

Università degli Studi della Calabria

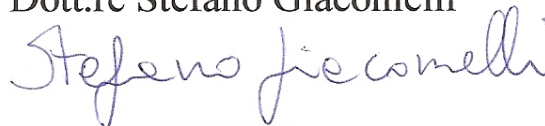
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

CICLO XXII

Settore disciplinare BIO/09

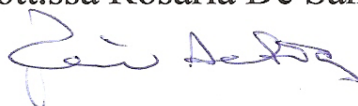
**Caratterizzazione molecolare e funzionale degli
amebociti di *Ciona intestinalis* nella risposta
immune mediata dal Sistema del Complemento**

Dott.re Stefano Giacomelli



TUTOR

Dott.ssa Rosaria De Santis



CO-TUTOR

Dott.ssa Maria Rosaria Pinto



COORDINATORE

Ch.mo Prof.re Marcello Canonaco



Anno Accademico 2008-2009

Abstract

Research over the past ten years indicates that the Complement System, the major effector arm of the vertebrate innate immunity, emerged at least 1,300 million years ago, long before the appearance of the adaptive immune response. These studies also pointed to the ascidian *Ciona intestinalis* (Urochordata), which occupies a key phylogenetic position in chordate evolution, as a suitable animal model for investigating the immune system evolution.

In this context, two C3-like molecules, *CiC3-1* and *CiC3-2*, exhibiting all the characteristic features of the mammalian C3s, have been previously identified, sequenced, and characterized in *C. intestinalis*. Furthermore, it has been found that the activation of *CiC3-1* results in the release of the bioactive fragment C3-1a, a potent mediator of inflammatory reactions. The C3-1a fragment exerts its functional activity through the specific binding to a cell surface G protein-coupled seven-transmembrane receptor (*CiC3aR*), which has been more recently identified and characterized. Both C3-1a and its receptor are expressed only by granular and hyaline amoebocytes, two renewing blood cell types. In *Ciona*, blood cell proliferation occurs in circulating blood and in lymph nodules, mainly localized in the pharynx.

In the present study I have first of all assessed whether *Ciona* C3 could represent an early molecular marker of amoebocyte proliferation in pharyngeal lymph nodules. Using real-time PCR analysis I have found that *CiC3-1* is constitutively expressed in the pharynx and that its expression is up-regulated by the treatment of the animals with lipopolysaccharides (LPS), a well-known inflammatory agent. By using two specific anti-C3 and anti-C3a polyclonal antibodies in immunohistological staining of pharynx sections, I have found that also the gene product is present in the pharynx, localized in areas identified as sites of hematogenic activity, and in amoebocytes occupying the pharyngeal bars. The same antibodies used in Western blot analysis indicated that *CiC3-1* and its activation products, namely *CiC3-1b* and *CiC3-1a*, are present in homogenates of pharynx. The

finding that the amount of the bioactive fragment *CiC3-1a* increases in the pharynx of LPS treated animals, clearly indicates that *CiC3-1*, present in the pharynx and labeling the maturing amoebocytes, is functionally active.

The identification in *C. intestinalis* of both the partners participating in the complement-mediated inflammatory response gave me the opportunity for further investigating the C3a-C3aR interaction at both the molecular and cellular levels. In another series of experiments, I have focused my attention on cellular mechanisms acknowledged to be fundamental in ligand-receptor interaction. I have analyzed by confocal microscopy the dynamic process of internalization of the *CiC3aR*, induced by the binding of *CiC3-1a* in the form of the eighteen amino acid C-terminal peptide *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶ of *CiC3-1a* fragment. These experiments have been performed on amoebocytes of circulating blood, which constitutively express both *CiC3-1* and *CiC3aR*. Results of these experiments indicate that *CiC3aR*, following the agonist stimulus, is internalized in few minutes, and recycled to the cell surface within 30 min, made again available for *CiC3-1a* binding.

My observations also revealed that in response to *CiC3aR* activation, *Ciona* arrestin (*CiArr*) is translocated to the plasma membrane in 30 sec. This localization profile is consistent with the participation of *CiArr* in *CiC3aR* internalization, and suggests, for the first time in *Ciona*, a role for *CiArr* as the agonist driven switch initiating receptor endocytosis.

INDICE

1. INTRODUZIONE	6
1.1 Il Sistema del Complemento	10
1.1.1 La via classica	14
1.1.2 La via lectinica	16
1.1.3 La via alternativa	17
1.1.4 Il pathway effettore	19
1.1.5 C3, molecola chiave del Sistema del Complemento	23
1.1.6 L'anafilatossina C3a e il suo recettore C3aR	24
1.2 Il sistema sperimentale: <i>Ciona intestinalis</i>	29
1.2.1 Gli emociti delle ascidie	32
1.2.2 Il Faringe	36
1.3 Il Sistema del Complemento negli Urochordata	41
2. SCOPO DELLA RICERCA	53
3. MATERIALI E METODI	56
3.1 Preparazione di campioni di faringe	57
3.2 Prelievo di emociti	57
3.3 Isolamento e purificazione di RNA totale da faringe	57
3.4 Sintesi del cDNA	58
3.5 Sintesi degli oligonucleotidi	59
3.6 Amplificazione mediante PCR	59
3.7 Elettroforesi su gel di agarosio	61

3.8 Real-time PCR	61
3.9 Sintesi dei peptidi e produzione di anticorpi	63
3.10 Analisi mediante Western blot	65
3.11 Immunoistochimica su sezione	66
3.12 Immunocitochimica su emociti circolanti	68
4. RISULTATI	70
4.1 Ricerca di <i>CiC3-1</i> nel faringe mediante PCR	71
4.2 Trattamento con LPS e valutazione dell'espressione di <i>CiC3-1</i> mediante real-time PCR	71
4.3 Rivelazione mediante Western blot di <i>CiC3-1</i> e dei suoi prodotti di attivazione	73
4.4 Analisi mediante Western blot dell'attivazione di <i>CiC3-1</i> indotta da LPS	76
4.5 Rivelazione di <i>CiC3-1</i> e <i>CiC3aR</i> mediante immunoistochimica	78
4.6 Analisi del processo di internalizzazione di <i>CiC3aR</i>	82
4.7 Rivelazione dell'arrestina in emociti di <i>Ciona</i>	85
4.8 Coinvolgimento di <i>CiArr</i> nel "signalling" di <i>CiC3aR</i>	89
5. DISCUSSIONE	92
6. BIBLIOGRAFIA	101

1. INTRODUZIONE

Tutti i metazoi hanno sviluppato la capacità di rispondere a patogeni quali virus, batteri e parassiti mediante meccanismi molecolari e cellulari del sistema immunitario, diversi a seconda dei phyla.

In quest'ambito, è particolarmente interessante comprendere come l'organismo dell'ospite riesca a intercettare gli agenti infettivi ed eliminarli senza danneggiare i propri tessuti. E' da sottolineare l'enorme diversità molecolare dei patogeni e la loro elevata capacità di mutare e replicarsi.

I meccanismi messi a punto dagli organismi pluricellulari in risposta agli agenti infettivi sono stati tradizionalmente distinti in due gruppi identificati come sistema immune innato e sistema immune adattativo. Il sistema immune innato è costituito da molecole che riconoscono un ampio spettro di diversità e che sono codificate come tali a livello genomico. Viceversa, le molecole del sistema immune adattativo sono codificate da geni che subiscono riarrangiamenti somatici specifici in ciascun clone cellulare.

Mentre la risposta immune innata è presente in tutti i phyla dei metazoi, quella adattativa è specifica dei vertebrati mandibolati, dove si è sviluppato il meccanismo della ricombinazione somatica mediata dal prodotto dei geni *RAG1* e *RAG2* (Gene Attivante la Ricombinazione 1 e 2), responsabile di una illimitata capacità di riconoscimento antigenico. La comparsa contemporanea durante l'evoluzione delle varie molecole specifiche del sistema immune adattativo, cioè i prodotti del Complesso Maggiore d'Istocompatibilità (MHC), gli anticorpi (Ig), il recettore dei linfociti T (TCR), i prodotti dei geni RAG, la deossinucleotidil Transferasi Terminale (TdT), ha indotto a speculare su un unico evento trasposizionale, avvenuto circa 500 milioni di anni fa, che avrebbe inserito nel genoma del precursore dei mandibolati i geni responsabili della ricombinazione somatica (Marchalonis et al., 2006; Litman et al., 2005).

Nonostante i due tipi di risposta immune presentino notevoli differenze nei meccanismi di attivazione, mostrano un comune corredo di

meccanismi effettori quali infiammazione, citotossicità, “clearance” degli immunocomplessi, fagocitosi e induzione dell’apoptosi.

Mentre nei vertebrati mandibolati le due tipologie di risposta immunitaria coesistono e cooperano, migliorando l’una l’azione dell’altra, negli altri phyla la risposta innata è l’unica difesa dell’organismo.

Le molecole di base che attivano la risposta immune innata sono costitutivamente espresse, disponibili quindi a rispondere con rapidità ai microbi; rispondono, però, in maniera sostanzialmente identica ad episodi ricorrenti dello stesso tipo d’infezione. Questo tipo di immunità risulta più rapida di quella adattativa, attivandosi immediatamente e rappresenta quindi la prima linea di difesa dell’organismo contro i microbi; l’elevata patogenicità di alcuni microrganismi è in parte associata alla loro capacità di resistere ai meccanismi dell’immunità innata. Le componenti principali dell’immunità innata sono: (1) le barriere fisico-chimiche dell’organismo, quali epiteli e sostanze ad azione antimicrobica da essi prodotte; (2) le cellule ad attività fagocitica (neutrofili e macrofagi) e quelle ad attività citotossica naturale (natural killer, NK); (3) proteine del sangue, quali quelle che costituiscono il Sistema del Complemento e quelle che mediano l’infiammazione; (4) le numerose proteine, denominate citochine, che regolano e coordinano molte funzioni svolte dalle cellule immunitarie.

L’immunità adattativa si è evoluta affiancando questa prima linea di difesa e risulta molto più selettiva nel riconoscimento di sostanze estranee; inoltre, questo tipo di risposta immune, a differenza della precedente, conferisce all’ospite maggiore capacità difensiva ad esposizioni reiterate ad un medesimo agente microbico: questo tipo di immunità viene plasmata ed “educata” nel tempo, dando luogo, così, ad una risposta più specifica rispetto a quella innata, anche se richiede un tempo più lungo per essere attivata. Le sue componenti principali sono i linfociti e i recettori per gli antigeni da essi prodotti. I recettori per gli antigeni sono generati in maniera “random”; quelli che riconoscono il patogeno inducono un processo di differenziamento e di espansione cellulare dei cloni che li producono. Tale processo richiede circa 4-7 giorni prima di essere completato, dando luogo,

quindi, ad un'efficiente risposta dopo un intervallo temporale troppo lungo se confrontato con la capacità degli agenti microbici di replicarsi. La difesa dell'ospite risulta così assicurata dalla cooperazione della risposta immunitaria innata, veloce ma poco specifica, con quella adattativa, più lenta ma più efficiente.

Le componenti dell'immunità innata riconoscono strutture molecolari specifiche degli agenti patogeni ed assenti nelle cellule dell'ospite, ma, a differenza delle componenti dell'immunità adattativa, capaci di riconoscere persino antigeni sintetici, non sono in grado di riconoscere macromolecole di origine non microbica né molecole di piccole dimensioni. La risposta immune innata è rivolta contro strutture chimiche comuni a particolari classi di microrganismi: gli RNA a doppia elica presenti nei virus o le sequenze CpG non metilate espresse nei batteri; i peptidi N-formil-metioninici all'inizio della sequenza, specifici delle proteine espresse nei batteri; i lipidi e i carboidrati complessi sintetizzati dai procari e non dalle cellule di mammifero, come il lipopolisaccaride (LPS) dei batteri gram-negativi, l'acido lipoteicoico dei batteri gram-positivi (LTA) e gli oligosaccaridi ricchi di mannosio delle glicoproteine batteriche. Poiché i bersagli del riconoscimento mediato dal sistema immune innato sono pattern molecolari conservati, questi sono stati denominati pattern molecolari associati al patogeno (PAMP), ed i relativi recettori del sistema immunitario sono stati denominati "recettori di riconoscimento di pattern" (PRR) (Janeway, 1989).

Grazie alla sua selettività per le componenti microbiche, anche il sistema immunitario innato, al pari di quello adattativo, è in grado di discriminare il "self" dal "non-self": il compartimento dell'immunità innata non è in alcun modo capace di reagire contro strutture autologhe. I prodotti microbici riconosciuti dai PRR sono spesso molecole essenziali per la sopravvivenza dei microrganismi: ciò garantisce che le strutture bersaglio dell'immunità innata non possano essere facilmente eliminate o modificate dai microbi, per eludere la risposta dell'ospite; l'LPS e l'LTA, per esempio,

sono componenti strutturali della parete batterica essenziali per la sopravvivenza del batterio.

I PRR sono codificati nella linea germinativa da un numero limitato di geni e presentano un repertorio di specificità abbastanza limitato, che consente di distinguere solo le diverse classi di microrganismi e non i diversi antigeni di uno stesso microrganismo.

1.1 Il Sistema del Complemento

Il Sistema del Complemento è il maggior sistema effettore dell'immunità innata dei vertebrati e rappresenta l'elemento di congiunzione tra l'immunità innata e quella adattativa (Volanakis e Arlaud, 1998; Song et al., 2000). Il Sistema del Complemento dei vertebrati superiori coinvolge circa 35 proteine umorali e di membrana, tra le quali gioca un ruolo chiave la molecola C3. Le funzioni effettrici del Sistema del Complemento possono essere attivate attraverso tre differenti percorsi: la via alternativa, che è innescata dal legame diretto di una componente del Complemento alla superficie del patogeno; la via lectinica che è iniziata dal legame di una lectina del siero, la "Mannose Binding Lectin" (MBL), ai carboidrati presenti sulla superficie del patogeno; e la via classica, che è innescata dal legame dell'anticorpo all'antigene (Fig. 1). In tutti i percorsi d'attivazione la terza componente del Complemento, C3, gioca un ruolo centrale (Sahu e Lambris, 2001). Infatti, la sua attivazione proteolitica da parte della C3-convertasi mette in moto le funzioni effettrici del Sistema, con conseguente reclutamento delle cellule infiammatorie, opsonizzazione del patogeno e successiva fagocitosi o lisi di quest'ultimo attraverso la formazione del cosiddetto "Complesso d'Attacco della Membrana" (MAC).

Il Sistema del Complemento fu scoperto intorno alla seconda metà del diciannovesimo secolo, quando gli esperimenti di Nuttal, Buchner e altri individuarono nella frazione "sensibile al calore" del plasma la presenza di un fattore che favoriva l'opsonizzazione dei batteri mediata dagli anticorpi e permetteva ad alcuni anticorpi di lisare i batteri stessi. Questa componente, che serviva a "complementare" la funzione degli anticorpi nella difesa

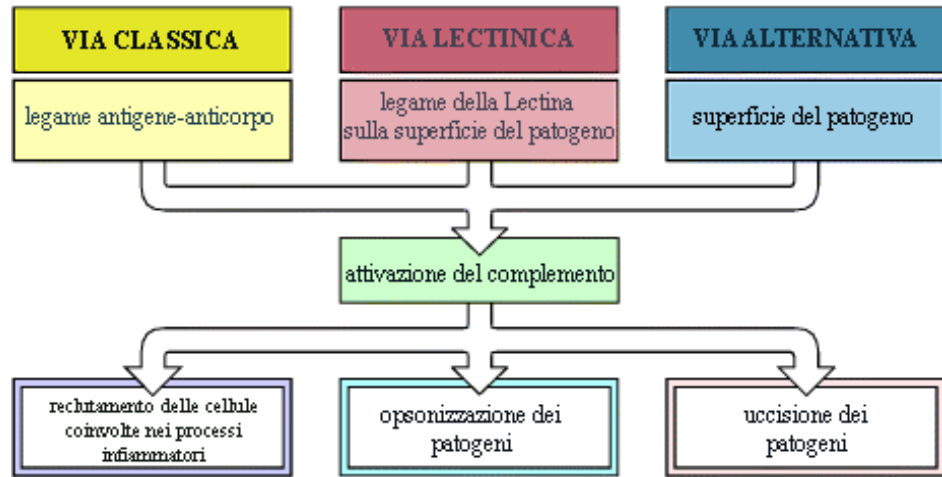


Figura 1. Illustrazione schematica della cascata del complemento. Le vie di attivazione del complemento sono tre: la via classica, attivata dagli anticorpi, la via lectinica che è iniziata dal legame di una lectina che riconosce il mannosio (MBL) sulla superficie batterica e la via alternativa che è innescata dall'attivazione spontanea di C3 che si lega direttamente alla superficie del patogeno. Le tre vie d'attivazione generano una serie di reazioni enzimatiche, che, a loro volta, generano le molecole effettrici del complemento. Le tre principali conseguenze dell'attivazione del complemento sono l'opsonizzazione dei patogeni, il reclutamento di cellule coinvolte nella risposta infiammatoria e l'eliminazione diretta dei patogeni. (Da Janeway, 1999)

dell'organismo, fu quindi denominata "complemento". La scoperta che l'effetto opsonizzante del Complemento fosse dovuto a più componenti proteiche risale agli anni '20 del 1900: l'identificazione di tre molecole plasmatiche, C1, C2 e C4, consentiva di ipotizzare per il Complemento un ruolo autonomo e non di mero meccanismo effettore degli anticorpi. Le altre componenti proteiche, quali C3, C5, C6, C7, C8 e C9, erano ancora ritenute, all'epoca, parte di un unico fattore chiamato "C3 classico". Un ulteriore passo avanti fu fatto tra gli anni '40 e '50 da Luis Pillemer con gli studi su cellule di lievito e veleno di cobra: egli riuscì infatti a dimostrare che il cosiddetto "C3 classico" era in grado di lisare lo zimozano, una mannoproteina derivante dalla parete delle cellule di lievito, senza avvalersi dell'intervento delle altre componenti note del Complemento, cioè C1, C2 e C4. Nel 1954 Pillemer postulò l'esistenza di un fattore sierico che chiamò "properdina", capace di agire indipendentemente dagli anticorpi. I fattori componenti la "properdina" furono successivamente isolati e caratterizzati, aprendo la strada alla scoperta di quello che ora è noto come pathway di attivazione alternativo del Complemento.

Il ruolo di C3, quale elemento cardine sia nel pathway di attivazione classico che in quello alternativo, e di C5, elemento chiave del pathway effettore litico, divenne chiaro quando negli anni '60 il "C3 classico" fu analizzato con tecniche biochimiche e furono individuate le proteine che lo costituiscono. Proprio in quegli anni H. Müller-Eberhard e i suoi collaboratori isolarono la proteina C3, il costituente del Complemento più abbondante nel plasma umano e purificarono anche C5 e C9.

Più recentemente, inoltre, è stata identificata una terza via di attivazione del Complemento, anch'essa indipendente dagli anticorpi: si tratta del pathway lectinico o dell'MBL. L'MBL riconosce i patogeni attraverso i carboidrati di superficie.

Oltre alle ricerche riguardanti le vie di attivazione del Sistema del Complemento, nel ventesimo secolo molto rilievo è stato dato anche ai meccanismi effettori del Sistema, quali i processi dell'infiammazione, dell'opsonizzazione e dell'anafilassi. Tra le molteplici osservazioni si notò,

infatti, che il trattamento con siero non preriscaldato, non solo promuoveva la lisi dei batteri, ma anche la loro “clearance” attraverso la fagocitosi; questo effetto non litico del siero, mediato da cellule di tipo fagocitico, fu detto opsonizzazione. L’esistenza di recettori per le componenti sieriche del Complemento, situate sulla membrana di cellule specializzate, fu ipotizzata nel 1953 da Nelson. Infatti, egli dimostrò che i batteri trattati con siero immune acquisivano la capacità di legarsi agli eritrociti e denominò questo fenomeno “aderenza immune”. Recettori di elementi del Complemento furono successivamente identificati su cellule fagocitiche e linfociti e fu dimostrata la loro specificità per i frammenti di C3.

La perdita di funzione dovuta al calore è caratteristico anche dell’anafilassi, un fenomeno osservato dopo la somministrazione di siero immune; la formazione di fattori chemotattici è stata provata da Boyden negli anni '60: si trattava di quelli che in seguito vennero identificati come C3a e C5a.

Mediante clonazione dei geni, a partire dai primi anni '80 sono state determinate le sequenze amminoacidiche dedotte di tutte le proteine del Complemento per la specie *Homo sapiens* e per altre e, successivamente, con l’avvento dell’era genomica, la posizione reciproca dei rispettivi geni sui cromosomi (Prodinger et al., 1999).

Il Sistema del Complemento agisce come sistema ausiliario nell’immunità, sia mediante azione diretta, sia mediante l’interazione con gli altri elementi dell’immunità umorale. Esso rappresenta un sistema di difesa antico che, con l’evoluzione della risposta immune nei vertebrati gnatostomi, ha acquisito la capacità di interagire con il sistema immune umorale adattativo, divenendo così il maggior sistema effettore per gli anticorpi.

Il Sistema del Complemento, come accade per ogni pathway complesso, ha bisogno di controlli costanti. A questo scopo, circa metà delle componenti del Complemento sono coinvolte nel controllo dei momenti più critici che caratterizzano soprattutto la fase di attivazione del Sistema.

La biosintesi delle proteine del Sistema del Complemento avviene principalmente nel fegato, dove sono prodotte circa il 90% delle componenti plasmatiche. Tuttavia, sono stati identificati molti altri organi e tipi cellulari, coinvolti nella sintesi di tali componenti, come i monociti/macrofagi, le cellule endoteliali, i linfociti, le cellule gliali, le cellule dell'epitelio renale, e quelle degli organi deputati alla riproduzione e molte altre. In particolare è stato osservato che i monociti/macrofagi, così come gli astrociti, sono in grado di produrre tutte le componenti del Sistema del Complemento. Il contributo fornito da queste fonti extra-epatiche nella produzione delle componenti del Complemento non è stato ancora del tutto definito, ma è sicuramente vario. Infatti, per quanto attiene agli astrociti ed alle cellule gliali, esse rappresentano l'unica fonte di tali componenti all'interno della barriera celebrale; per quanto riguarda i macrofagi, invece, la loro presenza in forma attiva nei siti di infezione suggerisce un ruolo di supporto, contribuendo essi all'aumento locale del livello di proteine del Complemento (Paul, 1999).

1.1.1 La via classica

Il pathway di attivazione classico, così denominato perché è stato identificato per primo, è il più moderno dei tre da un punto di vista evolutivo; esso si è sviluppato nei vertebrati dopo la comparsa delle immunoglobuline, come potente meccanismo effettore dell'immunità adattativa; infatti, interviene dopo la formazione di anticorpi specifici, potenziando l'attività delle altre vie più antiche del Sistema del Complemento. Le proteine che formano la cascata di attivazione del pathway classico intervengono nell'ordine: C1, C4, C2 e C3.

C1 è un complesso proteico molto grande (750 kDa) formato da una molecola C1q associata non-covalentemente a due molecole C1r e due C1s; gli ioni Ca^{2+} sono necessari per la formazione del complesso $C1q(C1r)_2(C1s)_2$. La proteina C1q, a sua volta, è composta di sei eterotrimeri identici, ciascuno dei quali è costituito da tre catene polipeptidiche omologhe, C1qA, C1qB e C1qC, associate a formare una

struttura di tipo “coiled-coil”. Ciascuna catena consta di un dominio globulare al carbossiterminale, una regione spaziatrice, ed una sequenza amminico terminale di tipo collagene. Le sei subunità sono tenute insieme a livello delle sequenze di tipo collagene, costituenti il cosiddetto “stelo” della struttura complessiva, spesso indicata come “bouquet di sei tulipani”. La porzione globulare è quella impegnata nel legame con la porzione Fc (Frammento cristallizzabile) delle immunoglobuline (di classe IgG o IgM). La porzione dello stelo, invece, interagisce con le molecole di C1s e C1r. Sia C1r che C1s possiedono un dominio serin-proteasico (dominio catalitico) e un dominio strutturale di interazione con C1q. Prima dell’attivazione tutti i quattro siti catalitici non sono accessibili poiché rivolti verso l’interno del complesso. Il legame con gli immunocomplessi antigene-anticorpo o con altre molecole, virali o batteriche, attiva C1q, inducendo un cambiamento conformazionale che modifica l’interazione con il dimero C1r₂. Le unità del dimero C1r₂ si idrolizzano reciprocamente ed attivano il dimero C1s₂. C1s è l’enzima che a sua volta attiva le componenti C4 e C2. Mediante la cascata descritta, l’attivazione di un singolo complesso C1 può portare, in pochissimo tempo, all’attivazione di circa trentacinque molecole di C4. L’attivazione di C4 avviene con la formazione di due frammenti proteolitici: uno più piccolo, l’anafilatossina C4a, che mostra una bassa attività quale chemoattrattante, e uno più grande, C4b. Quest’ultimo, appena prodotto, va incontro a un’importante variazione conformazionale, il cui risultato è l’esposizione del sito tioestere altamente reattivo nella formazione di legami covalenti di tipo ammidico o estereo con substrati di varia natura (proteine, carboidrati, acqua). Queste reazioni hanno luogo nello spazio di microsecondi. Tuttavia, la maggior parte di C4b interagisce con l’acqua e non comporta alcun effetto biologico, mentre il 5% si lega covalentemente alla superficie del patogeno nelle immediate vicinanze del complesso Ig/C1.

L’attivazione di C2 procede, invece, in modo meno efficiente rispetto a quella di C4: infatti, solo 4 molecole di C2 vengono attivate per ogni complesso C1. C2 si lega a C4b formando un complesso Mg²⁺-

dipendente, pronto per l'attivazione. In questo complesso, infatti, C2 è accessibile al taglio da parte di C1s, che produrrà due frammenti proteolitici: il frammento C2a, più grande, che rimane legato a C4b, e C2b, più piccolo. Si forma così il complesso C4bC2a che rappresenta la C3 convertasi della via classica. La convertasi rimane attiva finché C2a rimane legato a C4b. Quindi la C3 convertasi attiva C3 e contribuisce all'attivazione di C5, che dà inizio al pathway effettore.

1.1.2 La via lectinica

Più recentemente, come già detto, è stata identificata un'altra via di attivazione del Complemento, il cui principale costituente è rappresentato da un gruppo di proteine sieriche, le MBL.

Le MBL appartengono alla famiglia delle collectine, e sono quindi caratterizzate da una struttura simile a quella del collagene, con tre α -eliche assemblate a formare una struttura "coiled-coil", ed un dominio di legame per i carboidrati (CDR) all'estremità C-terminale di ciascuna subunità. Le MBL sono lectine di tipo-C, la cui struttura ricorda molto quella di C1q, a "bouquet di tulipani", e legano i carboidrati in presenza di Ca^{2+} . Le MBL sono state identificate in molte specie; nell'uomo sono presenti nel plasma come miscela di oligomeri delle subunità che le costituiscono (Lu et al., 1990). La concentrazione di queste lectine aumenta di circa tre volte durante la fase acuta dell'infezione. Come già accennato in precedenza, il riconoscimento di carboidrati quali N-acetilglucosamina o il mannosio sulla superficie del patogeno è mediato dalle teste globulari localizzate all'estremità C-terminale della molecola. Poiché l'affinità per i carboidrati di ciascun dominio CDR è bassa, è necessario che più domini si leghino contemporaneamente a più residui saccaridici. Questo tipo di legame è accompagnato da modifiche conformazionali che producono, a loro volta, l'attivazione delle MASP (Proteasi a Serina Associate alle MBL), cioè di MASP-1 e MASP-2, omologhe di C1r e C1s. È stato infatti dimostrato che MASP-2, similmente a C1s, attiva C4 e conduce alla formazione della C3 convertasi della via classica, C4bC2a, in maniera indipendente da C1.

