Bos taurus*). I residui sono numerati seguendo la DNasi1 umana. Le cisteine (123 e 126) presenti solo nella DNasi1 sono evidenziate in verde, il ponte comune alla famiglia (C173-209) indicato con triangoli.

Bibliografia

1. Keyel P.A. Dnases in health and disease. *Dev Biol.* 429(1):1-11 (2017).
2. Hartmann G. Nucleic Acid Immunity. *Adv Immunol.* 133:121-169 (2017).
3. Soni C., Reizis B. DNA as a self-antigen nature and regulation. *Curr Opin Immunol.* 55:31-37 (2018).
4. Bruschi M., et al. Neutrophil Extracellular Traps in the Autoimmunity Context. *Front Med.* 8:614829 (2021).
5. Kawane K., Motani K., Nagata S. DNA Degradation and Its Defects. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(6):a016394 (2014).
6. Baranovskii A.G., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Human Deoxyribonucleases. *Biochemistry* 69(6):587-601 (2004).
7. Han D.S.C., Lo Y.M.D. The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends Genet.* 37(8):758-770 (2021).
8. Shiokawa D., Tanuma S. C. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry.* 40(1):143-52 (2001).
9. Fujihara J., et al. Comparative biochemical properties of vertebrate deoxyribonuclease I. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 163(3-4):263-73 (2012).
10. Guérout M., et al. How Cations Can Assist DNase I in DNA Binding and Hydrolysis. *PLoS Comput Biol.* 6(11):e1001000 (2010).
11. Lauková L., et al. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. *Biomolecules.* 10(7):1036 (2020).
12. Fujihara J., et al. Two N-Linked Glycosylation Sites (Asn18 and Asn106) Are Both Required for Full Enzymatic Activity, Thermal Stability, and Resistance to Proteolysis in Mammalian Deoxyribonuclease I. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(12):3197-205 (2008).
13. Suck D., Oefner C., Kabsch W. Three-dimensional structure of bovine pancreatic DNase I at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 3(10):2423-30 (1984).
14. Chen W.J., et al. Biological functions of the disulfides in bovine pancreatic deoxyribonuclease. *Protein Sci.* 13(4):875-83 (2004).
15. Price P.A., Stein W.H., Moore S. Effect of Divalent Cations on the Reduction and Re-formation of the Disulfide Bonds of Deoxyribonuclease. *J Biol Chem.* 244(3):929-32 (1969).
16. Melgar E., Goldthwait D.A. Deoxyribonucleic acid nucleases. II. The effects of metals on the mechanism of action of deoxyribonuclease I. *Biol Chem.* 243(17):4409-16 (1968).
17. Parsieglia G., et al. The Structure of Human DNase I Bound to Magnesium and Phosphate Ions Points to a Catalytic Mechanism Common to Members of the DNase I-like Superfamily. *Biochemistry.* 51(51):10250-8 (2012).
18. Campbell V.W., Jackson D.A. The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *Biol Chem.* 255(8):3726-35 (1980).
19. Ulmer J.S., et al. Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16):8225-9 (1996).
20. Pan C.Q., et al. Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: Implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci.* 7(3):628-

- 36 (1998).
21. Weston S.A., Lahm A., Suck D. X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol.* 226(4):1237-56 (1992).
 22. Jones S.J., Worrall A.F., Connolly B.A. Site-directed Mutagenesis of the Catalytic Residues of Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease I. *J Mol Biol.* 264(5):1154-63 (1996).
 23. Beernink P.T., et al. Two Divalent Metal Ions in the Active Site of a New Crystal Form of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease, Ape1: Implications for the Catalytic Mechanism. *J Mol Biol.* 307(4):1023-34 (2001).
 24. Hitchcock S.E. Actin deoxyribonuclease I interaction. Depolymerization and nucleotide exchange. *J Biol Chem.* 255(12):5668-73 (1980).
