



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCENZE E BIOTECNOLOGIE  
INDIRIZZO: BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA  
CICLO XXV

**STUDIO DI GENI COINVOLTI NELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE, NELL'APOPTOSI, E NELLE  
RISPOSTE ALLO STRESS OSSIDATIVO DURANTE IL CICLO COLONIALE BLASTOGENETICO  
DELL'ASCIDIA COLONIALE *Botryllus schlosseri***

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti  
**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Andrea Pilastro  
**Supervisore:** Ch.mo Prof. Lorian Ballarin

**Dottorando:** Filippo Schiavon



## INDICE

<b>Abstract</b>	1
<b>Riassunto</b>	2
<b>Introduzione</b>	3
I Tunicati	3
La classe Ascidiacea	3
La colonia di <i>Botryllus schlosseri</i>	3
Il ciclo coloniale di <i>B. schlosseri</i>	5
Gli emociti di <i>B. schlosseri</i>	7
L'apoptosi nei vertebrati	8
Il cambio di generazione e l'apoptosi in <i>B. schlosseri</i>	9
Geni coinvolti nell'apoptosi considerati in questo studio	11
BAX	11
AIF	16
PARP1	18
BIRPs	22
NF-kB1	23
Proliferazione e differenziamento in <i>B. schlosseri</i>	26
Geni coinvolti nella proliferazione considerati in questo studio	28
PCNA	28
KI67	28
Nanos	29
Lo stress ossidativo	30
Geni coinvolti nello stress ossidativo considerati in questo studio	32
GCL	32
GS	34
GPx	36
SOD	37
<b>Scopo</b>	40
<b>Materiali e metodi</b>	41
Animali utilizzati	41
Retrotrascrizione dell'RNA	41
Estrazione RNA	41
Quantificazione RNA	41
Sintesi del cDNA	41
Amplificazione del cDNA mediante PCR	41
Progettazione dei primer	41
Amplificazione del cDNA	44
Clonaggio del cDNA amplificato	44
Preparazione dei batteri competenti alla trasformazione	45
Trasformazione dei batteri competenti	45
Screening delle colonie trasformate	45
Purificazione del DNA plasmidico	46
Sequenziamento	46
RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	46
3' RACE	46
5' RACE	46

Studio di espressione	47
Real-Time PCR (qRT-PCR)	47
Ibridazione <i>in-situ</i>	48
Costruzione sonde a RNA	48
Ibridazione <i>in-situ</i> su striscio di emociti	50
Allineamenti multipli e analisi di sequenza	50
Alberi filogenetici	51
<b>Risultati</b>	52
Analisi di sequenza	52
Geni coinvolti nell'apoptosi	52
BAX	52
AIF	58
PARP1	67
BIRPs	76
BIRP-1	76
BIRP-2	77
NF-kB1	81
Geni coinvolti nella proliferazione	89
PCNA	89
KI67	95
Nanos	108
Geni coinvolti nello stress ossidativo	116
GCLM	116
GS	122
GPx-1	130
GPx-2	135
Cu/Zn-SOD	141
Analisi di espressione	146
Real-Time PCR	146
Ibridazione <i>in-situ</i>	146
<b>Discussione</b>	150
Analisi di sequenza	150
Studio di espressione: qRT-PCR	155
Studio di espressione: ibridazione <i>in-situ</i>	156
Il ruolo degli immunociti di <i>B. schlosseri</i> durante il ciclo coloniale blastogenetico	157
<b>Bibliografia</b>	159

## ABSTRACT

In the last ten years, an increasing number of publications has highlighted the most interesting aspects of the biology of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*, indicating this non-vertebrate chordate as a reliable model organism for the study of gene expression, function and interaction pathways. The study of important cellular processes such as, for example, cell proliferation and death or stress and immune responses, is facilitated, in *B. schlosseri*, by its particular colonial life-cycle in which a continuous interchange from an apoptotic to a regenerative condition occurs. Each colony includes three different blastogenetic generations: adult filter-feeding zooids, primary buds on the adults and secondary buds on the primary buds. At the beginning of each cycle, new secondary buds originate from the atrial wall of primary buds and start to develop and grow until they become primary buds and, finally, zooids of the new adult generation replacing the old one. During the phase of generation change, also defined as take-over, these old zooids undergo a massive apoptosis and are gradually resorbed. The primary buds of the newly formed adults will then generate secondary buds. Although a morphological classification of the *Botryllus* blastogenetic cycle has been established, the complete lack of information on the type of genes involved, their role and level of expression remains a hard challenge. In order to add some new data, we used a library of *Botryllus* ESTs and considered specific sequences that showed a great BLAST similarity towards well-known vertebrate genes involved in apoptosis, proliferation and stress responses. Next, we were able to isolate their complete transcripts and we also analysed their site of synthesis and the differential expression between the main phases of the blastogenetic cycle, mid-cycle and take-over. We especially concentrated our work on the probable *Botryllus* orthologs of some key factors that are largely studied in vertebrates like the apoptotic BAX, AIF (Apoptosis Inducing Factor), PARP1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1), BIR Containing Proteins of the IAP family (Inhibitor of Apoptosis) and the transcription factor NF- $\kappa$ B1 (Nuclear Factor Kynase B 1); markers of cell proliferation such as PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), the Antigen KI67 and Nanos; antioxidant agents sensitive to stress conditions: the GCLM subunit of GCL (Glutathione Cysteine Ligase), GS (Glutathione Sintethase), GPx (Glutathione Peroxidase) and SOD (Superoxide Dismutase). Preliminary results obtained employing cDNA samples of two different colonies at the same blastogenetic stages of mid-cycle and take-over, indicate for five of the genes analyzed an unexpected general underexpression in the level of transcription in correspondence of the take-over phase. This work represents a first, detailed study of gene expression during the colonial blastogenetic cycle of *B. schlosseri*.

## RIASSUNTO

Nell'ultimo decennio, un numero crescente di pubblicazioni ha messo in luce gli aspetti più interessanti della biologia dell'ascidia coloniale *B. schlosseri* che, in quanto cordato non vertebrato, rappresenta un valido organismo modello per lo studio dell'espressione e della funzionalità genica ed il tipo di pathway. Il particolare ciclo coloniale di *B. schlosseri*, in cui si assiste alla continua alternanza tra morte per apoptosi e rigenerazione, offre un approccio semplificato allo studio di processi cellulari fondamentali come la proliferazione e la morte cellulare o la risposta immunitaria e allo stress. Ogni colonia include tre diverse generazioni blastogenetiche: zoidi adulti filtranti, gemme primarie sugli adulti e gemme secondarie su quelle primarie. All'inizio di ogni nuovo ciclo, le gemme secondarie si originano dalla parete atriale delle gemme primarie, cominciano a crescere e svilupparsi fino a quando diventano gemme primarie e alla fine zoidi adulti che sostituiscono quelli della vecchia generazione. Durante il cambio generazionale, una fase del ciclo chiamata anche regressione, gli zoidi senescenti vanno incontro a morte cellulare per apoptosi e vengono progressivamente riassorbiti. Nel frattempo, le gemme primarie della nuova generazione adulta sviluppano le gemme secondarie. Le diverse fasi del ciclo blastogenetico sono state classificate dal punto di vista morfologico, ma non sono disponibili dati completi sui geni coinvolti, sul ruolo e le modalità di espressione degli stessi. Per ottenere ciò, abbiamo utilizzato una libreria di EST specifiche di Botrillo, considerando le sequenze che presentavano in BLAST valori elevati di similarità rispetto ai geni dei vertebrati coinvolti nell'apoptosi, nella proliferazione e nella risposta allo stress. Dopo aver isolato i trascritti completi, abbiamo analizzato la localizzazione cellulare e le variazioni di espressione durante il ciclo blastogenetico, tra le fasi intermedie e la regressione. In questo studio, abbiamo esaminato i probabili orologi in Botrillo di alcune proteine chiave, ampiamente indagate nei vertebrati, come i fattori apoptotici BAX, AIF (fattore di induzione dell'apoptosi), PARP1 (poly ADP-ribosio polimerasi 1), le componenti BIRC della famiglia IAP (inibitori dell'apoptosi) ed il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B1/p105; i marcatori di proliferazione PCNA (antigene nucleare di proliferazione cellulare), l'antigene KI67 e Nanos; gli agenti antiossidanti GCLM (subunità regolatoria della glutazione cistein ligasi GCL), GS (glutazione sintetasi), GPx (glutazione perossidasi) e SOD (superossido dismutasi). I risultati preliminari ottenuti mediante l'utilizzo di campioni di cDNA provenienti da due colonie diverse in entrambe le fasi intermedie e la regressione del ciclo coloniale, mostrano che cinque trascritti sono sottoespressi durante il cambio generazionale. Il presente lavoro rappresenta un primo approfondito studio di espressione genica durante il ciclo blastogenetico coloniale di *B. schlosseri*.

## INTRODUZIONE

### **I Tunicati**

I Tunicati o Urocordati rappresentano, come i Vertebrati e i Cefalocordati, un subphylum dei Cordati, i quali condividono quattro caratteri fondamentali: una corda o notocorda dorsale, un tubo neurale dorsale, una faringe respiratoria fessurata che si continua in un intestino ventrale, e una coda muscolare.

Si tratta di organismi marini, filtratori che comprendono le classi degli Ascidiacei, Taliacei e Larvacei e sono caratterizzati da: 1) presenza di un particolare rivestimento esterno, chiamato tunica; 2) lo sviluppo della corda esclusivamente nella coda. Negli Ascidiacei e nei Taliacei, diversamente dai Larvacei, la corda viene persa, assieme alla coda, con il passaggio dallo stadio larvale a quello adulto (Berrill, 1941a,b; Milkman, 1967; Sabbadin, 1969; Burighel e Cloney, 1997). La tunica consiste di una matrice amorfa ricca di acqua, sali e componenti fibrose, che ha come componente principale la tunicina (un polisaccaride simile alla cellulosa) e contiene cellule e proteine che si legano alle fibre di tunicina. La tunica è implicata in molteplici funzioni quali rivestimento, protezione meccanica, difesa, adesione al substrato e alloriconoscimento.

### **La classe Ascidiacea**

Gli Ascidiacei rappresentano la classe di Tunicati maggiormente studiata e più ampia come numero di specie, comprendente circa duemila specie. Sono organismi bentonici, prevalentemente litorali, capaci di vivere e incrostare moli, pali e carene di navi (Berrill, 1941a,b; Milkman, 1967; Sabbadin, 1969; Burighel e Cloney, 1997); si possono trovare, inoltre, negli interstizi di sedimenti granulari e sono in grado di colonizzare, come epibionti, alghe, vegetazione sommersa, spugne, molluschi o altre ascidie. Molte specie presentano relazioni simbiotiche con altri metazoi, protozoi o procarioti che si insediano sulla superficie della o entro la tunica. Si distinguono forme coloniali, per lo più incrostanti, e solitarie, dall'aspetto sferico o cilindrico, che possono raggiungere dimensioni estremamente variabili (Burighel e Cloney, 1997). Le specie coloniali possono formare delle colonie molto estese, costituite da decine di centinaia di individui che condividono fra loro la medesima tunica e possono essere interconnessi da un sistema circolatorio comune. Tutte le ascidie sono ermafroditi simultanei, proterandri o proterogini e le forme coloniali riproducono anche per via asessuata. Sulla base della posizione delle gonadi si possono definire due ordini di ascidie: Enterogona e Pleurogona (Burighel e Cloney, 1997). Le ascidie enterogone hanno le gonadi in stretta associazione (dentro o dietro) con l'ansa intestinale, distanti dal sifone atriale e dotate di un lungo gonodotto. In queste specie, spermatozoi e uova possono essere conservati nei gonodotti prima della emissione. Nelle ascidie pleurogone le gonadi sono localizzate nella parte laterale della parete corporea e sono provviste di gonodotti corti.

### **La colonia di *Botryllus schlosseri*:**

*B. schlosseri* è un ascidia pleurogona di tipo coloniale, cosmopolita e diffusa in mari temperati poco profondi. La colonia è costituita da diversi individui chiamati blastozoidi che si dispongono a formare sistemi stellati. Il singolo zoide ha l'aspetto di un sacco più o meno allungato, su cui si individuano un sifone orale in posizione anteriore dorsale e un sifone atriale in posizione dorsale posteriore (Berrill, 1941a,b; Milkman, 1967; Sabbadin, 1969) (fig. 1). I sifoni inalanti si aprono alla periferia di ogni colonia mentre quelli esalanti confluiscono in una cloaca comune al centro del sistema (Berrill, 1941a,b; Milkman, 1967; Sabbadin, 1969).

Il flusso d'acqua che entra attraverso l'apertura orale raggiunge l'ampio cestello branchiale sul pavimento del quale è presente una doccia ventrale ciliata chiamata endostilo e considerata omologo della tiroide nei vertebrati. La parete della faringe è provvista di numerose perforazioni,

dette stigmi, disposte lungo linee orizzontali e delimitate da cellule ciliate. Il movimento delle ciglia provvede a convogliare l'acqua verso le camere atriali e successivamente all'esterno, mentre la rete mucosa secreta dall'endostilo che tappezza l'interno della faringe, intrappola le particelle alimentari e viene appallottolata dalla lamina dorsale e poi spinta lungo il tratto digestivo, composto da esofago, stomaco e intestino. Il processo di digestione, iniziato nello stomaco, prosegue nell'intestino dove si completa l'assorbimento ed il materiale residuo viene ridotto in pellet fecali, successivamente espulsi attraverso il retto. Lo stomaco presenta una conformazione circolare a sacco, caratterizzata da una parete ripiegata in diversi solchi e tasche. In particolare, si riconoscono otto solchi longitudinali e un lungo cieco pilorico ricurvo. L'intestino, inferiormente al sacco branchiale, forma un'ansa sul lato sinistro e si apre nella cavità peribranchiale, in prossimità del sifone atriale. Associata al tratto distale dell'intestino, vi è una ghiandola pilorica con funzione poco nota (Burighel e Cloney, 1997).

Alla destra dell'estremità posteriore della regione digestiva, in posizione ventrale, è presente il cuore, composto da miocardio e pericardio in forma di due tubi concentrici allungati collegati da un rafe connettivale. Il tubo esterno, (pericardio) privo di capacità contrattile, delimita la cavità pericardica mentre quello interno, rappresenta il miocardio formato da fibre muscolari striate longitudinali e circolari (Burighel e Cloney, 1997). In un blastozoido, questa struttura si origina come invaginazione di una vescicola cilindrica cava. L'emolinfa viene pompata dal miocardio, con inversioni periodiche del senso di spinta, in un sistema circolatorio aperto formato da un insieme di vasi e lacune mesenchimali sprovviste di parete propria che si continuano nella rete vascolare della tunica, la quale confluisce nel vaso marginale che corre lungo il perimetro della colonia. Da questo vaso si diramano numerose strutture a fondo cieco denominate ampolle, capaci di lente contrazioni. Ogni zoide è collegato da una vasta rete vascolare comune, che si sviluppa entro la tunica gelatinosa e trasparente che avvolge tutti gli individui della colonia (Berrill, 1941a,b; Milkman, 1967; Sabbadin, 1969).

Il sistema nervoso è composto da un ganglio cerebrale situato fra i due sifoni, immerso nel tessuto connettivo della regione mediana dorsale, e da una ghiandola neurale a stretto contatto con il ganglio in posizione ventrale. Da questo si dipartono le innumerevoli emergenze nervose, in direzione anteriore e posteriore, verso tutti i visceri (Burighel e Cloney, 1997).

Le colonie di *B. schlosseri* sono ermafrodite e acquisiscono la maturità sessuale solo dopo alcune generazioni blastogenetiche. Le gonadi sono alloggiare all'interno del mantello degli adulti e delle gemme primarie, tra l'epidermide e l'epitelio atriale, posteriormente alla regione gemmante. L'ovario è costituito da un insieme di oociti di diverse dimensioni e da un numero variabile di cellule germinali. Il testicolo è caratterizzato da una struttura a rosetta che comprende numerosi lobi bianchi opalescenti, circondati da epitelio (Sabbadin e Zaniolo, 1979). Dopo la fecondazione interna si ha una rapida embriogenesi che porta allo sviluppo di una larva natante in grado di aderire ad un substrato solido grazie alla presenza di tre papille adesive. Il passaggio a forma sessile comporta la metamorfosi in uno zoide primario, detto oozoido, capace di riprodursi asessualmente per blastogenesi, generando un'unica gemma sul lato destro del corpo. Dopo una settimana, si ha il riassorbimento dell'individuo parentale e la sua sostituzione da parte della gemma che raggiunge la maturità funzionale. La nuova generazione adulta rappresenta così il primo blastozoido della futura colonia. A partire dalla seconda generazione blastogenetica, gli zoidi producono una o due gemme per lato (Burighel e Cloney, 1997).

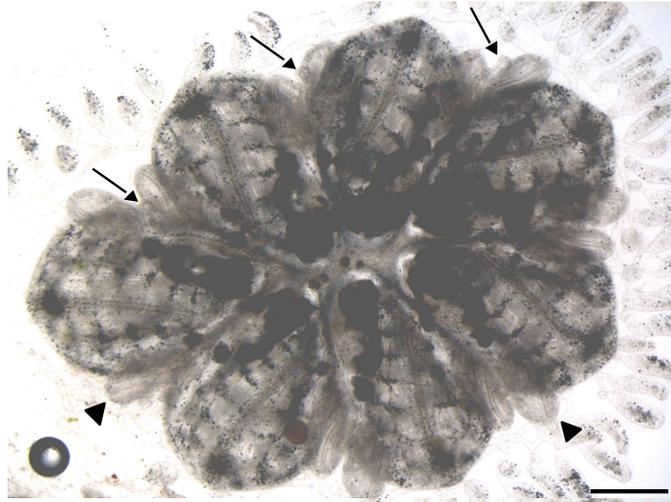


Figura 1: Colonia di *B. schlosseri*. Con le punte di freccia sono evidenziate le gemme, con le frecce le gemmule. Lunghezza della barra: 0.5 mm

**Il ciclo coloniale di *B. schlosseri*:**

In ogni colonia sono sempre presenti tre generazioni blastogenetiche (fig. 2a-b): gli zoidi adulti, le gemme primarie sugli zoidi e le gemme secondarie (gemmule) sulle gemme primarie. Ad intervalli regolari temperatura-dipendenti (una settimana a 19°C), ogni colonia va incontro ad un cambio generazionale che comporta la cessazione della filtrazione degli zoidi adulti, i quali gradualmente si contraggono e vengono progressivamente riassorbiti, la maturazione delle gemme che completano il loro sviluppo ed aprono i sifoni, e la comparsa di una nuova generazione di gemme secondarie. È, pertanto, possibile definire un ciclo coloniale blastogenetico che inizia con l’apertura dei sifoni di una nuova generazione di zoidi e termina, dopo una settimana a 19°C, con la regressione degli stessi durante il cambio generazionale. A partire dalla comparsa come gemme secondarie e fino al riassorbimento nel corso della regressione, l’intero ciclo vitale di una generazione blastogenetica è di tre settimane a 19°C (Ballarin *et al.*, 2008).

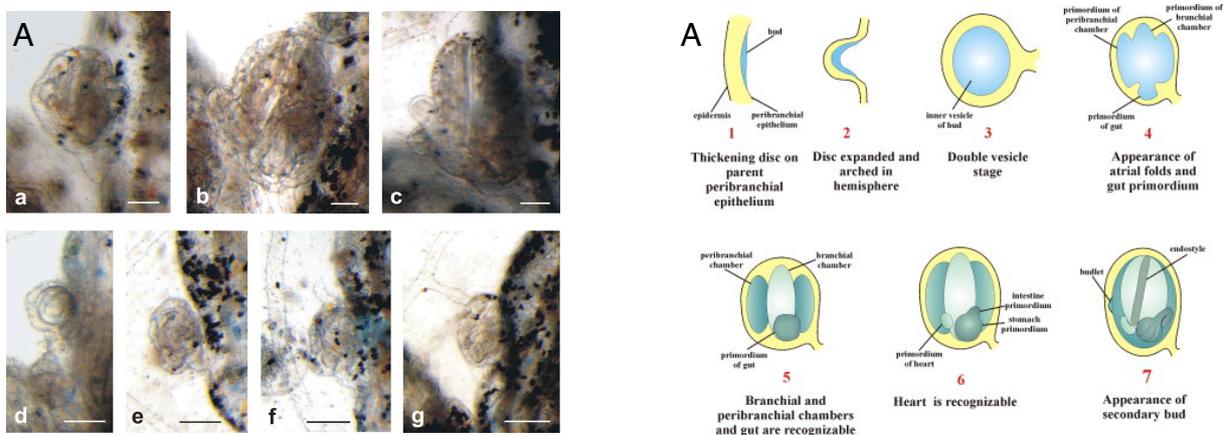


Figura 2a-b: stadi di sviluppo delle tre generazioni blastogenetiche durante il ciclo coloniale di *B. schlosseri*. a: 9/7/1; b: 9/8/2; c: 9/8/3; d: 9/8/4; e: 9/8/5; f: 9/8/6; g: 9/7/1. Lunghezza della barra in a, b, c: 2 µm; d, e, f, g: 1 µm.

Durante il ciclo coloniale blastogenetico, è possibile distinguere varie fasi, stabilite in base allo stadio di sviluppo di zoidi, gemme e gemmule. In particolare, nel metodo di stadiazione introdotto da Sabbadin (1955), gli stadi 1-6 si riferiscono alle gemme secondarie, gli stadi 7-8 a quelle primarie e gli stadi 9-11 agli adulti (fig. 2b). In questo modo, ogni fase del ciclo coloniale è indicata da una combinazione di tre numeri che corrispondono allo stadio di sviluppo delle tre diverse generazioni blastogenetiche (es. 9/7/1, 9/8/2, 9/8/3, 9/8/4, 9/8/5, 9/8/6, 11/8/6) (fig. 2a). Lo sviluppo sincrono delle tre generazioni di una colonia ad ogni ciclo blastogenetico è garantito dalla condivisione di una rete vascolare comune. Infatti, evidenze sperimentali di rimozione degli zoidi adulti con l'interruzione delle connessioni vascolari, hanno dimostrato la perdita della sincronizzazione nella blastogenesi (Watanabe, 1953; Sabbadin, 1956).

Il cambio di generazione rappresenta un evento fondamentale nella biologia di quest'animale: durante questa fase del ciclo blastogenetico chiamata regressione o take-over, della durata di 24-36 ore, si assiste ad una contrazione progressiva degli zoidi adulti, mentre le cellule tissutali vanno incontro a morte cellulare per apoptosi e vengono eliminate da fagociti circolanti, fino al completo riassorbimento del materiale senescente residuo. Il materiale digerito viene così riciclato e permette la crescita delle nuove generazioni blastogenetiche in un periodo durante il quale la colonia non può nutrirsi (Ballarin *et al.*, 2010).

Le fasi distanti più di un giorno dal cambio di generazione precedente o successivo vengono chiamate globalmente fasi intermedie (9/8/2, 9/8/3, 9/8/4). Lo stadio di sviluppo degli zoidi adulti durante la regressione viene indicato con il numero 11 e può essere suddiviso in quattro ulteriori sotto-stadi (Berrill, 1941a,b; Sabbadin, 1955) (fig. 3). Gli eventi associati a queste fasi sono, in primo luogo, una graduale contrazione dei singoli organi interni e di tutta la colonia con chiusura dei sifoni e restringimento degli zoidi ( $11^1/8/6$ ). In un secondo momento, gli zoidi si riducono ulteriormente e inizia la morte cellulare per apoptosi a livello della branchia fino a raggiungere successivamente tutto l'apparato digestivo ( $11^2/8/6$ ). Nella terza fase, un numero crescente di fagociti, capaci di ingerire materiale apoptotico, si infila nei tessuti attraversando la membrana basale ( $11^3/8/6$ ). Infine, il cuore cessa di battere definitivamente e lo zoide si riduce ad un ammasso di residui e grossi fagociti pronto per essere riassorbito ( $11^4/8/6$ ) (Burighel e Schiavinato, 1984; Ballarin *et al.*, 2010).

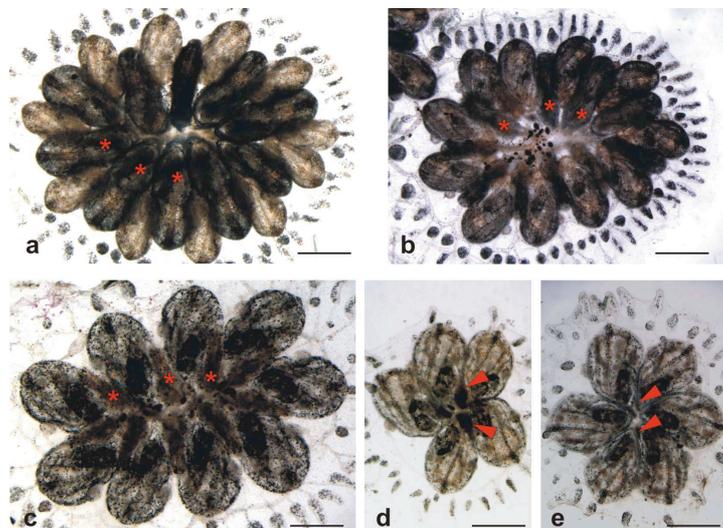


Figura 3: sequenza dei quattro stadi della regressione, individuati da Sabbadin (1955) in *B. schlosseri*, **a**: 11<sup>1</sup>; **b**: 11<sup>2</sup>; **c**: 11<sup>3</sup>; **d**: 11<sup>4</sup>. Alcuni degli zoidi in regressione sono indicati da asterischi. **e**: residui degli zoidi (punte di freccia). Lunghezza della barra: 500  $\mu$ m.

### **Gli emociti di *B. schlosseri*:**

La componente corpuscolare dell'emolinfa di *B. schlosseri* è costituita da diversi tipi cellulari che possono essere classificati in tre gruppi principali: i) cellule indifferenziate (emoblasti e cellule linfocito-simili); ii) immunociti, ulteriormente suddivisi nella linea fagocitica (amebociti ialini e cellule macrofago-simili) e in quella citotossica (amebociti granulari e cellule morulari); iii) cellule di accumulo (nefrociti e cellule pigmentate) (Ballarin e Cima, 2005; Ballarin *et al.*, 2008).

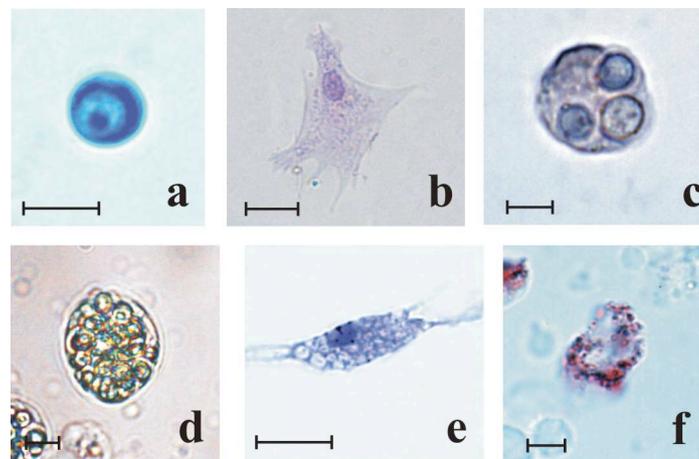


Figura 10: emociti di *B. schlosseri*. a: cellula linfocito-simile; b: amebocita ialino; c: cellula macrofago-simile; d: cellula morulare; e: amebocita granulare; f: cellula pigmentata. Lunghezza della barra: 5  $\mu$ m.

Le cellule indifferenziate (fig. 4) rappresentano la frazione minore di emociti circolanti, sono a forma sferica (4-5  $\mu$ m) con un grosso nucleo che occupa gran parte del volume cellulare e contiene uno o più nucleoli. Sembrano rappresentare i precursori delle altre cellule, capaci di differenziarsi in tutti gli altri tipi cellulari (Kawamura e Sunanaga, 2010).

Gli amebociti ialini (6-12  $\mu$ m) hanno un tipico aspetto irregolare (fig. 4), dovuto a lunghi e sottili pseudopodi che cui per i movimenti ameboidi. Nel citoplasma si riconoscono spesso vacuoli contenenti materiale ingerito, detti fagosomi (Ballarin e Cima, 2005). Gli amebociti ialini risultano più abbondanti durante gli stadi intermedi del ciclo coloniale (Ballarin *et al.*, 2008).

Le cellule macrofago-simili possiedono forma sferica (10-15  $\mu$ m) e un gran numero di vacuoli citoplasmatici, ricchi di materiale inglobato (fig. 4). Derivano dagli amebociti ialini che, dopo fagocitosi, si differenziano in cellule macrofago-simili (Ballarin e Cima, 2005). Sono diffusi soprattutto in regressione (Ballarin *et al.*, 2008).

Le cellule morulari (CM, 10-15  $\mu\text{m}$ ) sono caratterizzate da un citoplasma pieno di vacuoli che conferiscono a queste cellule un tipico aspetto a morula (fig. 4) (Ballarin e Cima, 2005). All'interno dei vacuoli sono presenti vari tipi di sostanze riducenti e di enzimi ossidativi come la pro-fenolossidasi con i polifenoli che ne costituiscono il substrato (Frizzo *et al.*, 2000). È stato dimostrato che quest'enzima è responsabile della citotossicità che si osserva quando colonie incompatibili entrano in contatto, formando delle masse necrotiche lungo i margini adiacenti (Ballarin *et al.*, 1998; Cima *et al.*, 2004). Le cellule morulari sono coinvolte nella maggior parte delle reazioni immunitarie.

Gli amebociti granulari (fig. 4) hanno forma ameboide e contengono evidenti granulazioni intracellulari che ricordano quelle delle cellule a morula, delle quali sono considerati i precursori (Ballarin e Cima, 2005).

I nefrociti e le cellule pigmentate (10-15  $\mu\text{m}$ ) sono contraddistinti da un numero limitato di vacuoli contenenti granuli di pigmenti in moto browniano (fig. 4) che determinano la colorazione specifica di ciascuna colonia. I nefrociti sono deputati all'accumulo di cataboliti azotati sotto forma di cristalli di urati (Ballarin e Cima, 2005).

### **L'apoptosi nei vertebrati:**

L'apoptosi è un processo fisiologico cruciale presente in tutti i metazoi che permette di eliminare le cellule difettose e dannose per l'organismo, garantendo così il mantenimento dell'omeostasi cellulare e di alcuni importanti eventi biologici come lo sviluppo embrionale e la regolazione del sistema immunitario. Scompensi nei meccanismi di controllo dell'apoptosi, infatti, comportano gravi conseguenze nel metabolismo umano: ad esempio una sovraregolazione dello stimolo apoptotico è connessa a disordini degenerativi come il morbo di Alzheimer, mentre bassi livelli di apoptosi sono associati a malattie autoimmuni e tumori (Thompson, 1995). Le cellule destinate a subire morte cellulare programmata tramite apoptosi, vanno incontro ad una serie di modificazioni morfologiche e fisiologiche piuttosto marcate. Questa sequenza di alterazioni prevede la perdita delle giunzioni intercellulari, la contrazione del citoplasma e la formazione di vescicole ("blebs"), la perdita dell'organizzazione strutturale della membrana plasmatica con il passaggio della fosfatidilserina nel foglietto esterno della membrana, la condensazione della cromatina nel nucleo ed infine la frammentazione della cellula in corpi apoptotici avvolti dalla membrana, contenenti residui di nucleo, organelli e mitocondri (Kaufmann e Hengartner, 2001; Taylor *et al.*, 2008).

I pathway molecolari e i fattori coinvolti nel processo apoptotico sono estremamente conservati in tutti i metazoi, dai nematodi ai vertebrati. L'attivazione di particolari enzimi, chiamate caspasi, rappresenta il punto critico del programma apoptotico. Le caspasi (cistein aspartasi) sono proteasi ricche di cisteine nel sito attivo, in grado di tagliare a livello di residui di aspartato. Vengono sintetizzate come zimogeni inattivi, privi di attività proteasica, caratterizzati da un prodominio N-terminale e da una subunità lunga (p20) e una subunità corta (p10), separate dai residui di aspartato bersaglio della loro attività catalitica (Shi, 2002). Si distinguono due classi di caspasi coinvolte nell'apoptosi: quelle iniziatrici (caspasi 8, 9 e 10), capaci di autoattivarsi e dotate di un lungo prodominio, e quelle effettrici (caspasi 3, 6 e 7), caratterizzate invece da un prodominio corto, la cui attivazione dipende direttamente dalle caspasi iniziatrici (Shi, 2002). Le caspasi effettrici sono gli enzimi effettivamente responsabili delle alterazioni cellulari che si verificano nel processo di morte. Nei vertebrati, sono state descritte due differenti vie di induzione dell'apoptosi: quella intrinseca, mitocondrio-dipendente, in cui i fattori proapoptotici Bax o Bak oligomerizzano, formando dei pori sulla membrana mitocondriale esterna, con il conseguente rilascio del Citocromo c dallo spazio intermembrana nel citoplasma (Smith *et al.*, 2008) (fig. 5). Qui, il Citocromo c si lega alla proteina

Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) che tramite un dominio specifico, detto CARD (caspase recruitment domain) interagisce con la caspasi iniziatrice 9, stimolandola ad attivarsi e formando un complesso detto apoptosoma. Una volta attivata, la caspasi 9 può tagliare la procaspasi 3, dando seguito alla cascata apoptotica (Kaufmann e Hengartner, 2001). L'altra via, detta estrinseca, si realizza attraverso l'interazione di un recettore di morte con il proprio ligando. Uno dei più noti recettori di morte è un membro della famiglia dei recettori di tipo TNF (tumor necrosis factor) ed è chiamato Fas (fig. 5). Tutti i recettori di morte condividono un dominio citoplasmatico specifico, detto dominio di morte (death domain). Il legame con il suo ligando, detto FasL, porta all'attivazione del recettore che assume una conformazione trimerica, in cui i domini di morte si attaccano ad una proteina adattatrice chiamata FADD (Fas-associated protein with a death domain), formando il complesso DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Thorburn, 2004). Un altro particolare dominio, denominato death effector domain, permette l'interazione di FADD con il prodominio della procaspasi 8 che, in questo modo, si attiva.

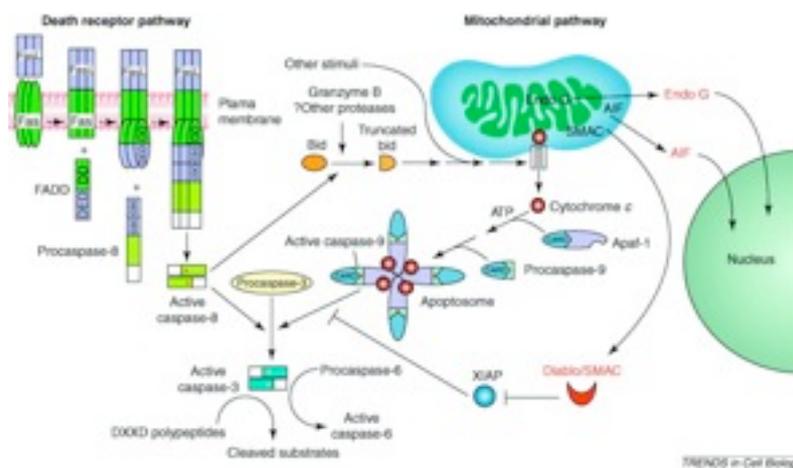


Figura 5: pathway di induzione dell'apoptosi. Da Kaufmann e Hengartner, 2001.

Tra i segnali che controllano e promuovono le due modalità di apoptosi, sono coinvolti sia componenti pro-apoptotici (Bid, Bax, Bad ecc.) che anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-x ecc.) della famiglia multigenica Bcl-2 (Smith *et al.*, 2008). Altre molecole effettrici che partecipano alle vie di induzione dell'apoptosi, sono il fattore mitocondriale AIF (Apoptosis Inducing Factor) e l'enzima PARP1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1) (Hangen *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2006). In presenza di stimolo apoptotico, PARP1 viene attivato e provoca il rilascio nel citoplasma di AIF che raggiunge il nucleo e stimola la degradazione del DNA senza il contributo delle caspasi. La distruzione progressiva della cromatina aumenta la trascrizione di PARP1 che sequestra e consuma ATP, con il risultato di produrre morte cellulare (Schreiber *et al.*, 2006). Al contrario, fattori come IAP (Inhibitor of Apoptosis) della famiglia delle proteine con dominio BIR (BIRPs), prevengono l'apoptosi, legando e disattivando le caspasi 9, 3 e 7 (Mace *et al.*, 2010).

### **Il cambio di generazione e l'apoptosi in *B. schlosseri*:**

Ad ogni ciclo blastogenetico, durante il cambio di generazione, i tessuti degli zoidi adulti delle colonie di *B. schlosseri* vanno incontro a morte cellulare per apoptosi e vengono riassorbiti da un

numero crescente di fagociti circolanti professionali che si infiltrano in essi (Ballarin *et al.*, 2010). L'eliminazione delle vecchie generazioni di zoidi è necessaria per permettere il proseguimento dello sviluppo blastogenetico delle gemme primarie e secondarie. Prove sperimentali di inibizione della fagocitosi infatti hanno dimostrato che arrestando il riassorbimento degli zoidi senescenti, si assiste ad un ritardo nella maturazione delle nuove generazioni (Voskoboynik *et al.*, 2004). Pertanto, l'avvio di ogni ciclo blastogenetico è strettamente legato all'attività fagocitica che garantisce la clearance del materiale apoptotico, così riciclato e messo a disposizione della colonia che non ha ancora i sifoni aperti e non è in grado di filtrare. D'altra parte, però, la corretta rimozione delle cellule senescenti, richiede anche il funzionamento della blastogenesi: ad esempio, esperimenti di rimozione chirurgica di tutte le gemme di una colonia, impediscono la digestione e l'utilizzo del materiale fagocitato e di conseguenza il completamento del cambio di generazione (Sabbadin, 1956; Lauzon *et al.*, 2007). Allo stesso modo, in presenza di una singola gemma, si osserva un suo aumento di dimensioni sproporzionato, in quanto unica utilizzatrice del materiale ingerito (Lauzon *et al.*, 2002). In questo caso, però, le nuove generazioni della colonia riescono a maturare e ad iniziare un nuovo ciclo blastogenetico. Il cambio generazionale rappresenta, quindi, uno stadio fondamentale del ciclo blastogenetico che, attraverso una stretta relazione tra blastogenesi e fagocitosi e l'interazione tra vecchie e nuove generazioni, porta ad una sorta di ringiovanimento della colonia.

Recentemente, numerosi studi hanno contribuito ad individuare molteplici aspetti dell'apoptosi durante la regressione in *B. schlosseri*. Attraverso l'utilizzo di vari marker molecolari, come i saggi TUNEL e cometa per evidenziare la frammentazione del DNA nel nucleo e la colorazione con Annessina-V, specifica per la fosfatidilserina, si è dimostrato che, nel corso del ciclo blastogenetico, la frazione di emociti senescenti con caratteri apoptotici sulla popolazione emocitaria totale, aumenta significativamente da un 2-5% riferito agli stadi intermedi, ad un 20-30% durante il cambio di generazione (Ballarin *et al.*, 2008). Inoltre, si osserva una variazione nella frequenza degli amebociti ialini circolanti e delle cellule macrofago-simili: i primi sono presenti negli stadi intermedi con una percentuale del 25-42% che si riduce ad un 12-25% nella regressione; nel caso delle cellule macrofago-simili responsabili della fagocitosi, si passa da un 4-10% negli stadi intermedi ad un più elevato 20-30% durante la regressione, quando tutto il materiale apoptotico viene ingerito e riassorbito (Ballarin, 2008). Al fine di garantire il turnover delle cellule senescenti eliminate dai fagociti, una nuova popolazione di cellule indifferenziate si diffonde nella circolazione durante il cambio di generazione e negli stadi iniziali del ciclo blastogenetico (Ballarin e Cima, 2005). È presumibile che queste cellule giovani tendano poi a differenziarsi proprio nei fagociti macrofago-simili, specializzati nella fagocitosi.

Analisi in immunoblot su lisati emocitari con anticorpi anti-caspasi umane, hanno evidenziato una banda di 34-kDa riconosciuta dall'anticorpo anti-caspasi 3, espressa sia negli stadi intermedi, sia nella regressione dove però aumenta di intensità (Ballarin *et al.*, 2008). Questa banda rappresenta probabilmente la forma inattiva (procaspasi) della caspasi 3. Una seconda banda di 21 kDa, corrispondente probabilmente alla caspasi 3 attivata, risulta marcata e raggiunge il suo massimo di espressione durante il cambio di generazione. Come per la caspasi 3, anche l'anticorpo anti-caspasi 7 umana, riconosce una banda oltre i 30 kDa che sembra corrispondere alla forma inattiva dell'enzima ed è sovraespressa in regressione (Cima *et al.*, 2010). Saggi immunocitochimici hanno confermato questa differenza di espressione durante il ciclo coloniale: infatti la frazione di cellule positive agli anticorpi anti-caspasi 3 e 7 risulta significativamente più elevata in corrispondenza del cambio di generazione (Cima *et al.*, 2010). Per quanto riguarda la caspasi 9, due bande sono riconosciute dall'anticorpo policlonale: una di 47 kDa che tende a diminuire di intensità durante la regressione ed una di 37 kDa che, al contrario, aumenta la sua espressione (Ballarin *et al.*, 2008). Questo particolare andamento sarebbe determinato dalla progressiva attivazione della caspasi 9 che,

durante il cambio di generazione, sostituisce la procaspasi inattiva, sintetizzata in prevalenza negli stadi intermedi. L'anticorpo anti-caspasi 8 umana, saggiato in immunoblot su omogenati di colonie, riconosce una banda di 54 kDa che in regressione perde d'intensità e scompare (Cima *et al.*, 2010). È probabile che anche in questo caso si tratti della forma inattiva della caspasi 8. Dai saggi immunocitochimici effettuati, gli amebociti ialini sono l'unica tipologia cellulare che risponde in modo positivo all'anticorpo anti-caspasi 8 (Cima *et al.*, 2010). La loro diminuzione nella popolazione emocitaria durante il cambio di generazione, sembra spiegare la mancanza di espressione della probabile procaspasi 8 nei lisati di colonie analizzati (Cima *et al.*, 2010). Tuttavia, un aumento dell'attività delle caspasi 3 e 8 è stato osservato in lisati emocitari, a livello della regressione rispetto agli stadi intermedi del ciclo blastogenetico (Cima *et al.*, 2010). Altre proteine coinvolte nelle vie di induzione dell'apoptosi sono state caratterizzate con analisi biochimiche di immunoblot su lisati di colonie. In particolare, due bande riconosciute dall'anticorpo anti-PARP, sembrano indicare la presenza di una forma attiva dell'enzima e della corrispondente tagliata. La più alta di 116 kDa è più intensa negli stadi intermedi e diminuisce sensibilmente nel cambio di generazione, mentre la seconda di 89 kDa è molto debole negli stadi intermedi e diventa maggiormente espressa in regressione (Cima *et al.*, 2010). Un forte aumento di espressione durante il cambio di generazione, è stato evidenziato anche dalle bande ottenute utilizzando anticorpi anti-FAS e FADD. Saggi citofluorimetrici e immunocitochimici con gli stessi anticorpi, hanno confermato un aumento della quantità di emociti positivi circolanti durante tale periodo (Cima *et al.*, 2010). Si tratta, per lo più di cellule macrofago-simili che durante la regressione aumentano di numero fino a rappresentare il 20% dell'intera popolazione emocitaria. Questi fagociti inglobano all'interno dei loro vacuoli le cellule senescenti e producono specie reattive dell'ossigeno come conseguenza del forte stress ossidativo indotto dalla fagocitosi. Pertanto, dopo aver svolto il loro compito, la maggior parte di queste cellule macrofago-simili sono destinate a morire per apoptosi e ad essere ingerite da altri fagociti: in questo modo, può essere spiegata la presenza di tipici tratti apoptotici come cromatina condensata nel nucleo o molecole riconosciute dagli anticorpi anti-Fas e FasL sulla membrana. Infine, analisi effettuate anche sui fattori Bcl-2 (antiapoptotico) e Bax (proapoptotico), hanno evidenziato una differenza di espressione in diversi momenti del ciclo blastogenetico: la frazione di emociti che presenta marcatura all'anticorpo anti-Bcl-2 è significativamente più alta negli stadi intermedi rispetto alla regressione, mentre si osserva una situazione opposta con l'anticorpo anti-Bax (Cima e Ballarin, 2009). A livello tissutale, la distribuzione del segnale contro questi due anticorpi mostra una simile discontinuità: in corrispondenza degli stadi intermedi Bcl-2 è espresso quasi interamente nel sistema digerente, nella faringe, nell'esofago e nell'intestino, mentre Bax rimane confinato nell'endostilo e nell'intestino prossimale. Al contrario, durante il cambio di generazione, è Bax ad essere espresso lungo tutto il tratto digestivo, mentre la marcatura per Bcl-2 tende a scomparire progressivamente (Cima e Ballarin, 2009). Lo stimolo apoptotico sembra quindi essere controllato in modo estremamente preciso, attraverso una stretta regolazione dell'espressione di queste due molecole a seconda della fase del ciclo coloniale. In definitiva, i dati finora raccolti in *B. schlosseri* sulla fase del cambio di generazione, suggeriscono che il meccanismo dell'apoptosi è altamente conservato e può realizzarsi indistintamente tramite le due classiche vie di induzione: quella estrinseca, recettore-dipendente e quella intrinseca, mitocondrio-dipendente.

### **Geni coinvolti nell'apoptosi considerati in questo studio:**

#### **- BAX:**

BAX (BCL-2 associated to X) è una proteina proapoptotica della famiglia BCL-2 che presenta tre regioni conservate note come domini BH (BCL-2 Homology Domains) (Danial, 2007; Ghibelli e

Diederich, 2010; Renault e Manon, 2011; Kushnareva *et al.*, 2012) (fig. 6). La famiglia BCL-2 è composta anche da componenti multidominio antiapoptotici (con quattro domini BH: BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, MCL-1, BCL-B, BCL-w, ecc.) e da alcune proteine “sentinella” che generalmente inducono apoptosi e sono costituite dal solo dominio BH3 (BAD, BID, BIM, NOXA, BIK, PUMA, ecc.) (Danial, 2007; Ghibelli e Diederich, 2010) (fig. 6). Tutti i componenti della famiglia BCL-2 sono coinvolti nella via intrinseca di attivazione dell’apoptosi che avviene a livello mitocondriale. I due fattori apoptotici BAX e BAK, una volta attivati, inducono la permeabilizzazione della membrana esterna del mitocondrio, portando alla formazione di un poro e permettendo alle proteine dello spazio intermembrana di raggiungere il citosol e di attivare le caspasi (Danial, 2007; Smith *et al.*, 2008). Infatti, cellule con BAX e BAK inattivati, non subiscono il rilascio del citocromo C e non sono in grado di innescare la via intrinseca dell’apoptosi (Danial, 2007). Nella via estrinseca, invece, la caspasi 8 interagisce e attiva BID, tramite taglio proteolitico. La forma tagliata di BID costituisce un potente attivatore di BAX che può iniziare la cascata di reazioni della via intrinseca, ad ulteriore sostegno di quella estrinseca (Ghibelli e Diederich, 2010). BAX può, quindi, essere espresso in entrambe le vie di induzione dell’apoptosi.

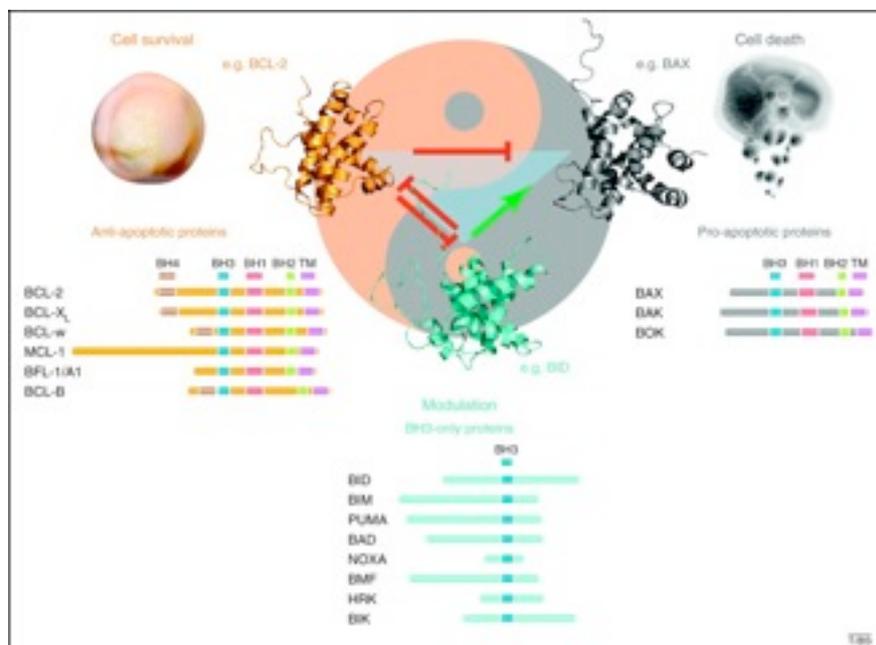


Figura 6: componenti della famiglia BCL-2. Da Walensky e Gavathiotis, 2011.

BAX è una proteina di 21 kDa, caratterizzata da nove alfa-eliche, le cui eliche 5/6 e 9 costituiscono regioni idrofobiche, tenute mascherate nella forma inattiva, impegnate nell’inserzione sulla membrana mitocondriale (Ghibelli e Diederich, 2010). L’alfa elica C-terminale 9 è coinvolta in un meccanismo critico per il trasferimento di BAX sul mitocondrio: una serie di movimenti dell’elica stessa modificano la normale conformazione in cui la tasca idrofobica formata dai tre domini BH è coperta e mascherata proprio da quest’elica. In seguito a quest’evento, la tasca corrispondente ai domini BH e la forcina idrofobica 5/6 diventano libere e possono così sviluppare interazioni di dimerizzazione e oligomerizzazione (Ghibelli e Diederich, 2010; Renault e Manon, 2011). Il

dominio rappresentato dalle eliche 5/6 è anche responsabile della formazione del poro, con le eliche 2, 3, 4 sufficienti e la 5 come unica indispensabile per l'oligomerizzazione di BAX (Ghibelli e Diederich, 2010). Nell'alfa elica 2 è presente il dominio BH3 che permette di effettuare interazioni con gli altri componenti della famiglia BCL-2, mentre l'elica 1 è il sito di legame specifico per le due proteine di tipo BH3, PUMA e la forma tagliata di BID. La sequenza proteica di BAX contiene anche due cisteine esposte che possono formare ponti disolfuro e dare luogo ad omo- ed eterodimeri, soprattutto in presenza di uno stato redox alterato, sovraccarico di agenti ossidanti (Ghibelli e Diederich, 2010). Verso la fine dell'estremità C-terminale idrofobica, si trova il residuo serina 184 che è un importante sito di fosforilazione: quando questo è fosforilato dalla protein chinasi C (PKC) zeta, BAX diventa inattivato, mentre in seguito a defosforilazione da parte della fosfatasi 2A, la regione N-terminale viene liberata, attivando così BAX (Ghibelli e Diederich, 2010; Renault e Manon, 2011). In condizioni di stress ossidativo, un altro amminoacido critico è la treonina 167, la cui fosforilazione tramite le MAPK p38/JNK stimola il trasferimento di BAX sul mitocondrio. Cellule sotto stress presentano concentrazioni ioniche alterate, come nel caso del  $Ca^{2+}$  citosolico che tende ad aumentare e a richiamare particolari cistein-proteasi, chiamate calpaine. Queste proteine sensibili ai livelli di  $Ca^{2+}$  intracellulare, inducono apoptosi, attivando BAX tramite una modalità atipica ed alternativa: eliminando con un taglio proteolitico la sua estremità N-terminale (Ghibelli e Diederich, 2010.)

La forma inattiva di BAX è una proteina solubile monomerica presente nel citosol con l'estremità C-terminale ripiegata in una tasca formata dai tre domini BH1, BH2 e BH3 (Danial, 2007; Renault e Manon, 2011). In seguito a stimolo apoptotico, BAX subisce un cambio conformazionale che espone anche l'estremità N-terminale e rilascia quella C-terminale con cui si attacca alla membrana esterna mitocondriale (fig. 7). Ulteriori monomeri di BAX si aggiungono attraverso l'estremità N-terminale, garantendo così la formazione di ampi oligomeri che fungono da canali specifici per il rilascio del citocromo C dal mitocondrio.

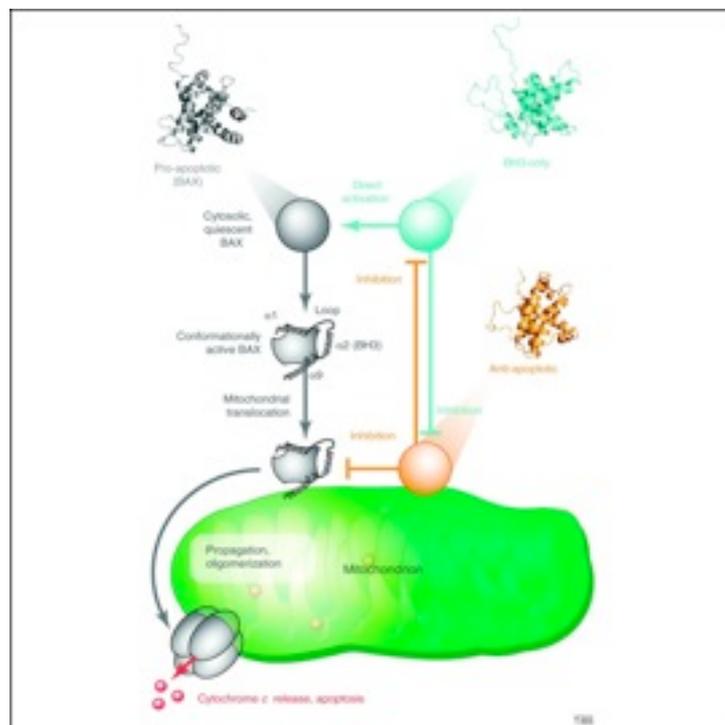


Figura 7: Meccanismo di attivazione di BAX. Da Walensky e Gavathiotis, 2011.

Diversamente, i fattori antiapoptici BCL-2 e BCL-X<sub>L</sub> intervengono a bloccare la formazione del poro da parte di BAX. Una modalità alternativa di azione prevede che la forma attiva di BAX agganciata alla membrana esterna del mitocondrio sfaldi il doppio strato lipidico portandolo alla permeabilizzazione (Danial, 2007).

Le proteine della famiglia BCL-2 controllano anche il rilascio di calcio a livello del reticolo endoplasmatico: nelle cellule sane, BCL-2 svolge la sua azione antiapoptotica, contrastando gli stimoli che portano alla perdita di Ca<sup>2+</sup>, mantenendo la concentrazione del calcio nel lume a livelli fisiologici (Danial, 2007; Ghibelli e Diederich, 2010). Tuttavia, in presenza di stimolo apoptotico, BAX si sposta sulla membrana del reticolo endoplasmatico e determina una diminuzione del Ca<sup>2+</sup> luminale, impedendo a BCL-2 di interagire con il recettore dell'inositolo-3-fosfato (IP3) e limitare la sua attivazione. L'intervento di BAX sul recettore IP3 provoca un efflusso di Ca<sup>2+</sup> in favore di un aumento di concentrazione nel mitocondrio in grado di modificare la permeabilità della membrana mitocondriale interna, fino a rigonfiarla e romperla, attraverso l'apertura di canali ad ampia conduttanza, definiti come pori di permeabilità transitoria (PTP, permeability transition pore) (Ghibelli e Diederich, 2010). Elevati livelli di Ca<sup>2+</sup>, oltre a favorire la formazione dei PTP e la conseguente dissoluzione della matrice mitocondriale, contribuiscono a scardinare il citocromo C dalla faccia esterna della membrana interna mitocondriale, alla quale si trova ancorato tramite le cardiolipine. Il citocromo C rilasciato, può a sua volta interagire con il recettore IP3, stimolandolo a prolungare la fuoriuscita di Ca<sup>2+</sup> dal reticolo endoplasmatico. In questo modo, il citocromo C riesce ad accrescere ulteriormente la sua diffusione (Ghibelli e Diederich, 2010). Insieme ai PTP, anche l'attività di altri canali viene influenzata dalle proteine della famiglia BCL-2. La proteina VDAC (voltage-dependent anion channels) o porina, presente nella membrana esterna mitocondriale, forma dei pori che consentono il passaggio di ioni e molecole (<5 kDa) dal citosol al mitocondrio. I canali VDAC sono regolati da proprietà chimico-fisiche come il voltaggio derivante dal potenziale transmembrana. Mentre BCL-2 ha un effetto inibitorio e tende a prevenire l'apertura di pori VDAC, invece BAX e BAK ne stimolano l'attivazione e li mantengono aperti, anche aumentando le dimensioni dei canali per permettere la fuoriuscita del citocromo C (Ghibelli e Diederich, 2010). Al contrario, i caratteristici pori dotati di un diametro specifico per il passaggio del citocromo C ed indicati come MAC (mitochondrial apoptosis channels), si formano solo in presenza di stimolo apoptotico via oligomerizzazione di BAX/BAK, sono composti da 9-10 monomeri, non necessitano di interazione con i VDAC e sono voltaggio indipendenti (Ghibelli e Diederich, 2010; Renault e Manon, 2011).

In presenza di segnali di morte o di sopravvivenza, proteine a singolo dominio BH3 fungono da sensori capaci di interagire con BAX o BAK, inducendo morte per apoptosi. Queste proteine BH3 sono altamente specializzate, vengono attivate esclusivamente tramite specifici segnali regolatori e rispondono in maniera differente a seconda del sito cellulare coinvolto. Due classi diverse di proteine BH3 sono state descritte: la prima comprende BID, BIM e PUMA che rappresentano i più potenti promotori dell'apoptosi, in grado di legare tutti i fattori BCL-2 antiapoptotici, mentre la seconda include NOXA e BAD che risultano più selettivi e interagiscono solo con alcuni tipi di proteine BCL-2 antiapoptotiche (Danial, 2007). L'interazione delle molecole BH3 con altri componenti della famiglia BCL-2, si realizza tramite il legame della porzione idrofobica dell'elica BH3 con la tasca idrofobica composta dai domini BH1-BH2-BH3, presente nei fattori BCL-2 pro e antiapoptotici. Sono state proposte due possibili modalità di attivazione di BAX e BAK da parte dei fattori BH3: un modello diretto ed uno indiretto. Il modello diretto considera la distinzione universalmente condivisa delle molecole BH3, dissociandone il ruolo ed il bersaglio dell'interazione a seconda della classe di appartenenza: BID, BIM e PUMA agiscono da "attivatori" che legano e attivano direttamente BAX/BAK, permettendone l'oligomerizzazione; invece BAD e

NOXA si comportano da “inattivatori” con capacità di legame limitata unicamente ai fattori antiapoptotici BCL-2, MCL-1 e BCL-X<sub>L</sub>, occupando il loro sito di legame per BAX (Danial, 2007; Ghibelli e Diederich, 2010). Secondo questo modello, normalmente gli attivatori risultano intrappolati dal legame con le proteine antiapoptotiche BCL-2. Pertanto, le condizioni favorevoli per l’attivazione di BAX si raggiungono quando la concentrazione dei fattori BH3 attivatori supera quella delle proteine BCL-2 antiapoptotiche, soppiantandone l’attività di prevenzione dal processo di morte. Inoltre, l’intervento coordinato degli attivatori con i rispettivi inattivatori che mettono fuori gioco le molecole antiapoptotiche BCL-2, aumenta la probabilità che BAX venga attivato e induca apoptosi (Danial, 2007). Il modello indiretto, a differenza di quello diretto, prevede che le proteine BH3 si leghino ai fattori antiapoptotici BCL-2 che tengono sequestrato BAX/BAK in uno stato inattivo, liberandolo e annullando l’effetto inibitorio. Al di là dei due possibili modelli, è stato dimostrato che sono sufficienti poche proteine BH3 per scatenare l’attivazione di BAX/BAK. L’interazione diretta degli attivatori BH3 con BAX appare temporanea e si esaurisce nel momento in cui BAX va incontro ad oligomerizzazione (Danial, 2007).