1.1.3 La via alternativa

La via alternativa, evolutivamente il più antico dei pathway di attivazione di C3, rappresenta la prima linea di difesa al contatto dei patogeni: essa viene istantaneamente attivata e amplificata in presenza di materiale estraneo, riconosciuto come non-self.

C3 è la componente chiave della via alternativa, ma altre tre proteine, il fattore B, il fattore D e la properdina sono essenziali per l'amplificazione di questa via (Fig. 2). Il primo evento di attivazione consiste nell'idrolisi di C3, processo che nel siero avviene di continuo, spontaneamente, ma in misura limitata. Esso è mediato dall'acqua e conduce alla formazione di un prodotto intermedio instabile, C3(H₂O), che è conformazionalmente e funzionalmente simile a C3b. Tale prodotto instabile, nel siero, rappresenta circa lo 0.5% della quantità totale di C3 nativo. C3(H₂O) è in grado di legare il fattore B in presenza di ioni Mg²⁺, divenendo così substrato del fattore D, un'altra proteasi a serina della via alternativa, che scinde il fattore B in Bb e Ba. Il prodotto d'idrolisi Bb si lega a C3(H₂O) formando il complesso C3Bb che è tuttavia instabile e si degrada rapidamente a meno che non venga stabilizzato dal legame con la properdina. Si genera così il complesso attivo C3Bb che è chiamato "C3 convertasi iniziale"; al suo interno il frammento Bb funziona da proteasi a serina capace di scindere C3 in C3b e C3a. Il legame di C3b con la superficie dei microrganismi conduce all'attivazione della C3 convertasi stabile. In questo modo la C3 convertasi della via alternativa rappresenta anche un meccanismo di amplificazione di un'attivazione del Complemento iniziata per la via classica.

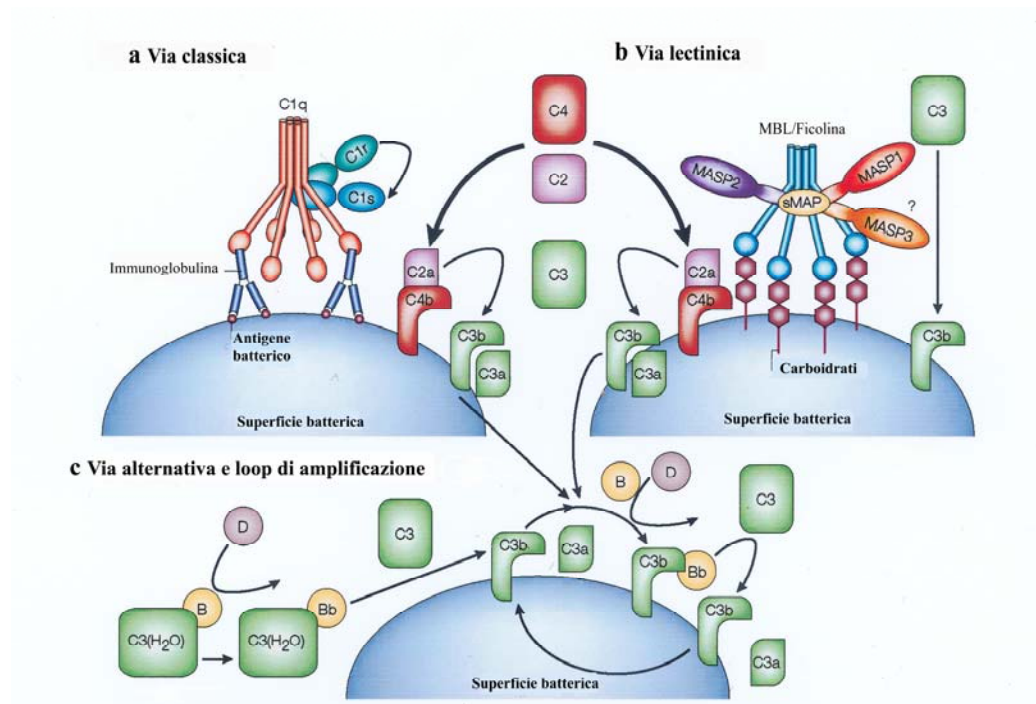


Figura 2. Attivazione della via classica, lectinica e alternativa. **a.** La via classica è iniziata dal legame del complesso C1 agli anticorpi legati agli antigeni sulla superficie dei batteri. Il complesso C1 è costituito da una molecola di C1q, due molecole di C1r e due molecole di C1s. Il legame di C1q con la porzione Fc delle immunoglobuline conduce all'attivazione della proteasi a serina C1r. C1r quindi, taglia ed attiva C1s che traduce l'attivazione del complesso C1 nell'attivazione del complemento mediante il taglio di C4 e C2, con la formazione del complesso enzimatico C4b2a. C4b2a agisce da C3 convertasi e taglia C3, inducendo la formazione di molti frammenti C3b che si legano al patogeno causandone la cosiddetta opsonizzazione. **b.** La via lectinica è iniziata dal legame di una lectina che lega il mannosio (MBL), o dalle ficoline, ad una gamma di carboidrati sulla superficie della cellula batterica. Partecipano a tale interazione la proteasi a serina 1 associata a MBL (MASP1), le proteasi a serina MASP2 e MASP3, e piccole proteine associate a MBL (sMBL)., Similmente a C1s, MASP2 è responsabile dell'attivazione di C4 e C2, che conduce alla formazione della C3 convertasi (C4b2a) come nella via classica. MASP1 è invece capace di tagliare C3 direttamente. **c.** La via alternativa è iniziata dall'attivazione spontanea di C3 – C3(H₂O)- e del fattore B (Bf). Il prodotto di attivazione C3b lega Bf, che è, a sua volta, tagliato in Bb dal fattore D per formare la C3 convertasi della via alternativa, C3bBb. Quando C3b si lega alla superficie della cellula, il loop di amplificazione delle componenti della via alternativa è attivato, e la C3-convertasi forma molte molecole di C3b, che si legano covalentemente intorno al sito di attivazione del complemento. (Da Fujita, 2002)

1.1.4 Il pathway effettore

Le tre vie di attivazione del Complemento convergono nell'attivazione di C3, la molecola chiave del Sistema del Complemento. L'attivazione di C3, da parte della C3 convertasi (C3bBb nella via alternativa, C4bC2a nella via classica ed in quella lectinica), dà inizio agli eventi tardivi della cascata del Complemento (Fig. 3). Infatti, uno dei prodotti dell'attivazione di C3, cioè C3b, è direttamente coinvolto nella opsonizzazione del patogeno sulla cui superficie forma un rivestimento, indirizzandolo o verso l'eliminazione, per fagocitosi, da parte di cellule specializzate o, in alternativa, verso quello che è comunemente conosciuto come pathway effettore litico. Il passaggio cruciale all'inizio del pathway litico è la formazione del complesso C4bC2aC3b che costituisce la C5 convertasi della via classica, che si ottiene dall'associazione di C4bC2a sulla superficie del patogeno con un altro frammento C3b covalentemente legato. Quest'ultimo frammento C3b ha l'importante funzione di associarsi a C5 e presentarlo nel corretto orientamento per l'idrolisi, operata da C2a. Questo complesso è in grado di legare e idrolizzare C5, mediante l'attività serin-proteasica di C2a, iniziando così la generazione del MAC. Anche nel caso della via alternativa alcune molecole di C3b, generate dalla C3 convertasi, formano un nuovo complesso insieme a C3bBb e cioè C3bBbC3b, che costituisce la C5 convertasi della via alternativa. Dopo questo step la via classica e alternativa convergono. Tanto C4bC2aC3b che C3bBbC3b richiedono per il loro funzionamento ioni Mg^{2+} . Il taglio di C5 all'estremità amminico terminale della catena α genera un piccolo peptide, C5a, di circa 11 kDa, ed un frammento grande C5b, di circa 180 kDa. C5a è una molecola infiammatoria con elevata capacità chemoattrattante, in grado di agire anche a grande distanza dal sito di produzione. C5b, come già detto, è la molecola iniziale per la formazione del MAC (Fig. 4). La produzione di C5b, che a differenza di C3b e C4b non è covalentemente legato alla superficie del patogeno, avviene con un cambiamento conformazionale che espone il sito di legame per la componente successiva,

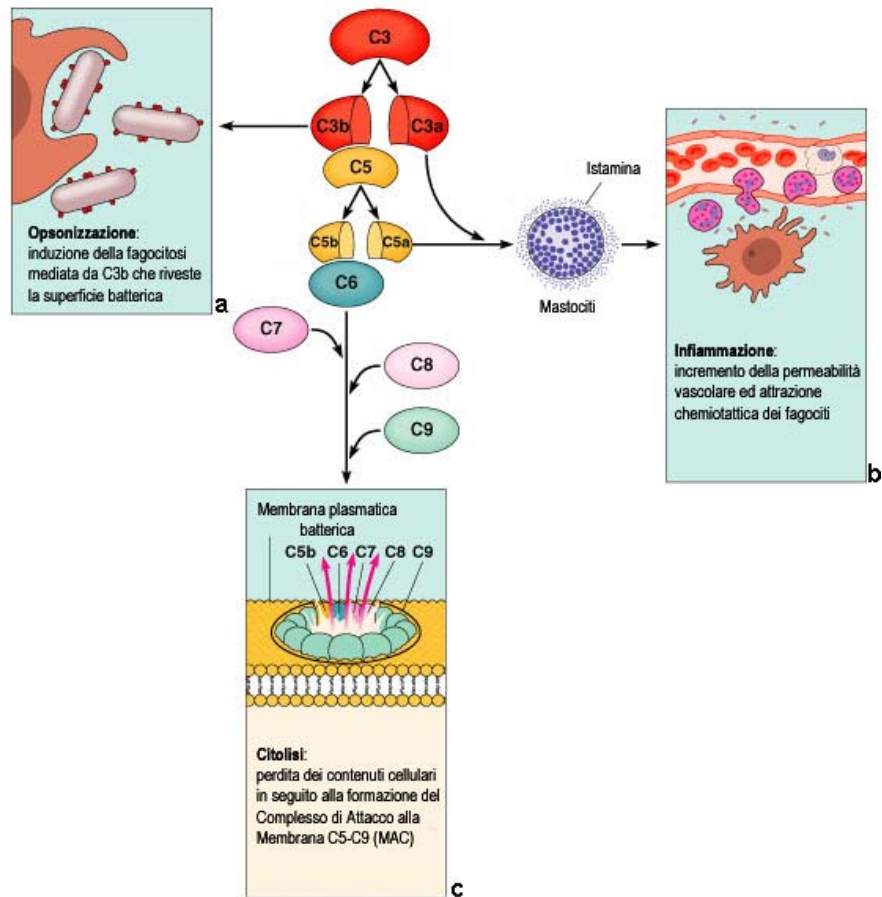


Figura 3. Le tre vie di attivazione del complemento prevedono una serie di differenti reazioni a cascata che convergono nella formazione della C3 convertasi, capace di scindere la componente C3 del complemento in C3a e C3b. Quest'evento genera tre diverse vie effettrici. **(a)** Il frammento C3b si lega alle membrane del bersaglio opsonizzandole e facilitandone l'internalizzazione da parte dei fagociti. **(b)** I due frammenti C3a e C5a, noti come anafilatossine, sono due peptidi dotati di potente attività chemiotattica, che innescano il pathway infiammatorio. **(c)** Infine, l'attivazione di C5 ad opera della C5 convertasi attiva la cascata delle componenti terminali del complemento. Le componenti terminali si associano sulle membrane cellulari a formare un complesso che induce la formazione di pori nella membrana del patogeno determinandone la morte per lisi. (Adattato da: Pearson Education, Inc. 2004)

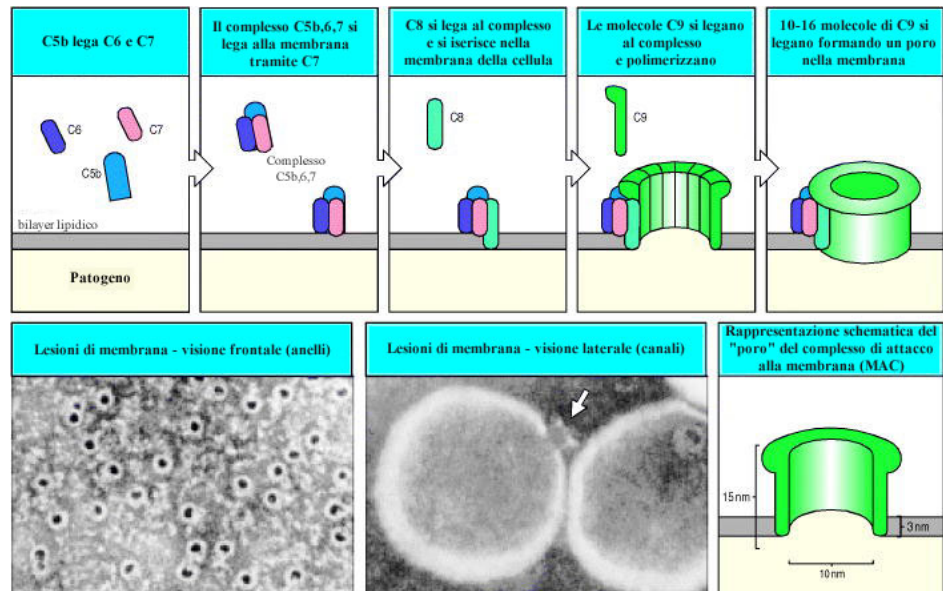


Figura 4. Formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC) e formazione del poro nel “bilayer” lipidico. C5b inizia il processo di formazione del MAC legandosi, in successione, ad una molecola di C6, C7 e C8. Una volta legati, C7 e C8, vanno incontro a modificazioni conformazionali, con esposizione di domini idrofobici che si inseriscono nella membrana. Questo complesso causa danni di piccola entità alla membrana ma è necessario per indurre l’attacco e la polimerizzazione di C9, che si inserisce nella membrana attraverso il sito idrofobico. Fino a 16 molecole di C9 sono aggiunte per formare un canale di 100 Å di diametro nella membrana. Questo canale induce lesioni alla membrana cellulare batterica portando alla morte del patogeno. Le immagini di microscopia elettronica mostrano membrane di eritrociti che presentano MAC in visione frontale e laterale. Strutture di questo tipo sono prodotte anche dalla perforina. C9 e la perforina 1, che sono codificate da geni correlati. Foto: S. Bhakdi e J. Trantum-Jensen. (Da Janeway, 1999)

C6. La capacità di C5b di legare C6 diminuisce rapidamente, ma, una volta legato, C5bC6 forma un complesso bimolecolare molto stabile. Quindi C5bC6 lega C7, e successivamente il complesso C5bC6C7 si lega alla membrana del patogeno mediante siti di riconoscimento presenti su C7, resi disponibili da cambiamenti conformazionali indotti dal legame con C5bC6; se la concentrazione di C7 vicino al sito di attivazione del Complemento è bassa, il complesso bimolecolare C5bC6 si dissocia e le sue componenti si accumulano in soluzione; viceversa, C5b-C7 si lega saldamente alla membrana, iniziando il processo definito reazione di lisi. Tale complesso neoformato è in grado di legare C8. Quest'ultimo è costituito da tre catene polipeptidiche diverse, α , β e γ ; la catena α e la catena γ sono legate covalentemente da un ponte disolfuro, mentre la catena β è associata non covalentemente alle due precedenti. Il legame tra il complesso C5b-C7 e la catena β di C8 avviene attraverso un sito specifico presente su C5b. La catena γ di C8, invece, non sembra avere una funzione definita nel processo di lisi del Complemento.

Il complesso C5b-C8 agisce come agente polimerizzante per C9. La prima catena polipeptidica di C9 che si lega al complesso C5b-C8 subisce profondi cambiamenti conformazionali che consentono la polimerizzazione di altre 10-16 molecole, che generano così un poro di circa 100 Å di diametro nella membrana; poiché il numero di molecole C9 che generano il canale può variare da poche unità fino ad un massimo di 16, i pori formati sulla superficie non sono omogenei. L'inserimento nella membrana del patogeno di questi pori, dotati di una faccia esterna idrofobica ed un canale interno idrofilico, consente il passaggio di ioni e piccole molecole all'interno della cellula bersaglio. Questo comporta uno squilibrio osmotico, con conseguente perdita dell'omeostasi cellulare, rigonfiamento della cellula e lisi. L'ingresso nella cellula di enzimi come il lisozima, contribuisce alla morte del patogeno con conseguente distruzione della cellula bersaglio. Questo meccanismo di lisi non è esclusivo del Sistema del Complemento; infatti le perforine, contenute nei granuli citoplasmatici di linfociti-T citotossici e di cellule natural killer, sono capaci di polimerizzare

su membrane bersaglio, generando canali transmembrana molto simili a quelli prodotti da C9: le perforine, infatti, presentano una forte omologia con C9.

1.1.5 C3, molecola chiave del Sistema del Complemento

C3, come già sottolineato precedentemente, ricopre un ruolo centrale nell'attivazione del Sistema del Complemento: essa è la chiave di volta di tutte e tre le vie di attivazione del Sistema; rappresenta, infatti, una delle molecole più versatili e multifunzionali del Sistema, interagendo in maniera specifica con almeno 25 differenti proteine (Lambris et al., 1998). C3 è una molecola molto antica: la sua identificazione in Cnidaria suggerisce che sia comparsa almeno 1.300 milioni di anni fa, molto prima, quindi, della comparsa delle immunoglobuline e del sistema immunitario adattativo.

C3 umano è la più abbondante proteina del Complemento nel siero, dove raggiunge concentrazioni di 1,2 mg/ml; essa è composta da una catena α ed una catena β (rispettivamente di 110 e 75 kDa), tenute insieme da un singolo ponte disolfuro e da interazioni non covalenti. La proteina è codificata da un unico gene di 41 kbp situato sul cromosoma 19: il gene si compone di 41 esoni, 16 dei quali codificano la catena β e 25 la α . La struttura primaria di C3, dedotta dalla sequenza del suo cDNA, è lunga 1663 residui amminoacidici (compresi i 22 del peptide segnale). Essa è sintetizzata come pro-proteina con la catena α e la catena β unite da una sequenza di tetraarginina, successivamente rimossa da un enzima durante le modifiche post-traduzionali. La struttura, come già detto, è tenuta unita da un ponte disolfuro intercatena tra la catena α e la catena β e da vari ponti disolfuro intracatena. C3 ha la capacità di legarsi covalentemente alla superficie delle cellule bersaglio attraverso legami esterei o amidici. Tale proprietà le è conferita dalla presenza di un ponte tioestere intramolecolare nella regione comunemente identificata come C3d. Il ponte tioestere si forma durante le modifiche post-traduzionali come risultato di una transacilazione intramolecolare tra il gruppo tiolico della cisteina 988 e il gruppo γ -ammidico della glutammina 991. Nella forma nativa il sito

tiostere di C3 è protetto all'interno di una tasca idrofobica ed è esposto solo in seguito a cambiamenti conformazionali prodotti su C3b, il frammento più grande generato dall'attivazione di C3 da parte della C3 convertasi (Janssen et al., 2005; Janssen et al., 2006; Grosse et al., 2008). L'attivazione di C3 rende il gruppo tiostere presente su C3b disponibile ad una reazione di transacilazione con gruppi nucleofili presenti sulla superficie della cellula bersaglio, o anche carboidrati e immunocomplessi.

L'attivazione di C3 avviene con l'intervento della C3 convertasi che agisce a livello dei residui 726 e 727 (Arg-Ser) della catena α e con la produzione di C3b e C3a. C3b si lega al patogeno indirizzandolo verso l'eliminazione o per fagocitosi o attraverso un complesso processo di lisi mediato dalla formazione del MAC; C3a, invece, il secondo dei frammenti che si generano nel processo di attivazione di C3, è una potente anafilatossina che innesca il pathway effettore infiammatorio.

1.1.6 L'anafilatossina C3a e il suo recettore C3aR

Come già accennato nei precedenti paragrafi, nei vertebrati, uno degli eventi più importanti legati all'attivazione del Complemento è la formazione di tre piccoli peptidi di natura cationica, C3a, C4a e C5a, definiti come anafilatossine del Complemento.

La parola "anafilatossina" è stata introdotta da Friedberg, circa 100 anni fa, per descrivere l'attività trovata nel siero, che determinava la morte rapida di animali da laboratorio quando venivano loro somministrate aliquote di siero attivate per il Complemento.

Le anafilatossine del Complemento sono state purificate, caratterizzate e sequenziate tra il 1970 e il 1980; si tratta di piccoli peptidi di lunghezza variabile tra 74 e 77 amminoacidi, secondo la specie presa in esame, di natura cationica (con un pI compreso tra 8.6 e 9.6), caratterizzati dalla presenza di un dominio anafilatossinico con sei residui di cisteina che formano tre ponti disolfuro intracatena. La comparazione delle sequenze di C3a, C4a e C5a dell'uomo ha dimostrato che esse, sebbene differiscano notevolmente nella loro composizione amminoacidica, derivano da un

unico gene ancestrale: nelle varie specie analizzate ci sono residui conservati solo in 13 posizioni, inclusi i residui di cisteina. Nonostante questa differenza nella loro struttura primaria, studi cristallografici e di risonanza magnetica nucleare (NMR) hanno indicato che le anafilatossine del Complemento sono molto simili nella loro struttura terziaria.

Riguardo al loro ruolo funzionale, l'anafilatossina C3a ha una potente attività proinfiammatoria, e media una varietà di risposte biologiche *in vivo* ed *in vitro*, quali il rilascio di istamina, la mobilitazione degli ioni calcio intracellulare nei mastociti umani, il rilascio di enzimi lisosomiali dai leucociti, la contrazione della muscolatura liscia, l'aggregazione delle piastrine in *Cavia porcellus*, e la modulazione delle risposte immuni cellulare ed umorale (Hugli, 1990; Ember et al., 1998).

Inoltre, la struttura di C3a, determinata con la tecnica NMR, è stata paragonata ad una "bacchetta da percussionista" o "pugnale", con un core rigido formato da tre α -eliche antiparallele, tenuto insieme da tre ponti disolfuro; la porzione amminico-terminale di C3a sembra possedere una grande flessibilità che le consente di ripiegare una quarta α -elica terminale verso il core della molecola. La porzione carbossi-terminale, identificata come la regione effettrice di C3a, ha una conformazione irregolare e, rivolgendosi verso il core della molecola, assume una conformazione a pseudo- β turn. La porzione carbossi-terminale, comprendente 5-8 residui amminoacidici, è fondamentale per l'attività biologica di C3a; in tutti i mammiferi, è presente al carbossi-terminale una sequenza conservata, LGLAR, che è coinvolta nell'interazione con il recettore specifico di C3a (C3aR). Il legame tra C3a e C3aR permette la trasduzione del segnale all'interno delle cellule che esprimono tale recettore.

La maggior parte delle attività biologiche di C3a, incluso il reclutamento e l'attivazione dei leucociti e di altre cellule effettrici ai siti d'infiammazione, è mediata dal legame a recettori specifici dotati di sette domini transmembrana, accoppiati alla proteina G (Fig. 5-6), e appartenenti alla famiglia delle rodopsine (Ember et al., 1998). Caratteristica distintiva di questo tipo di recettori è l'induzione di una risposta cellulare di tipo

transitorio, detta desensitivizzazione, consistente nella capacità di attenuare la risposta dei recettori stessi, nonostante la presenza persistente del ligando (Naik et al., 1997). L'attività di questi recettori, accoppiati a proteina G, è finemente regolata dalla loro fosforilazione.

C3aR è stato clonato in diverse specie di mammiferi (Ames et al., 1996; Crass et al., 1996; Roglic et al., 1996; Hsu et al., 1997; Tornetta et al., 1997; Fukuoka et al., 1998; Hollmann et al., 1998), e la caratterizzazione funzionale del prodotto genico è stata condotta principalmente in uomo e topo. Questo recettore è largamente espresso in differenti cellule del sistema immunitario e i suoi RNA messaggeri sono stati identificati anche in vari tessuti di organi non-linfoidi. La caratteristica principale di *C3aR* è la presenza nella molecola di un lungo loop extracellulare di 175 residui amminoacidici tra i domini transmembrana IV e V, a livello del quale c'è bassa omologia di sequenza tra le specie (Ember et al., 1998). E' stato dimostrato che tale loop è impegnato nella formazione del legame specifico con il frammento C3a; risultati ottenuti con approcci sperimentali diversi indicano che non tutto il loop è funzionale in questa interazione, essendo almeno il 65% della sequenza non direttamente coinvolto. Solo le porzioni amminico-terminale e carbossi-terminale del loop sembrano critiche per tale legame: esse formerebbero una sorta di tasca vicina alla membrana alla quale C3a si lega; l'interazione avverrebbe tra i numerosi residui di acido aspartico presenti in queste due regioni e i residui carbossi-terminale di C3a, di natura cationica. Più recentemente è stato anche dimostrato che la sulfazione della tirosina 174 di *C3aR* umano è essenziale per il legame con C3a (Gao et al., 2003). Il legame ligando-recettore fa sì che *C3aR* sia internalizzato nel giro di pochi minuti, e la fosforilazione dei residui di serina e treonina dell'estremità citosolica carbossi-terminale sembra giocare un ruolo cruciale in questo processo (Langkabel et al., 1999; Settmacher et al., 2003).

