

**Università degli Studi della Calabria**

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

CICLO XXIII

Settore disciplinare BIO/09

**Identificazione di Ci-Numb come marcatore  
dell'ematopoiesi di *Ciona intestinalis***

Dott. Nicola Antonino Russo

TUTOR

Dott.ssa Rosaria De Santis

COORDINATORE

Prof.ssa Maria Carmela Cerra

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

**Il progetto del Dottorato è stato svolto presso:**



**Laboratory of Animal  
Physiology and Evolution**

## Abstract

In Metazoa the maintenance of individuality and the defense against pathogens is devolved to the molecular mechanisms of the innate immunity. Adaptive immunity complements innate immunity in gnathostome vertebrates, thus indicating an increase of specialization of the defense mechanisms in the course of evolution. The Urochordate *Ciona intestinalis*, as the other invertebrates, does not have a gnathostome-type adaptive immune system, but, for its phylogenetic position, represents an excellent model for a comparative study of the elements and of the possible evolutionary pathways that led to the assembly of the adaptive system.

As in other organisms, also in *Ciona* the blood cells have fundamental roles in immune defense, such as phagocytosis, encapsulation and release of substances with pro-inflammatory activity and in this context the understanding of their nature and function is fundamental. Despite the data collected in the last decades, many issues about blood cells in *Ciona*, as in other tunicates, remain still open. In particular, essential information about their embryonic and adult origin, their differentiation and even their precise classification, is still scanty, thus leaving the problem of blood cells genesis and homeostasis, also during immune reaction, unsolved. The project is aimed to the study of genes directly involved in hemocyte differentiation that may represent possible markers for the identification of hematopoietic sites. To this aim, genes that are involved in hematopoiesis in other organisms, such as *Bmi*, *Ikaros*, *PU.1*, *Numb* and *GATA-a* have been identified, sequenced, and characterized using PCR, *in situ* hybridization and immunochemistry during the post metamorphic stages and in the adult tissues of *C. intestinalis*. Among these genes the *C. intestinalis* homolog of the *Numb* gene, involved in asymmetric cell division in mammals, has been identified as a

possible marker for the study of hematopoiesis. The study of *Ci-Numb* provides preliminary information that helps in the understanding of hematopoietic processes of both the post-metamorphic and adult animal, and points out some previously undescribed aspects of the pharynx structure. In fact, the expression data produced at post-metamorphic stages and in the adult indicate that both the *Ci-Numb* transcripts and the protein are present in discrete regions of the animal body. These overlap with sites of proliferative activity and, more interestingly, with some of the regions previously indicated as hematopoietic. The morphological study at ultrastructural level of the tissues expressing *Ci-Numb*, in the juvenile as also in the adult, has allowed a more detailed characterization of the cell types that populate the hematopoietic sites. Morphological analysis of the structures of the adult pharynx, and of the stigmata in particular, show that the hematopoietic areas, described as compact groups of cells adjacent to the pharynx epithelium, correspond to the some cells that form the structure of the stigmas. This leads to a reassessment of the data that refer to the hematopoietic sites as “nodules” in the body wall adjacent to the muscle. The electron microscopy observations carried out in the juveniles demonstrate for the first time the genesis of the stigma.

In conclusion, *Ci-Numb* can be considered a good marker of early hematopoiesis and may represent a baseline for further observations.

## INDICE

<b>Abstract</b>	pag. 3
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 8
Il sistema immunitario	pag. 9
Il sistema immunitario delle Ascidie	pag. 12
Ematopoiesi	pag. 14
Il modello sperimentale: <i>Ciona intestinalis</i>	pag. 20
Tessuti e organi coinvolti nell'ematopoiesi	pag. 27
Il faringe	pag. 27
Lo stomaco delle Ascidie	pag. 30
Gli emociti delle Ascidie	pag. 33
Geni regolatori dell'ematopoiesi analizzati	pag. 37
Numb	pag. 40
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	pag.46
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 52
Prelievo emociti	pag. 53
“Western Blot”	pag. 53
Immunoistochimica su sezioni	pag. 55
Amplificazione mediante PCR	pag. 56
Protocollo per la preparazione di tessuti e di juvenile per la microscopia elettronica	pag. 57
“Immunogold”	pag. 58

Trascrizione <i>in vitro</i>	pag. 60
Quantizzazione ribosonde	pag. 61
Ibridazione <i>in situ</i> su sezioni	pag. 63
Ibridazione <i>in situ</i> in “Whole mount”	pag. 65
<b>RISULTATI</b>	pag. 68
Ricerca di geni omologhi in <i>C.intestinalis</i> mediante PCR	pag. 69
Reazioni di ibridazione <i>in situ</i> in “Whole mount” per <i>Ci-GATA-a</i> su larve.	pag. 71
Immunoistochimica anti-PCNA su sezioni	pag. 72
Reazioni di ibridazione <i>in situ</i> per <i>Ci-Numb</i> su sezioni	pag. 77
Western Blot per l’espressione di <i>Ci-Numb</i>	pag. 81
Immunoistochimica anti- <i>Ci-Numb</i> su sezioni	pag. 82
Analisi morfologica di regioni del faringe e immunogold anti-PCNA e anti- <i>Ci-Numb</i>	pag. 86
Reazioni di ibridazione <i>in situ</i> per <i>Ci-Numb</i> su sangue circolante	pag.91
Reazioni di ibridazione <i>in situ</i> in “Whole mount” per <i>Ci-Numb</i> su “juvenile”	pag. 92
Analisi morfologica di regioni del faringe e immunogold anti- <i>Ci-Numb</i> su sezioni di “juvenile” corrispondenti allo stadio 8	pag.95
<b>DISCUSSIONE</b>	pag.98
<b>TABELLA SOLUZIONI</b>	pag. 105

**ABBREVIAZIONI**

pag. 110

**BIBLIOGRAFIA**

pag.112

## **INTRODUZIONE**

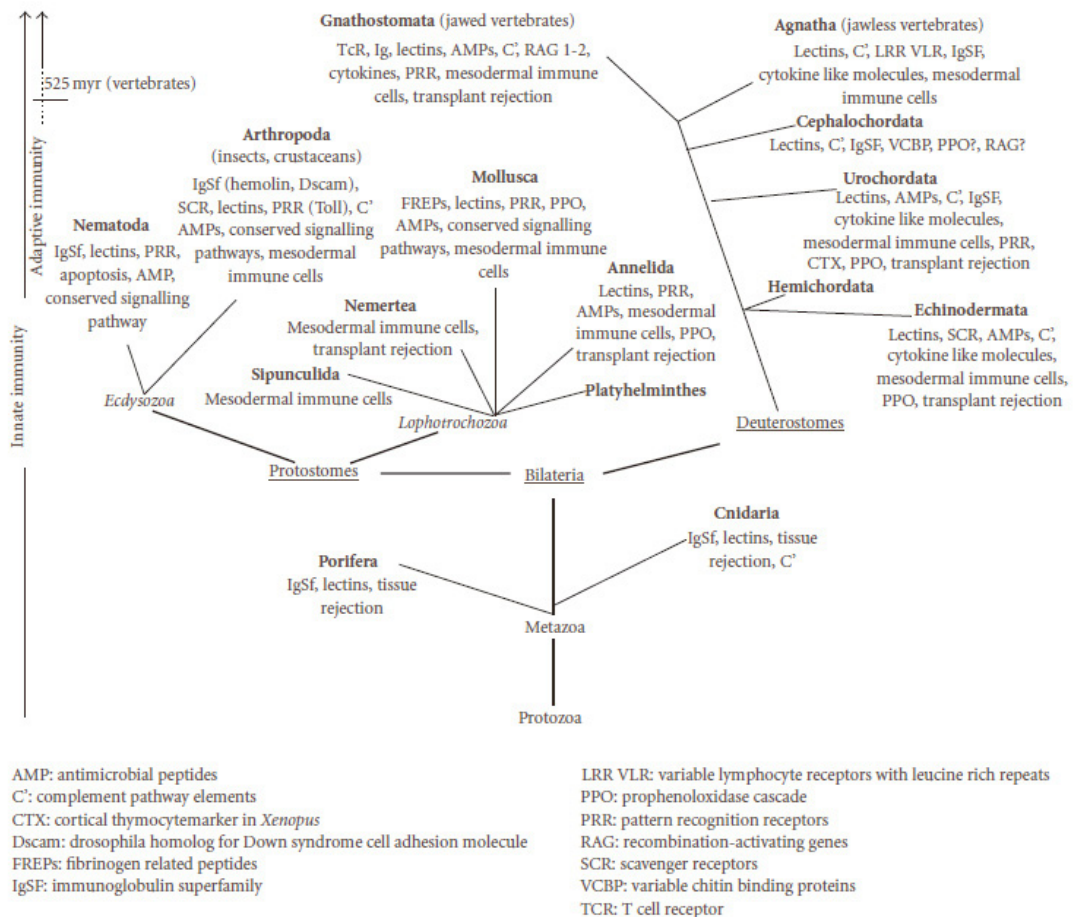


## **Il sistema immunitario**

In tutti gli organismi il mantenimento dell'individualità e la difesa contro i patogeni sono delegati alle molecole ed ai meccanismi dell'immunità. Questi raggiungono i più alti livelli di complessità nei vertebrati, sia per le strutture dei recettori, sia per le interazioni stabilite dalle cellule coinvolte. In organismi a diversi livelli della filogenesi l'analisi dell'immunità rende evidente non solo come questa funzione fondamentale si espliciti in modo differenziato, ma, più importante, come molecole, meccanismi e cellule effettrici si siano evoluti e specializzati. Uno dei paradigmi fondamentali dell'immunità prevede la costante presenza, sia nei vertebrati che negli invertebrati, dell'immunità innata, e dell'immunità adattativa, ristretta ai soli vertebrati mandibolati (Fig. 1). L'immunità innata utilizza i recettori di riconoscimento di pattern (PAMP) per riconoscere strutture molecolari associate a individui estranei, quali i patogeni, da quelle proprie dell'ospite. Geni presenti nella linea germinale regolano i meccanismi di questa complessa macchina che comporta fasi di riconoscimento da parte delle cellule deputate, attraverso la produzione di lectine e di peptidi ad attività antimicrobica, l'induzione dell'opsonizzazione, la fagocitosi, l'attivazione dei "pathway" infiammatori, dell'apoptosi e l'attivazione del sistema del complemento (Medzhitov, 1997).

L'immunità adattativa, è basata su recettori di superficie generati per riarrangiamento somatico, capaci di riconoscere la più ampia gamma di antigeni. Con la simultanea comparsa durante l'evoluzione degli anticorpi (Ig), dei recettori dei linfociti T (TCR), delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e dei prodotti dei geni della ricombinazione RAG1 e RAG2, l'immunità adattativa ha raggiunto una straordinaria specificità per le diverse macromolecole e la capacità di

"ricordare" (memoria immune), ossia di rispondere in maniera sempre più efficiente in occasione di ripetute esposizioni ad uno stesso agente infettivo (Pancer et al., 2004; Litman et al., 2005).



**Figura 1.** Albero filogenetico del regno animale con in evidenza l'evoluzione dei principali elementi del sistema immunitario. Le due frecce sul lato sinistro della figura indicano la possibile comparsa di due sistemi immunitari: immunità innata e immunità adattativa. L'immunità innata si può osservare nell'intero regno animale. L'immunità adattativa apparve solo nei vertebrati mandibolati. (Da Kvell et al., 2007)

Nonostante le loro sostanziali differenze, i due tipi di risposta immune costituiscono un sistema integrato, in cui cellule e molecole diverse funzionano in maniera cooperativa. Prove sperimentali comprovanti questa integratività hanno fatto sì

che sempre più si andasse assottigliando il netto confine tracciato in passato tra immunità innata e acquisita. L'analisi dell'immunità innata in vari organismi invertebrati a livelli diversi della filogenesi, e nei vertebrati agnati, ha rivelato infatti la presenza di sistemi alternativi di risposta immune capaci di accrescerne la plasticità. Quindi, la capacità di sopperire all'assenza dell'immunità adattativa degli invertebrati relegherebbe questa al ruolo di una vantaggiosa alternativa all'uso della sola immunità innata.

Un ulteriore e fondamentale elemento unificante di questi due sistemi, pur così diversi anche nell'ambito degli stessi *phyla*, è costituito dalla natura degli agenti effettori che si individuano nelle cellule e nei fluidi circolanti che popolano emolinfa e sangue. Questi sono rappresentati da linfociti con le immunoglobuline ed i recettori delle cellule T per l'immunità adattativa, o dalle cellule ad attività fagocitica (neutrofili, macrofagi) e quelle ad attività citotossica naturale (natural killer-NK) dei vertebrati mandibolati, o dalle cellule dell'emolinfa degli invertebrati, spesso assimilate ai linfociti. Anche attraverso lo studio di tali cellule che è possibile tracciare l'evoluzione dell'immunità. A tale scopo si rende sempre più indispensabile ampliare le conoscenze in un campo pressoché inesplorato, quale quello della natura e delle funzioni degli emociti degli invertebrati.