Recentemente, è stato descritto un altro possibile aspetto del funzionamento di BAX. In particolare, BAX è in grado di reclutare una proteina, non ancora identificata, presente sulla membrana mitocondriale esterna che viene definita come “catalizzatore” e ha la funzione di facilitare la formazione del poro mediata da BAX. L’attivazione di questo catalizzatore è indotta da BAX e si realizza attraverso l’assemblaggio di un complesso oligomerico. Una volta attivato, il catalizzatore può stimolare modificazioni al doppio strato lipidico della membrana mitocondriale, favorendo la distribuzione di BAX ed abbassando la sua soglia di concentrazione necessaria per la formazione del poro. Secondo questo modello, l’oligomerizzazione di BAX non appare più come un evento cruciale per il raggiungimento della permeabilizzazione mitocondriale che è invece scatenata da singoli monomeri di BAX attivati, inseriti nella membrana e supportati da uno specifico catalizzatore (Kushnareva *et al.*, 2012).

Dal punto di vista evolutivo, la famiglia genica BCL-2 risulta estremamente conservata, con diversi omologhi, individuati e caratterizzati nei metazoi. In alcuni organismi modello largamente studiati, questi geni apoptotici offrono uno scenario piuttosto contrastante, ma di indiscusso interesse. In *C. elegans* non è stato identificato un ortologo di BAX o BAK, mentre viene espresso l’omologo di BCL-2 (*ced9*) e di proteine BH3 (*Eg11*). Come nei mammiferi, *Eg11* interagisce con *ced9* disattivandolo e annullando il suo ruolo antiapoptotico (Renault e Manon, 2011). In *D. melanogaster*, oltre alla proteina *Debcl*, omologa di BAX, è stato recentemente isolato un ortologo della famiglia BCL-2, con attività antiapoptica (*Buffy*). Inaspettatamente, nonostante l’omologia di sequenza, *Debcl* non si comporta come BAX e non causa la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e nemmeno il rilascio del citocromo C (Galindo *et al.*, 2009; Renault e Manon, 2011). Negli insetti, a differenza dei mammiferi, questi due eventi chiave della via intrinseca dell’apoptosi, assumono un valore marginale e non risultano determinanti per l’avvio del processo apoptotico. È probabile che nel corso dell’evoluzione BAX abbia assunto un ruolo così specifico nella regolazione dell’apoptosi, in funzione esclusiva della liberazione del citocromo C (Renault e Manon, 2011). Tuttavia, altri lavori di recente pubblicazione hanno evidenziato un’origine ancora più antica per le proteine della famiglia BCL-2 e per BAX, individuati anche all’interno del phylum dei plattelminti, nelle due specie *Schistosoma japonicum* e *mansoni*, ma soprattutto nel phylum dei cnidari, in *Hydra magnipapillata* e nei metazoi più primitivi come alcune spugne (Wiens *et al.*, 2000; Wiens *et al.*, 2006; Lasi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). In questi organismi, la precisa funzione delle molecole BCL-2 presenti, rimane tuttora da caratterizzare.

Alcuni fattori BCL-2 partecipano attivamente ad altri processi cellulari, differenti dall’apoptosi, come il metabolismo del glucosio, il controllo a valle del DNA danneggiato nel ciclo cellulare e la regolazione della morfologia mitocondriale (Danial, 2007). Inoltre, diversi membri della famiglia

BCL-2 prendono parte allo sviluppo dei tumori: ad esempio, una sovraespressione di BCL-2 può inibire l'apoptosi, garantendo la persistenza delle cellule cancerogene. Al contrario, livelli di espressione anomali dei fattori proapoptotici BAX, BAD ecc., indicano un loro possibile coinvolgimento come soppressori tumorali. Sulla base di queste evidenze, sono stati sviluppati con un certo successo diversi composti che mimano il comportamento delle proteine BH3, legandosi e bloccando le componenti BCL-2 antiapoptotiche, in modo da indurre apoptosi nelle cellule maligne, senza intaccare quelle normali (Danial, 2007).

#### - AIF:

AIF (Apoptosis Inducing Factor) è stata la prima proteina mitocondriale scoperta e descritta, in grado di indurre morte cellulare senza l'apporto diretto delle caspasi (Joza *et al.*, 2009). AIF è un gene nucleare che, nei mammiferi, produce un trascritto codificante per una proteina di circa 67 kDa, contenente all'estremità N-terminale una regione detta MLS (Mitochondrial Localization Signal), essenziale per il trasferimento all'interno del mitocondrio dove poi viene tagliata e rimossa da specifiche peptidasi. Dopo aver traslocato nel mitocondrio, la proteina cambia folding, acquisendo il FAD (flavina adenina dinucleotide) come gruppo prostetico e dando origine alla sua forma matura di 62 kDa che si lega alla membrana interna mitocondriale tramite una regione transmembrana amino-terminale (Joza *et al.*, 2009; Norberg *et al.*, 2010). In presenza di stimolo apoptotico e successiva permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale, AIF viene rilasciata nel citosol come proteina solubile di 57 kDa, grazie all'intervento di una cistein proteasi che taglia ed elimina il dominio transmembrana, e poi si dirige nel nucleo dove svolge la sua azione apoptotica, promuovendo la frammentazione del DNA e la condensazione della cromatina (Cregan *et al.*, 2004; Joza *et al.*, 2009; Hangen *et al.*, 2010; Norberg *et al.*, 2010) (fig. 8). Nella normale fisiologia cellulare, AIF ha un ruolo estremamente importante nella fosforilazione ossidativa e nella regolazione dello stato redox (Joza *et al.*, 2009; Norberg *et al.*, 2010).

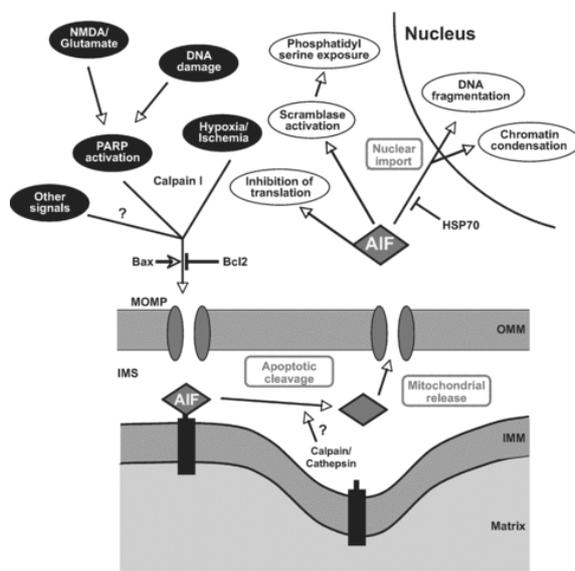


Figura 8: Apoptosi indotta da AIF. Da Joza *et al.*, 2009.

La sequenza proteica di AIF è costituita da un dominio transmembrana N-terminale, un dominio C-terminale di dimerizzazione tipico delle riduttasi FAD/NAD e due domini di tipo ossidoriduttasico

(piridin nucleotide-disolfuro ossidoriduttasi): uno di legame dell'NADH e uno più lungo che lega il FAD (Ye *et al.*, 2002).

Negli ultimi anni, la maggior parte delle pubblicazioni si è focalizzata nel tentativo di delineare in modo più chiaro la funzione di AIF nelle vie di attivazione dell'apoptosi, sfruttando il contributo fondamentale della ricerca di base in diversi organismi modelli. Ad esempio, in cellule di lievito selezionate per una delezione a livello del loro ortologo di AIF, si è osservata una parziale resistenza allo stress ossidativo, con un leggero aumento della vita media dei mutanti (Joza *et al.*, 2009). Infatti, diversi studi hanno dimostrato che l'accumulo di derivati reattivi dell'ossigeno può portare ad un'alterata sopravvivenza cellulare. In *Caenorhabditis elegans*, esperimenti di knock-down dell'ortologo di AIF, chiamato WAH-1, hanno evidenziato un ritardo nel normale programma apoptotico durante l'embriogenesi. Inoltre, il rilascio di WAH-1 dal mitocondrio al citoplasma e la sua capacità di indurre apoptosi, sono legati all'azione della caspasi *ced-3*: una sovraespressione di WAH-1, privato dell'MLS produce morte cellulare, mentre ciò non si verifica in vermi con mutazione per *ced-3*. In questo organismo, WAH-1 è quindi dipendente e funziona a valle delle caspasi (Cregan *et al.*, 2004; Joza *et al.*, 2009). Anche in *Drosophila melanogaster*, il silenziamento dell'ortologo di AIF (DmAIF) ha determinato uno sviluppo irregolare dell'embriogenesi, con una riduzione del numero di cellule apoptotiche. A differenza di altre specie, è stato riportato che DmAIF non viene rilasciato dal mitocondrio in presenza di alcuni segnali che favoriscono morte cellulare, come in seguito ad una sovraespressione del fattore proapoptotico GRIM o con esposizione ad agenti ambientali stressogeni, soprattutto radiazioni ultraviolette (Joza *et al.*, 2009). In *Drosophila*, anche il citocromo C come DmAIF rimane confinato all'interno del mitocondrio e non appare quindi coinvolto nella via intrinseca dell'apoptosi, tuttavia da studi recenti è risultato che in moscerini stimolati ad esprimere due promotori apoptotici, Reaper e Hid, il citocromo C lascia il mitocondrio e passa nel citosol. Sulla base di queste evidenze, è presumibile che il passaggio dal mitocondrio al citoplasma di entrambi citocromo C e DmAIF, sia strettamente legato al tipo di stimolo apoptotico e all'ambiente cellulare implicato (Joza *et al.*, 2009).

Grazie agli studi condotti in questi organismi, si è cercato di individuare i fattori con cui AIF interagisce, a monte e a valle dell'intera cascata di induzione dell'apoptosi. Diverse evidenze sembrano indicare una proteina detta calpaina come la probabile proteasi in grado di rimuovere la regione transmembrana di AIF che lo tiene ancorato alla membrana interna mitocondriale. Il trattamento di mitocondri isolati con Bid e calpaina I provoca il rilascio di AIF, che con l'aggiunta di calpastatina, un'inibitore della calpaina I, viene invece annullato (Joza *et al.*, 2009). Inoltre, si è osservato che la calpaina I riesce a tagliare AIF ricombinanti, dando luogo alla forma matura con funzionalità apoptotica. Il modello proposto prevede che una calpaina endogena, presente a livello dello spazio intermembrana mitocondriale, si attivi in seguito ad un segnale di variazione della concentrazione del calcio e determini il distacco di AIF ed il suo passaggio nel citosol (Joza *et al.*, 2009; Norberg *et al.*, 2010). In alcuni casi, anche un'altra classe di cistein proteasi, le catepsine, sono impegnate nel rilascio di AIF (Joza *et al.*, 2009; Norberg *et al.*, 2010).

Un importante partner di AIF è l'enzima nucleare PARP1, deputato a riparare il DNA danneggiato. Se il DNA è estremamente degradato, si attiva un processo di morte cellulare controllato da PARP1 e AIF, del tutto indipendente dalle caspasi. Numerosi esperimenti in cui sono stati impiegati degli attivatori specifici di PARP1, hanno stimolato il trasferimento di AIF dal mitocondrio al citoplasma e infine nel nucleo, dove si è verificata condensazione della cromatina ed alterazione della membrana plasmatica (Joza *et al.*, 2009). Nei topi mutanti per PARP1, le cellule corticali sono caratterizzate da AIF incapace di raggiungere il nucleo, mentre in topi mutanti che hanno subito il knock-out genico di AIF, detti *Harlequin* (*Hq*), le cellule resistono a morte cellulare indotta mediante attivatori di PARP1 (Joza *et al.*, 2009; Hangen *et al.*, 2010). Questi dati supportano la possibilità dell'esistenza di un'importante interazione fra PARP1 ed AIF nel pathway di morte

alternativo alle caspasi. Analisi effettuate in *C. elegans*, hanno messo in luce un'altra possibile interazione: l'ortologo di AIF, WAH-1, si trasferisce dal mitocondrio al nucleo insieme al fattore CPS-6 che rappresenta l'ortologo dell'endonucleasi G (EndoG) dei mammiferi (Cregan *et al.*, 2004; Joza *et al.*, 2009). L'endonucleasi G è un enzima mitocondriale che, durante il processo apoptotico, agisce da partner di AIF, traslocando nel nucleo e stimolando la frammentazione del DNA. Prove condotte sia *in vivo* che *in vitro*, hanno dimostrato che WAH-1 è in grado di attivare l'EndoG a svolgere la sua funzione di degradazione del DNA (Joza *et al.*, 2009). Un'altra proteina che con AIF ricopre un ruolo decisivo nella distruzione del DNA è la ciclofilina A (CypA), una peptidil-prolil *cis-trans* isomerasi (Hangen *et al.*, 2010; Norberg *et al.*, 2010). Esperimenti realizzati con campioni di lievito privi di CypA, hanno evidenziato che la sua espressione è essenziale per l'attività proapoptotica di AIF (Joza *et al.*, 2009). Infatti, AIF e CypA sono strettamente correlati fra loro dalla formazione di un complesso comune, senza il quale entrambi non riescono a raggiungere il nucleo.

Il coinvolgimento di AIF nel meccanismo di morte cellulare, non si limita esclusivamente alla degradazione del DNA nel nucleo, ma comprende anche altri effetti come la perdita del potenziale transmembrana mitocondriale e l'esternalizzazione della fosfatidilserina sul foglietto della membrana plasmatica. Ad esempio, recenti studi in *C. elegans*, hanno riportato che WAH-1 si lega all'enzima scramblasi 1 (SCRM-1), responsabile del trasferimento sul foglietto esterno della membrana cellulare di fosfolipidi come la fosfatidilserina e lo stimola. Inoltre, saggi con vermi mutanti per WAH-1 e SCRM-1, hanno dimostrato una riduzione nella presenza di fosfatidilserina sulla superficie delle cellule apoptotiche (Joza *et al.*, 2009). Altre analisi hanno, poi, evidenziato che AIF è in grado di interferire con l'attività della subunità p44 del fattore eucariotico di inizio della traduzione 3 (eIF3g), inibendo la sintesi proteica durante l'apoptosi, mentre in *D. melanogaster* l'ortologo di AIF forma una stretta associazione con la tioredossina 2 (DmTrx-2), una ossidoreduttasi coinvolta in reazioni redox, senza la quale DmAIF non è in grado di indurre morte cellulare (Joza *et al.*, 2009).

Nel mitocondrio, a livello fisiologico, AIF ha un ruolo fondamentale nel garantire un corretto funzionamento della catena respiratoria, in particolare regolando l'espressione del complesso I e successivamente la fosforilazione ossidativa (Joza *et al.*, 2009; Hangen *et al.*, 2010). Evidenze relative a cellule prive di AIF e topi con AIF silenziato, hanno anche indicato un possibile ruolo di AIF nella risposta allo stress ossidativo (Joza *et al.*, 2009; Norberg *et al.*, 2010). Tuttavia, questa maggiore capacità di risposta, può essere dovuta ad un'eventuale azione detossificante del complesso I, in quanto cellule prive di AIF che presentano alterazioni nel complesso I, vanno incontro ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (Joza *et al.*, 2009; Hangen *et al.*, 2010). Nonostante ciò, il potenziale ruolo di AIF come antiossidante rimane ancora da chiarire.

#### **- PARP1:**

PARP1 (poly (ADP-ribose) polymerase) è un enzima nucleare polifunzionale con il compito fondamentale di rilevare danni o lesioni nel DNA e provvedere alla sua riparazione, garantendo così l'integrità del genoma e la sopravvivenza cellulare (Schreiber *et al.*, 2006; Ba e Garg, 2011; Abd Elmaged *et al.*, 2012; Lamb *et al.*, 2012). PARP1 rappresenta, inoltre, un'importante regolatore trascrizionale ed è coinvolto in numerosi processi biologici come la replicazione del DNA, la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare (Ba e Garg, 2011). PARP1 è responsabile del processo di PARilazione (poli-adenosina difosfato ribosilazione), un meccanismo di modificazione post-traduzionale, caratterizzato dalla sintesi di polimeri di ADP-ribosio (PAR) che vengono impiegati per legare specifiche proteine nucleari (Schreiber *et al.*, 2006; Ba e Garg, 2011; Abd Elmaged *et al.*, 2012). Queste proteine bersaglio sono provviste di un motivo condiviso di legame per i PAR che è spesso situato in corrispondenza di un dominio funzionale che, con l'acquisizione

di lunghi polimeri di PAR, subisce un'alterazione della propria funzionalità originaria. La PARilazione avviene attraverso la conversione del substrato NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenina dinucleotide) ad ADP-ribosio da parte di PARP1 che poi ne stimola la polimerizzazione su proteine bersaglio accettrici (Abd Elmageed *et al.*, 2012). La superfamiglia PARP è stata descritta soprattutto nei mammiferi, in cui si distinguono 18 componenti: di questi, i più studiati sono PARP1 e PARP2 che risultano gli unici in grado di riconoscere e sistemare il DNA danneggiato (Ba e Garg, 2011; Abd Elmageed *et al.*, 2012) (fig. 9). Probabili sequenze di ortologhi, appartenenti a tutti i maggiori gruppi di eucarioti, sono stati classificati in una recente pubblicazione, mediante ricerche nei database genomici e ricostruzioni filogenetiche (Citarelli *et al.*, 2010).

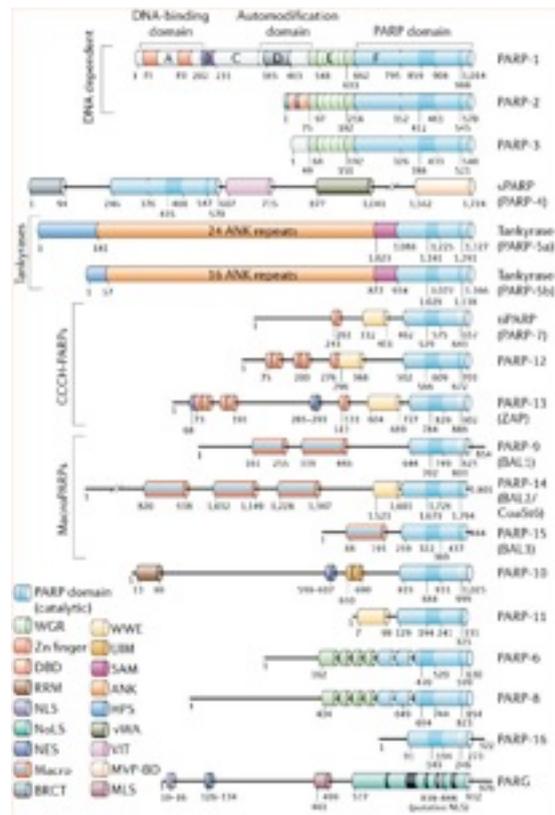


Figura 9: superfamiglia PARP nei mammiferi. Da Schreiber *et al.*, 2006.

Nell'uomo, PARP1 è una proteina di 116 kDa, composta da tre domini principali: il dominio di legame del DNA (DNA binding domain, DBD), il dominio di automodificazione (AMD) ed il dominio catalitico. La regione N-terminale DBD è formata da due motivi a dita di zinco (zinc-finger), necessari per il riconoscimento dei siti danneggiati nel doppio filamento di DNA, mentre il terzo è considerato essenziale per l'attività DNA-dipendente di PARP1 (Ba e Garg, 2011). Il dominio centrale AMD è costituito dal motivo C-terminale di sensibilità del cancro al seno che viene indicato come BRCT ed è caratteristico di molte proteine di controllo nelle varie tappe del ciclo cellulare e di quelle coinvolte nella riparazione del DNA. La regione amminoacidica dell'AMD è contraddistinta da una particolare concentrazione di residui di acido glutammico, ritenuti ipotetici siti di legame per i PAR. Secondo altri studi, gli amminoacidi che subiscono la

PARilazione sono i residui di lisina. Il dominio AMD ha il ruolo strategico di mediare le interazioni di PARP1 con altre proteine che svolgono attività di regolazione trascrizionale e aggiustamento del DNA. Questo dominio sembra anche importante per la formazione di omodimeri di PARP1 o di eterodimeri con PARP2, sebbene il meccanismo di dimerizzazione non sia ancora del tutto chiaro ed alcune pubblicazioni sostengano invece un coinvolgimento della regione N-terminale. Ad ogni modo, il processo di dimerizzazione è un evento cruciale per l'attivazione di PARP1 (Ba e Garg, 2011). Prima del dominio catalitico finale, sono presenti un motivo WGR a funzione sconosciuta, caratterizzato dai residui conservati di triptofano (W), glicina (G) ed arginina (R) ed un dominio regolatorio PARP, chiamato PRD (PARP regulatory domain), capace di accrescere l'attività di PARilazione (Lamb *et al.*, 2012). La componente C-terminale è la parte più conservata dell'enzima ed è costituita dal dominio catalitico di legame del NAD<sup>+</sup> (NAD<sup>+</sup> binding domain) che provvede alla sintesi dei PAR. In particolare, una sequenza di circa 50 amminoacidi, organizzata in un folding  $\beta$ - $\alpha$ -loop- $\beta$ - $\alpha$  e definita come il tratto distintivo di PARP (la "PARP signature"), è altamente conservata in tutti gli ortologi identificati, soprattutto a livello della triade HYE, composta dai residui amminoacidici di istidina, tirosina ed acido glutammico (Schreiber *et al.*, 2006; Ba e Garg, 2011; Lamb *et al.*, 2012). In questa triade, i primi due amminoacidi sono indispensabili per il legame con il NAD<sup>+</sup>, mentre il terzo è coinvolto nell'allungamento dei polimeri di PAR (Lamb *et al.*, 2012). In alcune proteine umane della superfamiglia PARP ed in diversi ortologi, il residuo di acido glutammico è stato sostituito da altri amminoacidi non conservati, determinando così una perdita totale o parziale della capacità di ribosilazione dell'enzima (in quest'ultimo caso, non si tratta più di poli(ADP-ribosil)azione, ma di mono(ADP-ribosil)azione) (Schreiber *et al.*, 2006). Tuttavia, sono state riconosciute e descritte anche proteine PARP, contenenti i caratteristici residui del dominio catalitico e prive di attività enzimatica.

PARP1 e PARP2 sono particolarmente noti per il loro coinvolgimento nei meccanismi di riparazione di eventuali danni nel DNA. Infatti, entrambi gli enzimi sono estremamente sensibili alla presenza di tagli o lesioni nella doppia elica di DNA, grazie ai due domini "dita di zinco" che fungono da veri e propri sensori di rotture o interruzioni nel DNA. Tali condizioni stimolano il legame di PARP ai punti danneggiati del doppio filamento e, di conseguenza, la sua attivazione e autopoli(ADP-ribosil)azione (Schreiber *et al.*, 2006). I PAR sintetizzati, si attaccano alle code N e C-terminali degli istoni H1A e H2B e, con le loro cariche negative, disturbano le interazioni di tipo DNA-proteina e proteina-proteina, favorendo il distacco degli istoni dal DNA ed il graduale rilassamento della fibra cromatinica che diventa più accessibile per il ripristino dei siti lesionati. L'azione di PARP1 permette anche alla cellula di verificare l'entità del danno e di decidere la soluzione più opportuna, optando tra la riparazione ed il salvataggio o la morte cellulare (Schreiber *et al.*, 2006). Oltre agli istoni, PARP1 è in grado di interagire e PARilare altre proteine nucleari come topoisomerasi, DNA elicasi ed i fattori di riparazione delle rotture nel singolo filamento (single-strand break repair, SSBR) e di basi tagliate (base excision repair, BER). Nonostante PARP1 e PARP2 condividano caratteristiche molto simili e, per certi versi ridondanti, sembra che PARP2 sia impegnato negli stadi più avanzati del processo di riparazione. PARP1 riveste un ruolo altrettanto importante nel mantenimento dell'organizzazione della cromatina. Ad esempio, PARP1 è stato evidenziato in *D. melanogaster* come un fattore necessario per la stabilità della struttura della cromatina durante il ciclo vitale (Schreiber *et al.*, 2006).

Alcuni fattori PARP sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare: PARP1 e PARP2 possono distribuirsi nei centromeri e sono in grado di interagire con proteine del cinetocore. È stata dimostrata anche la presenza di PARP1 e PARP3 in associazione con i centrosomi, mentre, all'interno della superfamiglia PARP, la classe delle tanchirasi rappresenta un'importante gruppo di regolatori della segregazione mitotica, controllando soprattutto la formazione e l'orientamento del fuso mitotico e la separazione dei telomeri prima dell'anafase (Schreiber *et al.*, 2006). Un altro

ambito in cui si trovano coinvolte proteine di tipo PARP è lo sviluppo. Esperimenti effettuati in topi mutanti per PARP1-2 ed in moscerini con gene PARP soppresso, hanno evidenziato nel primo caso difetti nella crescita e nel secondo mortalità larvale. Recenti analisi hanno riportato che l'ortologo di PARP3 in zebrafish è specializzato nello sviluppo ectodermico e delle creste neurali, mentre nell'ameba *Dictyostelium discoideum*, il knock-out di PARP ne arresta lo sviluppo allo stadio di pseudoplasmodio (slug stage) (Lamb *et al.*, 2012).

Una delle funzioni più importanti di PARP1 è quella di regolatore trascrizionale. Segnali di varia natura, dovuti alle condizioni fisiologiche, riescono a stimolare l'attivazione di PARP1, nonostante l'assenza di danni nel DNA. La PARilazione degli istoni ed il loro scollamento dalla cromatina, permettono l'apertura della fibra cromatinica, favorendo la trascrizione di specifici geni (Schreiber *et al.*, 2006; Abd Elmageed *et al.*, 2012). Questa particolare modalità, indipendente da rotture nel filamento di DNA, attraverso cui PARP1 viene attivato, rimane un punto del tutto irrisolto. Aldilà di questa controversia, PARP1 può intervenire nei meccanismi di trascrizione, instaurando anche interazioni dirette con cofattori e fattori di trascrizione. In dettaglio, PARP1 modula l'espressione di certi fattori di trascrizione, tra cui NFAT, p53, AP-1 e NF-κB, interferendo con le proteine deputate al loro trasporto. La PARilazione di p53, un'importante regolatore del ciclo cellulare, e di p65, un componente della famiglia NF-κB, inibisce la loro interazione con il recettore di esportazione nucleare Crm1, provocando un accumulo di p53 e p65 nel nucleo (Ba e Garg, 2011; Abd Elmageed *et al.*, 2012). Crm1 è un recettore nucleare che dirige il trasferimento di proteine dotate di una sequenza segnale, chiamata NES (nuclear export signal), dal nucleo al citoplasma. Pertanto, per effetto della PARilazione, NF-κB rimane confinato nel nucleo, raggiungendo così la sua massima capacità di trascrizione (Ba e Garg, 2011; Abd Elmageed *et al.*, 2012). PARP1 è in grado di regolare la localizzazione cellulare di altre proteine: nel caso di HMGB1, potente fattore proinfiammatorio correlato ad infiammazioni di tipo acuto o cronico, ne stimola il passaggio dal nucleo al citoplasma (sembra implicato ancora una volta Crm1, ma stavolta in maniera opposta, ovvero PARP1 promuove l'interazione di Crm1 con HMGB1); KLF8, fattore di trascrizione di tipo Kruppel, subisce PARilazione e viene estromesso dal legame con Crm1, permanendo nel nucleo (Abd Elmageed *et al.*, 2012).

Un'ulteriore funzione che inserisce PARP1 al centro di un'intensa attività di analisi, è l'induzione dell'espressione di geni infiammatori e di morte cellulare nei tessuti danneggiati. L'importanza di PARP1 si denota dal suo coinvolgimento in molte patologie, quali l'ictus, l'infarto miocardico, lo shock circolatorio ed il diabete; in malattie neurodegenerative come il Parkinson e l'Alzheimer ed in disturbi infiammatori come le allergie, l'asma, la colite ed altre ancora. In ognuno di questi casi, PARP1 si attiva ed influenza l'espressione di particolari geni coinvolti nelle risposte infiammatorie, come quelli delle citochine IL-1β e TNF-α, dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS), di molecole di adesione che facilitano l'infiammazione (E-selectina e P-selectina), ecc (Abd Elmageed *et al.*, 2012). Come già visto, PARP1 regola positivamente l'attivazione di NF-κB e di AP-1, due fattori di trascrizione che mediano la sintesi di molecole proinfiammatorie. Inoltre, se da un lato è stato dimostrato che PARP1 viene fortemente attivato mediante fosforilazione della MAPK ERK 1/2, dall'altro anch'esso partecipa alla via di trasduzione delle MAPK, modulando la fosforilazione di ERK 1/2, di p38 e della chinasi NH2-terminale di c-Jun. Diverse componenti extracellulari o intracellulari sono considerate dei possibili induttori dell'attivazione di PARP1: sostanze ossidanti, agenti DNA-alchilanti, etanolo, LPS, IL1, Ca<sup>2+</sup>, elevate concentrazioni di glucosio extracellulare, danni eccitotossici, ecc (Ba e Garg, 2011).

In un ambiente cellulare alterato da un'alta concentrazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e perossinitriti, l'incidenza di danni al DNA aumenta e porta ad una sovraespressione di PARP1, determinando una forte richiesta di NAD<sup>+</sup> e di consumo di ATP che si traduce nella morte della cellula per necrosi (Ba e Garg, 2011). Al contrario, in condizioni meno accentuate di stress

ossidativo, un'iperattivazione di PARP1 può avviare morte per apoptosi, in una modalità caspasi-indipendente, stimolando la depolarizzazione della membrana mitocondriale, la fuoriuscita del citocromo C, e quella dell'endonucleasi G e di AIF che si dirigono nel nucleo, dove eseguono la frammentazione della cromatina (Schreiber *et al.*, 2006; Ba e Garg, 2011). Numerose evidenze hanno dimostrato che l'attivazione di PARP1 è essenziale per il rilascio ed il trasferimento di AIF dal mitocondrio al nucleo (Cregan *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2006; Ba e Garg, 2011; Abd Elmageed *et al.*, 2012). Allo stesso modo, in cellule con AIF silenziato, PARP1 non è in grado di completare il processo di morte (Joza *et al.*, 2009; Hangen *et al.*, 2010). Durante l'apoptosi, a seconda del contesto cellulare, PARP1 può essere sequestrato dalle caspasi che lo inattivano, tagliandolo in due frammenti di 89 e 24 kDa. Questa reazione sembra indispensabile per il risparmio energetico a favore della classica via apoptotica caspasi-dipendente o di altri meccanismi cellulari (Cregan *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2012). In ogni caso, prove sperimentali con inibitori delle caspasi, non influenzano lo stimolo apoptotico di PARP1 ed il passaggio di AIF nel nucleo (Cregan *et al.*, 2004). Questo particolare tipo di apoptosi, sotto il controllo di PARP1, è stato descritto in molte malattie vascolari e neurodegenerative e, recentemente, in alcune cellule tumorali (Cregan *et al.*, 2004). Da diversi anni, la comunità scientifica sta intensificando gli sforzi nello sviluppo di specifici inibitori di PARP1 e AIF; alcuni di questi hanno già superato tutti i test preliminari e sono in fase di prova.

#### - BIRPs:

La famiglia di proteine BIRP (BIR domain containing proteins inhibitor of apoptosis), è caratterizzata dalla presenza di uno o più domini a dita di zinco BIR (baculovirus IAP repeat), della lunghezza di circa 70 amminoacidi (Eckelman *et al.*, 2006; Mace *et al.*, 2010). Nell'uomo sono state identificate e descritte 8 proteine di tipo IAP, alcune delle quali contengono altri domini, come XIAP (X-linked IAP) con un dominio RING (Really Interesting New Gene) che agisce da E3 ubiquitin ligasi e cIAP1 e cIAP2 (cellular IAP1 e 2) che possiedono un dominio CARD (Caspase Recruitment Domain), la cui funzione rimane ancora poco chiara (Mace *et al.*, 2010) (fig. 10).

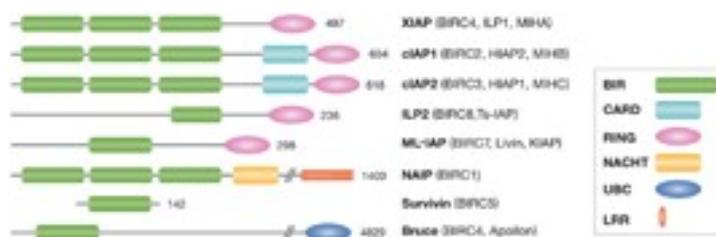


Figura 10: proteine IAP umane. Da Eckelman *et al.*, 2006.

La funzione che ha reso note queste proteine è la capacità di legare le caspasi e, nel caso di XIAP, annullarne l'azione che determina morte cellulare (Eckelman *et al.*, 2006). Nel corso degli ultimi anni, oltre all'attività antiapoptotica, è emerso il loro coinvolgimento in altri processi biologici come l'immunità, la risposta allo stress, l'infiammazione, la sopravvivenza e la divisione cellulare (Mace *et al.*, 2010). Inoltre, uno degli aspetti delle proteine IAP che richiama maggiormente l'interesse della comunità scientifica è la sovraespressione nelle cellule tumorali che permette la crescita e l'avanzamento della metastasi.

## - NF- $\kappa$ B1:

NF- $\kappa$ B è un fattore di trascrizione che controlla molti processi cellulari fondamentali, regolando un gran numero di geni coinvolti nell'immunità, nello sviluppo e nel differenziamento, nella risposta allo stress, nella sopravvivenza cellulare e nell'apoptosi (Kucharczak *et al.*, 2003; Ghosh e Hayden, 2008; Siomek, 2012). Nei mammiferi, la famiglia NF- $\kappa$ B è composta da cinque proteine che possono essere distinte in due sottofamiglie: quelle di tipo I comprendono p65 (RelA), RelB e c-Rel, mentre sono di tipo II NF- $\kappa$ B1 (p50 ed il precursore p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52 ed il precursore p100) (Kucharczak *et al.*, 2003; Ghosh e Hayden, 2008; Siomek, 2012) (fig. 11). Tutte sono caratterizzate dal dominio N-terminale Rel-omologo (RHD, Rel Homology Domain) che contiene una regione per il legame del DNA, una di dimerizzazione ed un motivo di localizzazione nucleare (NLS, Nuclear Localization Signal) (Siomek, 2012). Questo dominio permette la formazione di omodimeri o eterodimeri con gli altri NF- $\kappa$ B capaci di traslocare nel nucleo, dove si legano nei promotori dei geni bersaglio su elementi specifici, detti sequenze I $\kappa$ B (Kucharczak *et al.*, 2003; Siomek, 2012). Le proteine Rel possiedono un dominio C-terminale di attivazione della trascrizione (TAD), a differenza di NF- $\kappa$ B1 e NF- $\kappa$ B2 che sono privi di TAD e hanno un dominio inibitorio di motivi ripetuti anchirinici. I due fattori di tipo II condividono il dominio anchirinico con la famiglia I $\kappa$ B, di cui fanno parte gli stessi precursori p105 e p100 e le sei proteine I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\zeta$ , BCL-3 e I $\kappa$ BNS (NF- $\kappa$ B $\delta$ ).

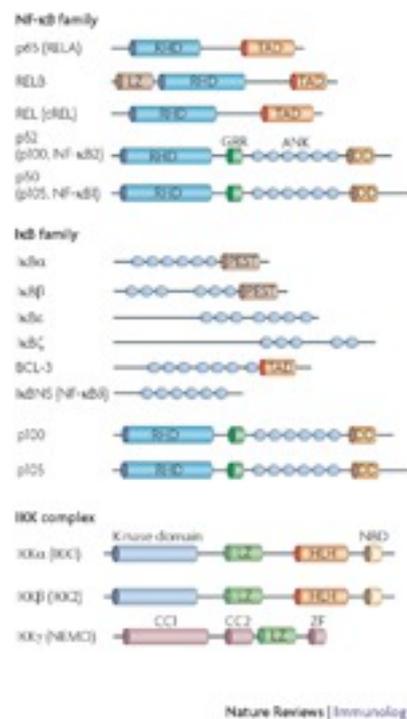


Figura 11: famiglia NF- $\kappa$ B nei mammiferi. Da Ghosh e Hayden, 2008.

Nella forma inattiva, i dimeri NF- $\kappa$ B sono bloccati nel citoplasma dall'interazione con I $\kappa$ B $\alpha$  che lega il dominio RHD attraverso il suo dominio anchirinico, mascherandone l'NLS (Kucharczak *et al.*, 2003; Ghosh e Hayden, 2008; Siomek, 2012). L'attivazione delle proteine NF- $\kappa$ B avviene

secondo tre modalità: canonica, non-canonica e atipica. La prima può essere stimolata dalle citochine  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta/IL-6$ , dai lipopolisaccaridi dei batteri (LPS), dal DNA danneggiato, dall'attivazione dei recettori TLR (Toll-Like Receptors) e dai ROS (Siomek, 2012). Nella via canonica, il reclutamento della chinasi IKK specifica per I $\kappa$ B, formata dalle tre subunità IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , entrambe con attività catalitica e IKK $\gamma$  (chiamata anche NEMO) regolatoria, provvede alla fosforilazione (in questo caso, da parte di IKK $\beta$ ) e alla successiva ubiquitinazione di I $\kappa$ B $\alpha$ . Solo dopo la sua degradazione da parte del proteasoma, l'eterodimero di NF- $\kappa$ B, solitamente p65-p50, diventa attivo e può dirigersi nel nucleo per avviare la trascrizione (fig. 12). L'attività di NF- $\kappa$ B va incontro ad un meccanismo di autoregolazione, promuovendo l'espressione di I $\kappa$ B $\alpha$  che nel nucleo rimuove p65-p50 dai siti I $\kappa$ B del DNA e lo riporta nel citoplasma, inattivandolo (Kucharczak *et al.*, 2003; Ghosh e Hayden, 2008; Siomek, 2012).

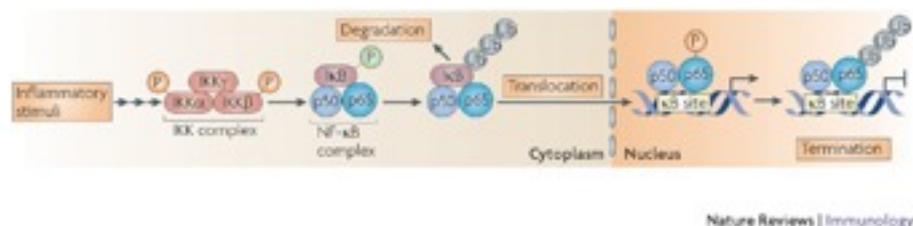


Figura 12: modalità canonica di attivazione di NF- $\kappa$ B. Da Ghosh e Hayden, 2008.

La via non-canonica è indotta perlopiù dalla famiglia di recettori del fattore di necrosi tumorale TNFR, come il recettore della linfotossina- $\beta$ ,  $LT\beta R$  ed il recettore del fattore di attivazione delle cellule B, BAFF. In questo pathway, è coinvolto solo IKK $\alpha$  che deve essere attivato dalla chinasi di induzione di NF- $\kappa$ B, NIK (NF- $\kappa$ B-inducing factor kinase), a sua volta controllata dalle proteine associate al recettore di  $TNF\alpha$ , TRAF, in particolare TRAF3. La via non-canonica porta al taglio proteolitico di p100 nella forma attiva p52 che forma un eterodimero con RelB (Kucharczak *et al.*, 2003; Ghosh e Hayden, 2008; Siomek, 2012). L'ultima via di attivazione, quella atipica, non richiede il coinvolgimento di nessuna subunità di IKK e viene innescata dall'ipossia, dai raggi UV, dai perossidi di idrogeno e dalla stimolazione del recettore della tirosin chinasi. Quest'ultima fosforila le tirosine di I $\kappa$ B che finisce degradato dal proteasoma (Siomek, 2012).

NF- $\kappa$ B1 e NF- $\kappa$ B2 mancano del dominio TAD e devono essere processati dal proteasoma per la conversione nelle forme mature p50 e p52, in grado di formare dimeri (Kucharczak *et al.*, 2003; Ghosh e Hayden, 2008; Siomek, 2012). Entrambi i precursori p105 e p100, dopo il dominio N-terminale RHD, contengono un motivo ricco di glicine che costituisce un segnale di stop per l'azione del proteasoma, un dominio C-terminale di sette anchirine ripetute ed infine un dominio di morte che favorisce l'interazione con IKK (Pereira e Oakley, 2008). L'omodimero p50-p50 è l'unico che può legare il DNA nucleosomiale: nelle cellule in condizioni normali, il suo legame con il DNA, in associazione con l'istone deacetilasi 3 (HDAC3), inibisce la trascrizione promossa dai fattori NF- $\kappa$ B. In seguito a stimolazione cellulare da parte di  $TNF\alpha$  o LPS, dimeri con p65 legati alla proteina di legame di CREB, CBP, provocano la dissociazione dell'omodimero di p50 e HDAC dal DNA, permettendo l'attivazione della trascrizione (Pereira e Oakley, 2008). Similmente, anche il fattore BCL-3 della famiglia I $\kappa$ B può garantire la trascrizione, tramite il distacco degli omodimeri di p50 e p52. Allo stesso tempo, BCL-3 può fungere da attivatore degli omodimeri di p50 e p52, con i quali forma un complesso stabile a livello del DNA, attivando la trascrizione grazie al suo dominio TAD. Infine, può agire da corepressore, aumentando l'affinità del legame tra l'omodimero

inattivo p50-p50 ed il DNA che impedisce la trascrizione (Ghosh e Hayden, 2008; Pereira e Oakley, 2008).

A seconda dei casi, NF- $\kappa$ B può contribuire alla sopravvivenza cellulare o promuovere morte per apoptosi. L'interazione delle caspasi inattive con i dimeri di NF- $\kappa$ B, favorisce la trascrizione, mentre durante l'apoptosi indotta da TNF $\alpha$ , le caspasi attivate mediante processamento proteolitico inibiscono l'attività di NF- $\kappa$ B, tagliando sia IKK $\beta$ , sia I $\kappa$ B che in questa forma tronca risulta ancora più stabile e capace di trattenere NF- $\kappa$ B nel citoplasma. In altri contesti, TNF $\alpha$  può stimolare NF- $\kappa$ B alla sovraespressione di cIAP1 e cIAP2 e TRAF1 e TRAF2 che inibiscono l'apoptosi (Kucharczak *et al.*, 2003; Baldwin, 2012).

Nella via apoptotica recettore-dipendente, la procaspasi 8 viene attivata dalle proteine inibitrici c-FLIP, l'espressione delle quali è sotto il controllo di NF- $\kappa$ B che può così prevenire l'apoptosi indotta dal recettore di morte FAS (Kucharczak *et al.*, 2003; Pereira e Oakley, 2008; Baldwin, 2012). In condizioni di stress ossidativo, NF- $\kappa$ B protegge dall'eccesso di ROS, aumentando la trascrizione della ferritina e della Mn-SOD mitocondriale (Kucharczak *et al.*, 2003; Baldwin, 2012). Livelli elevati di perossidi di idrogeno possono, tuttavia, scatenare morte cellulare tramite NF- $\kappa$ B che reprime l'espressione delle proteine antiapoptotiche BCL-2 e XIAP, a favore di TNF $\alpha$  e del ligando di FAS, FASL (Baldwin, 2012).

Negli invertebrati, *D. melanogaster* possiede tre proteine NF- $\kappa$ B: due di tipo REL, chiamate DIF e Dorsal, i cui geni sono il risultato di duplicazione e quella di tipo II, Relish che contiene il dominio RHD e quello C-terminale anchirinico (Ganesan *et al.*, 2011; Gilmore e Wolenski, 2012). Relish non viene attivato come p105 e p100 tramite degradazione proteasomiale di Cactus, omologo di I $\kappa$ B, ma dal taglio endoproteolitico della caspasi DREDD che genera due frammenti: quello N-terminale con il dominio RHD trasloca nel nucleo ed attiva la trascrizione di geni specifici, l'altro C-terminale rimane nel citoplasma (Kucharczak *et al.*, 2003; Ganesan *et al.*, 2011; Gilmore e Wolenski, 2012). I tre NF- $\kappa$ B di *Drosophila* formano dimeri e partecipano nella risposta immunitaria, regolando l'espressione di diversi peptidi antimicrobici. In particolare, DIF e Dorsal sono coinvolti nel pathway basato sui recettori TLR, indotto da funghi e batteri GRAM-positivi, mentre Relish in quello IMD di immunodeficienza, stimolato dai batteri GRAM-negativi (Ganesan *et al.*, 2011; Gilmore e Wolenski, 2012).

### **Proliferazione e differenziamento in *B. schlosseri*:**

Ad ogni ciclo blastogenetico, la colonia di *B. schlosseri* è coinvolta in un'intensa attività di proliferazione con le gemme che, da semplici primordi, si accrescono e diventano le nuove generazioni adulte, rigenerando tutti i tessuti e gli organi interni. Questo tipo di riproduzione asessuata mediante gemmazione, è resa possibile dalla presenza negli zoidi di una regione ben definita dell'epitelio atriale, a carattere multipotente. In corrispondenza di questo territorio, sull'epidermide della parete peribranchiale della gemma primaria, si sviluppano inizialmente degli ispessimenti - gli abbozzi delle future gemme secondarie - che negli stadi successivi, formano delle evaginazioni a forma di semisfera, fino a richiudersi in una doppia vescicola sferica cava (Manni *et al.*, 2007). Lo sviluppo delle gemme secondarie che da semplici abbozzi raggiungono rapidamente la complessità organizzativa e strutturale delle gemme primarie, è regolato dal forte tasso di proliferazione presente nell'epitelio atriale parentale e nella doppia vescicola. In questi siti, cellule somatiche multipotenti dell'epitelio peribranchiale e cellule mesenchimali del mantello, vanno incontro a continue divisioni (Ballarin e Manni, 2009). Nello stadio di doppia vescicola, la vescicola interna, derivante dall'epitelio atriale multipotente, ha un alto potere rigenerativo: è, infatti, in grado di costruire la maggior parte degli organi, tra cui la camera branchiale ed atriale, il faringe ed il sistema nervoso, mentre lo strato intermedio tra le due vescicole, di tipo mesenchimale, dà origine agli emociti, al cuore, alle gonadi ed alla muscolatura (Ballarin e Manni, 2009).

L'esistenza di cellule multipotenti altamente specializzate, capaci di contribuire allo sviluppo incessante di nuove generazioni di zoidi, è stata supportata nel corso degli anni da numerose evidenze (Laird e Weissman, 2004; Voskoboynik *et al.*, 2008). La telomerasi è un'enzima che preserva le estremità cromosomiali accorciate dalla continua attività mitotica, aggiungendo a livello dei telomeri delle brevi sequenze di DNA non codificante. Viene espressa ad alti livelli in diversi tipi di cellule staminali e progenitrici, mentre è assente in quelle quiescenti ed in via di differenziamento (Greider, 1998). Proprio per questa sua specificità, è considerata ed ampiamente utilizzata come marcatore di staminalità. In *B. schlosseri*, misurazioni dell'attività della telomerasi sono stati effettuati sia su tessuti germinali e su tutti gli stadi dell'embriogenesi, sia su colonie, prive di gonadi, nei vari stadi del ciclo blastogenetico. I valori ottenuti risultano molto elevati nei campioni germinali, mentre in quelli relativi alla blastogenesi si osserva un andamento che ricalca in pieno gli eventi morfogenetici più significativi del ciclo (Laird e Weissman, 2004). Prevedibilmente, il livello più alto è stato registrato nella gemma primaria al momento della formazione degli abbozzi delle gemme secondarie. Addirittura, qualche giorno precedente, quando ancora non sono presenti i primordi delle nuove gemme, si possono già rilevare cellule in divisione nella gemma parentale. Nelle gemme secondarie, la telomerasi comincia a crescere allo stadio di doppia vescicola e raggiunge un picco durante l'organogenesi che si verifica negli stadi successivi. Mano a mano che le gemme secondarie completano il loro sviluppo, l'attività della telomerasi nelle gemme primarie si stabilizza, fino a ridursi ed esaurirsi con il loro passaggio a nuova generazione adulta. Il ruolo di protezione della telomerasi diventa così essenziale per le cellule multipotenti o staminali che sono costrette a dividersi continuamente per riformare *de novo* le giovani generazioni di una colonia (Laird e Weissman, 2004). La diffusione dell'attività proliferativa nei vari stadi del ciclo blastogenetico, è stata studiata particolarmente nella specie giapponese *Botryllus primigenus*, con saggi di frequenza delle figure mitotiche e analisi dell'indice di marcatura con BrdU (5-bromo-2'-deossiuridina) (Kawamura *et al.*, 2008). Come negli esperimenti con la telomerasi, le percentuali più alte di cellule in divisione si concentrano allo stadio di completo sviluppo delle gemme secondarie. Allo stesso modo, con il loro passaggio a gemme primarie, la frequenza decresce progressivamente e si azzerava nel momento in cui divengono adulti, tranne per qualche eccezione. Infatti, anche negli zoidi adulti sono state evidenziate alcune regioni con attività mitotica: i vasi longitudinali del faringe, l'epitelio prefaringeo e l'estremità posteriore dell'endostilo

(Kawamura *et al.*, 2008). Analogamente, è stato dimostrato che l'endostilo di *B. schlosseri*, è un organo caratterizzato da una cospicua attività proliferativa di cellule somatiche staminali e di cellule circolanti nei suoi seni sottoendostilari. Questi precursori capaci di dividersi e dar luogo ad altri tipi cellulari, migrano all'esterno dell'endostilo e si disperdono nei rispettivi siti di competenza, dove si differenziano (Voskoboynik *et al.*, 2008). Le stesse cellule circolanti in proliferazione sono state identificate nei seni emolinfatici degli zoidi di *B. primigenus*, a livello dell'endostilo, della faringe e dello stomaco. Si tratta di cellule indifferenziate, degli emoblasti in grado di differenziarsi in vari tessuti, come cellule germinali, cellule muscolari ed epitelio atriale multipotente (Kawamura *et al.*, 2008). In *B. schlosseri*, la presenza di simili cellule staminali circolanti è suggerita dal ricambio della popolazione emocitaria che avviene durante la regressione. In questo stadio, il 20-30% degli emociti è soggetto a morte per apoptosi e viene eliminato grazie alla presenza di un numero crescente di fagociti granulari, macrofago-simili. Al termine del cambio di generazione, la loro frequenza si riduce sensibilmente e lascia spazio ad un incremento dei fagociti ameboidi (Ballarin *et al.*, 2008). Questo cambiamento di popolazione cellulare è dovuto alla sostituzione, al momento della regressione, delle cellule senescenti inglobate dai fagociti con una nuova riserva di cellule staminali multipotenti, capaci di dividersi e differenziarsi nei vari tipi cellulari. Inoltre, la comparsa di queste cellule indifferenziate con morfologia tipica degli emoblasti, coincide con l'inizio di un nuovo ciclo di rigenerazione che porta alla crescita di nuove gemme secondarie e primarie (Ballarin e Manni, 2009). La capacità di ricostituire la morfogenesi e lo sviluppo blastogenetico delle diverse generazioni di individui di una colonia, a partire da emoblasti circolanti totipotenti, è dimostrata da un particolare tipo di gemmazione, quella vascolare, diffusa soprattutto in altre ascidie, come *B. primigenus* e *Botrylloides leachi* (Oka e Watanabe, 1957; Rinkevich *et al.*, 1995). Nelle colonie di *B. schlosseri*, la gemmazione vascolare viene indotta per asportazione di tutti gli zoidi, comprese le gemme, lasciando intatto il sistema circolatorio con i vasi e le ampolle nella tunica. Dopo una serie di fasi, le gemme vascolari sono in grado di formare un'intera colonia composta da gemme e zoidi funzionalmente maturi (Sabbadin *et al.*, 1975). Lo sviluppo delle gemme vascolari ha diversi aspetti in comune con quello delle gemme palleali: ad esempio, entrambe le gemme sono caratterizzate da uno stadio di doppia vescicola. Nel caso delle gemme vascolari, la vescicola esterna deriva dall'epitelio dei vasi della tunica (in continuità con gli zoidi, prima della loro rimozione), mentre quella interna da cellule del sangue totipotenti, probabilmente emoblasti (Ballarin e Manni, 2009). Ulteriori evidenze a sostegno dell'esistenza di cellule indifferenziate totipotenti, sono testimoniate dai risultati degli esperimenti di parabiosi tra colonie geneticamente compatibili (Sabbadin e Zaniolo, 1979; Laird *et al.*, 2005). Quando due colonie vengono posizionate con le loro estremità adiacenti le une alle altre, possono contattarsi e fondere la tunica e i vasi associati, se le due colonie condividono almeno un allele in comune al locus di istocompatibilità (Sabbadin e Zaniolo, 1979). La fusione fra due sistemi determina il passaggio da una colonia all'altra di cellule circolanti totipotenti che entrano in competizione per acquisire il controllo dello sviluppo della nuova colonia "chimerica", finché la popolazione cellulare con fitness migliore non prende il sopravvento. In assenza di concordanza allelica, le due colonie non si fondono, ma reagiscono stimolando una risposta infiammatoria che porta alla formazione di masse necrotiche nelle zone di contatto (Sabbadin e Zaniolo, 1979). Questo fine meccanismo genico di regolazione, garantisce il mantenimento della variabilità genotipica di colonie non imparentate che, altrimenti, sarebbero preda di un parassitismo somatico e/o germinale (Laird *et al.*, 2005). Le colonie che sono state fuse, possono tramandare le cellule indifferenziate originarie dell'ex parabionte da una generazione all'altra, anche dopo numerosi incroci (Sabbadin e Zaniolo, 1979). Recentemente, l'utilizzo di tecniche più avanzate, come il trapianto di cellule marcate in modo specifico, nel sistema vascolare di colonie compatibili, ha permesso di riconoscere cellule staminali multipotenti, in grado di dare origine sia alle cellule somatiche sia a quelle germinali (Laird *et al.*, 2005). L'ipotesi più probabile è

che siano coinvolte due popolazioni indipendenti di cellule staminali, ognuna delle quali specializzata nel differenziamento della linea somatica o germinale. Inoltre, è possibile che queste due popolazioni distinte di cellule indifferenziate, siano a loro volta il prodotto di un unico gruppo basale di cellule staminali totipotenti (Laird *et al.*, 2005).

### **Geni coinvolti nella proliferazione considerati in questo studio:**

#### **- PCNA:**

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) è un componente del sistema di replicazione del DNA nella cellula: tre monomeri di PCNA formano una struttura ad anello che circonda la doppia elica di DNA in cooperazione con il fattore di replicazione C (RFC) (Köhler *et al.*, 2005; Moldovan *et al.*, 2007) (fig. 13). PCNA è in grado di aumentare la processività della DNA polimerasi  $\delta$  ed  $\epsilon$ , mantenendole ancorate al filamento stampo di DNA ed è inoltre coinvolta in meccanismi di riparazione del DNA e controllo del ciclo cellulare (Moldovan *et al.*, 2007). È stato dimostrato che la trascrizione di PCNA è strettamente correlata con le diverse fasi del ciclo cellulare: comincia infatti nel tardo G1, raggiunge un picco nella fase S e diminuisce nella fase G2/M (Celis e Celis, 1985; Bravo e MacDonald-Bravo, 1987). Grazie alla caratteristica di essere espresso esclusivamente nelle cellule in divisione e non in quelle quiescenti, PCNA è ampiamente utilizzato come marcatore di proliferazione cellulare nelle analisi cliniche per la prognosi di tumori (Köhler *et al.*, 2005). Sequenze omologhe di PCNA sono state isolate nei metazoi, nelle piante, nei funghi, nei protisti e nei procarioti (Aves *et al.*, 2012). In zebrafish è particolarmente sintetizzato a livello del tessuto ematopoietico e di particolari precursori cellulari (Leung *et al.*, 2005).

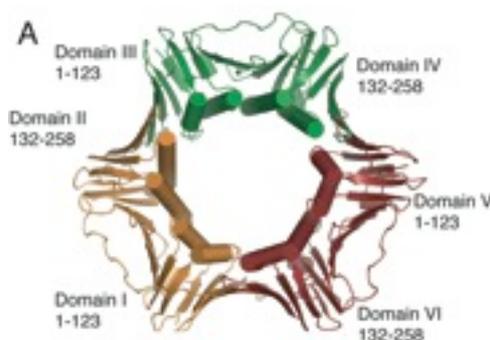


Figura 13: complesso trimerico ad anello di PCNA. Da Kazmirski *et al.*, 2005.

#### **- KI67:**

KI67 è una proteina nucleare che alla pari di PCNA costituisce uno dei più diffusi e comuni marcatori clinici per la diagnosi e la prognosi di tumori (Brown e Gatter, 2002). KI67 viene espresso nelle fasi attive del ciclo cellulare e non in cellule in via di differenziamento, in particolare dalla fase G1 iniziale alla fase G2 è presente nella corteccia nucleolare e nei componenti fibrillari del nucleolo, mentre con il passaggio alla fase di mitosi diventa strettamente associato con la periferia dei cromosomi condensati (Endl e Gerdes, 2000; Brown e Gatter, 2002; Saiwaki *et al.*, 2005). Le variazioni nella distribuzione di KI67 durante il ciclo cellulare sembrano essere regolate da reazioni di fosforilazione e defosforilazione: nella fase di mitosi KI67 è iperfosforilata e non è in

grado di legare il DNA, mentre durante l'interfase ha capacità di legame (Endl e Gerdes, 2000; Saiwaki *et al.*, 2005).

Analisi effettuate tramite microiniezione di anticorpi contro KI67 e oligo antisense in cellule umane e di topo, hanno dimostrato che questa proteina è necessaria per il completo svolgimento del ciclo cellulare, probabilmente con un ruolo nella regolazione della struttura della cromatina (Schlüter *et al.*, 1993; Starborg *et al.*, 1996). Tuttavia, la sua funzione precisa non è ancora del tutto chiara (Saiwaki *et al.*, 2005).