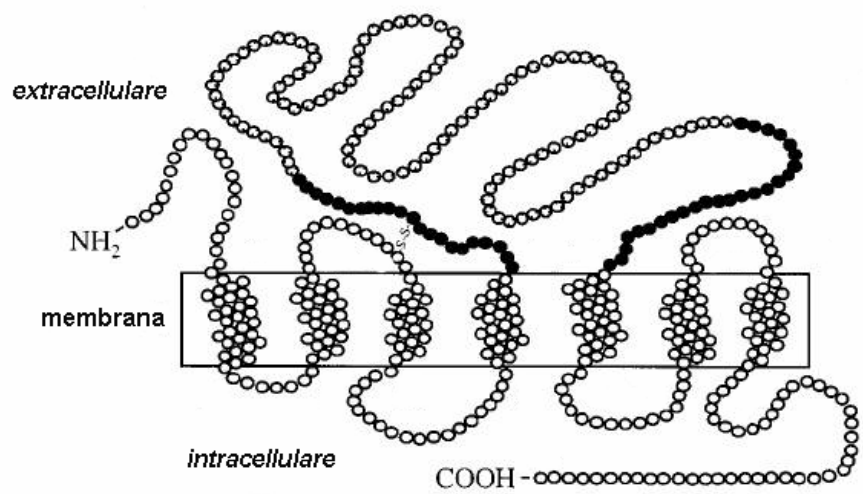


Figura 5. Rappresentazione schematica del recettore di C3a umano. I cerchi pieni rappresentano la porzione di sequenza del II loop extracellulare ritenuta indispensabile per la funzionalità del recettore, così come si evince da un'analisi per delezione. (Da: Chao et al., 1999)

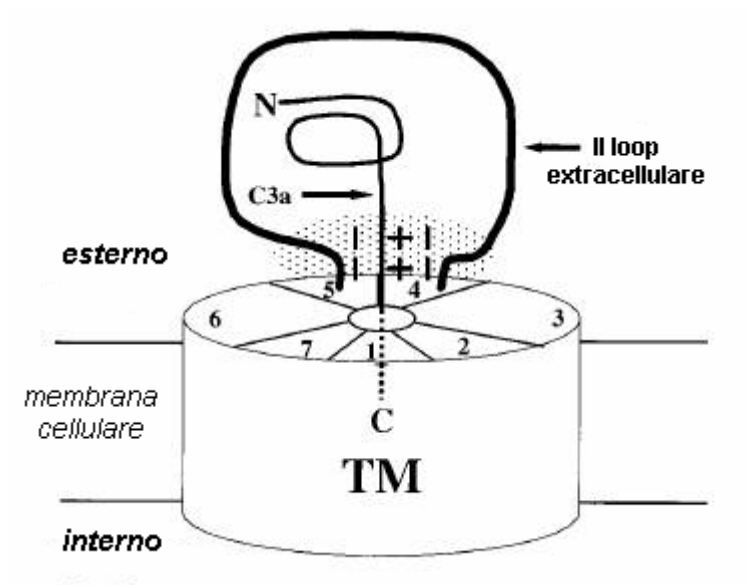


Figura 6. Il recettore di C3a dei mammiferi è rappresentato schematicamente come un cilindro suddiviso in sette sezioni corrispondenti ai sette domini transmembrana. Il modello di interazione “carica-carica” di C3a con il suo recettore prevede che le due regioni a carica negativa, localizzate alle estremità del II loop extracellulare del recettore, siano in grado di interagire con le cariche positive della porzione C-terminale del peptide C3a. Questo meccanismo faciliterebbe l’interazione che si realizza tra il sito effettore primario del recettore e la sequenza C-terminale GLAR di C3a. (Da: Chao et al., 1999)

1.2 Il sistema sperimentale: *Ciona intestinalis*

Il phylum dei Cordati comprende organismi molto diversi fra loro, accomunati da alcune caratteristiche basilari. Sono classificati tali, infatti, tutti gli animali dotati, durante la vita embrionale e/o adulta, di una struttura assiale di sostegno, la notocorda, fiancheggiata da muscoli segmentali, un tubo neurale cavo, dorsale ad essa, ed un tubo digerente ventrale.

Il phylum è suddiviso in tre subphyla: urocordati, cefalocordati e vertebrati, e tra questi gli urocordati erano considerati i più antichi, ed i cefalocordati i più prossimi ai vertebrati (Rowe, 2004). Tuttavia, recenti studi di filogenesi molecolare pongono gli urocordati, e non i cefalocordati, alla base dei vertebrati (Delsuc et al., 2006; Vienne e Pontarotti, 2006).

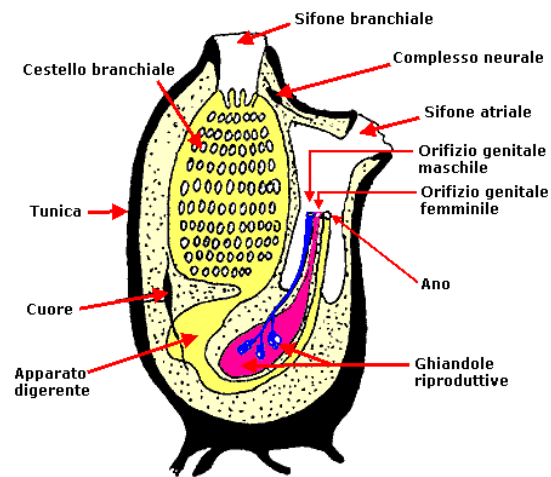
Nel subphylum degli urocordati è collocata la classe degli ascidiacei, animali marini sessili cui appartiene la specie *Ciona intestinalis*, il modello sperimentale utilizzato in questi studi (Fig. 7a).

Le caratteristiche distintive dei Cordati sono evidenti nelle ascidie soltanto nello stadio larvale, da cui l'adulto si origina per metamorfosi. La larva delle ascidie possiede, infatti, limitatamente alla coda, una struttura di sostegno cava, la notocorda, rivestita da cellule e, lateralmente ad essa, due serie di cellule muscolari striate suddivise in tre bande longitudinali. Il sistema nervoso è dorsale rispetto alla notocorda mentre cellule endodermiche sono localizzate in posizione ventrale.

L'anatomia della forma adulta delle ascidie, invece, poco giustifica la loro collocazione nella scala evolutiva dei Cordati. Gli individui adulti (Fig. 7b) (Barnes, 1987; Brusca e Brusca, 1990), infatti, sono di forma cilindrica o globosa, aderiscono al substrato attraverso un peduncolo fibroso e sono rivestiti da uno speciale involucro, la tunica, da cui prendono il nome di Tunicati. La tunica delle ascidie, il cui costituente principale è la tunicina, ha una speciale caratteristica: contiene cellule ameboidi (o cellule della tunica) e cellule del sangue, che sono migrate



a



b

Figura 7. (a) Individui adulti di *Ciona intestinalis*. **(b)** Rappresentazione schematica della struttura corporea di un individuo adulto. In questa visione laterale sono evidenziati i principali organi interni.

dalle strutture mesenchimali corporee. Una delle funzioni della tunica è quella di permettere l'ancoraggio al substrato; funge, inoltre, da supporto esoscheletrico protettivo. Il lato posteriore dell'animale è quello coinvolto nell'ancoraggio al substrato, il lato antero-superiore dell'animale presenta due aperture: un sifone inalante ventrale branchiale (orale o buccale) ed un sifone esalante dorsale atriale.

Il corpo delle ascidie può essere suddiviso in tre regioni: una regione faringea (o toracica) anteriore, che contiene il faringe, una regione addominale che contiene il tratto digerente e gli altri organi interni, ed un post-addome. Il post-addome di solito non si distingue facilmente dall'addome; tuttavia, in alcune ascidie coloniali, esso assume una forma allungata e contiene il cuore e gli organi preposti alla riproduzione. L'acqua di mare, contenente cibo ed altre componenti inorganiche, entra attraverso il sifone branchiale; acqua, prodotti di scarto e cellule riproduttive sono rilasciati attraverso il sifone atriale. Ciascun sifone è regolato da speciali muscoli sfinterici, che ne determinano la chiusura. La bocca, collocata dietro il sifone branchiale, è collegata con un grande faringe, o cestello branchiale, una camera perforata da fila dorsoventrali di numerose fessure branchiali, dette stigmata. I vasi sanguigni attraversano la parete del faringe a livello di queste fessure, dove si realizzano gli scambi gassosi. Lungo il margine ventrale del cestello branchiale c'è un organo specializzato chiamato endostilo, che sembra avere, da un punto di vista evolutivo, relazioni con la ghiandola tiroide dei vertebrati. Quest'organo produce grandi quantità di muco, che raggiunge le particelle alimentari e le avvolge, indirizzandole al tratto digerente. Il tratto digerente conduce allo stomaco, che si estende nella parte terminale del tratto a forma di U, e poi a un intestino che termina con l'ano che si apre nella cavità atriale.

Il sistema nervoso consiste di un unico ganglio cerebrale localizzato tra i due sifoni. Dal ganglio si originano i nervi diretti a varie parti del corpo, come i muscoli, il faringe e i sifoni. Una

ghiandola neurale, adiacente al ganglio, è collegata, attraverso un dotto, al faringe. La funzione di questa ghiandola è tuttora sconosciuta.

Il sistema circolatorio è aperto e ben sviluppato, e consiste di un piccolo cuore tubolare e di numerosi vasi sanguigni. Il cuore è posizionato vicino allo stomaco e dietro al cestello branchiale ed è circondato da un sacco pericardico. Il battito cardiaco e il flusso sanguigno subiscono periodicamente inversioni di direzione. Il sistema circolatorio contiene diversi tipi di cellule del sangue dette emociti. Gli emociti delle ascidie hanno numerose funzioni specializzate tra cui si distinguono le attività citotossiche, e la funzione di accumulo del vanadio (Sato, 1994).

1.2.1 Gli emociti delle ascidie

Numerosi studi condotti al microscopio ottico ed elettronico a trasmissione (TEM) hanno consentito di evidenziare nell'emolinfa delle ascidie diversi tipi di emociti che sono stati variamente classificati (Fig. 8). La classificazione utilizzata in questo studio li raggruppa in quattro tipi cellulari: cellule staminali, amebociti, cellule vacuolate e cellule pigmentate (Rowley et al., 1984).

Le cellule staminali (Fig. 8a) sono note anche col termine di emoblasti (Milanesi e Burighel, 1978), emocitoblasti (Ermak, 1976) o cellule linfocita-simile (LLC) (Overton, 1966; Fuke, 1979; Wright, 1981). Le cellule staminali si ritrovano principalmente nei noduli ematopoietici, localizzati a livello delle pareti che rivestono la struttura corporea delle ascidie e a livello delle pareti del faringe. Tali cellule sono coinvolte in questi tessuti in una intensa attività proliferativa, che suggerisce il loro coinvolgimento nella risposta immunitaria (Wright, 1981). Sono state ritrovate, inoltre, anche nell'emolinfa circolante. Le cellule staminali hanno un elevato rapporto nucleo/citoplasma e manifestano i tipici caratteri ultrastrutturali delle cellule indifferenziate. Sono cellule generalmente piccole, dai 5 ai 7 μm di diametro, e presentano un nucleo centrale contenente una grande quantità di eterocromatina ed

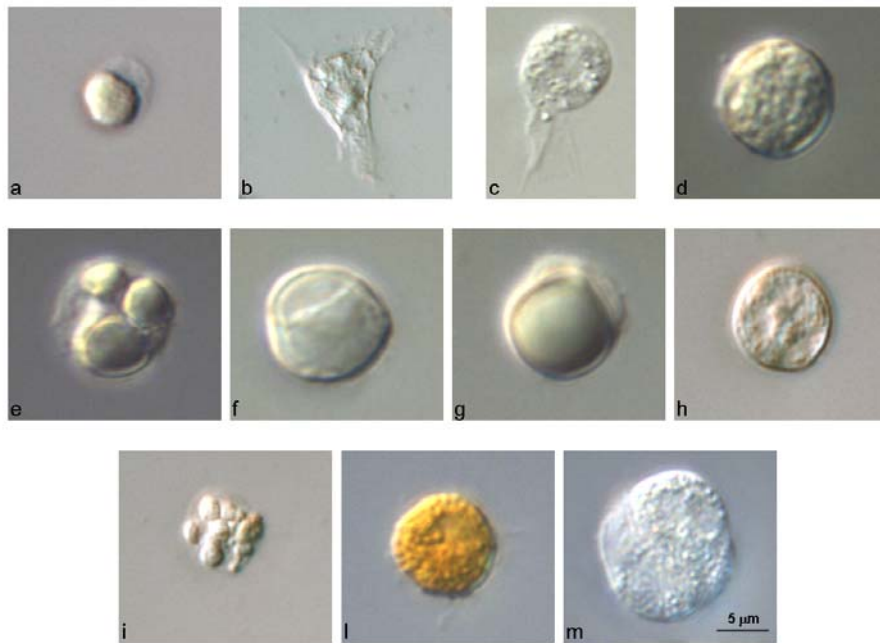


Figura 8. Emociti di *Ciona intestinalis*. Osservazione effettuata con ottica Nomarski. **(a)** Cellula staminale; **(b)** amebocita ialino non vacuolato; **(c)** amebocita ialino vacuolato; **(d)** amebocita granulare; **(e)** amebocita refrattile; **(f)** granulocita univacuolare refrattile (URG); **(g)** “signet ring”; **(h)** cellula compartimentata; **(i)** morula; **(l)** cellula pigmentata; **(m)** nefrocita.

un voluminoso nucleolo, spesso di aspetto granulare (Milanesi e Burighel, 1978; Rowley, 1982a). Il citoplasma è omogeneo e contiene un gran numero di ribosomi liberi, talvolta organizzati in poliribosomi, dei mitocondri ed un reticolo endoplasmatico rudimentale. Secondo Ermak (1976), queste cellule rappresentano una fonte, ancora indifferenziata, dei vari tipi di emociti. Egli riteneva, infatti, che le cellule staminali contenute nei noduli ematopoietici producessero le LLC, dalle quali successivamente si sarebbero differenziati tutti gli altri tipi di emociti. Le cellule linfocita-simile presentano un grande nucleo ed una piccola porzione di citoplasma, contenente poche piccole vescicole. Si ritiene che le LLC siano coinvolte nel riconoscimento del tessuto allogenico (Raftos et al., 1987), fungendo da cellule immunocompetenti.

Gli amebociti, in genere molto abbondanti nel sangue delle ascidie, hanno un diametro che varia tra i 6 e i 12 μm e possono essere raggruppati in quattro sottocategorie: amebociti ialini non-vacuolati, amebociti ialini vacuolati, amebociti granulari ed amebociti refrattili (Rowley, 1981; 1982a). Questi quattro tipi di amebociti si distinguono non solo per la loro morfologia ma anche per le diverse funzioni. Gli amebociti ialini non vacuolati (Fig. 8b) *in vitro* agglutinano rapidamente attraverso un meccanismo che richiama quello più complesso dell'emostasi. In presenza di particelle estranee, come batteri, queste cellule non sono coinvolte in processi di fagocitosi. Al contrario, gli amebociti ialini vacuolati (Fig. 8c) e gli amebociti granulari (Fig. 8d) sono cellule che mostrano elevata attività fagocitica verso una ampia varietà di antigeni, sia *in vivo* che *in vitro* (Rowley, 1981). Queste cellule sono caratterizzate da un citoplasma contenente molte vescicole, una piccola quantità di reticolo endoplasmatico rugoso (RER), complessi di Golgi e pochi mitocondri. La presenza delle numerose vescicole, e vacuoli di diverse dimensioni suggerisce il possibile coinvolgimento di entrambi i tipi di cellule nell'accumulo e nella conservazione del vanadio (Rowley, 1982b; 1983). Si è visto infatti, che in seguito alla fagocitosi i microrganismi sono accumulati nei vacuoli contenenti vanadio: quest'ultimo, essendo un potente veleno metabolico,

potrebbe giocare un importante ruolo nell'eliminazione dei microbi. Per quanto riguarda gli amebociti refrattili (Fig. 8e), la loro funzione non è ben nota, sebbene siano stati osservati a loro carico piccoli fenomeni di fagocitosi. Anch'essi, quindi, potrebbero essere coinvolti nelle reazioni di difesa cellulare.

Le cellule vacuolate sono caratterizzate dalla presenza di vacuoli o vescicole ripiene di fluido. Tali cellule, in condizioni fisiologiche, sono dotate di movimenti ameboidi ed attività fagocitica (Fuke, 1979); inoltre sembrano essere coinvolte anche in altri meccanismi di difesa, tra cui l'incapsulazione (Anderson, 1971) ed il riconoscimento self-nonsel (Fuke, 1980; 1990).

Le cellule vacuolate sono distinte in almeno tre sottotipi: granulociti univacuolari, cellule compartimentate e cellule a morula (Wright, 1981). Al primo sottotipo appartengono cellule che hanno un diametro di 6-12 μm , con un unico grande vacuolo contenente materiale granulare, un nucleo localizzato in periferia, ribosomi liberi e pochi mitocondri nel citoplasma. Appartengono a questo sottotipo i granulociti univacuolari refrattili (URG) (Fig. 8f) e le cellule "signet-ring" (Fig. 8g). Le cellule compartimentate (Fig. 8h) sono poco comuni e hanno forma sferica, con un diametro che varia tra gli 8 e i 12 μm . Nel citoplasma presentano un numero variabile di vacuoli in posizione periferica, il nucleo è centrale e non contiene il nucleolo; il citoplasma intorno al nucleo e ai compartimenti non è granulare. Le morule (Fig. 8i) sono cellule circolari, con un diametro di 8-16 μm , spesso con aspetto simile alle more, e contengono grandi vacuoli circondati da membrana, ripieni di materiale elettrondenso. Le morule sono state spesso indicate anche con il termine di "vanadociti" per la loro capacità di accumulare una grande varietà di metalli, tra cui il vanadio (Kustin et al., 1976). Tali cellule rappresentano anche un sito di accumulo di altre componenti, tra cui proteine e polisaccaridi (Wright, 1981), e possono essere coinvolte nella risposta infiammatoria (Anderson, 1971) e nella sintesi della tunica (Endean, 1961).

Le cellule pigmentate (Fig. 8l) hanno un diametro di 6-13 μm e contengono un numero variabile di granuli di pigmento di diverso colore, il

più frequente dei quali è il giallo (Rowley, 1981). Alcuni studiosi ritengono che i pigmenti contenuti in questi granuli siano basati su componenti contenenti vanadio (George, 1926); secondo altri, invece, si tratta di granuli ricchi di melanina o carotenoidi (Wright, 1981). Le cellule pigmentate si ritrovano spesso attaccate alle pareti dei vasi, in particolare quelli che circondano il sifone atriale e la tunica. La funzione di queste cellule non è ancora stata stabilita.

Oltre a queste quattro classi di cellule le cui caratteristiche e funzioni sono ben note, esistono altre cellule chiamate nefrociti (Fig. 8m). Queste cellule, che sono spesso molto più grandi degli altri emociti circolanti e raggiungono i 40 μm di diametro, si ritiene siano coinvolte nell'accumulo di vari prodotti escretivi (Wright, 1981).

1.2.2 Il Faringe

Il faringe, o sacco branchiale, è l'organo più grande del corpo delle ascidie. Esso è stato estensivamente studiato per l'importanza che ricopre nella sistematica; molti autori, infatti, sono d'accordo nel dire che la suddivisione in ordini delle ascidie riflette i tre livelli di evoluzione della parete branchiale, che potrebbe essere correlata con l'aumento di complessità ed efficienza dell'organo (Fiala-Medoni, 1974). Sebbene il sacco branchiale sia coinvolto principalmente nella respirazione e nella raccolta di cibo, esso svolge altre importanti funzioni, come l'assorbimento di metalli pesanti (Kalk, 1963), processi digestivi e l'assorbimento di materiale organico disciolto (Fiala-Medoni e Pequignat, 1980; Pestarino et al., 1988; Godeaux, 1989). Inoltre, le correnti d'acqua generate da quest'organo provocano l'espulsione di feci, cataboliti e gameti all'esterno attraverso il sifone atriale. Un'ulteriore funzione svolta dal faringe risiede nella sua attività ematopoietica: il tessuto ematopoietico, infatti, è abbondante nella sua parete, soprattutto nelle barre trasversali e longitudinali (Ermak, 1976), che costituiscono la struttura portante del faringe stesso (Fig. 9).

Il faringe, la cui organizzazione è stata descritta in dettaglio da Millar (1953), si estende dalla base del sifone orale alla bocca dell'esofago ed occupa poco più dei tre quarti della lunghezza totale del corpo dell'animale. Questa proporzione rimane costante lungo tutto il ciclo vitale dell'animale.

Nel faringe si distinguono una stretta zona anteriore, detta prebranchiale, ed un'ampia zona posteriore, branchiale. Nella zona prebranchiale la parete faringea e la parete del corpo sono unite: in tale area le pareti sono costituite da un epitelio non ciliato formato da cellule esagonali, molte delle quali in divisione. La zona branchiale, invece, è caratterizzata da pareti laterali perforate da fenditure (stigmata), organizzate in file trasversali che vanno dalla zona medio-ventrale a quella medio-dorsale, da una struttura chiamata endostilo in posizione medio-ventrale e da una serie di "languets" in posizione medio-dorsale.

Le pareti laterali del sacco branchiale originano dalla fusione dell'epitelio branchiale (endoderma) con quello atriale (ectoderma) durante lo sviluppo (Burighel e Cloney, 1997).

Le pareti laterali, come già detto precedentemente, sono perforate da stigmata ciliati: l'acqua entra nel sacco branchiale attraverso il sifone orale per l'azione propulsiva delle ciglia degli stigmata che la veicolano nella cavità atriale. Da questa è quindi espulsa attraverso il sifone cloacale.

Durante questo passaggio, avvengono gli scambi gassosi con il sangue ed i tessuti, mediati dall'epitelio interno. Le particelle alimentari ed i detriti in sospensione nell'acqua sono filtrati da un sottile strato mucoso che scivola al di sopra delle fessure, dall'endostilo alle "languets". La morfologia del faringe varia notevolmente a seconda degli ordini di appartenenza delle ascidie. La morfologia del sacco branchiale di *C. intestinalis*, è descritta in

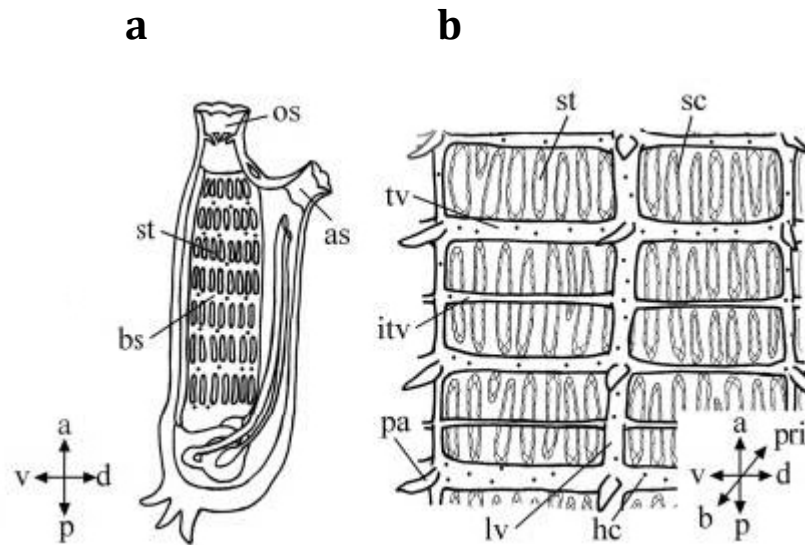


Figura 9. Rappresentazione schematica delle fessure branchiali in *Ciona intestinalis*. **a.** nell'adulto, gli stigmata allungati antero-posteriormente sono allineati dorsoventralmente e formano il sacco branchiale. **b.** nel sacco branchiale dell'adulto, ogni fila di stigmata è imbrigliata in una rete formata dall'intersezione di barre trasversali e longitudinali. a, anteriore; as, sifone atriale; b, branchiale; bs, sacco branchiale; d, dorsale; hc, emociti; itv, barre trasversali intrastigmatiche; lv, barre longitudinali; os, sifone orale; p, posteriore; pa, papille; pri, peribranchiale; sc cellule dello stigma; st, stigma; tv, barra trasversale; v, ventrale (Da Shimazaki et al., 2006).

maggior dettaglio di seguito. Per l'organizzazione della parete laterale del sacco branchiale, *Ciona* è classificata tra gli Stolidobranchia, caratterizzati da cestelli branchiali costituiti da numerose pliche appiattite in successione. Tale struttura è costituita da barre trasversali all'interno delle quali corrono i vasi sanguigni; le barre trasversali si dividono in interstigmatiche che corrono tra le file di stigmata e parastigmatiche, che passano esattamente al centro delle diverse file di stigmata. Entrambi i tipi sono ispessimenti della parete branchiale che le conferiscono una struttura a creste, connesse ad essa solamente attraverso occasionali strutture trabecolari. Le barre trasversali variano in dimensione in base all'età dell'animale. La loro organizzazione è stata analizzata in dettaglio da Damas (1901), che chiamò quelle più lunghe "barre di primo ordine", e le più piccole, in ordine decrescente, "barre di secondo, terzo ordine" e così via. Cinque barre di primo ordine dividono il cestello branchiale in sei porzioni di grandezza decrescente in direzione antero-posteriore. Le barre di secondo ordine tagliano a metà ogni porzione delimitata da quelle di primo ordine, risultando così alternate a queste ultime. Nove barre si aggiungono a quelle preesistenti attraverso un processo di crescita che le porta ad intercalarsi.

Oltre alle barre trasversali, la parete laterale del sacco branchiale presenta anche barre longitudinali, che sono perpendicolari alle barre trasversali, corrono per tutta la lunghezza del faringe e presentano al loro interno vasi sanguigni che mettono in comunicazione tra loro i vasi sanguigni delle barre trasversali.

Una scanalatura dorsale ed una ventrale corrono lungo ogni barra formando una parziale costrizione che separa la porzione interna a forma di clava dalla porzione esterna indifferenziata. La porzione a forma di clava è a sua volta divisa in due parti: una ciliata e la seconda non ciliata; due terzi della porzione dorsale sono ciliati e solo una stretta striscia lungo la parte ventrale non è ciliata. Nella porzione non ciliata si possono distinguere delle cellule piccole e schiacciate che hanno un grosso vacuolo contenente un corpo unico che si colora con coloranti specifici per il muco: sembra, infatti, che esse siano cellule attivamente impegnate nella produzione di muco.

Un gran numero di stigmata sono ingabbiati all'interno del reticolo formato dall'intersezione di barre longitudinali e trasversali intrastigmatiche: il numero di questi cresce al crescere dell'animale.

Gli stigmata sono lunghi e stretti con l'asse maggiore lungo il faringe. Le cellule ciliate, il cui numero varia da 6 a 8 lungo lo spessore della parete branchiale, delineano i margini degli stigmata. Ogni cellula si allunga nel senso della lunghezza dello stigma e possiede una fila di 15-20 ciglia, che sono abbastanza lunghe da raggiungere il centro dello stigma. Le cellule ciliate sono disposte in modo tale da formare una sorta di anello con sette file parallele di cellule inserite nello spessore della parete branchiale. Queste cellule sono poi fiancheggiate da sottili cellule "parietali". Le cellule stigmatiche sono laminari e ricche di mitocondri con un nucleo localizzato in posizione basale. Esse sono bagnate dal flusso sanguigno che avvolge l'anello stigmatico.

La moltiplicazione degli stigmata ha luogo attraverso la divisione degli stigmata pre-esistenti e non attraverso la formazione di nuove perforazioni: si vedono spesso nel sacco branchiale piccoli stigmata derivanti dalla divisione di quelli più grandi. Si possono trovare piccoli stigmata anche nel faringe di animali anziani o in condizioni di stress. In questi casi la presenza di stigmata piccoli dipende dalla riduzione dei più grandi.

In molte ascidie la parte superiore del faringe ha una lamina dorsale proiettata centralmente all'interno della cavità del sacco branchiale ma in *Ciona* questa è sostituita da una fila di "languets". Ad ogni "languet" corrisponde una barra trasversale. Le "languets" sono strutture lunghe, a forma di falce e curvate a destra. Sono schiacciate antero-posteriormente e possiedono un'ampia base che si assottiglia all'estremità opposta. L'epitelio liscio non ciliato ricopre le facce anteriore e posteriore, ma i margini laterali sono ciliati. Le ciglia si estendono per tutta la lunghezza della "languet".

Nella parte opposta alla fila di "languets", in posizione medio-ventrale, si trova l'endostilo, posizionato esattamente sopra la porzione dove la parete faringea forma un tutt'uno con la parete del corpo dell'animale.