## **Il sistema immunitario nelle Ascidie**

Un confronto tra il genoma dei vertebrati e quello dei protocordati, che si collocano filogeneticamente alla base dei vertebrati, è di particolare interesse per lo studio dell'immunità e della sua evoluzione. Infatti, l'analisi del genoma dell'Urocordato *Ciona intestinalis* (Dehal et al., 2002) ha fornito un quadro completo dei geni coinvolti nell'immunità, rivelando l'assenza dei geni fondamentali dell'immunità adattativa, come i geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I e II, dei recettori delle cellule T, o dei dimeri delle immunoglobuline, come anche dei geni RAG responsabili della ricombinazione somatica (Marchalonis et al., 2006; Litman et al., 2005).

In *C. intestinalis*, come anche nell'anfiosso, protocordato cefalocordato, sono invece presenti regioni omologhe a quelle contenenti i geni I e II dell'MHC (Azumi et al., 2003) e geni codificanti per proteine caratterizzate dalla presenza di domini Ig di tipo V e un dominio chitinico. Ad ora questi sono stati studiati nell'anfiosso, rivelando caratteristiche strutturali e siti di espressione che potrebbero ascrivere loro al ruolo di effettori di una immunità adattativa alternativa (Zhang et al., 2008).

Complessivamente questi dati indicano in modo inequivocabile che l'origine dell'immunità adattativa può essere fatta risalire all'intervallo tra la nascita degli urocordati e dei vertebrati agnati (Azumi et al., 2003).

Nel genoma di *Ciona* sono presenti molti dei geni dell'immunità innata, tra cui alcuni dei geni codificanti le proteine coinvolte nel sistema del complemento, i recettori "Toll-like" e le proteine implicate nella trasduzione del segnale intracellulare, alcuni marcatori delle cellule NK (Arizza and Parrinello, 2009). L'attività di questi geni è stata provata in *C. intestinalis* grazie alla presenza sistemi sperimentali e di informazioni

sulle reazioni infiammatorie inducibili che avvengono a livello della parete del corpo dell'animale. Questo ha reso la *Ciona* un modello di elezione anche per lo studio dell'evoluzione dell'immunità innata. Iniettando, infatti, materiale solubile o particolato nella parete del corpo dell'animale si innescano risposte infiammatorie, quali l'incapsulamento (Parrinello et al., 1990). Queste reazioni sono visibili al di sotto della tunica trasparente e si traducono, a livello microscopico, in un aumento del numero degli emociti presenti all'interno della matrice della tunica. Studi condotti in proposito indicano che gli emociti si infiltrano attraverso l'epidermide fino a raggiungere la tunica, (Di Bella and De Leo, 2000) e che solo alcuni dei tipi cellulari presenti nell'emolinfa partecipano al processo di infiammazione.

L'osservazione che gli emociti aumentano sensibilmente nelle aree interessate all'infiammazione (Parrinello et al., 1984) lascia aperto il problema del loro reclutamento, dell'eventuale stimolazione dell'ematopoiesi nei siti deputati a tale funzione, non ancora incontrovertibilmente identificati nelle ascidie, e dei meccanismi molecolari alla base di tali fenomeni. Tuttavia, l'immunità innata mediata dagli emociti delle Ascidie, è oggetto di numerosi studi in quanto consente l'analisi delle risposte immunitarie in assenza dell'immunità adattativa.

## **Ematopoiesi**

Nei vertebrati il sangue è un tessuto connettivo formato da elementi cellulari (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine) che sono sospesi in un fluido, il plasma. Le sue componenti cellulari svolgono funzioni molto diverse che vanno dal trasporto dell'ossigeno alla produzione di anticorpi e, mentre alcune di esse esauriscono il loro compito per intero all'interno del sistema vascolare, altre lo utilizzano solo come mezzo di trasporto per spostarsi fra i vari tessuti. Le cellule del sangue condividono, tuttavia, una serie di caratteristiche comuni. Prima di tutto esse sono incapaci di auto-rinnovarsi e possiedono, fatta eccezione per i linfociti, una durata di vita piuttosto limitata. Infatti, in seguito a traumi, malattie, condizioni di stress, oppure semplicemente in relazione al "turn-over" fisiologico, queste cellule vanno incontro a morte e devono essere, pertanto, continuamente rinnovate. La loro produzione è regolata in modo tale da mantenere il numero di cellule differenziate nel sangue relativamente costante.

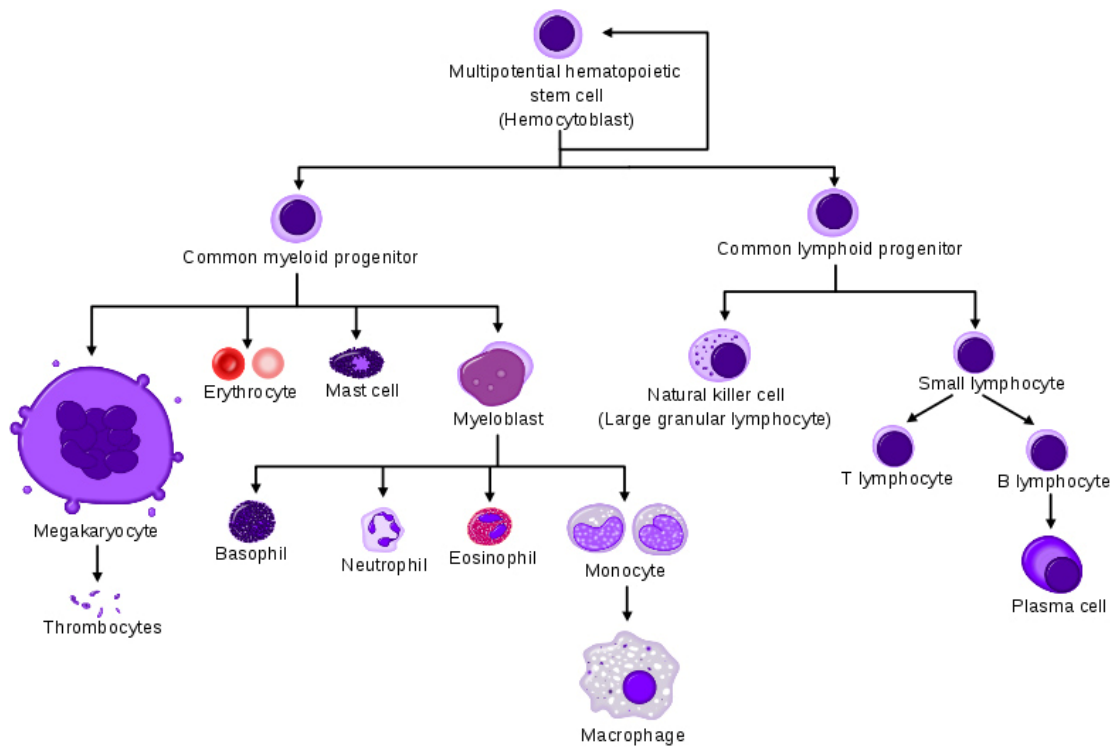
L'ematopoiesi è, quindi, il processo responsabile della loro produzione e garante della loro omeostasi. All'apice di tale processo risiedono le cellule staminali ematopoietiche ("Hematopoietic Stem Cells", HSCs), capaci di auto-rinnovamento e differenziamento. Le prime evidenze sperimentali dell'esistenza delle HSCs sono state fornite nel 1961 da Till e McCulloch che definirono una popolazione di cellule ematopoietiche dotate di capacità clonogeniche e in grado di ripopolare la milza di topi irradiati in risposta al microambiente; inoltre, queste cellule in alcuni casi producevano cloni che se trasferiti in ospiti secondari provvedevano alla ricostituzione di tutti le linee cellulari (Passegue et al., 2003).

L'intero e complesso programma di maturazione, che dalle cellule staminali dà origine alle cellule mature del sangue, avviene attraverso divisioni successive durante le

quali le HSCs perdono progressivamente le loro proprietà e danno vita ad una progenie di precursori sempre più limitati nel loro potenziale differenziativo. Dalle cellule staminali si originano il precursore comune di tipo linfoide (“Common Lymphoid Progenitor”), in grado di generare esclusivamente cellule B, T e NK, e il precursore comune di tipo mieloide (“Common Myeloid Progenitor”), progenitore delle linee mielo-eritroidi (Weissmann, 2000) (Fig. 2). E’ stato proposto che l’intero potenziale linfo-mieloide delle “long-term” HSCs si realizzi tramite le “short-term” HSCs e i progenitori multipotenti, sebbene essi siano dotati di ridotte capacità di autorinnovamento (Reya et al., 2001).

Durante l'embriogenesi l’ematopoiesi avviene con meccanismi e in siti diversi da quelli dell’adulto. Nei mammiferi il primo sito di ematopoiesi visibile è localizzato nel sacco vitellino, dove sono generate cellule con le caratteristiche multipotenti ematopoietiche delle HSCs. Le HSCs partendo dal mesoderma ventrale migrano attraverso l’aorta dorsale per colonizzare prima il sacco amniotico e, successivamente, il fegato e il midollo osseo (Orkin, 1995).

Il processo ematopoietico avviene in fasi successive, in cui gli emociti e/o i loro precursori si vengono a formare con meccanismi e in territori che variano molto, non solo tra gli animali appartenenti a diversi *phyla*, ma anche all'interno della stessa specie durante il ciclo vitale. Alcuni tra i modelli sperimentali più utilizzati per lo studio di processi omeostatici come l’ematopoiesi sono *Zebrafish* e *Drosophila* .



**Figura 2.** Ematopoiesi. Le HSCs danno origine al precursore comune di tipo linfoide (“Common Lymphoid Progenitor”, CLP), in grado di generare esclusivamente cellule B, T e NK (“Natural Killer”), e al precursore comune di tipo mieloide (“Common Myeloid Progenitor”, CMP), progenitore delle linee mielo-eritroidi. (Da <http://www.dentalarticles.com/images/hematopoiesis.png>)

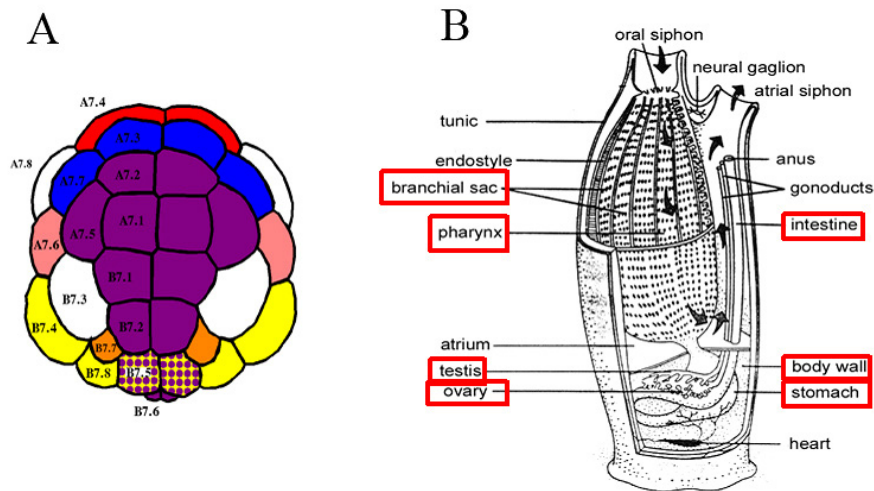
In *Zebrafish* l’ematopoiesi primitiva si verifica in una regione embrionale nota come massa cellulare intermedia (ICM), un gruppo di cellule che derivano dal mesoderma laterale, e che danno origine prevalentemente a eritrociti e alcune cellule mieloidi. L’ematopoiesi definitiva avviene nella parete dell’aorta e nel mesoderma intermedio, dove vengono prodotti tutti i tipi di cellule ematopoietiche durante la vita dell'animale (Hartenstein, 2006).

In *Drosophila* i progenitori degli emociti vengono generati durante due fasi dello sviluppo da popolazioni cellulari diverse del mesoderma. L'embrione e la larva sono popolati da emociti che si originano, poco dopo la gastrulazione, dal mesoderma della testa. Da questa regione si diffondono rapidamente per tutto l'embrione e la maggior



parte di esse si differenzia in plasmociti con attività fagocitica che partecipano al rimodellamento e alla rimozione dei tessuti e delle strutture della larva. Nell'animale adulto l'organo ematopoietico è la ghiandola linfatica, formata da cellule progenitrici che nascono dal mesoderma laterale del tronco (Wood and Jacinto, 2007). Questi meccanismi di formazione degli ematociti sia nell'embrione che nell'adulto presentano diverse analogie con l'ematopoiesi nei vertebrati.

In *C. intestinalis* non esiste una precisa e definitiva nomenclatura e classificazione dei tipi cellulari presenti nel sangue. Tuttavia, negli ultimi anni sono emerse più stringenti evidenze, a livello molecolare e funzionale (Du Pasquier et al. 2004; Pinto et al. 2003; Zucchetti et al. 2008), dell'affinità delle cellule del sangue di *C. intestinalis*, come anche di altri organismi, con gli emociti dei vertebrati. Inoltre, esistono poche e frammentarie informazioni circa l'origine ed il differenziamento degli emociti, sia nell'embrione che nell'adulto, e della loro omeostasi. Per quanto riguarda l'origine embrionale in *C. intestinalis*, le "trunk lateral cells" sono state individuate nello stadio di 64 cellule come la linea cellulare da cui si originano gli emociti (Millar, 1953) (Fig. 3 A). Nell'adulto esistono solo tre ipotetici siti ematopoietici descritti da un lavoro di Ermak del 1976 e localizzati nel tessuto connettivo intorno al canale alimentare; nelle barre trasversali del cestello branchiale dove le cellule ematopoietiche sono organizzate in piccoli gruppi adiacenti all'epitelio della faringe; in piccoli noduli nella parete del corpo intorno alle gonadi e allo stomaco (Wright, 1981) (Fig. 3 B).