#### - Nanos:

Nanos è una proteina di derivazione materna, capace di interagire con specifiche sequenze, dette NRE (nanos responsive element), presenti nelle regioni 3' UTR di alcuni trascritti bersaglio. Il legame con questi messaggeri stimola la loro inattivazione, bloccandone la traduzione (Hashimoto *et al.*, 2010). La struttura amminoacidica di Nanos è caratterizzata da una regione N-terminale, estremamente variabile e da un dominio C-terminale molto conservato, composto da due motivi zinc-finger ripetuti (CCHC) (Hashimoto *et al.*, 2010) (figura 14). È stato identificato per la prima volta in *Drosophila* dove ha un ruolo regolativo nello sviluppo embrionale dell'addome posteriore e nello sviluppo delle cellule germinali primordiali (Lehmann e Nüsslein-Volhard, 1991; Hayashi *et al.*, 2004). Tuttavia, la funzione più rappresentativa e maggiormente conservata in tutti gli omologhi di Nanos, è il controllo del destino della linea germinale staminale. In particolare, Nanos regola la migrazione e la sopravvivenza delle cellule germinali primordiali (primordial germline cells, PGC) durante l'embriogenesi, permettendo un corretto sviluppo nell'individuo adulto di cellule germinali funzionali e gonadi. In seguito alla formazione degli organi sessuali, il ruolo di nanos è finalizzato al mantenimento delle cellule germinali staminali (germline stem cells, GSC) in una condizione di totipotenza, senza possibilità di differenziamento (Wang e Lin, 2004; Shen e Xie, 2010).

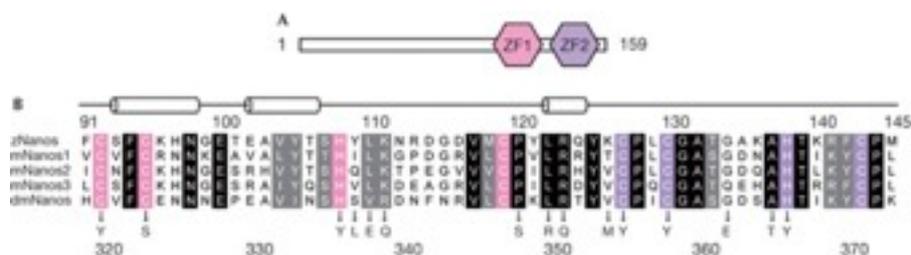


Figura 14: struttura del dominio Nanos nei vertebrati. Da Hashimoto *et al.*, 2010.

### **Lo stress ossidativo:**

L'evoluzione del metabolismo aerobio ha spinto la maggior parte degli organismi eucarioti ad affrontare gli svantaggi derivanti dal forte carattere ossidante dell'ossigeno, sviluppando un sistema interno in grado di mantenere l'omeostasi redox. L'ossigeno molecolare è di natura estremamente tossico, soprattutto ad elevate concentrazioni, ma risulta dannoso per la cellula anche in condizioni normali. Fortunatamente, allo stato basale, la sua tendenza ad accogliere un altro paio di elettroni, è ostacolata dall'orientamento parallelo dei due elettroni spaiati che lo compongono (Benzie, 2000; Halliwell, 2006). Questa limitazione, ne trattiene bassa la reattività, permettendo alla cellula di sfruttarlo come accettore finale nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. Infatti, alla fine del processo di respirazione, l'ossigeno acquista quattro elettroni dall'enzima citocromo ossidasi, producendo due molecole d'acqua (Halliwell, 2006). La citocromo ossidasi è il complesso IV terminale della catena respiratoria ed è costituita da quattro componenti redox: due centri con ioni rame e due gruppi prostetici eme, contenenti ferro, ognuno dei quali può incamerare un'elettrone alla volta (McCord, 2000). L'enzima interagisce con quattro molecole di citocromo c, rimuovendo gli elettroni dai gruppi eme con ione ferroso  $Fe^{2+}$  ossidato a ferrico  $Fe^{3+}$  e cedendoli simultaneamente all'ossigeno (McCord, 2000; Halliwell, 2006). L'intero pathway della fosforilazione ossidativa è molto elaborato e spesso il trasferimento degli elettroni all'ossigeno non avviene in modo perfetto e rimane incompleto. Il risultato è la formazione di prodotti intermedi, detti specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono essere più o meno reattivi e danneggiare DNA, proteine e carboidrati. Nonostante la sofisticata rete di fattori e cofattori che regola il metabolismo energetico nel mitocondrio, alcuni di questi mostrano qualche imprecisione, lasciandosi sfuggire gli elettroni da trasportare tramite rotture di legame (Halliwell, 2006). I maggiori siti esposti a tale inconveniente sono il complesso I (l'enzima NADPH deidrogenasi) ed il semi-ubichinone della catena respiratoria (McCord, 2000). Come conseguenza, gli elettroni persi possono reagire con l'ossigeno dando origine a vari ROS: dalla riduzione con un solo elettrone si sviluppa anione superossido,  $O_2^-$ , la doppia riduzione porta alla sintesi di perossido di idrogeno,  $H_2O_2$  (Benzie, 2000; McCord, 2000). Questi due ROS sono in grado di interagire e produrre il radicale ossidrilico, OH attraverso una reazione molto lenta che viene accelerata dalla presenza di ioni metallici liberi nella cellula. Infatti, il perossido di idrogeno può reagire con lo ione ferroso e dare luogo al radicale ossidrilico (Benzie, 2000; McCord, 2000; Forman *et al.*, 2009). Anche l'anione superossido può influenzarne la formazione, riducendo lo ione ferrico a ferroso. Il radicale ossidrilico costituisce il ROS più pericoloso, perchè estremamente reattivo e può colpire ed ossidare qualsiasi molecola, lesionare il DNA e causare danni alle membrane cellulari mediante perossidazione lipidica (Benzie, 2000; Halliwell, 2006; Forman *et al.*, 2009). In quest'ultimo caso, i lipidi vengono ossidati e la membrana subisce un progressivo deterioramento. Tra i componenti della membrana, l'ossidazione dell'acido arachidonico, un acido grasso polinsaturo, può stimolarne la degradazione in vari composti tossici che vanno ad inattivare le proteine della cellula (Forman *et al.*, 2009). Oltre ai ROS, si distinguono anche specie reattive dell'azoto (RNS) come il perossinitrito ( $ONOO^-$ ) che deriva dalla rapidissima reazione dell'anione superossido con l'ossido nitrico (NO) (Halliwell, 2006; Forman *et al.*, 2009). Il perossinitrito può scindersi e formare nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ), oppure, se protonato, diventa acido perossinitroso ( $ONOOH$ ), un radicale estremamente reattivo e tossico, capace di alterare il DNA, i lipidi e le proteine (Forman *et al.*, 2009). Gli altri principali produttori di ROS sono gli enzimi NADPH ossidasi, xantina ossidasi ed ossido nitrico sintetasi (NOS) (Alfadda e Sallam, 2012). Al fine di contrastare la produzione di ROS, la cellula ha messo a punto due sistemi di difesa, enzimatici e non enzimatici che prevedono il coinvolgimento di agenti antiossidanti, ovvero molecole che reagiscono ed inattivano i ROS, evitando che si verifichi danno ossidativo alle componenti cellulari (Benzie, 2000; Halliwell, 2006). Una delle prime strategie attuate è il mantenimento di una bassa concentrazione di ioni metallici nel plasma, per evitare che

questi entrino in contatto con l'anione perossido e sviluppino OH, grazie all'intervento di alcuni enzimi come la transferrina, la ferritina e la ceruloplasmina, le prime due che legano in modo specifico e trasportano ione ferrico, la terza ione rameico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Benzie, 2000; Halliwell, 2006). In alternativa, la cellula può sbarazzarsi dell'anione superossido, convertendolo in perossido di idrogeno tramite l'azione della superossido dismutasi (SOD) (Benzie, 2000; Halliwell, 2006; ). Tuttavia, anche il perossido di idrogeno può reagire con gli ioni metallici, producendo OH e necessita quindi di essere eliminato. Questo compito viene svolto da due tipi di enzimi, le catalasi e le perossidasi, che lo usano come substrato per sintetizzare molecole d'acqua (Benzie, 2000; Halliwell, 2006). Il glutathione (GSH) è un tripeptide costituito da glutammato, cisteina e glicina, presente in concentrazioni millimolari nelle cellule e capace di svolgere un importante ruolo nella difesa antiossidante, nella detossificazione da xenobiotici, nella regolazione del ciclo cellulare e dell'espressione genica (Lu, 2009). Infine, l'ultima importante linea di difesa antiossidante è rappresentata da una serie di piccole molecole scavenger, capaci di interagire con diversi ROS e proteggere la cellula dal rischio di perossidazione lipidica. Tra questi, i tocoferoli e tocotrienoli (vitamina E) e l'acido ascorbico (vitamina C), uno dei più potenti agenti antiossidanti essenziali (Benzie, 2000).

L'equilibrio che si instaura dalla compensazione tra formazione di ROS e relativi meccanismi antiossidanti, assicura alla cellula uno stato redox stabile ed allontana il pericolo di incorrere in danni ossidativi. Nonostante ciò, in presenza di un eccesso di ROS rispetto ai fattori antiossidanti, il bilancio redox viene meno e la cellula entra in una condizione di stress ossidativo che la può portare a riprendersi e tornare alla normale fisiologia, riparando eventuali danni subiti oppure andare incontro a morte per apoptosi. Nel corso degli ultimi anni, è stato dimostrato che i ROS ricoprono importanti funzioni in molti processi cellulari. Sono coinvolti nella regolazione del tono vascolare, mentre in condizioni di anossia vengono rilasciati per stimolare l'espressione di HIF-1 (hipoxia-inducible factor-1) che, aumentando l'angiogenesi, riporta l'ossigenazione a livelli di norma (Alfadda e Sallam, 2012). Nel reticolo endoplasmatico, il perossido di idrogeno che si sviluppa durante il meccanismo di folding delle proteine, viene utilizzato come indice dello stato redox cellulare. Infatti, se questo viene alterato, il reticolo endoplasmatico non riesce più ad assecondare in modo efficiente l'alta richiesta di folding proteico e produce maggiori quantità di  $\text{H}_2\text{O}_2$  che inducono il reticolo endoplasmatico ad attivare sistemi di protezione per ristabilire l'omeostasi cellulare (Alfadda e Sallam, 2012). I ROS possono stimolare la proliferazione di vari tipi cellulari e sembrano necessari per il corretto funzionamento del ciclo cellulare, quando un loro aumento determina il passaggio dalla fase G1 a quella S (Schippers *et al.*, 2012). In *D. melanogaster*, cellule progenitrici multipotenti sono caratterizzate da un aumento di concentrazione di ROS ed anticipano il differenziamento dopo trattamento a dosi ridotte di ROS (Schippers *et al.*, 2012). Queste evidenze suggeriscono un ruolo dei ROS anche nello sviluppo. Invece, nelle risposte immunitarie, sono coinvolti in numerose malattie metaboliche come il diabete mellito e l'obesità e possono indurre l'assemblaggio e l'attivazione degli infiammasomi, particolari complessi citoplasmatici che mediano l'infiammazione (Alfadda e Sallam, 2012). Nei fagociti che rispondono al non-self, l'enzima NADPH ossidasi produce superossido dalla reazione dell'ossigeno molecolare con l'NADPH ossidato (McCord, 2000). Altri fagociti possiedono enzimi chiamati mieloperossidasi, capaci di liberare acido ipocloroso (HOCl) o acido ipobromoso (HOBr) (Forman *et al.*, 2009). Questi ROS vanno a saturare l'ambiente cellulare del sito di infezione, uccidendo così gli agenti patogeni. A fronte del burst ossidativo scatenato, le cellule devono proteggersi, attivando determinate vie di trasduzione del segnale che aumentano l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B, AP-1 e delle MAPK (McCord, 2000; Alfadda e Sallam, 2012).

In *B. schlosseri*, saggi opportuni con lievito hanno dimostrato la presenza di burst ossidativo associato alla fagocitosi con un'elevata produzione di perossidi ad effetto citotossico (Ballarin,

2008). Oltre ai ROS, gli emociti di botrillo incubati con cellule di lievito liberano nitrito, a testimonianza che i fagociti possono scegliere fra varie possibilità di difesa, sfruttando tutte le armi microbicide a loro disposizione (Ballarin, 2008). In questo caso, è l'ossido nitrico sintetasi a generare ossido nitrico.

Nel ciclo blastogenetico, durante le fasi avanzate del cambio di generazione, quando si assiste ad un'intensa fagocitosi delle cellule senescenti negli zoidi adulti, la concentrazione di ROS nel plasma emolinfatico è due volte maggiore di quella misurata negli stadi intermedi (Cima *et al.*, 2010). La maggior parte dei fagociti macrofago simili che si diffondono e crescono di frequenza in regressione, contengono perossidi identificabili nel loro citoplasma, nonostante la presenza di agenti antiossidanti come il glutatione ridotto e la glutatione perossidasi (Cima *et al.*, 2010). Inoltre, una buona percentuale di fagociti mostra tracce di apoptosi a livello nucleare, probabilmente un effetto dovuto al forte stress ossidativo subito dalle cellule in seguito all'ingestione di materiale morto ed alla produzione di ROS per il suo smaltimento (Cima *et al.*, 2010). Questi fagociti macrofago-simili, con i vacuoli pieni di corpi apoptotici, non riescono a sopportare l'eccessivo stress ossidativo che innescano e sono destinati anch'essi a morte cellulare per apoptosi, con un crollo della loro percentuale nella popolazione emocitaria. Infatti, verso la fine della regressione, sono ancora riconoscibili i residui delle vecchie generazioni riassorbite che appaiono come delle masse scure contenenti notevoli quantità di ROS (Cima e Ballarin, 2009). Solo con l'inizio di un nuovo ciclo, il ricambio cellulare che rifornisce la colonia già durante la regressione, porta quindi ad un aumento dei fagociti ameboidi a discapito di quelli macrofago-simili.

### **Geni coinvolti nello stress ossidativo considerati in questo studio:**

#### **- GCL:**

La GCL (Glutamate Cysteine Ligase) è l'enzima coinvolto nella prima delle due reazioni attraverso le quali avviene la sintesi del glutatione. In questa reazione che richiede il consumo di una molecola di ATP, la GCL catalizza il legame tra il gruppo amminico della cisteina ed il gruppo  $\gamma$ -carbossilico del glutammato, con la formazione di  $\gamma$ -glutamilcisteina (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009; Forman *et al.*, 2009) (fig. ) (fig. 15). In gran parte degli eucarioti, la GCL è un eterodimero di due diverse subunità, chiamate GCLC e GCLM, prodotte da due geni differenti. La struttura della GCL delle piante si discosta dagli altri organismi per l'assenza della subunità GCLM e per l'adozione di una conformazione omodimerica composta da due GCLC (Franklin *et al.*, 2009). Nei batteri, invece, un unico gene esprime una proteina che agisce contemporaneamente da GCL e GS, generando glutatione; anche il lievito ha un gene solo per la GCL, ma contiene un ulteriore enzima, detto YdbK, in grado di sostenere, seppur meno efficacemente, la prima reazione del processo di sintesi del glutatione (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009). La subunità GCLC è più grande rispetto a GCLM, utilizza  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  come cofattori ed è regolata negativamente dal glutatione che compete con il glutammato per il legame al suo sito attivo. La GCLM non presenta attività catalitica, ma esercita un'importante funzione regolatoria, interagendo con GCLC e promuovendo un notevole abbassamento della sua costante di affinità per il glutammato, così come un aumento di quella d'inibizione per il glutatione (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009; Forman *et al.*, 2009). In questo modo, la GCL formata dall'unione di GCLC e GCLM, è caratterizzata da una maggiore affinità per il glutammato e da una resa senz'altro migliore della sola GCLC. Pertanto, in condizioni fisiologiche, la reazione catalizzata dalla GCL è controllata dall'azione inibitoria del glutatione e dalla quantità di cisteine disponibili: due aspetti che la rendono lo stadio limitante della produzione del glutatione. La GCLM isolata nei mammiferi ed in altri gruppi animali, è caratterizzata da un dominio conservato omologo di quello della famiglia delle aldo-keto riduttasi (AKR) (Franklin *et al.*, 2009). Il dominio di queste ossidoriduttasi ospita il suo cofattore NAD(P)H in una tasca che sembra

relativamente presente anche in GCLM. Sulla base di questi presupposti, alcuni esperimenti realizzati in *D. melanogaster*, hanno riscontrato un aumento di attività della GCL incubata con NADPH ed una diminuzione con NADP<sup>2+</sup>, mentre in topo non è stato osservato nessun effetto positivo. Quindi, la possibilità di un ruolo modulatore dell'NADPH nei confronti della GCLM e necessariamente della GCL, appare ristretta alla specie coinvolta o il risultato di un'interazione indiretta (Franklin *et al.*, 2009).

Lo stress ossidativo indotto da numerosi agenti ossidanti ed elettrofili stimola la sovraespressione di entrambe le subunità GCLC e GCLM e la formazione di GCL. In condizioni riducenti, invece, la produzione di glutatione da parte della GCL è neutralizzata dal distacco delle due componenti enzimatiche, tramite rottura dei ponti disolfuro che le tengono unite (Franklin *et al.*, 2009). Le analisi delle mutazioni introdotte in diverse cisteine della GCLC umana, hanno evidenziato una riduzione dell'attività della GCLC e solo in un caso anche quello drastico della GCL che comunque mantiene la sua struttura omodimerica. Nella GCLM di *D. melanogaster*, tre cisteine, due di queste conservate nell'uomo, sono coinvolte nella formazione di ponti disolfuro con la GCLC, ma non risultano necessarie per l'associazione delle due subunità. Quindi, un apporto fondamentale al consolidamento strutturale ed alla funzionalità della GCL deriva dall'insieme di interazioni covalenti e non di GCLC e GCLM (Franklin *et al.*, 2009).

L'espressione della GCL è regolata anche da altri fattori, oltre agli ossidanti. Nell'uomo, a seconda del tipo cellulare, l'insulina può attivare vie di trasduzione diverse che sovraesprimono la GCLC ed aumentano la sintesi di glutatione (Lu, 2009). Il fattore di crescita degli epatociti ha potere mitogenico su queste cellule e promuove in proporzioni variabili l'espressione di GCLC e di GCLM, con la crescita di concentrazione del glutatione (Lu, 2009). Il fattore di crescita trasformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), invece, blocca l'espressione di GCLC e diminuisce il tasso di glutatione (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009). Una varietà di agenti antiossidanti può influenzare la produzione di GCLC come la melatonina, lo zinco, la curcumina, i derivati della perossidazione lipidica tipo il 4-idrossinonenale (HNE) ed altri ancora (Lu, 2009). La fosforilazione della GCLC da parte della protein-chinasi C, protein chinasi AMP ciclico-dipendente (PKA) e protein chinasi II Ca<sup>2+</sup>-calmodulina-dipendente (CMKII), inibisce l'attività della GCL senza modificarne conformazione ed affinità per il glutammato. Questo meccanismo sembra di grande importanza nella fisiologia cellulare per contenere la GCL a livelli basali, considerato che la GCLC stessa è in grado di autofosforilarsi (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009). In diverse forme di apoptosi indotte da radiazioni UV, chemoterapici e dai fattori di morte TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ ,  $\alpha$ -Fas, GCLC viene tagliato dalla caspasi 3 in due frammenti di 60 e 13 kDa (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009). La proteolisi si verifica appena a monte di un importante residuo amminoacidico impegnato nel legame con GCLM, con conseguente rischio di impedire in modo irreversibile la formazione di GCL e la sua attività enzimatica. Tuttavia, la GCLC tagliata, conserva una completa funzionalità catalitica e continua ad interagire con GCLM, sviluppando GCL (Franklin *et al.*, 2009).

Nel promotore dei geni umani della GCLC e GCLM sono state identificate regioni conservate di consenso per i fattori di trascrizione NF-kB, Sp-1, AP1 (TRE) e proteina attivatrice 2 (AP2), un elemento di risposta ai metalli (MRE) ed uno di risposta agli antiossidanti (ARE)/elettrofili (EpRE) (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009; Forman *et al.*, 2009). Quest'ultimo, l'elemento ARE/EpRE, presente sia in GCLC che in GCLM, è uno dei più importanti e può interagire con molti fattori di trascrizione come c-Myc, c-Jun, Maf, Fra, AP1 e soprattutto Nrf2. In condizioni normali, Nrf2 è intrappolato nel citoplasma dall'interazione con la proteina Keap1 che provvede a degradarlo per via proteosomiale, mentre in condizioni altamente ossidanti, viene indotto a liberarsi di Keap1 e a traslocare nel nucleo dove, legandosi all'elemento ARE/EpRE, favorisce l'attivazione di geni coinvolti nello stress, come appunto GCLC e GCLM (Lu, 2009; Forman *et al.*, 2009). Nel nucleo, Nrf2 forma degli eterodimeri, specialmente con c-Jun che rappresenta il principale partner di

attivazione, mentre il legame con le proteine Maf e c-Myc ha effetto inibitorio. Oltre a questi, Nrf2 può interagire con altri fattori a livello del motivo ARE/EpRE (Lu, 2009; Forman *et al.*, 2009).

Un altro elemento significativo è il sito di legame per l'AP1, chiamato TRE (elemento di risposta al TPA). Parecchi motivi TRE sono presenti nei promotori di GCLC e GCLM, anche all'interno di alcuni ARE/EpRE e vengono attivati prevalentemente dal legame con dimeri di c-jun (o in qualche caso c-fos) (Forman *et al.*, 2009). L'HNE è in grado di attivare l'elemento TRE, modulando l'espressione di GCL, mediante coinvolgimento della chinasi c-Jun N-terminale (JNK). Questo probabile pathway implica che c-Jun, dopo essere stato fosforilato da JNK, si trasferisca nel nucleo e si leghi al sito TRE (Forman *et al.*, 2009). L'HNE, con la mediazione di diverse protein-chinasi, ha un ruolo centrale anche come stimolatore dell'interazione Nrf2-ARE/EpRE (Lu, 2009; Forman *et al.*, 2009).

Il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B è responsabile della regolazione basale di GCLC e GCLM e risponde allo stimolo di TNF- $\alpha$ , aumentando la loro espressione (Lu, 2009). In entrambi i casi, NF- $\kappa$ B può interagire direttamente con il suo elemento specifico nel promotore di GCLC, oppure coinvolgere c-jun che attiva i siti AP1. Invece, la sovraespressione di GCLM indotta da TNF- $\alpha$ , avviene esclusivamente tramite quest'ultima modalità, perchè il promotore di GCLM non possiede un sito di legame per NF- $\kappa$ B (Lu, 2009). Anche un altro fattore di trascrizione, c-Myc, ha la funzione di controllare l'espressione basale di GCLC e GCLM e di garantire la loro produzione, con maggiore formazione di GCL, in risposta allo stress ossidativo dato da un eccesso di perossido di idrogeno (Lu, 2009).

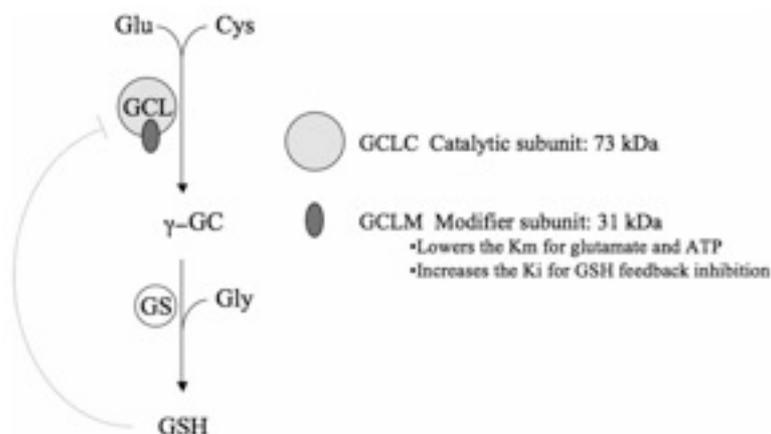


Figura 15: sintesi del glutatone. La prima reazione che produce  $\gamma$ -glutamilsteina è catalizzata dalla GCL, la seconda reazione che porta alla sintesi del glutatone dalla GS. Da Franklyn *et al.*, 2009.

#### - GS:

La GS (glutatione sintetasi) è l'enzima coinvolto nella seconda reazione di sintesi del glutatone, in cui viene catalizzata l'aggiunta di glicina alla  $\gamma$ -glutamilsteina prodotta dalla GCL (Lu, 2009; Forman *et al.*, 2009; Dinescu *et al.*, 2007) (fig. 15). Questa reazione necessita di una molecola di ATP e si suddivide in due fasi: nella prima il gruppo  $\gamma$ -fosfato dell'ATP viene ceduto al carbossilato C-terminale della  $\gamma$ -glutamilsteina, formando l'intermedio reattivo acil-fosfato che nella seconda si lega con la glicina, producendo glutatone, ADP e fosfato inorganico (Polekhina *et al.*, 1999).

La GS è un omodimero della superfamiglia denominata "ATP-grasp", composta da enzimi con un dominio di legame per l'ATP che catalizzano la reazione tra un substrato contenente gruppi

carbossilici e l'ATP, con formazione di acil-fosfato che poi si lega al gruppo amminico di una molecola (Fawaz *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2011; Dinescu *et al.*, 2007). L'arrangiamento di questo dominio è costituito da tre sottodomini  $\alpha$ - $\beta$ , due dei quali racchiudono l'ATP al loro interno, e da tre motivi conservati, corrispondenti al sito di legame del  $Mg^{2+}$  ed al loop di legame del fosfato dell'ATP. Ogni sottodominio presenta un loop che forma il sito attivo (Fawaz *et al.*, 2011). In questa struttura tripartita, la classificazione dei sottodomini con le lettere A, B, C, corrisponde ad una regione specifica: quella N-terminale per il primo, centrale il secondo e C-terminale l'ultimo (Fawaz *et al.*, 2011). La GS umana conserva la stessa organizzazione in tre sottodomini, così formata: un foglietto  $\beta$  antiparallelo con eliche avvolte su uno dei due lati, un foglietto  $\beta$  parallelo con eliche su entrambi i lati ed infine un foglietto  $\beta$  antiparallelo con eliche condensate su un lato, anche identificato come dominio di "copertura" (lid domain). Oltre a questi, è poi presente un motivo di dimerizzazione ed uno di collegamento tra il secondo sottodominio  $\beta$  parallelo ed il terzo (Polekhina *et al.*, 1999). I loop dei sottodomini circondano e proteggono la cavità del sito attivo, regolandone l'apertura o chiusura. Si tratta, nell'ordine, di un loop di legame del substrato (S-loop), uno ricco di glicina (G-loop) ed uno di alanina (A-loop) (Brown *et al.*, 2011; Dinescu *et al.*, 2007; Polekhina *et al.*, 1999). Il loop A, con 13 residui amminoacidici, per lo più idrofobici, risulta estremamente conservato nei mammiferi e negli anfibi, mentre negli altri eucarioti ha un'elevata identità di sequenza solo nella sua porzione ricca di glicine (459-464) (Brown *et al.*, 2011; Dinescu *et al.*, 2007). Il loop G è altamente conservato in tutti gli eucarioti, anche nel lievito, invece il loop S mostra basse percentuali di identità (Dinescu *et al.*, 2007). Nel folding della GS umana, il loop A fa parte del primo sottodominio, è situato in prossimità dell'ATP e della glicina del glutatione ed è quindi coinvolto nella sintesi finale del glutatione; il loop S del secondo sottodominio è adiacente alla  $\gamma$ -glutamilsteina con cui si lega, infine il loop G del sottodominio "di copertura" che stabilizza con legami idrogeno il gruppo fosfato dell'ATP, a cui è posto vicino (Dinescu *et al.*, 2007). Inoltre, il loop G coordina i due ioni  $Mg^{2+}$  associati all'ATP e forma un canale d'entrata nel sito attivo per la glicina, a sua volta trattenuta dal loop A tramite legami idrogeno. Diverse interazioni di legame tra loop A e G possono subire una serie di movimenti, dando vita ad una conformazione in cui il sito attivo è rigidamente chiuso, in modo da evitare la penetrazione di solvente e l'idrolisi dell'intermedio acil-fosfato. Al contrario, il loop S non contatta gli altri due loop (Brown *et al.*, 2011; Dinescu *et al.*, 2007).

La GS dei mammiferi ha una caratteristica molto particolare: è soggetta a cooperatività negativa. In particolare, il legame di una delle due subunità con la  $\gamma$ -glutamilsteina, influisce sull'affinità dell'altra per lo stesso substrato, riducendola. Recenti studi hanno messo in luce che la configurazione dimerica della GS garantisce la sua stabilità e sembra incidere anche sulla cooperatività. In questo senso, la regione di dimerizzazione si rivela una componente critica per la GS (Slavens *et al.*, 2011). Allo stesso modo, anche le interazioni tra i loop A e G appaiono cruciali per la cooperatività (Brown *et al.*, 2011).

Nell'uomo, gli effetti delle mutazioni nel gene della GS si manifestano in due forme di malattia: una leggera, in cui l'abolizione dell'enzima avviene solo negli eritrociti, provocando anemia emolitica cronica ed ittero neonatale, l'altra, più aggressiva, causa acidosi metabolica, danni neurologici e 5-ossiprolinuria (Polekhina *et al.*, 1999). In pratica, in assenza di GS, crolla la sintesi di glutatione che non riesce più ad inibire la  $\gamma$ -glutamilsteina prodotta in eccesso dalla GCL; così, la  $\gamma$ -glutamilsteina catalizza la conversione della  $\gamma$ -glutamilsteina in 5-ossiprolina e cisteina (Lu, 2009; Polekhina *et al.*, 1999).

In casi particolari, l'attività della GS può diventare determinante per la formazione del glutatione, al pari della GCL. Alcune molecole o composti capaci di stimolare l'espressione delle due subunità della GCL, aumentano anche la produzione di GS, mentre la singola induzione della GCLC, non ha

nessun effetto sulla GS. Quindi, un incremento della capacità di sintesi del glutathione dipende dall'induzione simultanea dei due enzimi e soprattutto dalla sovraespressione della GS (Lu, 2009). Uno dei fattori che regola in modo correlato l'attività di GCL e GS, è il recettore nucleare  $\alpha$  dei retinoidi X (RXR $\alpha$ ). Esperimenti di knockout genico hanno, infatti, evidenziato una drastica involuzione nello sviluppo del glutathione, accompagnata da un forte abbassamento di espressione della subunità GCLC e della GS e nessuna variazione in GCLM. Questo meccanismo di induzione di GCL e GS, controllato da RXR $\alpha$ , rimane tuttora sconosciuto (Lu, 2009).

Nel promotore della GS sono presenti diversi siti di attivazione: negli epatociti di ratto si distinguono elementi di legame per AP1 che promuovono l'espressione, mentre il sito NF1 la blocca; il reclutamento di AP1, a cui può aggiungersi NF-kB, permette l'espressione basale della GS. Nell'uomo, invece, la concentrazione basale di GS è regolata dal legame di Nrf1 e c-jun con due motivi di tipo NFE2 (fattore nucleare di derivazione eritroide 2) o di Nrf2 con uno solo (Lu, 2009).

### - GPx:

La famiglia delle glutathione perossidasi, GPx, è composta principalmente da enzimi selenio-dipendenti, contenenti un residuo di selenocisteina - una cisteina a cui è legato covalentemente un atomo di selenio - e classificati in due gruppi intra- ed extracellulari, a seconda della localizzazione della loro attività enzimatica (Herbette *et al.*, 2007; Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). Nel sistema di incorporazione della selenocisteina durante la sintesi proteica, sono coinvolti il fattore di traduzione Sec-tRNA, una struttura a stem-loop nella 3' UTR, indicata come SECIS (sequenza per l'inserimento della selenocisteina), uno specifico fattore di elongazione e vari cofattori. Queste componenti permettono che il codone UGA associato alla selenocisteina non venga riconosciuto come segnale di STOP (Herbette *et al.*, 2007).

Le GPx catalizzano la riduzione di idroperossidi organici, perossidi di idrogeno e perossidi lipidici utilizzando il glutathione come agente riducente, proteggendo così le cellule dai danni ossidativi. In base a struttura primaria, specificità dell'accessibilità al substrato e localizzazione tissutale, le GPx dei mammiferi sono state classificate in otto principali isoforme (Herbette *et al.*, 2007; Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013).

Mammalian GPx type	Peroxidatic residue	Homo-tetramer	Reducing substrate	Oxidizing substrates
GPx1	Sec	Yes	GSH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , soluble LOOH ROOH
GPx2	Sec	Yes	n.d.	Peroxynitrite n.d.
GPx3	Sec	Yes	GSH Low rate with Tix and Gix	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , soluble LOOH, ROOH, PEOOH
GPx4	Sec	No	GSH, DTT Mercaptoethanol Cysteine particular protein thiols	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , LOOH ROOH, PEOOH ChOOH, ClOOH Peroxynitrite
GPx5	Cys	Yes	n.d.	n.d.
GPx6	Sec in humans, Cys in rats and mice	Yes	n.d.	n.d.
GPx7	Cys	No	GSH, PDI	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
GPx8	Cys	No	GSH, PDI?	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Figura 16: famiglia GPx nei vertebrati. Da Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013

La GPx citosolica (GPx1) è formata da quattro subunità uguali, ognuna contenente un residuo di selenocisteina, ed ha distribuzione ubiquitaria. La GPx intestinale (GPx2) è anch'essa omotetramericata ed è presente nel tratto gastrointestinale e nel fegato. Queste due forme di GPx riducono i perossidi di idrogeno e gli idroperossidi degli acidi grassi in modo rapido. La GPx plasmatica (GPx3) è omotetramericata, viene secreta dalle cellule dei tubuli convoluti del rene ed è presente nel plasma in forma glicosilata. Da alcuni esperimenti sono state identificate due isoforme della GPx3, una a livello renale ed una a livello plasmatico, la prima in quantità doppia rispetto alla seconda (Olson *et al.*, 2010). La Fosfolipide Idroperossido GPx (GPx4) è una proteina mitocondriale monomerica, espressa soprattutto nel testicolo e coinvolta nello sviluppo embrionale, nella maturazione spermatica e nella proliferazione, che riduce in modo efficiente gli idroperossidi degli acidi grassi oltre ai perossidi di idrogeno. La GPx6 è caratterizzata da una stretta omologia con la GPx3 (Herbette *et al.*, 2007), entrambi omotetrameri, e viene sintetizzata nell'embrione e nell'epitelio olfattivo (Kryukov *et al.*, 2003; Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013).

A differenza delle GPx1, 2, 3, 4 e 6, le tre isoforme, GPx5, 7, 8 presentano una cisteina al posto della selenocisteina nel sito catalitico. La GPx5 ha struttura nucleotidica e amminoacidica simile alla GPx3. Viene espressa a livello dell'epididimo e si lega anche alla testa degli spermatozoi. La GPx7 è una proteina monomerica, localizzata nel reticolo endoplasmatico di testicoli, polmoni, reni, tessuto adiposo e ghiandola mammaria. Ha un dominio simile alla GPx4 e viene infatti anche detta Fosfolipide Idroperossido GPx priva di selenocisteina. La GPx8 è una proteina di membrana del reticolo endoplasmatico, la cui funzione è poco chiara (Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013).

#### - SOD:

La SOD (superossido dismutasi) è un enzima antiossidante che reagisce con l'anione superossido, dismutandolo in perossido di idrogeno ed ossigeno molecolare (Halliwell, 2006). Infatti, sebbene l'anione superossido non risulti estremamente reattivo, la sua capacità di sviluppare ROS in presenza di ioni metallici, è un rischio che le cellule non possono permettersi. Allo stesso modo, anche il perossido di idrogeno prodotto dalla reazione, è in grado di ossidare ioni metallici e deve essere smaltito dalla catalasi o soprattutto glutatione perossidasi, per evitare che le componenti cellulari subiscano pesanti danni (Benzie, 2000). La SOD è, quindi, coinvolta insieme ad altri agenti antiossidanti, tutti interconnessi fra loro, in un complesso sistema di controllo e di difesa dai ROS.

Si tratta di una proteina diffusa in ogni taxon e fortemente conservata, con un'origine molto antica, risalente all'avvento di un'elevata concentrazione di ossigeno nell'atmosfera, probabilmente già prima della separazione degli eubatteri dagli archeobatteri (Miller, 2012). Tutte le forme di SOD conosciute catalizzano la conversione del superossido in perossido di idrogeno, nonostante si differenzino per il cofattore metallico presente nel sito catalitico e per il folding. Nei metazoi sono state descritte tre tipi di SOD: una Cu/Zn-SOD omodimerica citoplasmatica, una Cu/Zn-SOD tetramericata extracellulare ed una Mn-SOD omodimerica nella matrice mitocondriale (Miller, 2012; Halliwell, 2006; Landis e Tower, 2005). La situazione nelle piante è pressoché identica, ma una buona percentuale, oltre alle SOD citate, presenta Fe-SOD nel cloroplasto ed, in alcuni casi, anche nel citoplasma. I funghi analizzati in letteratura, hanno Cu/Zn-SOD e Mn-SOD mitocondriale che in molti di essi è anche citosolica. Invece, i protisti sembrano privi di Cu/Zn-SOD e nei parassiti contano esclusivamente sulla Fe-SOD, citosolica o mitocondriale, mentre in alcuni organismi fotosintetici sulla Mn-SOD del loro cloroplasto. Per quanto riguarda i procarioti, molti batteri contengono Cu/Zn-SOD che è stata ritrovata come ipotetica sequenza, solo parzialmente identica a quella umana, anche in una specie di archeobatteri; i batteri aerobi dispongono di Mn-SOD, mentre alcuni archeobatteri sono dotati di una Fe/Mn-SOD capace di sfruttare entrambi i metalli,

soprattutto manganese in ambiente ricco di ossigeno e ferro in quello anaerobio (Miller, 2012). Inoltre, i due phyla attinobatteri e cianobatteri e pochi altri gruppi di batteri, si distinguono per la presenza di SOD contenente nichel, la cui acquisizione sarebbe avvenuta successivamente allo sviluppo diversificato di tutti i phylum batterici. (Miller, 2012).

I mammiferi e la maggior parte degli organismi eucarioti, possiedono un solo gene (SOD1) che codifica per la SOD Cu/Zn citoplasmatica, ad eccezione del topo in cui sono stati identificati tre geni specifici (Landis e Tower, 2005; Zelko *et al.*, 2002). Questa Cu/Zn-SOD ha una distribuzione cellulare che dipende dalla condizione metabolica e dal tessuto coinvolto ed è stata riconosciuta anche a livello del nucleo, dello spazio intermembrana mitocondriale, dei lisosomi e dei perossisomi (Miller, 2012; Zelko *et al.*, 2002). La Cu/Zn-SOD delle piante può essere prodotta da più geni diversi ed è presente nel citoplasma e nel cloroplasto ed, in qualche caso, nei perossisomi. In *S. cerevisiae* è localizzata nel citoplasma ed anche nello spazio intermembrana mitocondriale.

L'altra Cu/Zn-SOD, di natura extracellulare, nei mammiferi viene controllata da un singolo gene (SOD3), mostra un'elevata affinità per l'eparina ed un'espressione tessuto-specifica che nell'uomo è stata riscontrata a livello del plasma, della linfa e dei fluidi cerebrospinali (Zelko *et al.*, 2002).

La Mn-SOD, come le Cu/Zn-SOD, è costituita da un unico gene, sia nell'uomo (SOD2) che in buona parte dei metazoi, tranne in *Rattus norvegicus* e *C. elegans* che hanno due geni diversi e nel granchio reale *Callinectes sapidus*, dove la tradizionale Mn-SOD mitocondriale è affiancata da un'insolita Mn-SOD citosolica al posto della Cu/Zn-SOD citoplasmatica (Miller, 2012; Landis e Tower, 2005).

Dal punto di vista evolutivo, lo scenario condiviso prevede che in origine le forme più primitive di SOD funzionassero impiegando il ferro abbondantemente presente nell'atmosfera e, solo in un secondo momento, con la sua riduzione di disponibilità nel nuovo ambiente ossidante, abbiano optato per il manganese. In questo senso, la presenza di Mn-SOD nei batteri e di Fe/Mn-SOD negli archeobatteri, con l'uso alternato di entrambi i metalli, spinge a considerare le attuali Fe-SOD e Mn-SOD come omologhe e derivanti dall'endosimbiosi di un progenitore comune, molto probabilmente un archeobatterio (Miller, 2012; Benzie, 2000). Nelle piante, la stretta relazione filogenetica tra la Fe-SOD situata nel cloroplasto e quella dei cianobatteri, suggerisce un ulteriore evento endosimbiotico che coinvolge questo gruppo di batteri e non gli archeobatteri. Al contrario, i protisti che possiedono solo Fe-SOD nei mitocondri, non sembrano aver subito endosimbiosi, ma un processo di trasferimento genico laterale (Miller, 2012).

Le ipotesi avanzate sull'origine della Cu/Zn-SOD soffrono di molti punti interrogativi e non forniscono una chiara ricostruzione della sua evoluzione. In particolare, le maggiori incertezze riguardano la natura della Cu/Zn-SOD primordiale ed il meccanismo che ne ha permesso l'affermazione. L'assunzione più probabile è che questa SOD discenda da un gene ancestrale completamente diverso dal precursore della Mn-SOD (Zelko *et al.*, 2002; McCord, 2000). Infatti, le due forme intra ed extracellulare di Cu/Zn-SOD mostrano un basso livello di similarità con le Mn-SOD (Zelko *et al.*, 2002). Allo stesso tempo, alcuni studi di sequenza tendono ad escludere una derivazione delle moderne Cu/Zn-SOD da quelle dei batteri che risultano molto diverse, mentre, al contrario, la Cu/Zn-SOD extracellulare dei mammiferi è più vicina alle Cu/Zn-SOD dei funghi (Miller, 2012). La presenza, poi, in parecchi virus, soprattutto baculovirus e virus degli insetti, di Cu/Zn-SOD dalle caratteristiche molto simili a quelle degli organismi infestati, viene interpretata come il risultato di un trasferimento genico dai loro ospiti (Miller, 2012; Landis e Tower, 2005). Probabilmente, la stessa modalità con cui la Cu/Zn-SOD è stata cooptata anche in una specie di archeobatteri, lasciando, quindi, aperta la possibilità che la Cu/Zn-SOD sia stata trasmessa in questa maniera dai batteri agli eucarioti. Tuttavia, rimangono forti distanze tra le Cu/Zn-SOD degli eucarioti e quelle dei batteri. Inoltre, l'assenza della Cu/Zn-SOD nei protisti, nelle piante più

primitive e nei muschi, rende ancora più difficile la comprensione del suo sviluppo negli eucarioti più complessi (Miller, 2012).

L'attività delle SOD è finemente regolata da una serie di elementi conservati, presenti nei promotori dei loro geni, come i TATA e CAAT box, le regioni ricche di GC ed i siti di legame per importanti fattori di trascrizione, quali AP1, AP2, Sp1, NF- $\kappa$ B, CREB, NF1, HSF, ecc (Zelko *et al.*, 2002). Queste caratteristiche sono state identificate in molti organismi, ad esempio nei promotori della Mn-SOD di *D. melanogaster* e della Mn-SOD e Cu/Zn-SOD citosolica umana. L'altra Cu/Zn-SOD, di tipo extracellulare, non contiene TATA e CAAT box come la Mn-SOD, ma ha due potenziali elementi di risposta agli antiossidanti (ARE, Antioxidant Response Element), uno agli xenobiotici ed uno ai glucocorticoidi (Zelko *et al.*, 2002). La presenza di ioni metallici nell'ambiente cellulare provoca un aumento di espressione di entrambe le Cu/Zn-SOD, indotto dal loro elemento di risposta ai metalli (MRE, Metal Response Element), evitando che questi reagiscano con i ROS e producano tossicità. In condizioni normali, la Cu/Zn-SOD citoplasmatica viene espressa costitutivamente ma può essere stimolata da numerosi fattori fisico-chimici e biologici come lo shock termico, l'esposizione a raggi UV e X, l'ozono, i metalli pesanti, il perossido d'idrogeno, l'ossido nitrico e molti altri. Alcune citochine come IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e molte sostanze vasoattive tra cui l'istamina, la vasopressina, l'ossitocina, l'endotelina-1, la serotonina e l'eparina, mediano la sovraespressione della Cu/Zn-SOD extracellulare in particolari tipi cellulari umani, mentre invece diversi fattori di crescita la limitano. Le citochine IL-1, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sono in grado di amplificare, attraverso delle regioni introniche inducibili (cytokine inducible enhancer regions), anche la sintesi della Mn-SOD umana. Inoltre, i vari siti di legame per Sp1 e AP2 del suo promotore hanno caratteristiche opposte: il primo favorisce la trascrizione, il secondo la inibisce (Zelko *et al.*, 2002).

Negli ultimi anni, la maggior parte degli studi sulla SOD sono stati dedicati ad un suo possibile ruolo di rallentamento nell'invecchiamento (aging). Durante questa fase del ciclo vitale, si assiste ad un incremento dei ROS e del danno ossidativo, con la formazione di proteine alterate, perossidazione lipidica e modificazioni al DNA mitocondriale che porta ad una sensibile diminuzione dell'attività trascrizionale e della sintesi di ATP nel mitocondrio. In alcuni esperimenti in *D. melanogaster*, è stato osservato che il prolungamento della durata del ciclo vitale dato da una maggiore capacità di contenere lo stress ossidativo, è legata alla sovraespressione di specifici geni come appunto la SOD e altri (Landis e Tower, 2005). Tuttavia, se da un lato molte analisi incentrate sul silenziamento delle SOD hanno evidenziato in *D. melanogaster*, nel topo e nel lievito una forte riduzione dell'aspettativa di vita, dall'altro diverse prove di sovraespressione geneticamente indotta hanno mostrato, a seconda dell'apparato sperimentale adottato, risultati discordanti. Sembra, quindi, che la SOD possa solo in parte contrastare l'elevata concentrazione di agenti ossidanti che conduce all'invecchiamento, probabilmente perchè l'anione superossido non è fra i ROS maggiormente responsabili (Landis e Tower, 2005).

## SCOPO

*B. schlosseri*, dal punto di vista evolutivo, in quanto cordato invertebrato si colloca in una posizione molto vicina ai vertebrati, rappresentando un modello di interesse dal punto di vista filogenetico. A questo proposito, negli ultimi dieci anni un numero crescente di pubblicazioni ha analizzato vari aspetti della biologia di quest'ascidia coloniale, evidenziandone le potenzialità come organismo modello per lo studio dell'espressione, della funzionalità e dei pathways di interazione genica in numerosi processi biologici, ben descritti nei vertebrati, ma ancora non del tutto chiari. In particolare, l'attività di ricerca riguardante *B. schlosseri* si è concentrata soprattutto su una varietà di eventi biologici come la rigenerazione, l'angiogenesi, l'immunità innata, l'alloriconoscimento, l'apoptosi e la staminalità. La ciclicità che accompagna ciascuna colonia in un'alternanza continua di morte e sviluppo di nuove generazioni blastogenetiche, con il costante turnover degli zoidi, e l'intensa attività di proliferazione cellulare che permette alle gemme secondarie di svilupparsi e di acquisire la complessità strutturale degli individui adulti, costituiscono un importante stimolo per indagare in modo più approfondito il funzionamento del ciclo blastogenetico a livello genico. Infatti, i meccanismi molecolari che controllano e regolano il complesso sviluppo blastogenetico, necessario per la diffusione e la sopravvivenza di ogni colonia, rimangono attualmente poco noti. Allo scopo di indagare questi aspetti, nel corso dei tre anni del mio dottorato mi sono dedicato allo studio dell'espressione durante il ciclo blastogenetico di possibili orologi di geni noti nei vertebrati, seguendo tre filoni di analisi: 1) studio dell'apoptosi, con particolare attenzione allo stadio critico del cambio di generazione; 2) studio degli eventi proliferativi e di differenziamento cellulare che garantiscono il rinnovamento di tessuti ed organi durante il ciclo coloniale blastogenetico; 3) studio delle risposte di difesa allo stress ossidativo indotto dall'intensa attività di fagocitosi nelle fasi avanzate del cambio di generazione. Grazie alla disponibilità di una libreria di EST *Botryllus*-specifiche, prodotte nell'ambito del progetto di sequenziamento del trascrittoma coordinato dalla nostra unità di ricerca, ho individuato una serie di sequenze corrispondenti ai probabili orologi di geni identificati nei vertebrati. I geni considerati e analizzati nel mio lavoro di ricerca sono i seguenti: 1) studio dell'apoptosi: BAX, AIF, PARP, BIRPs, NF- $\kappa$ B; 2) studio degli eventi proliferativi e di differenziamento cellulare: PCNA, KI67, Nanos; 3) studio delle risposte di difesa allo stress ossidativo: GCL, GS, GPx, SOD. Per ogni gene, ho cercato di determinare la sequenza del trascritto completo ed il tradotto putativo, in modo da poter effettuare delle ricostruzioni filogenetiche. In un secondo momento, ho analizzato l'espressione di ciascun messaggero retrotrascritto, tramite reazioni di Real-Time PCR, confrontando campioni provenienti da una colonia in regressione con quelli a stadi intermedi del ciclo blastogenetico. Infine, ho provato a riconoscere i siti in cui sono localizzati e sintetizzati i vari trascritti, attraverso ibridazione *in-situ*.

## MATERIALI E METODI

### Animali utilizzati

Sono state utilizzate colonie di *B. schlosseri*, prelevate nella laguna di Venezia e adese a vetrini (4x4 cm) all'interno di vasche areate contenenti acqua di mare a 19°C in camere termostatiche. A giorni alterni, alle colonie veniva cambiata l'acqua e fornito il nutrimento costituito da Liquifry Marine (Liquifry, Dorking, UK).

Le fasi di sviluppo del ciclo coloniale blastogenetico di *B. schlosseri* sono state seguite con uno stereomicroscopio binoculare (WILD M5A). Durante l'osservazione, le colonie sono state ripulite dai depositi di Liquifry e dagli epibionti che aderiscono alla tunica, attraverso l'utilizzo manuale di piccole lamette, pennelli e aghi di tungsteno.

### Retrotrascrizione dell'RNA

#### Estrazione RNA

L'RNA totale è stato estratto da due diverse colonie di *B. schlosseri*, ciascuna con numerosi sistemi, selezionando, per ognuna, campioni rappresentativi di due fasi del ciclo coloniale blastogenetico: lo stadio intermedio 9/8/3 ed il cambio di generazione 11<sup>3</sup>/8/6. Le colonie sono state omogenate manualmente con un pestello di plastica, in una soluzione di cTAB e β-mercaptoetanololo (0,7 %) ed incubate a 60°C per 1 h. Infine, dopo aver aggiunto un volume di cloroformio:isopropanolo in rapporto 24:1, per l'estrazione è stato utilizzato il kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wi).

#### Quantificazione RNA

La quantità di RNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica a 260 nm, mentre la qualità tenendo conto del rapporto  $A_{260}/A_{280}$  che dà un'indicazione della purezza e della presenza di eventuale contaminazione da proteine.

#### Sintesi del cDNA

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato 1 µg di RNA totale, a cui sono stati aggiunti 1 µl di *Anchor* Oligo (dT) (500 ng/ml, Invitrogen) e acqua *RNase free* fino ad ottenere un volume finale di 5 µl. La miscela di reazione è stata posta a 70°C per 5 min ed incubata in ghiaccio per almeno 5 min. Quindi, ad ogni campione, sono stati aggiunti 4 µl di Improm II 5x Reaction Buffer (Promega), 2,4 µl di MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl di dNTP mix (10 mM), 5,6 µl di acqua *nuclease free* e 1 µl di RNasin *Ribonuclease Inhibitor* (20 U/µl). Per ultimo è stato aggiunto 1 µl dell'enzima Improm II RT (Promega) per un volume finale di 20 µl. La sintesi è stata effettuata in un termociclatore con il seguente profilo termico:

25°C per 5 min

42°C per 1 h

70°C per 15 min

#### Amplificazione del cDNA mediante PCR

#### Progettazione dei Primer

Grazie alla disponibilità del Prof. A. De Tomaso dell'Università di Santa Barbara (California), è stato possibile accedere al suo database di trascritti full-length specifici di Botrillo e ricavare diverse EST che, analizzate in BLAST, hanno evidenziato un'elevata similarità per ciascun gene

considerato in questo studio. L'allineamento di queste sequenze di lunghezza variabile, ha poi permesso di individuare delle regioni conservate condivise, sulle quali sono stati disegnati primer specifici (tabella 1). Ogni coppia di oligonucleotidi è stata, infine, verificata attraverso il programma IDT Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

<b>Primer 3' e 5' RACE</b>			
<b>Descrizione</b>	<b>Sigla</b>	<b>T melting</b>	<b>Sequenza 5'-3'</b>
Primer RT kit invitrogen	Anchor-oligodT		GTTTTCCCACGACTTTTTT TTTTTTTTTTTTT
Primer 5'RACE kit invitrogen	AAP		GGCCACGCGTCGACTAGTA CGGGIIGGGIIGGGIIG
Primer 3'RACE kit invitrogen	Anchor-oligodT		GTTTTCCCACGAC
M13 FW (-21)	M13F	55	TTGTAAAACGACGGCCAGT
M13 RE (-29)	M13R	50	CAGGAAACAGCTATGACC
<b>Primer per RT-PCR</b>			
<b>Descrizione</b>	<b>Sigla</b>	<b>T melting</b>	<b>Sequenza 5'-3'</b>
AC <i>Botryllus</i> FW	BAF-RT	60	ACTGGGACGACATGGAGAAG
AC <i>Botryllus</i> RE	BAR-RT	60	GCTTCTGTGAGGAGGACAGG
AIF <i>Botryllus</i> FW	AIFF2	64	GGACGCCAAACTGCCTACTGTCCG
AIF <i>Botryllus</i> RE	AIF-R	62	GCCGCTTCCTGTTTCAGACCGTAC
BAX <i>Botryllus</i> FW	BAXF	60	GATCAAGCGAAGAAGGAAGCAGGG
BAX <i>Botryllus</i> RE	BAXR1	64	CCTGGTCTGGCGGTTCTCGGTC
PARP <i>Botryllus</i> FW	PRPF	60	GGACTGTTATTGCTCGCTGAA
PARP <i>Botryllus</i> RE	PRPR	60	ATACCCTTGACGCTGTGCTT
BIRP1 <i>Botryllus</i> FW	IABF2	59	CAGAAATGGCGAAGGCAGGG
BIRP1 <i>Botryllus</i> RE	IABR	59	GGTCATGTTTCGCTAAATCGC
BIRP2 <i>Botryllus</i> FW	BIRF2	60	CGGGTTGTTATCACAGCAGCCTC
BIRP2 <i>Botryllus</i> RE	BIRR	60	GGATCTACCCTCTGCCACGC
NFkB(p105) <i>Botryllus</i> FW	NKBF	60	CGGTGATTTCAAACCCCATCGTCG
NFkB(p105) <i>Botryllus</i> RE	NKBR1	63	CTCCGTACCGCCAGTCGCC
PCNA <i>Botryllus</i> FW	PCNF2	59	CGCTCGCATTGCGGTGA
PCNA <i>Botryllus</i> RE	PCNR	63	TTCAACTCCGCCCCGCTG
KI67 <i>Botryllus</i> FW	BKF-RT	60	CGATCGGTTTCGTTTCAACTT
KI67 <i>Botryllus</i> RE	BKR-RT	60	GGTTGTGCGGTCTCAATTTT
NANOS <i>Botryllus</i> FW	BNAF-RT	60	TGGATGGCAATAATCGCATA
NANOS <i>Botryllus</i> RE	BNAR-RT	60	ACCTTTCGGTGCTATCCTT
GCLM <i>Botryllus</i> FW	GBBF2	54	CGAAAGCGTTGAGTGTATGG
GCLM <i>Botryllus</i> RE	GBBR1	57	CAAAATCAGTCACGCCGATGTG
GS <i>Botryllus</i> FW	BGSF-RT	60	CATGCGATCAGTCAAGATCC
GS <i>Botryllus</i> RE	BGSR-RT	60	TTGCCATTGCAGTCTTCTTG

SOD <i>Botryllus</i> FW	BSF-RT	60	CTGTGCAAGGACTGACTCCA
SOD <i>Botryllus</i> RE	BSR-RT	60	CCGGCATGATCAACCTTAGT
GPX1(sel) <i>Botryllus</i> FW	PXBF-RT	58	CGTCGCTACAAGACAAGGTGG
GPX1(sel) <i>Botryllus</i> RE	PXBR-RT	59	GGAAGCCACGACACCTTGC
GPX2(ser) <i>Botryllus</i> FW	BX36F-RT	60	GGAAATGGATGGACGCCGCA
GPX2(ser) <i>Botryllus</i> RE	BX36R-RT	60	CCTAACTCTTCGGTGTATGCGGGAC
<b>Primer per sonda ISH</b>			
<b>Descrizione</b>	<b>Sigla</b>	<b>T melting</b>	<b>Sequenza 5'-3'</b>
AC <i>Botryllus</i> FW	AUF2	55	GAGGTTATTCCTTACCACCAC
AC <i>Botryllus</i> RE	AUR	55	GGATGGGCCAGACTCG
BAX <i>Botryllus</i> FW	BAXF	60	GATCAAGCGAAGAAGGAAGCAGGG
BAX <i>Botryllus</i> RE	BAXR2	61	GTTGCGGCAGACAGAGAAACCAC
PARP <i>Botryllus</i> FW	PRF	57,5	ATGATCGACAGCCTGCTGGAT
PARP <i>Botryllus</i> RE	PRR	57	GTCATCAGCACTACACTGCGTA
BIRP1 <i>Botryllus</i> FW	IABF	57	GATAAAACGGCGGGACAATGC
BIRP1 <i>Botryllus</i> RE	IABR	59	GGTCATGTTTCGCTAAATCGC
BIRP2 <i>Botryllus</i> FW	BIRF1	60	ATTCCGTCACCACCCCCG
BIRP2 <i>Botryllus</i> RE	BIRR	60	GGATCTACCCTCTGCCACGC
NFkB(p105) <i>Botryllus</i> FW	NKBF	60	CGGTGATTTCAAACCCCATCGTCG
NFkB(p105) <i>Botryllus</i> RE	NKBR2	62	CGTTCGGACCGATCCTGGGTTC
PCNA <i>Botryllus</i> FW	PCNF1	58	CGAAGCCAAGTTGATTCAGGGAAG
PCNA <i>Botryllus</i> RE	PCNR	63	TTCAACTCCGCCCCCGCTG
KI67 <i>Botryllus</i> FW	K67F1	61	AGCAGTCCAGTATCAGAAGCCCCG
KI67 <i>Botryllus</i> RE	K67R	59	GCTGACCCTTGATTCTCTCCCTG
NANOS <i>Botryllus</i> FW	5NR1	56	ACCTCGGATGCTCATTTTGC
NANOS <i>Botryllus</i> RE	3NF1	58	GTTTCCAGAGGGCAATGACCAATCG
GCLM <i>Botryllus</i> FW	GBBF1	53	GTTGGAAAGAATCGGTAGGG
GCLM <i>Botryllus</i> RE	GBBR2	57	GCTTGGAAATGACTTCTCAGGGAG
GS <i>Botryllus</i> FW	GSBF1	55	CGAAGCCAACATCATCCGA
GS <i>Botryllus</i> RE	GSBR	55	CTCGGTTTCGCTCTCATCTG
SOD <i>Botryllus</i> FW	SODF	58	CCACGGGTTTTCACATTCACGAG
SOD <i>Botryllus</i> RE	SODR2	61	AATCCAATCACGCCACACGCC
GPX1(sel) <i>Botryllus</i> FW	PXBF-RT	58	CGTCGCTACAAGACAAGGTGG
GPX1(sel) <i>Botryllus</i> RE	PXBR	55	ACATCTCCAACGCAAGTCC
GPX2(ser) <i>Botryllus</i> FW	GPBF	58	CATTGCTTGTGCGAGTGCC
GPX2(ser) <i>Botryllus</i> RE	GPBR	57	GCCACCAGAGTGTCCCAATA

Tabella 1: PCR primer.