Esso è proiettato verso l'alto nella cavità del sacco branchiale nel quale si apre e presenta una profonda scanalatura longitudinale molto stretta. Rispetto a questa scanalatura, l'endostilo presenta simmetria bilaterale. Ogni metà dell'endostilo ha tre fasce longitudinali di cellule ghiandolari separate da due bande di cellule ciliate. C'è anche, in posizione ventrale, una singola banda mediana di cellule ciliate che occupa la parte interna dell'endostilo. Le tre fasce di cellule ghiandolari sono chiamate dorsale, mediana e ventrale. Tra la fascia dorsale e quella mediana c'è la banda mediana di cellule ciliate, mentre tra la fascia mediana e quella ventrale di cellule ghiandolari c'è la banda ventrale di cellule ciliate. All'esterno della scanalatura, al di sopra della fascia dorsale di cellule ghiandolari, l'endostilo presenta un tratto di epitelio non ciliato, seguito dalla banda dorsale di cellule ciliate. Epitelio liscio ricopre la parte più esterna dell'endostilo.

1.3 Il Sistema del Complemento negli Urochordata

Nell'ultima decade, nel contesto di un rinnovato interesse della comunità scientifica per l'immunità innata, lo studio del Sistema del Complemento è stato ulteriormente approfondito ed ha beneficiato di nuovi approcci. Tra questi, di particolare interesse è stato lo studio delle sue origini, con le ricerche di componenti del Sistema in specie molto divergenti; tale studio è stato condotto usando soprattutto i potenti mezzi messi a disposizione dalla biologia computazionale e dai progetti di sequenziamento dei genomi tuttora in corso.

In questo contesto si inserisce anche l'interesse degli immunologi comparati per il Sistema del Complemento degli urocordati che studi recenti di filogenesi collocano alla base della linea evolutiva che ha dato origine ai vertebrati (Delsuc et al., 2006; Vienne e Pontarotti, 2006; Nonaka e Kimura, 2006). I modelli animali usati nello studio del Complemento sono principalmente due: *Halocynthia roretzi*, specie giapponese, e *C. intestinalis*, specie cosmopolita che vive nelle acque temperate. Altre informazioni provengono da ricerche effettuate su altre due specie, *Pyura stolonifera* e *Styela plicata*, originarie dei mari australiani.

Le analisi genomiche per la ricerca di geni coinvolti nell'immunità sono state condotte prevalentemente nella specie *C. intestinalis*, il cui genoma è stato il primo ad essere sequenziato tra gli urocordati (Dehal et al., 2002; Azumi et al., 2003). L'analisi del genoma di *Ciona* ha consentito di identificare un gran numero di geni codificanti componenti omologhe a quelle del pathway di attivazione lectinico ed alternativo dei mammiferi (Fig. 10): nove MBL, nove ficoline, due molecole C1q, quattro membri della famiglia delle alfa-2-macroglobuline, tre Bf/C2 e quattro MASP (Azumi et al., 2003). Trascritti di gran parte di questi geni sono anche identificabili nelle librerie di EST. Inoltre, nel genoma di *Ciona* sono stati identificati 11 modelli genici contenenti il dominio perforinico, che potrebbero, quindi, codificare componenti che partecipano agli eventi più tardivi della cascata del Complemento. Infine, sono stati identificati un gran numero di modelli genici, 132, che potrebbero codificare molecole regolatrici del Sistema (Azumi et al., 2003).

Il risultato più rilevante di questa analisi ha evidenziato l'imprevedibile complessità molecolare del Sistema del Complemento delle ascidie, che possiedono la maggior parte delle componenti modulari del Sistema in numero uguale o superiore a quello dei geni ortologhi dei mammiferi. Il livello di espansione del Sistema raggiunto in *Ciona*, sembra sia stato generato da eventi di duplicazione genica specifici del lineage degli urocordati, quindi antecedenti il doppio round di duplicazione dell'intero genoma che sarebbe avvenuto in uno stadio iniziale dell'evoluzione dei vertebrati (Ohno, 1999).

Il gene codificante la molecola chiave del Sistema del Complemento, C3, è stato sequenziato e caratterizzato in due differenti specie di urocordati, le ascidie *Halocynthia roretzi* (Nonaka et al., 1999) e *C. intestinalis* (Marino et al., 2002), che presentano rispettivamente uno (*AsC3*) e due (*CiC3-1* e *CiC3-2*) geni per C3. La sequenza amminoacidica dedotta per i C3 di queste due specie mostra un sito canonico di taglio tra la catena α e la catena β , così come anche un sito tioestere canonico, con l'istidina catalitica

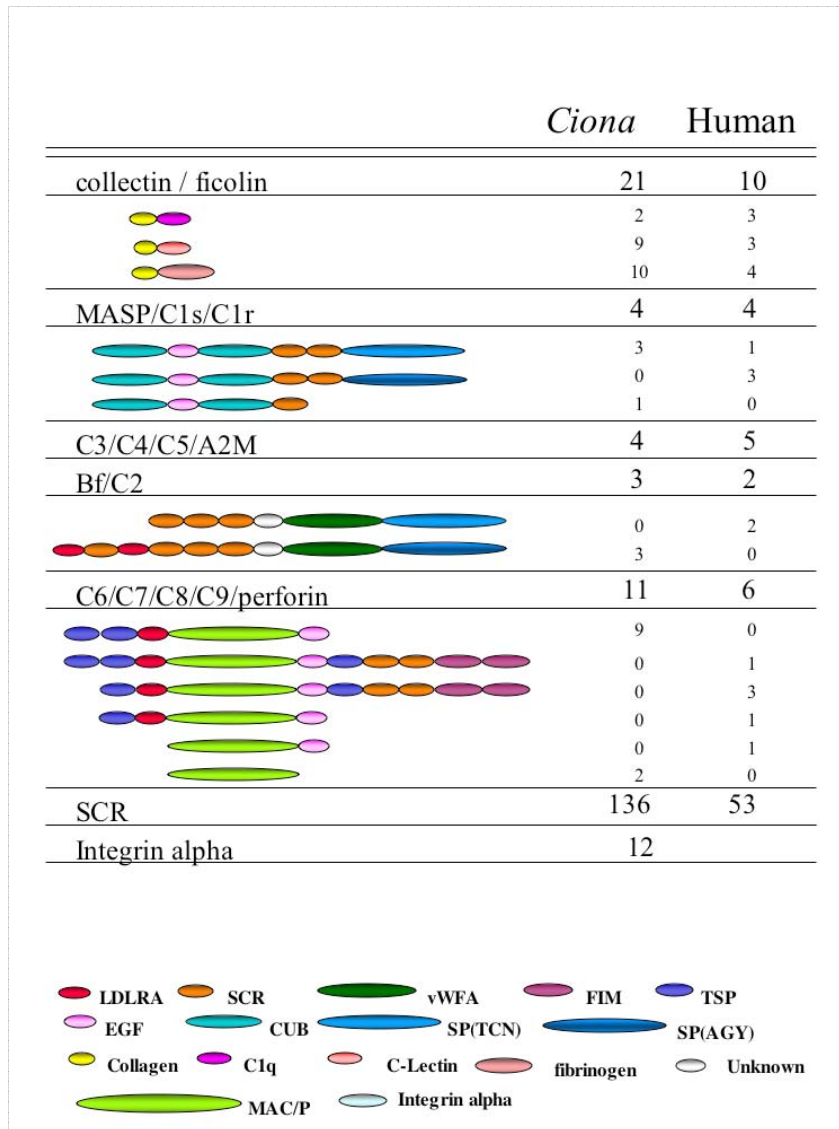


Fig.ura 10: Molti geni del complemento sono stati identificati nel genoma di *Ciona intestinalis*. Nell'elenco sono riportati solo i geni che mostrano una significativa omologia con i geni del complemento dei vertebrati. Solo quelli sicuramente identificati come appartenenti al sistema del complemento sono stati esaminati per la presenza di domini strutturali, e solo quei geni con gli stessi, o quasi gli stessi, domini strutturali come quelli trovati nella controparte dei vertebrati, sono stati considerati. A sinistra sono mostrate schematicamente le strutture dei domini dei geni del complemento, e a destra il numero di copie presenti in *Ciona* e nell'uomo. (Azumi et al., 2003)

localizzata a valle. È presente un sito di taglio della convertasi in posizione conservata sia in AsC3 che in CiC3-1, mentre in CiC3-2 una lunga inserzione, ricca di residui di treonina, rende difficile localizzare tale sito nella molecola. Nei mammiferi il sito di produzione di C3 è il fegato; nelle ascidie, nelle quali manca un fegato vero e proprio, non è stato condotto alcuno screening per identificare i siti di produzione di C3. Analisi condotte mediante Northern blot hanno rivelato la presenza in *H. roretzi* di trascritti di C3 in epatopancreas e cellule del sangue (Nonaka et al., 1999); in *C. intestinalis*, nella quale è assente anche l'epatopancreas, è stata evidenziata la presenza di trascritti di C3 in emociti (Marino et al., 2002).

La presenza dei prodotti del gene C3 in emociti circolanti e nel siero di *H. roretzi* e *C. intestinalis* è stata inoltre verificata usando anticorpi specifici (Nonaka et al., 1999; Marino et al., 2002; Pinto et al., 2003): in particolare, in *C. intestinalis*, esperimenti di immunistochemica condotti su sezioni di tunica da animali trattati con LPS, hanno consentito di identificare i tipi cellulari dell'emolinfa coinvolti nella produzione di C3, e cioè le cellule compartimentate e gli amebociti granulari (Pinto et al., 2003). Risultati simili sono stati ottenuti anche in *Styela plicata*, nella quale anticorpi eterologhi hanno rilevato, nell'emolinfa dell'animale, la presenza di C3 (Raftos et al., 2002) sintetizzato da emociti di tipo fagocitico e rapidamente esocitato dopo stimolazione con antigeni associati ai patogeni (Raftos et al., 2004).

C3 di *H. roretzi* si comporta come una opsonina umorale: infatti, l'incubazione di cellule bersaglio di lievito con emolinfa contenente C3 di *H. roretzi* porta ad un consistente aumento dell'attività fagocitica da parte degli emociti. Esperimenti di inibizione di questa attività fagocitica, condotti in presenza di anticorpi contro AsC3 o in presenza dell'agente chelante EDTA, hanno confermato l'ipotesi del coinvolgimento di AsC3 nell'opsonizzazione dei patogeni. Infatti la rimozione di C3 o dei cationi divalenti dall'emolinfa impedisce il legame di C3 alle cellule bersaglio di lievito, dimostrando, quindi, che la fagocitosi avviene attraverso

l'opsonizzazione delle cellule di lievito mediata da C3, la cui attivazione richiede appunto cationi divalenti (Nonaka et al., 1999).

Nei mammiferi, la produzione del frammento proteolitico C3b, che media l'opsonizzazione del patogeno, è associata alla produzione dell'anafilatossina C3a, un potente mediatore delle reazioni infiammatorie. C3a dei mammiferi presenta nella sequenza sei cisteine conservate che formano tre ponti disolfuro che stabilizzano il core della molecola costituito da quattro eliche antiparallele (Ember et al., 1998; Wetsel et al., 2000). Le sequenze C3a di ascidia, finora sequenziate, mostrano solo quattro cisteine conservate e non presentano un dominio anafilatossinico canonico. Inoltre la sequenza C-terminale del C3a delle ascidie, come molti altri C3a di invertebrati e bassi vertebrati, differisce da quella dei mammiferi, che presentano la sequenza consenso LGLAR, coinvolta nel binding tra C3a ed il suo recettore specifico (Ember et al., 1998; Wetsel et al., 2000). In *Ciona* la sequenza consenso presente al carbossiterminale di *CiC3-1a* è infatti VQGR. Nonostante queste differenze strutturali, è stata dimostrata in *C. intestinalis* la presenza di un'attività infiammatoria mediata da C3a (Pinto et al., 2003); infatti, sia *CiC3-1a* ricombinante che il peptide sintetico, riprodotto il C-terminale della molecola, sono in grado di promuovere *in vitro* la chemotassi degli emociti con modalità dose dipendente. Questa attività può essere inibita sia con anticorpi specifici diretti contro *CiC3-1a* che con pretrattamenti degli emociti con la tossina della pertosse. Questi risultati indicavano chiaramente che l'attività chemotattica è dipendente dall'interazione tra C3a e un recettore accoppiato a proteina G presente sugli emociti di *Ciona*.

L'attività del C3a di *C. intestinalis* è stata ulteriormente caratterizzata attraverso esperimenti di ibridazione *in situ* ed immunostochimica condotti su sezioni di tunica derivanti da animali trattati con LPS o animali di controllo ai quali era stato iniettato PBS. Questo tipo di analisi ha evidenziato che il numero totale di emociti presenti nelle aree iniettate con LPS è cinque volte superiore a quello dei controlli e che il numero di amebociti granulari aumenta di 15 volte nelle stesse aree trattate

con LPS. Inoltre, gli amebociti granulari e le cellule compartimentate richiamati nell'area dell'iniezione sono anche attivamente ingaggiati nella produzione di C3, che raggiunge il livello massimo di espressione a 48 ore dall'iniezione di LPS. Tutti questi dati, dunque, indicano che *CiC3-1a* agisce come chemotassina per gli emociti di *C. intestinalis* e che il reclutamento degli emociti mediato da *CiC3-1a* nel sito di infezione può svolgere un importante ruolo nei processi infiammatori (Pinto et al., 2003).

Nei mammiferi, il frammento bioattivo C3a si lega specificamente a recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteina G, che sono esposti sulla superficie cellulare (Ember et al., 1998; Wetsel et al., 2000). Recentemente, è stato clonato e caratterizzato in *C. intestinalis* il recettore coinvolto nella chemotassi mediata da C3a (Fig. 11) (Melillo et al., 2006). Tale recettore (*CiC3aR*), che come quello dei mammiferi è ampiamente espresso in differenti tessuti ed organi, è una proteina a sette domini transmembrana di 95 kDa, caratterizzata da una lunga regione idrofila di 162 amminoacidi tra il quarto ed il quinto dominio transmembrana, caratteristica, questa, comune a tutti i recettori di C3a dei mammiferi. Le predizioni di struttura secondaria e l'allineamento amminoacidico con altri C3aR ha evidenziato la presenza di una inserzione molto lunga nel terzo loop citoplasmatico e l'allungamento della coda citoplasmatica. Esperimenti di immunistochemica condotti su cellule del sangue dell'emolinfa circolante, con tre diversi anticorpi policlonali, EL1, EL2, ed IL3, diretti rispettivamente contro il primo ed il secondo loop extracellulare e contro il terzo loop intracellulare, hanno dimostrato che *CiC3aR* è espresso costitutivamente in due soli tipi di cellule fagocitiche, gli amebociti granulari e ialini. Da saggi di chemotassi, realizzati utilizzando gli anticorpi contro il primo ed il secondo loop extracellulare ed il terzo loop intracellulare, risulta evidente che la chemotassi mediata dal peptide sintetico riproducente la sequenza C-terminale di *CiC3-1a* è inibita solo dagli anticorpi contro il primo ed il secondo loop extracellulare, dimostrando, quindi inequivocabilmente che *C. intestinalis* esprime un C3aR funzionale, omologo al recettore dei mammiferi (Melillo et al., 2006).

aataaggtatgtagggaaaatcaaatgttttagttacgaagaccagtgacc**ATGGCTTT** 60
M A L 1
GGCCAAGATGTAGTTATAATATTTCTATGCATATGCGGGATCGGCCTCAATACAGCTAT 120
A Q D V V I I F L C I C G I G L N T A M 4
GTTGGGATGTTCTGTGTCAAGAAACAGGTCCGAGGTTCCATATACACCACATATATGAT 180
L G L F C V K K Q V R G S I Y T T Y M I 24
TCAAATCGCCGCAACAGACCTCATTTGCTTAGTATGGCTCATTATGACATCACTGTT 240
Q I A A T D L I V C L V W L I M T S L F 44
CCTACATGAACTACCAACGGAACCAACTTTGCAAGCTAATGCAGAGCCTCCCCCACCTC 300
L H E L P T E P T L Q A N A E P P P T S 64
TTCTCTCAGTTGTACAGATTCATATACGCGGTGTACAACCTCCATTATTACATCAATAT 360
S L T L Y R F I Y A V Y N F H Y Y I N I 84
CTTTCTGCTTGCCACGATGAGTGTGAACGGTGCCTTGCCGTGTGGAATCACTCAGGTG 420
F L L A T M S V E R C V A V W K S L R C 104
CCAACGATATCAGTTAATCGGAAATTTATCTACGGTGTAGTGCCTCATGTGGTTGAT 480
Q R Y Q F N R K F I Y G V S A L M W L I 124
AGCATTCTCATGCGCACTGCCGAGCTTCATTCGACTCGATCTCGTTACTGACAACATAAA 540
A F S C A L P S F I R L D L V T D N I N 144
CATCACACGACCGCCAACATGAAGGTAGCAGAGACACACATGTACATGAAATGTTACGA 600
I T R P A N M K V A E T H M Y M K C Y E 164
ACCGCTCAAACACGCATCTGACAACAACCTCACTTATGTGCATGGATTACGATGGAATATC 660
P L K H A S D N N L T Y V M D Y D G I S 184
CGCAGTGGATTGCTATGATATCATGCAGGAGGATTTATTTATCATGATTGATGAGATAGA 720
A V D C Y D I M Q E D Y L S L I D E I D 204
TACTGGTATGATGGATCCAATGTATGAGGAATACCAGGAGTTATATACAGATGATATATA 780
T G M M D P M Y E E Y Q E L Y T D D I Y 224
TGGGGATACCGGTAACATAACCATGCTACCGGAGTTGATGCAATTTGTGTACCAAGTCAC 840
G D T G N I T M L P E L M Q F V Y Q V T 244
ATTACCTAACGGTGATAACATGACCGTGGTTGACCACCAGATATATTTCTCATTATTCCA 900
L P N G D N M T V V D H Q I Y F S L F H 264
CGGGATTATTTTCGCATATTCATAATAAATCTAAGAAGGAACCACTAGGTGGCATATGCCA 960
G I I S H I H N K S K K E P L G G I C D 284
TCCAAGGTTGAACAAAGACCGGAAGATATACAACATCATAGTGAACCTCATCATCGGGTT 1020
P R L N K D A K I Y N I I V N L I I G F 304

CTTTCATCCCTTTCCTTGCATTCTCATAAGTTATGTTTCAATCGCTCACATGATCCGAGT 1080
 F I P F L A I L I S Y V S I A H M I R V 324
 GCGTGCCTTGGACCGTATGGAGAACGATTGTGATGTCATAGAGAGCGAGACACTGGG 1140
 R A L D R M E N D C D V I E S E S T L G 344
 ACGAAGAATGTCGGATTTCTTGCACAGTTTGTAAAGCGGGGCGGGCCCGTGAAAAATGT 1200
 R R M S D F L R Q F V S G G G P V K N V 364
 GGTGAAAGCACCCACCTTATAATAAAGGTAGTTCCTTGTGAGAAGAAGTTGAG 1260
 G E S T P P Y N K G S S P L L R R S L R 384
 GAAGAAAGCTCGCGATCGTGGACGGGTGGAGGGGAGCGAGGTCAAATCATCCAGAGA 1320
 K K A R D R G T G L E G S E V K S S R D 404
 TGATGTAGTTAAACCTCCAGTGGTGAGGAGGGAGAGAAACCTGTAGTCAGGGATGCGGG 1380
 D V V K P P V V R R E E K P V V R D A G 424
 GGTGATAGAAGACCTCGTTTGTCTGTCATTCTCGCACCAACGCACAGCAGAAGGACAAG 1440
 V D R R P R L S S F S H P T H S R R T S 444
 CGGGGGCTCGGCCAGTCTGCTGAAAGTTTCCAAACCGACCAAACATCGTTGCATGCGGC 1500
 G G S A S S A E S F Q T D Q T S L H A A 464
 GACACCAAGCCCTGGAGTGAGGCTCTCAGCTCCCATATTCGTACATGATAAGACCCCGGT 1560
 T P S P G V R L S A P I F V H D K T P V 484
 ACAACGAGCGTCATCGACCGAACCCCCACACACCCCGTTCACCCCCACACGACGATG 1620
 Q R A S S T E T P T H P R S P P T R R W 504
 GTCATCAGAAACCTTACGAGCCCCATGAGGCTTCACCCCTGTATTAGATGAAACGGA 1680
 S S E T L R S P H E A S P P V L D E T E 524
 GCCTCTTTACGACCGTGTGATGATGTCACAATGGCCAACCAACGTGCGCTCCTAGTGG 1740
 P L Y D R V D D V T M A K P T S P P S G 544
 GGACTCCACACAGGAATTATTCACGGAAGTTACGCGAGGTTATACTCACAGAAACCTGA 1800
 D S T Q E L F H G S Y A R L Y S Q K P D 564
 CGCGCGCCAAGATACCAACGACAAGCATCAACGACCTCAAACCTACAGAAGCCGCGCTTA 1860
 A R P R Y Q R Q A S T T S N Y R S R A Y 584
 CTCTGCCACGTCAAGGGCAGGCGGCGGAGGGGTACCCTTCGTAAAACAATCGTACACAA 1920
 S A T S R A G G G G T L R K T I V H K 604
 GAACGCTGAACGTATCTACGAATATCACGAACCGCTCTCACATACGTTTGTGTGTTCCG 1980
 N A E R H L R I S R T A L T Y V C V F A 624
 TGTGTGTTGGCTTCCACAGAGGATGTAGCTGTTGTGTATGTTGTGAGGGCATGGTTGG 2040
 V C W L P Q R I V A V V Y V V E G M V G 644

TTTAGGAGGCCACGCATGCCATGCAGTATTCACAGCTACCAGAATTCTCAGCTTTCTCAG 2100
 L G G H A C H A V F T A T R I L S F L S 664
 TGTTTTGCTCAACCCTATTGTATACGCGATGACACAACGTGAAATACGACATCTTTGCG 2160
 V L L N P I V Y A M T Q R E I R H L L R 684
 ACGAAAACCTGCAGGGATGTGTAATGTATCCACCCTGGCCGTGAATCGAACCCCTGACCC 2220
 R K L A G M C K C I H P G R E S N P D P 704
 CCAGAACCGCGACGTGAACGTCTCGTTTTCGGAACGCACGACGAGACTTTTCAGTTGTTGC 2280
 Q N R D V N V S F A N A R R D F S V V A 724
 TGATCATAATATAACGAGTGATGAGATTTTTATGAAACGAGAGAGACACGCACGTAACAA 2340
 D H N I T S D E I F M K R E R H A R N K 744
 AGAACGCTGGTCGAGGTTAATGCATAGATFGGGGGAAAAAACCTCCGCTTATCGTTGAC 2400
 E R W S R L M H R L G G K N L R L S L T 764
 GGGTAGCGGGTTCACTTCCCCGGGTGAGAAGCAAAGTGACGGAACAATAGATGAAGACGA 2460
 G S G F T S P G E K Q S D G T I D E D E 784
 GAGAAGGGTCAAAGTTCGAAAGGTCAAAGTTCATCAACCTCATTTAAGTTAATTGGGGG 2520
 E K G Q S S K G Q S S S T S F K L I G G 804
 TTGGGAAGATTGTCAGCAGATGATTGACATGGCTGAGGTTAATAAAGGTCAAACCACTAA 2580
 W E D C Q Q M I D M A E V N K G Q T T N 824
 CGAGGAAACCATACTCtgaactttcggggcggcgaatgcatgaggatactgatttcaagt 2640
 E E T I L * 844
 ctcatcgcgtgctaccattgtgggcgaatgtgggcaaaacacttaacagcaattgatccaa 2700
 cccagtggtcactaatggggtgtctgaattgtcagtcatacagaaaaacaatcaccacca 2760
 aagttacatacgtgataacttgaagctggcacaagggtgatgaaacagaacaccocgtgt 2820
 tataacgactgtcattgccccgccatgcgaggataaataagttacattctttaacctcaa 2880
 gtgcataaaacgtgtgagacctctaccagactacggtctattactataggtcgatagtga 2940
 cctctggtggtcatgtttagtttaaatcccaaccacttggtggtgtatggagtcgtacct 3000
 ctttgaggaaagttccaaagtttttttgtataaaaaataaaattaacaatcatgaaaaaa 3060
 aaaaaaaaaa 3071

Figura 11. Trascritto di 3071 bp corrispondente al gene che codifica il recettore di C3a di *Ciona intestinalis*, con relativa sequenza amminoacidica. In esso sono state identificate una regione 5'-UTR di 52 bp, una regione codificante di 2544 bp con il codone della metionina iniziale inserito nel contesto del motivo Kozac canonico, ed infine una regione 3'-UTR di 475 bp con due possibili segnali consecutivi di poliadenilazione alle posizioni 3030 e 3037, ed una coda di poly(A) terminale.

In *C. intestinalis* sono stati anche identificati tre geni, *CiBf-1*, *CiBf-2* e *CiBf-3*, che codificano il fattore B (Bf) (Dehal et al., 2002; Azumi et al., 2003; Yoshizaki et al., 2005). L'analisi delle sequenze amminoacidiche dedotte indica che tali proteine presentano una organizzazione in domini strutturali simile a quella della famiglia genica Bf/C2 dei vertebrati. L'identità di sequenza amminoacidica tra *CiBf-1* e *CiBf-2* è dell'88%, e tra *CiBf-3* e *CiBf-1* o *CiBf-2* è del 49%. L'analisi filogenetica, congiunta alla caratterizzazione dettagliata dell'organizzazione genomica e la composizione in introni/esoni, indica che la molteplicità di geni per Bf in *Ciona* sono il risultato di eventi duplicativi e di conversione genica avvenuti all'interno del subphylum Urochordata dopo la divergenza dal subphylum Vertebrata.

Nelle ascidie, è stata anche prodotta una chiara evidenza della presenza di un pathway di attivazione lectinico. E' stata infatti identificata e caratterizzata in *H. roretzi* una lectina (GBL) di 36 kDa che lega specificamente il glucosio. L'analisi della sequenza ha rivelato che GBL possiede un dominio lectinico di tipo C ma non ha il dominio collagene che caratterizza le MBL dei mammiferi.

Per determinare se GBL intervenisse come molecola di riconoscimento nel pathway lectinico del Sistema del Complemento delle ascidie, il plasma di *H. roretzi*, depletato di GBL o C3 con anticorpi specifici, è stato usato in saggi di fagocitosi di cellule di lievito da parte degli emociti. L'incubazione del plasma con entrambi gli anticorpi aveva come risultato una significativa diminuzione dell'attività fagocitica, suggerendo che GBL riconosce i carboidrati sulla superficie delle cellule di lievito e a sua volta attiva C3 attraverso le MASP ad essa associate (Sekine et al., 2001).

Nei mammiferi, il pathway lectinico viene scatenato dai patogeni e coinvolge il riconoscimento da parte di MBL o di altre lectine.

Queste lectine appartengono alla famiglia della ficoline e sono caratterizzate dalla presenza di un dominio all'estremità N-terminale contenente residui di cisteina, un dominio simile al fibrinogeno ed uno simile al collagene (Matsushita et al., 2000). In *H. roretzi*, sono stati sequenziali 4 cloni di cDNA codificanti ortologi di ficoline dei mammiferi ed è stata accertata la loro

specificità nel legare carboidrati. È stato suggerito che la loro associazione con le MASP contribuisce all'attivazione di C3, ma purtroppo non ci sono evidenze sperimentali a supporto di questa ipotesi (Kenjo et al., 2001).