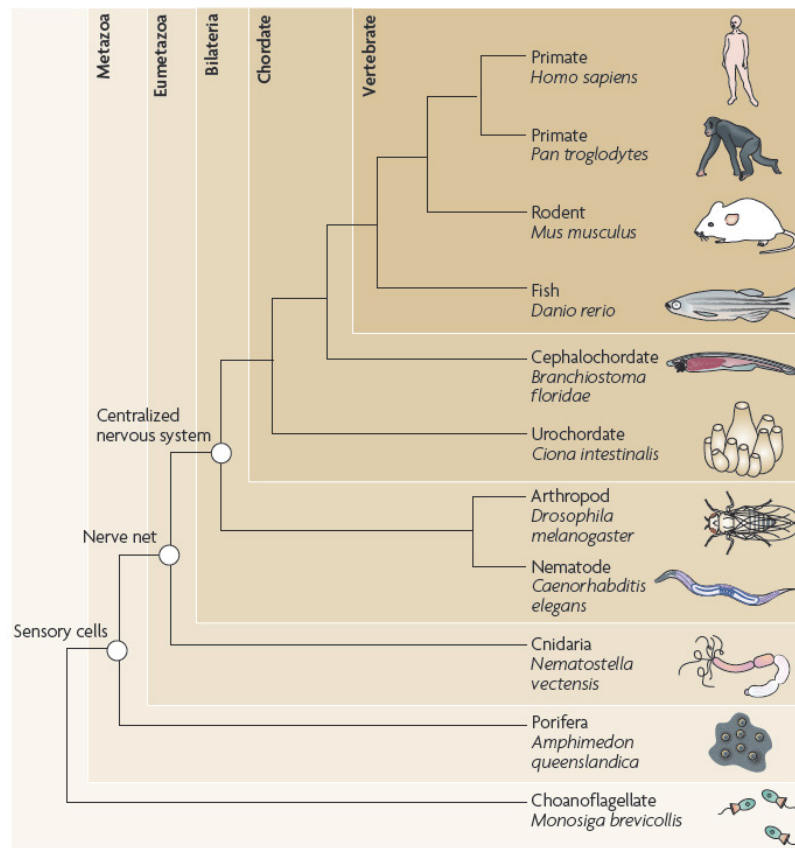
**Figura 3.** Ematopoiesi in *C. intestinalis*. (A) Schema dello stadio embrionale di 64 cellule con in rosa le “trunk lateral cells”, la linea cellulare da cui si originano le cellule del sangue. (B) Organi e i tessuti ematopoietici, indicati in rosso nello schema dell’anatomia dell’adulto di *C. intestinalis*.

In tutti gli organismi, l’intero processo dell’ematopoiesi è sottoposto ad uno stringente controllo, esercitato da segnali provenienti dalle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, innescati da specifici fattori di crescita e citochine o dovuti a modulatori intrinseci dello sviluppo ematopoietico. L’azione concertata dei molteplici stimoli sfocia nell’attivazione di specifiche cascate di trasduzione del segnale che, da ultimo, convergono a livello di espressione genica, dove modulatori positivi e negativi della trascrizione interagiscono per delineare il pattern di espressione, responsabile delle caratteristiche fenotipiche e funzionali delle singole filiere ematopoietiche. Per questa loro capacità di integrare i vari segnali e regolare di conseguenza l’apparato trascrizionale, i fattori di trascrizione (TFs) rappresentano un punto nodale nel controllo dell’ematopoiesi ed eventuali aberrazioni di tale stato di funzionamento sono alla base di molte malattie tra cui leucemie e linfomi (Tenen et al., 1997). Oltre l’80% di tutti i fattori di trascrizione e delle proteine ad essi associate sono

caratterizzati da motivi *zinc-finger*, *helix-turn-helix*, *helix-loop-helix*, *leucine zipper* o *winged-helix* (van Oostveen et al., 1999). Tra loro si annoverano la famiglia di fattori di trascrizione GATA, la famiglia di proteine codificate dai geni contenenti *omeobox*, composta dalle proteine Hox e non-Hox, la famiglia delle proteine C/EBP, proteine codificate da singoli geni come *Bmi*, *Numb*, *Ikaros*, *PU.1*, la famiglia delle proteine ETS, il complesso di proteine del “core binding factor” (CBF), c-myb, Oct-2, e la proteina Scl (Orkin, 1996; Tenen et al., 1997).

## Il modello sperimentale: *Ciona Intestinalis*

Il *phylum* dei Cordati comprende organismi molto diversi tra loro, che si trovano in ambienti acquatici e terrestri. Le caratteristiche anatomiche comuni a tutti i Cordati sono una struttura assile di sostegno, la notocorda, fiancheggiata da muscoli, un cordone nervoso cavo dorsale ad essa, fessure branchiali faringee ed un tubo digerente ventrale. Il *phylum* è suddiviso in tre *subphyla*: Urocordati (o Tunicati), Cefalocordati (o Acranii) e Vertebrati (o Cranioti) (Fig. 4).



**Figura 4.** Albero filogenetico dei Metazoi. (Modificato da Kosik, 2009)

Tra questi gli urocordati erano considerati i più antichi, ed i cefalocordati i più prossimi ai vertebrati (Rowe, 2004). Tuttavia, recenti studi di filogenesi molecolare pongono gli

urocordati, e non i cefalocordati, alla base dei vertebrati (Delsuc et al., 2006; Vienne and Pontarotti, 2006). Il *subphylum* degli Urocordati, che comprende animali esclusivamente marini, è a sua volta suddiviso in tre classi: Ascidiacei, Taliacei e Larvacei.

Le due classi dei Taliacei e Larvacei sono costituite rispettivamente da animali liberamente natanti e planctonici, mentre la classe degli Ascidiacei, la più numerosa e diversificata, è costituita da animali sessili e filtratori, solitari o coloniali. Ad essa appartiene la specie *C. intestinalis*, il modello sperimentale utilizzato nei nostri studi (Fig. 5).



**Figura 5.** *Ciona intestinalis*. Animali adulti.

La classificazione degli Ascidiacei è rimasta a lungo incerta per le caratteristiche morfologiche dell'organismo adulto, in virtù del quale le Ascidie furono inizialmente considerate invertebrati Protostomi e per la mancata correlazione tra adulto e larva. Caratteristiche anatomiche analoghe tra la larva delle Ascidie e quella dei Vertebrati,

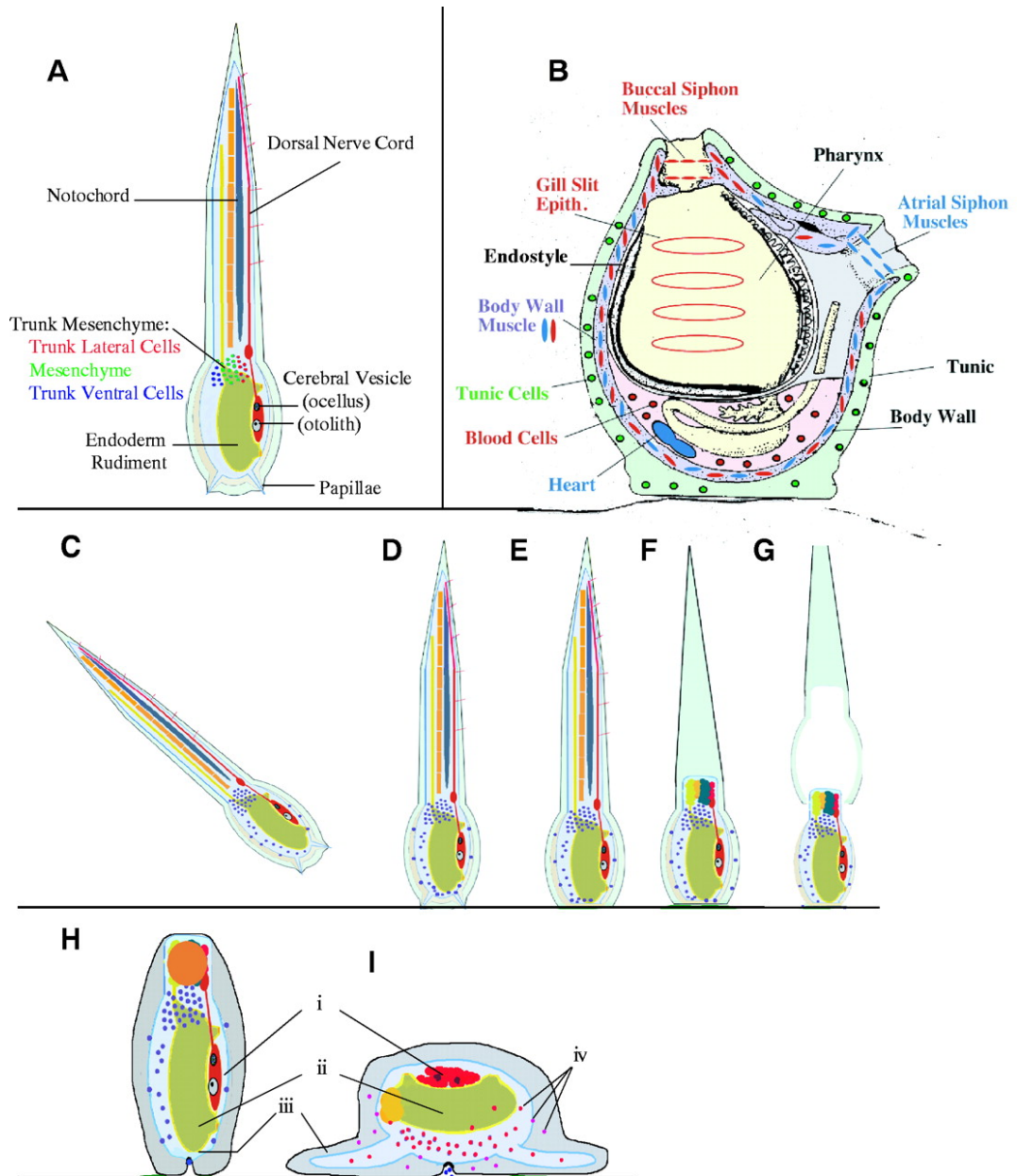
quali la presenza della notocorda e del tubo neurale, furono evidenziate per la prima volta dall'embriologo Alexander Kowalevsky nel 1866.

Le Ascidie rappresentano un buon sistema modello per lo studio dello sviluppo dei Cordati. In primo luogo, l'embrione della *C. intestinalis* si sviluppa rapidamente, con la larva che completa il suo sviluppo in diciotto ore ad una temperatura di 18°C (Whittaker, 1977), è facile da manipolare e trasparente, permettendo osservazioni dirette dei tessuti, senza bisogno di sezionamento. Inoltre, lo sviluppo embrionale è facile da osservare e vi sono informazioni complete sul "lineage" cellulare dei tessuti e degli organi più importanti (Conklin, 1905; Ortolani, 1971; Nishida, 1987). Un'altra importante caratteristica è fornita dalle piccole dimensioni del genoma della *C. intestinalis* costituito da sole 155 MB codificanti per circa 16000 geni, approssimativamente la metà di quelli presenti nel genoma umano. L'intero sequenziamento del genoma è disponibile attraverso il sito Web di JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html>), fornendo una risorsa che accelera notevolmente l'identificazione di geni omologhi che sono interesse di studio in altri organismi. Oltre al sequenziamento del genoma, è stato realizzato un progetto su larga scala "expressed sequence tag" (EST), con conseguente caratterizzazione di 18000 cloni di cDNA indipendenti, che rappresentano circa l'85% dei trascritti di *C. intestinalis* (Satou et al., 2002; Satoh et al., 2003). I risultati di questa indagine EST sono disponibili attraverso il sito web dell'Università di Kyoto (<Http://ghost.zool.kyotou.ac.jp/indexr1.html>).

Come tutte le Ascidie solitarie, la *C. intestinalis* si riproduce esclusivamente per via sessuale ed essendo un'ermafrodita sviluppa sia ovario che testicolo. La fecondazione è di tipo esterno in quanto i gameti vengono rilasciati nell'ambiente marino. Le uova presentano un tipico sviluppo a mosaico, caso unico tra i

Deuterostomi. La determinazione embrionale precoce, osservata Chabry nel 1887, fu studiata in dettaglio da Conklin nel 1905 e descritta in uno studio sull'organizzazione e sviluppo dell'uovo delle ascidie nel quale è riportata la mappa dei destini di singole cellule fino allo stadio di 110 blastomeri.