 25. Takeshita H., et al. Mammalian Deoxyribonucleases I Are Classified into Three Types: Pancreas, Parotid, and Pancreas-Parotid (Mixed), Based on Differences in Their Tissue Concentrations. *Biochem Biophys Res Commun.* 269(2):481-4 (2000).
 26. Napirei M., et al. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1- deficient mice. *Nat Genet.* 25(2):177-81 (2000).
 27. Jiménez-Alcázar M., et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 358(6367):1202-1206 (2017).
 28. Malferrari G., et al. Molecular Characterization of a Novel Endonuclease (Xib) and Possible Involvement in Lysosomal Glycogen Storage Disorders. *Exp Mol Pathol.* 66(2):123-30 (1999).
 29. Shiokawa D., et al. DNase X is a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane enzyme that provides a barrier to endocytosis-mediated transfer of a foreign gene. *J Biol Chem.* 282(23):17132-40 (2007).
 30. Rodriguez A.M., et al. Identification, Localization, and Expression of Two Novel Human Genes Similar to Deoxyribonuclease I. *Genomics.* 42(3):507-13 (1997).
 31. Shiokawa D., et al. Characterization of the human DNase1L2 gene and the molecular mechanism for its transcriptional activation induced by inflammatory cytokines. *Genomics.* 84(1):95-105 (2004).
 32. Fischer H., et al. DNase1L2 Degrades Nuclear DNA during Corneocyte Formation. *J Invest Dermatol.* 127(1):24-30 (2007).
 33. Eckhart L., et al. DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br J Dermatol.* 156(6):1342-5 (2007).
 34. Fischer H., et al. Essential role of the keratinocyte-specific endonuclease DNase1L2 in the removal of nuclear DNA from hair and nails. *J Invest Dermatol.* 131(6):1208-15 (2011).
 35. Fischer H., et al. Inactivation of DNase1L2 and DNase2 in keratinocytes suppresses DNA degradation during epidermal cornification and results in constitutive parakeratosis. *Sci Rep.* 7(1):6433 (2017).
 36. Fischer H., et al. Holocrine Secretion of Sebum Is a Unique DNase2-Dependent Mode of Programmed Cell Death. *J Invest Dermatol.* 137(3):587-594 (2017).
 37. Napirei M., et al. Comparative characterization of rat deoxyribonuclease 1 (Dnase1) and murine deoxyribonuclease 1-like 3 (Dnase1l3). *Biochem J.* 389(2):355-64 (2005).
 38. Shiokawa D., Shika Y., Tanuma S. Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity. *Biochem J.* 376(2):377-81 (2003).
 39. Wilber A., Lu M., Schneider M.C. Deoxyribonuclease I-like III Is an Inducible Macrophage Barrier to Liposomal Transfection. *Mol Ther.* 6(1):35-42 (2002).

40. Sisirak V., et al. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell*. 166(1):88-101 (2016).
41. Coke L.N., et al. Arg206Cys substitution in DNASE1L3 causes a defect in DNASE1L3 protein secretion that confers risk of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 80(6):782–7 (2021).
42. Shiokawa D., Hirai M., & Tanuma, S. cDNA cloning of human DNase y: chromosomal localization of its gene and enzymatic properties of recombinant protein. *Apoptosis*. 3(2), 89-95 (1998).
43. Zeng Z., et al. Cloning and characterization of a novel human DNase. *Biochem Biophys Res Commun*. 231(2):499-504 (1997).
44. Baker K.P., et al. Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. *Gene*. 215(2):281-9 (1998).
45. Evans C.J., Aguilera R.J. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene*. 322:1-15 (2003).
46. Bernardi G. Spleen acid deoxyribonuclease. *The Enzymes 3rd ed, Academic Press*, 4: 271–287 (1971).
47. Shiokawa D., & Tanuma, S. I. DLAD, a novel mammalian divalent cation-independent endonuclease with homology to DNase II. *Nucleic acids research*. 27(20), 4083-4089 (1999).