Inoltre, in *H. roretzi*, sono state identificate due MASP, MASPa e MASPb. Le sequenze amminoacidiche dedotte di queste due molecole mostrano due caratteristiche specifiche di MASP-1 dei mammiferi: il codone della serina nel sito attivo è di tipo TCN, e l'istidina catalitica è presente nel loop del ponte disolfuro. Il residuo che determina la specificità di substrato è localizzato alla posizione -6 rispetto al sito attivo; questo residuo è acido aspartico in MASPa, come in tutte le MASP dei vertebrati, e treonina in MASPb. Questi risultati suggeriscono un'attività triptica per MASPa e una specificità per un differente substrato per MASPb.

Nei mammiferi, i recettori del Complemento di tipo 3 e 4 (CR3 e CR4) sono membri della famiglia delle β_2 -integrine. Queste molecole sono eterodimeri legati alla membrana, ognuno consistente di differenti subunità α associate non covalentemente con la stessa subunità β . Tra le varie funzioni, apparentemente non relazionate, documentate per CR3 e per CR4 vi è la capacità di entrambe le molecole, espresse prevalentemente nelle cellule mieloidi, di stimolare la fagocitosi attraverso il legame dei batteri con iC3b.

In *H. roretzi* sono state clonate, sequenziate e parzialmente caratterizzate quattro subunità di integrine, due α (α_{Hr1} e α_{Hr2}) e due β (β_{Hr1} e β_{Hr2}) (Miyazawa et al., 2001; Miyazawa e Nonaka, 2004). L'analisi delle sequenze amminoacidiche dedotte indica che tutte presentano i domini strutturali tipici delle subunità α e β delle integrine. Il coinvolgimento della subunità α_{Hr1} dell'integrina nell'attività fagocitica dipendente da C3 di emociti di *H. roretzi* è stato dimostrato in saggi di fagocitosi utilizzando anticorpi specifici contro una proteina ricombinante che riproduce la regione extracellulare di α_{Hr1} (Miyazawa et al., 2001).

Inoltre, nelle ascidie, è stata anche dimostrata la composizione eterodimerica di tali recettori, con entrambe le subunità, β_{Hr1} e β_{Hr2} , trovate in associazione con la subunità α_{Hr1} : questo pattern di accoppiamento delle

subunità è contrastante con la situazione ritrovata nei mammiferi e ricorda quella trovata nelle integrine di tipo α_v . Il tipo di appaiamento trovato nelle ascidie è classificato dagli autori tra le forme ancestrali dei recettori del Complemento, e sono state denominate “famiglia delle integrine α_{Hr1} ” o “famiglia delle integrine degli emociti”.

2. SCOPO DELLA RICERCA

In *C. intestinalis*, gli emociti hanno un ruolo importante nei meccanismi di difesa. Infatti queste cellule sono in grado di discriminare tra il self ed il non-self e rimuovere, quindi, tutto ciò che è estraneo all'organismo. Studi frammentari ed a carattere prevalentemente morfologico indicano che tale attività è sotto il controllo dei diversi tipi cellulari che compongono l'emolinfa (Fig. 8), ed è regolata da meccanismi e fattori che includono varie componenti dell'immunità innata, quali fagocitosi, incapsulazione, produzione di fenol ossidasi e rilascio di sostanze con attività pro-infiammatoria o litica. In questo contesto, il processo ematopoietico è di cruciale importanza per la sopravvivenza degli organismi durante le infezioni. Nelle ascidie, l'ematopoiesi avviene nell'emolinfa circolante e soprattutto a livello dei linfo-noduli abbondanti nella parete del faringe e intorno all'ansa dello stomaco (George, 1939; Millar, 1953; Ermak, 1977). Una modesta attività ematopoietica è presente anche nella parete del corpo all'estremità posteriore del corpo e nel punto in cui il faringe si salda alla parete del corpo.

E' stato recentemente dimostrato che C3, la molecola centrale della risposta immune mediata dal Sistema del Complemento, è prodotta dagli amebociti granulari e ialini, cellule che costituiscono la maggiore componente cellulare del sangue, tanto circolante che infiltrante la tunica (Marino et al., 2002; Pinto et al., 2003).

Ci siamo quindi chiesti, innanzitutto, se C3 potesse rappresentare un marcatore precoce degli amebociti, già presente durante il loro differenziamento nei noduli di proliferazione localizzati nel tessuto faringeo. A tale fine sono stati condotti esperimenti di Western blot ed immunohistochimica su faringe di *C. intestinalis* per mettere in evidenza la presenza di C3 e dei suoi prodotti di attivazione anche a seguito di trattamento con agenti infiammatori.

Al fine di studiare in maggior dettaglio, tanto a livello cellulare che molecolare, l'interazione dell'anafilatossina CiC3-1a con il suo recettore, CiC3aR, esperimenti di microscopia confocale sono stati condotti *in vitro* su

emociti del sangue circolante. Il peptide sintetico *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶, riprodotto la sequenza carbossi-terminale dell'anafilatossina *CiC3-1a*, responsabile della sua attività biologica, e gli anticorpi specifici contro *CiC3aR* sono stati utilizzati per studiare l'interazione ligando-recettore. Infine, è stato analizzato il coinvolgimento della molecola dell'arrestina nel processo di internalizzazione del recettore innescato dal riconoscimento del ligando specifico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione di campioni di faringe

Esemplari di *C. intestinalis* sono stati raccolti nel Golfo di Napoli e mantenuti in vasche contenenti acqua di mare circolante fino all'uso. Per indurre la reazione infiammatoria, parte degli animali è stata iniettata con 0.4 ml di LPS (Sigma) 5mg/ml in PBS nell'area di tunica al di sopra del faringe. I controlli sono stati iniettati con lo stesso volume di PBS. Gli animali sono stati sacrificati a tempi differenti tra 1 e 48h, prelevando la regione di faringe adiacente al sito d'iniezione.

3.2 Prelievo di emociti

L'emolinfa è stata prelevata dalla cavità periviscerale mediante l'uso di una siringa.

Per ottenere gli emociti, l'emolinfa è stata immediatamente diluita 1:2 in acqua di mare artificiale fredda, priva di Ca^{2+} e Mg^{2+} , contenente 1 mM EDTA (pH 7.4) (FSW-EDTA). Dopo centrifugazione a 500 g per 5 minuti, a 4°C, il pellet di emociti è stato risospeso in "marine solution" (MS): 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl_2 , 11 mM KCl, 45 mM Tris e 12 mM CaCl_2 (pH 7.4). Le cellule presenti nella sospensione sono state contate mediante l'uso della camera di Neubauer. Il volume della sospensione è stato modificato in maniera da ottenere la concentrazione di 1.5×10^6 cellule/ml.

3.3 Isolamento e purificazione di RNA totale da faringe

Per evitare problemi di degradazione, durante la preparazione e l'analisi dell'RNA è stato usato materiale di laboratorio in plastica e sterile. Ove possibile, le singole componenti di ogni soluzione sono state trattate con dietil-pirocarbonato (depc) o preparate con H_2O trattata con depc. Il trattamento con depc è stato effettuato aggiungendo depc (Sigma) allo 0.1% (v/v) e agitando vigorosamente. Dopo una notte d'incubazione a temperatura ambiente, le soluzioni sono state autoclavate.

L'RNA totale è stato estratto da faringe di *C. intestinalis*, mediante l'uso del kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Il tessuto è stato prelevato, pesato ed immediatamente omogeneizzato a freddo mediante tre cicli di 30 secondi con Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Ika-Labortechnik); come indicato nel protocollo, 175 µl di "SV RNA Lysis Buffer" (4 M GTC, 0.01 M Tris pH 7.5, 0.97% β-Mercaptoetanolo) erano aggiunti a 60-100 mg di tessuto. I passaggi successivi sono stati effettuati come da protocollo del kit fino al recupero dell'RNA in H₂O depc.

La concentrazione dei campioni di RNA totale è stata determinata mediante lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm in uno spettrofotometro SmartSpec[™] 3000 (Bio-Rad), utilizzando la relazione 1 O.D.= 40 µg/ml di RNA.

Allo scopo di valutare la qualità degli RNA preparati, aliquote da 0.2 µg delle preparazioni sono state separate elettroforeticamente su gel di agarosio 2% in tampone TAE 1x (tab.), applicando una differenza di potenziale di 30 Volts.

3.4 Sintesi del cDNA

La sintesi del primo filamento di cDNA è stata eseguita utilizzando il kit Superscript della Invitrogen. Sono stati impiegati come stampo l'RNA totale estratto dal faringe e come innesco gli oligonucleotidi formati da una coda di poli-dT per permettere l'appaiamento alla popolazione degli RNA poli-A⁺.

La miscela di reazione era così composta: 2 µg di RNA, 0.5 µg di innesco Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 1 µl di 10 mM dNTP mix ed H₂O trattata con depc per un volume finale di 10 µl. Dopo 5 minuti a 65°C la miscela è stata portata immediatamente a 0°C in ghiaccio fondente. Successivamente sono stati aggiunti 2 µl di tampone di sintesi 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 µl 100 mM DTT, 4 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl di Inibitore di RNAsi (40 U/µl) ed il tutto è stato portato alla temperatura di 42°C per 2 minuti. E' stato aggiunto, quindi, 1µl di Trascrittasi inversa (50 U/µl) e la reazione è stata condotta a 42°C per 50 minuti. Al termine, l'enzima è stato

inattivato a 70°C per 15 minuti e quindi il campione è stato raffreddato mediante incubazione in ghiaccio fondente.

L'RNA formante doppie eliche ibride con il DNA è stato idrolizzato aggiungendo 1 µl di RNAsi H da *E.Coli* (2 U/µl) e incubando la miscela a 37°C per 20 minuti.

I controlli corrispondenti sono stati effettuati seguendo lo stesso protocollo illustrato precedentemente, omettendo però l'aggiunta di Trascrittasi inversa.

3.5 Sintesi degli oligonucleotidi

Tutti gli oligonucleotidi sintetici impiegati sono stati preparati dalla PRIMM srl di Milano.

3.6 Amplificazione mediante PCR

Il cDNA a singolo filamento è stato amplificato per PCR utilizzando i seguenti oligonucleotidi specifici:

oligo senso 3822u

5' – AGCGAAAGATCCATTGGTAC – 3'

oligo antisenso 3975l

5' – GCAATTCCTGGTTCCACAGT – 3'

Tali oligonucleotidi sono stati disegnati sulla sequenza nucleotidica del trascritto di CiC3-1 depositata in banca dati (AJ320542); entrambi riproducevano sequenze localizzate a cavallo di due regioni esone-introne, come indicato nella figura 12.

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 50 µl con le seguenti componenti: 2 µl di cDNA, 5 µl di "PCR reaction buffer" 10x (Roche) contenente MgCl₂, 5 µl di dNTP mix 2 mM, 10 pmoli di ogni oligonucleotide ed H₂O ad un volume finale di 50 µl. La miscela è stata

5'.....**AGCGAAAGATCCAT**gtGAGTGAATGTTTATATTAAGCAT
GTGTGAGTGTTTGGGTTCAAACATAGGTCAAACAGCTGTTTGGG
AAGACACTGATCCAACATTTATATTCTTATCTGCATGTTACCCC
ATGTTCTGTTTTTag**TGGTAC**AAGCAGATTTGGATCTTGGACG
CAAATCTCTTTGTGGTTGATTAGTCAGAGGAATTCAAATGG
TGGCTTCAGGTCAACACAAGATACAGTGATTGGGCTGCAAGC
TTTGTCTACCTACTTATCATGGATAAGT**ACTGTG**gtATGTAAT
ACAATTACTAATATTAGGTTTAACTGTTTAAATAGTGATTTTAGA
ATTATACCATTCAATTTCTCAACCCATTAGTGACCACTGGGTTGTA
TCAATTCTTCTTAAGTGTATTGCCCAAGGGCACATTCGCCACAA
TGGTGCAATGGTAGCAGCGACATAAAATAGTGGTAATAAATAGT
GTTAATAGGTCCGGCGCCGTGGTATAGTGGTTATAGCGCGCCTGC
CTGTAACCCAGAGGTAATGGGTTCAAGGCTCGACGCTGCTACCA
ATGTTGGCGTATGTGTCCTTGGGCAAGACACTTAACGACAATTGC
TCCAACCCAGTGGTCACTAATAGGTGGTCTGAATTATCAGCCATA
CATACAAAAAATAATAATAAATTACCCACAAAGTAACAT
ACATGGTAACTTGTAAGCTGGCACGAGGTGCTAAACCCGTGTGA
TAAGACTGTCGTTTTTCGGCCATGCGAGGATAAAGTAAGTTACAC
ATTCATTCATTCACATTCATTTATTCAATAAATCCAAGTTCTGATA
TAAACCAAACACTTTATCTTTAAag**GAACCAGGAATTGC**....3'

Figura 12. Sequenza genomica, da Scaffold 250|1|125404 di JGI v. 2.0, della regione di *CiC3-1* dove sono stati disegnati gli oligonucleotidi usati negli esperimenti di PCR; nella sequenza in rosso vengono riportate le sequenze introniche (i siti accettori e donatori di splicing, sono messi in evidenza dalle lettere minuscole sottolineate) ed in grassetto in nero quelle esoniche; inoltre sono evidenziati in verde l'oligonucleotide 3822u ed in giallo l'oligonucleotide 3975l.

incubata per 3 minuti alla temperatura di denaturazione di 94°C e sono stati, quindi, aggiunti 0.5 µl di Taq DNA polimerasi.

Sono stati condotti 35 cicli di amplificazione in una macchina per PCR, modello “PTC-100 Peltier Thermal Cycler” (MJ Research), secondo il seguente schema: 94°C per 15 secondi, 56.7°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto. Per l’aggiunta di nucleotidi adenilici all’estremità 3' dei prodotti di amplificazione, la miscela del probe è stata ulteriormente sottoposta ad un ciclo di 10 minuti a 72°C.

3.7 Elettroforesi su gel di agarosio

Al fine di valutare la lunghezza dei frammenti amplificati, il DNA ottenuto mediante la reazione PCR è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio all’1% in TBE 0.5x (tab.), in presenza di bromuro di etidio 0.5 µg/ml. Sono stati caricati 5 µl di reazione con l’aggiunta di 1 µl di colorante per DNA 6x. La lunghezza dei frammenti ottenuti per PCR è stata ricavata dal confronto della loro distanza di migrazione con quella dei frammenti di lunghezza nota dei marcatori di peso molecolare. Alla fine della corsa elettroforetica, le bande nel gel sono state visualizzate su uno schermo a raggi UV e sono state fotografate. E’ stata ottenuta una singola banda della lunghezza attesa di circa 170 bp. Questo prodotto è stato clonato nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen), seguendo le indicazioni suggerite dal produttore, ed è stato controllato mediante sequenziamento, che ha confermato il peso atteso di 174 bp.

3.8 Real-time PCR

La reazione di Real Time PCR è stata condotta attraverso il Chromo 4 sequence Detection System e con l’uso di FastStart SYBR Green Master (Roche).

Gli oligonucleotidi utilizzati per la rivelazione dell’espressione del gene *CiC3-1* sono gli stessi già descritti in precedenza, nel paragrafo 3.6. Sono stati sintetizzati, inoltre, oligonucleotidi specifici per il trascritto

dell'actina di *C. intestinalis*, utilizzato come gene di riferimento nella reazione di amplificazione:

oligo senso (ACTF)

5' –ATGTGCAAGGCCGGTTT– 3'

Oligo antisenso (ACTR)

5' – GACACGGAGTTCGTTGT – 3'

Le reazioni sono state eseguite in triplicato in piastre da 96 pozzetti. La miscela di reazione conteneva 2 µl di cDNA (diluizione 1:10 del materiale iniziale), 12,5 µl di FastStart SYBR Green Master (Roche) e 10.5 µl della coppia specifica di oligonucleotidi (7.0 pmol ognuno). La miscela preconstituita è stata prima denaturata a 95°C per 10 min; ad essa sono seguiti 40 cicli di amplificazione (15 sec a 95°C e 1 min a 60°C).

La specificità di ogni reazione di amplificazione è stata verificata attraverso l'analisi della curva di “melting”. L'efficienza delle coppie di oligonucleotidi è stata calcolata sia per il gene di riferimento che per il gene d'interesse ed è stata valutata per entrambe le coppie pari a 2; in ogni esperimento i dati sono stati normalizzati internamente contro il trascritto dell'actina, i cui livelli di espressione rimangono costanti nel tempo indipendentemente dai trattamenti subiti dal tessuto in esame.

I risultati sono riportati come percentuale rispetto al valore massimo ottenuto. La percentuale indica la quantità di espressione del trascritto d'interesse di ogni campione rispetto alla quantità di espressione ottenuta al livello massimo, che corrisponde all'espressione di C3 ottenuta dopo 24 ore dalla stimolazione con LPS. La formula applicata per calcolare i valori di espressione durante il trattamento è $2^{-\Delta\Delta C_t}$, dove 2 è l'efficienza di amplificazione per ciclo di PCR, e $\Delta\Delta C_t$ dato dalla differenza ΔC_t di un determinato tempo meno il ΔC_t del tempo di riferimento (24 h): ΔC_t è la differenza tra il ciclo ottenuto imponendo un valore soglia di fluorescenza per il gene d'interesse meno il ciclo ottenuto per il gene di riferimento.

3.9 Sintesi dei peptidi e produzione di anticorpi

Il peptide di 22 amminoacidi *CiC3-1*⁹³⁶⁻⁹⁵⁷ (IEDEGELKDIYETFPIDLKNSR) ed il peptide di 18 amminoacidi *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶ (IALARLNSGTRRQRVQGR) riproducono segmenti della sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3-1*. Entrambi sono localizzati sulla catena α della molecola: il primo nella porzione che dopo l'attivazione farà parte del frammento peptidico *CiC3-1b* e il secondo nella porzione che dopo l'attivazione di *CiC3-1* andrà a costituire *CiC3-1a*. La sintesi dei peptidi è stata effettuata dalla Primm (Primm, Milano, Italia) (fig. 13).

Analogamente, anche il peptide di 17 amminoacidi *CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹ (HELPTPTLQANAEPPT), che riproduce il segmento della sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3aR*, localizzato nel primo loop extracellulare (EL1), è stato sintetizzato dalla Primm (Primm, Milano, Italia).

I peptidi sono stati successivamente coniugati all'ovalbumina e sono stati usati per l'immunizzazione di conigli nella produzione degli anticorpi specifici anti-*CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹ (anti-EL) (Primm, Milano, Italia), anti-*CiC3-1*⁹³⁶⁻⁹⁵⁷ (anti-C3) (Primm, Milano, Italia) e anti-*CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶ (anti-C3a) (Primm, Milano, Italia).

I tre anticorpi specifici anti-peptide sono stati purificati mediante cromatografia di affinità usando una matrice di Sepharosio 4B coniugata con i rispettivi peptidi sintetici usati come antigene (Amersham Biosciences).

Negli esperimenti di immunistochemica e di Western blot condotti per identificare *CiArr* è stato utilizzato un anticorpo commerciale preparato in coniglio contro un peptide sintetico corrispondente alla sequenza della β -arrestina2 umana (NP_004304), localizzato al C-terminale tra la posizione 384 e la posizione 397 (Sigma).

MVWFSFSLLVTLAVATAFDHTVVPKALRVDDEKIIVNLHGYNRATITGYLQDLPLQTFFSRTGQ
 RVLTPAQCNPIEMTFRVTRDPQGADGIASFGLTQKVRLLTIQVTNSNSDFTENIDVLVSKQSGYIYVI
 TDRPIYKPNDTVKISAFLLNQNMGHQTVDAEITIQTPDGIGLVRESFVLDLQSNRLNHEFAINENPIY
 GTWSIEVKFSSDGYTTSSTTSFKIDKYVLPFTDVALQLAQSHILTS DPRITGTIYANYSYGEPVNGNV
 YLSATLQKLPGGPAIKFYQIPPRITRTALFRNGVKPFSIPLVELIGILQPGETLAQMSDQGAVVSIFA
 TVNGEADGVMESAVISNIPILRTPYRIDKSRALKYHTPGISYLLQVDVQDVVTHQNMANIPVRIEITG
 PNGQRVIRNSTANQNGQVNYPHNFDTTGTQFIKVTTAKPNLGAANQATVNITVEAYNSPGQRFLTVP
 NPHTVDVGREVHITLAFNQPTPAEIRFYVVS RGSVVLVGRIVPPANSHNIVQIIQVTQAMVPSMRVIA
 YFLHGAEVVSNSAFVNVNRCETELVTTNRNTVKPGAPITYTIEGAQNADVLLYGVDRAAYFLYNGS
 RLTRNSMFSDMAAYDQGCVSNGGSDGPNVFFGAGLTLTTPTHKPGALDLDCTAAAQSRKKRQIQVEQ
 ELSIEAKLHKCGEDGKKKSFSECDTCEMQRDRVIYTFDDAIPGCSERFYAECIAQARLNEGTREQRVW
 SIGVNGQVERSVASAVRKDFAEALYLDPSTLEQAGRQITAKARDSITTYEIDAMASADTPDGFCCI
 APTTNVKVFKNVFVQVYTPYSLKKREQALIKLSVFNYGDTLVTVDIMMRAHPVLCTHFRTDGSYDLVR
 TISVGPNSAGSASFVLPRIIPAGDIPKATVEVYITDNRNRTYDSVKKEILIEDEGELKDIYETFPID
 LKNSRFVQQTQINFTFPEQFVLGTRKCLYAYMDFMGAIEVDPVTQEANNVNSLIRQPYGCGEQTMIY
 AGPTVFALQYLVTGTITPNSPEYNSAVNKIEAAFQREMTYRTTHTNPRVSVFTHYLPSTWLNAFVD
 KVFYHGRRYDMDMNVGPICNLSNFLIGEQMAGEHFRERRPPLHREM HGAVKGPMTLTAHV AISMGEIN
 SICLPELNQRVIASRVSAMNYLEQHKDHATFQRPYPLSLLAYAAALHNPRSQLAIEMNARLMAMKQTS
 GNGAYVFWRAKTLAEISGTNAHAYWYRTRPLALDIETTSYALLAQVAMSKAKDPLVQADLDLGRKISL
 WLISQRNSNGGFRSTQDTVIGLQALSTILSWISTVEPGIANPRIDFEMEGAAGSAWAPPNAYTNHIDN
 TNQRLKKQMAVPKNVIEGTIVDVTSRGQGQILSYRCTYRTVVDEESCHYNLSTNVRVMNPGVQGKRI
 KITITVSKPLGPQSEATILYVGFMSGYKAVDQTTLEDLSIDENVAGVVDREYVTNHNVLFLYLNRI TSQS
 MNISFEMRQMLVRKPPQPKINIYEYEPVVHCGQFYSLPDTTTPDLQTSNCETGANNDNLRCRAEGG
 CPTCRTRDDTLFKLHVLEVEVGARCGTCTQNRNYNHRDEGCSAKYVYKVRVIGVREDSVFNLDAVIE
 DVYRSGSDNVQNGTVRFTFVIRNDCHASCRDTEDELRLLRN NIPAKDTRLFKEGRVLLITGSLIERRQN
 RNRLQLQTVYQVDEQTTAERLVTDVACARAKSVLVR CAGNRPPRQSKCVKSRELNAICENMKRLKESLN
 DIGCD

Figura 13. Sequenza amminoacidica dedotta della pro-proteina di *CiC3-1*. In verde è il peptide segnale; in nero è la sequenza della catena β , mentre in rosso la sequenza della catena α ; inoltre, evidenziata in giallo è l'arginina al livello della quale avviene il taglio proteolitico che genera le due catene, α e β della proteina matura; infine, evidenziati in blu e grigio sono gli epitopi contro cui sono rispettivamente diretti gli anticorpi anti-C3a e anti-C3..

3.10 Analisi mediante Western blot

Ai faringe, prelevati come descritto sopra, è stata aggiunto in “sample buffer” (60 mM Tris pH 6.8, con 2% SDS, 10% 2-mercaptoetanolo, 10% glicerolo, 0.01% blu di bromofenolo,) contenente inibitori di proteasi, Mini Complete (Roche Applied Science), nelle quantità suggerite dal produttore.

I campioni sono stati omogeneizzati a freddo mediante tre cicli di 30 secondi con Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel Ika-Labortechnik); successivamente sono stati bolliti per 10 minuti, ed infine centrifugati a temperatura ambiente per 30 minuti a 13'400 rpm in una centrifuga Mini Spin (Eppendorf). Il sopranatante è stato recuperato e conservato in aliquote a -20°C.

La reattività degli estratti proteici da faringe di *Ciona* con gli anticorpi anti-C3 ed anti-C3a è stata saggiata mediante Western blotting, descritto di seguito in maggior dettaglio.

Le proteine, 80 µg di proteina/pozzetto, sono state separate su gel di poliacrilammide 7.5% e 15% contenente SDS (SDS-PAGE) (vedi tab). La corsa elettroforetica è stata effettuata con “Running buffer” 1x (tab.) a 100 Volts in un apparecchio Mini Protean 2 Cell (Bio-Rad Laboratories). Sono stati usati come standard di riferimento 10 µl di “Precision Plus Protein Standard All Blue” (Bio-Rad Laboratories). Le proteine sono state successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) mediante l’uso dell’apparecchio Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) in “Blotting buffer” 1x (tab.), applicando 100 Volts, per 1 ora. La presenza della banda corrispondente a *CiC3-1* e *CiC3-1a* negli estratti proteici separati per elettroforesi è stata rilevata mediante l’uso degli anticorpi, purificati per affinità, anti-C3 o anti-C3a, alla concentrazione di 5 µg/ml.

Legami non-specifici degli anticorpi alla membrana sono stati prevenuti mediante incubazione del filtro in “blocking buffer” (PBS 1x, contenente 5% latte e 0.05% Tween 20). Il legame tra l’antigene e gli anticorpi specifici è stato rilevato mediante l’uso di un anticorpo secondario coniugato

con perossidasi, IgG-HRP (Amersham Biosciences), secondo le indicazioni del produttore.

Le incubazioni con gli anticorpi specifici e con secondario sono state effettuate rispettivamente per 2 e 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane, dopo ogni incubazione, sono state lavate tre volte per 10 minuti con PBS 1x (tab.) contenente Tween 20 (0.05%). Le proteine sono state rivelate mediante l'uso del kit ECL plus (Amersham Biosciences).

La determinazione della concentrazione delle proteine è stata effettuata mediante l'uso del kit Quanti-Pro BCA Assay (Sigma) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

La stessa metodica è stata seguita per rivelare la presenza della *CiArr* in emociti di *Ciona*; gli emociti, raccolti come descritto sopra, sono stati risospesi, anch'essi, in "sample buffer" contenente inibitori di proteasi. Le cellule del sangue, però, a differenza del tessuto faringeo, sono stati omogeneizzati a mano in un omogenizzatore Potter-Elvehjem di Teflon con un pestello; successivamente è stata seguita la stessa procedura utilizzata nel caso dei faringe: gli emociti sono stati bolliti per 10 minuti, ed infine centrifugati a temperatura ambiente per 30 minuti a 13'400 rpm in una centrifuga Mini Spin (Eppendorf). Il sopranatante è stato recuperato e conservato in aliquote a -20°C. In questo caso è stato utilizzato l'anticorpo eterologo anti- β -arrestina (Sigma) alla concentrazione di 20 μ g/ml.