Durante lo sviluppo l'embrione di *Ascidia* va incontro a gastrulazione e neurulazione, che risultano, tra l'altro, nella formazione della notocorda e del tubo neurale che si prolungano nella coda della larva. A circa diciotto ore dalla fecondazione questa si libera dell'involucro vitellino entro il quale si è sviluppata, e inizia la fase natante che ha una durata di circa ventiquattro ore. Al momento della schiusa la larva ha una testa arrotondata con papille adesive non molto sviluppate e viene definita "giovane larva". Successivamente si ha un allungamento del tronco e le strutture delle papille adesive e del lobo preorale diventano mature e ben distinte. Le larve, chiamate in questa fase "larve mature", si possono così legare al substrato attraverso le papille e possono rispondere a stimoli regolativi per avviare metamorfosi (Degnan et al., 1997) (Fig. 6). Attraverso la metamorfosi la larva subisce una serie di rapidi cambiamenti morfologici e si trasforma in un "juvenile" con caratteristiche di un animale sessile filtratore. La coda viene rapidamente riassorbita e il mesenchima del tronco subisce ampie migrazioni. Dopo sette ore dalla fecondazione, il "juvenile" appena formato ("early rotation stage") subisce ulteriori modificazioni: muta la tunica esterna larvale, ruota la posizione del sacco dei visceri e comincia il riassorbimento della vescicola neurale (Cloney, 1977) (Fig. 6). Nei periodi successivi (da alcuni giorni a una settimana) gli organi rudimentali si differenzieranno nelle strutture presenti nell'animale adulto (Hinman et al., 2000).



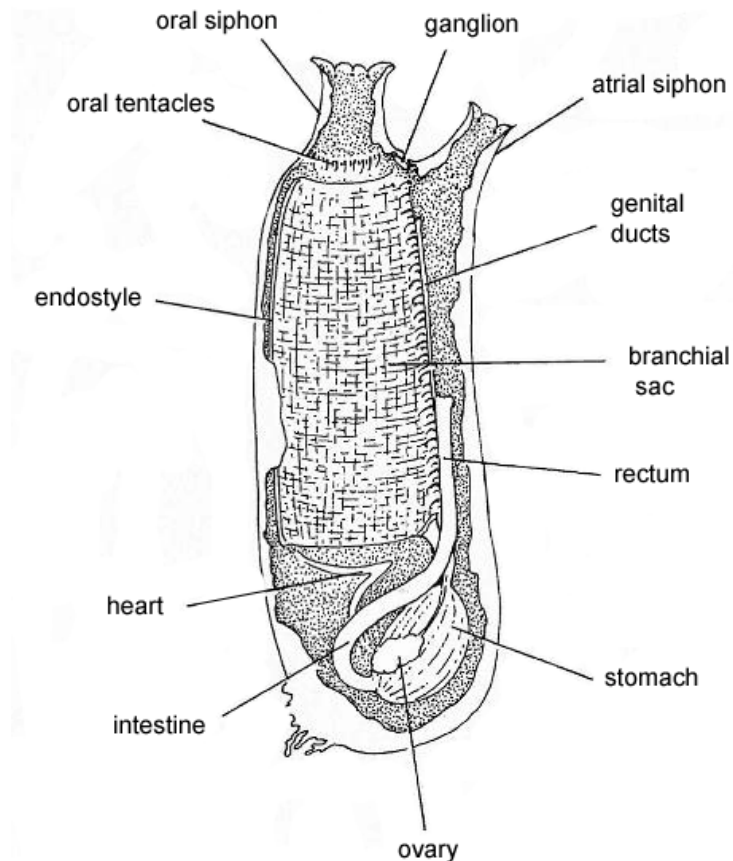
**Figura 6.** Metamorfosi delle Ascidie. **(A)** Larve di ascidia con in evidenza la corda neurale in posizione dorsale e la notocorda. Le tre linee cellulari del mesenchima del tronco che formano distinte strutture mesodermiche, mostrate in **B**. **(B)** Schema di un'ascidia adulta che mostra l'endostilo e le fessure del faringe. Le "trunk lateral cells" formano strutture (in rosso) tra cui le cellule del sangue, parti della muscolatura della parete del corpo e dell'endotelio delle fessure branchiali del faringe. Le cellule del mesenchima (in verde) migrano nella tunica. Le "trunk ventral cells" formano strutture (in blu), tra cui il cuore e parti della muscolatura della parete del corpo. **(C, D e E)** Larve aderenti al substrato mediante le papille adesive. **(F)** Riassorbimento della coda nei successivi 20 minuti. **(G)** Nel giro di un'ora la tunica esterna della larva si perde. **(H, I)** "Juvenile" di nuova formazione nelle prime ore della metamorfosi. Durante questo periodo **(i)** la vescicola cerebrale viene riassorbita, **(ii)** il sacco dei visceri ruota di 90 gradi, **(iii)** le ampolle si estendono dall'epidermide anteriore, spingendo la tunica lungo il substrato, e **(iv)** avviene la migrazione completa delle cellule del mesenchima tronco. (Da Davidson and Swalla, 2002)



L'anatomia della *C. intestinalis* adulta poco giustifica la collocazione delle Ascidie nella scala evolutiva dei Cordati. Gli individui adulti, infatti, sono di forma cilindrica o globosa, aderiscono al substrato attraverso un peduncolo fibroso e sono rivestiti da uno speciale involucro, la tunica, da cui prendono il nome di Tunicati. La tunica delle ascidie, il cui costituente principale è la tunicina, ha una speciale caratteristica: contiene cellule ameboidi (o cellule della tunica) e cellule del sangue, che sono migrate dalle strutture mesenchimali corporee. Una delle funzioni della tunica è quella di permettere l'ancoraggio al substrato; funge, inoltre, da supporto esoscheletrico protettivo contro danni meccanici e infezioni ed è anche sede di "self-nonsel recognition". In letteratura è riportato che durante le infiammazioni numerosi emociti migrano nella tunica nel sito d'infiammazione (Di Bella, 2000). Le cellule del sangue infiltrate in queste regioni circondano ed isolano l'agente infiammatorio attaccandolo con sostanze che ne causeranno la distruzione (Di Bella, 2000; Parrinello, 1996). Il lato posteriore dell'animale è quello coinvolto nell'ancoraggio al substrato mentre il lato antero-superiore dell'animale presenta due aperture: un sifone inalante ventrale branchiale (orale o buccale) ed un sifone esalante dorsale atriale. Precursori di queste strutture possono essere individuate nella larva.

Il sifone orale si origina da invaginazioni dell'ectoderma dorsale che, all'adesione della larva al substrato, formano un placode orale. All'inizio della metamorfosi nello stadio di rotazione il placode si fonde con l'endoderma sottostante e diventa pervio. Solo nel 1° stadio di ascidia il sifone orale si contrae in risposta agli stimoli esterni e inizia a far entrare l'acqua. Il sifone atriale deriva dai due pori atriali localizzati su entrambi i lati della larva. Durante la metamorfosi nel 1° stadio di ascidia, i due pori atriali si spostano dorsalmente e si fondono tra loro. La fusione è completata nel 2° stadio ascidia (Chiba et al., 2004). Nell'adulto l'acqua entra attraverso il sifone

inalante, viene filtrata attraverso il cestello branchiale che cattura le particelle nutritive, poi convogliate nell'apparato digerente costituito da esofago stomaco e intestino (Fig. 7).



**Figura 7.** *C. intestinalis*. Rappresentazione schematica della struttura corporea di un individuo adulto. In questa visione laterale sono evidenziati i principali organi interni. (Da Millar, 1953)

Il materiale digerito e l'acqua filtrata vengono emessi attraverso il sifone esalante. Il sistema nervoso, molto semplice, è costituito da un ganglio, localizzato tra i due sifoni, da cui si originano le innervazioni del sistema periferico. Inoltre è presente un sistema circolatorio aperto ben sviluppato costituito da un cuore tubolare che pompa il sangue attraverso numerosi vasi sanguigni con la caratteristica di poter invertire la direzione del flusso sanguigno.

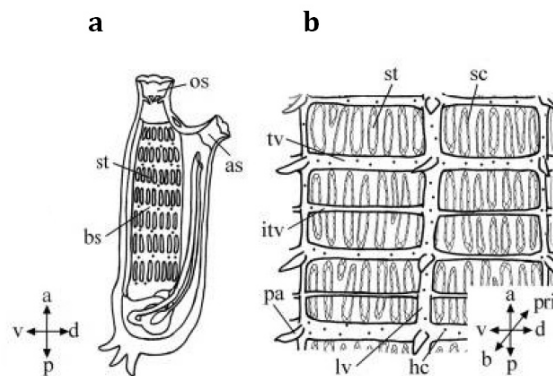
## **Tessuti e organi coinvolti nell'ematopoiesi**

### **Il faringe**

Il faringe o cestello branchiale della *C. intestinalis* è un vero e proprio organo con funzioni molteplici. Sebbene le funzioni principali siano sicuramente la respirazione e la cattura delle particelle alimentari, il faringe ha anche un ruolo importante nel sequestro dei metalli pesanti (Kalk, 1963), nei processi digestivi e nell'assorbimento di materiale organico (Fiala-Medoni e Pequignat, 1980; Pestarino et al., 1988; Godeaux, 1989). In letteratura il lavoro di Ermak del 1976 descrive diverse regioni del faringe come sede di attività ematopoietica. Inoltre, in questo organo si generano flussi di acqua coinvolti nel trasporto di feci, cataboliti e gameti attraverso il sifone esalante. Nell'individuo adulto il faringe si estende dalla regione dei sifoni fino alla bocca dell'esofago, occupando circa i tre quarti dell'intera lunghezza del corpo. La struttura del faringe, analizzata e ben descritta dal Millar nel 1953, è costituita da: le pareti laterali, l'endostilo in posizione ventrale e le "languets" in posizione dorsale. È possibile riconoscere una regione prebranchiale, in cui la parete del faringe è a stretto contatto con la parete del corpo lungo i margini dell'endostilo, e una regione branchiale più ampia che occupa gran parte del volume del corpo e che delimita la camera atriale. Le pareti laterali del cestello branchiale sono perforate da numerosi stigmi delimitati dalle barre trasversali e longitudinali all'interno delle quali è presente sangue circolante.

Il numero degli stigmi aumenta gradualmente con la crescita dell'animale. Gli stigmi hanno una forma allungata e studi morfologici hanno evidenziato la presenza di cellule cigliate come in molte delle diverse strutture del faringe. Il margine degli stigmi è delimitato da un numero variabile da 6 a 8 cellule cigliate che sono fiancheggiate da

cellule parietali che ne completano la struttura. Le ciglia sono perpendicolari al piano della fenditura dello stigma e, quando estese per intero, sono lunghe abbastanza da chiuderlo. Le ciglia degli stigmi sono le uniche ad essere coinvolte nella creazione del flusso di acqua mentre le ciglia che rivestono le altre cellule della parete del cestello delle altre strutture sono coinvolte direttamente nel trasporto e distribuzione del muco, utilizzato per la cattura del cibo, dalla regione ventrale dell'endostilo e dalla regione dorsale delle "languets" (Fig. 8 a). Nei primi stadi di *juvenile* post-metamorfosi il numero degli stigmi è molto ridotto per poi aumentare proporzionalmente con le dimensioni dell'animale. La formazione dei nuovi stigmi avviene attraverso la divisione di stigmi già esistenti che si allungano per poi dividersi in due stigmi distinti.



**Figura 8.** Rappresentazione schematica delle fessure branchiali in *C. intestinalis*. (A) Nell'adulto, gli stigmi allungati antero-posteriormente sono allineati dorsoventralmente e formano il sacco branchiale. (B) Nel sacco branchiale dell'adulto, ogni fila di stigma è compresa in una rete formata dall'intersezione di barre trasversali e longitudinali. a, anteriore; as, sifone atriale; b, branchiale; bs, sacco branchiale; d, dorsale; hc, emociti; itv, barre trasversali intrastigmatiche; lv, barre longitudinali; os, sifone orale; p, posteriore; pa, papille; pri, peribranchiale; sc cellule dello stigma; st, stigma; tv, barra trasversale; v, ventrale. (Da Shimazaki et al., 2006)

Le barre trasversali, contenenti sangue circolante, sono distinte in interstigmatiche e parastigmatiche e variano in dimensione e numero in base all'età dell'animale. Le prime corrono ai lati delle file di stigmi mentre le parastigmatiche passano attraverso il centro delle file di stigmi (Fig. 8 b).

Le barre longitudinali sono localizzate in una posizione più interna rispetto alle barre interstigmatiche trasversali, sono perpendicolari ad esse e si distendono lungo l'intera lunghezza del sacco branchiale (Fig. 8 b).

Nelle zone d'intersezione tra barre longitudinali e barre trasversali, dove avvengono scambi tra il sangue circolante, si osservano papille di dimensioni ridotte che si affacciano nella cavità del cestello branchiale. Il bordo dorsale delle papille è dentato mentre il bordo ventrale presenta una scalanatura cigliata.

In *C. intestinalis*, inoltre, sono presenti strutture definite "languets" in posizione dorsale, che si proiettano all'interno della cavità branchiale e che sostituiscono la lamina dorsale descritta in altre Ascidi. Le "languets" sono strutture allungate a forma di falce ripiegata che si assottiglia verso l'estremità. Sono ricoperte da un epitelio non cigliato nella faccia anteriore e in quella posteriore, ma cigliato sui margini laterali. Ogni barra trasversale ha la sua "languet" di dimensioni variabili.