48. Yasuda T., et al. Structure and organization of the human deoxyribonuclease II (DNase II) gene. *Ann Hum Genet*. 62(4):299-305 (1998).
49. MacLea K.S., Krieser R.J., Eastman A. Structural requirements of human DNase II α for formation of the active enzyme: the role of the signal peptide, N-glycosylation, and disulphide bridging. *Biochem J*. 371(3):867-76 (2003).
50. Krieser R.J., Eastman A. The cloning and expression of human deoxyribonuclease II. A possible role in apoptosis. *J Biol Chem*. 273(47):30909-14 (1998).
51. MacLea K.S., Krieser R.J., Eastman A. Revised Structure of the Active Form of Human Deoxyribonuclease II. *Biochem Biophys Res Commun*. 292(2):415-21 (2002).
52. Yasuda T., et al. Human urine deoxyribonuclease II (DNase II) isoenzymes: a novel immunoaffinity purification, biochemical multiplicity, genetic heterogeneity and broad distribution among tissues and body fluids. *Biochim Biophys Acta*. 1119(2):185-93 (1992).
53. Murai K., et al. Purification and Properties of Deoxyribonuclease II from Human Urine. *J Biochem*. 87(4):1097-103 (1980).
54. Harosh I., et al. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. *Eur J Biochem*. 202(2):479-84 (1991).
55. Cymerman I.A., Meiss G., Bujnicki J.M. DNase II is a member of the phospholipase D superfamily. *Bioinformatics*. 21(21):3959-62 (2005).
56. Leiros I., McSweeney S., Hough E. The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces* sp. strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. *J Mol Biol*. 339(4):805-20 (2004).
57. Varela-Ramirez A., et al. Structure of acid deoxyribonuclease. *Nucleic Acids Res*. 45(10):6217-6227 (2017).
58. Schäfer P., et al. Human lysosomal DNase IIa contains two requisite PLD-signature (HxK) motifs: Evidence for a pseudodimeric structure of the active enzyme species. *Protein Sci*. 16(1):82-91 (2007).
59. Krieser R.J., et al. The cloning, genomic structure, localization, and expression of human deoxyribonuclease IIb. *Gene*. 269(1-2):205-16 (2001).

60. Nishimoto S., et al. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature*. 424(6952):1071-4 (2003).
61. Fischer H., et al. DNase 2 is the main DNA-degrading enzyme of the stratum corneum. *PLoS One*. 6(3):e17581 (2011).
62. Shiokawa D., Tanuma S.I. Isolation and Characterization of the DLAD/Dlad Genes, Which Lie Head-to-Head with the Genes for Urate Oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 288(5):1119-28 (2001).
63. Oda M., et al. Loss of Urate Oxidase Activity in Hominoids and its Evolutionary Implications. *Mol Biol Evol*. 19(5):640-53 (2002).
64. Magna M., Pisetsky D.S. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins. *Clin Ther*. 38(5):1029-41 (2016).
65. Santa P., et al. The Role of Nucleases and Nucleic Acid Editing Enzymes in the Regulation of Self-Nucleic Acid Sensing. *Front Immunol*. 12:629922 (2021).
66. Brinkmann V., et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 303(5663):1532-5 (2004).
67. Tan E.M., et al. Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Invest*. 45(11):1732-40 (1966).
68. Relle M., et al. Genetics and novel aspects of therapies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 14(11):1005-18 (2015).
69. Napirei M., et al. Murine serum nucleases – contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase113). *FEBS J*. 276(4):1059-73 (2009).
70. Napirei M., Wulf S., Mannherz H.G. Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum*. 50(6):1873-83 (2004).
71. Lee Serpas, et al. Dnase113 deletion causes aberrations in length and end-motif frequencies in plasma DNA. *PNAS*. 116(2):641-649 (2019).