3.11 Immunoistochimica su sezione

I faringe, prelevati come descritto precedentemente, sono stati fissati in Bouin (acido picrico, soluzione satura: formaldeide 37%: acido acetico glaciale, nel rapporto 15:5:1) per 24 h. Per rimuovere completamente il fissativo, i campioni sono stati lavati in etanolo al 75% finché il colore giallo, tipico del fissativo, scompariva. Dopo la disidratazione, effettuata attraverso passaggi in etanolo a concentrazione crescente, fino ad etanolo assoluto, i campioni sono stati inclusi in paraffina e sezioni di 7 μ m sono state preparate con un microtomo rotativo RM2255 (Leica). Le fette sono state montate su vetrini Superfrost plus (Thermo Scientific).

I vetrini sono stati, quindi, sparaffinati in xilolo (3 passaggi da 3 min) e lavati 2 volte per 10 min in etanolo 100%; successivamente sono stati reidratati attraverso una serie di passaggi in etanolo a concentrazione decrescente (95%, 75% e 50%, 3 minuti ciascuno) e infine in acqua distillata per 5 min. Sono stati, poi, equilibrati in tampone TBS con 3 passaggi da 5 min. Per inibire le perossidasi endogene, le sezioni sono state trattate per 20 min con perossido d'idrogeno allo 0.3% in TBS e poi lavate con tampone TBS; dopo un passaggio in TBS contenente 10% "normal goat serum" per 10 min, sono stati lavati tre volte per 5 minuti in TBS. Quindi, le sezioni sono state incubate con anticorpo primario, anti-C3 per la rivelazione di *CiC3-1* e anti-EL per la rivelazione del recettore *CiC3aR*, entrambi diluiti in TBS con BSA all'1%, o/n a 4°C; gli anticorpi sono stati utilizzati alla concentrazione di 15 µg/ml. Vetrini di controllo sono stati trattati in parallelo con le IgG preimmuni corrispondenti, alle stesse concentrazioni degli anticorpi primari.

Al termine dell'incubazione con gli anticorpi primari, i vetrini sono stati lavati per 3 volte, per 8 min, con il tampone e incubati per 1 h con anticorpo secondario biotinilato diluito in TBS 1:250 a temperatura ambiente, come indicato nelle istruzioni del kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) usato per la rivelazione degli antigeni. Dopo altri 3 lavaggi di 8 min ciascuno, le sezioni sono state incubate con la soluzione ABC (10ml di TBS, 2 gocce del reagente A e 2 gocce del reagente B). Dopo altri tre lavaggi con TBS, ciascuno di 8 min, le sezioni sono state trattate con una soluzione di H₂O in cui era stata sciolta una Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine tablet (Sigma-Aldrich), secondo le indicazioni del produttore. Ottenuta la colorazione sul tessuto, la reazione è stata bloccata con acqua distillata. I vetrini sono stati montati con montante glicerol Jelly e osservati al microscopio ottico Axiophot Zeiss; le immagini ottenute sono state acquisite col programma Axiovision.

3.12 Immunocitochimica su emociti circolanti

Gli emociti, raccolti e risospesi come descritto nel paragrafo 3.2, sono stati trattati con 100 ng/ml cicloesimide per 3h. A 30 min dalla fine dell'incubazione, una goccia di 100 μ l di sospensione di emociti, contenenti $\sim 1.5 \times 10^5$ cellule, è stata depositata nell'area circoscritta da isolatori di silicone adesivo (Sigma) applicati ai vetrini porta-oggetto Superfrost Plus (Thermo Scientific) per consentire l'adesione delle cellule al vetrino; è stato aggiunto, quindi, il peptide sintetico *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶ alla concentrazione finale 20 μ M. L'incubazione con l'agonista è durata per intervalli compresi tra 0 e 30 min. Al termine dell'intervallo di stimolazione, gli emociti sono stati fissati per 30 minuti a temperatura ambiente in 4% paraformaldeide sciolta in 0.1 M tampone MOPS (pH 7.5), 0.5 M NaCl. Le cellule fissate sono quindi state lavate per 10 min con PBS 1x (tab.) contenente 0.1% NP40. Questo lavaggio è stato seguito da altri tre lavaggi, di 10 min ciascuno, in PBS 1x contenente 0.1% Tween 20 (PBT), quindi, incubati per 10 minuti in PBT contenente 10% "normal goat serum". L'incubazione con l'anticorpo purificato per affinità anti-EL è stata effettuata in una camera umida alla concentrazione di 20 μ g/ml in tampone PBT contenente 1% BSA, o/n a 4°C. Il giorno successivo, i vetrini sono stati lavati 3 volte con PBT per 10 min e trattati successivamente per un ora con anticorpo secondario, prodotto in capra, coniugato con FITC (Sigma) diluito 1:250 in PBT. Dopo ripetuti lavaggi in PBT, sono stati tolti gli isolatori di silicone dal vetrino e i vetrini sono stati lasciati o/n a 4°C in PBT. Il terzo giorno, dopo gli ultimi 3 lavaggi per 10 min in PBT, i vetrini sono stati chiusi con il Mounting ProLong Gold (Invitrogen) e sigillati dopo 30 min.

In parallelo, sono stati condotti esperimenti di controllo o eliminando la stimolazione delle cellule o utilizzando un peptide non relazionato riprodotto parte del terzo loop intracellulare di *CiC3aR*, *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹² (LRRSLRKKARDRGTG), alle stesse concentrazioni dell'agonista.

Gli esperimenti di immunofluorescenza con l'anticorpo anti- β -arrestina (Sigma) sono stati condotti con lo stesso procedimento descritto sopra, con concentrazione dell'anticorpo 20 μ g/ml.

4. RISULTATI

4.1 Ricerca di *CiC3-1* nel faringe mediante PCR

Per verificare la presenza di trascritti di *CiC3-1* nel tessuto faringeo, è stata condotta un'analisi preliminare mediante PCR su cDNA sintetizzato da RNA totale, estratto da un pool di faringe da diversi animali.

A tale scopo, sono stati disegnati, come indicato nella sezione “Materiali e Metodi”, primer specifici che hanno dato come risultato una singola banda di amplificato del peso atteso, di circa 170 bp (fig. 14A). Nella PCR di controllo, condotta su cDNA sintetizzato in assenza di trascrittasi inversa, non si evidenziavano bande di amplificato (fig. 14B).

Il prodotto PCR è stato clonato nel vettore pCRII-TOPO e sequenziato. La sequenza dell'amplificato confermava che il frammento clonato di 174 bp corrispondeva a *CiC3-1* (dati non mostrati).

4.2 Trattamento con LPS e valutazione dell'espressione di *CiC3-1* mediante real-time PCR

Per valutare l'espressione di *CiC3-1* in seguito a stimolazione con LPS, campioni di RNA totale, estratti da faringe di individui adulti di *C. intestinalis* trattati con l'agente infiammatorio, sono stati analizzati mediante la tecnica della real-time PCR.

Gli animali, iniettati con il lipopolisaccaride, sono stati sacrificati a tempi diversi, tra 1 e 48 ore; come controllo d'espressione costitutiva del gene, è stato prelevato il faringe da un animale non trattato.

I campioni sono stati prelevati dalla stessa zona d'iniezione ai tempi stabiliti, come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. Da ciascun campione è stato estratto l'RNA totale e da 2 µg di ogni preparazione, è stato sintetizzato il cDNA. La valutazione dell'espressione del gene di interesse è stata condotta mediante PCR quantitativa, utilizzando primer specifici disegnati a cavallo di due esoni consecutivi della sequenza di

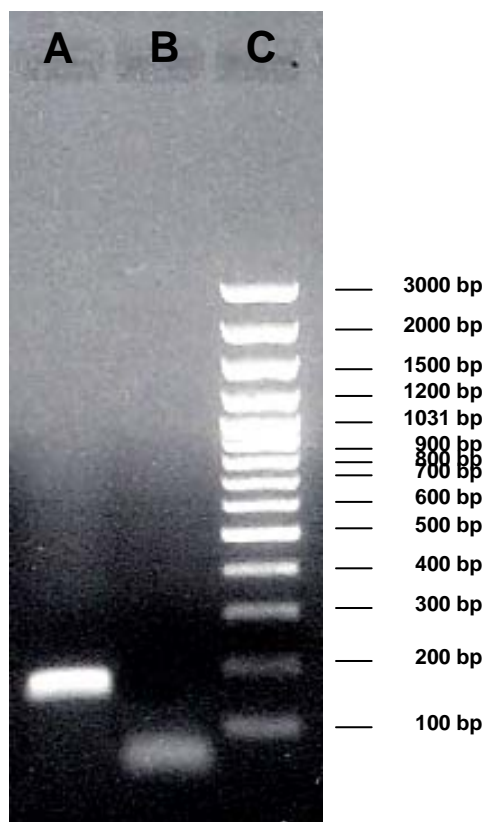


Figura 14. Analisi condotta mediante PCR su cDNA di tessuto faringeo. L'amplificazione è stata effettuata con gli oligo senso 150u e antisenso 3041, che danno un amplificato di 174 bp; **A**, amplificato di cDNA da faringe di *C. intestinalis*; **B**, controllo senza RT; **C**, marcatori di peso molecolare.

CiC3-1, allo scopo di evitare la trascrizione di eventuali sequenze gnomiche, contaminanti le preparazioni di RNA totale. La sequenza dei primer e l'organizzazione genomica della regione interessata, sono riportate nella sezione "Materiali e Metodi".

Nel faringe, il trascritto di *CiC3-1* è presente costitutivamente, essendo rilevabile anche nel campione di controllo; il suo livello di espressione rimane approssimativamente costante tra 1 e 6 ore dal trattamento con LPS; a 24 ore dall'iniezione si osserva un picco nell'espressione del gene, che cala successivamente fino ai valori costitutivi a 30 e 48 ore dal trattamento. L'istogramma riportato nella figura 15 mostra i valori ottenuti, normalizzati utilizzando come riferimento interno il gene della β -actina, la cui espressione rimaneva costante in seguito al trattamento (dati non mostrati).

4.3 Rivelazione mediante Western blot di *CiC3-1* e dei suoi prodotti di attivazione

Per verificare la presenza di *CiC3-1* nel faringe di *C. intestinalis*, nonché dei suoi prodotti di attivazione, cioè *CiC3-1b* e l'anafilatossina *CiC3-1a*, sono stati testati due specifici anticorpi policlonali contro *CiC3-1* su estratti proteici dell'organo in esame mediante Western blot. Gli anticorpi utilizzati nell'analisi, anti-C3 ed anti-C3a, erano stati prodotti utilizzando due peptidi sintetici, riproducenti due regioni della catena α della sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3-1*; più precisamente, la regione riconosciuta da anti-C3 si trovava tra la posizione 936 e 957 e quella riconosciuta da anti-C3a tra la posizione 732 e 750, localizzata al terminale carbossilico del frammento proteolitico *CiC3-1a*, anafilatossina prodotta dall'attivazione di *CiC3-1* (Fig. 13 nella sezione "Materiali e Metodi"). Mediante elettroforesi, condotta in condizioni riducenti, su gel di poliacrilammide al 7,5%, l'anticorpo anti-C3 riconosceva due bande. Quella di mobilità elettroforetica minore, corrispondente ad un peso molecolare apparente di 140 kDa (Fig. 16A), era riferibile alla catena α di *CiC3-1*; la differenza tra il peso molecolare dedotto, 124 kDa, e quello osservato in SDS-PAGE, 140 kDa,

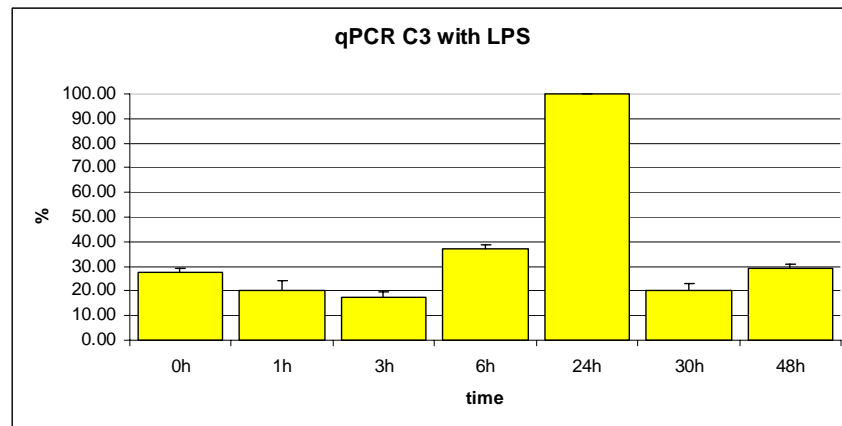


Figura 15. Analisi dell'espressione del trascritto *CiC3-1* nel faringe, in seguito a trattamento con LPS, mediante esperimenti di Real Time PCR. L'istogramma mostra la variazione della quantità di trascritto espresso come valore percentuale in funzione del tempo (da 0 a 48 ore). I dati sono stati normalizzati utilizzando come gene di riferimento, il gene della β -actina, la cui espressione rimane costante nel corso dell'esperimento.

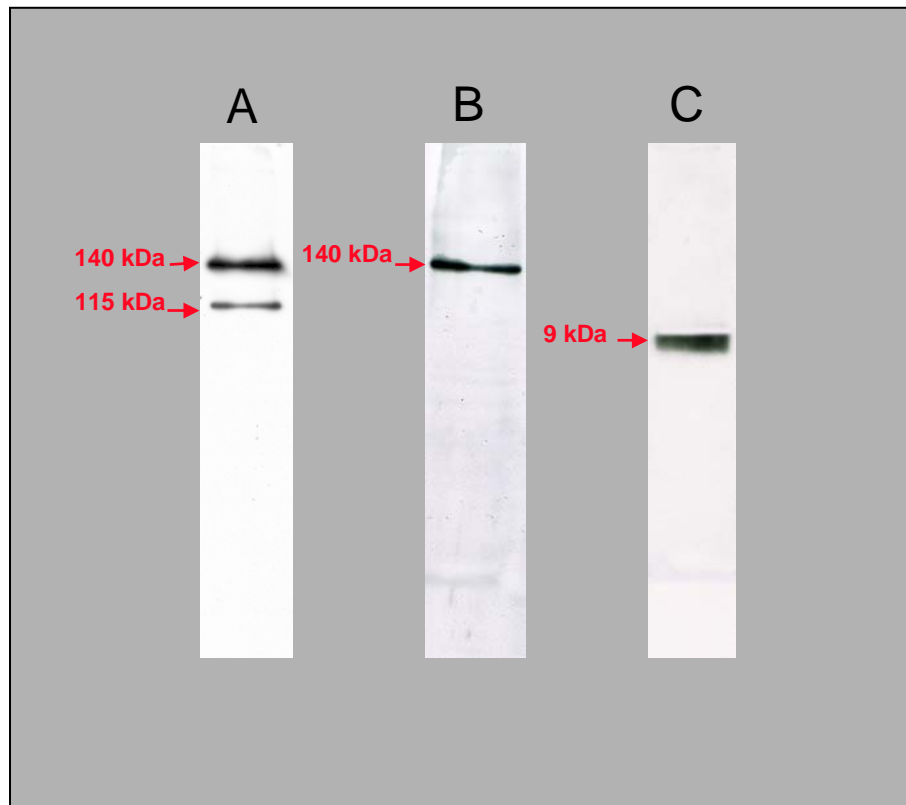


Figura 16. Analisi mediante Western blot di estratti proteici di faringe di *C. intestinalis*. In questa analisi sono stati usati due anticorpi policlonali diretti contro due epitopi differenti: anti-C3 ed anti-C3a. Le proteine estratte dal faringe di *Ciona* (80 µg/pozzetto) sono state sottoposte ad elettroforesi su un gel di poliacrilammide-SDS al 7.5% in condizioni riducenti, trasferite su membrane di nitrocellulosa e trattate con gli anticorpi purificati per affinità anti-C3, in **A**, e anti-C3a, in **B**. La rivelazione degli anticorpi legati è stata ottenuta con un anticorpo secondario coniugato alla HRP e con ECL. In **C** è mostrata l'analisi ripetuta con gli stessi estratti proteici, nella stessa quantità, separati su di un gel di poliacrilammide-SDS al 15% in condizioni riducenti: l'anticorpo usato per la rivelazione è l'anti-C3a.

poteva essere attribuita a glicosilazione o ad altre eventuali modifiche post-traduzionali. La seconda banda di peso molecolare apparente 115 kDa (Fig. 16A), corrispondeva alla catena α di *CiC3-1b*, prodotto proteolitico dell'attivazione di *CiC3-1*. Tale risultato indicava la presenza costitutiva nel tessuto faringeo di un processo limitato di attivazione di C3.

L'anticorpo anti-C3a, nelle condizioni elettroforetiche precedentemente descritte, identificava una sola banda di 140 kDa (Fig. 16B), analoga a quella di peso molecolare maggiore rivelata dall'anticorpo anti-C3, e corrispondente alla catena α di *CiC3-1* non attivato. Lo stesso anticorpo, saggiato su campioni di faringe separati su gel di poliacrilammide al 15%, era in grado di riconoscere una banda di circa 9 kDa (Fig. 16C), corrispondente all'anafilatossina *CiC3-1a*, prodotta nel processo di attivazione di *CiC3-1*.

4.4 Analisi mediante Western blot dell'attivazione di *CiC3-1* indotta da LPS

Per verificare l'effetto dell'LPS sul prodotto proteico del gene *CiC3-1* e sulla sua attivazione, le proteine, estratte da faringe di animali trattati con l'agente infiammatorio, sono state analizzate mediante Western blot.

Individui adulti sono stati trattati con iniezioni di LPS nel tessuto faringeo e, dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, la porzione di tessuto intorno al sito d'iniezione, è stato prelevato da ciascun animale. Animali di controllo sono stati trattati in parallelo con iniezioni nel faringe di PBS, con conseguente prelievo dopo 24 ore. Dal faringe degli animali di controllo e di quelli trattati sono state estratte le proteine; dopo avere determinato la concentrazione proteica di ciascun campione, identiche quantità sono state caricate su gel di poliacrilammide al 7,5% ed analizzate per Western blot usando l'anticorpo specifico anti-C3. Il risultato ottenuto, riportato in figura 17A, mostra chiaramente che gli estratti proteici di faringe di animali di controllo presentano due bande di 140 e 115 kDa, attribuibili alla catena α di *CiC3-1* nella forma rispettivamente non attivata ed attivata; il rapporto

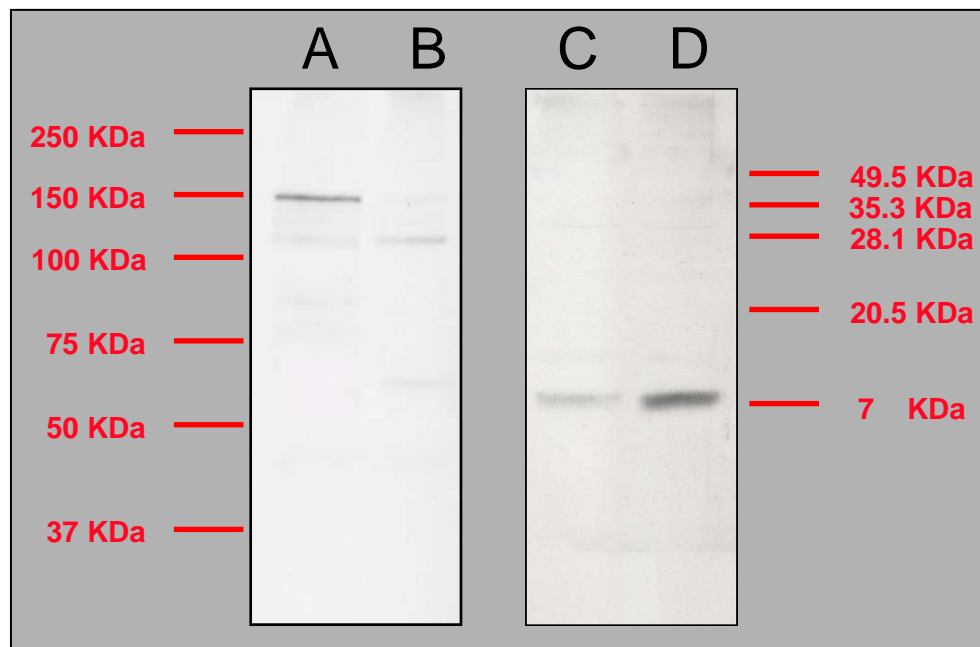


Figura 17. Analisi mediante Western blot di estratti proteici di faringe trattati (**B e D**) e non (**A e C**) con LPS di *C. intestinalis*; **A e B** sono stati rivelati con l'anticorpo anti-C3, su un gel di poliaccrilammide-SDS al 7.5% in condizioni riducenti. La rivelazione degli anticorpi legati è stata ottenuta con un anticorpo secondario coniugato alla HRP e con ECL. Invece **C e D** si riferiscono ai risultati di un gel di poliaccrilammide-SDS al 15% : in questo caso è stato utilizzato l'anticorpo anti-C3a per la rivelazione.

quantitativo delle due bande indica una limitata attività proteolitica costitutiva a carico di *CiC3-1*. Nei campioni degli animali trattati con LPS, sussistono entrambe le bande, ma con rapporto quantitativo invertito (Fig. 17B), indice dell'induzione da parte dell'agente infiammatorio di una rilevante attivazione di *CiC3-1*.

La corsa elettroforetica degli estratti proteici è stata ripetuta nelle stesse condizioni ma usando un gel di poliacrilammide al 15% e l'anticorpo anti-C3a specifico per l'anafilatossina *CiC3-1a*, secondo frammento proteolitico prodotto dall'attivazione di *CiC3-1*. I risultati di questo esperimento (Fig. 17C e D) mostrano una banda di circa 9 kDa molto più intensa nei campioni trattati con LPS (Fig. 17D) rispetto a quelli di controllo. I dati ottenuti dall'insieme di queste analisi indicavano chiaramente che il trattamento con LPS incrementava notevolmente il processo di attivazione di *CiC3-1*.

4.5 Rivelazione di *CiC3-1* e *CiC3aR* mediante immunisto chimica

Per verificare quali tipi cellulari del faringe esprimessero *CiC3-1*, sono state condotte reazioni di immunisto chimica su sezioni dell'organo, utilizzando l'anticorpo anti-C3. Contemporaneamente, sezioni di controllo sono state trattate con IgG purificate da siero preimmune (Fig. 18A e B). La rivelazione della reazione, effettuata con DAB, come descritto in dettaglio nella sezione "Materiali e Metodi", mostrava un'intensa marcatura a carico del sangue all'interno delle barre trasversali, delle cellule ciliate al margine degli stigmata, riconoscibili dalle caratteristiche strutture ciliate rivolte verso le aperture stigmatiche, ed anche a carico delle cellule epiteliali delle barre longitudinali. La marcatura delle tre zone risulta ben visibile negli ingrandimenti di queste tre regioni riportate in figura 19A e B e 20A. Inoltre la specificità della reazione è confermata dall'assenza di segnale nei controlli, come illustrato in figura 18B e 20B.

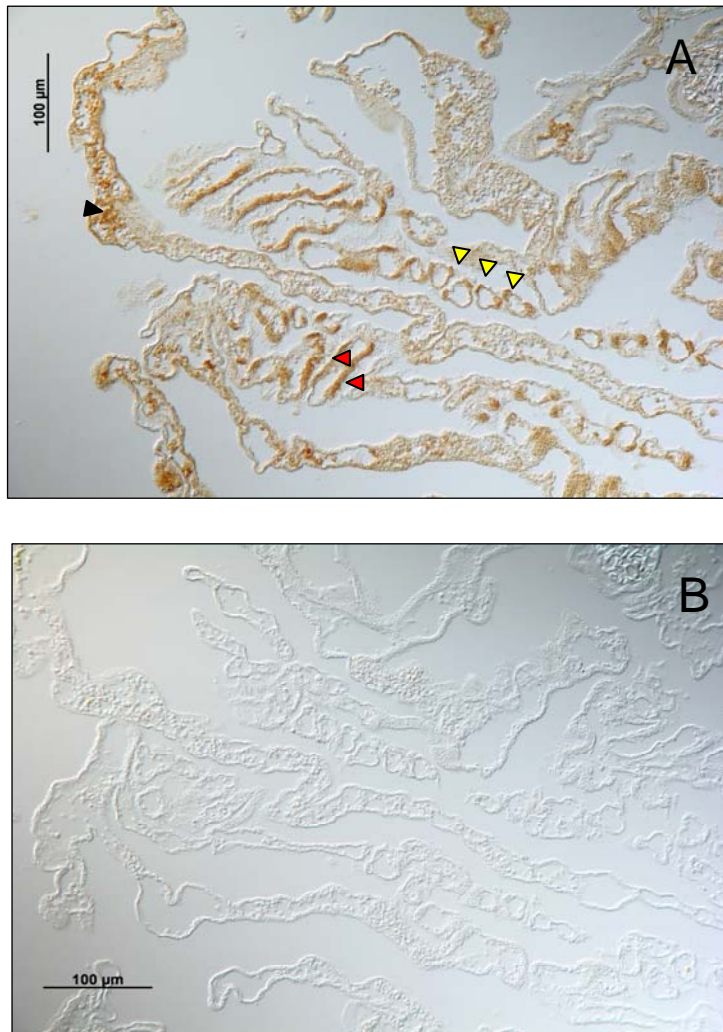


Figura 18. Immagini relative all'esperimento di immunistochemica su sezioni di faringe: la rivelazione è stata effettuata con DAB. In **A**, la sezione trattata con anticorpo anti-C3: la freccia nera indica la marcatura al livello delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali; la freccia gialla indica la marcatura delle cellule ciliate dello stigma; infine, la freccia rossa indica la marcatura al livello delle cellule epiteliali delle barre longitudinali. In **B**, la sezione di controllo trattata con Ig purificate dal siero preimmune corrispondente.

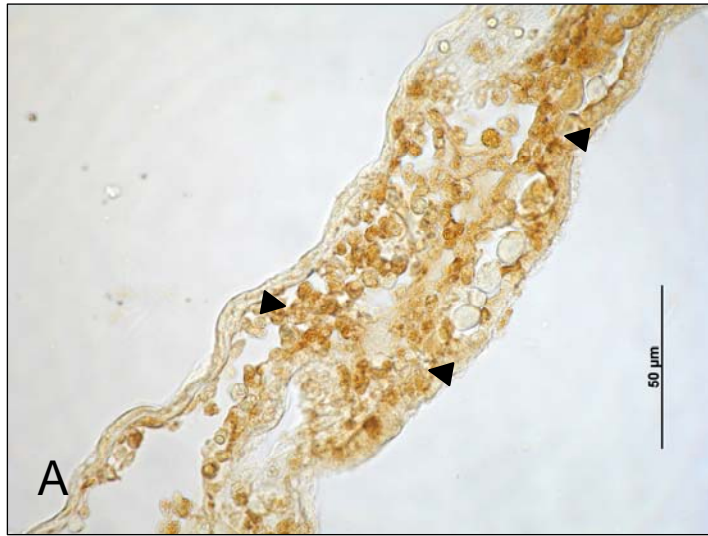


Figura 19. Immagini a maggiore ingrandimento dell'esperimento di immunohistochimica su sezioni di faringe mostrato in fig. 18. **A**, La freccia nera indica la marcatura a livello delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali; **B**, la freccia gialla indica la marcatura delle cellule ciliate dello stigma.