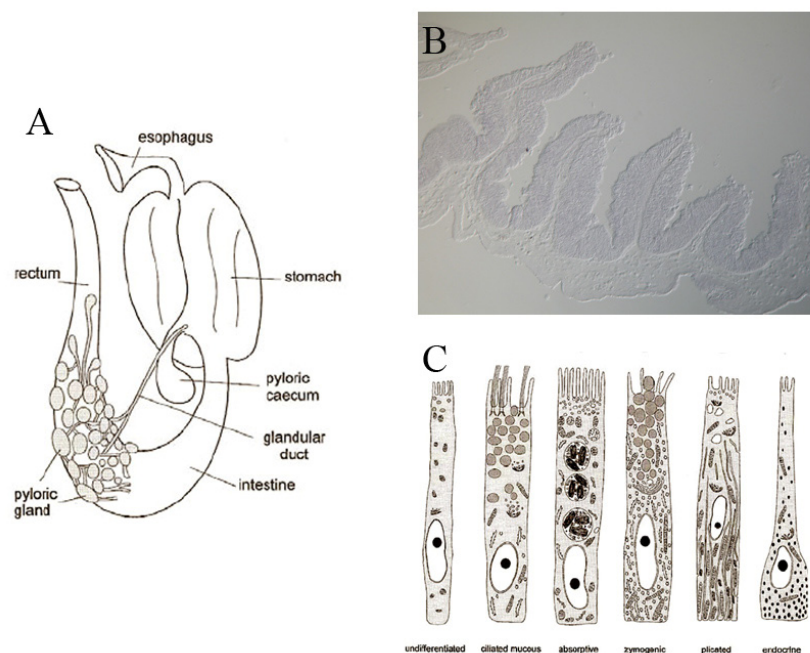
Il faringe presenta una muscolatura longitudinale a livello della parete del corpo e, inoltre, anche una muscolatura nelle larghe barre trasversali in stretta connessione con la muscolatura longitudinale dorsale. Tale sistema di muscolatura è importante per l'espulsione delle sostanze durante l'escrezione e sembra anche essere coinvolto nel movimento delle papille durante la cattura del cibo.

Nella regione ventrale, opposto alle "languets", c'è l'endostilo che si sviluppa nella zona di contatto tra le pareti del cestello branchiale e del corpo dell'animale. La struttura dell'endostilo è simmetrica rispetto una scalanatura centrale e si proietta nella

cavità del sacco branchiale. Le cellule che lo compongono sono cigliate e ghiandolari e per le caratteristiche di quest'ultime gli viene attribuita un'omologia con la tiroide dei vertebrati (Millar, 1953)

## Lo stomaco delle Ascidie

Lo stomaco delle Ascidie è un organo a forma di sacca le cui pareti sono ripiegate a formare delle creste che si estendono per tutta la sua lunghezza e si proiettano nella cavità gastrica (Fig. 9 A e B). Nella parete gastrica sono stati identificati sei diversi tipi cellulari: cellule mucose cigliate, cellule di assorbimento, cellule dello zimogeno, cellule indifferenziate, cellule endocrine e cellule complesse (Fig. 9 C) (Burighel and Cloney 1997).



**Figura 9.** Stomaco delle ascidie. (A) Apparato digestivo, (B) sezione trasversale dello stomaco e (C) tipi cellulari della parete dello stomaco. (Burighel and Cloney 1997)

Le cellule mucose cigliate hanno diverse localizzazioni all'interno della parete gastrica, ma principalmente costituiscono la regione della testa delle creste e del rafe. Hanno alcune caratteristiche comuni come le lunghe ciglia intercalate con microvilli, i granuli di muco e un apparato del Golgi ben sviluppato. Le lunghe ciglia sono inserite nel plasmalemma. I granuli di muco contengono materiale denso e omogeneo o una rete di filamenti. Spesso le cellule mucose cigliate si raggruppano a formare dei ciuffi.

Le cellule di assorbimento rappresentano il tipo cellulare più numeroso nella parete gastrica. In letteratura sono spesso associate a diverse e svariate funzioni, ma essenzialmente, come indicato da dati sperimentali, sono adibite all'assorbimento del materiale digerito (Thorndyke, 1977). Le cellule di assorbimento sono a forma di colonna con un largo nucleo alla base e un margine striato. Sono presenti vacuoli sopranucleari ben sviluppati che spesso contengono sistemi concentrici di lamelle, goccioline osmiofiliche e vescicole chiare. Il citoplasma nella regione apicale contiene corpi vescicolari, piccole vescicole di cui alcune rivestite. Un ridotto reticolo endoplasmatico fiancheggia il nucleo e l'apparato del Golgi è formato da numerose cisterne e vescicole appiattite. Le cellule di assorbimento sono in grado di assorbire ferritina e HRP (Thorndyke, 1977).

Le cellule dello zimogeno sono direttamente coinvolte nei processi di digestione dello stomaco per la presenza di enzimi dello zimogeno attivi. Le cellule dello zimogeno sono immerse all'interno di gruppi di cellule di assorbimento e la loro ultrastruttura somiglia molto alle cellule acinari del pancreas dei vertebrati. Sono fortemente basofile con un nucleo basale dotato di un nucleolo prominente e i mitocondri sono molto abbondanti rispetto a quelli presenti nelle cellule di assorbimento. I granuli di zimogeno, che si originano da vacuoli nella regione del ben

sviluppato apparato del Golgi, si accumulano nel citoplasma apicale prima della secrezione.

Le cellule complesse hanno strutture articolate del plasmalemma sia nella regione basale che in quella laterale quando sono circondate da altri tipi cellulari all'interno dell'epitelio. Quando sono associate con altre cellule complesse interagiscono con esse a formare delle interdigitazioni. Questo tipo cellulare è presente in zone specializzate come il cieco pilorico o la regione terminale dei diverticoli gastrici. Le cellule complesse sembrano partecipare nella regolazione del flusso di fluidi in assenza di tipici organi escretori.

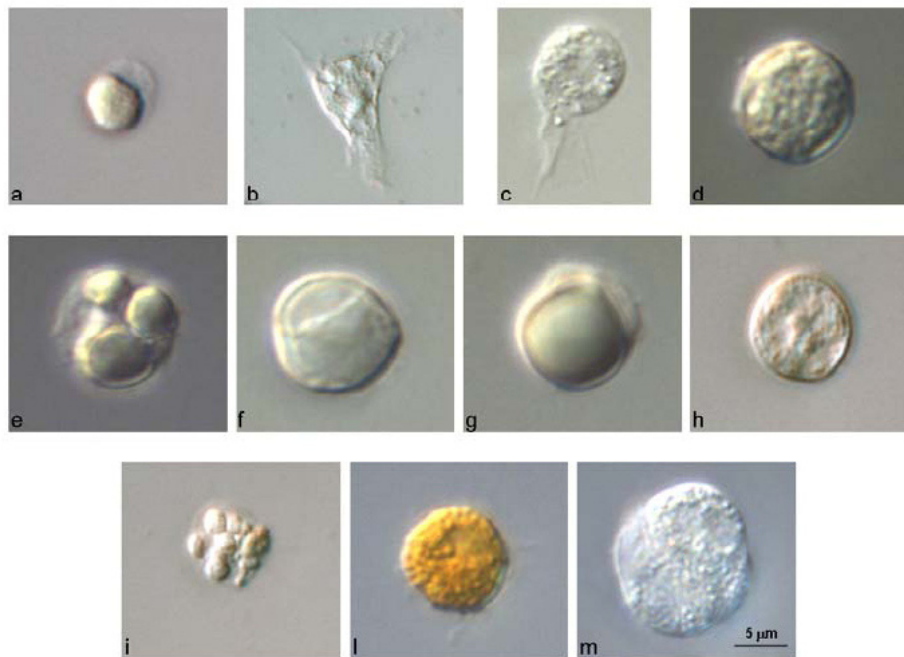
Le cellule endocrine localizzate in diverse regioni dello stomaco sono caratterizzate dalla presenza di numerosi piccoli granuli legati alla membrana e contenenti spesso corpi fortemente elettrone-densi. I granuli prevalgono nella regione basale delle cellule spesso delimitati dal plasmalemma. Diversi lavori rivelano una varietà di cellule endocrine nello stomaco con una immunoreattività per gastrina, calcitonina, neurotensina, secretina, somatostatina, e serotonina (Fritsch et al., 1982). Molto probabilmente questi peptidi nelle Ascidie funzionano da agenti regolatori della digestione.

Cellule indifferenziate sono state indicate per la prima volta da Ermak nel 1981 indicando numerose popolazioni cellulari gastriche che sono oggetto di continuo autorinnovamento. Il turnover cellulare è rapido e le cellule migrano dalle zone germinali verso le zone di estrusione, dove le cellule che hanno completato il processo di maturazione sono perse nel lume. La zona germinale si marca con la timidina triziata e consiste di cellule indifferenziate. Le cellule indifferenziate hanno un esteso nucleo con grandi nucleoli; i ribosomi sono abbondanti e il reticolo endoplasmatico è sparso. I mitocondri sono moderati in numero e prevalgono nella regione apicale.



## Gli emociti delle Ascidie

Studi di microscopia ottica ed elettronica a trasmissione (TEM), hanno consentito di raggruppare gli emociti delle ascidie in cinque tipi cellulari: le cellule staminali, gli amebociti, le cellule vacuolate, le cellule pigmentate e i nefrociti (Fig. 10).



**Figura 10.** Emociti di *C. intestinalis*. Osservazione effettuata con ottica Nomarski. (a) Cellula staminale; (b) amebocita ialino non vacuolato; (c) amebocita ialino vacuolato; (d) amebocita granulare; (e) amebocita refrattile; (f) granulocita univacuolare refrattile (URG); (g) “signet ring”; (h) cellula compartimentata; (i) morula; (l) cellula pigmentata; (m) nefrocita.

Le cellule staminali (Fig. 10 a) sono note anche col termine di emoblasti (Milanesi e Burighel, 1978), emocitoblasti (Ermak, 1976) o cellule linfocita-simile (LLC) (Overton, 1966; Fuke, 1979; Wright, 1981). Le cellule staminali si ritrovano principalmente nei noduli ematopoietici, localizzati a livello delle pareti che rivestono l'intera struttura corporea delle ascidie e a livello delle pareti del faringe. Tali cellule

sono coinvolte in questi tessuti in una intensa attività proliferativa, che suggerisce il loro coinvolgimento nella risposta immunitaria (Wright, 1981). Sono state ritrovate, inoltre, anche nell'emolinfa circolante. Le cellule staminali hanno un elevato rapporto nucleo/citoplasma e manifestano i tipici caratteri ultrastrutturali delle cellule indifferenziate. Sono cellule generalmente piccole, dai 5 ai 7  $\mu\text{m}$  di diametro, e presentano un nucleo centrale contenente una grande quantità di eterocromatina (Milanesi e Burighel, 1978; Rowley, 1982). Il citoplasma è omogeneo e contiene un gran numero di ribosomi liberi, talvolta organizzati in poliribosomi, mitocondri ed un reticolo endoplasmatico rudimentale. Secondo Ermak (1976), queste cellule rappresentano una fonte, ancora indifferenziata, dei vari tipi di emociti. Egli riteneva, infatti, che le cellule staminali contenute nei noduli emopoietici producessero le LLC, dalle quali successivamente si sarebbero differenziati tutti gli altri tipi di emociti. Le cellule linfocita-simile presentano un grande nucleo, che manca di nucleolo, ed una piccola porzione di citoplasma, contenente poche piccole vescicole. Si ritiene che le LLC siano coinvolte nel riconoscimento del tessuto allogenico (Raftos et al., 1987), fungendo da cellule immunocompetenti.

Gli amebociti, in genere molto abbondanti nel sangue delle ascidie, hanno un diametro che varia tra i 6 e i 12  $\mu\text{m}$  e possono essere raggruppati in quattro sottocategorie: amebociti ialini non-vacuolati, amebociti ialini vacuolati, amebociti granulari ed amebociti refrattili (Rowley, 1981). Questi quattro tipi di amebociti si distinguono non solo per la loro morfologia ma anche per le diverse funzioni. Gli amebociti ialini non vacuolati (Fig. 10 b) *in vitro* si agglutinano rapidamente attraverso un meccanismo che richiama quello più complesso dell'emostasi. In presenza di particelle estranee, come batteri, queste cellule non sono coinvolte in processi di fagocitosi. Al contrario, gli amebociti ialini vacuolati (Fig. 10 c) e gli amebociti

granulari (Fig. 10 d) sono cellule che mostrano elevata attività fagocitica verso una ampia varietà di antigeni, sia *in vivo* che *in vitro* (Rowley, 1981). Queste cellule sono caratterizzate da un citoplasma contenente molte vescicole, una piccola quantità di reticolo endoplasmatico rugoso, complessi di Golgi e pochi mitocondri. La presenza delle numerose vescicole, e vacuoli di diverse dimensioni suggerisce il possibile coinvolgimento di entrambi i tipi di cellule nell'accumulo e nella conservazione del vanadio (Rowley, 1982; 1983). Si è visto infatti, che in seguito alla fagocitosi i microrganismi sono accumulati nei vacuoli contenenti vanadio: quest'ultimo, essendo un potente veleno metabolico, potrebbe giocare un importante ruolo nell'eliminazione dei microbi. Per quanto riguarda gli amebociti refrattili (Fig. 10 e), la loro funzione non è ben nota, sebbene siano stati osservati rari fenomeni di fagocitosi. Anch'essi, quindi, potrebbero essere coinvolti nelle reazioni di difesa cellulare.