72. Singh H.R., et al. A novel Alu-mediated Xq28 microdeletion ablates TAZ and partially deletes DNL1L1 in a patient with Barth syndrome. *Am J Med Genet A*. 149A(5):1082-5 (2009).
73. Ueki M., et al. Evaluation of All Nonsynonymous Single-Nucleotide Polymorphisms in the Gene Encoding Human Deoxyribonuclease I-Like 1, Possibly Implicated in the Blocking of Endocytosis-Mediated Foreign Gene Transfer. *DNA Cell Biol*. 33(2):79-87 (2014).
74. Lichtenbelt K.D., et al. Frequency of the deletion polymorphism of DNASE1L1 in 137 patients with acid maltase deficiency (Pompe disease). *Exp Mol Pathol*. 80(3):308-9 (2006).
75. Malferrari G., et al. Deletion polymorphism of DNASE1L1, an X-Linked DNase I-like gene, in acid maltase deficiency disorders. *Exp Mol Pathol*. 70(2):173-4 (2001).
76. Marino M., et al. Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Ther*. 18(2):109-16 (2011).
77. Rashedi I. The Role of DNase X in Skeletal Muscle Addressed by Targeted Disruption of the Gene in a Mouse Model. Available online at: <https://mspace.lib.umanitoba.ca/xmlui/handle/1993/21248> (2008).
78. Mohan Kumar D., et al. Ehrlichia chaffeensis Uses Its Surface Protein EtpE to Bind GPI-Anchored Protein DNase X and Trigger Entry into Mammalian Cells. *PLoS Pathog*. 9(10):e1003666 (2013).
79. Rikihisa Y. Molecular Pathogenesis of Ehrlichia chaffeensis Infection. *Annu Rev Microbiol*. 69:283-304 (2015).
80. A. Kallick C. Diabetic retinopathy and ehrlichia: the possible relationship. *Med Hypothesis*

- Discov Innov Ophthalmol.* 1(2):33-6 (2012).
81. Brumpton B.M., Ferreira M.A. Multivariate eQTL mapping uncovers functional variation on the X-chromosome associated with complex disease traits. *Hum Genet.* 135(7):827-39 (2016).
 82. Counis M.F., Torriglia A. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie.* 88(12):1851-8 (2006).
 83. Kawane K., et al. Requirement of DNase II for Definitive Erythropoiesis in the Mouse Fetal Liver. *Science.* 25;292(5521):1546-9 (2001).
 84. Fujihara J., et al. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the human deoxyribonuclease (DNase) family potentially relevant to autoimmunity. *Immunol Invest.* 45(5):406-19 (2016).
 85. Nakahara M., et al. Degradation of nuclear DNA by DNase II-like acid DNase in cortical fiber cells of mouse eye lens. *FEBS J.* 274(12):3055-64 (2007).
 86. Xiukun Cui, et al. HSF4 regulates DLAD expression and promotes lens de-nucleation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1832 ,1167–1172 (2003).
 87. Iida A., et al. Critical roles of DNase1131 in lens nuclear degeneration in zebrafish. *Biochimie.* 106:68-74 (2014).
 88. Cedervall J., et al. Neutrophil Extracellular Traps Accumulate in Peripheral Blood Vessels and Compromise Organ Function in Tumor-Bearing Animals. *Cancer Res.* 75(13):2653-62 (2015).
 89. Wang S., et al. DNASE1L3 as an indicator of favorable survival in hepatocellular carcinoma patients following resection. *Aging.* 12(2):1171-1185 (2020).
 90. Ahn J., et al. Extrinsic Phagocyte-Dependent STING Signaling Dictates the Immunogenicity of Dying Cells. *Cancer Cell.* 14;33(5):862-873.e5 (2018).
 91. Bhalla S., et al. Gene expression-based biomarkers for discriminating early and late stage of clear cell renal cancer. *Sci Rep.* 7:44997 (2017).