### Amplificazione del cDNA

L'amplificazione del cDNA mediante PCR è stata effettuata con una miscela di reazione contenente, oltre al primo filamento di cDNA (1  $\mu$ l) e ai primer progettati *ad hoc* elencati in Tabella 1, le seguenti componenti:

Buffer di reazione 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 $\mu$ l
dNTP mix (10mM)	1 $\mu$ l
Primer forward (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer reverse (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Xtra-Taq (5U/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O nuclease free	38,6 $\mu$ l
	<hr/> 50 $\mu$ l

La mix di reazione è stata, quindi, incubata in un termociclatore col seguente programma :

94°C per 2 min	}	
94°C per 30 s		
T° di <i>melting</i> ottimale per 30 s		35 cicli
72°C per 60s per ogni Kb		
72 °C per 10 min		

### Clonaggio del cDNA amplificato

I prodotti di PCR sono stati separati elettroforeticamente in gel d'agarosio e le bande corrispondenti alla lunghezza attesa dei cDNA amplificati sono state estratte utilizzando il kit ULTRAPrep Agarose Gel Extraction Mini Prep (AHN Biotechnologie), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Una volta quantificato, il DNA purificato è stato impiegato nella reazione di ligazione con il vettore pGEM®-T Easy Vector (Promega) (fig. 17), indispensabile per il clonaggio in *E. coli*. Infatti, la presenza nel plasmide del gene *amp<sup>r</sup>* per la resistenza all'ampicillina, ha permesso di sfruttare batteri sensibili all'antibiotico, riconoscendo in modo semplice quelli trasformati positivamente come gli unici in grado di crescere su un terreno selettivo contenente ampicillina.

La reazione di ligazione è stata effettuata a 4°C *overnight* tramite i seguenti reagenti: 1 $\mu$ l di tampone di ligazione, 5 $\mu$ l vettore pGEM®-T Easy (50ng/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l T4 DNA ligasi (3U/ $\mu$ l) (Promega), 1 $\mu$ l DNA estratto dalla banda, in quantità sufficiente per ottenere un rapporto di almeno 3:1 tra il cDNA ed il vettore, H<sub>2</sub>O sterile deionizzata per un volume finale di 10  $\mu$ l.

X $\mu$ l	H <sub>2</sub> O sterile,
5 $\mu$ l	Rapid Ligation Buffer 2X
1 $\mu$ l	Vettore "pGEM®-T Easy Vector" (50ng/ $\mu$ l),
1 $\mu$ l	T4 DNA Ligase (3U/ $\mu$ l).
X $\mu$ l	Prodotto di PCR

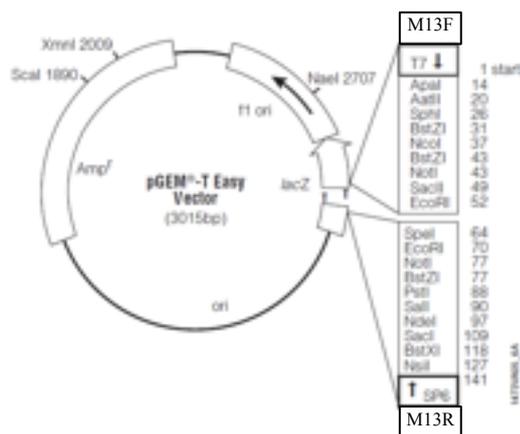


Figura 17: vettore “pGEM®-T Easy Vector” (Promega).

### Preparazione dei batteri competenti alla trasformazione

Batteri *E. coli* XL1-BLUE sono stati resi competenti sulla base di una metodica che prevede l’uso di  $\text{CaCl}_2$  (Tang *et al.*, 1994). La resa finale della procedura è stata saggiata mediante una normale trasformazione batterica, utilizzando come controllo il plasmide richiuso pUC18. I batteri sono stati stoccati a  $-80^\circ\text{C}$  in aliquote da 25  $\mu\text{l}$  di volume in glicerolo 50%.

### Trasformazione dei batteri competenti

Ad ogni aliquota di batteri (25  $\mu\text{l}$ ) sono stati aggiunti 2  $\mu\text{l}$  di prodotto di ligazione e, dopo un’incubazione in ghiaccio di 30 min, è stato indotto uno *shock* termico, ponendo il campione prima a  $42^\circ\text{C}$  per 30 s e poi in ghiaccio per 1 min. Dopo aver aggiunto 273  $\mu\text{l}$  di terreno SOC (tabella 1), i batteri sono stati incubati a  $37^\circ\text{C}$  in agitazione per 1 h, per permetterne la crescita. Successivamente, aliquote da 100 e 200  $\mu\text{l}$  di batteri trasformati sono state piastrate su terreno solido selettivo contenente LB Agar (tabella 2), ampicillina (concentrazione finale 0,1 mg/ml), X-Gal (2%) e IPTG (0,1 M) 0,4%. Infine, le piastre sono state lasciate *overnight* in stufa a  $37^\circ\text{C}$ , per favorire la formazione e la proliferazione delle colonie.

	Triptone	Estratto di lievito	Agar	Glucosio	NaCl	KCl	Mg SO <sub>4</sub>	pH
<b>LB Broth</b>	1%	0,50%	-	-	10 mM	-	-	7,0
<b>LB Agar</b>	1%	0,50%	1,50%	-	10 mM	-	-	7,0
<b>SOC</b>	-	0,50%	-	20 mM	10 mM	2,5 mM	20 mM	7,0

Tabella 2: composizioni dei terreni utilizzati.

### Screening delle colonie trasformate

Due diversi *screening* sono stati eseguiti sulle colonie cresciute, in modo da discriminare quelle che hanno subito un’effettiva trasformazione e presentano al loro interno l’inserto.

Screening visivo: considerando il meccanismo dell’ $\alpha$ -complementazione, sono state distinte placche batteriche di colore bianco, contenenti il plasmide ed il rispettivo inserto, e placche azzurre

caratterizzate invece dal vettore richiuso. Spesso questo test si è rivelato poco attendibile, pertanto, le colonie bianche selezionate sono state sottoposte ad un secondo *screening* più preciso.

Screening mediante PCR: le colonie realmente contenenti l'inserto sono state identificate tramite l'allestimento di una PCR con i *primer* M13F e M13R (tabella 1) che si appaiano alle regioni fiancheggianti il sito di policonaggio del vettore e con la successiva analisi elettroforetica delle dimensioni di ciascun amplificato.

### **Purificazione del DNA plasmidico**

Ogni colonia positiva allo screening è stata fatta crescere *overnight* in un terreno liquido LB Broth (tabella 2), in agitazione a 37°C. Il giorno successivo 2 ml di coltura stazionaria sono stati centrifugati per far sedimentare le cellule. Il DNA plasmidico è stato quindi purificato con il kit ULTRAPrep PLASMID DNA mini prep (AHN Biotechnologie), seguendo le indicazioni fornite dalla casa costruttrice.

### **Sequenziamento**

Il sequenziamento, di tipo Sanger, è stato eseguito presso il centro BMR Genomics, dotato di un sequenziatore automatico a 96 capillari modello ABI 3730XL. La sequenza è stata determinata attraverso una reazione di PCR con i *primer* M13F e M13R (Tabella 1).

### **RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

La RACE è una procedura che permette di risalire alle porzioni di sequenza mancanti in un trascritto incompleto. In particolare, attraverso le due reazioni di amplificazione 5' e 3' RACE, il frammento di cDNA disponibile viene allungato fino ad ottenere le regioni 5' e 3' terminali.

La metodica della 3' RACE si basa sull'utilizzo della coda di poly(A) all'estremità 3' terminale dell'mRNA come generico sito di attacco per un *primer Anchor* Oligo(dT), mentre la 5' RACE sfrutta l'aggiunta mediante transferasi di una coda di poly (C) all'estremita 5' del cDNA sintetizzato con oligo specifici alla sequenza da completare. In questo modo, la reazione di PCR con un primer forward complementare alla coda poly (C) ed un reverse specifico del cDNA, produce la porzione ricercata.

### **3' RACE**

Per determinare la regione non tradotta al 3' terminale, è stata effettuata una normale PCR utilizzando come *primer forward* un oligonucleotide specifico, costruito all'interno della sequenza codificante nota, e l'*Anchor primer* che riconosce e si lega all'Oligo(dT) del cDNA, come *primer reverse* (Tabella 1).

La reazione è stata incubata con il seguente profilo termico:

94°C per 2 min	}	35 cicli
94°C per 30 s		
T°C ottimale per 30 s		
72°C per 90 s		
72°C per 5 min		

### **5' RACE**

Questa tecnica è stata eseguita seguendo le indicazioni del kit commerciale dell'Invitrogen ed è suddivisa in tre fasi.

• *Sintesi del primo filamento di cDNA e purificazione*

La sintesi del primo filamento di cDNA è stata realizzata con primer specifici per le sequenze di interesse (tabella 1). La reazione catalizzata da una trascrittasi inversa fornita dal kit (SuperScript™ II RT) in presenza del rispettivo buffer (Promega), ha portato alla formazione di un doppio filamento ibrido di mRNA-cDNA. L'emifilamento di mRNA è stato poi degradato mediante l'intervento di una RNasi mix, mentre il cDNA a singolo filamento è stato purificato con una colonna S.N.A.P., fornita dal kit e composta da una membrana silicea capace di legare il cDNA. I componenti del buffer, i dNTPs non utilizzati, gli enzimi ed i primer rimasti in soluzione sono stati rimossi dopo centrifugazione.

• *TdT tailing*

La procedura di TdT *tailing* avviene attraverso l'uso combinato della TdT (*Terminal deoxynucleotidil Transferase*) con il nucleoside trifosfato dCTP, sintetizzando una coda omopolimerica di poly (C) all'estremità 5' del primo filamento di cDNA purificato che funge da sito di attacco per un *anchor primer* specifico nella reazione finale di amplificazione.

• *Amplificazione del cDNA dC-tailed*

Il cDNA polyC è stato amplificato tramite PCR, usando i diversi *primer reverse* progettati in precedenza (tabella 1) e come *primer forward* l'AAP (*Abridged Anchor Primer*) (tabella 1), costituito da una sequenza complementare alla coda di polyC e fornito dal kit commerciale utilizzato.

Le componenti della reazione sono:

- H<sub>2</sub>O sterile
- 10x PCR buffer
- MgCl<sub>2</sub> 25mM
- dNTP mix 10mM
- Primer RE 10μM
- AAP 10μM
- cDNA dC-tailed
- Taq DNA polimerasi 5U/μl

Il programma di PCR impiegato è stato il seguente:

94°C per 2 min	}	35 cicli
94°C per 30 s		
55°C per 30 s		
72°C per 1 min		
72°C per 5 min		

Per controllare l'esito dell'amplificazione, i campioni sono stati separati mediante elettroforesi in gel d'agarosio e mandati a sequenziare.

**Studio di espressione**

**Real-Time PCR (qRT-PCR)**

La Real Time PCR è una tecnica che permette di stabilire quantitativamente il cDNA amplificato durante una reazione di PCR. La misura dell'amplificazione è data dalla fluorescenza prodotta dal SYBR Green, una molecola non specifica che si lega al solco minore del doppio filamento di DNA. Il segnale del SYBR Green comincia ad essere rilevato in corrispondenza delle prime molecole di cDNA sintetizzate: pertanto, l'aumento della fluorescenza è strettamente dipendente dal numero di molecole amplificate. Le condizioni sperimentali delle varie reazioni, ripetute almeno due volte, sono state realizzate con campioni di cDNA di due diverse colonie, caricati singolarmente in triplicato, e coppie di primer ad una concentrazione finale di 0,3  $\mu$ M che producono un amplicone di circa 150 bp al massimo.

La miscela di reazione impiegata è stata la seguente:

Acqua mQ	5,6 $\mu$ l
Primer F	0,3 $\mu$ M
Primer R	0,3 $\mu$ M
FastStart Universal SYBR Green Master (Roche)	10 $\mu$ l
	18 $\mu$ l

Infine, dopo aver aggiunto 2  $\mu$ l di cDNA, è stata incubata in un apposito termociclatore (Applied Biosistem AB PRISM 7900 HT fast real-time PCR System) con il seguente profilo termico:

50°C per 1 min		
95°C per 10 min		
95°C per 10 s	}	40 cicli
60°C per 1 min		

I valori di espressione di ogni gene sono stati normalizzati su quelli dell'actina citoplasmatica, considerata come gene housekeeping di riferimento. Applicando la formula del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Pfaffl, 2001), il livello di espressione di ciascun trascritto nel ciclo blastogenetico, è stato calcolato come la differenza fra i campioni in regressione e negli stadi intermedi di una stessa colonia. I risultati sono espressi come % di induzione  $\pm$  deviazione standard.

### Ibridazione *in situ*

L'ibridazione *in situ* consente di identificare i siti di trascrizione di uno specifico gene di interesse, sintetizzando *in vitro* una sonda di RNA complementare all'mRNA da localizzare. Il segnale associato alla ribosonda deriva dall'uso, nella reazione di sintesi, di molecole di uracile modificate con una molecola di biotina legata (Biotin RNA labelin dNTPs mix, Roche). Ad ibridazione avvenuta, la biotina presente nella sequenza della sonda interagisce con il complesso streptavidina-perossidasi che, in presenza di un substrato adeguato, si attiva e reagisce formando un precipitato colorato.

Il template utilizzato per la sonda, è stato ottenuto tramite amplificazione con PCR (tabella 1). Successivamente, i frammenti sono stati clonati nel vettore pGEM-T Easy, come precedentemente descritto.

### Costruzione sonde a RNA

Oltre alle sonde anti-senso, sono state prodotte anche sonde senso che, a differenza delle prime non sono complementari al messaggero ricercato, ma ne rappresentano una copia esatta con identica sequenza. Queste sonde senso sono state utilizzate come controllo negativo.

La costruzione delle sonde può essere suddivisa in due diversi passaggi:

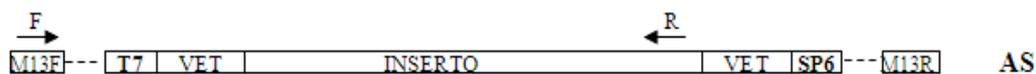
a) Scelta della RNA polimerasi ed amplificazione

A seconda del tipo di sonda da sintetizzare e del verso della sequenza clonata all'interno del vettore, l'inserto ed una delle due regioni fiancheggianti che contengono i promotori per le RNA polimerasi T7 ed SP6, sono stati amplificati con i primer M13F o M13R ed i forward e reverse specifici del trascritto.

- Nel caso di inserimento della codificante in direzione 5'→3', si dovranno utilizzare i seguenti primer per ottenere le relative sonde:



- Nel caso di inserimento della codificante in direzione 3'→5', si dovranno utilizzare i seguenti primer per ottenere le relative sonde:



La miscela ed il profilo termico sono identici a quelli della reazione di amplificazione del cDNA. Il prodotto di PCR è stato purificato tramite l'ULTRAPrep PCR KIT (AHN Biotecnologie) e poi quantificato come descritto in precedenza.

b) Produzione della sonda

Sulla base del protocollo per le T7 ed SP6 polimerasi (Promega), l'inserto amplificato è stato incubato per 3 h a 37°C con questa miscela di reazione:

Transcription optimized 5X Buffer (Promega)	4 µl
DTT 0,1M (Promega)	2 µl

RNase inibitor (Jena Bioscience)	0,5 µl
Biotin RNA labelin dNTPs mix (Roche)	2 µl
DNA templatato (1 µg)	X µl
RNA polimerasi (Promega)	SP6=1,2 µl ; T7=2 µl
H <sub>2</sub> O <i>nuclease free</i>	X µl
	20 µl

Terminate le 3 h, 1 µl di DNAsi I (1 unità/µl) è stato aggiunto alla mix, lasciandola altri 15 min a 37°C. In seguito a purificazione con Mini Quick Spin Columns kit (Roche), si è ottenuta la ribosonda coniugata.

### Ibridazione *in situ* su striscio di emociti

Gli emociti sono stati prelevati con una sottile micropipetta di vetro da sistemi precedentemente immersi in soluzione antiaggregante di citrato di sodio 0.38% in acqua di mare filtrata, pH 7.5 (FSW), eseguendo lacerazioni dei vasi marginali mediante un sottile ago di tungsteno. Dopo aver lasciato sedimentare le cellule in una provetta di tipo Eppendorf a 4°C per 5 min per eliminare eventuali residui tissutali, si è centrifugato a 3000 rpm per 10 min. Il pellet ottenuto è stato poi risospeso in FSW ed una sospensione di emociti pari a 60 µl è stata posta al centro di vetrini pretrattati Superfrost Plus, lasciandola aderire per circa 30 min. Dopo due lavaggi in FSW per 5 min, gli emociti sono stati fissati con liquido di *Karnowsky* (4% di paraformaldeide e 0,1% di glutaraldeide in tampone Na-cacodilato 0,4 M, pH 7,4, contenente NaCl 0,29 M e saccarosio 29 mM) per 30 min a 4°C, risciacquati in PBS 1X, permeabilizzati per 4 min con TritonX 0,1% in PBS e lavati di nuovo in PBS. Prima dell'ibridazione, sono stati incubati per 1 h a 65°C in *Hybridization Cocktail 50% Formamide* e successivamente ibridati *overnight* a 65°C nella stessa mix contenente 1 µg/ml di sonda biotinilata. Dopo due lavaggi di 5 min in SSC 2x, tre a 65°C in 50% formamide in SSC 2x per 30 min e due in PBS-T per 5 min, gli emociti sono stati trattati per 30 min con una soluzione di blocco della perossidasi endogena (5% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in metanolo) e lavati in PBS-T. Quindi, sono stati lasciati reagire per 30 min con il complesso avidina-biotina-perossidasi, prima di essere lavati in PBS-T e colorati con True Blue per 10 min. I vetrini sono stati montati con Aquovitrex (Carlo Erba) e osservati al microscopio ottico (Leitz DIALUX 22). Come controllo positivo, è stata impiegata una sonda antisense specifica per l'mRNA dell'actina citoplasmatica, prodotta sulla base della sequenza di cDNA registrata in GenBank.

### Allineamenti multipli e analisi di sequenza

Gli allineamenti multipli, utilizzati per inferire le relazioni filogenetiche, sono stati effettuati impiegando il programma Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Tutti gli allineamenti sono stati controllati ed eventualmente modificati manualmente.

Le sequenze sono state analizzate attraverso i software gratuiti disponibili agli indirizzi internet:

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>: analisi BLAST
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>: individuazione di *open reading frame* (ORF)
- <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>: traduzione delle sei ORF possibili
- [http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html): creazione di sequenze complementari-invertite

- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>: allineamenti con clustalw
- [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html): allineamenti tra due o più sequenze
- <http://smart.embl-heidelberg.de/>: identificazione di domini proteici evolutivamente conservati
- <http://www.elm.eu.org/>: predizione di motivi e siti funzionali proteici

### **Alberi filogenetici**

Gli alberi filogenetici sono stati costruiti tramite il programma Mega 5 (Kumar *et al.*, 2004). Per ottenere il maggior numero di informazioni, sono stati utilizzati quattro differenti metodi che si distinguono per algoritmi e parametri considerati: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Sneath e Sokal, 1973), Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), Minimum Evolution (Rzhetsky e Nei, 1992) e Maximum Parsimony (Fitch, 1971).

## RISULTATI

### ANALISI DI SEQUENZA

#### Geni coinvolti nell'apoptosi

##### - BAX

L'accesso al database di EST 454 *Botryllus* specifiche, dell'Università di Santa Monica (CA) ha permesso di individuare, attraverso l'analisi in BLAST, i probabili full-length di alcuni geni coinvolti nell'apoptosi. Tra questi, la sequenza che mostrava un'elevata similarità per il gene proapoptotico BAX, è stata utilizzata per disegnare i due primer BAXF e BAXR2 (fig. 18). La loro amplificazione tramite reazione di PCR, ha prodotto un frammento della lunghezza attesa di 725 pb che è stato quindi allungato mediante 5' e 3' RACE, fino ad ottenere un mRNA finale di 2004 pb. Il trascritto completo è caratterizzato da un Open Reading Frame (ORF) di 780 pb che codifica per una proteina putativa di 259 aa. La sequenza proteica di BsBAX contiene tra gli amminoacidi 128 e 226 il caratteristico dominio BCL-2 con i tre sottodomini BH1, BH2 e BH3. Il primo è compreso tra gli amminoacidi 163-182, il secondo tra 218 e 232 e l'ultimo tra 128 e 136 (fig. 18). Inoltre, è presente un dominio transmembrana (234-256 aa), numerosi siti di legame per le proteine di tipo BH3 (131-132; 134-135; 141; 144-145; 155-156; 159-160; 163-164; 171; 173-174; 176-177; 181; 185; 232;) e nelle posizioni 161 e 191 due potenziali cisteine impegnate nella formazione di omodimeri od eterodimeri. Ulteriori analisi con software specializzati disponibili online, hanno portato al riconoscimento di altri motivi funzionali come regioni di legame delle caspasi 3 e 7 e degli inibitori dell'apoptosi, di interazione con la proteina 13-3-3, vari residui di fosforilazione tramite chinasi PKC, GSK3, p38 e JNK, infine alcuni amminoacidi critici per l'attività di BAX.

```
TGTTA
TAAGTTGATTGGCGATTGCTCTTCAGGCTCTCCTTGATTTCGAAGTTGTTAGTATATA
GGCAGCCGCTATCTAACATATAGATATACGGTATAACCATTCCATTTCTTGTGTGGCA
1
1 M
ATG
2 S G G G D Q A K K E A G K I D D K N D E
4 TCGGGGGGCGGTGATCAAGCGAAGAAGGAAGCAGGGAAGATAGATGATAAAAATGACGAG
22 D P R P S R P T R P R T A R P G R R T D
64 GATCCTCGACCATCTAGGCCAACCCGACCGAGAACCGCCAGACCAGGTAGAAGAACAGAT
42 P E S S L V Q G A V G G E G S Y T R H L
124 CCTGAATCGTCTTTGGTCCAGGGAGCTGTTGGTGGGGAAGGTTTCATACACGAGACATCTA
62 T E E E R A V G N Q A R H L L T M F I S
184 ACTGAGGAGGAAAGAGCTGTTGGAAACCAAGCAAGGCATCTTCTGACAATGTTTATCTCT
82 D R A E R D P D L S Q D K K G A V Q E T
244 GACAGAGCAGAACGTGATCCCGACCTGTCGCAGGATAAGAAAGGAGCTGTACAGGAAACA
102 V Q L C N K S S E S N A M S D S D A A L
304 GTTCAGTTATGTAACAAGAGCTCGGAAAGTAATGCGATGAGCGATAGCGATGCTGCTTTA
122 R E V S L T L R V I G D Q L N E D N D L
364 AGGGAGGTATCATTGACCTTGCGTGTATTGGAGATCAGTTGAATGAAGACAATGACCTT
142 N S L I D R V L V Q P T K D I F M K V C
```

424 AACAGCCTTATTGATAGAGTTCTCGTTCAACCCACCAAGGACATCTTCATGAAAGTTTGT

162 K O I F A D O N F N W G R V A A V F Y F

484 AAACAGATATTTGCCGATCAAAATTTCAACTGGGGCAGAGTAGCCGCTGATTCTACTTT

182 A Y R L I T K A V C T T M D E G I D W I

544 GCGTACAGACTTATAACAAAGGCTGTATGCACAACCATGGATGAAGGCATAGATTGGATT

202 K D I M S W A M D F L Y Q Y V L W W I V

604 AAAGATATTATGAGTTGGGGCATGGACTTCTTATATCAGTATGTTCTTTGGTGGATTGTC

222 O R G G W G M I R E Y F G T P T A Y V V

664 CAAAGGGGAGGTTGGGAATGATCAGAGAATACTTTGGAACACCGACTGCGTATGTGGTT

242 S L S A A T I L T V L Y V W W K Q Q - 259

724 TCTCTGTCTGCCGCAACAATACTTACTGTTTTGTATGTATGGTGGAAAGCAGCAATGA 850

TCT

TAAACTTTATCATTCCCTGTTTTTACCAAGATCACGTCTTAGATATGAAATTTACCCAGT  
 GCCTTTTATAACGGCTACATCTGGTTTTATTGTAGGAAGTTTCTGTTGGACATA  
 CTCTAGATCAGTAATCGGCAATCTATTTTGGCTCTGCAGACTGGTTCCAAAATGCAACAC  
 ACAAATTTCAATTAAGCGACTAACCTAATTCTGTTTATTAATCAGTATGATTGACCA  
 CTATAATTCTAAAACCTTCACTTAAGTGGCAAGAGTATATGAAATCCACGCAGACCGTCA  
 CCGTCTGCAAACCGTGGGTTGCCGACCACTCCTCCATATTACATTCATTTGTGAAATCGA  
 TCTAGATGTGATGAATATCAATGTTATGCATTGAAATTTGTCCAACAATTGCAGAGCCA  
 CTGAAATTTGGTTTCAGGATTTCTTGAAAATAAAATGGAACGATGATTCATCAGTTTT  
 GGCATAGCAACAAAGGTGACATGCCATAGCAAACCTTCATTTGGAAAATATCAGGATTT  
 TGTGAGTGGGGTGTAACTCCCGTCAATTTGGTTGATGGACAAAGCTGAATGTCGATACTTA  
 TATACGAGTATCCCCGGTTTGTCCAAAATAATTGGTGTCTCTGCTTGCATATGGTGTCT  
 GTTTTCGGTACACCAACAATGGATTATGCTCCAGTTAGTCATGAGTTATACAAGGTGCTA  
 TTTTCTTCAAATGAGCAAATAATGATCCCTGAATGTCGTCTCTATTGACATGCGATCTC  
 CTTTTTTACCCAGTAGACTTGAATCCAATTGGGTCTCGTTTGTATTTTTTGGCTCTATA  
 GATCAAGTACATTTTAAAGAATGAAGCCTAATGATTTACTCATATTGCTCTGTTGCGTGG  
 TTGTCTACTGTGTTCTAATCATGGGAGAAAAATCTGCGTCTCTACTGTGATTATTTGA  
 GTCGATGTGTTTCGTGACTTGACAATCCAGCATATATTCTCAGCGTTTTACGATCAATTT  
 ATTGCTCAATTATGCGTATTTAATAAAAATATCATGTAGTTTTTGTAGATAACCTACAAA  
 GATTGCTTACCTGGAAAAAAA

Figura 18: mRNA e tradotto predetto di BsBAX. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione gialla rappresenta il dominio BCL-2, le porzioni sottolineate i tre sottodomini BH1, BH2 e BH3 e in azzurro il dominio transmembrana C-terminale.

Il confronto di BsBAX con gli orologi dei diversi phyla animali, ha evidenziato una maggiore percentuale di identità nei vertebrati, soprattutto negli anfibi con il 33,6% di *Xenopus laevis*, nei mammiferi con il 32,3% del ratto e negli uccelli con il 30,9% di *Taeniopygia guttata*. L'ascidia *Ciona intestinalis* che con *B. schlosseri* appartiene al subphylum degli urocordati, ha un valore di poco inferiore del 30% (fig. 19).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Rattus norvegicus (isoforma b)</i>	32,3	39
<i>Rattus norvegicus (isoforma a)</i>	31,9	39
<i>Sus scrofa (isoforma 1)</i>	31,9	43

<i>Sus scrofa</i> (isoforma 2)	29,7	38
<i>Sus scrofa</i> (isoforma 3)	24,2	44
<i>Mus musculus</i>	31,5	39
<i>Macaca mulatta</i>	31,2	37
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (isoforma 1)	31,2	38
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (isoforma 2)	28,6	35
<i>Homo sapiens</i> (isoforma alfa o psi)	30,8	37
<i>Homo sapiens</i> (isoforma beta)	26,6	37
<i>Homo sapiens</i> (isoforma gamma)	6,6	44
<i>Homo sapiens</i> (isoforma delta)	23,8	43
<i>Homo sapiens</i> (isoforma sigma)	28,6	34
<i>Homo sapiens</i> (isoforma epsilon)	22,8	35
<i>Homo sapiens</i> (isoforma zeta)	20,4	43
<i>Homo sapiens</i> (isoforma theta)	17,1	46
<i>Taeniopygia guttata</i>	30,9	35
<i>Gallus gallus</i>	20,7	32
<i>Anolis carolinensis</i>	29,3	40
<i>Xenopus laevis</i>	33,6	40
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	33,2	39
<i>Onchorynchus mykiss</i> (isoforma a)	28,1	30
<i>Danio rerio</i> (isoforma a)	26,6	36
<i>Ictalurus punctatus</i>	27,8	36
<i>Oreochromis niloticus</i>	27,6	37
<i>Salmo salar</i>	24,7	36
<i>Esox lucius</i>	20,2	36
<i>Ciona intestinalis</i>	30	41
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	26,4	33
<i>Crassostrea gigas</i>	22,2	37
<i>Drosophila melanogaster</i> (Debcl)	14,1	18
<i>Hydra magnipapillata</i>	23,4	31
<i>Acropora millepora</i>	18,2	30

Figura 19: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsBAX e gli ortologhi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, azzurro i platelminti, rosa scuro i cnidari.

L'allineamento di BsBAX con le sequenze ortologhe di questi organismi ha confermato l'alto tasso di conservazione amminoacidica della proteina a livello del dominio BCL-2 e delle componenti BH1, BH2 e BH3 (fig. 20).





L'analisi filogenetica sulle sequenze proteiche delle specie considerate, condotta con i metodi di massima parsimonia, UPGMA, minima evoluzione e neighbor joining, ha prodotto un albero in cui la sequenza di BsBAX si stacca dalla maggior parte dei vertebrati, riuniti in cluster diversi, tranne alcune specie più variabili che tendono a divergere. Sia BsBAX che gli ortologhi di quest'ultime presentano valori di bootstrap molto bassi che non supportano in modo solido i rapporti evolutivi ipotizzati (fig. 21).

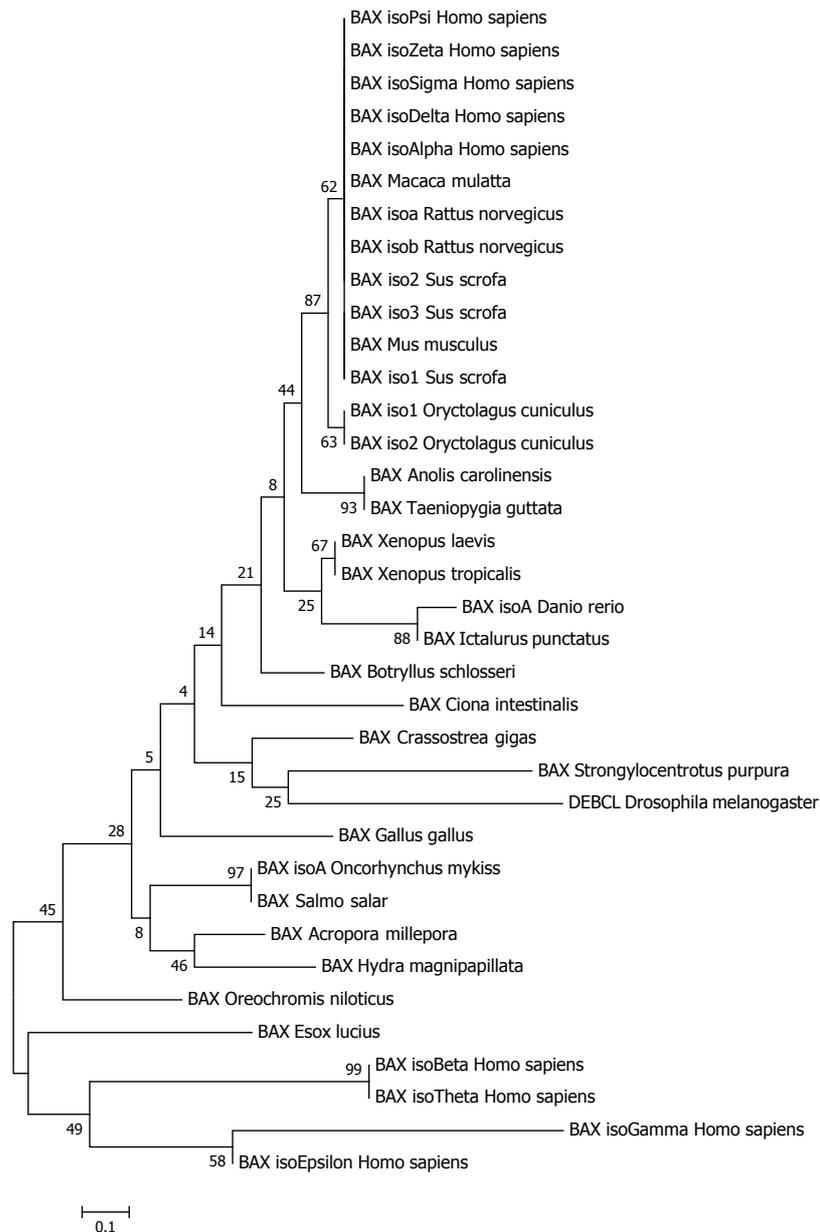


Figura 21: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di BsBAX nei metazoi, indicate in figura 19, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - AIF

Una serie di sequenze, tra le EST esaminate in BLAST, sono risultate estremamente simili al gene per AIF e quella più lunga è stata utilizzata per costruire i due primer specifici AIFF1 ed AIF-R (fig. 22). La reazione di PCR ha fornito un amplicone della lunghezza attesa di 928 pb, il quale è stato poi completato tramite 5' e 3' RACE. Il messaggero è di 2048 pb e presenta una regione codificante di 1737 pb che esprime un tradotto putativo di 578 aa. Quest'ultimo è costituito, come nell'AIF degli altri organismi, dal dominio conservato piridin nucleotide-disolfuro della famiglia delle ossidoriduttasi FAD-dipendenti di classe II, compreso tra gli amminoacidi 106-413, al cui interno, negli amminoacidi 271-357, è presente un dominio piridin nucleotide-disolfuro di legame dell'NADH ed, infine, un dominio C-terminale tra i residui 434-555 contenente una regione di dimerizzazione (447-568 aa) (fig. 22). BsAIF possiede un dominio transmembrana all'N-terminale (57-79 aa), un motivo di localizzazione nucleare (415-420 aa) e numerosi siti di legame per il FAD (111-115; 137-138; 423-424; 145; 150; 206; 254; 407 aa). Si distinguono anche importanti residui di fosforilazione, di acetilazione e di ubiquitinazione.

```
TTATAAGTATAGATTCAACTATAGAACTCTTCAATC
1 M Y C F S R M H
1 ATGTATTGTTTTAGTCGGATGCAC
9 N R V G I L L K N V S K S K E Y V Q T F
25 AATCGGGTTGGAATACTGCTAAAGAAATGTGTCAAAAAGCAAAGAATACGTTCAAACATTT
29 G V R G Y R F T R K D Q R P Q Q L H T H
85 GGGGTCAGAGGATACAGGTTCACTAGAAAAGACCAACGACCACAGCAGTTGCACACGCAT
49 R S L D L P T H V G S A V C I G T G M M
145 CGGTCACTTGACCTCCACGCATGTTGGGTCTGCTGTTTGCATTGGAACGGGGATGATG
69 F F G I A G V Y Y A M E P K A A E V A E
205 TTCTTTGGAATTGCTGGAGTTTATTATGCCATGGAGCCAAAAGCTGCTGAAGTCGCTGAA
89 V P S E E S G P L L P T V P E S A Q Y L
265 GTACCGTCGGAAGAATCTGGCCCACTGTTACCAACTGTCCCGGAGTCTGCACAATATCCT
109 L I G G G T A S H S A M R A I R K R D P
325 TTGATCGGAGGAGGCACGGCATCTCATTGCGCAATGCGCGCCATCAGGAAAAGAGATCCA
129 T A K I L I I T E E E L R P Y M R P P L
385 ACTGCAAAAATTTAATCATCACCGAAGAAGAACTTCGACCTTACATGCGACCCCGCTC
149 S K E L W Y S D D R E L A R Q L I F K Q
445 TCAAAGGAACCTGTTACTCGGACGATCGCGAGTTGGCGGGCAACTTATTTTCAAACAA
169 W N G K T R S L F F E K E G F Y S D P S
505 TGGAACGGAAAACGAGGAGTTTATTTTTTTGAGAAGGAAGGATTTTATTCGGACCCTTCA
189 E L S S L E S G G V G L L T G K K V L S
565 GAATGTGTCGCTAGAAAAGCGGGGGCGTCCGACTACTTACTGGAAGAAGGTTTTGTCG
209 I S V K D N S V T L D D G S I V K F E K
625 ATATCTGTAAAAGATAAATTCGGTTACTCTCGATGACGGGTCGATTGTGAAATTTGAGAAA
229 C L I A T G G K P K S L P V F E N H S N
685 TGCTCATCGCGACCGGGGAAACCGAAAAGTTTGCAGTTTTTGAATAACACAGCAAC
249 K T T L F R T A A D F E T L D S L T D G
```

745 AAAACAACGCTTTTTTCGAACGGCGGCCGATTTTCGAGACTTTGGATTCTCTCACCGATGGA

269 I E S V T V I G G G F L G S E L A C A L  
805 ATAGAATCTGTTACTGTGATAGGAGGAGGATTCTTGGGAAGCGAACTGGCTTGCGCGCTT

289 G H K G S K S G L K V T Q I F P E A G N  
865 GGCCATAAAGGCTCCAAGTCAGGCTTGAAAGTGACGCAAATCTTTCCGGAAGCCGGCAAC

309 M G R V L P E Y L T K W T T E K V R K E  
925 ATGGGCCGCTTCTGCCGAATATCTCACAAAGTGGACGACGGAAAAAGTTTCGTAAAGAG

329 G V D V I T H S V V K S V S E D N D K V  
985 GGTGTCGATGTGATCACTCATTCCGTCGTCAAGTCAGTGTGAGAAGACAATGACAAAAGT

349 Q L S L S N G E K I A T D H L V V A V G  
1045 CAGTGTCTCTCAGTAACGGAGAAAAGATCGCCACCGATCATCTGGTTGTTGCCGTAGGT

369 L D I D T K L A A S A G I E V D E T Q G  
1105 TTAGACATCGACACGAAACTGGCAGCTTCCGCAGGTATCGAAGTGGATGAAACGCAAGGC

389 G Y R V N A E L Q A R N N I W V A G D A  
1165 GGGTATCGGGTTAATGCCGAGTTGCAAGCGAGAAAACAATATCTGGGTGGCAGGAGACGCA

409 A C F Y D I K L G R R R V E H H D H A V  
1225 GCGTGTCTTCTACGACATCAAGCTTGGAAAGGAGAGAGTGGAGCACCATGACCATGCGGGT

429 V S G R L A G E N M T G A G K P Y W H Q  
1285 GTCAGCGGCAGATTGGCCGGAGAAAATATGACCGGTGCCGGTAAACCATACTGGCACCAA

449 S M F W S D L G P D V G Y E A I G I V D  
1345 TCCATGTTTTGGTCCGATCTCGGTCCCGATGTGGGATATGAAGCCATTGGAATTGTGGAC

469 A K L P T V G V F A K A T A A D T P R A  
1405 GCCAAACTGCCTACTGTCCGAGTCTTTGCTAAAGCCACGGCAGCCGACACGCCACGCGCT

489 A A E A T G E G V R S E Q E A A E P A I  
1465 GCAGCAGAAGCCACTGGCGAAGGCGTACGGTCTGAACAGGAAGCGGCAGAACCTGCTATT

509 R V T S A N V D S E D F G K G V V F Y V  
1525 CGCGTGACTTCAGCCAATGTTGACTCGGAAGACTTCGGCAAGGGTGTAGTTTTCTACGTG

529 R Q K K V V G I L L W N I F G R T G I A  
1585 CGACAAAAGAAAGTCGTCGGGATACTGCTGTGGAACATTTTCGGGCGCACTGGAATTGCG

549 R K I I H D Q Q E H D D Y R E L A K L F  
1645 AGAAAGATCATTCATGACCAACAAGAACACGACGACTACCGAGAACTCGCAAAACTGTTT

569 K I H K E D F E D E - 578  
1705 AAAATTCAAAAGAAGATTTTGAAGACGAA TGA ATCCAAACGTTTTCGATATCTCAGATGC 1737

CAAATATGATATTGTCACCTATAAATATCAGAAGTGTGTAATAATGCTGTTAAGTGTCTGT  
ACCAAGAAGAAAGCCGAACCCAACGTATGTAGGGGAGTTGGAGCTTTATCAAGTCTTCGT  
GGTAGGACCTTAACACTAGATAATTTCAACGTTTCCAAATATGATTAGAGTTCGAAT  
CTAGCTACAGTTTTTTAAATTAGACTAGAGTAGAGCAGATTATTAATTAGAATCACTG  
AATTTTAAAAA

Figura 22: mRNA di BsAIF e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione rosa rappresenta il dominio transmembrana N-terminale; arancio il dominio piridin nucleotide-disolfuro classe II; giallo il dominio piridin nucleotide-disolfuro legante l'NADH; lilla il motivo di localizzazione nucleare; azzurro il dominio C-terminale con in grassetto la regione di dimerizzazione.

Le ricerche sulla similarità di BsAIF rispetto a vari ortologhi negli animali, hanno mostrato le percentuali di identità più alte in due organismi invertebrati: nell'altro tunicato *C. intestinalis* con il 55% e nel riccio di mare *Strongylocentrotus purpuratus* con il 52,7%. Similmente, BsAIF condivide valori intorno al 50% anche con le sequenze di molti gruppi vertebrati, come quelle di *Danio rerio* e *Meleagris gallopavo* (52%), *A. carolinensis* (51,6%), *Xenopus tropicalis* (50,5%) e *Homo sapiens* (50,9%) (fig. 23).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 1)	49,8	58
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 2)	50,9	58
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (isoforma 1)	50,7	59
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (isoforma 2)	49,4	59
<i>Sus scrofa</i> (isoforma 1)	49,2	57
<i>Sus scrofa</i> (isoforma 2)	50,6	52
<i>Rattus norvegicus</i>	49,5	58
<i>Meleagris gallopavo</i>	52,3	60
<i>Taeniopygia guttata</i>	52,1	61
<i>Gallus gallus</i>	52	60
<i>Anolis carolinensis</i>	51,6	61
<i>Crotalus adamanteus</i>	50,2	60
<i>Chelonia midas</i>	49,3	57
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	50,5	62
<i>Danio rerio</i>	52,3	63
<i>Takifugu rubripes</i>	51,9	61
<i>Oreochromis niloticus</i>	49,3	62
<i>Oryzias latipes</i>	46,2	62
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	44,7	60
<i>Ciona intestinalis</i>	55,6	60
<i>Saccoglossus kovalevski</i>	50	58
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	52,7	63
<i>Crassostrea gigas</i>	42	48
<i>Apis mellifera</i>	42,1	53
<i>Tribolium castaneum</i>	41	54
<i>Camponotus floridanus</i>	40,6	50
<i>Culex quinquefasciatus</i>	39,6	47
<i>Drosophila melanogaster</i> (isoforma A)	38,1	48
<i>Drosophila melanogaster</i> (isoforma B)	35,2	48
<i>Loa loa</i>	36,2	47
<i>Caenorhabditis elegans</i>	27,5	37
<i>Hydra magnipapillata</i>	46,8	57
<i>Suberites domuncula</i>	40,7	48
<i>Amphimedon queenslandica</i>	40,3	48

Figura 23: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsAIF e gli orologi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, verde smeraldo gli emicordati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, limone i nematodi, rosa scuro i cnidari, verde scuro i poriferi.

L'allineamento di BsAIF con gli orologi considerati, ha sottolineato, come già osservato sopra, l'elevata concentrazione di residui conservati, soprattutto in corrispondenza delle regioni fondamentali per la sua funzionalità, come i due domini ossidoriduttasi, i vari elementi di legame del FAD, il segnale di localizzazione nucleare e la porzione di dimerizzazione C-terminale (fig 24).



AIFI Suberites domuncula  
 AIFI Amphimedon queenslandica  
 AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 AIFI Cliona intestinalis  
 AIFI Tetraodon nigroviridis  
 AIFI Takifugu rubripes  
 AIFI Oryzias latipes  
 AIFI Oreochromis niloticus  
 AIFI Danio rerio  
 AIFI Isod Cytolagus cuniculus  
 AIFI Isod Homo sapiens  
 AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 AIFI Isod Sus scrofa  
 AIFI Isod Sus scrofa  
 AIFI Isod Sus scrofa  
 AIFI Isod Homo sapiens  
 AIFI Anolis carolinensis  
 AIFI Crataegus edmanae  
 AIFI Melospiza gallopavo  
 AIFI Gallus gallus  
 AIFI Taeniopygia guttata  
 AIFI Chelonia mydas  
 AIFI Xenopus tropicalis  
 AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 AIFI Isod Drosophila melanogaster  
 AIFI Apis mellifera  
 AIFI Comptosia floridana  
 AIFI Tribolium castaneum  
 AIFI Culex quinquefasciatus  
 AIFI Hydra magnipapillata  
 AIFI Caenorhabditis elegans  
 consensus\* 50

EVFV.....  
 AS.....  
 .AEATETKSTQNVTEKRRCTEKRRNVIISPAKTHESVLPKRVNVCYCFPSADPTEPAAEPAAVEPSPAAPGAEPAASSETAEPVPEATVMMKROAAALSOASAARETFAPHFQGP  
 ..CG.....  
 .VFEDQFAAPS...LEEPSAE.....V.....EAPKEETAPETITTFDIPVEGSEEAASAAAAPVQIIEPLVSSSEPPAVESVLAEPAA...AEPFASERPE...FOPE  
 .VENTETKAT...T...E...PKPEAPSSQEP...S...PPASCTIAVTSST...TELP...AVG.....  
 .APAAEPID.....P.....  
 .OV.....  
 .AIFI Isod Cytolagus cuniculus  
 .AIFI Isod Homo sapiens  
 .AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 .AIFI Isod Sus scrofa  
 .AIFI Isod Sus scrofa  
 .AIFI Isod Sus scrofa  
 .AIFI Isod Homo sapiens  
 .AIFI Anolis carolinensis  
 .AIFI Crataegus edmanae  
 .AIFI Melospiza gallopavo  
 .AIFI Gallus gallus  
 .AIFI Taeniopygia guttata  
 .AIFI Chelonia mydas  
 .AIFI Xenopus tropicalis  
 .AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 .AIFI Saccoglossus kowalewskii  
 .AIFI Isod Drosophila melanogaster  
 .AIFI Apis mellifera  
 .AIFI Comptosia floridana  
 .AIFI Tribolium castaneum  
 .AIFI Culex quinquefasciatus  
 .AIFI Hydra magnipapillata  
 .AIFI Caenorhabditis elegans  
 consensus\* 50

AIF1 Suberites domuncula	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Amphimedon queenslandica	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Botryllus schlosseri	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Cliona intestinalis	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Terredon nigrovittata	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Takiyagu rubripes	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Oryzias latipes	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Oryzias latipes	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Danio rerio	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 ieo2 Cryptolegus cumiculu	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 ieo1 Nomo sapiens	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Rattus norvegicus	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 ieo1 Sus scrofa	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 ieo2 Sus scrofa	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 ieo1 Nomo sapiens	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Anolis carolinensis	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Crocodylus adamanensis	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Gallus gallus	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Melospiza gallopavo	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Chalcophaps indica	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Xenopus tropicalis	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Strongylocentrotus purpur	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Saccocentrotus kowalevskii	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 ieoA Strosophila melanogras	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Apis mellifera	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Tribolium castaneum	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Culicis quinquefasciatus	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Hydra magnipapillata	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Caenorhabditis elegans	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
consensus-50	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430		
AIF1 Suberites domuncula	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Amphimedon queenslandica	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Botryllus schlosseri	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Cliona intestinalis	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Terredon nigrovittata	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Takiyagu rubripes	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Oryzias latipes	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Oryzias latipes	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Danio rerio	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 ieo2 Cryptolegus cumiculu	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 ieo1 Nomo sapiens	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Rattus norvegicus	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 ieo1 Sus scrofa	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 ieo2 Sus scrofa	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 ieo1 Nomo sapiens	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Anolis carolinensis	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Crocodylus adamanensis	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Gallus gallus	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Melospiza gallopavo	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Chalcophaps indica	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Xenopus tropicalis	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Strongylocentrotus purpur	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Saccocentrotus kowalevskii	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 ieoA Strosophila melanogras	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Apis mellifera	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Tribolium castaneum	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Culicis quinquefasciatus	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Hydra magnipapillata	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
AIF1 Caenorhabditis elegans	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	330	340	350	360	3						



Le relazioni filogenetiche di BsAIF con i suoi ortologhi, ricavate tramite l'utilizzo di vari strumenti di analisi, come massima parsimonia, minima evoluzione, Neighbor-Joining ed UPGMA, hanno messo in luce una netta separazione tra le sequenze dei vertebrati e quelle degli invertebrati. In particolare, gli urocordati *B. schlosseri* e *C. intestinalis* formano un clade comune e si staccano, insieme agli echinodermi, dai vertebrati (fig. 25).

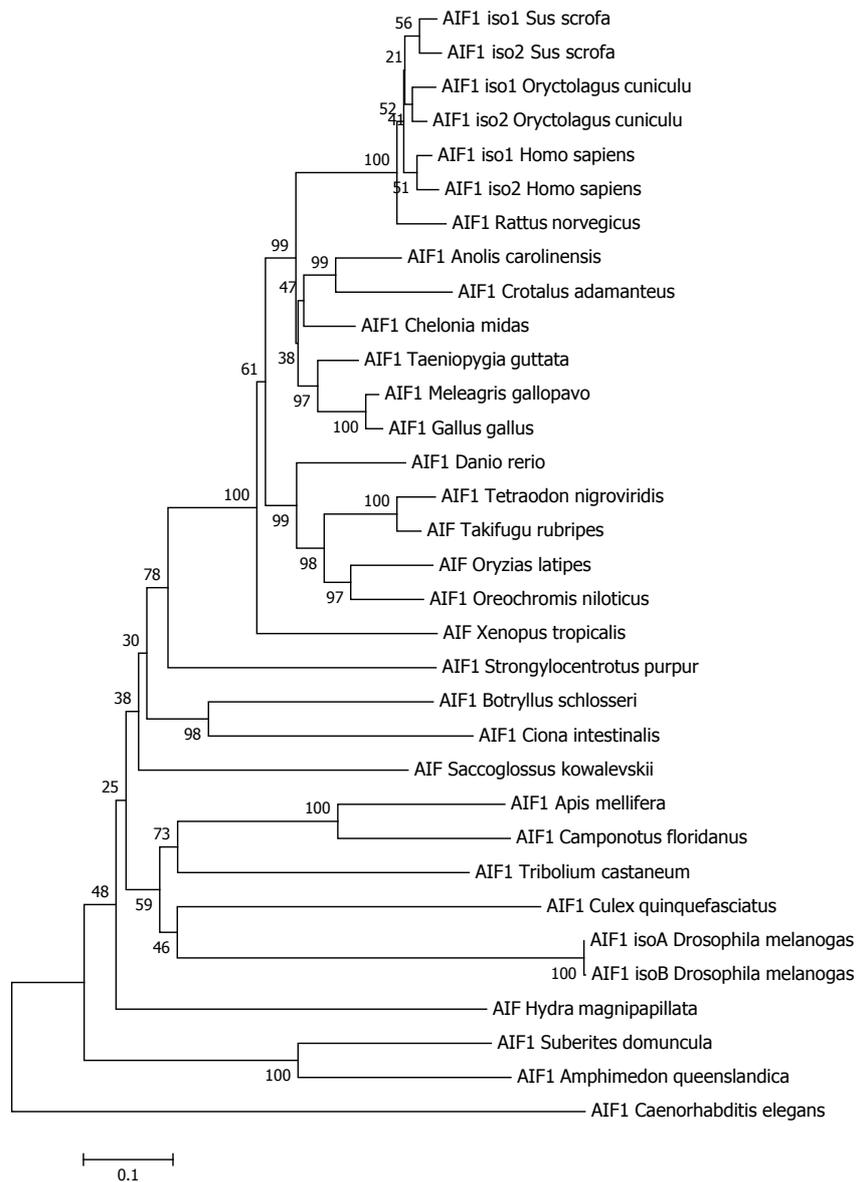


Figura 25: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di AIF nei metazoi, indicate in figura 23, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - PARP1

Sulla base delle EST di *B. schlosseri* con elevata similarità per la sequenza PARP1 dei vertebrati, sono stati disegnati i primer specifici PRF e PRR che, mediante reazione di PCR, hanno amplificato un cDNA di 820 pb, poi sottoposto a 5' e 3' RACE. Il trascritto completo di BsPARP1 è di 3195 pb, con una regione codificante di 2916 pb ed una proteina putativa della lunghezza di 971 aa. La sequenza amminoacidica di BsPARP1 condivide con l'ortologo umano i due domini N-terminali a dita di zinco, il primo compreso tra gli amminoacidi 13-89 ed il secondo tra i residui 115-199, il dominio PADR1 (269-323 aa), il dominio WGR (499-601 aa) ed il dominio PARP catalitico C-terminale (fig. 26). Quest'ultimo, situato tra gli amminoacidi 618 e 964, è estremamente conservato e contiene una caratteristica regione regolatoria (618-751 aa) seguita da quella catalitica (754-964 aa). Inoltre, si distinguono diversi residui critici di inibizione di PARP1 (722; 725-726; 819-820; 825; 835-837; 853-855; 861; 864; 946), numerosi siti di legame del NAD<sup>+</sup> (722; 726; 818-820; 829; 833-835; 853; 861; 864; 946), un motivo di localizzazione nucleare in corrispondenza dei residui 199-201, alcuni siti di fosforilazione (42; 176) ed, infine, residui di N-acetil-L-lisina (96, 130, 556, 577).

```

1  GTATTAAGATTCCCTGGGTGTAATTCAAATTGATACTTGATCGAA
1  M D G R S
   ATGGATGGGCGTAGT
6  N D Y D Y V A E Y A K S N K A M C R D C
16 AATGACTATGACTATGTGCGAGAATATGCGAAGAGTAACAAGGCTATGTGCCGTGATTGC
26  K A L I A K E S L R I A Y M V Q S R F F
76 AAAGCCTTGATAGCCAAGGAAAGTCTGAGAATTGCTTACATGGTACAGTCACGATTTTTT
46  D G K Q P P W Y H Y T C F F R K Y R P S
136 GATGGCAAGCAACCACCGTGGTACCATTACACTTGCTTCTCCGAAAATATCGACCTTCC
66  C S D D I K G F N N L R F P D Q E K I R
196 TGTTCGATGACATAAAGGGCTTCAACAATCTCCGATTTCAGACCAAGAAAAGATTCTGA
86  T Q I D G F A N S S K S A K G G T K I I
256 ACGCAAATCGATGGCTTTGCAAATAGTTCAAATCTGCAAAGGTGGAACAAAGATCATA
106 S T T L R D F V V Q Y A A S N R S K C R
316 TCGACGACGCTGCGAGACTTTGTAGTTCAGTATGCGGGCTCTAACAGGAGCAAGTGCCCG
126  Q C E D K I E K D E I R L S H K E K H P
376 CAATGTGAGGATAAAAATCGAGAAGGACGAAATCCGGCTCTCGCACAAAGAGAAGCATCCC
146  E K P Q L G L V D R W H H V G C F L K H
436 GAAAAGCCGCAGCTCGGCCTTGTGATCGTTGGCATCATGTCCGATGTTCTTGAACAC
166  K A A R G W E D H F S A D M L S G F Q G
496 AAGGCCGCCCGTGGCTGGGAAGATCACTTCAGCGCCGACATGCTCTCAGGGTTCCAAGG
186  L D A D D K G Q M R K L L K P K G K A K
556 CTGGACGCGGACGACAAAGGGCAGATGAGGAAACTACTGAAGCCTAAAGGAAAGGCAAAA
206  K I A E Q P S T S E I R T E E D P I M K
616 AAGATTGCGGAACAGCCTTCAACTTCTGAAATTCGAACGGAAGAGGATCCGATCATGAAA
226  K I K S Q S T L M W R N I D R L K S I E
676 AAAATCAAATCGCAGTCGACCTTGATGTGGAGGAACATCGACAGACTCAAAAGTATCGAA

```

246 L R K S T F E D I L E E N H Q K I P I G  
 736 CTGCGTAAAAGTACCTTCGAAGACATACTGGAAGAAAATCATCAGAAAATACCCATCGGC

266 Y D A L Y L A I G D G M T F G A L P W C  
 796 TACGACGCATTGTATCTCGCCATCGGAGACGGCATGACTTTCGGGGCTTTCGCCCTGGTGT

286 P E C K A G P L V V C S D G Y K C T G Q  
 856 CCGGAATGCAAAGCGGGACCGCTGGTTGTCTGCAGCGACGGATATAAATGCACCGGACAG

306 I S E W T R C T Y R T A V V E R P T W S  
 916 ATATCGGAATGGACCCGGTGCACGTATAGGACGGCCGTCGTCGAGAGGCCACCTGGTGC

326 F P K S V R E S D P F L E K Y K Y K K M  
 976 TTCCCGAAAATCCGTCCGAGAATCCGACCCGTTTCTTGAGAAAATATAAGTATAAAAAAATG

346 E R V F P P K A P F K P L K K M K V I V  
 1036 GAGCGCGTTTTTCTCCGAAAGCGCCTTCAAGCCGTTGAAAAAATGAAGGTTATCGTT

366 L T K T P S P K P D I K A S V E K L G G  
 1096 CTTACGAAAACACCCTCGCCGAAGCCTGACATCAAGGCGTCTGTGCAAAAACCTCGGCGGT

386 S I T T S V H L A Y F C I S T K E G V A  
 1156 TCGATCACTACGTCCGTGCATCTGGCGTACTTTTGCATCAGCACTAAGGAGGGAGTTGCT

406 K M S K K M T F G S A T R C F C R F S R  
 1216 AAAATGAGCAAAAAAATGACATTCCGGCTCAGCTACAAGATGTTTTTGTGCTTTCTCAAGA

426 Y F E R S R G R V G A T A D V A F A Q K  
 1276 TATTTTGAAAGATCTCGAGGCCGTGTGCGAGCCACAGCCGATGTTGCCTTTGCTCAAAAA

446 A Q R V R L G I G A T R I E A W G I K R  
 1336 GCACAGCGTGTGCGATTGGGGATCGGAGCAACGAGGATCGAGGCTTGGGGTATAAAGAGA

466 A L E E V S G N V P E K K M K M V V K A  
 1396 GCTCTCGAGGAGGTTAGTGGTAACGTGCCAGAGAAAAAATGAAGATGGTGGTCAAAGCG

486 G A A V D Q Q S G L E H K T H V L V K N  
 1456 GCGCTGCAGTTGATCAGCAGTCTGGGTTGGAGCACAAAACCTCATGTGCTGGTCAAGAAC

506 G S K Y T A T L S L V D M N T G A N S Y  
 1516 GGCTCGAAGTACACCGCAACCCTATCCTTGGTGGACATGAATACGGGAGCAAAATCCTAT

526 Y K L Q L L E H D S K K K Y Y V F R A W  
 1576 TATAAGTTGCAGCTTCTGGAGCATGACTCGAAGAAGAAATATTATGTGTTCGCGCCTGG

546 G R V G T T I G G D K V E D F Y S V D A  
 1636 GGTGAGTTGGGACGACGATAGGGGGGATAAAGTCGAGGACTTCTATTCCGTTGATGCG

566 A V R N F E E V Y L D K T G N E F G T A  
 1696 CGGGTGAGGAATTTGAAGAAGTCTATTTAGATAAAAACCTGGCAACGAATTTGGCACCGCT

586 H F M K M P K K F Y P L D I D Y G E N D  
 1756 CATTTTCATGAAGATGCCAAAAAGTTTATCCCTTGACATCGATTACGGTGAAAACGAT

606 E K L K V L Q S A G S N S K L H Q E V Q  
 1816 GAGAAGCTGAAGGTTCTGCAATCTGCCGGTAGCAATTCGAAGCTACATCAAGAAGTGCAA

626 K I I K M I F D V E S M K K A M V E F E  
 1876 AAGATCATCAAGATGATATTTGACGTGGAAGCATGAAGAAGGCGATGGTGGAAATTCGAG

646 L D M K K M P L G K L S K K Q L Q R A Y  
 1936 CTGGATATGAAAAGATGCCTCTCGGTAAGTTAAGTAAGAAGCAGCTGCAGAGAGCCTAC

666 G V L S E V T G I I E C E T P S A P K I  
 1996 GGGTACTGTCCGAAGTGACCGGGATTATTGAATGCGAAACGCCAAGCGCTCCCAAAATA

686 L D C S N R F Y T L I P H D F G M K Q P  
 2056 CTGGATTGCTCAAACAGATTTTACTTGTGATCCCGCATGACTTCGGAATGAAACAGCCG  
  
 706 P M L N N I E L V K S K V E M I D S L L  
 2116 CCGATGCTGAACAACATTGAGTTGGTCAAGTCCAAGGTCGAGATGATCGACAGCCTGCTG  
  
 726 D I E V A Y N L L Q G D Y A D V K E E D  
 2176 GATATTGAGGTCGCATACAATCTGCTTCAAGGCGACTATGCCGACGTGAAGGAGGAAGAC  
  
 746 P I D T Q Y K K L Q C R I E P L N A N D  
 2236 CCCATCGACACTCAGTACAAGAACTGCAATGCCGAATAGAGCCACTCAATGCCAACGAC  
  
 766 E M R K V I S D M V Q N T H A K T H S S  
 2296 GAGATGCGTAAGGTGATCAGCGACATGGTGCAAAACTCACGCCAAGACCCATTCTCTCG  
  
 786 Y N L E V E E I F E L D R K G E K S R Y  
 2356 TACAATCTCGAAGTCGAAGAAATATTTGAGCTGGACCGTAAAGGTGAAAAAGCCGCTAC  
  
 806 R P F K K L H N R R L L W H G S R V T N  
 2416 CCGCCGTTCAAGAAGCTGCACAACCGTCTGCTGTGGCATGGCTCTCGTGTGACCAAC  
  
 826 Y A G I L S Q G L R I A P P E A P V T G  
 2476 TATGCCGGCATTGTTGTACAGGGCTTGAAGATTGCGCCGCCCGAAGCGCTGTGACGGGA  
  
 846 Y M F G K G L Y F A D M V S K S A N Y C  
 2536 TATATGTTCCGGCAAGGGGTTGTACTTTGCCGATATGGTTTCGAAAAGTGCGAATTACTGC  
  
 866 H A S H G N P Y G L L L L A E V A L G N  
 2596 CATGCGTCGCATGGGAATCCATACGGACTGTTATTGCTCGCTGAAGTAGCGCTGGGAAAT  
  
 886 M R E L K N A M D V R K L P K G K H S V  
 2656 ATGCGCGAGTTGAAGAATGCCATGGACGTACGGAAGCTACCGAAAGGAAAGCACAGCGTC  
  
 906 K G M G S T C P D E S S D Y T M K D G T  
 2716 AAGGTATGGGGTCCACATGCCCGGACGAATCGAGCGACTACACGATGAAAGATGGCACC  
  
 926 I A H V G S G K E S G C E G T S L L Y N  
 2776 ATAGCCCATGTAGGGTCCGGGAAGGAGTCTGGCTGTGAAGGAACGTCGTTACTCTACAAT  
  
 946 E Y I V Y D V A Q V N L R Y L V K T K F  
 2836 GAATACATAGTGTACGATGTAGCGCAAGTGAAGTGAAGTATTTAGTGAAGACTAAATTC  
  
 966 N M Q S Q W - 971  
 2896 AATATGCAAAGTCAATGGTAA CAGTGTAGTGCTGATGACATTTTGTGCTATCTGTTGTGG  
 TGATTTTCATTGCCAAGTTCGCAATAGTAAGCATCTGTTGACCATCATTTTCGCTTTGCTG  
 CCTTTTGGACTTCATGTTACCGCTGTTCTTTTTCTCATCGTGAAATAAACTGCTGAAT  
 TCGCAATTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2916

Figura 26: mRNA di BsPARP1 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. Le regioni azzurre rappresentano i due domini a dita di zinco N-terminali, rosa il dominio PADR1, lilla il dominio WGR, arancio la regione regolatoria del dominio PARP catalitico e giallo la parte catalitica dello stesso dominio.