Le cellule vacuolate sono caratterizzate dalla presenza di vacuoli o vescicole ripiene di fluido. Tali cellule, in condizioni fisiologiche, sono dotate di movimenti ameboidi ed attività fagocitica (Fuke, 1979); inoltre sembrano essere coinvolte anche in altri meccanismi di difesa, tra cui l'incapsulazione (Anderson, 1971) ed il riconoscimento self-nonself (Fuke, 1980; 1990). Le cellule vacuolate sono distinte in almeno tre sottotipi: granulociti univacuolari, cellule compartimentate e cellule a morula (Wright, 1981). Al primo sottotipo appartengono cellule che hanno un diametro di 6-12  $\mu\text{m}$ , con un unico grande vacuolo contenente materiale granulare, un nucleo localizzato in periferia, ribosomi liberi e pochi mitocondri nel citoplasma. Appartengono a questo sottotipo i granulociti univacuolari refrattili (URG) (Fig. 10 f) e le cellule "signet-ring" (Fig. 10 g). Le cellule compartimentate (Fig. 10 h) sono poco comuni e hanno forma sferica, con un diametro che varia tra gli 8 e i 12  $\mu\text{m}$ . Nel citoplasma presentano un numero variabile di vacuoli in posizione periferica, il nucleo è centrale e non contiene il

nucleolo, e il citoplasma intorno al nucleo e ai compartimenti non è granulare. Le morule sono cellule circolari, con un diametro di 8-16  $\mu\text{m}$  e contengono grandi vacuoli circondati da membrana, ripieni di materiale elettrondenso. Le morule (Fig. 10 i) sono state spesso indicate anche con il termine di “vanadociti” per la loro capacità di accumulare una grande varietà di metalli, tra cui il vanadio (Kustin et al., 1976). Tali cellule rappresentano anche un sito di accumulo di altre componenti, tra cui proteine e polisaccaridi (Wright, 1981), e possono essere coinvolte nella risposta infiammatoria (Anderson, 1971) e nella sintesi della tunica (Endean, 1961).

Le cellule pigmentate (Fig. 10 l) hanno un diametro di 6-13  $\mu\text{m}$  e contengono un numero variabile di granuli di pigmento di diverso colore, il più frequente dei quali è il giallo (Rowley, 1981). Alcuni studiosi ritengono che i pigmenti contenuti in questi granuli siano basati su componenti contenenti vanadio (George, 1926); secondo altri, invece, si tratta di granuli ricchi di melanina o carotenoidi (Wright, 1981). Le cellule pigmentate si ritrovano spesso attaccate alle pareti dei vasi, in particolare quelli che circondano il sifone atriale e la tunica. La funzione di queste cellule non è ancora stata stabilita.

Oltre a queste quattro classi di cellule esiste una quinta classe di cellule chiamate nefrociti (Fig. 10 m). Queste cellule, che sono spesso molto più grandi degli altri emociti circolanti e raggiungono i 40  $\mu\text{m}$  di diametro, si ritiene siano coinvolte nell'accumulo di vari prodotti escretivi (Wright, 1981).

## Geni regolatori dell'ematopoiesi analizzati

Il differenziamento delle cellule ematopoietiche comporta una progressiva restrizione del potenziale di cellule staminali pluripotenti. Nonostante i meccanismi responsabili del differenziamento di una cellula ematopoietica non siano ben definiti, è probabile che essi coinvolgano due distinti, ma correlati, *pathway*: uno che coinvolge proteine nucleari che regolano direttamente l'espressione genica, e un secondo che interessa la trasduzione del segnale dei fattori di crescita attraverso i loro recettori di superficie. Tra i diversi fattori di regolazione della trascrizione che potrebbero permettere di individuare il profilo di espressione genica di cellule ematopoietiche mature, sono stati identificati: *GATA-a*, *Bmi*, *PU.1* e *Ikaros*.

Della famiglia GATA fanno parte fattori di trascrizione che svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e il differenziamento di molti tessuti nei metazoi. Questi fattori presentano due motivi *zinc-finger* conservati che si legano specificamente alla sequenza (A/T)GATA(A/G) nella sequenza regolatoria del gene (Orkin, 1992). Nei vertebrati sono stati identificati sei membri della famiglia GATA poi suddivisi in due sottofamiglie sulla base di omologia di sequenza e territori di espressione. GATA-1,-2,-3 hanno un ruolo importante nella regolazione dell'ematopoiesi e possono essere considerati dei marcatori precoci di precursori ematopoietici. Anche in *Drosophila* l'omologo di *GATA-1,-2,-3*, *Serpent (Srp)*, è essenziale per lo sviluppo degli emociti interagendo con altri fattori di trascrizione (Hartenstein et al., 2003). In *C. intestinalis* due proteine omologhe dei fattori GATA sono state identificate: Ci-GATA-a che corrisponde ai GATA-4,-5,-6 dei vertebrati e GATA-b che corrisponde ai GATA-1,-2,-3.

Uno dei fattori di trascrizione in grado di interagire con GATA-1,-2,-3 è PU.1, un membro della famiglia *Ets*, essenziale per lo sviluppo delle linee cellulari di monociti, granulociti e linfociti (Orkin, 2001). Infatti, i topi *PU.1*-deficienti non sono in grado di sviluppare e differenziare queste linee cellulari (Oikawa, 1999). La regolazione dell'ematopoiesi da parte di PU.1 avviene attraverso l'interazione con diverse proteine specifiche e attraverso la trascrizione e selezione di geni target di PU.1 come risposta dello stesso a molecole segnale di tipo diverso: citochine, fattori di crescita, antigeni cellulari e stress cellulari. I domini specifici di PU.1 interagiscono con motivi come bHLH, *bZipper* e *zinc fingers* (Gupta, 2009).

L'espressione dei geni della famiglia *Ikaros* è ristretta alle cellule ematopoietiche ed è essenziale per il differenziamento di linee cellulari di linfociti. Questi fattori di trascrizione sono espressi nell'ematopoiesi primitiva delle cellule progenitrici e durante il differenziamento di linfociti (cellule B, cellule T e cellule NK) (Cupit et al., 2003). Oltre a *Ikaros*, altri due membri della famiglia, *Aiolos* e *Helios*, sono implicati nello sviluppo di linee di linfociti. Le proteine della famiglia *Ikaros* contengono fino a sei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> motivi organizzati in due domini distinti (Morgan et al., 2004; Hahm et al., 1998). I quattro motivi all'N-terminale partecipano in legami con DNA, mentre i due domini al C-terminale sono coinvolti nella formazione di eterodimeri ed omodimeri con altri membri della famiglia *Ikaros*. Questi fattori funzionano come regolatori dell'ematopoiesi agendo nell'attivazione genica e nel silenziamento durante lo sviluppo delle linee di linfociti; in particolare, poiché si associano con l'eterocromatina che contiene sequenze geniche non trascritte, agiscono come regolatori negativi (Georgopoulos, 2002). I motivi *zinc-finger* dei membri della famiglia *Ikaros* sono conservati durante l'evoluzione dei vertebrati, permettendo l'individuazione di cloni in organismi filogenicamente distanti dai vertebrati.

Un altro interessante fattore di trascrizione è Bmi-1 un membro del “Polycomb group of genes” (*PcG*). Bmi-1 contiene un *Ring-finger*, fondamentale nei processi di ubiquitinazione, che è un tipo di *zing-finger* costituito da 40-60 residui amminoacidici che legano due atomi di zinco. Bmi-1 svolge un ruolo importante nel regolare il ciclo, l’autorinnovamento e la senescenza cellulare (Song et al., 2009). E’ stato dimostrato che Bmi-1 partecipa in molti processi biologici, come lo sviluppo embrionale, la formazione degli organi, la tumorigenesi, la regolazione dell’omeostasi delle cellule staminali e il loro differenziamento (Van der Lugt et al., 1994). Nel lavoro di Park et al. del 2003 viene descritta un’elevata espressione di Bmi-1 nelle HSCs dell’uomo adulto e del topo adulto e fetale. Il numero di HSCs è fortemente ridotto nei topi *Bmi-1<sup>-/-</sup>* dopo la nascita rispetto a quello presente nel fegato fetale dei topi *Bmi-1<sup>-/-</sup>*. Inoltre Park et al. hanno anche dimostrato che il fegato fetale trapiantato da topi *Bmi-1<sup>-/-</sup>* può solo transitoriamente contribuire all’ematopoiesi. Comunque, l’espressione di geni associati con l’auto-rinnovamento delle staminali, la sopravvivenza e il differenziamento cellulare, come i geni *p16INK4a* e *p19ARF*, nelle cellule di fegato fetale di topi *Bmi-1<sup>-/-</sup>* è completamente alterato. Tutti questi risultati indicano che *Bmi-1* è necessario per il differenziamento e l’autorinnovamento delle HSCs dell’adulto.

## **Numb**

Le cellule del sangue si originano tutte da cellule staminali ematopoietiche pluripotenti e pertanto devono esistere meccanismi in grado di regolarne il differenziamento. Uno di questi meccanismi coinvolti nel differenziamento cellulare è rappresentato dalla divisione cellulare asimmetrica. Numb è tra le prime molecole scoperte in grado di influenzare il destino cellulare per la sua segregazione asimmetrica durante la divisione cellulare.

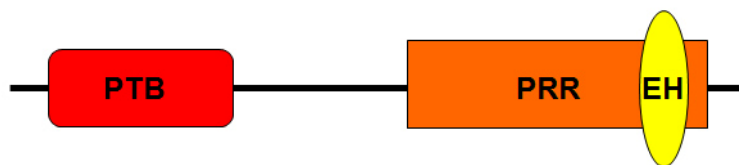
Il gene *Numb*, inizialmente identificato in *Drosophila* (Uemura et al., 1989), codifica per un determinante cellulare coinvolto nel differenziamento cellulare e nell'ematopoiesi. Successivamente ulteriori lavori hanno dimostrato l'importanza di *Numb* nei mammiferi, in particolare nell'uomo, per lo studio della neurobiologia dello sviluppo, del cancro e delle malattie neurodegenerative.

Numb riveste il ruolo di determinante cellulare durante lo sviluppo sia in *Drosophila* che nei vertebrati (Bhalerao et al., 2005). Studi su *Drosophila* dimostrano che Numb ha una localizzazione asimmetrica a livello delle cellule progenitrici nel sistema nervoso centrale. E' quanto accade in particolare per le "ganglion mother cell" (GMC) che danno origine a due tipi cellulari diversi (neuroni o glia). Nella cellula che riceve *Numb* la via di segnale di Notch viene bloccata dallo stesso Numb e induce la cellula figlia ad assumere il destino di cellula gliale ("B cell"). La cellula sorella non esprime *Numb* (stesso fenotipo dei mutanti di *Numb*) e la via di Notch attiva i suoi fattori di trascrizione determinando il destino di neurone ("A cell"). Nel caso di cellule progenitrici che non esprimono *Numb* non sarà possibile avere un differenziamento cellulare, con la formazione di due cellule figlie identiche poiché la via di Notch è sempre attiva. Quindi Numb non agisce solo come singolo determinante, ma interagisce



con fattori intrinseci come la via di segnale di Notch. I geni membri della famiglia *Notch* codificano per recettori di membrana sia negli invertebrati che nei vertebrati. I segnali generati dall'interazione ligando-recettore inducono un processo proteolitico a carico del recettore Notch e la traslocazione del suo dominio intracellulare (NICD) nel nucleo, dove interagirebbe con regolatori trascrizionali (Allman et al., 2002).

La proteina Numb ha una localizzazione citoplasmatica in una regione associata alla membrana plasmatica. Dal punto di vista biochimico la proteina ha tre “binding domains” in grado di determinarne la funzione (Fig. 11).



**Figura 11.** Rappresentazione schematica della proteina Numb con i suoi domini: PTB (“phosphotyrosine-binding domain”); PRR (“proline rich region”); EH (sequenza conservata asparagina-prolina-fenilalanina).

Nella regione all’N-terminale è presente un “phosphotyrosine binding domain” (PTB domain) altamente conservato in tutti gli omologhi di Numb identificati. Il dominio PTB può interagire con diverse proteine e sembra avere un ruolo fondamentale per la localizzazione della proteina e per la funzione di regolatore negativo della via di segnale di Notch. Invece nella regione al C-terminale, scarsamente conservata, è presente una “proline rich region” (PRR) che ha un’elevata affinità per il dominio SH3 delle SRC tirosina-chinasi, una proteina di segnale specializzata in messaggi che controllano la crescita e lo sviluppo cellulare. All’interno della regione PRR è riconoscibile una sequenza conservata (asparagina-prolina-fenilalanina NPF) che costituisce l’EH domain. Questo è in grado di interagire con una serie di proteine come l’adapina coinvolte in processi quali l’endocitosi, il rimodellamento dell’actina e la trasduzione

intracellulare del segnale (Reugels et al., 2006). Nonostante Numb sia descritto come una proteina associata alla membrana plasmatica, in letteratura è riportata una sua possibile traslocazione nucleare. Infatti, Numb si lega alla proteina Mdm2, associata a sua volta all'oncogene p53, attraverso due siti di legame uno all'interno del dominio PTB e uno nella regione C-terminale. Il legame tra Numb e Mdm2 induce traslocazione nucleare abbassando i livelli citoplasmatici di Numb (Juven-Gershon et al., 1998).

Il gene *Numb* ha omologhi nell'uomo, nel topo e nel pollo rivestendo il ruolo di determinante cellulare durante lo sviluppo. Nel topo *Numb* è espresso in diversi tessuti sia nell'adulto che durante l'embriogenesi. Nel tessuto nervoso dell'adulto in particolare *Numb* è espresso solo nelle cellule progenitrici dei neuroni in divisione. Le prime evidenze sull'esistenza di *Numb* nell'uomo è fornita dal lavoro di Verdi et al. del 1999 che ha individuato la presenza di quattro isoforme Numb da una libreria di cDNA di precursori neuronali umani.