 92. Deng Z., et al. DNASE1L3 as a Prognostic Biomarker Associated with Immune Cell Infiltration in Cancer. *Onco Targets Ther.* 14:2003-2017 (2021).
 93. Kawai Y., et al. Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction. *Circulation.* 109(20):2398-400 (2004).
 94. Fisher J., et al. Proteome Profiling of Recombinant DNase Therapy in Reducing NETs and Aiding Recovery in COVID-19 Patients. *Mol Cell Proteomics.* 20:100113 (2021).
 95. Pan C.Q, Lazarus RA. Engineering hyperactive variants of human deoxyribonuclease I by altering its functional mechanism. *Biochemistry.* 36(22):6624-32 (1997).
 96. Pan C.Q, et al. Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem.* 273(29):18374-81 (1998).
 97. Alibardi L. The Process of Cornification Evolved From the Initial Keratinization in the Epidermis and Epidermal Derivatives of Vertebrates: A New Synthesis and the Case of Sauropsids. *Int Rev Cell Mol Biol.* 327:263-319 (2016).
 98. Pierleoni A., Martelli P.L, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics.* 9:392 (2008).
 99. Zhang J., et al. Knockout of DNase1111 abrogates lens denucleation process and causes cataract in zebrafish. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1866(5):165724 (2020).
 100. Larkin M.A., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23(21):2947-8 (2007).
 101. Robert X., Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42:W320-4 (2014).

102. Guindon S., et al. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 59(3):307-21 (2010).
103. Kumar S., et al. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Mol Biol Evol*. 34(7):1812-1819 (2017).
104. Crooks G.E., et al. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 14(6):1188-90 (2004).
105. Gupta, R.. & Jung, Euil & Brunak, Søren. Prediction of N-glycosylation Sites in Human Proteins. Available online: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc> (2004).
106. Bordoli L., et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc*. 4(1):1-13 (2009).
107. Varadi M. et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*. 50(D1):D439–D444 (2022).
108. Jumper J., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596(7873):583-589 (2021).
109. Ratjen F., Bell S., Rowe S. et al. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 1,15010 (2015).
110. Cohen T.S., Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 18(4):509-19 (2012).
111. Liu F., et al. Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*. 169(1):85-95.e8 (2017).
112. Theodoulou F.L., Kerr I.D. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans*. 43(5):1033-40 (2015).
113. Gadsby D.C., Nairn A.C. Control of CFTR Channel Gating by Phosphorylation and Nucleotide Hydrolysis. *Physiol Rev*. 79(1):S77-S107 (1999).
114. Winter M.C., Welsh M.J. Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature*. 389(6648):294-6 (1997).
115. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr*. 109(5):893-899 (2020).
116. De Boeck K., Amaral M.D. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 4(8):662-674 (2016).
117. Boucher R.C. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J Intern Med*. 261(1):5-16 (2007).
118. Dhooghe B., et al. Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies. *Clin Biochem*. 47(7-8):539-46 (2014).
119. Cullen L., McClean S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens*. 4(1):66-89 (2015).
120. Lu T., et al. A NET outcome. *Front Immunol*. 3:365 (2012).
121. Ledson M.J., et al. Targeting of dornase alpha therapy in adult cystic fibrosis. *J R Soc Med*. 91(7):360-4 (1998).
122. Pressler T. Review of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of patients with cystic fibrosis. *Biologics*. 2(4):611-7 (2008).
123. Edmondson C., Davies J.C. Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Chronic Dis*. 7(3):170-83 (2016).
124. Murphy M.P., Caraher E. Current and Emerging Therapies for the Treatment of Cystic Fibrosis

- or Mitigation of Its Symptoms. *Drugs R D*. 16(1):1-17 (2016).
125. Robinson M., et al. Effect of increasing doses of hypertonic saline on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 52(10):900-3 (1997).