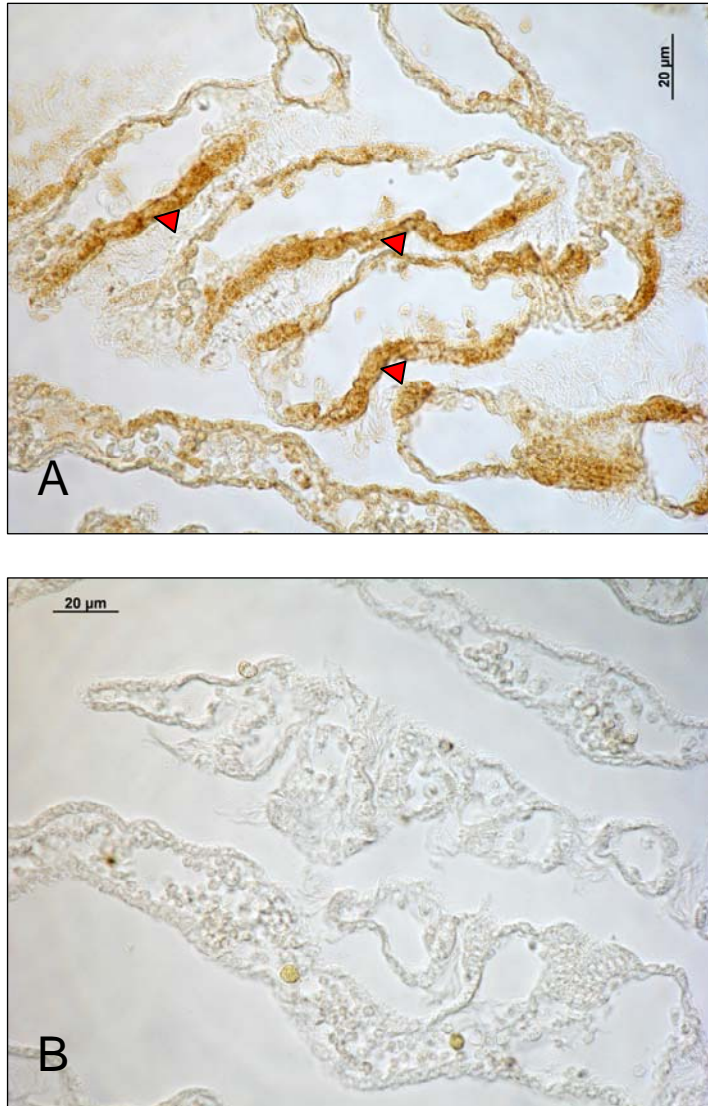


Figura 20. Immagini a maggiore ingrandimento dell'esperimento di immunistochemica su sezioni di faringe: in **A**, le frecce rosse indicano la marcatura al livello delle cellule epiteliali delle barre longitudinali; in **B**, il relativo controllo.

La presenza di *CiC3-1* e del suo prodotto d'attivazione *CiC3-1a*, incrementato in animali sottoposti ad uno stimolo pro-infiammatorio, ci è sembrata una condizione necessaria ma non sufficiente a trarre delle conclusioni sulla capacità delle cellule del faringe di rispondere a stimoli di natura infiammatoria. Abbiamo, quindi, approntato esperimenti di immunistochemica allo scopo di verificare la presenza in cellule del faringe del recettore dell'anafilatossina *CiC3-1a*. prodotta. A tal fine abbiamo utilizzato l'anticorpo anti-EL, prodotto contro il peptide sintetico *CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴, localizzato nel secondo loop extracellulare del recettore *CiC3aR* (Fig. 11). La figura 21A mostra la localizzazione della marcatura negli stessi due tipi cellulari identificati nella reazione d'immunistochemica condotta con l'anticorpo anti-C3; anche in questo caso le cellule del sangue, all'interno delle barre trasversali, le cellule ciliate degli stigmata e le cellule epiteliali delle barre longitudinali presentano un'intensa colorazione, tipica della rivelazione con la DAB. In reazioni di controllo non si evidenziava alcuna marcatura (Fig. 21B).

4.6 Analisi del processo di internalizzazione di *CiC3aR*

Per studiare gli eventi risultanti dall'interazione del recettore *CiC3aR* con il suo specifico ligando, *CiC3-1a*, sono stati condotti esperimenti d'immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo specifico contro il recettore, anti-EL.

Emociti circolanti sono stati trattati per 3 ore con cicloesimide, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi", per inibire la sintesi di proteine e quindi anche l'esposizione continua sulla membrana cellulare di recettori neo-sintetizzati. Tali cellule, poi, sono state fatte aderire alla superficie di vetrini dove sono state stimulate con il peptide sintetico *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶ riprodotto la porzione carbossi-terminale dell'anafilatossina *CiC3-1a*, peptide responsabile dell'interazione con il recettore *CiC3aR*. Le cellule sono state fissate successivamente, a tempi differenti tra 0 e 30 min. Nella figura 22 è mostrata una selezione d'immagini ottenute al microscopio confocale, dove i tipi cellulari analizzati sono gli

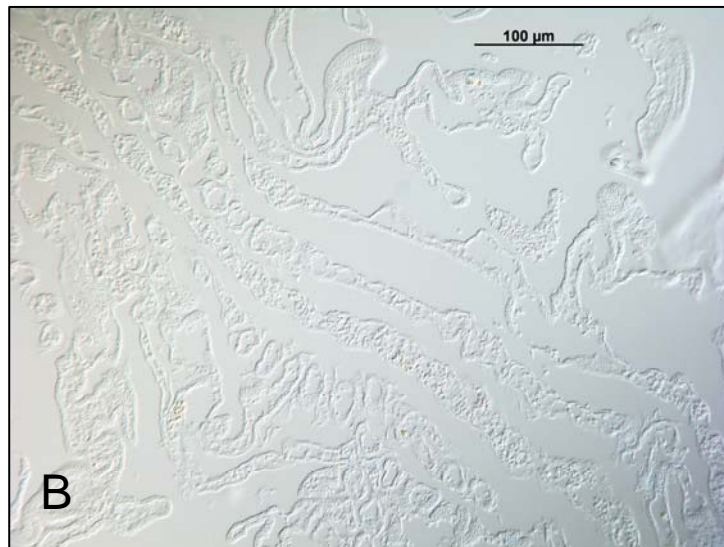
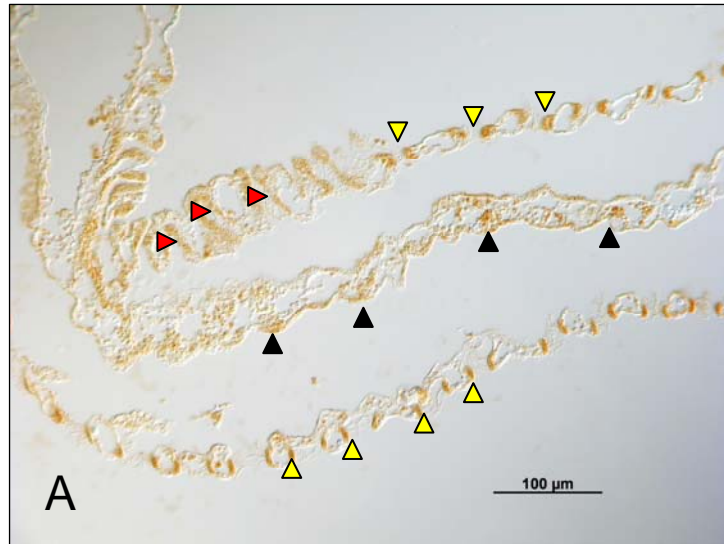


Figura 21. Immagini relative all'esperimento di immunohistochimica su sezioni di faringe: in **A** la sezione trattata con anticorpo anti-EL; si osserva la localizzazione del segnale nei medesimi tipi cellulari: cellule del sangue all'interno delle barre trasversali (indicate dalla freccia nera), le cellule ciliate dello stigma (indicate dalle frecce gialle) ed infine le cellule epiteliali delle barre longitudinali (indicate dalle frecce rosse). In **B** la sezione di controllo trattata con Ig purificate dal siero preimmune corrispondente.

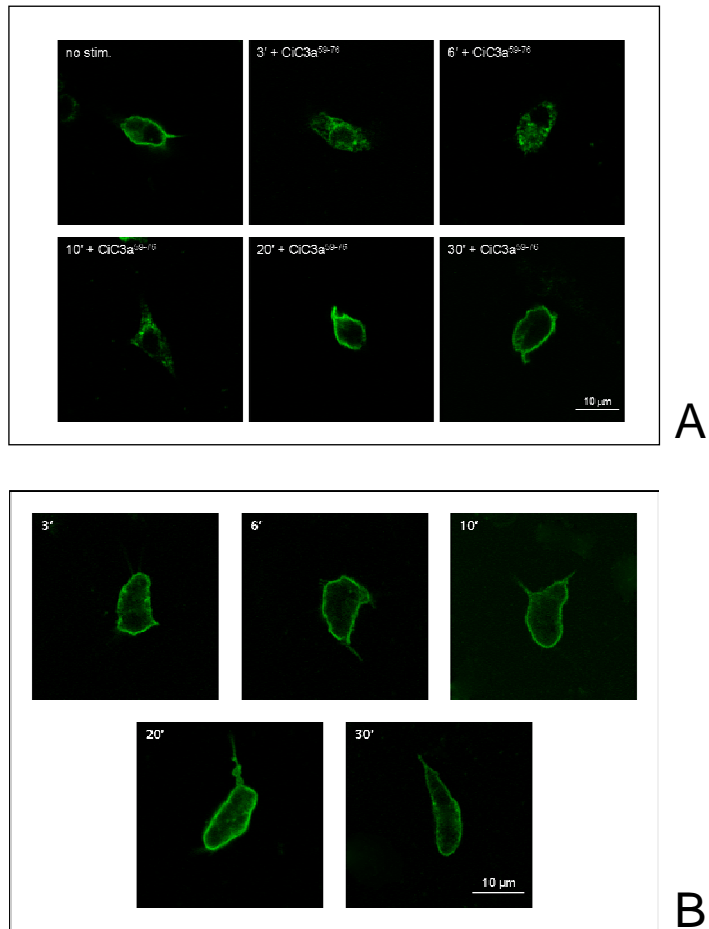


Fig.ura 22. Analisi del processo di internalizzazione di *CiC3aR*. In **A**, le cellule del sangue sono state stimulate con il peptide sintetico $CiC3a^{59-76}$ a diversi intervalli di tempo tra 0min e 30 min: a T0 il recettore è sulla membrana plasmatici (no.stim.); a 3 min dall'applicazione dello stimolo C3aR si muove verso il citoplasma; una situazione simile si ritrova anche a 6 e 10 min dall'aggiunta dell'agonista; a 20 min dalla stimolazione inizia a ritornare in superficie; il processo termina a 30 min dall'applicazione dello stimolo, quando tutto il recettore ritorna sulla membrana plasmatica. In **B** il controllo dell'esperimento di immunocitochimica a fluorescenza condotto sulle cellule del sangue stimulate con un peptide sintetico non relazionata $CiC3aR^{398-412}$, riprodotte parte del secondo loop extracellulare del recettore di C3a di *C. intestinalis*. I tempi della stimolazione vanno da 3 min a 30 min: il recettore rimane sempre in superficie.

amebociti ialini e granulari, gli unici in grado di esprimere *CiC3aR* (Melillo et al., 2006; Pinto et al., 2007).

Al tempo 0, in assenza dell'agonista, C3aR era localizzato sulla membrana plasmatica (Fig. 22A), come indicato da un sottile e luminoso anello fluorescente. A 3 min dall'applicazione dello stimolo, la fluorescenza era individuabile all'interno della cellula. La situazione permaneva simile a 6 e a 10 min dalla stimolazione, con accumulo di fluorescenza, talora, nelle aree perinucleari. A 20 min, il recettore, come indicato dalla fluorescenza, era parzialmente traslocato sulla superficie cellulare. Il processo si completava in 30 min dall'applicazione dello stimolo, con la ricomparsa del sottile anello fluorescente in superficie.

Questi dati sono stati validati da esperimenti di controllo condotti in parallelo. In un caso, gli emociti adesi al vetrino non erano trattati con alcun peptide, in un altro caso erano trattati con un peptide non relazionato, *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹². In entrambi i casi, la fluorescenza rimaneva in superficie, indicando così, che il processo d'internalizzazione era dipendente dall'interazione con il ligando specifico. I risultati degli esperimenti di controllo fatti con il peptide sintetico *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹² sono riportati nel pannello della figura 22B.

4.7 Rivelazione dell'arrestina in emociti di *Ciona*

Nei mammiferi i processi d'internalizzazione dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati alla proteina G coinvolgono le molecole di β -arrestina, il cui legame con il recettore avvia il processo d'internalizzazione. Infatti, le β -arrestine indirizzano i recettori verso le vescicole di endocitosi, quali quelle rivestite di clatrina. Il complesso recettore- β -arrestina è fissato alle vescicole attraverso un legame specifico mediato da un dominio strutturale legante la clatrina, presente al carbossiterminale delle β -arrestine. Nel genoma di *C. intestinalis* è stato identificato un singolo gene codificante l'arrestina, *CiArr*. L'analisi della sequenza amminoacidica dedotta indicava che *CiArr* è strettamente

relazionata ai geni orologi dei vertebrati; in particolare essa presenta al carbossiterminale il dominio canonico capace di legare la clatrina (Nakagawa M. et al., 2002); la sequenza di tale dominio è evidenziata in verde nell'allineamento amminoacidico riportato in figura 23.

In una prima serie di esperimenti, è stata verificata la presenza e distribuzione di CiArr negli emociti di *Ciona* mediante Western blot ed immunocitochimica, utilizzando un anticorpo commerciale eterologo anti- β -arrestina2 umana.

L'uso di tale anticorpo commerciale nei due tipi di esperimenti è stato suggerito dall'alta omologia di sequenza tra la β -arrestina2 umana e quella di *Ciona*. Nell'allineamento riportato in figura 23, l'epitopo contro il quale è diretto l'anticorpo commerciale utilizzato nei nostri esperimenti, è evidenziato in rosso. L'identità di sequenza in questa regione è pari all'86% e solo 2 residui amminoacidici su 14 sono diversi.

I risultati dell'analisi condotta mediante Western blot su estratti proteici da cellule del sangue circolante di *C. intestinalis* usando tale anticorpo, sono mostrati in figura 24A ed indicavano chiaramente la presenza di una singola banda del peso atteso di 48 kDa. Tale analisi è stata condotta su gel di poliacrilammide al 7,5% in condizioni riducenti. Lo stesso anticorpo è stato impiegato in esperimenti di immunocitochimica sugli emociti di *C. intestinalis*: le cellule prelevate dall'animale sono state fatte aderire al vetrino, fissate e quindi trattate con l'anticorpo commerciale. La rivelazione della reazione è stata effettuata con DAB. Come evidente dalla figura 24B, diversi tipi cellulari dell'emolinfa di *Ciona* risultano marcati, e tra questi anche gli amebociti granulari e ialini, che esprimono sulla superficie cellulare il recettore per CiC3-1a.

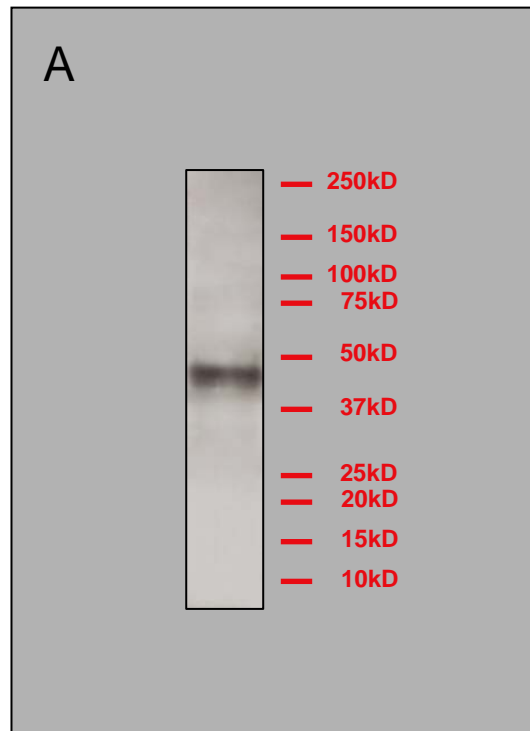


Figura 24. Analisi della presenza di *Ci-arr* in cellule del sangue. In **A** analisi condotta tramite Western Blot su omogenato di cellule del sangue raccolte da diversi animali; la banda ottenuta misura 48 kDa. In **B**, invece, è riportata l'immagine relativa agli esperimenti di immunocitochimica su cellule del sangue su vetrino. Entrambi gli esperimenti sono stati condotti utilizzando l'anticorpo commerciale anti- β -arrestina (Sigma).

4.8 Coinvolgimento di CiArr nel “signalling” di CiC3aR

Per verificare il possibile coinvolgimento di CiArr nel processo d’internalizzazione di CiC3aR, l’anticorpo commerciale anti-β-arrestina è stato utilizzato negli esperimenti d’internalizzazione condotti *in vitro*, come descritto precedentemente, su emociti di *C. intestinalis*. In breve, gli emociti, prelevati da animali adulti, sono stati trattati con cicloesimide, sono stati fatti aderire al vetrino e successivamente sono stati stimolati con il peptide sintetico CiC3-1a⁵⁹⁻⁷⁶; gli emociti, quindi, sono stati fissati e trattati con l’anticorpo anti-β-arrestina² e con un anticorpo secondario coniugato con FITC. L’analisi è stata condotta mediante microscopia confocale sugli amebociti di tipo granulare e ialino, i due tipi cellulari dell’emolinfa di *C. intestinalis* che in esperimenti analoghi di immunocitochimica avevano mostrato la presenza del recettore per C3a sulla superficie cellulare. Le osservazioni effettuate hanno evidenziato che in entrambi i tipi cellulari al tempo zero, cioè in assenza di stimolazione indotta dal peptide funzionale CiC3-1a⁵⁹⁻⁷⁶, la Ci-arr distribuita era distribuita in maniera omogenea nel citoplasma (Fig. 25). L’aggiunta dell’agonista aveva come effetto la redistribuzione dell’arrestina che era localizzata sulla membrana cellulare già a 30 sec dall’applicazione dello stimolo; l’anello fluorescente che si formava al di sotto della membrana suggeriva che la stimolazione del recettore provocava la traslocazione dell’arrestina dal citoplasma alla superficie cellulare. A 3 minuti dall’applicazione dello stimolo, Ci-Arr era nuovamente localizzata anche nel citoplasma, con distribuzione piuttosto omogenea. L’assenza di cambiamenti nel pattern d’espressione dell’arrestina in amebociti granulari e ialini in esperimenti di controllo condotti con il peptide non relazionato o in assenza di stimolo (dati non mostrati), indicavano chiaramente che tali modifiche erano specificamente indotte dal binding del ligando CiC3-1a⁵⁹⁻⁷⁶ al proprio recettore. Queste conclusioni erano ulteriormente convalidate dalle osservazioni condotte in parallelo su altri tipi cellulari presenti nell’emolinfa di *C. intestinalis*. Infatti, l’arrestina, pur essendo espressa in altri tipi cellulari dell’emolinfa di questa specie, quali cellule compartmentale, pigmentate ed URG, non

subiva cambiamenti nel pattern d'espressione in seguito all'applicazione dello stimolo indotto dal peptide sintetico *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶.

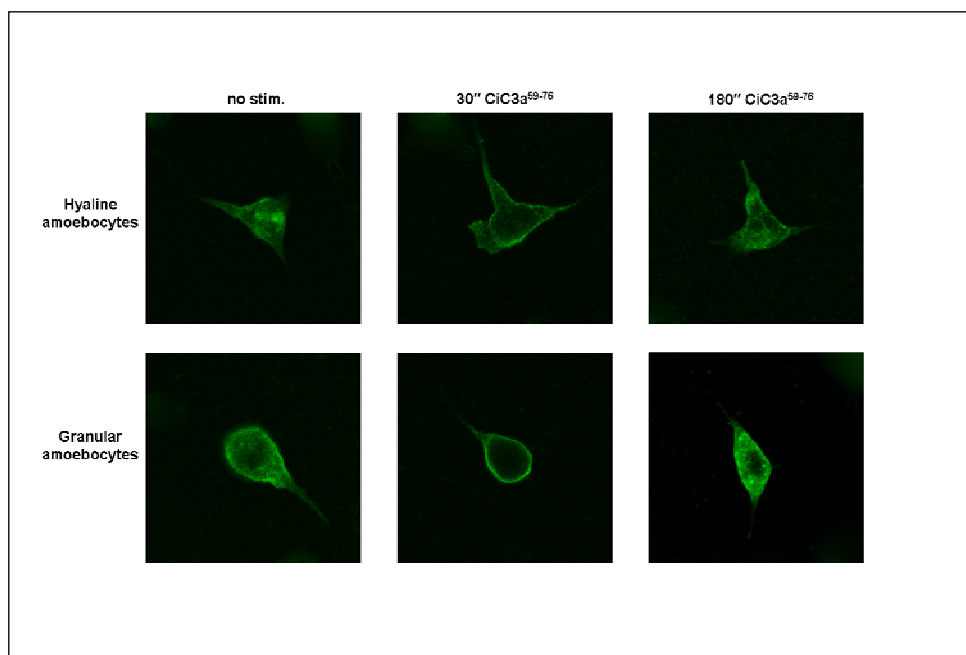


Figura 25. Selezione di immagini relative a esperimenti di immunocitochimica a fluorescenza su cellule del sangue con l'anticorpo commerciale anti- β -arrestina; le cellule mostrate nel pannello sono amebociti ialini e granulari, i tipi cellulari delle cellule del sangue che esprimono $CiC3aR$. L'esperimento è stato condotto a diversi intervalli di tempo: a T0 l'arrestina è distribuita uniformemente all'interno del citoplasma; ma dopo 30 sec dall'applicazione dello stimolo, essa è richiamata in superficie; a 3 min dall'aggiunta dell'agonista, torna a distribuirsi in maniera omogenea all'interno del citoplasma.

5. DISCUSSIONE

Lo studio del processo ematopoietico nelle ascidie è stato sostanzialmente ignorato dalla comunità scientifica. L'interesse è stato, piuttosto, rivolto allo studio degli emociti in quanto effettori della risposta immunitaria, ma anche in quest'ambito le ricerche hanno sofferto di una certa frammentarietà e si sono per lo più limitate ad osservazioni di natura morfologica.

Nelle prime osservazioni dedicate all'argomento (George, 1939; Millar, 1953) gli autori avevano individuato in noduli localizzati nella parete del faringe, ed in circolo, i possibili siti di proliferazione cellulare. Questi risultati sono stati successivamente confermati ed estesi mediante l'uso di timidina triziata che, preferenzialmente incorporata nel DNA delle cellule in divisione, consentiva di seguirne il destino (Ermak, 1977, 1982; Raftos et al, 1991). In *Ciona*, il tessuto ematopoietico è abbondante nella parete del faringe e intorno all'ansa dell'apparato digerente. Poche aree di proliferazione sono state individuate anche all'estremità posteriore della parete del corpo, laddove questa si salda al faringe. Tessuto ematogenico non è presente in altre regioni della parete del corpo (Ermak, 1982).

Le aree di proliferazione, abbondanti nelle barre trasversali del faringe e più rare in quelle longitudinali, sono organizzate in piccoli "cluster", i cosiddetti linfo-noduli, costituiti da poche cellule, immerse nell'epitelio dell'organo. In ciascun nodulo si distinguono pochi emoblasti in divisione, circondati da cellule del sangue in via di maturazione (Ermak, 1982; Parrinello, 1992).

In questo contesto, così scarso di conoscenze, l'identificazione in *C. intestinalis* di regolatori dell'ematopoiesi, come anche di marcatori molecolari precoci che esibiscano pattern di espressione spazio-temporali specifico nelle cellule ematopoietiche, è sicuramente un obiettivo di particolare rilievo.

In lavori precedenti, centrati sul ruolo del Sistema del Complemento nei processi infiammatori, è stato dimostrato che *CiC3-1*, molecola centrale

in tutti i pathway d'attivazione del Sistema del Complemento, è presente costitutivamente solo negli amebociti, granulari e ialini, tanto nella tunica che nell'emolinfa circolante dell'animale (Pinto et al, 2003; Melillo et al, 2006). A partire da questo dato, c'è sembrato interessante andare a verificare la possibile presenza e ruolo di *CiC3-1* nel faringe.

In questo studio, l'analisi condotta sul faringe mediante PCR indicava che trascritti di *CiC3-1* sono costitutivamente presenti in quest'organo. Tale risultato era ulteriormente validato dagli esperimenti di Western blot che indicavano la presenza nel faringe tanto di *CiC3-1* che dei suoi prodotti di attivazione, cioè *CiC3-1b* e *CiC3-1a*. Questo suggeriva che non solo *CiC3-1* era costitutivamente presente nel faringe, ma anche che esso era funzionalmente attivo, poiché i suoi prodotti di proteolisi erano identificabili nell'analisi condotta mediante Western blot.

Tale conclusione era rafforzata dai risultati degli stessi tipi di indagine condotta su faringe di animali trattati con LPS; a tal fine erano praticate iniezioni di quest'agente nella tunica della zona sovrastante il faringe, precisamente tra i due sifoni. A tempi stabiliti tra 0 e 48 ore gli animali erano sacrificati, e la zona di faringe al di sotto del punto di iniezione era prelevata. E' stata condotta, quindi, un'analisi mediante real-time PCR sul cDNA sintetizzato dall'RNA estratto da questo tessuto per verificare la variazione della quantità di trascritto in risposta all'LPS. I risultati riportati in figura 15 indicavano un incremento di mRNA di *CiC3-1*: la quantità rimaneva più o meno costante fino a 6 ore dall'iniezione, presentava un picco di espressione a 24 ore, e tra 30 e 48 ore ritornava a livelli che potremmo definire basali, perché paragonabili a quelli rilevati tra 0 e 6 ore. Allo stesso tempo, cioè a 24 ore dall'iniezione dell'agente infiammatorio, era possibile rilevare mediante Western blot un incremento significativo di *CiC3-1a* (Fig. 17), chiaramente indicativo del coinvolgimento del tessuto faringeo nella risposta infiammatoria. E' da sottolineare che il picco d'espressione di *CiC3-1* a 24 ore dall'iniezione di LPS è in buon accordo con quanto osservato precedentemente nella risposta infiammatoria indotta in tunica dalla somministrazione dello stesso agente;

infatti in esperimenti di immunistoichimica, tra 24 e 48 ore dal trattamento, si osservava nel sito del processo infiammatorio, un rilevante aumento del numero degli amebociti granulati, per la quasi totalità coinvolti nella produzione di *CiC3-1* (Pinto et al., 2003).

Il dato più interessante che emerge dallo studio che abbiamo condotto sul faringe riguarda la localizzazione nel tessuto delle cellule coinvolte nella produzione di *CiC3-1*. Esperimenti di immunistoichimica condotti con anticorpi specifici su sezioni dell'organo individuavano distinti siti di localizzazione del segnale: nelle cellule ciliate dello stigma, a livello delle cellule epiteliali delle barre trasversali e longitudinali, ed in cellule del sangue all'interno della rete di barre trasversali e longitudinali.