Le quattro diverse isoforme di Numb sono generate da splicing alternativo e differiscono tra di loro per la presenza di un'inserzione di 11 aminoacidi nel dominio PTB e/o la presenza di un'altra inserzione di 48 aminoacidi nella PRR al C-terminale. Le quattro isoforme distinte in base al peso molecolare come p72 (PTB<sup>L</sup>PRR<sup>L</sup>), p71 (PTB<sup>S</sup>PRR<sup>L</sup>), p66 (PTB<sup>L</sup>PRR<sup>S</sup>) e p65 (PTB<sup>S</sup>PRR<sup>S</sup>) sono funzionalmente diverse e hanno effetti biologici differenti.

Le isoforme PRR influenzano la proliferazione o il differenziamento cellulare. Infatti, le isoforme PRR<sup>L</sup> e PRR<sup>S</sup> umane promuovono rispettivamente la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali della cresta neurale *in vitro* (Verdi et al., 1999). *In vivo*, durante lo sviluppo neuronale del topo, le isoforme PRR<sup>L</sup> sono presenti nei progenitori delle corticali non differenziate, e il passaggio all'espressione delle isoforme PRR<sup>L</sup> si verifica durante il differenziamento (Bani-

Yaghoub et al., 2007). Questo accade anche durante lo sviluppo pancreatico del topo (Yoshida et al., 2003) e lo sviluppo della retina di ratto (Dooley et al., 2003), quando un aumento delle isoforme PRR<sup>L</sup> coincide con una maggiore presenza di cellule progenitrici.

Le inserzioni all'interno del dominio PTB sono importanti per la localizzazione della proteina. Infatti, mentre le isoforme PTB<sup>L</sup> sono localizzate prevalentemente a livello della membrana plasmatica, le isoforme PTB<sup>S</sup> sono prevalentemente citosoliche (Dho et al., 1999).

Inoltre sempre nel topo e nell'uomo è stato identificato un altro omologo di Numb, definito Numb-like con una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e con funzione solo parzialmente sovrapponibile a Numb (anche Numb-like sembra avere un ruolo importante nel differenziamento cellulare).

Negli ultimi anni gli studi su *Numb* si sono concentrati molto sul suo coinvolgimento nello sviluppo tumorale e nelle malattie neurodegenerative. Il nesso logico tra il cancro e la divisione cellulare asimmetrica è stato avanzato sul presupposto che la compromissione del sistema della divisione cellulare asimmetrica in cellule staminali si traduce in un'alterazione dell'equilibrio esistente tra l'auto-rinnovamento e il differenziamento (Morrison, 2006).

*Numb* è anche descritto come un soppressore di tumori nei tumori al seno umano e nei medulloblastomi. Nei tumori al seno, l'effetto inibitorio di Numb sulla via di segnale di Notch non avviene per inattivazione e degradazione da ubiquitinazione dello stesso Numb (Pece et al., 2004). In questo contesto di particolare interesse è stata l'evidenza della capacità di Numb di regolare i livelli dell'oncogene p53 (Colaluca et al., 2008). Numb forma un complesso con p53 e Mdm2, una molecola oncogenica che

promuove l'ubiquitinazione e la degradazione di p53 (Haupt et al., 1997). In presenza di Numb, l'ubiquitinazione e la degradazione di p53 viene impedita.

Numb è una proteina coinvolta anche in meccanismi di endocitosi di diverse di molecole, tra le quali le integrine e L1 (Nishimura et al., 2003), importanti regolatori della proteina progenitrice dell'amiloide (APP) e della proteina  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), molecole implicate nello sviluppo dell'Alzheimer (AD). Un'interazione tra Numb e APP è ipotizzabile per le similarità nell'attivazione proteolitica dell'APP e della via di Notch (entrambe sono tagliate dalla  $\gamma$ -secretasi) e per la capacità di Numb di legarsi al motivo YENPTY all'interno dell'APP (Roncarati et al., 2002).

L'espressione delle isoforme PTB<sup>S</sup> di Numb nelle cellule neuronali provoca un accumulo dell'APP negli endosomi e un aumento della secrezione dell' $A\beta$ , mentre l'espressione delle forme PTB<sup>L</sup> diminuisce l'accumulo dell'APP e inibisce la secrezione dell' $A\beta$  (Kyriazis et al, 2008). Il meccanismo attraverso il quale Numb inibisce la produzione dell' $A\beta$  non è conosciuto ma si pensa sia una conseguenza dovuta alla regolazione di Numb sull'endocitosi dell'APP.

Essendo Numb uno dei principali mediatori di Notch, svolge anch'esso un importante ruolo nel regolare l'ematopoiesi. Infatti nei vertebrati la via di Notch regola sia il differenziamento che l'auto-rinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche e delle popolazioni cellulari ad esse collegate, influenzando eventi di differenziamento come lo sviluppo del compartimento linfoide (Allman et al., 2002). Nei mammiferi *Numb* è distribuito e segregato in maniera asimmetrica durante le divisioni dei precursori ematopoietici. Nei vertebrati la distribuzione asimmetrica di *Numb* è necessaria durante il differenziamento delle cellule parentali delle cellule T durante la risposta immunitaria. Infatti *Numb* è asimmetricamente distribuito nella regione sinaptica delle cellule progenitrici delle cellule T e viene segregato in quelle che

saranno le cellule T effettrici dove va a bloccare la via di Notch. Le cellule che non riceveranno Numb si differenziano in cellule di memoria contribuendo alla memoria immune (Allman et al., 2002).

## **SCOPO DELLA RICERCA**

E' noto che anche nell'ascidia *C. intestinalis* gli emociti hanno un ruolo importante nell'immunità. Infatti per alcuni dei tipi cellulari presenti nell'emolinfa sono state riconosciute funzioni e reazioni che indicano un loro diretto coinvolgimento nei sistemi di difesa. Un reclutamento di emociti ed un aumento del loro numero nei siti di infiammazione indotta, ad esempio, sono stati descritti diffusamente. Rimane però irrisolto il problema della dinamica di questo processo che potrebbe essere a carico di un reclutamento e/o di una produzione *de novo* dei tipi cellulari coinvolti. Anche in *Ciona*, quindi, la comprensione delle dinamiche che regolano l'ematopoiesi è di cruciale importanza per lo studio dei sistemi che assicurano la sopravvivenza degli organismi durante le infezioni e le interazioni con l'ambiente.

Nonostante ciò, l'informazione sull'ematopoiesi nelle ascidie è totalmente mancante o limitata a tentativi di riconoscere forme maturative diverse nei vari tipi cellulari rappresentati nell'emolinfa. Anche per la nomenclatura di questi, infatti, si è raggiunto un accordo solo più di recente.

Tutto ciò è indicativo della difficoltà dell'approccio a questi temi, che ha sofferto soprattutto della mancanza di strumenti molecolari che permettessero di seguire sia la genesi che il differenziamento degli emociti in *Ciona*, come anche nelle altre ascidie.

Nel mio progetto di dottorato ho avuto come obiettivo la ricerca di geni che potessero essere utilizzati come marcatori per l'identificazione di siti ematopoietici. Partendo da un lavoro di Satake del 2006 (Ogasawara et al., 2006), in cui attraverso lo screening del genoma di *C. intestinalis* sono stati analizzati geni coinvolti nell'immunità col fine di identificare marcatori specifici dei vari tipi cellulari del sangue, e sulla base dei dati presenti in letteratura circa geni che in altri organismi sono coinvolti nell'ematopoiesi, sono stati studiati gli omologhi di *C. intestinalis* di una serie

di geni come *Bmi*, *Ikaros*, *PU.1* e *GATA-a*. Per tutti i geni in esame è stata effettuata amplificazione per PCR e ne è stata verificata l'espressione mediante tecniche di ibridazione *in situ* sulla larva, sui "juvenile" e sui tessuti dell'adulto. Il solo *GATA-a* presentava un'espressione nello stadio larvale in tre diversi tessuti (vescicola neurale, mesenchima e trunk lateral cells) confermando dati già presenti in letteratura (D'Ambrosio et al., 2003), ma tale espressione non è stata riscontrata negli stadi successivi dello sviluppo e nell'adulto rendendo così questo potenziale marcatore non utilizzabile per la mia indagine. Gli altri geni analizzati non presentavano pattern di espressione apprezzabili con le tecniche utilizzate.

Lo studio della letteratura mi ha portato all'identificazione di un altro gene, *Numb*, che per il suo coinvolgimento come singolo determinante nella divisione asimmetrica e nell'ematopoiesi nei mammiferi, poteva rappresentare un buon candidato di cui verificare il coinvolgimento nell'ematopoiesi di *C. intestinalis*.

L'omologo di *Numb*, identificabile nel genoma di *C. intestinalis*, versione 2.0 disponibile su JGI, è costituito da 8 esoni come nei vertebrati e ha una sequenza nucleotidica di 1811 bp, riportata nel modello genico ci0100139295, Scaffold\_74:183487-192647 (Fig. 12).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtggaattgaatgttcttatttaataaacctaaacactttaagatgatgccaacttgcgacaaagt...
V E L N V L V F K * P K H F K M M R T L R Q S F R R K K K P

     100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aaaataccagagagcagtaaacacatcagtgccaacaagatgaagaactgttaagtgcgcaaatgtagcttcaatctg
K I P E S S K P H Q W Q Q D E E I V K S A K C S F H V K Y L

     190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggcaatattgaagttgaagaatcaaggggaatggctgtatgtgaacaagctgtcaagcaacttaagccggcaaaaagaaagattcgt
G N I E V E E S R G M A V C E Q A V K Q L K A G K K K K I R

     280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gcgatgtttacgtttcaccagatgctctctctgttggaaagattcaactaaagcttggctcgatcaacaattgaaaaagtttca
A M L Y V S P D A L R V V E D S T K A L L L D Q T I E K V S

     370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ttttgtctcctgacagaaattacgagagagctttctcttcatatgtagagatggaacaacgtagatggatgcatgcatcattcttt
F C A P D R N Y E R A F S Y I C R D G T T R R W I C H S F F

     460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gcagtaaaagattcgggtgagagattgagtcacggttggttgtgcaattgtctgcttgccttgaagaagaaacaaacgagaaaaagaa
A V K D S G E R L S H A V G C A F A A C L E K K Q K R E K E

     550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
actgggtgaactgttacttatgatcaaaatcgacaacttttacaagagaaggttcatttagagtgaagacattgacagacaacaagaa
T G V T V T Y D Q N R T I F T R E G S F R V K T L T E Q Q E

```