 126. Wark P.A., McDonald V. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. (2):CD001506 (2000).
 127. Shak S., et al. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci*.87(23):9188-92 (1990).
 128. Fuchs H.J., et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 331(10):637-42 (1994).
 129. Suri R., et al. Effects of hypertonic saline, alternate day and daily rhDNase on healthcare use, costs and outcomes in children with cystic fibrosis. *Thorax*. 57(10):841-6 (2002).
 130. Hewer S.L. Inhaled antibiotics in cystic fibrosis: what's new?. *J R Soc Med*. 105(2):S19-S24 (2012).
 131. Lazarus R.A., Wagener J.S. Recombinant Human Deoxyribonuclease I. *Pharmaceutical Biotechnology*. 471-488 (2019).
 132. Cipolla D., Gonda I., Shire S.J. Characterization of aerosols of human recombinant deoxyribonuclease I (rhDNase) generated by jet nebulizers. *Pharm Res*. 11(4):491-8 (1994).
 133. Cobos N., et al. DNase use in the daily care of cystic fibrosis: who benefits from it and to what extent? Results of a cohort study of 199 patients in 13 centres. *DNase National Study Group. Eur J Pediatr*. 59(3):176-81 (2000).
 134. Sanders N.N., et al. Role of magnesium in the failure of rhDNase therapy in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 61(11):962-8 (2006).
 135. Veronese F.M., Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*. 10(21):1451-8 (2005).
 136. Harris J.M., Chess R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*. 2(3):214-21 (2003).
 137. Guichard M.J., et al. Production and characterization of a PEGylated derivative of recombinant human deoxyribonuclease I for cystic fibrosis therapy. *Int J Pharm*. 524(1-2):159-167 (2017).
 138. Guichard M.J., et al. Impact of PEGylation on the mucolytic activity of recombinant human deoxyribonuclease I in cystic fibrosis sputum. *Clin Sci*. 132(13):1439-1452 (2018).
 139. Mahri S., et al. PEGylation of recombinant human deoxyribonuclease I decreases its transport across lung epithelial cells and uptake by macrophages. *Int J Pharm*. 593:120107 (2021).
 140. Mahri S., et al. Biodistribution and elimination pathways of PEGylated recombinant human deoxyribonuclease I after pulmonary delivery in mice. *J Control Release*. 329:1054-1065 (2021).
 141. Guichard M.J., et al. PEGylation of Recombinant Human Deoxyribonuclease I Provides a Long-Acting Version of the Mucolytic for Patients with Cystic Fibrosis. *Clin Sci*. 132(13):1439-1452 (2018).
 142. Vanz A., et al. Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microb Cell Fact*. 11, 103 (2012).
 143. Mohsen Karbalaei, Seyed A Rezaee, Hadi Farsiani. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*. 1–15 (2020).

144. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24(1):45-66 (2000).
145. Desreux V., Hacha R., Fredericq E. Activation of Deoxyribonucleases by Divalent Cations. *J Gen Physiol.* 45(4)Pt 2(4):93-102 (1962).
146. Coakley R.D., et al. Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci.* 100(26):16083-8 (2003).
147. Kabsch W. , and Vandekerckhove J.. Structure and Function of Actin. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 21:1, 49-76 (1992).
148. Sanders N., et al. Extracellular barriers in respiratory gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(2):115-27 (2009).
149. Vasconcellos C.A., et al. Reduction in Viscosity of Cystic Fibrosis Sputum in Vitro by Gelsolin. *Science.* 263(5149):969-71 (1994).
150. Craparo E.F., et al. Pegylated Polyaspartamide-Polylactide-Based Nanoparticles Penetrating Cystic Fibrosis Artificial Mucus. *Biomacromolecules.* 17(3):767-77 (2016).
151. Veronese F.M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials.* 22(5):405-17 (2001).
152. Freches D., et al. PEGylation prolongs the pulmonary retention of an anti-IL-17A Fab' antibody fragment after pulmonary delivery in three different species. *Int J Pharm.* 521(1-2):120-129 (2017).
153. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23 (1979).