Le analisi di similarità di BsPARP1 con gli ortologi di altri metazoi, hanno evidenziato percentuali di identità molto elevate nei vertebrati, in particolare nei pesci che presentano valori vicini o uguali al 49% di residui (fig. 27).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Homo sapiens</i>	47,5	48
<i>Mus musculus</i>	47,1	48
<i>Bos taurus</i>	46,6	47
<i>Gallus gallus</i>	48,2	48
<i>Taeniopygia guttata</i>	40,3	47
<i>Anolis carolinensis</i>	47,3	48
<i>Xenopus laevis</i>	47,5	48
<i>Oreochromis niloticus</i>	49,2	50
<i>Takifugu rubripes</i>	48,6	49
<i>Danio rerio</i>	48,4	48
<i>Oicopleura dioica</i>	41,6	43
<i>Saccoglossus kovalevski</i>	34,9	60
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	40	42
<i>Crassostrea gigas</i>	45,8	45
<i>Aplysia californica</i>	44,8	45
<i>Daphnia pulex</i>	42,4	43
<i>Camponotus floridanus</i>	42,3	43
<i>Apis mellifera</i>	42	43
<i>Drosophila melanogaster</i>	38,1	40
<i>Caenorhabditis elegans</i>	30,8	41
<i>Hydra magnipapillata</i>	24,8	60
<i>Amphimedon queenslandica</i>	40,7	44

Figura 27: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsPARP1 e gli ortologhi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, verde smeraldo gli emicordati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, limone i nematodi, rosa scuro i cnidari, verde scuro i poriferi.

Nell'allineamento di BsPARP1 con gli ortologhi considerati si distinguono in modo chiaro i diversi domini, soprattutto la regione C-terminale del dominio PARP catalitico che risulta fortemente conservata (fig. 28).









Nell'indagine filogenetica con i metodi di massima parsimonia, minima evoluzione, Neighbor-joining ed UPGMA, tutte le sequenze PARP1 dei vertebrati formano un unico gruppo che si separa marcatamente da quelle degli invertebrati. In particolare, BsPARP1 clusterizza con la sequenza dell'altro tunicato *Oikopleura dioica*, ma il valore di bootstrap della relazione è pressoché risibile (fig. 29).

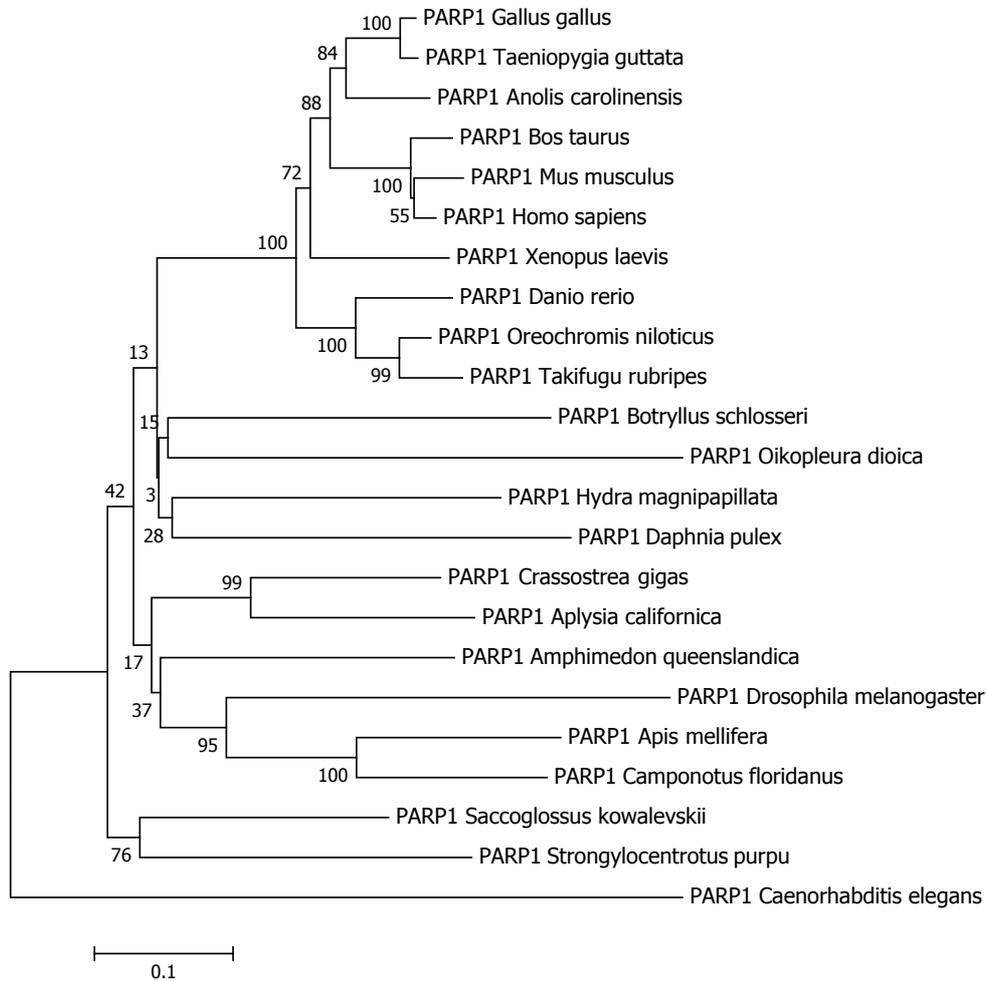


Figura 29: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di PARP1 nei metazoi, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - BIRPs

### BIRP-1

L'analisi in BLAST ha evidenziato diverse EST con regioni molto simili al dominio BIR della famiglia di inibitori dell'apoptosi BIRP/IAP. I dati sui geni differenzialmente espressi durante il ciclo blastogenetico, ottenuti con il trascrittoma di Botrillo prodotto dal nostro laboratorio, hanno permesso di determinare le sequenze più interessanti. Due di queste sono state isolate e caratterizzate. La reazione di PCR con la coppia di oligonucleotidi IABF e IABR ha sintetizzato un amplicone di 324 pb che è stato completato tramite 5' e 3' RACE. Il primo trascritto è lungo 611 pb, con un ORF di 438 pb che esprime un tradotto predetto di 145 aa. BsBIRP-1 è costituito da un dominio BIR tra gli amminoacidi 40-110 contenente i residui specifici per l'interazione con proteine regolatrici (68; 73; 82-84; 86) e quelli per il legame dello ione  $Zn^{2+}$  (76; 79; 98), nei quali manca una delle tre cisteine (fig. 30).

```
A
ACTGTTGAGCAGAAATAGAGTACAGTGTAAGTAACGCCGTAACGAAGC
1
1 M I K
ATGATAAAA
4 R R D N A N N K P C L N K D R L D R D P
10 CGGCGGGACAATGCAAACAATAAACCTGTCTTAACAAGGACAGACTGGACAGAGACCCG
24 P G Q V S V C I P P G D P R R E Q C R L
70 CCGGGACAAGTGAGCGTGTGTATACCTCCAGGTGACCCGGAAGAGAGCAATGTCCGGCTT
44 A T F Q I F P K N L A V R P T E M A K A
130 GCAACATTTCAAATCTTCCCAGAAGAACCTAGCAGTGCACCAACAGAAATGGCGAAGGCT
64 G F Y Y I G Y R D I V K C F S C G G A I
190 GGTTTTATTATTACATTGGATACAGAGACATAGTAAATGTTTCAGCTGTGGTGGAGCAATA
84 E N W M V G D N P E D R R W H K S T C D
250 GAGAATTGGATGGTCGGCGATAATCCAGAGGACAGAAGATGGCACAAATCTACTTGTGAT
104 L A N M T D T Q N I P M P K S S G T G T
310 TTAGCGAACATGACCGACACACAGAATATACCAATGCCAAAGTCGAGTGGTACAGGTACA
124 F K K F V S R Y H R L S F A R V H N T P
370 TTCAAGAAATTTGTCAGCCGGTATCACAGACTGTCGTTTGCTCGTGTGCACAACACTCCG
144 V S - 145
430 GTTTCGTAG 438
ACTTTTACTAACTGTAATCCCAGCGTACATTGTGAATGGCAATTATATTAT
ACTCTGTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA
```

Figura 30: mRNA di BsBIRP-1 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione gialla rappresenta il dominio BIR.

## BIRP-2

La seconda sequenza BIRP è stata identificata partendo dal frammento di 396 pb, ricavato dalla reazione di PCR con i primer specifici BIRF1 e BIRR. In seguito a 5' e 3' RACE, il messaggero finale di BsBIRP-2 è risultato di 1290 pb, con una regione codificante di 1050 pb che produce una proteina putativa di 349 aa. Il dominio BIR di BsBIRP-2 è localizzato tra gli amminoacidi 58-126, possiede le tre cisteine e l'istidina responsabili del legame con lo  $Zn^{2+}$  (94; 97; 114; 121) ed i residui di interazione con vari substrati (86; 91; 93; 100-102; 104; 108; 113; 117-118). All'estremità C-terminale della sequenza, è inoltre presente il dominio a dita di zinco RING (302-336), tipico dei BIRP di tipo IAP in grado di inibire le caspasi (fig. 31).

```
TGATCG
AAGGTATTCTTTGTACCTATTATATAGTGTATATATGGAGTTGGGACGAGTAGA
ACGCAGCAAAAATACGTGCCAAGTCTGTATGATAGTTCGCCTTGTGAACTGGA
1
1
M I
ATGATT
3 G S D S R R S Q L Q A V N G S G S V S T
7 GGATCGGACAGCAGGAGGTCACAGCTTCAAGCTGTGAATGGAAGCGGAAGCGTGTCAACA
23 S G I P T S S Q G G L S A N H G L F T D
67 TCTGGTATACCTACCAGTTCTCAAGCGGACTATCAGCAAACCATGGTCTCTTCACGGAC
43 I F N C A N P T S P A Y T G K S Q R L S
127 ATCTTCAACTGTGCAAATCCAACCTTCTCCAGCATATACGGGAAGTCGCAAAGGCTTTCA
63 T F K N W N K H N I L S P D K L A D A G
187 ACCTTTAAAACTGGAACAAGCACAACATACTGAGCCCAGATAAAATTAGCCGACGCAGGA
83 L F Y L G E R D R C K C F Y C N G G L Q
247 TTGTTTATTTGGGCGAAAGAGACAGATGTAAATGCTTTTACTGCAATGGAGGATTGCAG
103 N W V A G D D P M E E H A K Y F P Q C E
307 AATTGGGTGGCAGGCGACGACCCAATGGAGGAGCATGCCAAATATTTCCACAATGCGAA
123 Y V L S R M G P D Y V A N L N A R Y P N
367 TACGTCTGTCAAGAATGGGACCCGATTACGTTGCAAACCTGAATGCAAGATATCCGAAT
143 L T R P T I P S P P P Q M Q Y D A R P I
427 TTAACGCGACCGACGATTCGGTCACCACCCCGCAAATGCAATATGACGCCCGGCAATT
163 T L S P P S S A V H R P Q N V Q S S P S
487 ACGCTGTCACCGCCAGCAGCGCTGTTACAGGCCACAAAACGTGCAATCATCGCCATCA
183 L S R S P A A A S Q S H I D Q D L A E L
547 CTCAGCCGGTCGCCAGCAGCTGCATCACAAAGTCATATTGATCAAGACTTGGCGGAATTA
203 V S Q A E Q F G F D R S I I E E I L S D
607 GTATCGCAAGCAGAACAATTCGGTTTTGATCGATCAATTATTGAGGAAATATTATCGGAT
223 K Y R S T G C Y H S S L T E L I D D I I
667 AAGTACAGGTCAACGGGTTGTTATCACAGCAGCCTCACAGAACTTATTGATGACATCATT
243 R K E S G I T F D P Q P M E D V E V E C
727 AGAAAAGAAAGTGGGATTACCTTCGATCCCCAGCCAATGGAAGACGTGCAAGTCGAATGT
263 H E T I R N P P I A C V A E G R S C G N
787 CATGAAACAATACGGAATCCACCGATAGCATGCGTGGCAGAGGGTAGATCCTGTGGTAAT
```

```

283  V E S D S P L R D Q L Q S A I N V T R C
847  GTAGAAAAGCGACTCGCCGCTACGCGATCAGCTGCAATCAGCAATAAACCGTAACCCGTTGT

303  M S C N R R N R D C L F L D C G H L C C
907  ATGTCATGTAACAGGCGGAATCGTGATTGCTTATTCCTAGATTGCGGTCACTTGTGCTGC

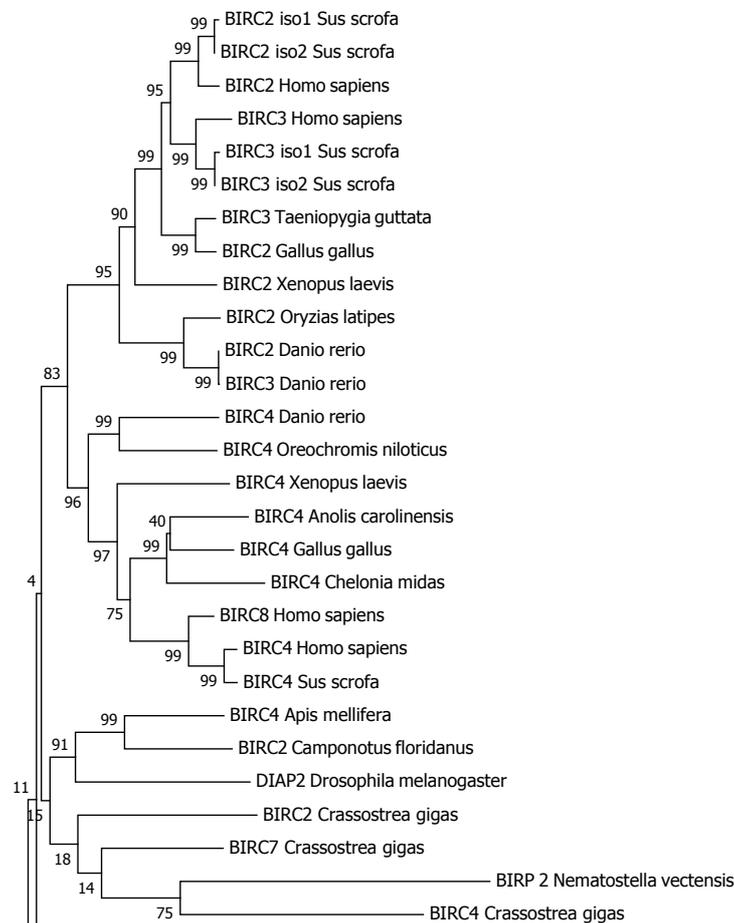
323  C Y E C G K A K Q R C V I C G T R V R E
967  TGTTACGAATGCGGGAAAGCAAAGCAAAGATGCGTGATTTGTGGGACCCGGGTTAGGGAA

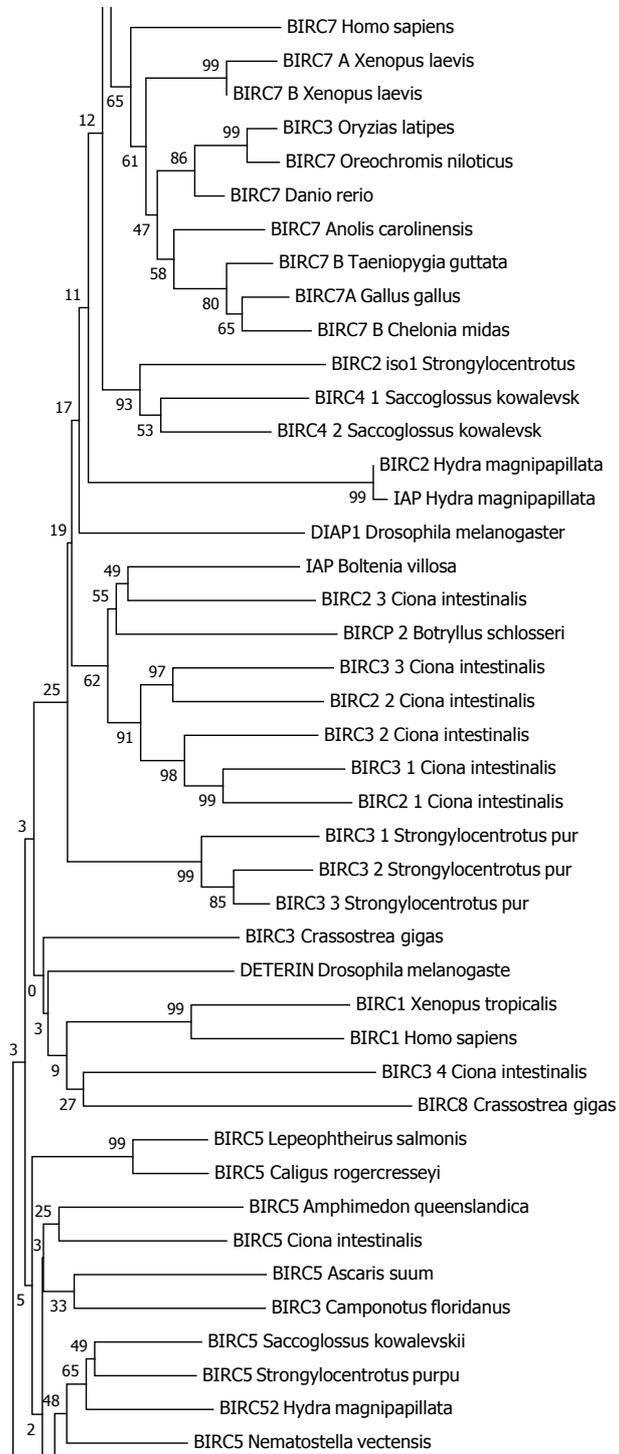
343  V I K I F T T -
1027 GTGATAAAAATATTTACGACGTGA
                                     ATCTTTCGCATTAAGGTTCCTTTCACTGTGGCTTCT
AACTACTGCAATTAATATAGTTATCTTCAAGATCTTATTTTCGTTTACTATAATGAA
TAAACATTCGTTGTGTCTGATAAAAAAAA

```

Figura 31: mRNA di BsBIRP-2 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione gialla rappresenta il dominio BIR e in azzurro il dominio RING.

Le relazioni filogenetiche di BsBIRP-2 con tutte le classi di proteine BIR, sia quelle maggiormente studiate nei vertebrati, soprattutto nell'uomo, sia gli ortologi noti negli invertebrati, hanno mostrato che la sequenza di Botrillo fa parte del ramo delle BIRP dei tunicati, con un'evoluzione simile ad una delle diverse forme di BIRC2 di *Ciona intestinalis* (fig. 32).





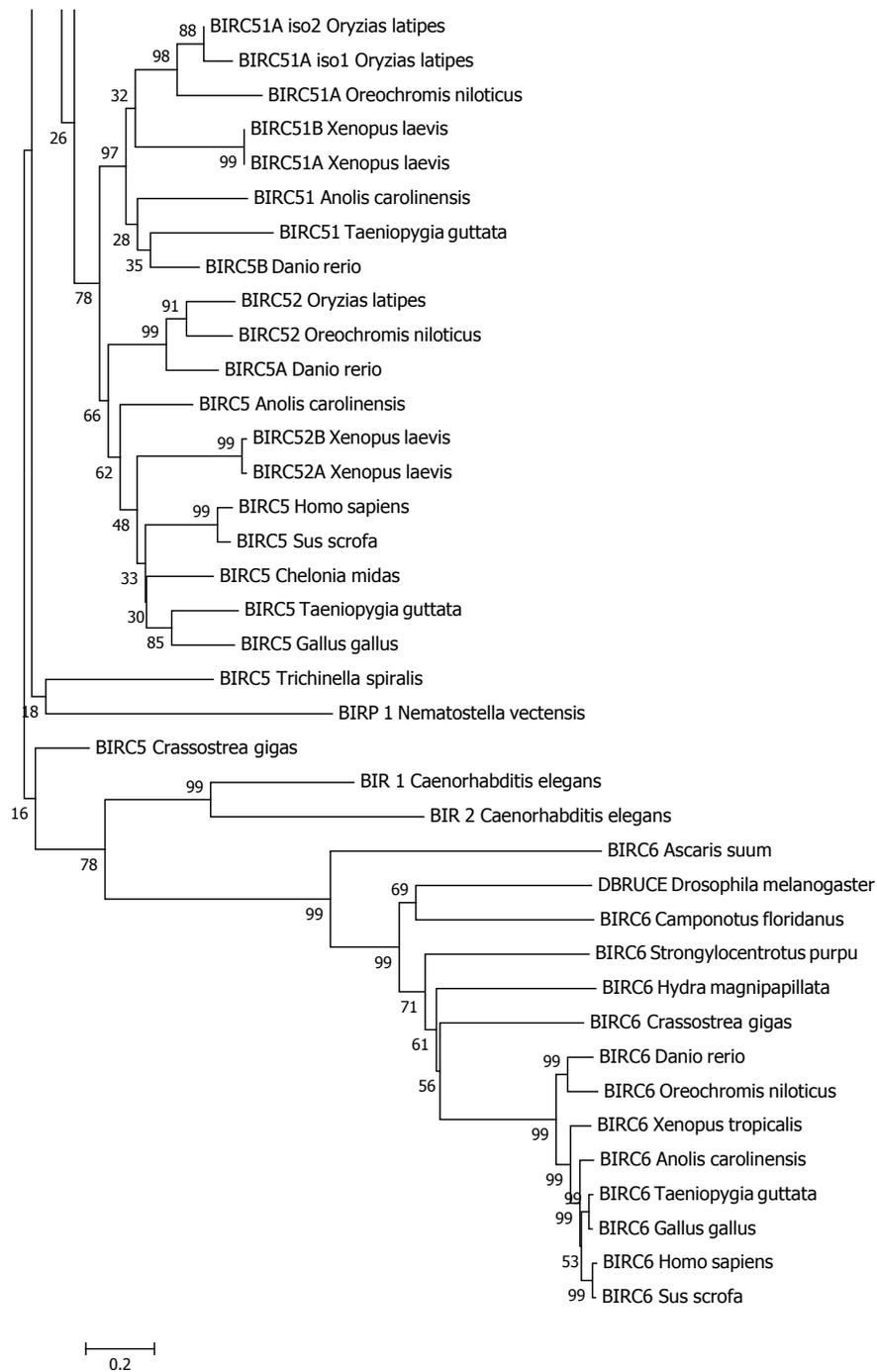


Figura 32: analisi filogenetica di BsBIRP-2 e delle BIRP dei metazoi, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - NF-kB1

I primer specifici NKBF e NKBR2, disegnati sulle sequenze di Botrillo riconosciute simili al fattore di trascrizione p105 NF-kB1, hanno fornito un amplicone di 812 pb, da cui si è ottenuto, tramite 5' e 3' RACE un trascritto finale di 3887 pb, con un ORF di 3009 pb per un tradotto predetto di 1002 aa. BsNF-kB1 conserva la regione N-terminale del dominio RHD (28-201 aa), seguita dal dominio IPT tra gli amminoacidi 204-306 e all'estremità C-terminale circa quattro motivi ripetuti anchirinici, con l'ultimo che è tronco (721-1002 aa) (fig. 33). Manca il caratteristico dominio di morte, presente nella maggior parte delle proteine NF-kB1 dei metazoi, che segue le brevi sequenze anchiriniche. I due domini RHD e IPT di BsNF-kB1 contengono i residui di legame del DNA nei siti kB specifici per i geni bersaglio da regolare (41; 43-44; 46-47; 50-52; 128; 130-131; 201; 228; 230; 262-263) e nell'IPT sono conservati i residui di legame per la formazione di omodimeri o eterodimeri con i fattori REL della famiglia NF-kB (207-208; 210; 223; 225; 227; 261-262; 265; 267) e quelli che coordinano l'interazione con i motivi anchirinici di altre proteine, soprattutto l'inibitore IκB (205; 207-209; 211-213; 254-256; 269; 281; 300; 303; 305). Un motivo di localizzazione nucleare è presente tra gli amminoacidi 315-320 ed alcuni siti di fosforilazione delle chinasi PKA, GSK3β e MAPK.

```

ATGTGAAATATCTATCTCGACACCG
AAGATATAGAAAAATACTAGATAGCAGTAGACTTCA
AAGGATAGATCTGGATTAATTGTTTGAAGTTGAAAT
1
1 M F G Q D T Y I
ATGTTTGGTCAAGACTTACATA
9 E E V T I K T E D I T D Y L Q Q V E S P
25 GAGGAGGTGACCATAAAAAACGGAGGATATCACGGACTACTTACAGCAAGTTGAAAGTCCA
29 S L I I S E Q P A A S V R F R Y P S E G
85 AGTTCATCATATCAGAGCAACCAGCGCAAGCGTTAGATTTTCGCTATCCGAGCGAAGGA
49 N S H G G I P G V Q S N E F R K T C P T
145 AACTCACACGGTGGAAATCCCGGTGTGCAAAGCAATGAATTCAGAAAAACATGTCCAAC
69 V E I A G Y K G Y A R I V V Q L V T D D
205 GTGGAGATCGCGGGTACAAAGGTTACGCCAGGATTGTCGTTCAACTTGTGACTGACGAC
89 P D P K L H V H S L V G K Q C E N G V C
265 CCAGATCCGAAACTGCACGTACTCTCTCGTTGAAAGCAATGTGAGAACGGCGTCTGT
109 S V T C G P G E M R S Q F P N L G V Q H
325 TCTGTGACTTGCGGCCCTGGAGAGATGAGATCTCAATTTCCGAATCTGGGTGTTCAACAC
129 V K K K R A E E I L F A R F K E K Y P D
385 GTGAAAAAGAAGCGAGCTGAAGAAATCTCTTTGCTAGATTTAAAGAAAAATATCCGGAT
149 V S D K E L K N Q A K A E V E R M N L S
445 GTGTCAGACAAAGAACTTAAAAATCAAGCCAAAGCCGAGGTGCAACGGATGAATCTTTCC
169 A V R L T P V A Y L P D Q N N E F T E M
505 GCCGTGCGTCTCACACCCGTGCGTATCTCCAGACCAAAACAACGAATTTACCGAGATG
189 L P P V I S N P I V D N K S T L K I C R
565 CTGCCACCGGTGATTTCAAACCCCATCGTCGACAACAAATCGACTTTGAAGATTTGCCGT
209 I S R V D S P A T G G T E I F L L C D K
625 ATCAGCCCGGTGACTCGCCGGCGACTGGGGTACTGAAATATTCTTGCTGTGCGACAAA

```

229 V Q K D D I Q V R M F E R D A S Q N E I  
685 GTGCAAAAAGACGATATCCAGGTCAGAATGTTTGAACGGGACGCGTCACAAAACGAAATC  
249 W E D F C R F S P T D V H R Q Y A I V L  
745 TGGGAGGACTTCTGTCGATTCTCGCCACGGACGTTTCATCGCCAGTACGCGATTGTTTTG  
269 K T P S Y K N P N I D R P T R V F I Q L  
805 AAGACGCCCTTTACAAAATCCAAACATCGATCGGCCACGCGAGTTTTTATTACAGCTG  
289 R R K S D G Q F S Q P L Q F T Y T P V I  
865 CGTAGAAAATCTGACGGGCAATTTTCGCAACCTTTGCAGTTCACATACACGCTGTGATC  
309 D A K D I P L K R K R A T C G G M P T T Q  
925 GACGCGAAAAGATATCCCGTTGAAACGTAAACGCGCAACATGCGGAATGCCGACCACTCAA  
329 S Q I A S L G S V S Q A P Y R M Q G R N  
985 TCTCAAATCGCAAGCCTCGGATCGGTATCGCAGGCACCGTACCGTATGCAGGGACGGAAT  
349 G K P K V D H H V K P I D P S L L M K R  
1045 GGCAAGCCAAAAGTGGACCACCACGTGAAACCGATAGACCCGTCACTGTTAATGAAACGA  
369 F T P A M K R Q H P T D C K L S E Y A A  
1105 TTCACACCGGCCATGAAACGTCAACACCCAACAGACTGCAAGCTATCAGAGTATGCCGCA  
389 R N R C H P K H G D F F A K F P K L Q Q  
1165 AGGAACAGATGTCACCCAAAGCATGGTGACTTCTTCGAAAATTTCCAAAATTACAACAA  
409 S A R Q Q C Q L C N H D N T E R H E P A  
1225 TCAGCCCGCCAGCAATGTCAACTCTGCAATCACGACAATACCGAACGTCATGAGCCCGCA  
429 K F R Q L T R L S E L F E H A E Q S G L  
1285 AAGTTTCGGCAGCTCACAAGGCTCTCCGAGTTATTTGAACATGCAGAACAGTCCGGGCTA  
449 F F F I L F E P R I G R N V R K L T G I  
1345 TTCTTCTTCATCTTATTCGAACCCAGGATCGGTTCGGAACGTACGAAAGCTCACAGGGATC  
469 P I P A A A D E S P T A A A N E P D A T  
1405 CCCATTCCAGCAGCCGAGATGAGTCCCAACAGCAGCAGCAAATGAGCCCGATGCAACA  
489 T A D E S A S N A T T V H S P T S S H L  
1465 ACAGCAGATGAGTCCGCTTCAAATGCAACAACAGTACATAGTCCGACATCTTCTCACCTT  
509 T T V N S I G N M S N L P C I P G M N V  
1525 ACAACTGTCAACAGCATTGGCAATATGTCCAACCTACCTTGCATTCCCGGCATGAACGTT  
529 P K P D A L K S A L Q Q N S S A Q V S S  
1585 CCGAAACCAGACGCTCTGAAATCCGCCCTTCAGCAAAACAGCTCAGCACAGGTGTCTTCT  
549 Q Q S F P Q S P G F G N V Y T S M Q N V  
1645 CAGCAATCGTTTTCCCAAAGCCAGGATTCGGTAATGTGTACTTCAATGCAGAATGTG  
569 Q S N T S G Q Y A S T Y S Q Q E A D R Q  
1705 CAATCCAACACCAGCGGGCAGTATGCTTCCACGTACTCGCAGCAGGAGCTGACCCGCAA  
589 A F G P D Y A S V L D Q L D F D D S N G  
1765 GCGTTTGGTCTGACTACGCGAGCGTACTCGACCAACTCGATTTTGACGACAGCAATGGC  
609 D L P S I G S Q F V E N L L N E G V M S  
1825 GATTTACCGTCGATAGGATCGCAATTTGTGGAAAATCTTGAACGAAGGCGTCATGTCA  
629 S I A M N P S R I P I V Q S D S T A E D  
1885 TCGATCGCGATGAATCCGTGAGAAATACCGATCGTTCAGAGCGACAGCACGGCCGAGGAT  
649 P N T P A D T V E D S E D F T T A M Q E  
1945 CCAACACACCGGCAGACACAGTGAAGACAGTGAAGACTTACGACGGCAATGCAGGAG

669 T Q E E E Q P E E H P I D D S F I K Q L  
 2005 ACTCAGGAAGAAGAGCAGCCGGAGGAGCATCCGATCGACGACTCCTTCATCAAGCAGCTT  
  
 689 L E T M M R K I T K Q L S D F K K S G N  
 2065 CTCGAAACCATGATGAGGAAGATCACGAAACAGCTGAGCGACTTCAAAAAATCGGGGAAC  
  
 709 V E A L S S A K Q F F T K V H D R N D S  
 2125 GTCGAGGCTCTGAGCTCGGCGAAGCAGTTTTTACAAAAAGTCCACGATCGTAACGACAGC  
  
 729 T C L H L A A L N G H N D I L M K L A Q  
 2185 ACATGCTTGCATCTGGCTGCACTCAATGGACACAACGATATTCTCATGAAACTGGCTCAG  
  
 749 Y A R L V E P S G S L L N V C N D A Q Q  
 2245 TACGCGAGACTTGTGGAGCCTAGCGGTTCTTACTGAATGTTTGCAACGACGCACAGCAG  
  
 769 T P L Q I C I L K G D A E I V K S L L R  
 2305 ACGCTCTGCAGATCTGCATTTTTGAAGGGAGACGCTGAGATTGTGAAATCGCTTCTACGT  
  
 789 S G S D P N Q V D G N G D T G L H L A C  
 2365 TCAGGATCCGATCCAAACCAGGTGACGGCAATGGAGACACGGGGCTGCATCTTGCCTGC  
  
 809 E M G R A D I V T L L L S A S G Y S E E  
 2425 GAGATGGGACGTGCGGATATCGTCACGTTATTGCTTTCTGCCAGCGTTACAGCGAAGAA  
  
 829 L Y N Y K G L T P L H I L A Q R K S E K  
 2485 CTCTACAACCTACAAAGGGCTCACTCCTTTACACATCCTCGCCCAACGCAAGTCCGAGAAA  
  
 849 S V E C L K A L L S H E G V D V N E R E  
 2545 TCTGTGAATGCCTCAAAGCCTTGTGTCTCACGAGGGCGTCGACGTC AACGAACGCGAA  
  
 869 L R S G Q T A L H M S V E E G N T M F A  
 2605 CTGAGAAGTGGCCAGACGGCCCTACACATGTCTGTGGAAGAAGGGAACACCATGTTTCGCA  
  
 889 A Y L V L K G D A D I D A M T F D G L T  
 2665 GCTTACCTTGTCTGAAGGGTGACGCAGACATTGACGCAATGACCTTCGACGGCTTGACA  
  
 909 P L H I A S A H G N S A L V Q L L L D L  
 2725 CCTCTCACATCGCGTCCGCCACGGAAATTCGCCCTCGTTCAACTGCTTCTGGACCTC  
  
 929 G A D K D T C I C E E S G S S V L S V A  
 2785 GGCGCCGATAAAGACACTTGCATCTGCGAGGAATCAGGAAGCTCGGTGCTTTCCGTGGCT  
  
 949 A N E D I R R I L Q Q P V D A M S P D I  
 2845 GCCAACGAGGACATTAGAAGAATACTGCAACAGCCTGTGATGCTATGTCTCCCGATATC  
  
 969 K K R A N Q L I D S G L V N F L E F D T  
 2905 AAAAAAGAGGGCGAATCAGCTCATCGATTCCGGACTGGTAAACTTTCTCGAATTCGACACC  
  
 989 S A E K L A A M M K T M A V -  
 2965 AGTGCAGAAAAGCTGGCGGCAATGATGAAAACCATGGCCGTC TGA

1002  
3009

CCTCAATAATACTGA  
 AAACATAACCTGGGTTGATCAGGAAAATGACCCAGCTTTTAATGACTCTGATTTATTCTG  
 TGTCGTTCCATTTTGTAAATTGATCGTATTTTAACTCTTTATTTTCTTTATCATACAA  
 TCACTTTTAAAATTCCTTTTTGTGTCGTTGCGTAGTAATTAATCAGTGCCTTGTGTTTAT  
 TTCAAAAATGTCAATGGCTTTTATACGTCGTTATGGGTTATGGATCGAAAACGTAGTACTCT  
 GTAATATGAGCAAAAAGTTCCAACCTGTTGTTTTGCAGTACAGGGCACCTATTGGGCATT  
 ATTCGTGTTGATAAAAATGACACATGATGAAGGTTACAGCGACATATTATTGTTTTATTAG  
 TGCAAGTGTACAAAATACAGCTTTTGGAGTCGGCGTCACCTTGTAGGCTAATAAATTTGTTG  
 AACTTATGTCTGCACTACCTAGCGATGCTGTTAGGCTTAGTATGCCTCCATGAAATAGCA  
 CTAGTACTTGGCCTGTAACATGAGATAGGGAGCGTCTACGTGTTTTTATCAATGATCTTA  
 ATACTTTGAATGTGGTACGAAATTCGATTGGGATCGCCACACTTGAACATTGTATGTAC  
 AACATTCACAACCTGGTTTCATATGTGCGTGTATGGATGTGTGTGATTTCTTGCTGTTT  
 ACGTTCCAAATCCATACTCATTTTTGGTCCATGTACAGTTCTTTGTTGCTTTTTCGGCTT  
 CAAGGTTTTTATACCTTGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 33: mRNA di BsNF-kB1 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione rosa rappresenta il dominio RHD, giallo il dominio IPT e arancio il dominio di anchirine ripetute. In grassetto è indicato il motivo di localizzazione nucleare.

Nel confronto con gli ortologi identificati negli altri metazoi, BsNF-kB1 presenta maggiori percentuali di similarità per le sequenze di *C. intestinalis*, *Xenopus tropicalis* e *Oreochromis niloticus*, ognuna con valori del 26% (fig. 34).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità (globale)	% similarità
<i>Homo sapiens</i>	24,7	47
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	24,7	47
<i>Sus scrofa</i>	24,7	46
<i>Mus musculus</i>	24,4	45
<i>Rattus norvegicus</i>	23,9	46
<i>Gallus gallus</i>	24,8	45
<i>Taeniopygia guttata</i>	24,2	47
<i>Meleagris gallopavo</i>	24,2	45
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	26,6	46
<i>Oreochromis niloticus</i>	26,3	46
<i>Siniperca chuatsi</i>	25,6	46
<i>Ciona intestinalis</i>	26,5	45
<i>Saccoglossus kovalevski</i>	23,6	50
<i>Apostichopus japonicus</i>	24	47
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	23,2	47
<i>Amphimedon queenslandica</i>	23,7	42

Figura 34: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsNF-kB1 e gli ortologi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, verde smeraldo gli emicordati, rosso gli echinodermi, verde scuro i poriferi.

L'allineamento di BsNF-kB1 con le sequenze ortologhe mette in evidenza i domini RHD e IPT ben conservati, a differenza dell'estremità C-terminale che risulta molto variabile a livello dei motivi anchirinici. L'ultimo di questi si sovrappone al dominio di morte degli altri NF-kB, mancante in Botrillo (fig. 35).





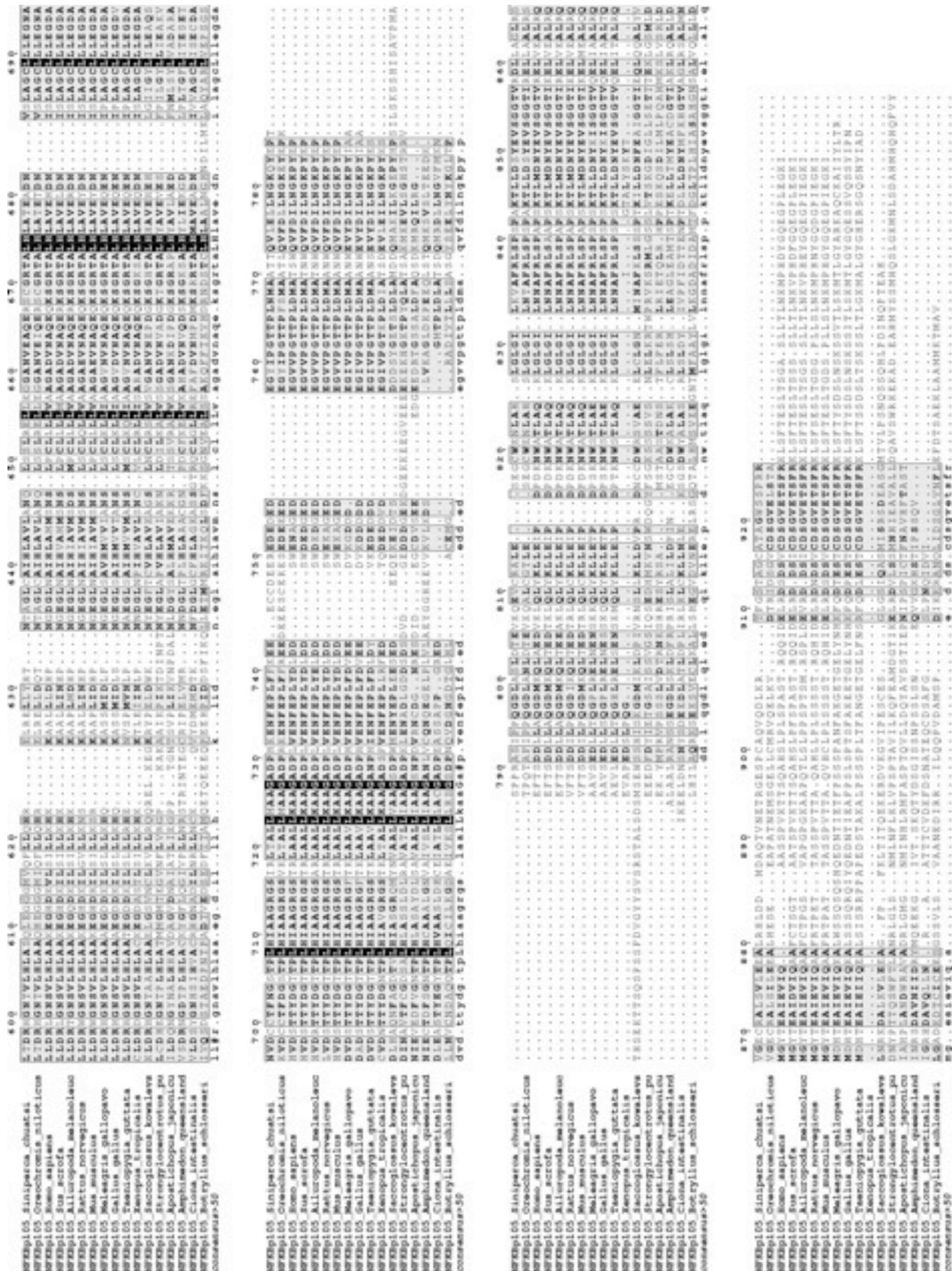


Figura 35: allineamento del tradotto predetto di BsNF-kB1 con ortologi di altri metazoi riportati in figura 34.

Nell'analisi filogenetica con i metodi di massima parsimonia, minima evoluzione, UPGMA e Neighbor-Joining, BsNF-kB1 si separa dal ramo di *C. intestinalis* e si colloca in una posizione evolutiva basale rispetto alle sequenze degli organismi considerati (fig. 36).

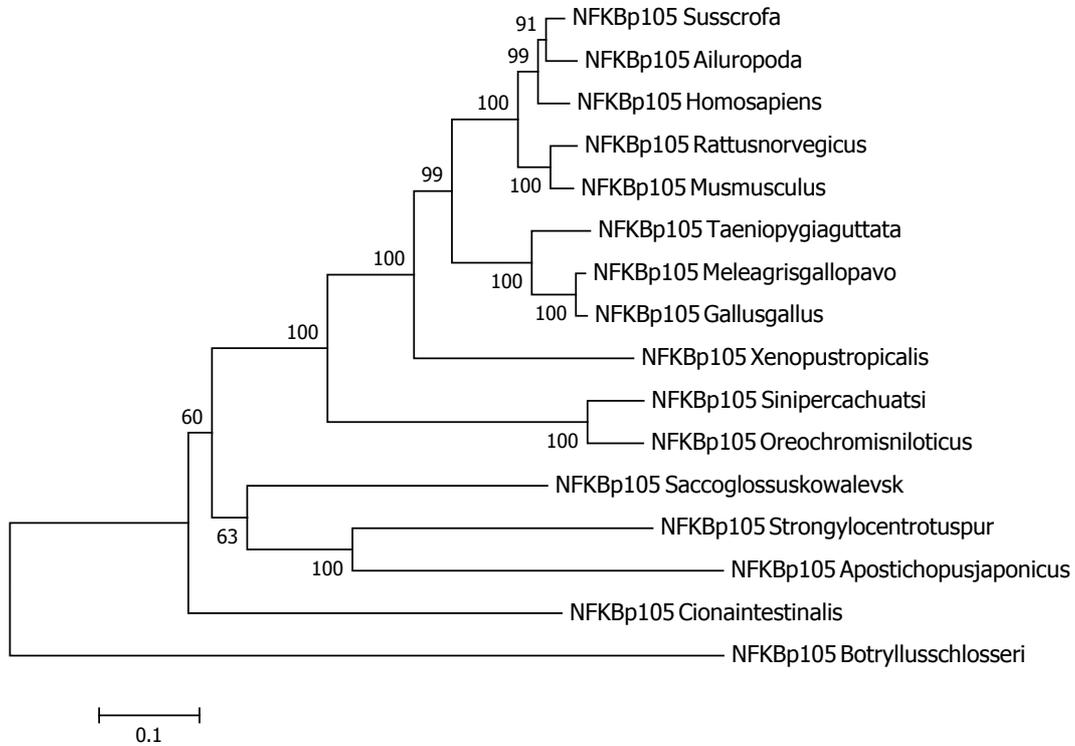


Figura 36: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di NF-kB1 indicate in figura 34, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## Geni coinvolti nella proliferazione

### - PCNA

Le EST di *B. schlosseri* che mostravano in BLAST una regione molto simile al dominio specifico della proteina PCNA, sono state analizzate per ottenere dei primer con cui isolare il suo trascritto. L'amplificazione con i primer PCNF1 e PCNR ha prodotto un cDNA della lunghezza attesa di 568 pb che successivamente, con la tecnica della 5' e 3' RACE, è stato finalizzato in messaggero completo di 1415 pb. Questo mRNA ha un ORF di 792 pb che traduce per una proteina putativa di 263 aa. La sequenza amminoacidica di BsPCNA presenta il caratteristico dominio PCNA tra gli amminoacidi 4-257 che si suddivide nei due sottodomini PCNA-N all'N-terminale (1-125 aa) e PCNA-C all'estremità opposta (127-198 aa) (fig. 37). Numerosi residui funzionali risultano conservati, a partire da quelli coinvolti nel legame con le altre molecole di PCNA per la formazione dell'anello trimerico che circonda la doppia elica (77; 80-82; 111-117; 143; 146-147; 149-150; 173; 176-177; 179-183), quelli di legame con il DNA (13-14; 20; 77; 80; 146; 149; 211; 218), di interazione con la proteina p21 (WAF/CIP1) che inibisce l'attività di PCNA (27; 29; 40; 67; 69; 119-122; 253-256) e con l'endonucleasi FEN-1 che invece ne accresce l'attività (40; 47; 251) e di legame con il partner di replicazione RFCL (209; 253-255). Infine, una fosfotirosina critica per la stabilità del legame di PCNA con il DNA è conservata in posizione 212.

```
CTCCGACTCAG
CGTTTGTGCTCGGCGCGCTTAATTCATTCTGAGAACGCTGTTGCTGTCGTAG
TCGGTCTTATTCTTTTTCGACGCGCCTAAAGTACGATAATACAATTACAAA
1
1
M F E
ATGTTCGAA

4
A K L I O G S T L K K V Q E A L K D I V
10
GCCAAGTTGATTACAGGGAAGTACCTTGAAAAAGTTCAAGAAGCTCTAAAAGACATTGTA

24
T E A K W D C T H S G I S L Q A M D S S
70
ACGGAAGCAAATGGGATTGTACGCATTCGGGCATCAGCTTACAAGCTATGGACTCATCG

44
H V S L V Q L T L R A D G F E N Y R C D
130
CACGTTTCCTTAGTACAGTTGACATTAAGAGCGGACGGTTTCGAAAATTACAGATGCGAC

64
R N L T M G I N M S S M A K I L R C A G
190
CGCAATTTAACGATGGGAATAAACATGTCTAGCATGGCGAAAATTTTGGCTTGCGCAGGC

84
N N D V I T L K A E D N A D L L E L T F
250
AACACGACGTAATTACATTGAAGGCCGAAGACAACGCTGATTTATTGGAATTGACCTTT

104
E A P E E K K F S Q Y E L K L M D L D C
310
GAAGCGCCGGAGGAAAAGAAATTCGCGAGTACGAGCTTAAGCTGATGGATTTGGACTGT

124
E O L G I P D O E Y S C S V T L P S O E
370
GAACAACCTCGGTATTCAGATCAAGAGTACAGCTGTAGCGTGACGCTCCCATCTCAAGAA

144
F A R I C R D L S O I S E C V V I T C T
430
TTCGTCGCAATTTGCCGTGATTTAAGCCAAATCAGCGAATGTGTGCTTATTACGTGCACT

164
K D G V O F S A K G D L G T G K V R L Q
490
AAAGATGGCGTTCAGTTTCTGCGAAAGGAGATCTGGGAACTGGTAAAGTTCGATTGCAG

184
O N S G G G V E D D E K V T V E I S E P
550
CAAAACAGCGGGGGCGGAGTTGAAGATGATGAAAAAGTCACAGTCGAAATTTTCGGAACCA
```

204 V O L T F A I K Y L N M F A K A M S L S  
 610 GTTCAATTGACATTTGCGATCAAATATTTGAACATGTTTGCTAAAGCCATGTCCCTTTCA  
  
 224 P S V T L S M S N D V P L V V E Y G V A  
 670 CCATCCGTGACCCTTTCCATGTCAAACGATGTCCCGCTTGTGTTGAATATGGTGTGCT  
  
 244 D M G H I K Y F L A P K I E D E E D D D 263  
 730 GATATGGGACACATCAAGTACTTCCCTTGCGCCAAAGATAGAAGATGAAGAGGACGACGAT 789  
  
 -  
 790 **TGA** 792  
 GACAACTGAAAAAACACTAGCGTTGATATTCTTCTTACATGCTCTTTTCTGTGTTT  
 TTTTTTTAAACAGGATTATTCTGTCTTTTTTCCGTATAAAATCTCAACCTATGGCAG  
 TTTCCGATTTTCGTTTGTCCGGTCCGCATCATGTGTACATTTATTGTGCACCTGGCAC  
 TCGTCTGAATTTTTTGGCTTTATCTGAAATGCATATAGCAAAGCAACATTCTTAGT  
 AATTATGAAC TGAGTGTCAAGTATTTTTCGGTCATGTTGACAAAATGTCTTTCAAAT  
 CGAAATTTAACATTAGGTGATAACGAATTGTTTGCCTTGTATTATTTGGAATAAAA  
 TACTCCTTGTATTATAAAGTCTTGTCTTAGTGAGTATAAATAGTAAAAACAGGTATGC  
 AAATTATGGTAATGATGATTACAGCATTGGAATGTGAACAATTACCAATTGATGT  
 TTGTTTGAACAGTTACAGATGAAATACATATTTTCTGACTGAAAAGGTAAAAAAA

Figura 37: mRNA di BsAIF e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. Le regioni gialle e azzurre rappresentano rispettivamente il dominio PCNA-N e PCNA-C. La parte sottolineata indica il dominio PCNA condiviso.

Le analisi di similarità di BsPCNA con ortologi dei diversi gruppi di metazoi, evidenziano valori superiori al 50% per ognuno di questi e raggiungono percentuali vicine al 70% nei vertebrati, come con *O. niloticus*, mentre condivide con le altre specie di tunicati l'80% di residui identici, arrivando quasi all'86% con *Botryllus primigenus* (fig. 38).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Sus scrofa</i>	68,8	69
<i>Homo sapiens</i>	68,5	69
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	68,1	69
<i>Mus musculus</i>	67,3	68
<i>Taeniopygia guttata (variante 1)</i>	68,4	69
<i>Taeniopygia guttata (variante 2)</i>	68,4	69
<i>Gallus gallus</i>	67,8	68
<i>Meleagris gallopavo</i>	67,7	68
<i>Coturnix japonica</i>	67,4	68
<i>Anolis carolinensis</i>	66,9	67
<i>Chelonia midas</i>	58,9	59
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	68,5	69
<i>Xenopus laevis</i>	68,1	68
<i>Oreochromis niloticus</i>	69,5	69
<i>Oryzias latipes</i>	68,7	69
<i>Salmo salar</i>	68,3	68
<i>Takifugu rubripes</i>	68,3	68

<i>Esox lucius</i>	68,3	68
<i>Danio rerio</i>	68,1	69
<i>Botryllus primigenus</i>	85,6	87
<i>Polyandrocarpa misakiensis</i>	84,1	84
<i>Styela clava</i>	81,4	82
<i>Ciona intestinalis</i>	76,8	77
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	62,7	63
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	59	59
<i>Bombyx mori</i>	60,8	61
<i>Culex quinquefasciatus</i>	59	59
<i>Drosophila melanogaster</i>	58,9	60
<i>Camponotus floridanus</i>	55,3	55
<i>Dugesia japonica</i>	53,1	53
<i>Trichinella spiralis</i>	55,7	56
<i>Caenorhabditis elegans</i>	46,6	47
<i>Loa loa</i>	45,8	46
<i>Hydra magnipapillata</i>	54,8	55
<i>Amphimedon queenslandica</i>	55	55

Figura 38: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsPCNA e gli ortologhi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, rosa chiaro gli artropodi, azzurro i platelminti, giallo limone i nematodi, rosa scuro i cnidari, verde scuro i poriferi.

L'allineamento di BsPCNA con le sequenze ortologhe, riflette l'alto tasso di conservazione osservato nelle analisi di similarità e l'origine antica del dominio PCNA che si è evoluto con poche variazioni in gran parte degli eucarioti (fig. 39).