Come già detto, sono molteplici le funzioni svolte dal faringe: l'acqua, introdotta nell'animale dal sifone inalante, è separata in una frazione solida, contenente i nutrienti che sono convogliati verso il sistema digerente, ed una frazione liquida, che permette gli scambi gassosi. Gli stigmata svolgono un ruolo fondamentale in tale processo, e le cellule ciliate che li delimitano rappresentano un avamposto rispetto all'ambiente esterno, probabilmente in grado di captare segnali potenzialmente dannosi per l'organismo. In tale contesto, i risultati da noi ottenuti negli esperimenti di immunistoichimica sulle sezioni di tessuto faringeo, accreditano un ruolo di sorveglianza immunitaria per le cellule ciliate dello stigma. Infatti, la quasi totalità di esse sono reclutate nella produzione e secrezione di *CiC3-1*.

Ad un ruolo immunitario si può anche ascrivere la produzione di *CiC3-1* negli amebociti, presenti nelle barre longitudinali e trasversali del faringe, che diversi autori hanno identificato quale sito di maturazione dei diversi tipi cellulari presenti nell'emolinfa di *Ciona* (Ermak, 1977; Parrinello, 1990).

Un'ulteriore localizzazione di cellule coinvolte nella produzione di *CiC3-1* è a livello delle pareti delle barre trasversali e longitudinali, nei cosiddetti linfo-noduli, strutture che diversi autori hanno identificato quali siti di proliferazione ematopoietica (Ermak, 1977; Raftos, 1991 e 2003). Questo dato è di particolare interesse perché identifica in *CiC3-1* un

possibile marcatore molecolare precoce degli amebociti, tipo cellulare che dati convergenti identificano quale principale immunocita in ascidie (Pinto et al., 2003; Melillo et al., 2006; Azumi et al., 2003).

In linea con quanto osservato in altri organismi, la presenza di *CiC3-1* e del recettore di *CiC3-1a* in siti ematopoietici induce ad ipotizzare anche funzioni alternative del Complemento, piuttosto divergenti dai tradizionali ruoli immunitario ed infiammatorio descritti per questo sistema. Nei mammiferi il profilo d'espressione di C3a e del suo recettore, C3aR, sono stati messi in relazione con pathway modulatori dello sviluppo, del destino delle cellule staminali, del differenziamento, della riproduzione e rigenerazione dei tessuti (Mastellos e Lambris, 2002). In particolare, è stato suggerito che la generazione di C3a nelle cellule del midollo osseo, in sinergia con altri pathway, sia in relazione con la maturazione e l'homing di vari progenitori ematopoietici (Reca et al, 2003).

In conclusione, nel tessuto faringeo di *Ciona* coesisterebbero diverse funzioni di *CiC3-1*, spazialmente distinte: immunosorveglianza negli stigmata, immunoeffettore negli emociti circolanti, e promozione del differenziamento nei linfo-noduli.

Obiettivo parallelo di questa tesi è stato l'approfondimento dell'interazione tra l'anafilatossina C3a ed il suo recettore specifico. Infatti, l'identificazione e caratterizzazione in *C. intestinalis* di entrambi i partner che partecipano alla risposta infiammatoria mediata dal Sistema del Complemento, ci ha incoraggiati a studiare in maggior dettaglio l'interazione *CiC3a-CiC3aR*, sia a livello cellulare che molecolare. Abbiamo, quindi, iniziato un'analisi accurata degli eventi cellulari e molecolari innescati dal binding dell'anafilatossina *CiC3-1a* al suo recettore specifico *CiC3aR*.

In particolare, abbiamo concentrato la nostra attenzione su due dei meccanismi cellulari ritenuti fondamentali in questo processo, e cioè l'internalizzazione del recettore ed il possibile coinvolgimento delle arrestine in tale processo.

In seguito a interazione con il ligando, infatti, molti GPCR sono internalizzati, e la maggior parte di essi, in presenza di uno stimolo continuo, va incontro a desensitivizzazione. La desensitivizzazione regola il rilascio del mediatore, prevenendo così il danno tissutale. Questo processo coinvolge tanto la fosforilazione del recettore indotta dall'agonista che il reclutamento della β -arrestina che interagisce con la proteina G per inibire la funzione del recettore. Quello delle arrestine nell'internalizzazione di molti GPCR è un ruolo chiave che regola l'attività della cellula sia nei processi di desensitivizzazione a lungo termine, dove la down-regolazione del recettore passa attraverso la sua degradazione, sia in quelli dove il recettore desensitivizzato è riciclato alla superficie cellulare per essere ingaggiato in nuovi cicli di trasduzione del segnale (Yu et al., 1993; Pippig et al., 1995; Ferguson et al., 1996; Laporte et al., 1997, Hüttenrauch et al., 2005).

Gli esperimenti sono stati condotti su amebociti granulari e ialini di *Ciona*, prelevati dal sangue circolante; infatti, in un precedente lavoro, questi due tipi cellulari erano stati identificati quale sito di espressione del recettore in esame (Melillo et al., 2006). La particolare resistenza di questi tipi cellulari, ci ha consentito di effettuare esperimenti *in vitro* senza ricorrere a trasfezioni.

Innanzitutto, siamo andati a verificare se, in seguito al binding di *CiC3-1a*, nella forma del peptide funzionale *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶, *CiC3aR* era internalizzato. Abbiamo analizzato mediante microscopia confocale la risposta al ligando del recettore presente sugli amebociti granulari e ialini sottoposti a trattamento preliminare con cicloesimide, che impedisce la traduzione dei trascritti. Questi esperimenti indicavano chiaramente che *CiC3aR*, in seguito all'applicazione di uno stimolo nella forma del ligando specifico *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶, era internalizzato in pochi minuti, raggiungeva un massimo tra 3 e 10 min, era quindi riciclato alla superficie della cellula entro 30 min dall'applicazione dell'agonista.

I risultati da noi ottenuti sono in accordo con quanto osservato in saggi condotti su granulociti umani mediante citometria a flusso. La

stimolazione delle cellule con l'anafilatossina umana induceva l'internalizzazione del recettore entro 5-10 min dall'applicazione dello stimolo, con quasi il 100% di recettore internalizzato. Gli stessi esperimenti condotti su una linea cellulare di mastociti umani (HMC-1) inducevano il 70% circa di internalizzazione del recettore mentre non si osservava internalizzazione in cellule HEK293 trasfettate con C3aR (Settmacher et al., 1999).

Molti GPCR sono internalizzati attraverso un pathway endocitotico che coinvolge la formazione di vescicole rivestite di clatrina (von Zastrow e Kobilka, 1992; Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1996; Tolbert e Lameh, 1996). Tale pathway, come già accennato a proposito della desensitivizzazione, è innescato dall'interazione dei GPCR fosforilati con le β -arrestine, che fanno da ponte tra il recettore e la clatrina (Ferguson et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Nei vertebrati, le arrestine sono distinte in arrestine visuali, espresse esclusivamente nei fotorecettori della retina e nell'organo pineale, e non visuali che sono invece ubiquitarie e sono responsabili dell'internalizzazione dei GPCR (Krupnick e Benovic, 1998; Barak et al., 1997).

In *C. intestinalis* è stato identificato, isolato e sequenziato un unico gene (*CiArr*) codificante per l'arrestina, che, come evidenziato dall'analisi della sequenza amminoacidica dedotta, è strettamente correlata alle arrestine dei vertebrati, presenta caratteristiche intermedie tra il tipo visuale e quello non visuale ed esibisce il 65% di identità con la β -arrestina2 umana (Nakagawa et al., 2002). La sequenza di *Ci-arr* è caratterizzata dalla presenza al carbossi-terminale di un dominio di binding per la clatrina, responsabile dell'internalizzazione dei GPCR indotta dall'agonista. Utilizzando un anticorpo commerciale contro un epitopo della β -arrestina-2 umana, generato contro una sequenza amminoacidica che condivide con *Ci-arr* l'86% di identità, abbiamo innanzitutto verificato se tale anticorpo cross-reagisse con *Ci-arr*, allestendo esperimenti di Western blot ed immunocitochimica, condotti rispettivamente su cellule del sangue e loro

estratti proteici. Abbiamo, quindi, ripetuto l'esperimento di immunocitochimica a fluorescenza su emociti stimolati con l'agonista di *CiC3aR*. Questo approccio ci ha consentito di dimostrare che, contestualmente al binding tra *CiC3-1a* e *CiC3aR*, *CiArr* è traslocata dal citoplasma, dove è più o meno omogeneamente distribuita, alla superficie degli amebociti ialini e granulari. Tale dislocazione era limitata a questi due tipi cellulari, gli unici che esprimono C3aR sulla superficie cellulare (Fig. 25).

I risultati dei nostri esperimenti suggeriscono che, come accade per buona parte dei recettori accoppiati alla proteina G, l'esposizione all'agonista nella forma del peptide funzionale *CiC3-1a*⁵⁹⁻⁷⁶, modula l'espressione sulla superficie degli amebociti granulari e ialini di *CiC3aR*. Infatti, il binding del peptide al recettore specifico determina una sua rapida scomparsa dalla superficie degli emociti; *CiC3aR* è rapidamente internalizzato, entro 10 minuti dall'applicazione dello stimolo in vescicole endocitotiche, che occasionalmente formano "cluster" nella regione perinucleare. L'analisi al microscopio confocale suggerisce che il processo di internalizzazione è controllato da *CiArr* e che *CiC3aR* è riciclato sulla membrana plasmatica entro 30 minuti. Questi risultati sono in ottimo accordo con l'analisi eseguita sulla sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3aR*, che consente di classificarla come una GPCR, appartenente alla classe A della famiglia delle Rodopsine che mostrano un analogo comportamento (Pfleger et al, 2007).

La valenza dei dati ottenuti va sicuramente oltre la specie usata. La funzione di immuno-sorveglianza del faringe potrebbe, infatti, prefigurare analoghe funzioni svolte nei mandibolati dai primi tratti del sistema digerente. L'evoluzione funzionale del faringe è certamente un elemento chiave nel passaggio alla complessità tissutale e morfologica di tale struttura nei vertebrati inferiori, che si è accompagnata ad un aumento della complessità funzionale del sistema immunitario, con l'introduzione dell'immunità adattativa; la funzione della risposta immune a questo livello

topico ha senz'altro avuto un ruolo fondamentale nell'evoluzione del rapporto individuo/ambiente trofico.

6. BIBLIOGRAFIA

Ames R.S., Li Y., Sarau H.M., Nuthulaganti P., foley J.J., Ellis C., Zeng Z., Su K., Jurewicz A.J., Hertzberg R.P., Bergsma D.J., Kumar C. 1996. Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 20231-20234.

Anderson R. S. 1971. Cellular responses to foreign bodies in the tunicate *Molgula manhattensis* (DeKay). *Biol. Bull.* 141, 91-98.

Azumi K., De Santis R., De Tomaso A., Rigoutsos I., Yoshizaki F., Pinto M.R., Marino R., Shida K., Ikeda M., Ikeda M., Arai M., Inoue Y., Shimizu T., Satoh N., Rokhasar D.S., Du Pasquier L., Kasahara M., Satake M., Nonaka M. 2003. Genomic analysis of immunity in a urochordate and emergence of the vertebrate immune system: “waiting for Godot”. *Immunogenetics.* 55: 570-581.

Barnes R. D. 1987. *Invertebrate Zoology*. 5th ed. Philadelphia, Saunders.

Brusca R. C., Brusca G. J. 1990. *Invertebrates*. Sunderland, Mass., Sinauer.

Burighel P., Cloney A.R. 1997. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Hemichordata, Chaetognatha, and the Invertebrates Chordates. Wiley-Liss Inc. 15: 221-347.

Crass T., Raffetseder U., Martin U., Grove M., Klos A., Kohl J., Bautsch W. 1996. Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 1944-1950.

Damas D. 1900. Etude du sac branchial chez *Ciona intestinalis* (L). *Arch. Biol. Paris.* 1: Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. Philadelphia, Saunders.

Dehal P., Satou Y., Campbell R. K., Chapman J., Degnan B., De Tomaso A., Davidson B., Di Gregorio A., Gelpke M., Goodstein D. M. et al. 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science.* 298, 2157-2167.

Delsuc F., Brinkmann H., Chourrout D., Philippe H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*. 439, 965-968.

Ember J.A., Jagels M.A., Hugli T.E. 1998. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In *The Human Complement system in Health and Disease*. Volanakis J.E., Frank M.M. Ed. Marcel Dekker, New York, USA, pp 241-284.

Endean R. 1961. The test of the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 102, 107-117.

Ermak T.H. 1976. The hematogenic tissues of tunicates. In: Wright R.K., Cooper E.L. ed. *Phylogeny of thymus and bone marrow-bursa cells*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp 45-56.

Ermak T.H. 1982. The renewing cell populations of ascidians, *Am. Zool.* 22: 795-805.

Ferguson S.S., Barak L.S., Zhang J., Caron M.G. 1996. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1095-110.

Fiala-Medoni A. 1974. Ethologie alimentaire d'ivertébrés benthique filtreurs (ascidies). II Variations des taux de filtration et de digestion en fonction de l'espèce. *Mar. Biol.* 28: 199-206.

Fiala-Medoni A., Pequignat E. 1980. Direct absorption of amino acids and glucose by the branchial sac and the digestive tract of benthic filter feeders (Ascidians). *J. Zool. Lond.* 192: 403-419.

Fuke M. T. 1979. Studies of coelomic cells of some Japanese ascidians. *Bull. Mar. Biol. Stn Asamushi Tôhoku Univ.* 16, 142-159.

Fuke M. T. 1980. "Contact reaction" between xenogeneic or allogeneic celomic cells of solitary ascidians. *Biol. Bull.* 158, 304-315.

- Fuke M. T. 1990. Self and nonself recognition in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. In *Defence molecules*. Ed. Marchalonis J., Reinisch C. Alan. R. Liss., New York. 107-117.
- Fukuoka Y., Ember J.A., Hugli T.E. 1998. Molecular cloning of two isoforms of the guinea pig C3a anaphylatoxin receptor: alternative splicing in the large extracellular loop. *J. Immunol.* 161: 2977-2984.
- Gao J., Choe H., Bota D., Wright P.L., Gerard C., Gerard N.P. 2003. Sulfation of tyrosine 174 in human C3a receptor is essential for binding of C3a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* 278: 37902-37908.
- George W. C. 1926. The histology of the blood of *Perophora viridis* (ascidian). *J. Morph.* 41, 311-331.
- George, W. C. 1939. A comparative study of the blood of Tunicates. *Quart. J. Micr. Sci. London.* 81: 391-428.
- Godeaux J.E.A. 1989 Functions of the endostyle in the tunicates. *Bull. Mar. Sci.* 45: 228-242.
- Hollmann T.J., Haviland D.L., Kildsgaard J., Watts K., Wetsel R.A. 1998. Cloning, expression, sequence determination, and chromosome localization of the mouse complement C3a anaphylatoxin receptor gene. *Mol. Immunol.* 35: 137-148.
- Hsu M.H., Ember J.A., Wang M., Prossnitz E.R., Hugli T.E., Ye R.D. 1997. Cloning and functional characterization of the mouse C3a anaphylatoxin receptor gene. *Immunogenetics.* 47: 64-72.
- Hugli T.E. 1990. Structure and function of C3a anaphylatoxin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 153, 181-208.
- Hüttenrauch F., Pollok-Kopp B., Oppermann M. 2005. G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* 280: 37503-15.

- Janssen B.J.C., Christodoulidou A., McCarthy A., Lambris J.D., Gros P. 2006. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*. 444: 213-216.
- Janssen B.J.C., Huizinga E.G., Raaijmakers H.C.A., Ross A., Daha M.R., Nilsson-Ekdahl K., Nilsson B., Gros P. 2005. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*. 437: 505-511.
- Kalk M. 1963. Absorption of vanadium by tunicates. *Nature*. 198: 1010-1011.
- Kenjo A., Takahashi M., Matsushita M., Endo Y., Nakata M., Mizuochi T., Fujita T. 2001. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Biol. Chem.* 276: 19959-65.
- Krupnick J.G., Benovic J.L. 1998. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 289-319.
- Kustin K., Levine D. S., McLeod G. C., Curby W. A. 1976. The blood of *Ascidia nigra*: blood cell frequency, distribution, morphology, and the distribution and valence of vanadium in living blood cells. *Biol. Bull.* 150, 426-441.
- Lambris J.D., Sahu A., Wetsel R. The chemistry and biology of C3, C4 and C5. 1998, p.83-118. In *The human complement system in health and disease*. Ed. Volanakis J.E., Frank M. Marcel Dekker Inc. New York.
- Langkabel P., Zwirner J., Oppermann M. 1999. Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptor C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases. *Eur. J. Immunol.* 29: 3035-3046.
- Litman G.W., Cannon J.P., Dishaw L.J. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 866-879.

- Lu J.H., Thiel S., Wiedmann H., Timpl R., Reid K.B. 1990. Binding of the pentamer/examer forms of mannan binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r₂C1s₂ complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J. Immunol.* 144: 2287-2294.
- Marchalonis J.J., Adelman M.K., Schluter S.F., Ramsland P.A. 2006. Antibody repertoire in evolution: chance, selection and continuity. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 223-47.
- Marino R., Kimura Y., De Santis R., Lambris J.D., Pinto M.R. 2002. Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Immunogen.* 53: 1055-1064.
- Mastellos D, Lambris JD. 2002. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends Immunol.* 23: 485-91.
- Matsushita M., Endo Y., Fujita T. 2000. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J. Immunol.* 164: 2281-2284.
- Melillo D., Sfyroera G., De Santis R., Graziano R., Marino R., Lambris J.D., Pinto M.R. 2006. First identification of chemotactic receptor in an invertebrate species: structural and functional characterization of *Ciona intestinalis* C3a receptor. *J. Immunol.* 177: 4132-4140.
- Ménard L., Ferguson S.S., Zhang J., Lin F.T., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Barak L.S. 1997. Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol. Pharmacol.* 51: 800-8.
- Milanesi C., Burighel P. 1978. Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus Schlosseri*. I. Hemoblast, granulocytes, macrophage, morula cell and nephrocyte. *Acta Zool.* 59, 135-147.

- Millar R.H. 1953. Ciona. In: Colman J.S. ed. L.M.B.C. Memoirs, vol. 35, Liverpool: The University Press of Liverpool.
- Miyazawa S., Azumi K., Nonaka M. 2001. Cloning and characterization of integrin alpha subunits from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. J. Immunol. 166, 1710-1715.
- Miyazawa S., Nonaka M. 2004. Characterization of novel ascidian beta integrins as primitive complement receptor subunits. Immunogenetics. 55: 836-44.
- Naik N., Giannini E., Brouchon L., Boulay F. 1997. Internalization and recycling of C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. J. Cell. Sci. 110: 2381-2390.
- Nakagawa M., Orii H., Yoshida N., Jojima E., Horie T., Yoshida R., Haga T., Tsuda M. 2002. Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of visual and nonvisual arrestins of vertebrate. Eur. J. Biochem. 269: 5112-5118.
- Nonaka M., Azumi K., Ji X., Namikawa-Yamada C., Sasaki M., Saiga H., Dodds A. W., Sekine H., Homma M. K., Matsushita M., Endo Y., Fujita T. 1999. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. J. Immunol. 162, 387-391.
- Nonaka M., Kimura A. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. Immunogenetics. 58: 701-713.
- Ohno N., Miura T., Miura N.N., Chiba N., Uchiyama M., Adachi Y., Yadomae T. 1999. Inflammatory and immunopharmacological activities of meta-periodate oxidized zymosan. Zentralbl. Bakteriologie. 289: 63-77.
- Overton J. 1966. The fine structure of blood cells in the ascidian *Perophora viridis*. J. Morph. 119, 305-326.

- Parrinello N., De Leo G., Di Bella M.A. 1990. Fine structural observation of the granulocytes involved in the tunic inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata). *J. Invert. Pathol.* 56: 181-189.
- Pestarino M., Fiala-Medoni A., Ravera F. 1988. Ultrastructure of the branchial wall of lower chordate: the ascidian *Ciona intestinalis*. *J. Morphol.* 197: 269-276.
- Pfleger K.D., Dalrymple M.B., Dromey J.R., Eidne K.A. Monitoring interactions between G-protein-coupled receptors and beta-arrestins. *Biochem. Soc. Trans.* 35:764-6.
- Pinto M.R., Chinnici M.C., Kimura Y., Melillo D., Marino R., Spruce L.A., De Santis R., Parrinello N., Lambris J.D. 2003. CiC3-1a-mediated chemotaxis in deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* (Urochordata). *J. Immun.* 171: 5521-5528.
- Pinto M.R., Melillo D., Giacomelli S., Sfyroera G., Lambris J.D. 2007. Ancient origins of the complement system: emergine invertebrate models. In: *Innate Immunity. Advances in experimental medicine and biology*, series, John D. Lambris ed., Springer New York.
- Pippig S., Andexinger S., Lohse M.J. 1995. Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* 47: 666-76.
- Raftos D. A., Tait N. N., Briscoe D. A. 1987. Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata*. *Dev Comp. Immunol.* 11, 713-725.
- Raftos D.A., Fabbro M., Nair S.V. 2004. Exocytosis of a complement component C3-like protein by tunicate hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 181-90.

Raftos D.A., Nair S.V., Robbins J., Newton R.A., Peters R. 2002. A complement component C3-like protein from the tunicate, *Styela plicata*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 307-12.

Reca R., Mastellos D., Majka M., Marquez L., Ratajczak J., Franchini S., Glodek A., Honczarenko M., Spruce L.A., Janowska-Wieczorek A., Lambris J.D., Ratajczak M.Z. 2003. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood.* 101: 3784-93.

Richard D.E., Laporte S.A., Bernier S.G., Leduc R., Guillemette G. 1997. Desensitization of AT1 receptor-mediated cellular responses requires long term receptor down-regulation in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 138: 3828-35.

Roglic A., Prossnitz E.R., Cavanagh S.L., Pan Z., Zou A., Ye R.D. 1996. cDNA cloning of a novel G protein-coupled receptor with a large extracellular loop structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1305: 39-43.

Rowe T. 2004. In *Assembling the tree of life*. Ed. Cracraft, J. & Donoghue M. J. Oxford Univ. Press, Oxford. 384-409.

Rowley A. F. 1981. The blood cells of sea squirt *Ciona intestinalis*: morphology, differential counts, and *in vitro* phagocytic activity. *J. Invert. Pathol.* 37, 91-100.

Rowley A. F. 1982a. Ultrastructural and cytochemical studies on the blood cells of the sea squirt, *Ciona intestinalis*. I Stem cells and amoebocytes. *Cell Tissue Res.* 223, 403-414.

Rowley A. F. 1982b. The blood cells of *Ciona intestinalis*: an electron probe X-ray microanalytical study. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 62, 607-620.

Rowley A. F. 1983. Preliminary investigations on the possible antimicrobial properties of tunicate blood cell vanadium. *J. Exper. Zool.* 227, 319-322.

Rowley A. F., Rhodes C. P., Ratcliffe N. A. 1984. Protochordate leucocytes: a review. *Zool. J. Linn. Soc.* 80, 283-295.

Sahu A., Lambris J.D. 2001. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 180: 35-48.

Satoh N. 1994. *Developmental biology of ascidians.* Cambridge University Press. New York, NY, USA.

Sekine H., Kenjo A., Azumi K., Ohi G., Takahashi M., Kasukawa R., Ichikawa N., Nakata M., Mizuochi T., Matsushita M., Endo Y., Fujita T. 2001. An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Immunol.* 167, 4504-4510.

Settmacher B., Bock D., Saad H., Gärtner S., Rheinheimer C., Köhl J., Bautsch W., Klos A. 1999. Modulation of C3a activity: internalization of the human C3a receptor and its inhibition by C5a. *J. Immunol.* 1999 162: 7409-16.

Settmacher B., Rheinheimer C., Hamacher H., Ames R.S., Wise A., Jenkinson L., Bock D., Schaefer M., Kohl J., Klos A. 2003. Structure-function studies of the C3a-receptor: C-terminal serine and threonine residues which influence receptor internalization and signalling. *Eur. J. Immunol.* 33: 920-927.

Shimazaki A., Sakai A., Ogasawara M. 2006. Gene expression profiles in *Ciona intestinalis* stigmatal ciliated cells: insight into formation of the ascidian branchial fessures. *Dev. Dyn.* 235: 562-569.

Song W. C., Sarrias M. R., Lambris J. D. 2000. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology*. 49, 187-198.

Tolbert L.M., Lameh J. 1996. Human muscarinic cholinergic receptor Hm1 internalizes via clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 271: 17335-42.

Tornetta M.A., Foley J.J., Sarau H.M., Ames R.S. 1997. The mouse anaphylatoxin C3a receptor: molecular cloning, genomic organization, and functional expression. *J. Immunol.* 158: 5277-5282.

Van Koppen C.J., Jakobs K.H. 2004. Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 66: 365-367.

Vienne A., Pontarotti P. 2006. Metaphylogeny of 82 gene families sheds a new light on chordate evolution. *Int. J. Biol. Sci.* 2, 32-37.

Volanakis J. E., Arlaud G. J. 1998. Complement enzymes. In *The Human Complement System in Health and Disease*. Volanakis J. E., Frank M. M. Ed. Marcel Dekker, New York, USA. 49-81.

von Zastrow M., Kobilka B.K. 1992. Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* 267: 3530-8.

Wetsel R. A., Kildsgaard J., Haviland D. L. 2000. Complement anaphylatoxins (C3a, C4a, C5a) and their receptors (C3aR, C5aR/CD88) as therapeutic targets in inflammation. In *Therapeutics Interventions in the Complement System*. Lambris J. D., Holers V. M. Ed. Human Press, New York, 113-153.

Wetsel R.A., Kildsgaard J., Haviland D.L. Complement anaphylatoxins (C3a, C4a, C5a) and their receptors (C3aR, C5aR/CD88) as therapeutic targets in inflammation. In *Contemporary Immunology: Therapeutic Interventions in the Complement System*. Ed. Lambris J.D. and Holers V.M. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Wright R.K. (1981) Urochordates. In: Ratcliffe N.A., Rowley A.F. ed. Invertebrate blood cells. Academic Press, London, pp 565-626.

Yu S.S., Lefkowitz R.J., Hausdorff W.P. 1993. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 268: 337-41.

Zhang J., Ferguson S.S., Barak L.S., Ménard L., Caron M.G. 1996. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol Chem.* 271(31): 18302-5.

TABELLE soluzioni

TAE 10x (1 lt)

Tris	48.4 g
acido acetico glaciale	11.42 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml

TBE 10x (1 lt)

Tris	108 g
acido borico	55 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 ml

TE

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM

TBS (1 lt)

NaCl	80gr
KCl	2gr
Tris	30gr

MOPS 10x (1 lt)

MOPS	41.8 g
sodio acetato	11.8 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml

“Resolving gel” (7.5%)

30% Acrilammide/Bis	6.25 ml
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	6.5 ml
H ₂ O MQ	12.1 ml
TEMED	12.5 µl
Ammonio persolfato 10%	125 µl

“Resolving gel” (15%)

30% Acrilammide/Bis	12.3 ml
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	6.5 ml
H ₂ O MQ	6 ml
TEMED	12.5 µl
Ammonio persolfato 10%	125 µl

“Stacking gel” (4%)	
30% Acrilammide/Bis	3.3 ml
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	6.5 ml
H ₂ O MQ	15 ml
TEMED	25 µl
Ammonio persolfato 10%	125 µl

“Running buffer” 5x (1 lt)	
Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

“Blotting buffer” 1x (1 lt)	
Tris	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanolo	20 %

PBS 10x (1 lt)	
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g