PCMA, Lepocephabeirus, saloonis  
 PCMA, Fenneropenaeus, chinensis  
 PCMA, Protophila, melanogaster  
 PCMA, Culex, quinquefasciatus  
 PCMA, Camponotus, floridanus  
 PCMA, Bolyellus, schlosseri  
 PCMA, Polyandrocampa, masakianii  
 PCMA, Bocyllus, primigenus  
 PCMA, Styela, clava  
 PCMA, Clona, iracundialis  
 PCMA, Gallus, gallus  
 PCMA, Meleagris, gallopavo  
 PCMA, Cucurbita, japonica  
 PCMA, var2, Trimeniopygia, guttata  
 PCMA, Chelonia, midas  
 PCMA, Anolis, carolinensis  
 PCMA, Homo, sapiens  
 PCMA, Grylloblatta, cuniculipes  
 PCMA, Mus, musculus  
 PCMA, Salmo, salar  
 PCMA, Eoos, lucius  
 PCMA, Oreochromis, niloticus  
 PCMA, Takifugu, rubripes  
 PCMA, Danio, rerio  
 PCMA, Xenopus, laevis  
 PCMA, Xenopus, tropicalis  
 PCMA, Hydra, magnipapillata  
 PCMA, Apicomplexon, queenslandica  
 PCMA, Dugesia, japonica  
 PCMA, Trichinella, spiralis  
 PCMA, Loa, loa  
 PCMA, Caenorhabditis, elegans  
 consensus:50

1  
 1.0  
 2.0  
 3.0  
 4.0  
 5.0  
 6.0  
 7.0  
 8.0  
 9.0  
 1.00  
 1.10  
 1.20

PCMA, Lepocephabeirus, saloonis  
 PCMA, Fenneropenaeus, chinensis  
 PCMA, Protophila, melanogaster  
 PCMA, Culex, quinquefasciatus  
 PCMA, Camponotus, floridanus  
 PCMA, Bolyellus, schlosseri  
 PCMA, Polyandrocampa, masakianii  
 PCMA, Bocyllus, primigenus  
 PCMA, Styela, clava  
 PCMA, Clona, iracundialis  
 PCMA, Gallus, gallus  
 PCMA, Meleagris, gallopavo  
 PCMA, Cucurbita, japonica  
 PCMA, var2, Trimeniopygia, guttata  
 PCMA, Chelonia, midas  
 PCMA, Anolis, carolinensis  
 PCMA, Homo, sapiens  
 PCMA, Grylloblatta, cuniculipes  
 PCMA, Mus, musculus  
 PCMA, Salmo, salar  
 PCMA, Eoos, lucius  
 PCMA, Oreochromis, niloticus  
 PCMA, Takifugu, rubripes  
 PCMA, Danio, rerio  
 PCMA, Xenopus, laevis  
 PCMA, Xenopus, tropicalis  
 PCMA, Hydra, magnipapillata  
 PCMA, Apicomplexon, queenslandica  
 PCMA, Dugesia, japonica  
 PCMA, Trichinella, spiralis  
 PCMA, Loa, loa  
 PCMA, Caenorhabditis, elegans  
 consensus:50

130  
 140  
 150  
 160  
 170  
 180  
 190  
 200  
 210  
 220  
 230

```

24号      25号      26号
FCNA Lepoctheirus_sakioensis      LKPIIDLI GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Penestipensius_chinensis    KYGIKI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Drosophila_melanogaster      KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Coix_quinqrefasciatus       KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Caspotes_floridensis        KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Bocryllus_schlosseri        KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Polyandrocarpa_masakiensis  KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Styela_cava                  KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Cloa_troastinalis           KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Gallus_gallus                KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Meleagris_gallinavo         KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Coturnix_japonica           KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA var2_Teuclopygia_guttata    KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Chelonia_mada                KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Anolis_carolinensis         KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Sus_scrofa                  KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Gryotelepus_ousiocalus      KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Mus_musculus                 KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Salmo_salar                  KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Scex_lucius                  KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Gryllus_letipes              KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Oreochromis_niloticus       KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Takifugu_rubripes           KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Danio_erio                   KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Xenopus_laevi                KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Hydra_magnipapillata        KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Amphimedon_queenslandica    KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Dupesia_japonica            KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Trichinella_spiralis        KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Loa_loa                       KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
FCNA Caenorhabditis_elegans      KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI
consensus>50                      KYIIDI  GRIVYV LKPIIDLI

```

Figura 39: allineamento del tradotto predetto di BsPCNA con ortologhi di altri metazoi riportati in figura 38.

Nell'indagine filogenetica, determinata con i metodi della massima parsimonia, minima evoluzione, UPGMA e Neighbor Joining, il cluster che raggruppa le sequenze dei tunicati, dove BsPCNA forma un clade con *Polyandrocarpa misakiensis*, si stacca da quello degli anfibi e degli altri vertebrati (fig. 40).

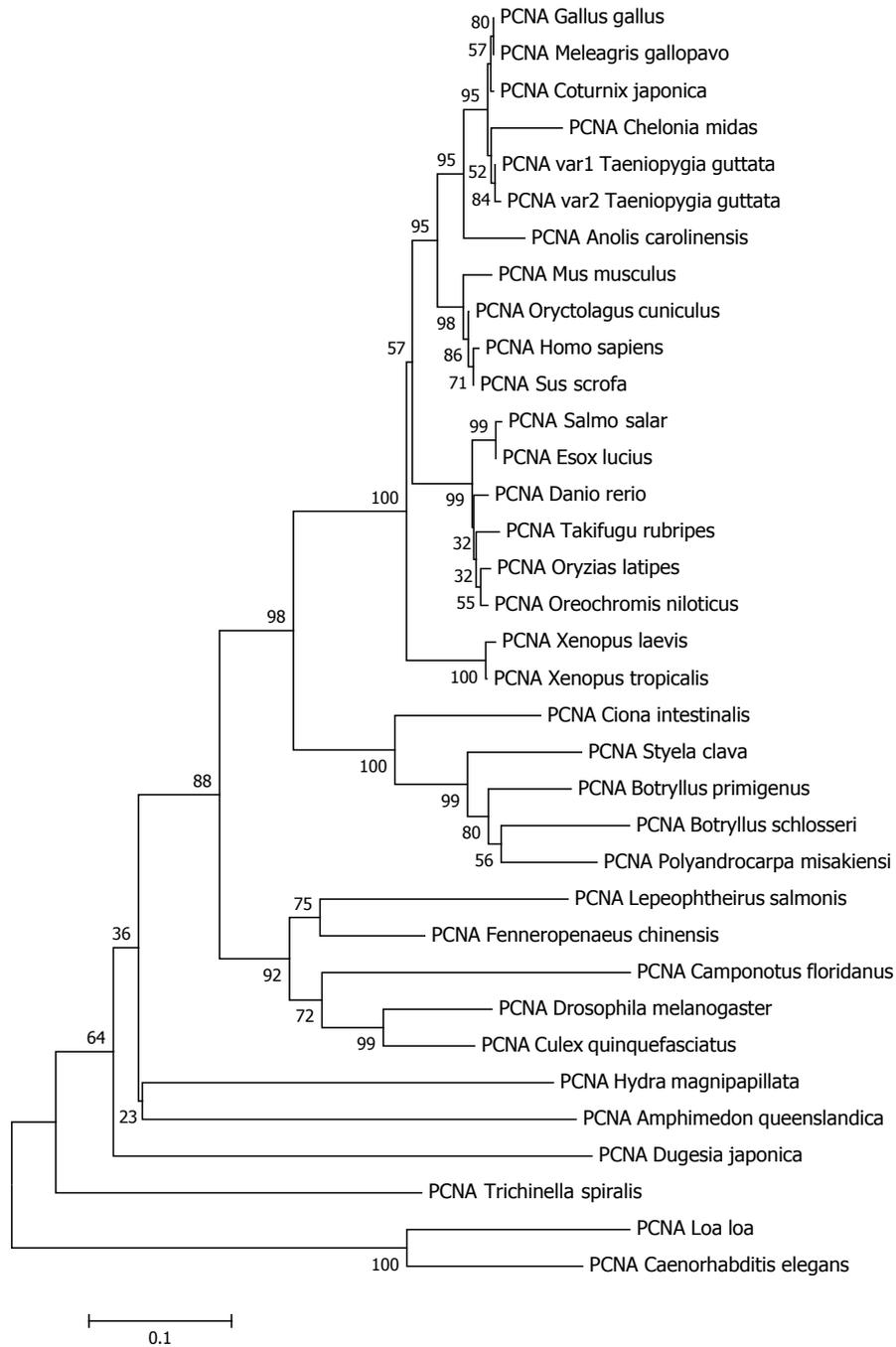


Figura 40: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di PCNA indicate in figura 38, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - KI67

Un frammento di cDNA di 659 pb è stato prodotto attraverso reazione di PCR con la coppia di primer specifici K67F1 e K67R, disegnati sulla base delle EST di Botrillo con similarità per il fattore KI67. I tentativi di completare il messaggero all'estremità N-terminale tramite 5' RACE non hanno avuto esito positivo e, pertanto, il trascritto parziale di BsKI67 è di 3680 pb, con una regione codificante di 1950 pb che esprime un tradotto putativo di 649 aa. Quest'ultimo è composto dal dominio conservato N-terminale FHA, compreso tra gli amminoacidi 9-102 e da due domini sovrapposti di motivi ripetuti KI67 all'estremità C-terminale (479-596; 559-645 aa) (fig. 41). Inoltre, BsKI67 contiene un dominio di legame con la fosfatasi 1 (132-199 aa), residui di legame con fosfopeptidi (31; 43; 45-46; 67-69) e diversi siti che subiscono fosforilazione dalle MAPK, da PKA, dalla chinasi ciclina-dipendente e altre ancora.

```
1 M P L Y G K I T V L K R D G S S G S Q Y
1 ATGCCACTTTATGGGAAAATCACCGTTTTGAAACGGGATGGGAGCAGCGGATCGCAGTAT

21 P I T N N I C T F G R G S N C E I R I Q
61 CCCATCACTAACAATATCTGCACGTTCCGGCAGAGGTTCGAATTGTGAGATCAGAATTCAA

41 L P S V G L R E C R L V A D E N G S F V
121 CTTCCTTCCGTCGGATTGAGAGAATGCAGATTGGTGGCGGATGAAAATGGATCTTTTGT

61 L S K I N Q S G E I F V N S E A L K T K
181 CTCTCAAAAATCAACCAGTCAGGTGAGATATTTCGTC AACAGTGAAGCGCTGAAAACAAAG

81 V E A T L N H N D V L S I A G R S F R F
241 GTTGAAGCTACTTTGAATCATAACGATGTTCTATCAATTGCTGGACGTTCTTTCAGGTT

101 E Y P P A V V E T M M M S K K L G G T T
301 GAATATCCGCCTGCAGTTGTGGAACTATGATGATGAGCAAGAACTTGGGGGACGACC

121 P R P A V L D R L R K S E R R R V S F G
361 CCGCAGCTGCCGTTCTGGACCGTCTCAGAAAATCCGAGAGGCGAAGAGTGTCTGTTTGGG

141 P Q L S P E Q F D L A L P P N T P V K K
421 CCGCAGTTGAGTCCGGAGCAGTTTGATCTGGCCCTGCCCCGAATACGCCGTTGAAGAAG

161 G T I P M Q N L S N T D K V V R S V S L
481 GGCACGATCCCCATGCAGAACCTGAGCAACACGGATAAAGTTGTCCGAAAGCGTCAGTTTG

181 T K G T K R K S C G N V T T P K L Q K S
541 ACGAAGGGCACGAAACGCAAGAGCTGCGGAAATGTCACGACTCCAAAGTTGCAGAAATCA

201 K E K R S F D E L V E L V G L N K R K K
601 AAGGAGAAAAGAAGCTTTGACGAACTGGTGGAGCTTGTTCGGCCTGAACAAGCGAAAGAAA

221 S I G N D Q T P A D I G S P D I F E G L
661 TCGATTGGAAATGATCAGACGCCCCGAGACATAGGAAGCCCCGACATTTTTGAGGGTCTG

241 P K Q T T P T P K T A L S E K K N T L T
721 CCAAAGCAAACGACCCCAACCCCAAAAACCGCTCTGTCAGAGAAGAAAATACTTTGACC

261 K T R K S C D S G R K S T G R P T G Q P
781 AAGACAAGAAAAGTTGCGATTCTGGACGCAAGAGCACTGGACGCCCTACTGGACAGCCA

281 V D G A S S E G G S P V L G R R G S L P
841 GTGGATGGAGCATCGTCAGAAGGAGGGTCCGACGTCGTTGGGTAGGAGGGGCTCGCTGCCA
```

301 R T P K S V P S D E A K L E P K S D S K  
 901 CGGACACCAAAAAGCGTCCCAGCGACGAGGCAAAATTTGGAACCAAACTCTGATAGCAAG  
  
 321 K T P T D K A K K T G A E S N P P R T P  
 961 AAAACACCTACAGACAAAGCAAAGAAAACCGGGGCCGAGTCAAACCCACCTCGTACCCCG  
  
 341 R R S G A N S A I L S I R R K S L K G R  
 1021 CGAAGATCCGGAGCCAATTTCCGCGATCTTGAGCATAACGAAGGAAGAGTCTGAAAGGACGC  
  
 361 K S G V L L W S D V V R K N V D K K M E  
 1081 AAAAGCGGGGTGCTGCTCTGGTCCGACGTGGTCAGGAAAAATGTGGATAAAAAGATGGAG  
  
 381 P A N E A V Q Y Q K P G K M G R R L V H  
 1141 CCCGCGAATGAAGCAGTCCAGTATCAGAAGCCAGGCAAAATGGGTGCAAGATTGGTTTAC  
  
 401 M T P K Q R S M M R H V D S P A T I Y I  
 1201 ATGACCCCAAAAACAACGATCGATGATGCGTCACGTAGACTCGCCCGGACCATCTATATT  
  
 421 G K R A K S R R S K A P V P D W P A N D  
 1261 GGTAACCGGGCAAAATCCAGACGATCGAAAGCGCCCGTTCTGATTGGCCCGCAATGAT  
  
 441 I D S I E S P A C K I E T A Q P T E K A  
 1321 ATTGATTCCATCGAGTCACCAGCTGCAAAATTTGAGACCGCACAAACCGGAAAAGGCT  
  
 461 V K R K T P K V K G Q P V E K H F G T K  
 1381 GTCAAACGAAAGACCCCAAAAGTGAAAGGCCAGCCAGTCGAAAAACATTTTCGGCACCAAAA  
  
 481 R L L Q T P K P K V N G V P V E E H F G  
 1441 AGACTGCTTCAGACTCCAAAACCAAAAGTGAATGGTGTGCCGGTGGAGAACAATTTTGGC  
  
 501 T K R L L K T P K E K L K G Q P V E K H  
 1501 ACCAAAAGATTACTGAAGACTCCCAAAAGAAAACCTGAAAGGCCAGCCCGTTGAAAAGCAT  
  
 521 F G T R R L L Q T P K E K I K G V P V E  
 1561 TTTGGGACCAGAAGATTGCTGCAGACGCCTAAAGAGAAGATAAAAGGTGTGCCAGTGGAG  
  
 541 K H L G T K R L L Q T P K E K V K Y D P  
 1621 AAACATCTGGGCACCAAAAGGTTGCTGCAAACTCCGAAAAGAAAAGGTGAAATATGATCCT  
  
 561 V E K H F G T K R L L Q T P K E R V K G  
 1681 GTTGAGAAGCATTTTGGCACAAAAGACTGCTACAGACTCCTAAAGAGAGGGTGAAGGGG  
  
 581 E P V E E H F G T K R L L Q T P R E R I  
 1741 GAACCGGTGCAAGAACATTTCCGGACCAAAAGATTGTTGCAGACTCCCAGGGAGAGAATC  
  
 601 K G Q P V E K N F G T K R L L Q T P K E  
 1801 AAGGTCAGCCCGTTGAAAAGAATTTCCGAACGAAAAGATTGCTGCAAACTCCGAAAAGAA  
  
 621 K V K Y D P V E K H F G T K R L L Q S P  
 1861 AAGGTGAAATATGATCCCGTCGAGAAGCATTTTGGGACTAAACGACTTTTGCAGAGTCTCT  
  
 641 K E K V K R R Y G -  
 1921 AAGGAAAAGTGAAAAGCGGTATGGTTGA

649  
1950

AGATAAGCTAGGAATGAAACGTATGTTTGC  
 TTCGCCAAAAATAAGAACAACCTCGAGCGTCTATCGACGGAGATTTTGGACTGGACACGTT  
 GTTTGTGGAACCTGAAACTTGTGTGCTGACGACAAGAAGTCTCAGGAGGTGCAGATTGA  
 CAAAACGACCAAAAAAGAGACAGGAAAAAGGCTCCGAAAAGTGAATGTGTGCAAAAAG  
 TTTGGAATCTCAAACTTGCATGTGACAAGTCTGAGGAGGGGAGATTGACAAAATAAC  
 CAAACAACTGGCAGCAAAAAGTTGAAAAGGCTCCGAAAAGTGGGAGTGTGTGCAAAAC  
 TCAGACGCACGACGTCGACAACAAGAAAATCCGGGGAGGGACAGACTGACAAAACCGAGCAA  
 AAGAACTGCCAGGAGCAAAATGGTTGAAAAATGTATCAAAAAGGAAGGAATCTCAGACTC  
 GTGACAATACCGAGGAGGAGCAGATTGATGAACCCGTTTCGAAAAGTTGGTAAGGGGACAA  
 AAAATGGAAAAGGTGACGAAAATTTGAGAAAAGGTCGACCAGGTCAAAACAGTTACCTGC  
 TGATGATGTTGACGAAAATTTGGAGCGGAAAATTTGAGAAGAAAACCTGAAAACCCGGTGC  
 GAAACGAGCGACAAGAGGTGCTAAGAAGGAGAGTGAAGGAGGAAAATATTTGGAAGCAAAA  
 AGATGAGGTTGCGACTCAGCCTCCTGTTGTGAGGAAGACTCGAGGCAGAAAAGTGGAAACA

AATGACCCCAAACCAACGGCGGTGAGCCTCCAAAAGTGGGTAGGAAAAGGAAAGCGGA  
 AACTGCAGTGGATGAGCCAAAGAAAACAAGGTCCAAAATATCTGCTGATGCGGAAATGG  
 TGAGAAAACAGTTCCTGAAACAACAGAACTAAGCGACTGAAACGGAAAACGAAAGAAAT  
 CGACGAGCTGGAGCCAAAATCGCAAAAAATCACAAAAGTGGCAAAAACGTGTAATAATCGCA  
 AAAATCAGCGGGCCGGAACCGAAGGTGAAAAAACTGTCGAAACGGAAACCAAAAAGTTCA  
 AAAAGCGACTCGATCGACCAAATCAAAGGTCTGGAGGCAAAAAGAGGAGTCGGATCAACA  
 AAAACCATCGATACTGAAAAAGGAAAAATCCGAATCGAAAGAAACGAAACGATCGACTCG  
 TGACAAAAATGTCACCTTTTCAACCCGTCAGAAAAGTCGACAAGATCCAAGAAAAGTTTAAAG  
 ATCTGTGCAAAATTTGGTGTCTCAAGACAGCAAGGTGAAATGGAGATGCCTTTTCCA  
 TCGTGACACCCGTTGAATTTTGTGCTGTGTATTATAGGTTTGTGCATCAGACAGGATTTCA  
 CCAATCATATTATTTCCACTGCTCAGAAATCTGTGCCATTATGGATGTTTAAACGCTTG  
 TACAAAAATGTCACCTCTATGTAATCTTCGTGGGTCTGCGGAAAGTTCTCTGATCTGT  
 GTTTTTAGGAGTTCAAACCTCACAGATTGTATAAACTTGTCTATGGTAATTTGTTTG  
 TAAAAGATATTTGAATGATTCTCATAAGTGGCGGACGTTAAGGTTACAATGGAGAGAGTC  
 TTAACAGCAACTTTGCGCACTTTTCAAAGTTGGATTTGTCATCATTTTATTCTCACA  
 GCTCTGAAACTCTTGTCTTTATGGATGTTTGAATGTTGTACATAAAATTCGACTTCTATG  
 TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 41: mRNA di BsKI67 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione arancio corrisponde al dominio FHA. La regione in grassetto rappresenta il primo dominio KI67 e quella sottolineata il secondo.

Le ricerche sulla similarità di BsKI67 con gli ortologi dei metazoi sono state effettuate calcolando sia la percentuale di identità globale che quella locale, data la variabilità di queste proteine che sono accomunate dalla presenza del dominio FHA, l'unico elemento conservato. La sequenza proteica di Botrillo condivide il valore più alto di identità locale con quella di *C. intestinalis* (49,5%), mentre nei vertebrati gli anfibi e gli uccelli mostrano percentuali leggermente inferiori. Invece, nell'analisi dell'identità globale, BsKI67 presenta maggiore similarità per l'ortologo di *Taeniopygia guttata*, con un valore del 25,2% (fig. 42).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>		
	% identità (locale)	% identità (globale)	% similarità
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 1)	23	8,1	34
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 2)	32,4	8,7	33
<i>Homo sapiens</i>	28,2	8,6	31
<i>Mus musculus</i>	21,7	8,3	34
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	35	10,3	35
<i>Ovis aries</i>	34,4	7,9	34
<i>Gallus gallus</i>	45,1	9,7	38
<i>Taeniopygia guttata</i>	28,4	25,2	38
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	48,7	11,3	42
<i>Xenopus laevis</i>	44,1	9,9	45
<i>Danio rerio</i>	44,7	12,5	45
<i>Dicentrarchus labrax</i>	44,1	19,7	44
<i>Oryzias latipes</i>	43,1	12,7	43
<i>Ciona intestinalis</i>	49,5	16,2	56
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	35,6	11,2	39
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	27,7	12,4	30

<i>Crassostrea gigas</i>	26,4	14,7	44
--------------------------	------	------	----

Figura 42: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsKI67 e gli ortologhi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, verde smeraldo gli emicordati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi.

Nell'allineamento di BsKI67 con gli ortologhi considerati, si nota con chiarezza che la regione all'estremità N-terminale del dominio FHA è conservata in tutte le sequenze, così come la variabilità amminoacidica della parte rimanente che presenta pochi motivi o residui simili isolati, perlopiù nei domini KI67. A differenza della proteina putativa di Botrillo, quasi tutti gli ortologhi dei vertebrati sono lunghi tra i 2000-3000 aa e oltre i 1000 aa quelle degli invertebrati. L'unica sequenza che ha dimensioni simili a BsKI67 è quella di *T. guttata* (fig. 43).











K167 Mecynops laevis  
 K167 Mecynops tropicoides  
 K167 Siccotrichos labrax  
 K167 Oxyria latipes  
 K167 Betryllus schlosseri  
 K167 Cioma succatinalis  
 K167 Gallus gallus  
 K167 Temnopygia guttata  
 K167 Leo2 limo-apiana  
 K167 Leo1 limo-apiana  
 K167 Gyrocotyle cuniculus  
 K167 Ovis aries  
 K167 Mus musculus  
 K167 Strongyloides\_kowalevskii  
 K167 Crassostrea gigas  
 conensem20

K167 Mecynops laevis  
 K167 Mecynops tropicoides  
 K167 Siccotrichos labrax  
 K167 Oxyria latipes  
 K167 Betryllus schlosseri  
 K167 Cioma succatinalis  
 K167 Gallus gallus  
 K167 Temnopygia guttata  
 K167 Leo2 limo-apiana  
 K167 Leo1 limo-apiana  
 K167 Gyrocotyle cuniculus  
 K167 Mus musculus  
 K167 Strongyloides\_kowalevskii  
 K167 Crassostrea gigas  
 conensem20

K167 Mecynops laevis  
 K167 Mecynops tropicoides  
 K167 Siccotrichos labrax  
 K167 Oxyria latipes  
 K167 Betryllus schlosseri  
 K167 Cioma succatinalis  
 K167 Gallus gallus  
 K167 Temnopygia guttata  
 K167 Leo2 limo-apiana  
 K167 Leo1 limo-apiana  
 K167 Gyrocotyle cuniculus  
 K167 Mus musculus  
 K167 Strongyloides\_kowalevskii  
 K167 Crassostrea gigas  
 conensem20

K167 Mecynops laevis  
 K167 Mecynops tropicoides  
 K167 Siccotrichos labrax  
 K167 Oxyria latipes  
 K167 Betryllus schlosseri  
 K167 Cioma succatinalis  
 K167 Gallus gallus  
 K167 Temnopygia guttata  
 K167 Leo2 limo-apiana  
 K167 Leo1 limo-apiana  
 K167 Gyrocotyle cuniculus  
 K167 Mus musculus  
 K167 Strongyloides\_kowalevskii  
 K167 Crassostrea gigas  
 conensem20





L'analisi filogenetica con i metodi di massima parsimonia, minima evoluzione, UPGMA e Neighbor-Joining, mostra che BsKI67 forma un clade con la sequenza di *C. intestinalis* che si separa dal cluster dei vertebrati composto dagli anfibi e dai teleostei (fig. 44).

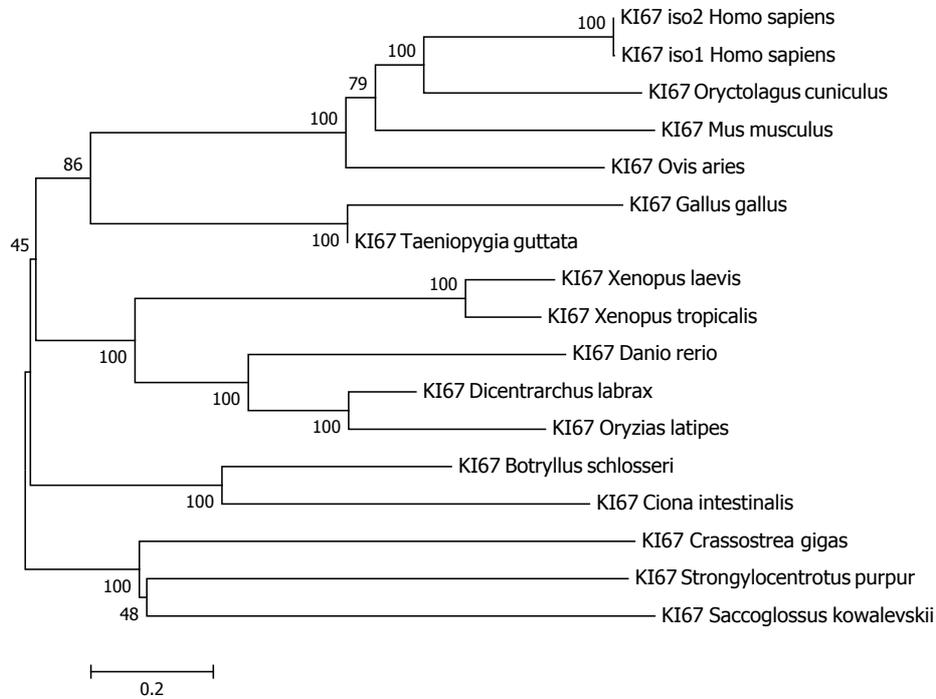


Figura 44: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di KI67 indicate in figura 42, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

- NANOS

Il trascritto completo di BsNANOS, ottenuto dall'allungamento tramite 5' e 3' RACE del prodotto di PCR di 173 pb sintetizzato con i primer 5NR1 e 3NF1, è lungo 1418 pb, ha un ORF di 873 pb che produce una proteina predetta di 290 aa. Questa contiene all'estremità C-terminale, tra gli amminoacidi 212-265, il classico dominio Nanos, costituito da due motivi a dita di zinco (CCHC) necessari per la funzionalità della proteina, il primo potenzialmente in corrispondenza dei residui 212-239 ed il secondo 247-263 (fig. 45).

```

AAGTCTGTGAGTCTGTGAGATAAATTTAGAACTGTTTTATATATAGGCAGCGCAAAC
ATC
1   M N L Q G C Y D V F N D Y L G L S T V
1   ATGAATTTACAAGGCTGCTACGATGTGTTTAACGATTACTTGGGCTGTGACTGTT
20  V G G Q E D Q C Y W M R S V L G R D Y K
58  GTCGGCGGTCAAGAAGACCAATGCTACTGGATGCGATCTGTTCTCGGACGGGACTACAAG
40  K F Q N I P S L D H Q F S E S H L D M N
118 AAATTCCAGAACATTTCCAAGCCTGGATCATCAATTTCCGAAAGCCACCTCGACATGAAC
60  A Y Y D S K L S D V E R L F G R G A V L
178 GCATACTACGATTCGAACTGTCTAGACGTAGAGAGATTGTTTGGGCGCGGAGCTGTCCTA
80  Q K S I N E D S E P A T N N Y Q V P V L
238 CAGAAATCAATCAACGAAGATTCAGAACCTGCTACTAACAACACCAAGTACCGGTACTC
100 E N L T P P T T N Q A A Y P V S G K E D
298 GAAAATTTGACACCACCCACCACCAATCAAGCTGCATATCCAGTTAGTGCAAAGAAGAC
120 Y K D R I Q I A L D A I L Q K Y S H L Q
358 TACAAGGACAGAATACAAATAGCTCTCGATGCGATTTTGCAAAAATACAGCCATCTTCAA
140 N P C L T S S Q F A G N F Q D R Y M G S
418 AACCCCTGCCTAACCTCAAGCCAATTCGCCGGTAATTTCCAAGATCGCTACATGGGTTC
160 S N I P P A N Q L N Q Q C G I D D R K I
478 AGCAATATTCCGCCGCAAATCAACTTAATCAACAGTGCGGCATTGATGACAGAAAGATA
180 L A N L D L D G N N R I L R V T R A A K
538 TTGGCTAATTTGGACTGGATGGCAATAATCGCATACTTCGCGTCACCAGGGCAGCGAAA
200 S G I G S S A T R F I G C S F C K N N K
598 TCCGGCATTGGCAGCTCCGCCACGAGATTCATCGGGTGTTCCTTCTGCAAAAACAACAAA
220 E V K D W Y M S H Q L K D S T G K V T C
658 GAAGTCAAAGATTGGTATATGTACACCAGCTCAAGGATAGCACCAGGAAAGGTTACTTGC
240 P V L R S Y E C P L C D A T G D N A H T
718 CCCGTGTTGAGAAGTTACGAATGTCTTTGTGTGACGCGACTGGAGATAATGCTCATACG
260 I G H C P L N P N R H S S L P L A V R S
778 ATTGTCATTGCCCTTAAACCCAAATCGCCACAGTAGCCTCCCGCTTGCTGTAAGAAGC
280 K T N A T G K K K S L -
838 AAGACTAACGCGACAGGGAAGAAGAAATCACTGTAA
TCAGGCTGTATAATACGAAACTTT
CGTCGGCAGCATTATAGGCTACTTACCGCATCCTTACGCCGTAGACTTGACCGATATC
AATCACTATTTACGATCGGTAATGGCGATATCAGCCTGTGCCGCCATGACAAAACGG
CTGGGTCGTGGATTGTTTTACCCTAGTTTTTATTGATTGGTGTTCCTCCCTTCTTGAAT

```

GAGATTTTCGTAGGAAATCATATTGGCCGTTTAATCGAATTTGTGACGTGTTTAGTTTTG  
 TGCTGCAGATGAAATTATAATGTCCACGGCGGATTTGTTTACCGTTGCCAACTGTATTTT  
 GTTGATAATTCTGCGTGTGATATCCATTATGTGCCGGTTTTATCGATTTTTGTTGTTT  
 TTCGTTGTTACGATTGTTAACGTTGATGTTAAAGTGTGTTTTAACCAAAGTGTGCTTTAA  
 TTGTCTAAGGCAGGATCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 45: mRNA di BsNANOS e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. Il dominio NANOS è indicato in azzurro.

La famiglia NANOS è caratterizzata da una topologia che prevede una regione N-terminale estremamente variabile ed un C-terminale, contenente il dominio NANOS, ben conservato. A questo proposito, nello studio della similarità di BsNANOS con i vari orologi dei metazoi, sono stati considerati entrambi i tassi di identità, globale e locale. La sequenza putativa di Botrillo possiede globalmente la percentuale maggiore di residui identici con quella di *Botryllus primigenus* (48%), mentre a livello locale molti orologi mostrano valori superiori al 50%, sia nei vertebrati che negli invertebrati, come negli cnidari con il 57,9% di *Nematostella vectensis* e negli uccelli e nell'uomo con il 61,8% (fig. 46).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>		
	% identità (locale)	% identità (globale)	% similarità
<i>Homo sapiens 1</i>	61,8	23,3	62
<i>Homo sapiens 2</i>	51,3	22,1	51
<i>Homo sapiens 3</i>	47,4	16,9	47
<i>Mus musculus 1</i>	49,4	21	54
<i>Mus musculus 2</i>	52,6	20,7	53
<i>Mus musculus 3</i>	46,4	14,1	47
<i>Sus scrofa 1</i>	61,8	22	50
<i>Sus scrofa 2</i>	50,6	21	51
<i>Sus scrofa 3</i>	47,4	14,5	47
<i>Gallus gallus 1</i>	61,8	24,1	51
<i>Chelonia midas 2</i>	53,3	16,6	53
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis 1</i>	56,4	19	55
<i>Xenopus laevis 1</i>	56,4	18,3	56
<i>Danio rerio 1</i>	55,2	25,1	58
<i>Danio rerio 3</i>	51,6	18,6	57
<i>Oryzias latipes 1a</i>	56,4	19,7	56
<i>Oryzias latipes 1b</i>	42,4	21,6	52
<i>Oryzias latipes 2</i>	56,6	20	57
<i>Oryzias latipes 3</i>	49,3	23,1	57
<i>Salmo salar 1</i>	53,1	20,7	53
<i>Acipenser sinensis 1</i>	53,1	23,4	53
<i>Botryllus primigenus</i>	49,1	48	47
<i>Ciona intestinalis</i>	51,1	33,4	51
<i>Branchiostoma floridae</i>	49	23,8	49

<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	51,2	26,1	51
<i>Strongylocentrotus purpuratus 2</i>	50,7	22,6	45
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	50,7	23,9	44
<i>Haliotis asinina</i>	49,4	23,1	49
<i>Drosophila melanogaster a</i>	50	18	50
<i>Drosophila melanogaster b</i>	50	18,8	50
<i>Apis mellifera</i>	44,3	16,4	44
<i>Aedes aegypti</i>	37,3	19,8	37
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	45,7	20,5	49
<i>Caenorhabditis elegans 1</i>	52,8	16	64
<i>Caenorhabditis elegans 2</i>	40,9	12	27
<i>Caenorhabditis elegans 3a</i>	25,5	9,3	26
<i>Caenorhabditis elegans 3b</i>	25,5	9,5	26
<i>Nematostella vectensis 1</i>	57,9	23,8	58
<i>Nematostella vectensis 2</i>	56,4	24,4	57
<i>Hydra magnipapillata 1</i>	35	22,3	53
<i>Hydra magnipapillata 2</i>	54,1	20,7	54

Figura 46: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsNANOS e gli ortologi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, giallo chiaro i cefalocordati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, giallo limone i nematodi, rosa scuro i cnidari.

Nell'allineamento di BsNANOS con gli ortologi dei metazoi, si osserva la regione N-terminale variabile che contrasta con il dominio fortemente conservato NANOS, in cui si possono distinguere con efficacia le due porzioni a dita di zinco organizzate nei quattro residui C-C-H-C (fig. 47).









sequenze NANOS2 dei vertebrati, con i quali forma un grande gruppo separato dal cluster delle sequenze NANOS1 dei vertebrati. Questa separazione non è comunque abbastanza supportata dal valore di bootstrap (fig. 48).

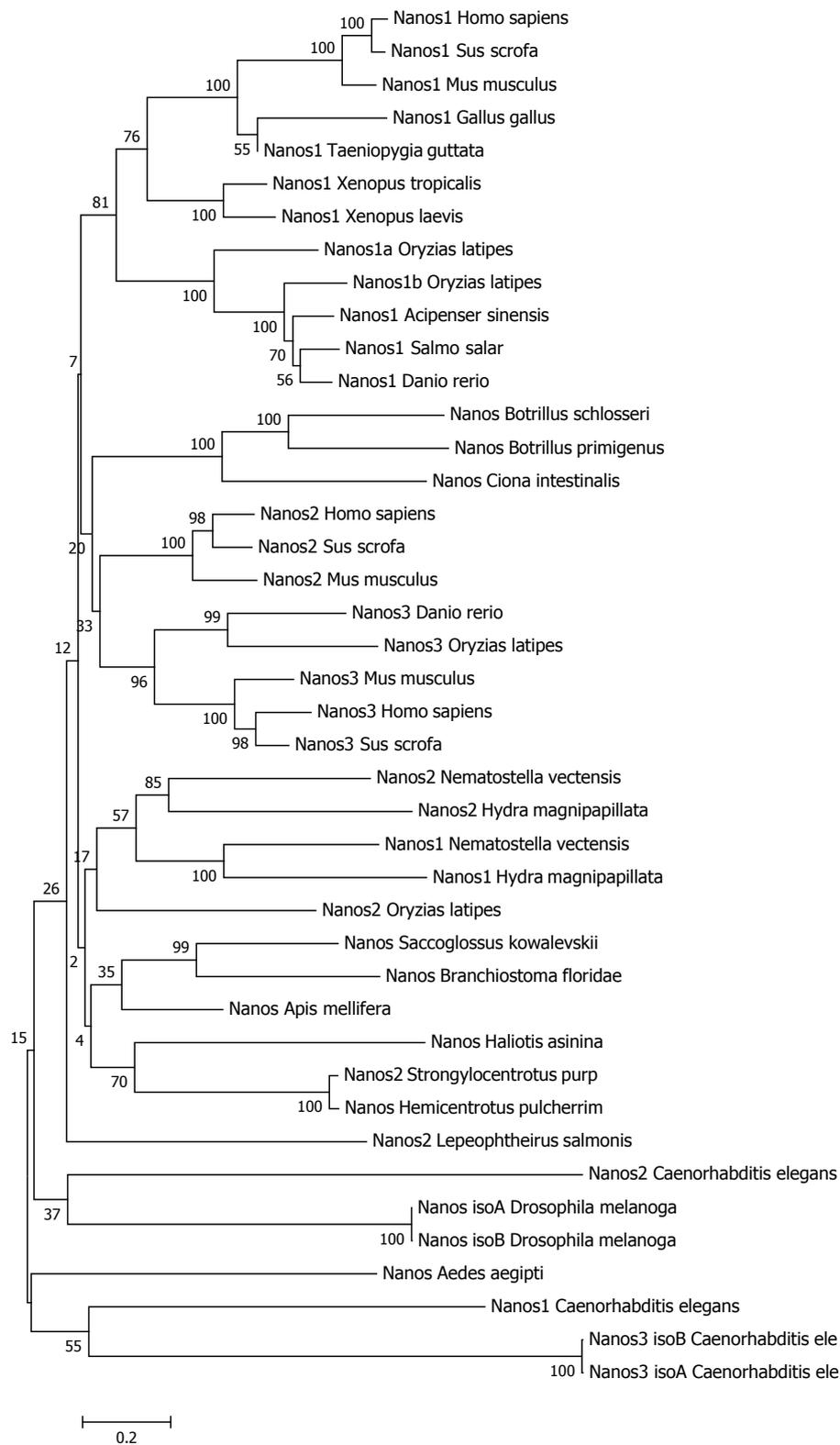


Figura 48: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di NANOS indicate in figura 46, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## Geni coinvolti nello stress ossidativo

### - GCLM

Le EST simili alla subunità regolatoria della glutatione cistein ligasi, individuate in BLAST, sono state impiegate per disegnare i primer specifici GBBF1 e GBBR2 che nella reazione di PCR hanno prodotto un frammento di cDNA di 535 pb. Il trascritto finale di BsGCLM, completato mediante 5' e 3' RACE, è di 1556 pb e presenta una regione codificante di 870 pb che esprime un tradotto putativo di 289 aa. La sua sequenza amminoacidica conserva il caratteristico dominio aldo-cheto riduttasi (AKR) tra gli amminoacidi 84-264, in cui si trovano i residui funzionali del sito attivo (92; 125-126; 164-165; 186) e quelli per la formazione della tetraide catalitica in associazione con la subunità catalitica della GCL (92; 125) (fig. 49).

```
TTGGAACCGATAGCTCTGTTTCTGTAGCATATGTACAGTTGTACACACTGAAGG
1
1 M D
ATGGAT
3 V A Q M L V D Q A D T V V I H S G N I I
7 GTTGCTCAGATGCTAGTCGACCAAGCCGATACTGTGGTTATCCATTCAGGGAATATTATC
23 N S Y S L K K R V G Q K S S D E L A D S
67 AACTCGTATTCTTTGAAGAAGCGTGTAGGTCAGAAGAGCTCAGATGAACTGGCTGACTCC
43 I E K T F T S W K E S V G P E Y M N I P
127 ATCGAAAAGACGTTCAACAAGTTGAAAAGAATCGGTAGGGCCGGAATATATGAACATTCCC
63 E P I P T L N I T N D A L T S S Y T D E
187 GAACCAATACCTACTTTGAATATCACCAACGACGCCCTTGACGTCGAGCTACACCGACGAA
83 R R S N L K I S A K I F F S E V E P Q L
247 AGACGCTCAAACCTGAAAATATCGGCCAAGATATTTTTTCAGCGAAGTGGAAACCACAGCTG
103 V R N A V D N V C K T L G V R H L D S A
307 GTCAGAAAACGCTGTCGACAACGTCGAAAACCTTGGGCGTACGCCATTTAGATTCAGCT
123 V V S F P D T I P G A Y V E G S F S K A
367 GTCGTTTCTTTTCCGACACCATAACGGGAGCGTACGTTGAAGGCAGTTTTTTCGAAAGCG
143 L S V W R E I E A M T K E G L V K H I G
427 TTGAGTGATGGCGCGAGATTGAAGCCATGACAAAAGAAGGTTTGGTCAAACACATCGGC
163 V T D F D K T A M Q N L Y R C A T V K P
487 GTGACTGATTTTGATAAGACCGCTATGCAGAATTTATACCGGTGCGCGACCGTGAACCC
183 T I D Q I K T G H D F N V P D D L I K L
547 ACGATTGACCAGATCAAACTGGACATGATTTTAACGTACCAGACGATTTGATCAAGCTT
203 S E E Y D I E L L S H D D A A D M L P E
607 TCCGAAGAGTATGATATCGAACTTTTATCGCACGACGACGCCGCTGACATGCTCCCTGAG
223 K S F Q A I M E D N F P N S T S A S E W
667 AAGTCATTCCAAGCAATAATGGAAGACAATTTTCCAACAGTACTTCAGCAAGCGAATGG
243 L P S Y A V R Y S A I A R C R G I V R S
727 CTTCCGTCGTACGCCGTAAGATATTACGCCATTGCGCGATGCCGTGGAATCGTACGAAGT
263 K G Y I V E A G K R L S N G Y Y T V T T
787 AAGGGTTATATTGTAGAAGCGGGGAAAAGGTTATCTAACGGGTACTACACTGTCCACCACA
```

283 G G E G Y I D -  
 847 GCGGAGAGGGATACATCGAC TGA

289  
 870

ATATGTTTGTGTGTTGAAAATGTTTCTTATGTCTCT  
 ATCCCTATTACCTCGCTATATCATTGTACATTGAGCATAGCAATGTCTGTAATACAATGA  
 TACTGATATCGTTGTTAACACGCGCCAAGCATATCCGCTATTGTGAGCGATCATTTAA  
 TAAATGACGACGATAATGTATCTTTTATATGCTTTTACAAGGCCCGCAATTCTTAATATC  
 GTGGCTTTAATCTGACAGATCGAAATTTATATAATATCTAACATTTTATGTTACTACCGA  
 ATGCATCATTTTAAATCATGCTATCTGCGTATTTTTATCCCTCTTCTTCAAATCTATATC  
 GAAATACTGTTTATGTTAAGTGTCTTCACACGCTTATCTAGTCGGTTGATGATTATCATG  
 TGACAAGTTGGATTTGTTCTATTTCGTGCATGCCTACAATATCCAATTGTCCATGCTCAAT  
 TAAAGGACACGCATACCGACAGACAACTACTCGCTTACTCATAGCTACATGGTACGTTA  
 CTAGACAAGTGAATGTCAGTGTACAGTTTTGGGCGCAATCCTGCCAAAGTGAACGAGAC  
 AATGCATTCGTTGTTAACAAAGTGTATATTTTTCTACTTTTCTAGAAAAAAAAA

Figura 49: mRNA di BsGCLM e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione arancio rappresenta il dominio AKR.

L'analisi di similarità di BsGCLM con una serie di sequenze ortologhe dei metazoi, ha evidenziato la percentuale di identità più alta con la forma GCLM-A di *C. intestinalis*, circa il 35%, mentre con vertebrati e cefalocordati i valori scendono intorno al 30% (fig. 50).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Homo sapiens</i>	31,6	34
<i>Mus musculus</i>	31,6	33
<i>Bos taurus</i>	31,3	34
<i>Gallus gallus</i>	32,4	34
<i>Taeniopygia guttata</i>	30,5	34
<i>Meleagris gallopavo</i>	29,3	35
<i>Anolis carolinensis</i>	31	34
<i>Rana catesbeiana</i>	31,6	34
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	31,2	33
<i>Xenopus laevis</i>	29,2	32
<i>Oryzias latipes</i>	30,6	32
<i>Danio rerio</i>	30,2	32
<i>Salmo salar</i>	29,8	31
<i>Takifugu rubripes</i>	29,4	32
<i>Oreochromis niloticus</i>	28,7	31
<i>Ciona intestinalis A</i>	34,8	37
<i>Ciona intestinalis B</i>	27,4	29
<i>Branchiostoma belcheri</i>	30,5	33
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	27,2	33
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	27,8	29
<i>Crassostrea gigas</i>	24,2	26
<i>Apis mellifera</i>	26,5	27

<i>Camponotus floridanus</i>	24,9	27
<i>Drosophila melanogaster iso A</i>	23	28
<i>Drosophila melanogaster iso B</i>	23	28
<i>Caligus rogercresseyi</i>	18,6	24
<i>Ascaris suum</i>	24,7	27
<i>Brugia malayi</i>	22,2	24
<i>Loa loa</i>	22,1	23
<i>Hydra magnipapillata</i>	25,2	29
<i>Amphimedon queenslandica</i>	25	28

Figura 50: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsGCLM e gli ortologi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, giallo chiaro i cefalocordati, verde smeraldo gli emicordati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, giallo limone i nematodi, rosa scuro i cnidari, verde scuro i poriferi.

L'allineamento con gli ortologi dei metazoi, mostra che il dominio AKR della proteina putativa di Botrillo risulta molto conservato, inoltre, sono mantenuti simili anche i residui critici per l'attività dell'eterodimero GCLM-GCLC identificati nelle sequenze dei vertebrati (fig. 51).

GCMX Bos\_saurus  
 GCMX Mus\_musculus  
 GCMX Homo\_sapiens  
 GCMX Anolis\_carolinensis  
 GCMX Gallus\_gallus  
 GCMX Melanerpes\_galapago  
 GCMX Taeniopygia\_guttata  
 GCMX Xenopus\_tropicalis  
 GCMX Xenopus\_laevis  
 GCMX Danao\_catebeiana  
 GCMX Salmo\_salar  
 GCMX Trachemys\_niloticus  
 GCMX Takifugu\_rubripes  
 GCMX Oryzias\_latipes  
 GCMX Saccoligotus\_kowalevskii  
 GCMX Branchiostoma\_balchani  
 GCMX Crassostrea\_gigas  
 GCMX Strongylocentrotus\_purpur  
 GCMX Xyrrhilus\_schlosseri  
 GCMX A\_cinclus\_incertinalis  
 GCMX Myra\_magnumplata  
 GCMX Apis\_mellifera  
 GCMX Camponotus\_floridanus  
 GCMX Isoa\_drosophila\_melanogas  
 GCMX Isoa\_drosophila\_melanogas  
 GCMX Amphimedon\_greenlandica  
 GCMX Brodia\_mayli  
 GCMX Sox\_sox  
 GCMX Accaris\_enum  
 GCMX A\_cinclus\_incertinalis  
 GCMX Calligus\_rogercreaseyi  
 consensu250

GCMX Bos\_saurus  
 GCMX Mus\_musculus  
 GCMX Homo\_sapiens  
 GCMX Anolis\_carolinensis  
 GCMX Gallus\_gallus  
 GCMX Melanerpes\_galapago  
 GCMX Taeniopygia\_guttata  
 GCMX Xenopus\_tropicalis  
 GCMX Xenopus\_laevis  
 GCMX Danao\_catebeiana  
 GCMX Salmo\_salar  
 GCMX Trachemys\_niloticus  
 GCMX Takifugu\_rubripes  
 GCMX Oryzias\_latipes  
 GCMX Saccoligotus\_kowalevskii  
 GCMX Branchiostoma\_balchani  
 GCMX Crassostrea\_gigas  
 GCMX Strongylocentrotus\_purpur  
 GCMX Xyrrhilus\_schlosseri  
 GCMX A\_cinclus\_incertinalis  
 GCMX Myra\_magnumplata  
 GCMX Apis\_mellifera  
 GCMX Camponotus\_floridanus  
 GCMX Isoa\_drosophila\_melanogas  
 GCMX Isoa\_drosophila\_melanogas  
 GCMX Amphimedon\_greenlandica  
 GCMX Brodia\_mayli  
 GCMX Sox\_sox  
 GCMX Accaris\_enum  
 GCMX A\_cinclus\_incertinalis  
 GCMX Calligus\_rogercreaseyi  
 consensu250

*CCLM Bos taurus*  
*CCLM Mus musculus*  
*CCLM Homo sapiens*  
*CCLM Acoelia carolinensis*  
*CCLM Callus gallus*  
*CCLM Meleagris gallopavo*  
*CCLM Traniopogon guttata*  
*CCLM Xenopus tropicalis*  
*CCLM Xenopus laevis*  
*CCLM Fana estabensis*  
*CCLM Danio rerio*  
*CCLM Salmo salar*  
*CCLM Oreochromis niloticus*  
*CCLM Takifugu rubripes*  
*CCLM Oryzias latipes*  
*CCLM Saccoglossus kowalevskii*  
*CCLM Branchiostoma belcheri*  
*CCLM Crassostrea gigas*  
*CCLM Strongylocentrotus purpurus*  
*CCLM Bostryllus schlosseri*  
*CCLM A. Ciona intestinalis*  
*CCLM Hydra magnipapillata*  
*CCLM Apis mellifera*  
*CCLM Caspocottus floridanus*  
*CCLM Isopha brucephila*  
*CCLM Isopha brucephila melanogaster*  
*CCLM Amphimedon queenslandica*  
*CCLM Prorhinotermes*  
*CCLM Icos*  
*CCLM Ascaris suum*  
*CCLM B. Ciona intestinalis*  
*CCLM Caligus rogerscresseyi*  
*consensus>30*

200 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 210 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 220 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 230 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 240 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 250 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 260 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 270 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 280 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 290 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 300 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 310 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 320 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 330 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 340 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 350 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 360 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 370 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 380 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 390 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 400 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 410 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 420 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 430 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 440 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 450 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 460 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 470 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 480 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 490 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 500 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 510 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 520 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 530 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 540 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 550 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 560 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 570 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 580 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 590 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 600 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 610 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 620 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 630 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 640 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 650 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 660 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 670 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 680 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 690 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 700 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 710 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 720 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 730 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 740 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 750 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 760 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 770 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 780 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 790 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 800 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 810 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 820 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 830 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 840 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 850 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 860 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 870 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 880 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 890 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 900 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 910 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 920 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 930 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 940 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 950 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 960 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 970 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 980 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 990 CCMPPDLAFAKQDIQ  
 1000 CCMPPDLAFAKQDIQ

Figura 51: allineamento del tradotto predetto di BsGCLM con ortologi di altri metazoi riportati in figura 50.

La filogenesi delle sequenze GCLM raccolte, realizzata con i metodi di massima parsimonia, minima evoluzione, UPGMA e Neighbor-Joining, ha determinato la separazione netta delle proteine dei vertebrati da quelle degli invertebrati, nelle quali rientra il clade formato da BsGCLM e l'ortologo A di *C. intestinalis* (fig. 52).

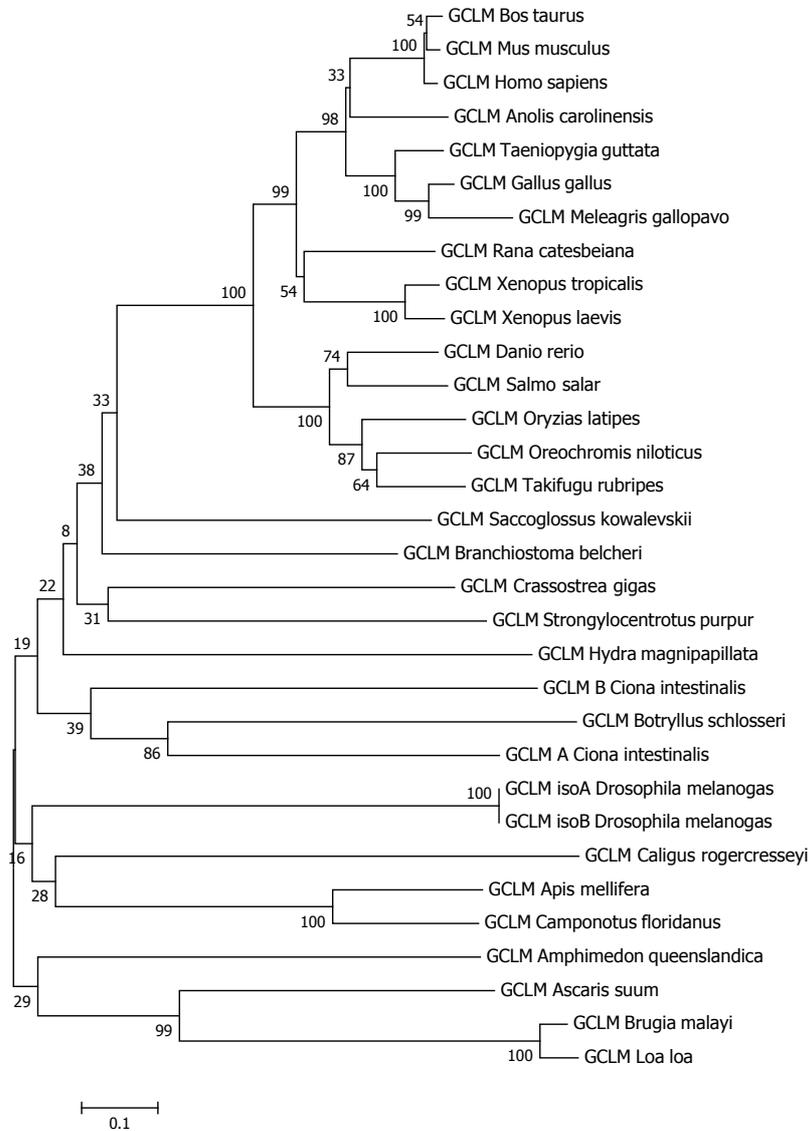


Figura 52: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di GCLM indicate in figura 50, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

- GS

La reazione di PCR con i primer specifici GSBF1 e GSBR, costruiti sulle EST con regioni simili al dominio glutatione sintetasi, ha generato un amplicone di 304 pb che è stato allungato attraverso 5' e 3' RACE per ottenere un messaggero completo di 1710 pb, con un ORF di 1446 pb che codifica per una proteina putativa di 481 aa. BsGS è caratterizzato dal dominio di legame del DNA glutatione sintetasi eucariotico (eu-GS), compreso tra gli amminoacidi 8-481 (fig. 53), contenente importanti residui funzionali: i componenti del sito attivo in cui avviene la reazione di sintesi del glutatione (126; 152; 373; 457), i residui di legame dell'ATP necessario per la catalisi (130; 144; 310; 366; 368; 374; 377; 379; 402-405; 432; 459), di uno ione magnesio (144; 147; 372) e del glutatione (126; 150; 152; 216; 218; 222; 271; 274; 457; 472-473); i siti che permettono la formazione di omodimeri (14-27; 33-36; 45-49). Infine, i motivi ricchi di glicine e alanine che fanno parte del sito attivo sono conservati rispettivamente tra gli amminoacidi 370-380 e 461-469.

```

GGTTGTATTAAGGTTGATTCAGTTATTTTGTTCATTGGCGGTATATCAGCTACTTTTGAAG
CTAGGTTTCTAGGCC
1      M D A A A V K L S K F L E Q R
1      ATGGATGCTGCGGCTGTGAAGCTTCCAAGTTCTGGAACAGAGG
16     S V G Q L V L D A V D Y A I C N G I V M
46     TCTGTGGCCAATTAGTTCTTGACGCTGTGGATTATGCCATCTGTAATGGGATTGTAATG
36     R T R S K P T S S D V V Q H A P F T L L
106    AGAACACGGTCAAGCAACATCATCCGATGTTGTTCAACATGCGCCGTTACAGCTCTTA
56     P S P V P K N L Y E Q A I S S P K R L Q
166    CCATCTCCAGTACCAAAGAATTTGTATGAGCAAGCAATTTCTAGTCCAAAAAGACTTCAA
76     F L M H A I S Q D P E F M K S A F S T I
226    TTCCTTATGCACGCAATCAGTCAAGATCCGGAATTTATGAAGTCTGCTTTTTCCACCATT
96     I H S D D F T R R L F E I Y E T A L L E
286    ATTCACAGTGATGACTTTACTAGGAGACTGTTTCGAGATTTACGAAACTGCACCTTTTAGAA
116    K P K K T A M A I I R S D Y M F N K T E
346    AAACCAAGAAGACTGCAATGGCCATCATCCGTTCCGATTATATGTTCAACAAAACAGAG
136    E S E P S L K Q I E V N M I A S S F G G
406    GAGAGCGAACCGAGTTTGAAGCAAATCGAAGTCAACATGATCGCATCCAGTTTTGGAGGG
156    I G T E K T R S L H D Y T L R H A G F E
466    ATCGGAACGGAGAAAACGAGATCTCTCCATGATTACTCTCAGACACGCGGGATTGAG
176    D V A T S L P Q N K A L Q N L A Q S I V
526    GATGTGGCGACATCGCTGCCGAAAATAAGGCGCTGCAAAACCTAGCGCAGTCCATCGTG
196    N A W D L Y G D N S A V V V F V I T E I
586    AACGCATGGGACCTCTACGGCGATAACTCTGCGGTTGTGTTCGTTATAACGGAAATA
216    E N N I F D Q R A L E F R I C E I Q P D
646    GAAAATAATATATTCGACCAACGGGCGTTAGAGTTTTCGAATCTGCGAAATACAACGGGAC
236    I V V K R Y T L T Q I S E L G D H D D D
706    ATTGTGTCGTCAAACGATACACTCTCAGCAAATATCAGAGCTCGGCGACCATGATGATGAC
256    R N M V I N D Q K V G F V Y Y R A G Y S
766    AGAAATATGGTTATTAATGATCAAAAAGTAGGCTTTGTTTACTATCGGGCCGGATATTCG

```

276 P D H Y P S E K E W D A R L L L D T S T  
 826 CCGGATCATTATCCTTCAGAGAAGGAATGGGATGCACGACTCCTCCTGGATACCAGTACT  
  
 296 A I N C P C V A H Q L V G A K K M Q Q I  
 886 GCAATCAACTGCCCGTGTGTGCTCACCAATTGGTGGGTGCGAAGAAAATGCAACAGATT  
  
 316 L S Q P N M V E R F I K D R N S V K R I  
 946 CTATCACAGCCGAACATGGTAGAAAGATTATCAAGGACCGCAATTCGGTAAAAAGAATC  
  
 336 R D T F V G F Y G L E M G S A G D E S I  
 1006 AGGGATACGTTTGTGGGATTCTACGGACTGGAAATGGGTAGCGCCGGAGATGAATCAATT  
  
 356 Q K V L Q H P E N Y V L K P Q L E G G G  
 1066 CAAAAAGTATTGCAACATCCAGAAAATATGTTTGAACCACAACCTCGAGGGAGGAGGA  
  
 376 N N L Y N D E M V A K L K E V G E D D R  
 1126 AACAACTCTTACAACGATGAGATGGTGGCAAAGCTGAAAGAAGTTGGAGAGGATGACCGG  
  
 396 R C S Y I V M E K Y A P M P H Q R F I V  
 1186 AGATGCAGCTACATTGTGATGGAAAAATATGCCCGATGCCACACCAGAGATTCATCGTA  
  
 416 R S E A G Y D K P T P V E G V S E L G I  
 1246 CGTCCGAAGCAGGCTATGACAAACCAACTCCTGTAGAAGGCGTCAGCGAATTGGGCATA  
  
 436 Y G Y I I V K G D Q I L H N S I A G H L  
 1306 TACGGATACATCATAGTGAAAGGCGATCAAATACTACACAACCTCAATTGCCGGCCACTTG  
  
 456 L R T K A S H H D D G G V A S G V A V L  
 1366 CTTGCGACCAAGGCAAGCCATCACGACGACGGAGGCGTTGCCAGTGGTGTGGCTGTTCTC  
  
 476 D S P M L Y - 481  
 1426 GATTCACCTATGCTATATTTGA 1446  
 TCATTCTTTTCGTCAGAAGAATTGACAGCAGTGACTGTT  
 GTAGCAGTAATGGTTTGGAAAGTGATCCTGACCTCAAATCGTGTGATGAAGTTACTTTG  
 CTTTTCAATGATTCAGTTTGTGTTGTGCAAATGCTCGATATGATATATAGAATATATGAT  
 GTTAATTTTCCTGCTCAAAAAAAAAAAAAA

Figura 53: mRNA di BsGCLM e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione gialla rappresenta il dominio eu-GS.

La sequenza GS 1 del cefalocordato *Branchiostoma floridae* è risultata quella con più alta percentuale di identità rispetto a BsGS, con il 43,3%. Similmente, anche gli orologi dei vertebrati hanno valori che superano il 40%, in particolare nei mammiferi e negli uccelli con il 41,5% della sequenza umana ed il 41,3% delle due isoforme di *Gallus gallus* (fig. 54).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Homo sapiens</i>	41,5	43
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	41,3	43
<i>Sus scrofa</i>	40,9	42
<i>Rattus norvegicus</i>	39,7	41
<i>Gallus gallus isoX3</i>	41,3	43
<i>Gallus gallus X4</i>	41,3	43

<i>Taeniopygia guttata</i>	40,7	44
<i>Meleagris gallopavo</i>	36,3	41
<i>Anolis carolinensis</i>	40,7	43
<i>Chelonia mydas</i>	39,9	42
<i>Xenopus laevis</i>	40,9	43
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	39,6	42
<i>Takifugu rubripes</i>	40,1	42
<i>Danio rerio</i>	37,8	39
<i>Oreochromis niloticus</i>	29,6	35
<i>Ciona intestinalis 3</i>	40,8	43
<i>Ciona intestinalis 2</i>	37	38
<i>Ciona intestinalis 1</i>	26,8	36
<i>Branchiostoma floridae 1</i>	43,3	45
<i>Branchiostoma floridae 2</i>	37,9	39
<i>Saccoglossus kowalevskii 2</i>	41,1	42
<i>Saccoglossus kowalevskii 1</i>	37,7	43
<i>Strongylocentrotus purpuratus 1</i>	37,1	38
<i>Strongylocentrotus purpuratus 2</i>	33,6	36
<i>Crassostrea gigas</i>	34,4	39
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	37,6	40
<i>Drosophila melanogaster iso J</i>	36,9	39
<i>Drosophila melanogaster iso I</i>	33,2	42
<i>Drosophila melanogaster iso H</i>	33	42
<i>Camponotus floridanus 1</i>	34,3	36
<i>Camponotus floridanus 2</i>	24,4	38
<i>Dugesia japonica</i>	30,2	32
<i>Schistosoma mansoni 2</i>	28,3	30
<i>Schistosoma mansoni 1</i>	19,3	39
<i>Ascaris suum</i>	37,9	39
<i>Caenorhabditis elegans</i>	36,7	39
<i>Loa loa</i>	34,9	36

Figura 54: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsGCLM e gli ortologhi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, giallo chiaro i cefalocordati, verde smeraldo gli emicordati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, azzurro i platelminti, giallo limone i nematodi.

Nell'allineamento con gli ortologhi considerati, si osserva l'alto tasso di conservazione del dominio glutatione sintetasi della sequenza di Botrillo, al pari delle altre proteine GS (fig. 55).







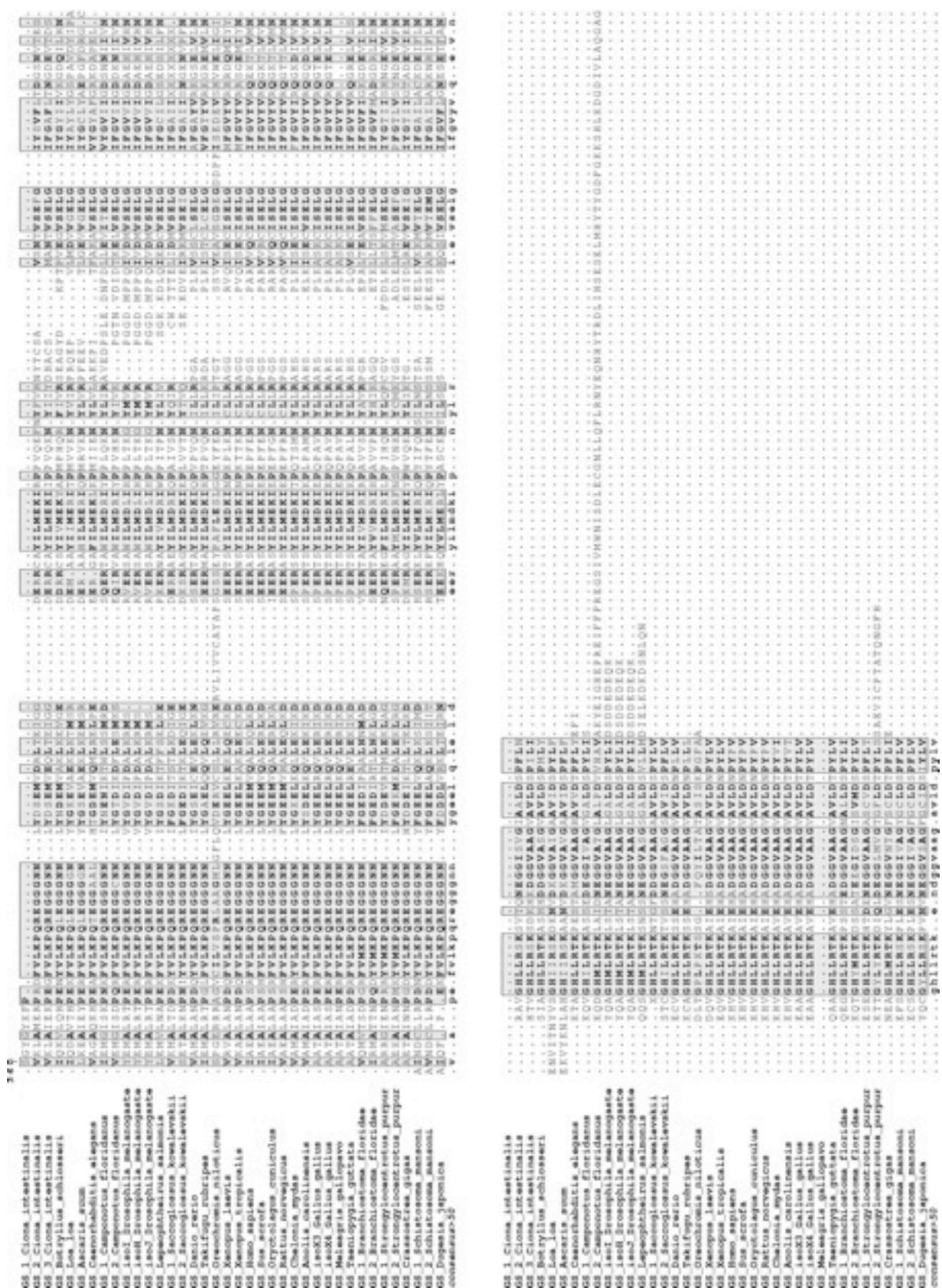


Figura 55: allineamento del tradotto predetto di BsGS con ortologhi di altri metazoi riportati in figura 54.

Le relazioni filogenetiche, calcolate con i metodi di massima parsimonia, minima evoluzione, UPGMA e Neighbor-Joining, mostrano che BsGS si colloca nel cluster che comprende le altre sequenze dei tunicati, delle quali la GS 3 di *C. intestinalis* è quella più simile dal punto di vista evolutivo (fig. 56).

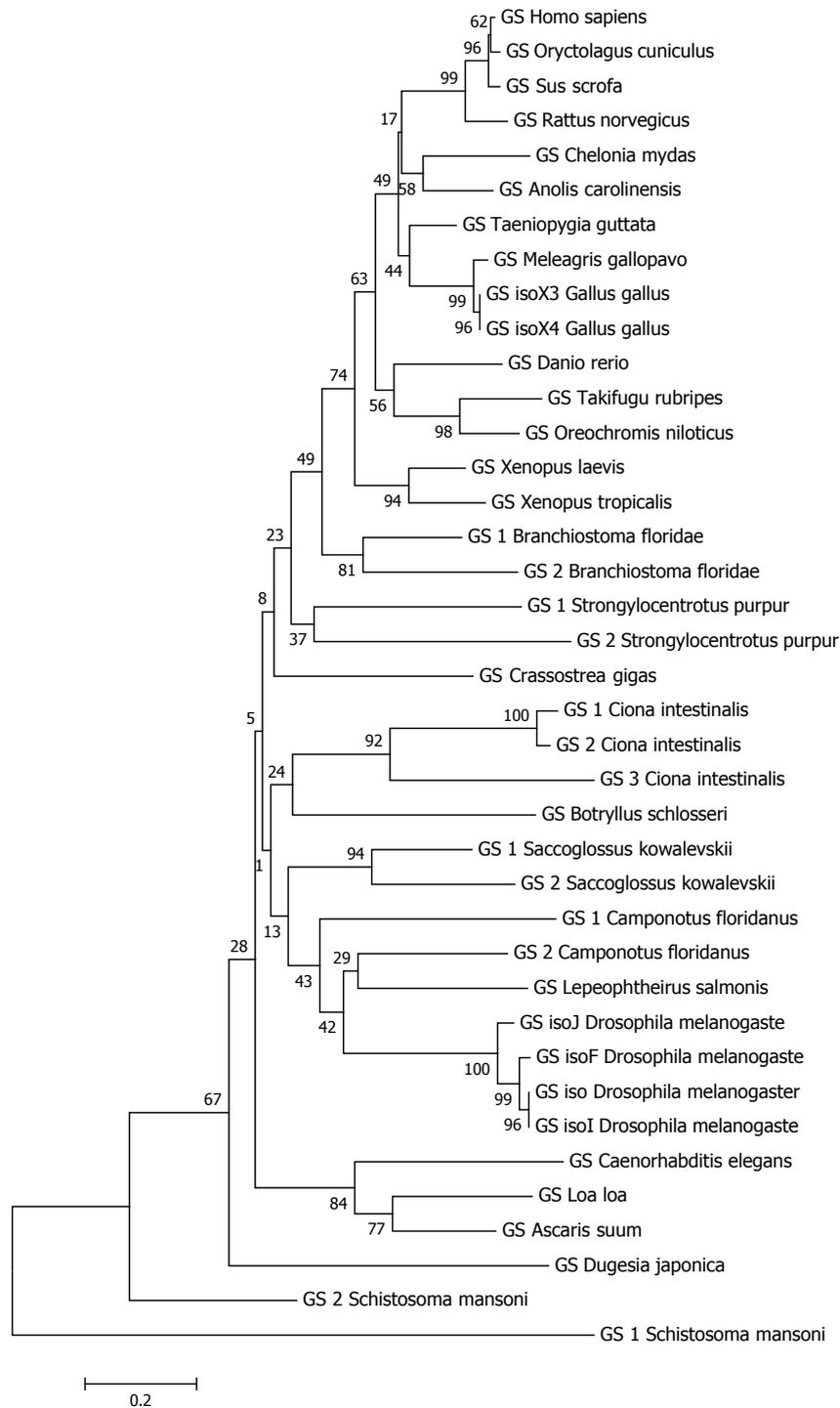


Figura 56: analisi filogenetica delle sequenze proteiche di GS indicate in figura 54, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - GPx-1

L'analisi in BLAST delle EST di Botrillo, ha permesso di individuare sequenze potenzialmente full-length con elevata similarità per la famiglia delle glutatione perossidasi. Due di queste sono state isolate sperimentalmente. I due trascritti sono stati ottenuti con la tecnica della 5' e 3' RACE, dopo l'ampificazione, rispettivamente, di un frammento di cDNA lungo 662 pb con i primer specifici PXBF-RT e PXBR e di un cDNA di 493 pb con i primer specifici GPBF e GPBR.

L'mRNA completo di BsGPx-1 è di 1029 pb, con una regione codificante di 636 pb che produce un tradotto predetto di 211 aa. La sequenza amminoacidica presenta un peptide segnale N-terminale (1-21 aa) ed il tipico dominio glutatione perossidasi tra gli amminoacidi 34-207 (fig. 57). Al suo interno, i residui della triade catalitica coinvolti nella reazione di riduzione del perossido di idrogeno (66; 101; 177), tra cui la selenocisteina in posizione 66 che ha un'importanza particolare come carattere esclusivo delle GPx e delle altre selenoproteine. Infine, sono riconoscibili i residui per la formazione di omodimeri (100; 103; 105; 108; 111; 115), dato che la struttura di questi enzimi è tetramerica, in dimeri di dimeri.

```

CTATCACATCCCATATATATCGGCAAACCTATCTTCCTTTCGTGTGTCACTTTATATATAGGC
CTACACGTTTGGTGACATTTGACAACTCTTCGCAAGCTGTAGCAGCAACAGCAGCTCTGC
AGCTGCACC
1      M V T M K N V L P L L L C S W I S
1      ATGGTAACAATGAAGAATGTAAGTCTCCGTTGCTGCTATGCAGCTGGATTAGC
18     A I H A L K V S T C R Y S E K A I Y E Y
52     GCGATCCACGCGCTAAAAGTGTCAACATGCCGGTACTCTGAAAAAGCAATTTACGAATAC
38     P V T K L D G S P F T L S S L Q D K V A
112    CCTGTAACAAAACCTTGATGGCTCTCCATTTACCTTATCGTCTGCTACAAGACAAGGTGGCG
58     V I I N T A C F U G E T W T Q L P G M N
172    GTAATTATTAATACCGCTGTTTC TGA GGGGAGACCTGGACTCAGTTACCAGGAATGAAT
78     A L L Q K Y S K Q G V V A S G F P C D Q
232    GCGTACTACAGAAATATTCCAAGCAAGGTGTCGTGGCTTCCGGATTTCCGTGTGATCAG
98     F E L Q E P G L P R E I L P C Y K Y V R
292    TTCGAACTACAGGAGCTGGCTTACCTCGAGAAATCCTTCCTTGTACAAAGTACGTCAGA
118    P G K G W I P H P N F H F L N K T K V N
352    CCCGGCAAAGGATGGATCCCACACCCTAACTTCCATTTCTTAACAAAACCTAAAGTCAAC
138    G K D E N S L Y A H L K S V C P Q V T D
412    GGAAAAGATGAAAATTCGTTATATGCTCATCTAAAGTCCGTGTGTCCACAAGTTACTGAC
158    E I G T R S E M Y W D P V K V S D I T W
472    GAGATTGGCACCAGATCGGAGATGTACTGGGACCCCGTCAAAGTATCGGATATCACATGG
178    N Y E K F L I D R K G K P R Y R F G P S
532    AATTATGAAAAATTTCTGATTGACAGAAAAGGCAAACCAAGGTACAGATTCCGGTCCCTCC
198    V L P S E I E P Y I D S I L -
592    G T A C T A C C G A G C G A A A T C G A G C C T T A C A T T G A T T C A T T C T A T G A
AATCTCCGAATTCGC
AAAAGATTTACACTGTGAAGGCGCGTTGTCTAAGCATTCGAAAACGCTCAATGACGATC
ATCTGCTAAAACCTCAGGTTGCCGATGATCTGAAAAGTCTGTTGTTCTGGCATTTTACGC
ATTCAAATGTTTCGATTCAATGGACTTGCGTTGGAGATGTATATGGGCTATTGGCTTATTC
ATTATATGCCGATCTTCCAATGTGGATTAAAATGTATTGCGATAGAGAAAAA

```

211  
636

AAAAAAAAA

Figura 57: mRNA di BsGPx-1 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione lilla rappresenta il peptide segnale e quella azzurra il dominio della famiglia glutazione perossidasi. Il residuo in rosso indica la selenocisteina.

La GPx-1 putativa di Botrillo, confrontata con le forme di GPx dei metazoi risultate più simili in BLAST, condivide il valore più alto di identità di sequenza, del 37%, con la proteina GPx b di *C. intestinalis*. Le percentuali di alcuni vertebrati si avvicinano a questo valore con il 35,4% della GPx 3 di *Maylandia zebra*, il 34,3% della GPx 3b di *Xenopus laevis* ed il 34% della GPx 3 umana (fig. 58).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Homo sapiens GPx3</i>	34	41
<i>Homo sapiens GPx5</i>	32,6	36
<i>Homo sapiens GPx6</i>	31,4	39
<i>Oryctolagus cuniculus GPx3</i>	32,7	41
<i>Oryctolagus cuniculus GPx5</i>	22,2	36
<i>Oryctolagus cuniculus GPx6</i>	32,5	36
<i>Sus scrofa GPx3</i>	32,8	41
<i>Sus scrofa GPx5</i>	32,1	36
<i>Sus scrofa GPx6</i>	32,2	37
<i>Mus musculus GPx3 iso 1</i>	30,9	41
<i>Mus musculus GPx3 iso 2</i>	34	41
<i>Mus musculus GPx5</i>	33,9	38
<i>Mus musculus GPx6</i>	31,8	40
<i>Gallus gallus GPx3</i>	33,5	38
<i>Taeniopygia guttata GPx3</i>	30,1	36
<i>Thamnophis elegans GPx3</i>	30,3	38
<i>Xenopus laevis GPx3a</i>	33,5	38
<i>Xenopus laevis GPx3b</i>	34,3	39
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis GPx3</i>	32,5	37
<i>Maylandia zebra GPx3</i>	35,4	40
<i>Takifugu rubripes GPx3</i>	34,3	39
<i>Danio rerio GPx3</i>	33,9	39
<i>Perca flavescens GPx3</i>	30,5	50
<i>Ciona intestinalis GPx b</i>	37,2	43
<i>Ciona intestinalis GPx c</i>	36,3	40
<i>Saccoglossus kowalevskii GPx3</i>	32,4	49
<i>Ruditapes philippinarum</i>	31	38
<i>Meretrix meretrix</i>	29,9	38
<i>Crassostrea gigas GPx3</i>	29,4	45

<i>Caenorhabditis elegans GPx3</i>	33,2	40
<i>Caenorhabditis elegans GPx5</i>	33,7	41

Figura 58: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsGPx-1 e le GPx di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, verde smeraldo gli emicordati, viola i molluschi, giallo limone i nematodi.

L'allineamento con le diverse GPx dei metazoi, mette in evidenza il dominio conservato glutazione perossidasi della sequenza di Botrillo e la sua selenocisteina, rappresentata dal programma come amminoacido generico con la lettera X. Nella GPx 3 di *Caenorhabditis elegans*, nelle GPx 6 di *Mus musculus* e di *Oryctolagus cuniculus* e soprattutto nelle GPx 5 dei vertebrati e di *C. elegans*, il residuo selenocisteinico è sostituito da una cisteina (fig. 59). Proprio le GPx 5 sono note per la mancanza della classica selenocisteina.





## - GPx-2

La seconda sequenza GPx identificata in Botrillo, ricavata come descritto sopra, ha un messaggero di 918 pb, con un ORF di 675 pb che traduce per una proteina putativa di 224 aa. BsGPx-2 è costituita, come BsGPx-1, da un peptide segnale e dal dominio glutatione perossidasi, situati rispettivamente tra gli amminoacidi 1-23 e 29-203 (fig. 60). Invece, si registrano alcune variazioni a livello dei tre residui catalitici (U, Q, W): la più importante è la presenza in posizione 62 di una serina al posto della selenocisteina e, secondariamente, la sostituzione del triptofano con il residuo 173 di glicina. I siti di dimerizzazione risultano conservati nei residui 96; 99; 101; 104; 107; 111.

```

TG
1 GAGATGTGTTACTGGAACATTTTGTGGTACTTCGTTTGAGCTGGGAGGAAAGAAAAT
1 M
1 ATG
2 L W A L L V A S A A L V A A D D A S Q C
4 CTGTGGGCATTGCTTGTGCGAGTGCCCGGTTAGTTGCTGCAGATGACGCGAGCCAATGT
22 L S Q G L T G T V Y D S T E A T L A G T
64 CTGAGTCAAGGTTTGACGGGTACAGTTTACGATAGCACCGAGGCGACCCTGGCCGGAACA
42 N V D L T Q L F G Y V S V V M N P G V Y
124 AATGTCGATTTAACTCAGCTTTTTGGTTACGTATCGGTTGTGATGAATCCCGAGTTTAC
62 S E W T S Q M M T G M N T L L E K Y E S
184 TCGGAATGGACCTCGCAGATGATGACGGGAATGAATACTCTTCTTGAGAAAATATGAATCT
82 D G V V G L G F P C N Q F N L E Q P G S
244 GACGGAGTAGTCGGTTTGGGATTCCCATGTAACCAATTCAACTTGGAACAACCGGGCAGT
102 P G E I L N A Y K Y L R P G N G W T P H
304 CCAGGCGAAATACTGAAACGCGTATAAAATACCTTCGACCAGGAAATGGATGGACGCCGCAT
122 Q N F H L F T V T E V N G D T A S D I F
364 CAGAAATTTTCATCTTTTCACAGTGACAGAAGTGAACGGAGATACGGCCTCTGATATTTTC
142 K F L R S A C P A Y T E E L G S K A S F
424 AAATTTTGAGGTCGGCTTGTCCCGCATACACCGAAGAGTTAGGAAGCAAGGCATCATTT
162 Y W D T L V A R D L R G T Y E K F V I D
484 TATTGGGACACTCTGGTGGCAGCGATCTTCGTGGAACGTACGAAAAATTTGTTATTGAC
182 K N G K P R Y R F A P N V A M T E I Y P
544 AAAAATGGGAAACCGAGATACCGATTTGCTCCGAACGTGGCCATGACGGAGATTTATCCT
202 Y I D E L L A E T P I Q P T Q F P G V E
604 TACATTGATGAATTGCTGGCGGAGACACCGATCCAGCCTACTCAATTTCCGGGAGTCGAG
222 A G N -
664 GCGGGAAATTAG
CGATTGAATGCGTTGATGCTGTGTCAGTAATAGATATCCCTATGTCGAGC
TTTAAACGGAGTTTCAAACCTTGAAAAAGTGTGCGTAATTTGCATACTTACAGATCCAGT
TACAGTGTAAACAACCGCTGTCTGTTCAACATTATGAAAGCATGTCATCTGTGACATTTGTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 60: mRNA di BsGPx-2 e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione lilla rappresenta il peptide segnale e quella azzurra il dominio della famiglia glutazione perossidasi. Il residuo in rosso indica la serina che prende il posto della classica selenocisteina.

L'analisi della similarità di BsGPx-2 con le varie forme di GPx dei metazoi, mostra valori diversi a seconda della specie e del tipo di GPx: la percentuale più alta di residui identici con la sequenza di Botrillo è rappresentata dalla GPx c di *C. intestinalis* con il 32,9%, seguita dal 32,8% e 31,5% delle GPx 5 e 3 di *C. elegans* e nei vertebrati, dal 31,4% della GPx 6 di *Mus musculus* e dal 31% della GPx 3 di *Oryctolagus cuniculus*. La maggior parte delle GPx considerate, ha comunque valori intorno al 30% (fig. 61).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Homo sapiens</i> GPx3	29,1	34
<i>Homo sapiens</i> GPx5	29,1	36
<i>Homo sapiens</i> GPx6	28,2	31
<i>Oryctolagus cuniculus</i> GPx3	31	36
<i>Oryctolagus cuniculus</i> GPx5	24,3	37
<i>Oryctolagus cuniculus</i> GPx6	30,2	35
<i>Sus scrofa</i> GPx3	27,3	36
<i>Sus scrofa</i> GPx5	29,5	34
<i>Sus scrofa</i> GPx6	29,8	34
<i>Mus musculus</i> GPx3 iso 1	27,1	34
<i>Mus musculus</i> GPx3 iso 2	28,7	34
<i>Mus musculus</i> GPx5	29,7	36
<i>Mus musculus</i> GPx6	31,4	35
<i>Gallus gallus</i> GPx3	26,8	34
<i>Taeniopygia guttata</i> GPx3	26,4	34
<i>Thamnophis elegans</i> GPx3	24,3	33
<i>Xenopus laevis</i> GPx3a	27,3	31
<i>Xenopus laevis</i> GPx3b	27	32
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> GPx3	26,9	30
<i>Maylandia zebra</i> GPx3	30,7	36
<i>Takifugu rubripes</i> GPx3	29,6	34
<i>Danio rerio</i> GPx3	29,4	35
<i>Perca flavescens</i> GPx3	24,7	39
<i>Ciona intestinalis</i> GPx b	30	38
<i>Ciona intestinalis</i> GPx c	32,9	38
<i>Saccoglossus kowalevskii</i> GPx3	26,5	36
<i>Ruditapes philippinarum</i>	31	34
<i>Meretrix meretrix</i>	29,1	34
<i>Crassostrea gigas</i> GPx3	26,6	38
<i>Caenorhabditis elegans</i> GPx3	31,5	36

<i>Caenorhabditis elegans GPx5</i>	32,8	38
------------------------------------	------	----

Figura 61: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsGPx-2 e le GPx di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, verde smeraldo gli emicordati, viola i molluschi, giallo limone i nematodi.

Nell'allineamento con le diverse forme di GPx dei metazoi, si distingue il dominio conservato glutazione perossidasi di BsGPx-2 con il residuo di serina in corrispondenza delle selenocisteine o cisteine delle altre GPx (fig. 62).

GK45 Mus. musculus  
 GK45 Homo sapiens  
 GK45 Oryzotylagus cuniculus  
 GK45 Sus. scrofa  
 GK45 Sus. scrofa  
 GK45 Mus. musculus  
 GK45 Oryzotylagus cuniculus  
 GK45 Iae01 Mus. musculus  
 GK45 Oryzotylagus cuniculus  
 GK45 Homo sapiens  
 GK45 Sus. scrofa  
 GK45 Gallus gallus  
 GK45 Trinitropysia griseata  
 GK45 Thaumophis elegans  
 GK45 Xenopus laevis  
 GK45 Xenopus tropicalis  
 GK45 Meria filiformis  
 GK45 Meria filiformis  
 GK45 Takifugu rubripes  
 GK45 Danio rerio  
 GK45 Podiceps filippinorum  
 GK45 Meretrix meretrix  
 GK45 Saccoploceus kowalevskii  
 GK45 Crassostrea gigas  
 GK45 Cloos. incertinae  
 GK45 Cloos. incertinae  
 GK45 Caenorhabditis elegans  
 GK45 Caenorhabditis elegans  
 GK45 Helicoverpa armigera  
 consensus-50

GK45 Mus. musculus  
 GK45 Homo sapiens  
 GK45 Oryzotylagus cuniculus  
 GK45 Sus. scrofa  
 GK45 Sus. scrofa  
 GK45 Mus. musculus  
 GK45 Oryzotylagus cuniculus  
 GK45 Iae01 Mus. musculus  
 GK45 Oryzotylagus cuniculus  
 GK45 Homo sapiens  
 GK45 Sus. scrofa  
 GK45 Gallus gallus  
 GK45 Trinitropysia griseata  
 GK45 Thaumophis elegans  
 GK45 Xenopus laevis  
 GK45 Xenopus tropicalis  
 GK45 Meria filiformis  
 GK45 Meria filiformis  
 GK45 Takifugu rubripes  
 GK45 Danio rerio  
 GK45 Podiceps filippinorum  
 GK45 Meretrix meretrix  
 GK45 Saccoploceus kowalevskii  
 GK45 Crassostrea gigas  
 GK45 Cloos. incertinae  
 GK45 Cloos. incertinae  
 GK45 Caenorhabditis elegans  
 GK45 Caenorhabditis elegans  
 GK45 Helicoverpa armigera  
 consensus-50



La ricostruzione filogenetica delle GPx dei metazoi, realizzata con i metodi di massima parsimonia, minima evoluzione, UPGMA e Neighbor-Joining, stabilisce una netta separazione tra le sequenze dei vertebrati e quelle degli invertebrati. Il gruppo delle GPx degli invertebrati, in cui si trova il clade con le GPx-1 e -2 di Botrillo, è in relazione con il cluster delle GPx 3 dei vertebrati, dal quale si stacca. Nei vertebrati, le GPx 3 sono a loro volta separate dal ramo delle GPx 5 e 6 (fig. 63).

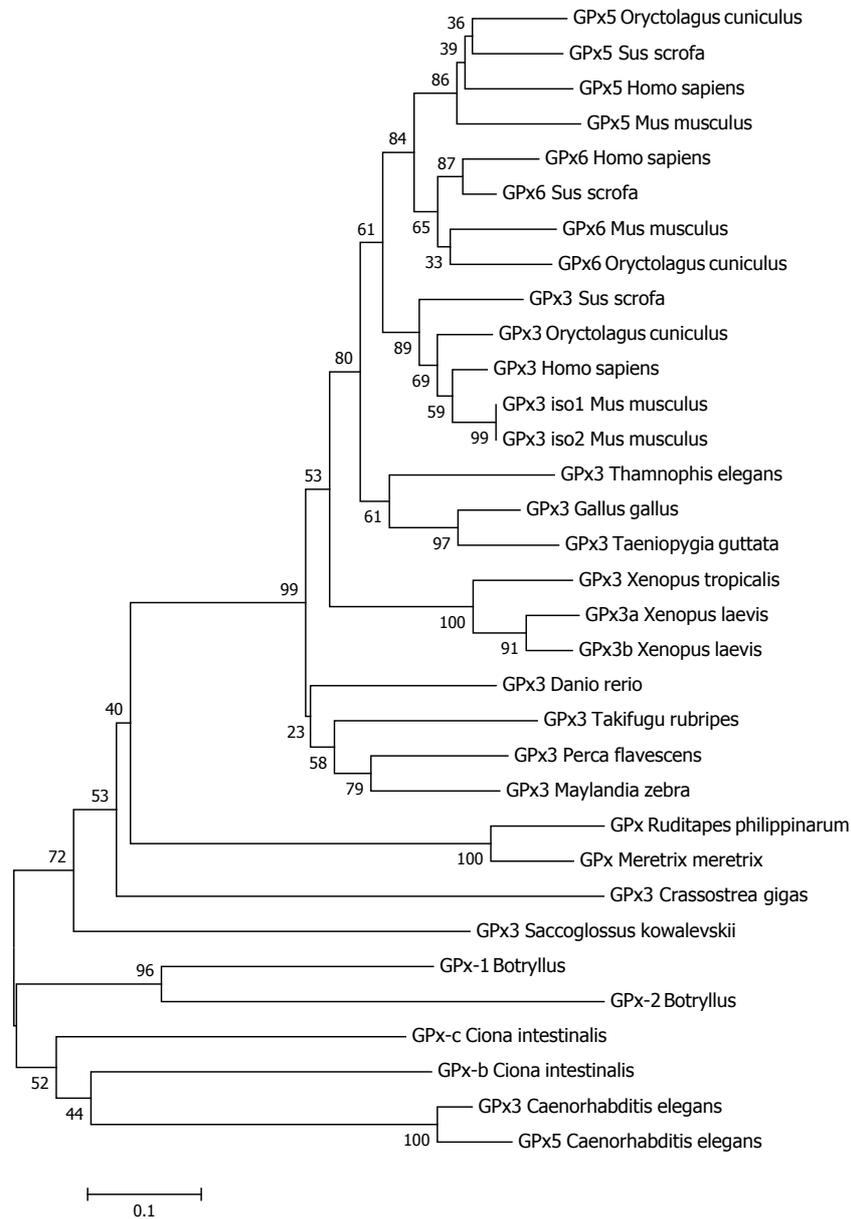


Figura 63: analisi filogenetica delle sequenze GPx indicate in figura 61, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## - Cu/Zn-SOD

I primer specifici SODF e SODR2, basati sulle EST di Botrillo simili alla Cu/Zn-SOD, hanno prodotto un amplificato di 322 pb, da cui è stato ottenuto dopo 5' e 3' RACE un trascritto finale di 1040 pb con una regione codificante di 447 pb. Il tradotto predetto di BsSOD è lungo 148 aa e possiede un dominio rame/zinco superossido dismutasi compreso tra gli amminoacidi 1-144 (fig. 64), nel quale le istidine e l'acido aspartico che formano il sito attivo dell'enzima sono conservate nelle posizioni 41; 43; 58; 75; 78; 115. Alcuni di questi residui fungono da siti di legame dello ione  $\text{Cu}^{2+}$  (41; 43; 58; 115) e dello ione  $\text{Zn}^{2+}$  (58; 66; 75; 78). Si riconoscono inoltre i residui impegnati nella formazione di omodimeri (4; 6; 14; 16; 45-47; 108-109).

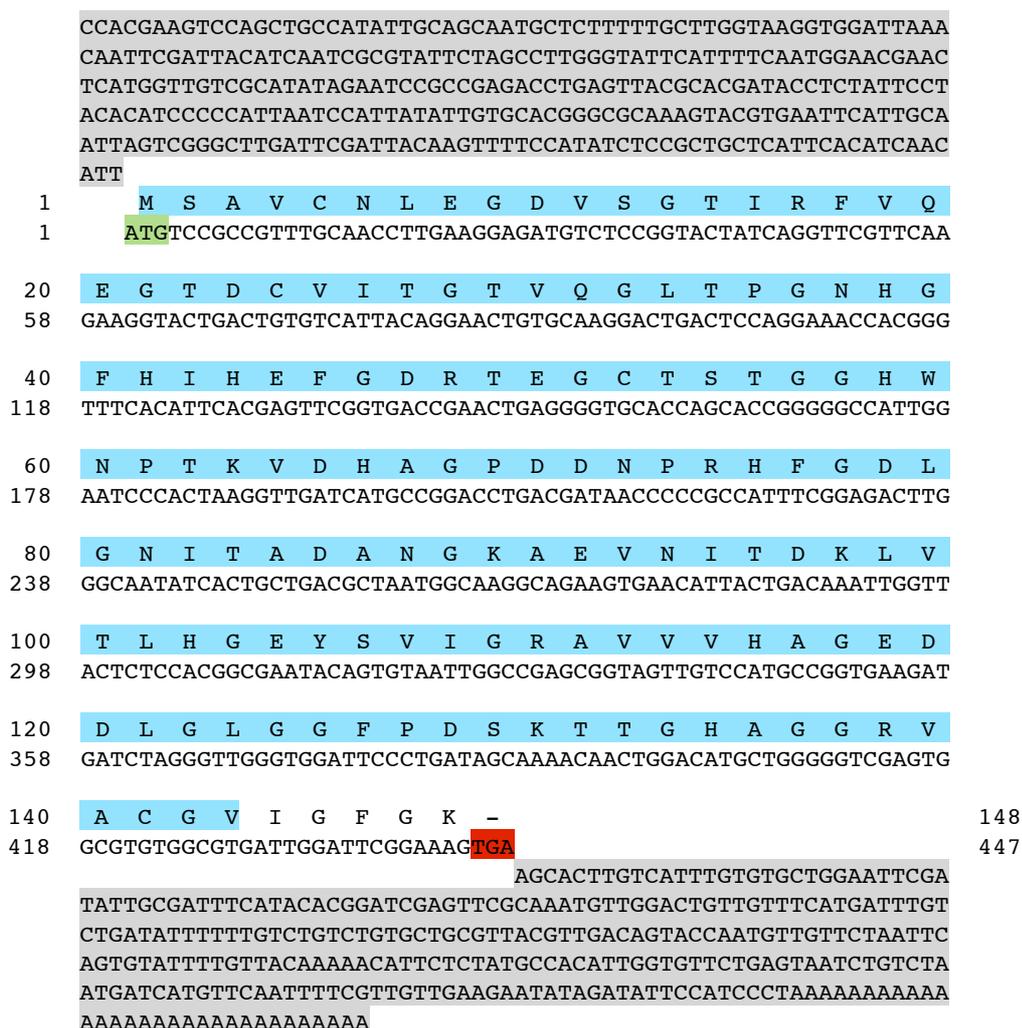


Figura 64: mRNA di BsSOD e tradotto predetto. La regione codificante e i residui amminoacidici sono numerati, con codone di start in verde e di stop in rosso. Le porzioni in grigio indicano la 5' e 3' UTR. La regione azzurra rappresenta il dominio  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -superossido dismutasi.

La sequenza amminoacidica di BsSOD presenta alte percentuali di identità di sequenza con gli ortologi dei diversi metazoi, di circa il 50%, che nei tunicati arrivano a valori del 63,2% in *Polyandrocarpa misakiensis* e del 60,1% in *Halocynthia roretzi* (fig. 65).

Specie	<i>Botryllus schlosseri</i>	
	% identità	% similarità
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	52,3	55
<i>Mus musculus</i>	51,4	54
<i>Sus scrofa</i>	50	55
<i>Homo sapiens</i>	49,1	52
<i>Gallus gallus</i>	53,2	58
<i>Meleagris gallopavo</i>	43	58
<i>Anolis carolinensis</i>	50,6	54
<i>Caretta caretta</i>	47,8	58
<i>Rana catesbeiana</i>	52,3	60
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	50,3	58
<i>Xenopus laevis</i>	49,4	56
<i>Danio rerio</i>	52,6	56
<i>Takifugu rubripes</i>	50,9	55
<i>Oreochromis niloticus</i>	50,6	55
<i>Salmo salar</i>	49,1	51
<i>Polyandrocarpa misakiensis</i>	63,2	75
<i>Halocynthia roretzi</i>	60,1	70
<i>Ciona intestinalis</i>	59,4	73
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	56,4	64
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	52,5	62
<i>Crassostrea gigas</i>	52,3	58
<i>Apis mellifera</i>	60,1	66
<i>Camponotus floridanus</i>	54,3	62
<i>Drosophila melanogaster</i>	51,4	57
<i>Loa loa</i>	47,5	52
<i>Caenorhabditis elegans</i>	34,1	55
<i>Amphimedon queenslandica</i>	46,6	58

Figura 65: comparazione tra la sequenza amminoacidica putativa di BsSOD e gli ortologi di altre specie di metazoi. I colori associati a ciascun gruppo sono: giallo per i mammiferi, grigio gli uccelli, marrone i rettili, verde gli anfibi, celeste i teleostei, arancio i tunicati, rosso gli echinodermi, viola i molluschi, rosa chiaro gli artropodi, giallo limone i nematodi, rosa scuro i cnidari, verde scuro i poriferi.

Nell'allineamento con gli ortologi dei metazoi, si nota che il dominio superossido dismutasi della sequenza di Botrillo è fortemente conservato, soprattutto nei residui funzionali, come nel caso delle cinque istidine e dell'acido aspartico del sito attivo, responsabili anche del legame dello ione  $\text{Cu}^{2+}$  (fig. 66).





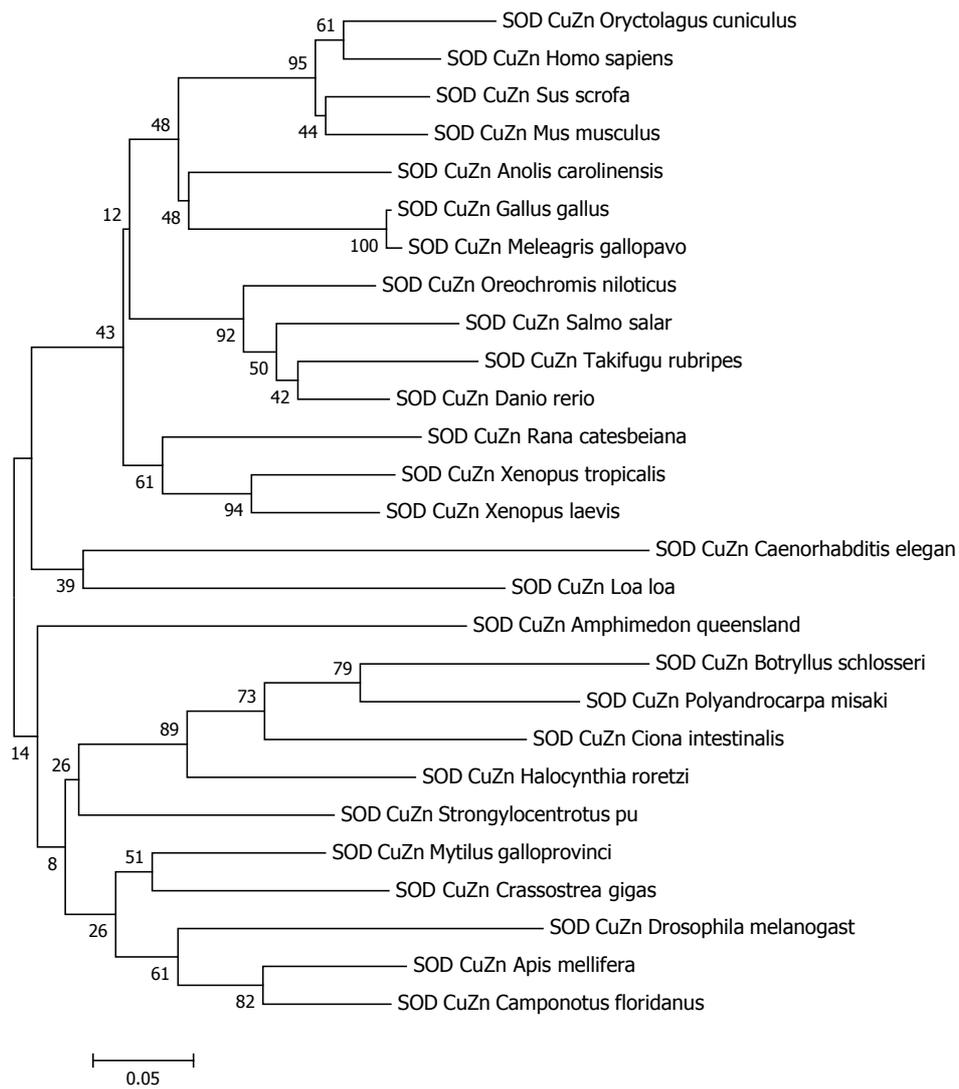


Figura 67: analisi filogenetica delle sequenze SOD indicate in figura 65, tramite il metodo del Neighbor-Joining. I numeri indicano i valori di Bootstrap (espressi in percentuale) dopo 10000 repliche.

## ANALISI DI ESPRESSIONE

### - Real-Time PCR

I livelli di espressione di cinque trascritti identificati sono stati quantificati tramite Real-Time PCR, utilizzando mRNA retrotrascritto da campioni della stessa colonia in due fasi distanti del ciclo coloniale blastogenetico: quelle intermedie ed uno stadio avanzato del cambio di generazione. L'analisi è stata condotta su due colonie distinte dalla sigla numerica 110 e 361. I risultati ottenuti mostrano che tutti i trascritti, sia quelli apoptotici come BAX, AIF1, BIRP-2 e NF-kB1, che PCNA con attività proliferativa, sono ampiamente sottoespressi durante il cambio di generazione rispetto alle fasi intermedie (fig. 68).

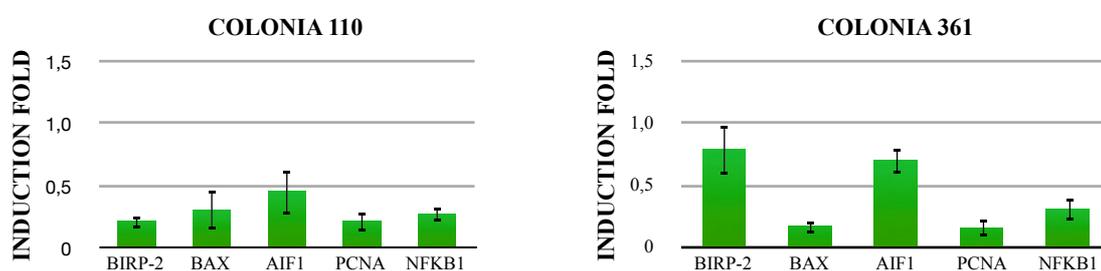


Figura 68: variazione del livello di espressione dei trascritti durante il cambio di generazione rispetto alle fasi intermedie del ciclo coloniale blastogenetico. Tutti i valori sono normalizzati tramite l'utilizzo della  $\beta$ -actina come gene housekeeping. Valori inferiori ad 1,0 indicano sottoespressione, uguali ad 1,0 assenza di variazione, superiori ad 1,0 aumento di espressione.

### - Ibridazione *in-situ*

La localizzazione di alcuni trascritti è stata determinata, attraverso ibridazione *in-situ* con specifiche ribosonde antisense biotinilate, su colture cellulari ricavate da colonie nelle fasi intermedie e nel cambio generazionale del ciclo coloniale. Per tutti i trascritti sono state sintetizzate delle sonde senso come controllo negativo.

La sonda antisense specifica per il messaggero di BsBAX, presenta marcatura a livello dei fagociti, sia nelle fasi intermedie che nel cambio di generazione del ciclo blastogenetico (fig. 69).

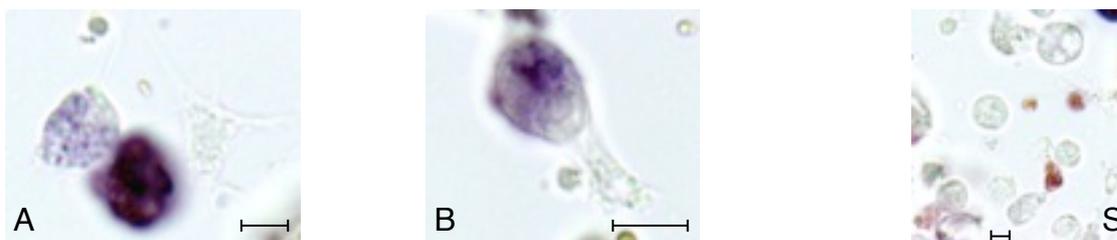


Figura 69: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsBAX. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva. Lunghezza della barra: 5  $\mu$ m.

La sonda antisenso specifica per il trascritto di BsPCNA, riconosce le cellule indifferenziate nelle fasi intermedie e durante il cambio di generazione (fig. 70).

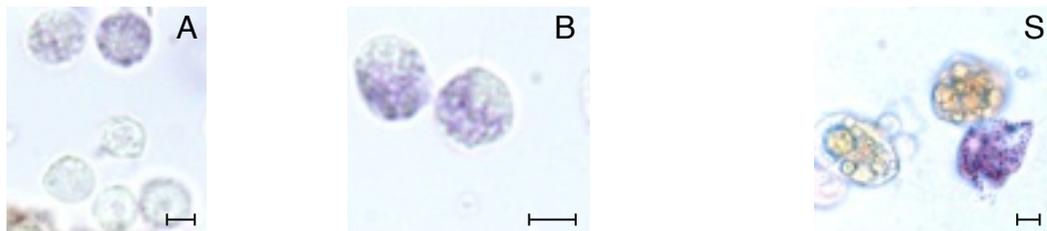


Figura 70: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsPCNA. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva. Lunghezza della barra: 5  $\mu$ m.

Come per BsPCNA, anche l'mRNA di BsKI67 è localizzato nelle cellule indifferenziate in entrambe le fasi del ciclo coloniale analizzate (fig. 71).

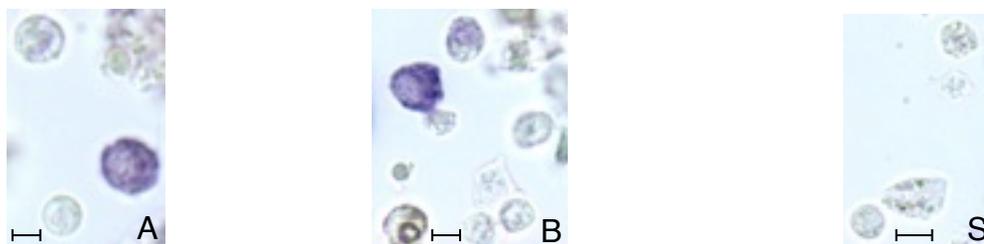


Figura 71: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsKI67. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva. Lunghezza della barra: 5  $\mu$ m.

Il trascritto di BsGCLM è sintetizzato dalle cellule macrofago-simili nelle fasi intermedie e dalle cellule morulari nel cambio di generazione del ciclo blastogenetico (fig. 72).

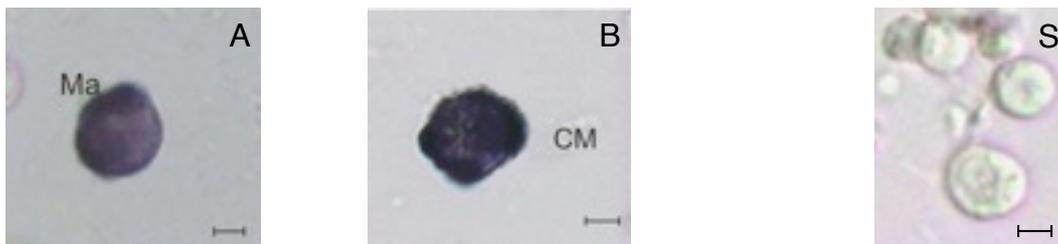


Figura 72: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsGCLM. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva. Lunghezza della barra: 5 µm.

La marcatura della sonda antisenso specifica per il messaggero di BsGS è localizzata nelle cellule macrofago-simili nelle fasi intermedie del ciclo coloniale, mentre nelle cellule morulari e macrofago-simili durante il cambio generazionale (fig. 73).

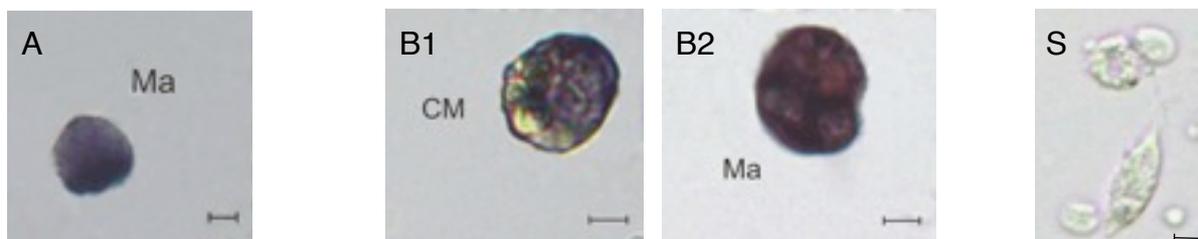


Figura 73: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsGS. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva. Lunghezza della barra: 5 µm.

Il segnale positivo del trascritto di BsGPx-1, come per BsGS, viene rilevato dalla sonda antisenso nelle cellule macrofago-simili nelle fasi intermedie del ciclo blastogenetico e nelle morulari e macrofago-simili nel cambio generazionale (fig. 74).

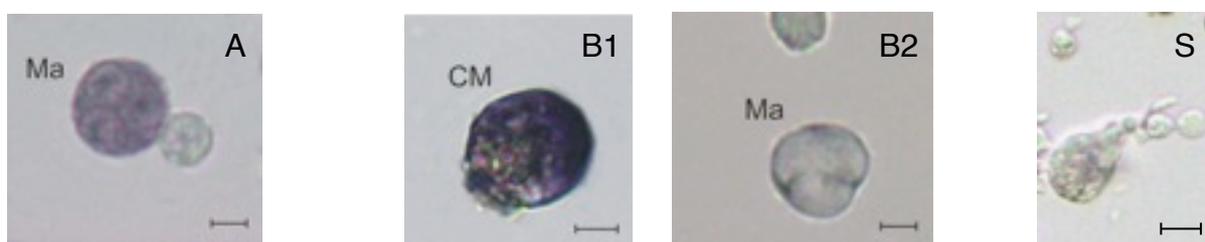


Figura 74: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsGPx-1. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva. Lunghezza della barra: 5 µm.

L'mRNA di BsGPx-2 viene prodotto dalle cellule morulari e macrofago-simili nelle fasi intermedie del ciclo coloniale e dalle macrofago-simili durante il cambio di generazione (fig. 75).

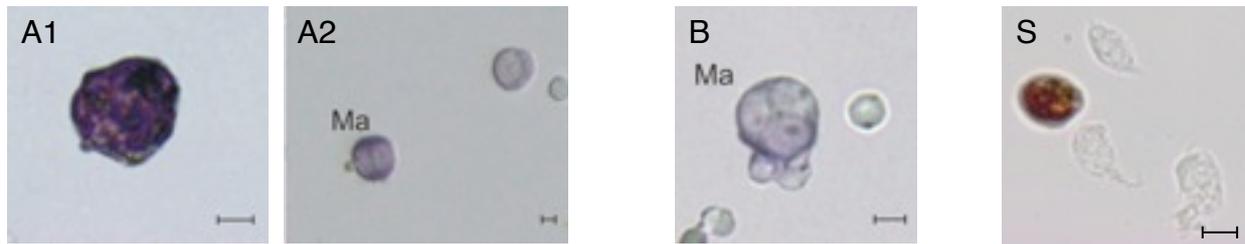


Figura 75: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsGPx-2. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva.

La sonda antisenso per il trascritto di BsSOD risulta marcata nelle cellule macrofago-simili nelle fasi intermedie del ciclo e nelle morulari e macrofago-simili nel cambio di generazione (fig. 76).

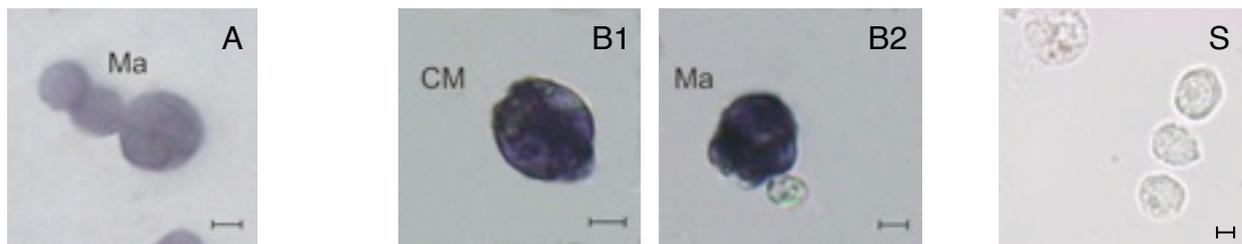


Figura 76: ibridazione *in-situ* con sonda antisenso per mRNA di BsSOD. Colture emocitarie da colonie nelle fasi intermedie (A) e nel cambio generazionale (B) del ciclo blastogenetico coloniale. Sonda senso (S). In blu la colorazione positiva.

## DISCUSSIONE

In Botrillo, il corretto funzionamento del ciclo blastogenetico coloniale è di fondamentale importanza per garantire la diffusione e la sopravvivenza di ogni colonia. L'alternanza ciclica delle tre generazioni blastogenetiche coloniali è, infatti, strettamente legata ad una sequenza di eventi ben regolati fra loro. Una delle fasi più critiche del ciclo coloniale è senz'altro il cambio di generazione, in cui lo sviluppo di nuovi zoidi prende il posto della vecchia generazione adulta. Questo passaggio di testimone è reso possibile da due processi: la morte cellulare per apoptosi ed il riassorbimento mediante fagocitosi degli zoidi senescenti. La maturazione delle gemme primarie a nuovi individui adulti avviene solo grazie alla clearance dei residui apoptotici da parte dei fagociti, in quanto il materiale ingerito viene messo a disposizione delle gemme in procinto di affrontare gli stadi finali di sviluppo. Questa richiesta energetica è causata dalla mancanza di alimentazione della colonia durante la regressione. Un altro processo basilare è la proliferazione che permette la formazione e lo sviluppo delle gemme secondarie ad ogni ciclo blastogenetico. I primordi di queste giovani generazioni si originano da cellule multipotenti somatiche che ricostruiscono la loro struttura interna fino allo stadio di gemma primaria e di adulto.

L'attività di ricerca degli ultimi anni ha contribuito ad aumentare la disponibilità di informazioni sui vari aspetti della biologia di Botrillo. Tuttavia, ancora oggi non si hanno conoscenze precise sui geni e i pathway deputati alla regolazione delle diverse fasi del ciclo blastogenetico coloniale. Questo studio ha permesso di evidenziare che i principali geni dei vertebrati coinvolti nell'apoptosi, nella proliferazione cellulare e nella risposta allo stress ossidativo sono conservati e vengono espressi durante il ciclo coloniale in Botrillo.

### **Analisi di sequenza**

Tutti i geni analizzati in questo lavoro sono stati isolati e caratterizzati: per quanto riguarda quelli coinvolti nell'apoptosi, BsBAX presenta un mRNA finale di 2004 pb con un Open Reading Frame (ORF) di 780 pb che codifica per una proteina putativa di 259 aa. La sequenza proteica di BsBAX contiene il caratteristico dominio BCL-2 con i tre sottodomini BH1, BH2 e BH3, un dominio transmembrana e numerosi siti di legame per le proteine di tipo BH3. Si distinguono poi alcuni residui critici per l'attività di BAX e vari residui di fosforilazione tramite chinasi PKC, GSK3, p38 e JNK. Recentemente, un'approfondita analisi filogenetica sull'evoluzione della famiglia BCL-2 ha stabilito la loro origine in due sequenze omologhe di BCL-2 nei poriferi, evolutesi per duplicazione da un antenato comune (Aouacheria *et al.*, 2005). Successivamente, con l'evoluzione dei deuterostomi e soprattutto dei vertebrati, si è assistito a numerosi eventi di duplicazione e differenziazione che hanno portato ad un aumento delle sequenze di tipo BCL-2. Negli invertebrati, ortologhi di BAX sono presenti in cnidari, artropodi e molluschi ma mancano nei nematodi che invece possiedono un ortologo di BCL-2. Nel genoma dell'ascidia *Ciona intestinalis* si distinguono quattro sequenze di tipo BCL-2, tra le quali è stato identificato e caratterizzato un ortologo di BAX umano con la tipica struttura multidominio e la capacità di indurre morte per apoptosi tramite il dominio BH3 (Takada *et al.*, 2005).

Il trascritto completo di AIF è di 2048 pb con una regione codificante di 1737 pb che esprime un tradotto putativo di 578 aa. La proteina di Botrillo, come quella dei vertebrati, possiede il dominio ossidoriduttasico FAD-dipendente di classe II, piridin nucleotide-disolfuro, con al suo interno un dominio piridin nucleotide-disolfuro di legame dell'NADH ed, infine, il dominio C-terminale di dimerizzazione. Sono presenti, inoltre, un dominio transmembrana N-terminale, un motivo di localizzazione nucleare, numerosi siti di legame per il FAD, di fosforilazione e di ubiquitinazione da parte di XIAP. AIF ha un'origine estremamente antica, dato che ortologhi e sequenze AIF-simili

sono state identificate negli eucarioti, negli eubatteri e negli archeobatteri (Sevrioukova, 2011). La loro evoluzione è avvenuta probabilmente attraverso l'acquisizione da un antenato comune ed il successivo adattamento alla funzione mitocondriale. Infatti, l'attività proapoptotica di AIF è presente già negli eucarioti unicellulari, come dimostrato recentemente in *Dictyostelium discoideum* (Arnoult *et al.*, 2001).

Il messaggero di PARP1 è lungo 3195 pb con un ORF di 2916 pb che produce una proteina putativa di 971 aa. La sequenza amminoacidica di BsPARP1 conserva all'N-terminale due motivi a dita di zinco per il legame del DNA e dello ione zinco, i domini centrali PADR1 e BRCT, il dominio WGR e i due domini PARP, regolatorio e catalitico, al C-terminale. Sono presenti numerosi siti di inibizione della proteina, un motivo di localizzazione nucleare e residui di legame del NAD<sup>+</sup> e di fosforilazione. Sequenze PARP1 sono diffuse nella maggior parte degli eucarioti e condividono il dominio WGR, il dominio PARP regolatorio (PRD) e quello catalitico, probabilmente la stessa struttura dell'enzima dell'antenato comune (Citarelli *et al.*, 2010). In molti di questi ortologi, nelle piante, nei funghi e nei protisti, la funzione di riconoscimento e riparazione del DNA danneggiato è conservata. Contrariamente alle sequenze degli eucarioti e a quella di BsPARP1, la proteina PARP1 annotata in GenBank di *C. intestinalis* ha un dominio WGR tronco ed è privo di entrambi i domini PRD e PARP catalitico.

Nel caso delle proteine BIR, le diverse sequenze raccolte, tutte con elevata similarità per questa famiglia di proteine, risultano in eccesso rispetto alle otto caratterizzate nell'uomo. Negli invertebrati più studiati, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, sono state identificate quattro BIRC nel primo caso (DIAP1 e 2, deterina e d-BRUCÉ) e due nel secondo (BIR-1 e BIR-2) (Mace *et al.*, 2010). Una pubblicazione recente ha indagato la filogenesi del dominio BIR, riscontrando che i BIR di tipo I, presenti esclusivamente nelle proteine che inibiscono l'apoptosi, si differenziano sensibilmente tra vertebrati ed invertebrati. In particolare, i diversi domini BIR I delle proteine BIRC di *C. intestinalis* o di *Strongylocentrotus purpuratus* si raggruppano in singoli cluster a parte, indicando che in queste specie le sequenze BIR o i loro geni specifici sono andati incontro a duplicazione, con un aumento del loro numero (Cao *et al.*, 2008). In ambito simile, un report sulla ricerca di geni apoptotici nel genoma di *C. intestinalis*, ha mostrato 15 sequenze contenenti il dominio BIR, ipotizzando un allargamento di tipo adattativo delle proteine BIR in questa specie (Terajima *et al.*, 2003). Tuttavia, dopo averle analizzate una per una, otto di queste sequenze non sembrano condividere la tipica organizzazione strutturale della famiglia IAP, in quanto prive della regione BIR o addirittura proteine di tutt'altro tipo. In GenBank, proteine BIRC di diversa lunghezza di *C. intestinalis* sono registrate come simili a BIRC3 e BIRC2 umane. Lo stesso vale per BIRC7. Queste proteine putative, confrontate fra loro, non sembrano il prodotto di splicing alternativo, ma molto probabilmente annotazioni erronee. Rimane il fatto che sia nel browser genomico *Ensembl* sia nel database di EST e trascritti ANISEED, sono presenti molteplici sequenze BIRC di *C. intestinalis*.

Nel mio lavoro di ricerca, ho scelto di analizzare due sequenze BIRC differenti: la prima è caratterizzata da un trascritto completo di 611 pb, una regione codificante di 438 pb ed un tradotto putativo di 145 aa. Questa proteina è costituita dal solo dominio BIR come la survivina umana, la deterina di *D. melanogaster* e BIR-1 di *C. elegans*. Nell'uomo, la survivina (BIRC5) ha la doppia funzione di proteina che regola la segregazione cromosomica e la citodieresi e di inibitore dell'apoptosi. Entrambi i ruoli sono possibili grazie all'interazione con altre proteine IAP come BRUCÉ (BIRC6) e cIAP1 (BIRC2) nella divisione cellulare e XIAP (BIRC4) nella prevenzione della morte cellulare, dato che la survivina non lega le caspasi (Mace *et al.*, 2010). Il coinvolgimento in questi due processi distinti è stato evidenziato anche per gli ortologi di altri organismi come la deterina di *D. melanogaster*, SURVL della spugna *Suberites domuncula* e Bir1p del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, mentre solo BIR-1 del nematode *C. elegans* opera

esclusivamente nella mitosi (Fraser *et al.*, 1999; Yoon e Carbon, 1999; Jones *et al.*, 2000; Luthringer *et al.*, 2011).

L'analisi in Blast della sequenza BIR di Botrillo non sembra però avere similarità con la survivina. Inoltre, la survivina è una proteina BIR di tipo II che, come le altre sequenze di questa classe, è estremamente conservata in tutti gli eucarioti, dal lievito fino all'uomo. Pertanto, appare escluso che la sequenza di Botrillo sia un ortologo della survivina. Nell'ascidia solitaria *Boltenia villosa* è stato recentemente isolato un trascritto full-length BIRC che viene espresso durante la metamorfosi dello stadio larvale (Davidson *et al.*, 2003). La proteina tradotta contiene un solo dominio BIR come in Botrillo. Il messaggero di questo BIRC viene prodotto in tre momenti differenti: quando la larva è pronta per attaccarsi ad un substrato, l'ora successiva al momento in cui si è insediata e allo stadio di giovanile di quattro giorni. Nelle ore che seguono all'adesione, la larva subisce una serie di modificazioni veloci che rivoluzionano la sua struttura, preparando i rudimenti di quella degli adulti. Le larve delle ascidie coloniali non metamorfosano, però, allo stesso modo, ma sviluppano i futuri organi già durante l'embriogenesi e prima dell'insediamento (Davidson *et al.*, 2003).

Il secondo trascritto BIRC, isolato in *B. schlosseri*, ha un messaggero di 1290 pb con un ORF di 1050 pb che traduce per una proteina putativa di 349 aa. Questa sequenza amminoacidica è composta da un dominio BIR e dal dominio a dita di zinco RING che si trova esclusivamente nelle BIRC di tipo I o IAP, tranne in NAIP (BIRC1) (Mace *et al.*, 2010). Nell'uomo si distinguono due sequenze BIRC contenenti un solo dominio BIR e la regione RING: la livina (BIRC7) e ILP-2 (BIRC8) (Mace *et al.*, 2010). La livina inibisce l'apoptosi, legando e bloccando le caspasi 3, 7 e 9 ma anche degradando l'antagonista degli IAP, Smac/Diablo, attraverso il suo dominio RING che è un E3 ubiquitin-ligasi. A sua volta, Smac/Diablo può legare la livina, inducendola a degradazione proteosomiale. La livina contrasta sia l'apoptosi indotta dai recettori di morte, sia quella promossa da BAX, FADD e altre proteine. Inoltre, se sottoposta a taglio proteolitico da parte delle caspasi, acquisisce attività proapoptotica. Infine, sembra anche coinvolta nel ciclo cellulare e regola la proliferazione cellulare (Yan, 2011). ILP-2 o Ts-IAP (Testis-specific inhibitor of apoptosis) è espressa nei testicoli in condizioni normali e risulta un debole inibitore della caspasi 9, non ha effetto sull'apoptosi indotta da Fas o TNF, mentre è un potente repressore di BAX (Fulda, 2009). Nel genoma di *S. purpuratus* sono state descritte quattro sequenze BIR di tipo I che formano un cluster comune filogeneticamente vicino a quello dei BIRC2 e 3 umani. Si tratta di una sequenza con tre domini BIR ed un RING, due sequenze molto simili che sembrano il risultato di un evento di duplicazione, entrambe con due BIR ed un RING ed una sequenza con un BIR ed un RING (Robertson *et al.*, 2006). Similmente, anche nel genoma del cnidario *Nematostella vectensis* è presente una sequenza BIRC contenente un dominio BIR ed un RING che in Blast mostra similarità per la BIRC2 dei vertebrati. Un'altra sequenza interessante di *N. vectensis*, al pari della sua survivina ma completamente diversa, è costituita dal solo dominio BIR come in una delle due BIRC di Botrillo (Cao *et al.*, 2008).

Lasciando da parte la complessa evoluzione delle proteine BIRC nei metazoi, l'ultimo trascritto coinvolto nell'apoptosi che ho considerato è NF- $\kappa$ B1 o p105, il precursore di p50. In Botrillo, la sequenza del suo mRNA è di 3887 pb, con una regione codificante di 3009 pb per una proteina putativa di 1002 aa che conserva la caratteristica topologia di p105 con un dominio N-terminale RHD, seguito da quello IPT e da una serie di motivi ripetuti di anchirina, mentre è privo del dominio di morte situato al C-terminale. Nel dominio IPT sono presenti siti di legame del DNA, di interazione con le anchirine dell'inibitore I $\kappa$ B e siti di dimerizzazione. Altri siti di legame del DNA sono presenti nel dominio RHD.

Negli invertebrati, la maggior parte delle pubblicazioni inerenti alla famiglia NF- $\kappa$ B riguarda le proteine di classe II, ovvero p65 (RELA) e RELB, mentre quelle di classe I come p105 (NF- $\kappa$ B1) e p100 (NF- $\kappa$ B2) non sono ancora abbastanza approfondite. In *C. intestinalis*, molti studi sono stati

dedicati a p65, mostrando che l'ortologo di questa specie e la variante più corta di splicing alternativo sono coinvolti nell'embriogenesi e nella formazione della notocorda. In particolare, nelle prime fasi dello sviluppo svolgono una funzione antiapoptotica delle cellule testicolari extraembrionali, la cui eliminazione è strettamente regolata. Invece, l'interazione tra Cip65 e CtkB, con la prima che promuove la trascrizione del secondo, il quale, a sua volta, reprime p65, risulta fondamentale per la formazione della notocorda allo stadio larvale (Maury *et al.*, 2006; Kaway *et al.*, 2005). Un risultato simile è stato osservato anche nell'ascidia solitaria *Halocynthia roretzi*, dove lo sviluppo della notocorda viene controllato dalle due varianti antagoniste AsRel1 e AsRel2 (Kaway *et al.*, 2003). Un ortologo putativo di p65 è stato individuato anche nel trascrittoma di Botrillo, ma non è ancora stato validato sperimentalmente. Riguardo alle proteine di classe I, l'unica sequenza di questo tipo in *C. intestinalis* è NF-kB1 e contiene il dominio di morte C-terminale, a differenza di quella di Botrillo (Yagi *et al.*, 2003). Il tentativo di ricostruire il percorso evolutivo di questo tipo di proteine appare tutt'altro che semplice. Nel riccio di mare *S. purpuratus*, è stato identificato un ortologo di NF-kB1 che mantiene la stessa successione in domini presente nella proteina dei vertebrati (Pancer *et al.*, 1999). Negli cnidari, si distinguono diverse situazioni: 1) *N. vectensis* possiede un ortologo incompleto di NF-kB1, composto dai soli domini RHD ed IPT; 2) nel genoma di *Hydra magnipapillata* non sono presenti sequenze NF-kB; 3) nella libreria di EST di *Acropora millepora* si trova solo una breve sequenza anchirinica (Sullivan *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007). Inoltre, negli cnidari mancano le proteine NF-kB di classe II, REL-simili. Recentemente, un ortologo estremamente conservato di NF-kB1 è stato caratterizzato anche nella spugna *Amphimedon queenslandica*, appartenente ad un phylum di metazoi primitivi. Questa specie è però priva del fattore Ikb e delle proteine REL, come in *N. vectensis* (Gauthier e Degnan, 2008). La scoperta in una spugna di una proteina NF-kB1, molto simile a quella descritta nei vertebrati, sembra indicare che il dominio anchirinico di *Nematostella* o l'intera sequenza di altri cnidari siano state perse in un momento successivo alla loro acquisizione. Nei protostomi, la proteina Relish di *D. melanogaster* è stata studiata a fondo e la sua struttura viene associata a quella di NF-kB1 e NF-kB2 (Begun e Whitley, 2000). Negli artropodi è stato recentemente isolato il primo omologo di Relish nei crostacei, nel gamberetto *Litopenaeus vannamei*, insieme alla sua isoforma corta, contenente solo il dominio RHD (Huang *et al.*, 2009). Inaspettatamente, *C. elegans* manca di proteine NF-kB. Nei lofozoocozoi, la chiocciola d'acqua dolce *Biomphalaria glabrata* è l'unico mollusco in cui è stata caratterizzata una sequenza conservata Relish-simile, mentre negli altri molluschi analizzati sono stati descritti solo ortologi di REL (Zhang e Coultas, 2011). Proprio nell'emolinfa di *B. glabrata* è stato isolato il simbionte unicellulare *Capsaspora owczarzaki* che contiene una sequenza NF-kB1 con un dominio RHD, una regione ricca di glicine e sei anchirine ripetute. Considerando la presenza di proteine anchiriniche negli eubatteri, è stato proposto che l'interazione tra una nuova sequenza dal solo dominio RHD in un antenato sconosciuto ed una sequenza anchirinica preesistente, abbia dato origine ad una proteina simile a quella di *C. owczarzaki* (Gilmore e Wolenski, 2012). Nel corso dell'evoluzione, è probabile che le proteine degli cnidari abbiano perso il dominio anchirinico e successivamente negli artropodi siano comparse le proteine di tipo REL che, insieme ad NF-kB, sono andate incontro a duplicazione nei mammiferi (Gilmore e Wolenski, 2012).

L'analisi dei geni coinvolti nella proliferazione ha prodotto un trascritto completo di BsPCNA di 1415 pb con un ORF di 792 pb ed un tradotto putativo di 263 aa. La sequenza ortologa di Botrillo è fortemente conservata e mantiene la tipica ripartizione in due domini N- e C-terminali identici tra loro, numerosi siti di legame del DNA e molti residui critici per la trimerizzazione con altre due molecole di PCNA ed infine, vari siti di legame per alcune proteine partner nella replicazione del DNA. Finora, la presenza di una proteina conservata PCNA-simile in *B. schlosseri*, era stata

evidenziata in modo indiretto tramite saggi immunostochimici con anticorpi policlonali specifici (Voskoboynik *et al.*, 2008; Gasparini *et al.*, 2007).

Il secondo messaggero ottenuto, relativo a BsKI67, è incompleto all'estremità N-terminale, dove manca la 5' UTR. La sequenza parziale è lunga 3680 pb e ha un ORF di 1950 pb che esprime una proteina putativa di 649 aa. La struttura di quest'ortologo è costituita da un dominio FHA N-terminale con i suoi siti di legame dei fosfopeptidi e dalla regione di motivi ripetuti KI67R. Diversamente da Botrillo, la sequenza proteica di KI67 degli altri metazoi ha una lunghezza più elevata che varia dai 1500 ai 3000 amminoacidi, eccetto quella dell'uccello *Taeniopygia guttata* di 621 aa, con la quale Botrillo condivide la maggiore identità di sequenza globale, circa il 25%.

Questa proteina riserva molti punti interrogativi: da un lato, la sua funzione specifica non è ancora stata chiarita, dall'altro non ci sono informazioni sul modo in cui si è evoluta (Endl e Gerdes, 2000). Analizzando le sequenze KI67 dei diversi organismi, si osserva che gli ortologi del riccio di mare, dell'emicordato *Saccoglossus kowalevskii* e di *C. intestinalis*, considerati deuterostomi basali, contengono solo il dominio FHA. Nei vertebrati, a livello dei pesci, KI67 è formato dai due domini caratteristici FHA e KI67R, tranne in *Dicentrarchus labrax* che possiede solo il primo. Negli altri gruppi di vertebrati, il dominio KI67 è sempre conservato e in alcuni ha anche un maggior numero di ripetizioni. Nei protostomi, soprattutto quelli più noti *D. melanogaster* e *C. elegans*, non ci sono tracce di proteine simili o del dominio FHA. Tuttavia, una sequenza ortologa di KI67 è stata recentemente identificata nel genoma dell'ostrica *Crassostrea gigas* ed anche in questo caso è presente solo il dominio FHA (Zhang *et al.*, 2012). Pertanto, Botrillo sembra essere il primo cordato invertebrato nel quale è stato possibile evidenziare il nuovo dominio KI67 che poi si è diffuso e affermato nei vertebrati.

L'ultimo gene analizzato è Nanos che ha un trascritto completo di 1418 pb, una sequenza codificante di 873 pb per un tradotto putativo di 290 aa. In Botrillo, come negli altri metazoi, la proteina ortologa è costituita da una regione variabile e da un dominio C-terminale a dita di zinco Nanos che lega l'RNA ed è estremamente conservato. Un ortologo di Nanos è stato caratterizzato anche in *Botryllus primigenus* (Sunanaga *et al.*, 2008).

I geni coinvolti nella risposta allo stress, analizzati in Botrillo, sono risultati tutti molto conservati. Il messaggero di una delle due subunità di GCL, quella regolatoria GCLM, presenta 1556 pb ed un ORF di 870 pb che traduce per una proteina putativa di 289 aa. La sequenza amminoacidica di quest'ortologo è formata dal dominio AKR, tipico della famiglia aldo-cheto riduttasi e dai residui del sito attivo e di quello catalitico.

Il trascritto di BsGS è di 1710 pb con una regione codificante di 1446 pb che produce un tradotto putativo di 481 aa. Questo conserva un dominio di tipo GS in cui si distinguono i residui del sito attivo implicati nella reazione catalizzata, una regione di dimerizzazione, una tasca di legame dell'ATP e del glutatione, alcuni siti di legame del magnesio ed un motivo ricco di glicine che forma la copertura del sito attivo.

Sono state caratterizzate due diverse sequenze GPx: l'mRNA della prima è lungo 1029 pb, ha un ORF di 636 pb che codifica per una proteina putativa di 211 aa. La sequenza amminoacidica contiene un peptide segnale seguito dal tipico dominio GSH perossidasi. Inoltre, sono conservati dei residui di dimerizzazione ed una tetraide di residui catalitici che comprende la selenocisteina.

Nei metazoi sono stati descritti vari geni che esprimono isoenzimi GPx, soprattutto nei mammiferi dove sono presenti otto GPx diverse tra loro per localizzazione cellulare e funzione svolta (Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). In Blast, la proteina di Botrillo mostra similarità soprattutto per le due forme 3 e 5 dei vertebrati, ma anche di *Caenorhabditis* e per le GPx b/c di *C. intestinalis*, nel cui genoma sono state identificate otto selenoproteine (Jiang *et al.*, 2010). Cinque di queste sono

state annotate con lettere dalla a alla e. Nelle analisi di similarità, la GPx b di *Ciona* e le GPx3 dei vertebrati presentano le maggiori percentuali di identità amminoacidica con la sequenza di Botrillo. La seconda GPx isolata ha un trascritto di 918 pb con un ORF di 675 pb. Il tradotto putativo è di 224 aa e presenta la stessa topologia dell'altra GPx di Botrillo ma, a differenza di questa, contiene una serina al posto della selenocisteina. L'analisi in Blast mostra un'elevata similarità con la GPx c di *C. intestinalis* e via via con la GPx 5 di *C. elegans* e con le GPx 3, 5 e 6 dei vertebrati. Confrontando queste sequenze con quella di Botrillo, si nota che la GPx c di *Ciona* ha la maggiore identità di sequenza e le GPx 5 e 3 di *C. elegans* sono di poco inferiori come le GPx 6 e 3 dei vertebrati. Tuttavia, la GPx c di *Ciona*, come la GPx 3, conserva la caratteristica selenocisteina, mentre le due GPx di *Caenorhabditis* hanno una cisteina al posto della selenocisteina. La GPx 6 umana possiede anch'essa la selenocisteina ed è espressa a livello embrionale e nell'epitelio olfattivo adulto (Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). L'omologa di questa GPx nei roditori presenta una cisteina al posto della selenocisteina. Le analisi filogenetiche mostrano che il clade formato dalle due GPx di Botrillo si colloca nel gruppo delle GPx 3 degli invertebrati. L'ultimo gene identificato è quello della Cu/Zn-SOD con un mRNA di 1040 pb ed una codificante di 447 pb che produce una proteina putativa di 148 aa. La sequenza di quest'ortologo contiene il dominio conservato Cu/Zn-SOD, i residui del sito attivo, i siti di legame dello ione  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  ed i residui di dimerizzazione. Le proteine SOD hanno avuto origine miliardi di anni fa con l'avvento sulla terra dell'atmosfera aerobia. Le prime forme corrispondevano probabilmente alla Cu/Zn-SOD e Fe/Mn-SOD, mentre la Cu/Zn-SOD extracellulare si è evoluta prima della differenziazione di funghi, piante e metazoi (Zelko et al., 2002). Ortologi della Cu/Zn-SOD sono stati caratterizzati anche in altre ascidie come *Polyandrocarpa misakiensis* nella quale la Cu/Zn-SOD1 è sottoespressa negli zoidi senescenti e *H. roretzi* dove la Cu/Zn-SOD purificata dal plasma e dagli emociti sembra essere la stessa proteina, probabilmente secreta dagli emociti (Kawamura et al., 2012; Abe et al., 1999).

### **Studio di espressione: qRT-PCR**

L'analisi in Real-Time PCR è stata effettuata su cinque geni, utilizzando cDNA di campioni della stessa colonia in regressione e negli stadi intermedi. L'esperimento è stato ripetuto in due colonie diverse. I geni BAX, AIF, NFkB e BIRP2 coinvolti nell'apoptosi e PCNA nella proliferazione, risultano tutti marcatamente sottoespressi in regressione. In questo studio, è stato considerato uno stadio avanzato della regressione, durante il quale un numero crescente di fagociti elimina le cellule senescenti. Esperimenti con anticorpi policlonali anti-BAX hanno dimostrato che questo fattore proapoptotico viene espresso in modo esteso in tutti i tessuti degli zoidi adulti a partire dallo stadio precedente al cambio di generazione (Cima e Ballarin, 2009). In questo modo, è probabile che il livello di BAX, dopo una sovraespressione iniziale che si protrae nei primi stadi della regressione, quando lo stimolo apoptotico viene trasmesso a tutte le cellule tissutali, si riduca con l'avvicinarsi di un nuovo ciclo blastogenetico. Di conseguenza, tende a scendere anche AIF.

Saggi immunocitochimici con lo stesso anticorpo anti-BAX su colture emocitarie di colonie in regressione e negli stadi intermedi, hanno evidenziato un aumento di cellule positive durante il cambio di generazione. Tuttavia, nelle stesse condizioni sperimentali, anticorpi policlonali contro il recettore di morte Fas, il suo ligando FasL, la proteina adattatrice FADD e le caspasi 3 e 7 hanno mostrato percentuali di marcatura di gran lunga maggiori (Cima et al., 2010). La via estrinseca, caspasi dipendente, sembra, quindi, coinvolta nell'apoptosi della componente emocitaria. Probabilmente, l'accumulo di ROS prodotto dall'intensa fagocitosi negli stadi terminali della regressione, stimola questa modalità di apoptosi nella popolazione emocitaria, soprattutto nella frazione maggioritaria di macrofagi che hanno ingerito corpi apoptotici. Infatti, nell'ascidia

coloniale *P. misakiensis*, l'espressione dell'agente antiossidante SOD diminuisce sensibilmente negli zoidi senescenti (Kawamura *et al.*, 2012).

La funzione di BIRP-2 non è ancora stata determinata e non si sa se questo ortologo di Botrillo conserva l'attività antiapoptotica delle proteine BIRC di tipo I. Assumendo che BIRP-2 sia effettivamente un inibitore dell'apoptosi IAP, è comprensibile che il suo trascritto venga sottoespresso durante la regressione, piuttosto che negli stadi intermedi.

Nel cambio di generazione, si assiste ad un aumento dei fagociti macrofago-simili, la cui percentuale sale al 20% rispetto al 4% negli stadi intermedi (Cima *et al.*, 2010). Questa crescita di frequenza avviene verosimilmente poco prima della loro comparsa, attraverso la proliferazione di particolari cellule multipotenti che si differenziano in fagociti competenti. Quindi, il valore sottoespresso di PCNA può essere dovuto al fatto che la fagocitosi è ad un punto avanzato nello stadio della regressione analizzato. Comunque, considerando che i dati ottenuti si riferiscono alla colonia *in-toto*, sarebbe utile effettuare un'analisi Real-time PCR sugli emociti di colonie in regressione e negli stadi intermedi, per chiarire meglio l'andamento di espressione dei geni studiati.

### **Studio di espressione: ibridazione *in-situ***

L'ibridazione *in-situ* è stata realizzata su campioni di emociti da colonie in regressione e negli stadi intermedi. Le sonde antisense specifiche per PCNA, KI67 e Nanos hanno riconosciuto lo stesso tipo cellulare, l'emoblasto. Gli emoblasti sono cellule indifferenziate totipotenti, note come precursori di tutte le altre classi di emociti (Kawamura e Sunanaga, 2010). Queste cellule a carattere proliferativo mostrano un incremento di marcatura durante la regressione, proprio in corrispondenza del loro aumento di frequenza dimostrato precedentemente (vedi sopra) che permette il ricambio della popolazione emocitaria di cellule senescenti. L'espressione dei trascritti di PCNA e KI67 negli emoblasti è in linea con le evidenze indirette ottenute nell'analisi immunoisto- e citochimica con anticorpi policlonali specifici per queste due proteine (Voskoboynik *et al.*, 2008; Gasparini *et al.*, 2007; Cima e Ballarin, 2007). Il segnale positivo della sonda antisense di Nanos negli emoblasti, conferma che questo gene conserva un ruolo di controllo della staminalità anche in Botrillo. Nella specie *B. primigenus* l'mRNA di Nanos è espresso debolmente nelle cellule germinali primordiali ma in modo molto marcato nella linea germinale maschile, a livello di spermatogoni e spermatozoi. In particolare, si è visto che Nanos inibisce l'apoptosi delle cellule germinali maschili e mantiene in una condizione di staminalità le cellule germinali primordiali. Inoltre, pur non essendo coinvolto nella blastogenesi, risulta espresso nelle cellule epiteliali multipotenti della linea somatica, dalle quali si sviluppano tutti gli organi delle nuove generazioni. Infine, il trascritto di *B. primigenus* è fortemente espresso da cellule totipotenti circolanti, probabilmente gli emoblasti da cui derivano entrambe le linee cellulari staminali, germinali e somatiche (Sunanaga *et al.*, 2008).

La sonda antisense specifica per BAX ha marcato esclusivamente le cellule macrofago-simili, come osservato negli esperimenti di immunocitochimica (Cima *et al.*, 2010). La localizzazione di BAX in queste cellule supporta l'ipotesi che lo stress legato all'attività fagocitica induce la loro morte per apoptosi. In *Ciona*, la sintesi di BAX è stata analizzata solo a livello embrionale dove è coinvolto nella formazione del tubo neurale (Takada *et al.*, 2005).

La maggior parte degli agenti antiossidanti mostra fagociti positivi sia negli stadi intermedi che in regressione e cellule morulari positive solo in regressione. Probabilmente, i fagociti che rappresentano le cellule più soggette a stress ossidativo, sono costretti a produrre proteine antiossidanti in modo costante durante il ciclo blastogenetico. Le cellule morulari sono immunociti con attività citotossica che in certe condizioni possono generare ROS, come in regressione contro le cellule senescenti. Nello stesso tempo, è probabile che queste cellule si proteggano dall'alto tasso di molecole ossidanti, sintetizzando i principali antagonisti dei ROS.

### **Il ruolo degli immunociti di *B. schlosseri* durante il ciclo coloniale blastogenetico**

Gli immunociti di Botrillo sono rappresentati dagli amebociti ialini e le cellule macrofago-simili della linea fagocitica e dagli amebociti granulari e le cellule morulari della linea citotossica (Ballarin e Cima, 1995; Ballarin, 2008). I fagociti sono deputati all'eliminazione del non-self e all'efferocitosi. Nel ciclo blastogenetico, durante la regressione, la maggior parte delle cellule macrofago-simili che hanno ingerito il materiale apoptotico, risulta positivo all'Annessina V, alla reazione TUNEL e agli anticorpi policlonali umani anti-caspasi 3 e 7 e anti-FAS, suggerendo che le cellule macrofago-simili, dopo aver fagocitato, vanno incontro ad apoptosi e, di conseguenza, vengono a loro volta fagocitate (Cima *et al.*, 2010). Quest'ipotesi è confermata dai grossi fagociti che si osservano nel cambio di generazione, con i vacuoli contenenti cellule macrofago-simili positive alla TUNEL. Similmente, colture di emociti preincubate con lievito e successivamente con emociti della stessa colonia, hanno evidenziato la fagocitosi dei fagociti senescenti (Cima *et al.*, 2010). Inoltre, i fagociti sono immunopositivi nel nucleo all'anticorpo policlonale anti-NF- $\kappa$ B1 umano, quasi esclusivamente in colture emocitarie incubate con zymosan, nelle quali l'aggiunta di PDTC (pirrolidina ditiocarbammato), un inibitore indiretto di NF- $\kappa$ B1 che agisce da scavenger dei ROS responsabili della degradazione di I $\kappa$ B e dell'attivazione di NF- $\kappa$ B1, provoca un'inibizione massima di circa il 55% della fagocitosi (Franchi *et al.*, 2013). Il meccanismo che porta alla morte delle cellule macrofago-simili, in seguito a fagocitosi durante il cambio generazionale, sembra quindi causato dal forte stress ossidativo prodotto dal rilascio di ROS da parte della loro ossidasi di membrana. Infatti, saggi citochimici e spettrofotometrici mostrano un aumento significativo della concentrazione di perossidi nel plasma ricavato da colonie in regressione piuttosto che negli stadi intermedi e fluorescenza a livello citoplasmatico delle cellule macrofago-simili (Cima *et al.*, 2010). L'elevata produzione di ROS durante la fagocitosi, è stata dimostrata ancora una volta tramite incubazione della popolazione emocitaria con lievito, da cui si ottiene un aumento temporale nella sintesi di anione superossido, perossido di idrogeno, acido ipoclorito e di ossido nitrico (Ballarin, 2008). Pertanto, la presenza di fattori antiossidanti nei fagociti, come rilevato in ibridazione *in-situ* sia nelle fasi intermedie sia durante il cambio generazionale, costituisce una forma di protezione strettamente dipendente dallo stato redox dell'ambiente cellulare e dall'intensità dell'attività fagocitica. L'*in-situ* indica che anche le cellule morulari producono antiossidanti, soprattutto in regressione. Le cellule morulari hanno la funzione di percepire e riconoscere il non-self, attivandosi e degranulando, con il risultato di liberare il contenuto dei loro vacuoli, formato dagli enzimi perossidasi, arilsulfatasi e fenolossidasi (PO) (Ballarin e Cima, 2005). In risposta al non-self, la PO rilasciata converte substrati polifenolici in chinoni, producendo ROS e quindi citotossicità ed è coinvolta nel riconoscimento intraspecifico. In particolare, due colonie con un allele in comune nel locus genico di istocompatibilità, sono in grado di fondersi e diventare una chimera, mentre, in caso contrario, si respingono attraverso una reazione molto simile a quella infiammatoria dei vertebrati (Ballarin *et al.*, 2002; Ballarin, 2008). Nella repulsione, le cellule morulari si ammassano nelle ampolle e penetrano nella tunica a contatto con l'estremità dell'altra colonia, dove degranulano e l'attivazione della PO induce stress ossidativo con formazione finale di masse necrotiche di melanina (Ballarin *et al.*, 2002; Ballarin, 2008). La produzione di ROS è stata osservata in una condizione simile, incubando gli emociti di Botrillo con il plasma di una colonia incompatibile e viene abolita in presenza di inibitori della PO o di antiossidanti che prevengono la morte cellulare causata dal forte stress ossidativo (Ballarin *et al.*, 2002).

In presenza del non-self e nell'alloriconoscimento, le cellule morulari rilasciano anche molecole citochino-simili che stimolano l'attivazione e la degranolazione delle morulari stesse. Inoltre, promuovono la fagocitosi tramite il legame con recettori specifici sulla superficie delle cellule

macrofago-simili che vengono indotte a produrre lectine solubili. Tra queste, è stata recentemente caratterizzata una lectina legante ramnosio (BsRBL) con attività agglutinante che aumenta l'attività fagocitica e la sintesi di ROS nelle cellule macrofago-simili (Franchi *et al.*, 2011). Inoltre, ad elevate concentrazioni, induce le cellule morulari a liberare molecole citochino-simili e, con la loro degranolazione, PO e gli altri enzimi citotossici. Nel ciclo coloniale blastogenetico, BsRBL è maggiormente espressa durante la fase della regressione, nella quale è necessario eliminare le cellule senescenti mediante fagocitosi (Franchi *et al.*, 2011).

In conclusione, la presenza di agenti antiossidanti anche nelle cellule morulari, evidenziata nell'*in-situ*, appare indispensabile a scopo protettivo, soprattutto in virtù della loro funzionalità e delle relazioni con gli altri tipi cellulari.

## BIBLIOGRAFIA

- Abd Elmageed Z.Y., Naura A.S., Errami Y., Zerfaoui M.,** 2012. The poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): new roles in intracellular transport. *Cell Signal.* 24(1), 1-8.
- Abe Y., Ishikawa G., Satoh H., Azumi K., Yokosawa H.,** 1999. Primary structure and function of superoxide dismutase from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 122(3), 321-326.
- Alfadda A.A., Sallam R.M.,** 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 936486, 1-14.
- Aouacheria A., Brunet F., Gouy M.,** 2005. Phylogenomics of Life-Or-Death Switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators. *Mol. Biol. Evol.* 22(12), 2395-2416.
- Arnoult D., Tatischeff I., Estaquier J., Girard M., Sureau F., Tissier J.P., Grodet A., Dellinger M., Traincard F., Kahn A., Ameisen J.C., Petit P.X.,** 2001. On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death. *Mol. Biol. Cell.* 12(10), 3016-3030.
- Aves S.J., Liu Y., Richards T.A.,** 2012. Evolutionary diversification of eukaryotic DNA replication machinery. *Subcell. Biochem.* 62, 19-35.
- Ba X., Garg N.J.,** 2011. Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *Am. J. Pathol.* 178(3), 946-955.
- Baldwin A.S.,** 2012. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- $\kappa$ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol. Rev.* 246(1), 327-345.
- Ballarin L.,** 2008. Immunobiology of compound ascidians, with particular reference to *Botryllus schlosseri*: state of art. *Invertebr. Surv. J.* 5, 54-74.
- Ballarin L., Cima F.,** 2005. Cytochemical properties of *Botryllus schlosseri* haemocytes: indications for morpho-functional characterisation. *Eur. J. Histochem.* 49, 255-264.
- Ballarin L., Manni L.,** 2009. Stem cells in sexual and asexual reproduction of *Botryllus schlosseri* (Asciacea, Tunicata): an Overview. *Stem Cells in Marine Organisms.* 267-280.
- Ballarin L., Cima F., Sabbadin A.,** 1998. Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 479-492.
- Ballarin L., Cima F., Floreani M., Sabbadin A.,** 2002. Oxidative stress induces cytotoxicity during rejection reaction in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comp. Biochem Physiol.* 133C, 411-418.
- Ballarin L., Schiavon F., Manni L.,** 2010. Natural apoptosis during the blastogenetic cycle of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*: a morphological analysis. *Zool. Sci.* 27, 96-102.

- Ballarin L., Menin A., Tallandini L., Matozzo V., Burighel P., Basso G., Fortunato E., Cima F.,** 2008. Haemocytes and blastogenetic cycle in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*: a matter of life and death. *Cell Tissue Res.* 331, 555-564.
- Begun D.J., Whitley P.,** 2000. Adaptive evolution of relish, a *Drosophila* NF-kappaB/IkappaB protein. *Genetics.* 154(3), 1231-1238.
- Benzie I.F.F.,** 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39, 53-61.
- Berrill N.J.,** 1941a. The development of the bud in *Botryllus*. *Biol. Bull.* 80, 169-184.
- Berrill N.J.,** 1941b. Size and morphogenesis in the bud of *Botryllus*. *Biol. Bull.* 80, 185-193.
- Bravo R., MacDonald-Bravo H.,** 1987. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J.* 4, 655–661.
- Brigelius-Flohé R., Maiorino M.,** 2013. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (5), 3289-3303.
- Brown D.C., Gatter K.C.,** 2002. KI67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 40(1), 2-11.
- Brown T.R., Drummond M.L., Barelier S., Crutchfield A.S., Dinescu A., Slavens K.D., Cundari T.R., Anderson M.E.,** 2011. Aspartate 458 of human glutathione synthetase is important for cooperativity and active site structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 536-542.
- Burighel P., Cloney R.A.,** 1997. Urochordata: Ascidiacea. In: “Microscopic Anatomy of Invertebrates. Hemichordata, Chaetognatha, and the Invertebrate Chordates”. *Wiley-Liss* 15, 221-347.
- Burighel P., Schiavinato A.,** 1984. Degenerative regression of the digestive tract in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Pallas). *Cell. Tiss. Res.* 235, 309-318.
- Callaini G., Riparbelli M.G., Cintorino M., Tripodi S.A., Bianciardi G., Tosi P., Dallai R.,** 1994. The proliferating cell marker monoclonal antibody Ki-67 recognizes specific antigens associated with the nuclear envelope of the early *Drosophila* embryo. *Biol. Cell.* 81(1), 39-45.
- Cao L., Wang Z., Yang X., Xie L., Yu L.,** 2008. The evolution of BIR domain and its containing proteins. *FEBS Lett.* 582(27), 3817-3822.
- Celis J.E., Celis A.,** 1985. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 3262–3266.
- Cima F., Ballarin L.,** 2007. Undifferentiating cells in the blood of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*: a morpho-functional characterisation. *Invert. Surv. J.* 4, 29.

- Cima F., Ballarin L.,** 2009. Apoptosis and pattern of Bcl-2 and Bax expression in the alimentary tract during the colonial blastogenetic cycle of *Botryllus schlosseri* (Urochordata, Ascidiacea). *Ital. J. Zool.* 76, 28-42.
- Cima F., Sabbadin A., Ballarin L.,** 2004. Cellular aspects of allorecognition in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 881-889.
- Cima F., Manni L., Basso G., Fortunato E., Accordi B., Schiavon F., Ballarin L.,** 2010. Hovering between death and life: haemocytosis and natural apoptosis in the blastogenetic cycle of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 272-285.
- Citarelli M., Teotia S., Lamb R.S.,** 2010. Evolutionary history of the poly(ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. *BMC Evol. Biol.* 10, 308.
- Cregan S.P., Dawson V.L., Slack R.S.,** 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 23(16), 2785-2796.
- Daniel N.N.,** 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin. Cancer Res.* 13(24), 7254-7263.
- Davidson B., Smith Wallace S.E., Howsmon R.A., Swalla B.J.,** 2003. A morphological and genetic characterization of metamorphosis in the ascidian *Boltenia villosa*. *Dev. Genes Evol.* 213 (12), 601-611.
- Dinescu A., Anderson M.E., Cundari T.R.,** 2007. Catalytic loop motion in human glutathione synthetase: a molecular modeling approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 450-457.
- Eckelman B.P., Salvesen G.S., Scott F.L.,** 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *Embo Rep.* 7(10), 988-994.
- Endl E., Gerdes J.,** 2000. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exper. Cell Res.* 257, 231-237.
- Fawaz M.V., Topper M., Firestone S.M.,** 2011. The ATP-Grasp enzymes. *Bioorg. Chem.* 39(5-6), 185-191.
- Fitch W.M.,** 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Sys. Zool.* 20, 406-416.
- Forman H.G., Zhang H., Rinna A.,** 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 1-12.
- Franchi N., Schiavon F., Betti M., Canesi L., Ballarin L.,** 2013. Insight on signal transduction pathways involved in phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *J. Invertebr. Pathol.* 112(3), 260-266.

- Franklin C.C., Backos D.S., Mohar I., White C.C., Forman H.J., Kavanagh T.J., 2009.** Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 86-98.
- Fraser A.G., James C., Evan G.I., Hengartner M.O., 1999.** *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr. Biol.* 9(6), 292-301.
- Frizzo A., Guidolin L., Ballarin L., Baldan B., Sabbadin A., 2000.** Immunolocation of phenoloxidase in vacuoles of the compound ascidian *Botryllus schlosseri* morula cells. *Ital. J. Zool.* 67, 273-276.
- Fulda S., 2009.** Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia.* 23(3), 467-476.
- Galindo K.A., Lu W., Park J.H., Abrams J.M., 2009.** The Bax/Bak ortholog in *Drosophila*, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. *Development.* 136, 275-283.
- Ganesan S., Aggarwal K., Paquette N., Silverman N., 2011.** NF- $\kappa$ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 349, 25-60.
- Gasparini F., Longo F., Manni L., Burighel P., Zaniolo G., 2007.** Tubular sprouting as a mode of vascular formation in a colonial ascidian (Tunicata). *Dev. Dyn.* 236(3), 719-731.
- Gauthier M., Degnan B.M., 2008.** The transcription factor NF-kappaB in the demosponge *Amphimedon queenslandica*: insights on the evolutionary origin of the Rel homology domain. *Dev. Genes Evol.* 218(1), 23-32.
- Ghibelli L., Diederich M., 2010.** Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion.* 10(6), 604-613.
- Ghosh S., Hayden M.S., 2008.** New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (11), 837-848.
- Gilmore T.D., Wolenski F.S., 2012.** NF- $\kappa$ B: where did it come from and why? *Immunol. Rev.* 246 (1), 14-35.
- Greider C.W., 1998.** Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr. Biol.* 8(5), R178-R181.
- Halliwell B., 2006.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312-322.
- Hangen E., Blomgren K., Bénit P., Kroemer G., Modjtahedi N., 2010.** Life with or without AIF. *Trends Biochem. Sci.* 35(5), 278-287.
- Hashimoto H., Hara K., Hishiki A., Kawaguchi S., Shichijo N., Nakamura K., Unzai S., Tamaru Y., Shimizu T., Sato M., 2010.** Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO Rep.* 11(11), 848-853.

**Hayashi Y., Hayashi M., Kobayashi S.,** 2004. Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 10338-10342.

**Herbette S., Roeckel-Drevet P., Drevet J.R.,** 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* 274(9), 2163-2180.

**Huang X.D., Yin Z.X., Liao J.X., Wang P.H., Yang L.S., Ai H.S., Gu Z.H., Jia X.T., Weng S.P., Yu X.Q., He J.G.,** 2009. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue. *Fish Shellfish Immunol.* 27(2), 230-238.

**Jiang L., Liu Q., Ni J.,** 2010. In silico identification of the sea squirt selenoproteome. *BMC Genomics.* 11, 289.

**Jones G., Jones D., Zhou L., Steller H., Chu Y.,** 2000. Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275, 22157–22165.

**Joza N., Pospisilik A.J., Hangen E., Hanada T., Modjtahedi N., Penninger J.M., Kroemer G.,** 2009. AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1171, 2-11.

**Kaufmann S.H., Hengartner M.O.,** 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11(12), 526-534.

**Kawai N., Takahashi H., Nishida H., Yokosawa H.,** 2005. Regulation of NF-kappaB/Rel by IkappaB is essential for ascidian notochord formation. *Dev. Biol.* 277(1), 80-91.

**Kawai N., Shimada M., Kawahara H., Satoh N., Yokosawa H.,** 2003. Regulation of ascidian Rel by its alternative splice variant. *Eur. J. Biochem.* 270(22), 4459-4468.

**Kawamura K., Sunanaga T.,** 2010. Hemoblasts in colonial tunicates: are they stem cells or tissue-restricted progenitor cells? *Dev. Growth Differ.* 52(1), 69-76.

**Kawamura K., Tachibana M., Sunanaga T.,** 2008. Cell proliferation dynamics of somatic and germline tissues during zooidal life span in the colonial tunicate *Botryllus primigenus*. *Dev. Dyn.* 237(7), 1812-1825.

**Kawamura K., Kitamura S., Sekida S., Tsuda M., Sunanaga T.,** 2012. Molecular anatomy of tunicate senescence: reversible function of mitochondrial and nuclear genes associated with budding cycles. *Development.* 139(21), 4083-4093.

**Kazmirski S.L., Zhao Y., Bowman G.D., O'Donnell M., Kuriyan J.,** 2005. Out-of-plane motions in open sliding clamps: molecular dynamics simulations of eukaryotic and archaeal proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(39):13801-13806.

**Köhler T., Pröls F., Brand-Saberi B.,** 2005. PCNA in situ hybridization: a novel and reliable tool for detection of dynamic changes in proliferative activity. *Histochem. Cell Biol.* 123, 315-327.

- Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R., Gladyshev V.N., 2003.** Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 300, 1439-1443.
- Kucharczak J., Simmons M.J., Fan Y., Gélinas C., 2003.** To be, or not to be: NF- $\kappa$ B is the answer - role of Rel/NF- $\kappa$ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 22, 8961-8982.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004.** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinform.* 5, 150-163(14).
- Kushnareva Y., Andreyev A.Y., Kuwana T., Newmeyer D.D., 2012.** Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes. *PLoS Biol.* 10(9), e1001394.
- Laird D.J., Weissman I.L., 2004.** Telomerase maintained in self-renewing tissues during serial regeneration of the urochordate *Botryllus schlosseri*. *Dev. Biol.* 273(2), 185-194.
- Laird D.J., De Tomaso A.W., Weissman I.L., 2005.** Stem cells are units of natural selection in a colonial ascidian. *Cell*. 123(7), 1351-1360.
- Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S., 2012.** Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants. *Cell Mol. Life Sci.* 69(2), 175-189.
- Landis G.N., Tower J., 2005.** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Aging and Development*. 126, 365-379.
- Lasi M., Pauly B., Schmidt N., Cikala M., Stiening B., Käsbauer T., Zenner G., Popp T., Wagner A., Knapp R.T., Huber A.H., Grunert M., Söding J., David C.N., Böttger A., 2010.** The molecular cell death machinery in the simple cnidarian Hydra includes an expanded caspase family and pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Cell Res.* 20(7), 812-825.
- Lauzon R.J., Ishizuka K.J., Weissman I.L., 2002.** Cyclical generation and degeneration of organs in a colonial urochordate involves crosstalk between old and new: a model for development and regeneration. *Dev. Biol.* 249(2), 333-348.
- Lauzon R.J., Kidder S.J., Long P., 2007.** Suppression of programmed cell death regulates the cyclical degeneration of organs in a colonial urochordate. *Dev. Biol.* 301(1), 92-105.
- Lee E.F., Clarke O.B., Evangelista M., Fenga Z., Speed T.P., Tchoubrieva E.B., Strasser A., Kalinna B.H., Colman P.M., Fairlie D.W., 2011.** Discovery and molecular characterization of a Bcl-2-regulated cell death pathway in schistosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108(17), 6999-7003.
- Lehmann R., Nüsslein-Volhard C., 1991.** The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*. 112(3), 679-691.
- Leung A.Y.H., Leung J.C.K., Chan L.Y.Y, Ma E.S., Kwan T.T., Lai K.N., Meng A., Liang R., 2005.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a proliferative marker during embryonic and adult zebrafish hematopoiesis. *Histochem. Cell Biol.* 124(2), 105-111.

- Lu S.C.**, 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 42-59.
- Luthringer B., Isbert S., Müller W.E., Zilberberg C., Thakur N.L., Wörheide G., Stauber R.H., Kelve M., Wiens M.**, 2011. Poriferan survivin exhibits a conserved regulatory role in the interconnected pathways of cell cycle and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18(2), 201-213.
- Mace P.D., Shirley S., Day C.L.**, 2010. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ.* 17(1), 46-53.
- Manni L., Zaniolo G., Cima F., Burighel P., Ballarin L.**, 2007. *Botryllus schlosseri*: a model ascidian for the study of asexual reproduction. *Dev. Dyn.* 236, 335-352.
- Maury B., Martinand-Mari C., Chambon J.P., Soulé J., Degols G., Sahuquet A., Weill M., Berthomieu A., Fort P., Mangeat P., Baghdiguian S.**, 2006. Fertilization regulates apoptosis of *Ciona intestinalis* extra-embryonic cells through thyroxine (T4)-dependent NF-kappaB pathway activation during early embryonic development. *Dev. Biol.* 289(1), 152-165.
- McCord J.M.**, 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652-659.
- Milkman R.**, 1967. Genetic and developmental studies on *Botryllus schlosseri*. *Biol. Bull.* 132, 229-243
- Miller A.F.**, 2012. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters.* 586, 585-595.
- Miller D.J., Hemmrich G., Ball E.E., Hayward D.C., Khalturin K., Funayama N., Agata K., Bosch T.C.**, 2007. The innate immune repertoire in Cnidaria - ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biol.* 8(4), R59.
- Moldovan G.L., Pfander B., Jentsch S.**, 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 129(4), 665-679.
- Norberg E., Orrenius E., Zhivotovsky B.**, 2010. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396(1), 95-100.
- Oka H., Watanabe H.**, 1957. Vascular budding, a new type of budding in *Botryllus*. *Biol. Bull.* 112, 225-240.
- Olson G.E., Whitin J.C., Hill K.E., Winfrey V.P., Motley A.K., Austin L.M., Deal J., Cohen H.J., Burk R.F.**, 2010. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298, 1244-1253.
- Pancer Z., Rast J.P., Davidson E.H.**, 1999. Origins of immunity: transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes. *Immunogenetics.* 49(9), 773-786.

- Pereira S.G., Oakley F.,** 2008. Nuclear factor- $\kappa$ B1: regulation and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40(8), 1425-1430.
- Pfaffl M.W.,** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Polekhina G., Board P.G., Gali R.R., Rossjohn J., Parker M.W.,** 1999. Molecular basis for glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. *EMBO J.* 18(12), 3204-3213.
- Renault T.T., Manon S.,** 2011. Bax: addressed to kill. *Biochimie.* 93(9), 1379-1391.
- Rinkevich B., Shlemberg Z., Fishelson L.,** 1995. Whole-body protochordate regeneration from totipotent blood cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92, 7695-7699.
- Robertson A.J., Croce J., Carbonneau S., Voronina E., Miranda E., McClay D.R., Coffman J.A.,** 2006. The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 300(1), 321-334.
- Rzhetsky A., Nei M.,** 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 9, 945-967.
- Sabbadin A.,** 1955. Osservazioni sullo sviluppo, l'accrescimento e la riproduzione di *Botryllus schlosseri* (Pallas), in condizioni di laboratorio. *Boll. Zool.* 22, 243-265.
- Sabbadin A.,** 1956. Studio sperimentale della gemmazione in *Botryllus schlosseri* (Pallas) [Ascidacea]. *Rend. Accad. Naz. Lincei (Cl. Sci. FF.MM.NN.).* 20, 379-385.
- Sabbadin A.,** 1969. The compound ascidian *Botryllus schlosseri* in the field and in the laboratory. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 37(Suppl.), 62-72.
- Sabbadin A., Zaniolo G.,** 1979. Sexual differentiation and germ cell transfer in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *J. Exp. Zool.* 207, 289-304.
- Sabbadin A., Zaniolo G., Majone F.,** 1975. Determination of polarity and bilateral asymmetry in pallear and vascular buds on the ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Biol.* 46, 79-87.
- Saitou N., Nei M.,** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Saiwaki T., Kotera I., Sasaki M., Takagi M., Yoneda Y.,** 2005. In vivo dynamics and kinetics of pKi-67: transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase. *Exp. Cell Res.* 308 (1), 123-134.
- Schippers J.H., Nguyen H.M., Lu D., Schmidt R., Mueller-Roeber B.,** 2012. ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cell Mol. Life Sci.* 69(19), 3245-3257.
- Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M.H., Key G., Flad H.D., Gerdes J.,** 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein

with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 123(3), 513-522.

**Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G.,** 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(7): 517-528.

**Sevrioukova I.F.,** 2011. Apoptosis-Inducing Factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 14(12), 2545-2579.

**Shen R., Xie T.,** 2010. NANOS: a germline stem cell's guardian angel. *J. Mol. Cell Biol.* 2(2), 76-77.

**Shi Y.,** 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.* 9(3), 459-470.

**Siomek A.,** 2012. NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim. Pol.* 59(3), 323-331.

**Slavens K.D., Brown T.R., Barakat K.A., Cundari T.R., Anderson M.E.,** 2011. Valine 44 and valine 45 of human glutathione synthetase are key for subunit stability and negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 597-601.

**Smith D.J., Ng H., Kluck R.M., Nagley P.,** 2008. The mitochondrial gateway to cell death. *IUBMB Life.* 60(6), 383-389.

**Sneath P.H.A., Sokal R.R.,** 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. *Freeman W.H. & Co.*

**Starborg M., Gell K., Brundell E., Höög C.,** 1996. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 109, 143-153.

**Sullivan J.C., Kalaitzidis D., Gilmore T.D., Finnerty J.R.,** 2007. Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* 217(1), 63-72.

**Sunanaga T., Satoh M., Kawamura K.,** 2008. The role of Nanos homologue in gametogenesis and blastogenesis with special reference to male germ cell formation in the colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. *Dev. Biol.* 324(1), 31-40.

**Takada N., Yamaguchi H., Shida K., Terajima D., Satou Y., Kasuya A., Satoh N., Satake M., Wang H.G.,** 2005. The cell death machinery controlled by Bax and Bcl-XL is evolutionarily conserved in *Ciona intestinalis*. *Apoptosis.* 10(6), 1211-1220.

**Tang X., Nakata Y., Li H.O., Zhang M., Gao H., Fujita A., Sakatsume O., Ohta T., Yokoyama K.,** 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 22, 2857-2858.

- Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J.,** 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(3), 231-241.
- Terajima D., Shida K., Takada N., Kasuya A., Rokhsar D., Satoh N., Satake M., Wang H.G.,** 2003. Identification of candidate genes encoding the core components of the cell death machinery in the *Ciona intestinalis* genome. *Cell Death Differ.* 10(6), 749-753.
- Thompson C.B.,** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267(5203), 1456-1462
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.,** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680
- Thorburn A.,** 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* 16(2), 139-144.
- Voskoboynik A., Rinkevich B., Weiss A., Moiseeva E., Reznick A.Z.,** 2004. Macrophage involvement for successful degeneration of apoptotic organs in the colonial urochordate *Botryllus schlosseri*. *J. Exp. Biol.* 207, 2409-2416.
- Voskoboynik A., Soen Y., Rinkevich Y., Rosner A., Ueno H., Reshef R., Ishizuka K.J., Palmeri K.J., Moiseeva E., Rinkevich B., Weissman I.L.,** 2008. Identification of the endostyle as a stem cell niche in a colonial chordate. *Cell Stem Cell.* 3(4), 456-464.
- Walensky L.D., Gavathiotis E.,** 2011. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci.* 36(12), 642-652.
- Wang Z., Lin H.,** 2004. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science.* 303(5666), 2016-2019.
- Watanabe H.,** 1953. Studies on the regulation in fused colonies in *Botryllus primigenus* (Ascidiae Compositae). *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku B.* 7, 183-198.
- Wiens M., Krasko A., Müller C.I., Müller W.E.,** 2000. Molecular evolution of apoptotic pathways: cloning of key domains from sponges (Bcl-2 homology domains and death domains) and their phylogenetic relationships. *J. Mol. Evol.* 50(6), 520-531.
- Wiens M., Belikov S.I., Kaluzhnaya O.V., Schröder H.C., Hamer B., Perovic-Ottstadt S., Borejko A., Luthringer B., Müller I.M., Müller W.E.,** 2006. Axial (apical-basal) expression of pro-apoptotic and pro-survival genes in the lake baikal demosponge *Lubomirskia baicalensis*. *DNA Cell Biol.* 25(3), 152-164.
- Yagi K., Satou Y., Mazet F., Shimeld S.M., Degnan B., Rokhsar D., Levine M., Kohara Y., Satoh N.,** 2003. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. III. Genes for Fox, ETS, nuclear receptors and NFκB. *Dev. Genes Evol.* 213(5-6), 235-244.
- Yan B.,** 2011. Research progress on Livin protein: an inhibitor of apoptosis. *Mol. Cell Biochem.* 357(1-2), 39-45.

**Ye H., Cande C., Stephanou N.C., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., Kroemer G., Wu H., 2002.** DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9(9), 680-684.

**Yoon H.J., Carbon J., 1999.** Participation of Bir1p, a member of the inhibitor of apoptosis family, in yeast chromosome segregation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(23), 13208-13213.

**Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J., 2002.** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine.* 33(3), 337-349.

**Zhang G., Fang X., Guo X., Li L., Luo R., Xu F., Yang P., Zhang L., Wang X., Qi H., Xiong Z., Que H., Xie Y., Holland P.W., Paps J., Zhu Y., Wu F., Chen Y., Wang J., Peng C., Meng J., Yang L., Liu J., Wen B., Zhang N., Huang Z., Zhu Q., Feng Y., Mount A., Hedgecock D., Xu Z., Liu Y., Domazet-Lošo T., Du Y., Sun X., Zhang S., Liu B., Cheng P., Jiang X., Li J., Fan D., Wang W., Fu W., Wang T., Wang B., Zhang J., Peng Z., Li Y., Li N., Wang J., Chen M., He Y., Tan F., Song X., Zheng Q., Huang R., Yang H., Du X., Chen L., Yang M., Gaffney P.M., Wang S., Luo L., She Z., Ming Y., Huang W., Zhang S., Huang B., Zhang Y., Qu T., Ni P., Miao G., Wang J., Wang Q., Steinberg C.E., Wang H., Li N., Qian L., Zhang G., Li Y., Yang H., Liu X., Wang J., Yin Y., Wang J., 2012.** The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature.* 490(7418), 49-54.

**Zhang S.M., Coultas K.A., 2011.** Identification and characterization of five transcription factors that are associated with evolutionarily conserved immune signaling pathways in the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Mol. Immunol.* 48(15-16), 1868-1881.