```

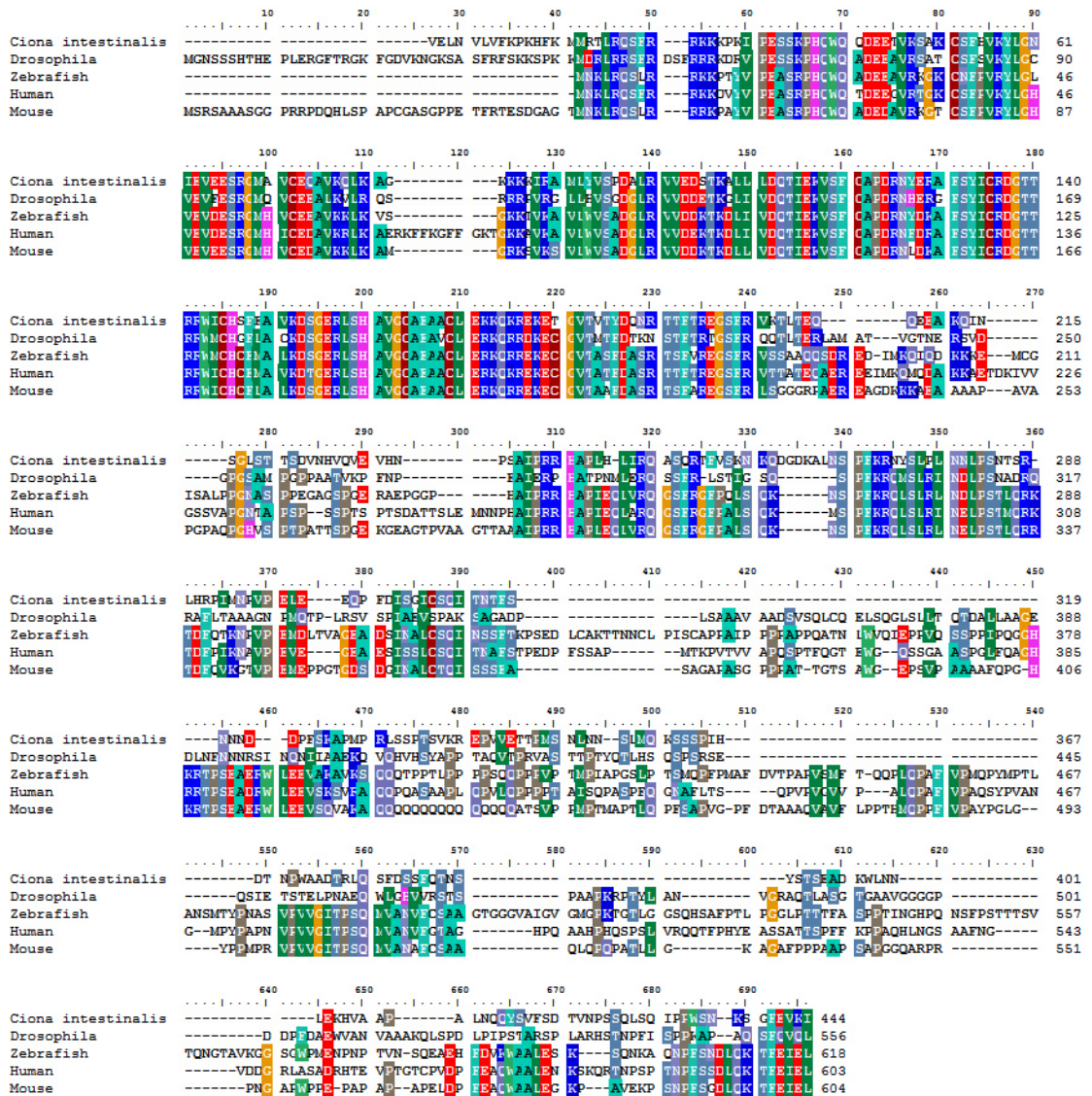
640      650      660      670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gaagcaaaacaaatattcaggtttatcaaccacaagtgatgtaaacatgttcaagttgaagttcataatccaagtgctataccagca
E A K Q I N S G L S T T S D V N H V Q V E V R N P S A I P S
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
730      740      750      760      770      780      790      800      810
cgacatgcacctttacatttaataagacaagcatctcaagaacattgtttcaagacaagcaagatggtgacaagcattgaattct
K R A P L H L I R A S Q R T F V S K N K Q D G D K A L N S
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
820      830      840      850      860      870      880      890      900
ccattcaagcgaattattctctcattaaacaacttaccatcaaacaccagcagactgacacaggccaattatgaatctctgtccagaa
P F K R N Y S L P L N N L P S N T S R L H R P I M N P V F E
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
910      920      930      940      950      960      970      980      990
ttagaagcagcgtcttgacatcagtggaatctgttcgaaataaccaacacattttcaacaataatgatgatccattttccaaagca
L E E Q P F D I S G I C S Q I T N T I F S N N N D D P F S K A
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
ccgatgccagattatcatcaccaacatctgtcaaacgagaaccagttgtgaaacaactccaatgagtaattaaacaactcgtctatg
P M E R L S S P I S V K R E P V V E I T E M S N L N N S L M
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
caaaaattctctcacttctcagatgatacaaacaccatggcagcagacacggttacaagaattttgatcaagtttccaaagcaattct
Q K S S S S P I H D I N F W A A D I R L Q S F D S S F Q I N S
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
tattccactctcgaagcagataaatggctaaatacttgaaaaacacgcttgctgaccagcattgaatcagcagtcacagcgggttaag
Y S I S E A D R W L N N L E K R V A A P A L N Q Q Y S V F S
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1270     1280     1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350
gatactgtaaatccatcaagccagctatctcagatcacctccatggtctaataaatctggcttgaagttaaaatttaacttatacata
D I V N P S S Q L S Q I P F W S N K S G F E V K I * L * F I
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1360     1370     1380     1390     1400     1410     1420     1430     1440
tgtacagtacagaataatgaacttacatgacctttgtcttaaaaggtgattttaaggaggtgctgcatggtgtctcttcttctaatat
C T V Q Q * * T Y M T F C F K R C I L R R C C M V F F L * Y
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1450     1460     1470     1480     1490     1500     1510     1520     1530
aaagtaaatcaagttgtcactatactcaaaaattattttataaagtttaataatataaagtgcttggataataaacccctttt
K V N Q V C H Y T Q N N Y F I K F N H I K V L V N N * I P F
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1540     1550     1560     1570     1580     1590     1600     1610     1620
tattgctgtttaaatttatgatagttgtgatatttaaccaatttaaggtactgacatttttaaatgtggcactttacacttaaa
Y C C L N L C I * L * Y L T N L R Y * H F L N L R H F I L K
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1630     1640     1650     1660     1670     1680     1690     1700     1710
ttttgttttttaattgataagtcataaattattacaatagtgatcattgccaatcagcagcatattgcaataatgttgaatttat
F L F I L M Y K S * I I T I V Y H C Q S A A Y C N N V V I Y
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1720     1730     1740     1750     1760     1770     1780     1790     1800
ggtaaaaacgaactactctgtgtctgttttaagtgtttaattctatcttctgacaatatcaagaaaactctaattgccaataaaa
G K N E Y F C C S G F K C L N S I F L T I S R K L * L P K K
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1810
.....|.....|
aaaaaaaaaa
K K K

```

**Figura 12.** Allineamento del trascritto di 1811 bp corrispondente al gene che codifica Numb in *C. intestinalis* con la relativa sequenza amminoacidica. Nella figura sono evidenziate: le sequenze nucleotidiche su cui sono stati costruiti gli oligonucleotidi per l'amplificazione mediante PCR (in giallo), la sequenza amminoacidica del dominio PTB (in blu), la sequenza del peptide immunogenico contro il quale è stato prodotto l'anticorpo policlonale per Ci-Numb (in rosso) e la sequenza corrispondente alla regione PRR (in verde).

La sequenza nucleotidica di *Ci-Numb* codifica per una proteina di 445 amminoacidi con la regione all'N-terminale corrispondente al PTB domain che risulta essere la più conservata, come evidenziato dagli allineamenti della sequenza

amminoacidica degli omologhi di Numb dei vari organismi (Fig. 13) . La regione relativa al PRR domain è scarsamente conservata e l'EH domain è assente.



**Figura 13.** Allineamento della sequenza amminoacidica di Ci-Numb con le sequenze aminoacidiche omologhe di Numb nell'uomo, nel topo, in *Zebrafish* e in *Drosophila*.

L'espressione del gene *Ci-Numb* è stata valutata per ibridazione *in situ* nel faringe e nell'apparato digerente, tessuti identificati come sede di proliferazione cellulare attraverso uno studio preliminare che prevedeva l'uso di un anticorpo anti-

PCNA. L'indagine per immunistoichimica a livello di microscopia ottica è stata poi utilizzata per studiare l'espressione della proteina Ci-Numb. Preceduta da uno studio morfologico, la stessa tecnica è stata poi applicata a livello di microscopia elettronica a trasmissione ai tessuti che esprimevano il gene, per verificare la loro interpretazione come possibili siti ematopoietici e definire i tipi cellulari in essi contenuti.

Infine, è stata analizzata l'espressione di *Ci-Numb* negli stadi post-metamorfosi mediante tecniche di ibridazione *in situ* in "Whole mount" per indagare sui tempi e sulle strutture interessate all'ematopoiesi in fasi iniziali dello sviluppo dell'adulto. La morfologia dei tessuti in formazione è stata valutata con più dettagliate osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione.

## **MATERIALE E METODI**

## **Prelievo di emociti**

L'emolinfa è stata prelevata dalla cavità periviscerale mediante l'uso di una siringa. Per ottenere gli emociti, l'emolinfa è stata immediatamente diluita 1:2 in acqua di mare artificiale fredda, priva di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , contenente 1 mM EDTA (pH 7.4) (FSW-EDTA). Dopo centrifugazione a 500 g per 5 minuti, a 4°C, il pellet di emociti è stato risospeso in "marine solution" (MS): 0.45 M NaCl, 26 mM  $\text{MgCl}_2$ , 11 mM KCl, 45 mM Tris e 12 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.4). Le cellule presenti nella sospensione sono state contate mediante l'uso della camera di Neubauer. Il volume della sospensione è stato modificato in maniera da ottenere la concentrazione di  $3 \times 10^6$  cellule/ml e 100  $\mu\text{l}$  di questa diluizione vengono alloggiati su vetrini Superfrost plus (Thermo Scientific) sui quali sono stati ricavati dei pozzetti con isolatori adesivi in silicone (Sigma-Aldrich). Le cellule del sangue sono quindi lasciate aderire per 15 minuti e poi fissate in una soluzione contenente paraformaldeide al 4% - MOPS pH 7,5 0,1M - NaCl 0,5 M. I vetrini sono stati poi utilizzati per esperimenti di ibridazione *in situ*.

## **“Western blot”**

A campioni di faringe e stomaco, prelevati da esemplari di *C. intestinalis* raccolti nel Golfo di Napoli e mantenuti in vasche contenenti acqua di mare circolante fino all'uso, è stata aggiunto un "sample buffer" (60 mM Tris pH 6.8, con 2% SDS, 10% 2-mercaptoetanolo, 10% glicerolo, 0.01% blu di bromofenolo,) contenente inibitori di proteasi, Mini Complete (Roche Applied Science), nelle quantità suggerite dal produttore.

I campioni sono stati omogeneizzati a freddo mediante tre cicli di 30 secondi con Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel Ika-Labortechnik); successivamente sono stati bolliti per 10 minuti, ed infine centrifugati a temperatura ambiente per 30 minuti a 13'400 rpm in una centrifuga Mini Spin (Eppendorf). Il sopranatante è stato recuperato e conservato in aliquote a -20°C. La reattività degli estratti proteici da faringe di *Ciona* con l'anticorpo anti-Ci-Numb è stata saggiata mediante "Western blotting", descritto di seguito in maggior dettaglio.

Le proteine, 20 µl di proteina/pozzetto, sono state separate su gel di poliacrilammide al 10% contenente SDS (SDS-PAGE) (Tab.). La corsa elettroforetica è stata effettuata con "Running buffer" 1x (Tab.) a 100 Volts in un apparecchio Mini Protean 2 Cell (Bio-Rad Laboratories). Sono stati usati come standard di riferimento 10 µl di "Precision Plus Protein Standard All Blue" (Bio-Rad Laboratories). Le proteine sono state successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) mediante l'uso dell'apparecchio Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) in "Blotting buffer" 1x (Tab.), applicando 100 Volts, per 45 minuti. La presenza della banda corrispondente a Ci-Numb negli estratti proteici separati per elettroforesi è stata rilevata mediante l'uso dell'anticorpo, purificato per affinità, anti-Ci-Numb ottenuto in coniglio (Primm), alla concentrazione di 10 µg/ml. Legami non-specifici degli anticorpi alla membrana sono stati prevenuti mediante incubazione del filtro in "blocking buffer" (PBS 1x, contenente 3% latte e 0.05% Tween 20). Il legame tra l'antigene e gli anticorpi specifici è stato rilevato mediante l'uso di un anticorpo secondario coniugato con perossidasi, IgG-HRP (Amersham Biosciences), secondo le indicazioni del produttore.

Le incubazioni con gli anticorpi specifici e con il secondario sono state effettuate rispettivamente per 2 e 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane, dopo

ogni incubazione, sono state lavate tre volte per 10 minuti con PBS 1x (Tab.) contenente Tween 20 (0.05%). Le proteine sono state rivelate mediante l'uso del kit ECL plus (Amersham Biosciences).

## **Immunoistochimica su sezione**

Campioni di faringe e stomaco sono stati prelevati e fissati in Bouin (acido picrico, soluzione satura: formaldeide 37%: acido acetico glaciale, nel rapporto 15:5:1) “over night”. Per rimuovere completamente il fissativo, i campioni sono stati lavati in etanolo al 75% finché il colore giallo, tipico del fissativo, scompariva. Dopo la disidratazione, effettuata attraverso passaggi in etanolo a concentrazione crescente, fino ad etanolo assoluto, i campioni sono stati inclusi in paraffina e sezioni di 7  $\mu\text{m}$  sono state preparate con un microtomo rotativo RM2255 (Leica). Le fette sono state montate su vetrini Superfrost plus (Thermo Scientific). I vetrini sono stati, quindi, sparaffinati in xilolo (3 passaggi da 10 min) e lavati 2 volte per 3 min in etanolo 100%; successivamente sono stati reidratati attraverso una serie di passaggi in etanolo a concentrazione decrescente (95%, 75% e 50%, 3 minuti ciascuno) e infine in acqua distillata per 5 min. Sono stati, poi, equilibrati in tampone TBS con 3 passaggi da 5 min. Per inibire le perossidasi endogene, le sezioni sono state trattate per 20 min con perossido d'idrogeno allo 0.3% in TBS e poi lavate con tampone TBS; dopo un passaggio in TBS contenente 10% “normal goat serum” per 10 min, sono stati lavati tre volte per 5 minuti in TBS. Quindi, le sezioni sono state incubate con anticorpo primario, anti-PCNA ottenuto in topo (Sigma) o anti-Ci-Numb, entrambi diluiti in TBS con BSA all'1%, o/n a 4°C in camera umida; l'anticorpo anti-PCNA è stato utilizzato

con una diluizione di 1:100 mentre l'anticorpo anti-Ci-Numb è stato utilizzato alla concentrazione di 50 µg/ml. Vetrini di controllo sono stati trattati in parallelo con le IgG preimmuni corrispondenti, alle stesse concentrazioni degli anticorpi primari.

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

## **Amplificazione mediante PCR**

Il cDNA a singolo filamento di *Ci-Numb* è stato amplificato per PCR utilizzando i seguenti oligonucleotidi specifici:

- oligo senso 5' - GATGCGAACGTTGCGACAAA - 3'
- oligo antisenso 5' - ATTGGCCTGTGCAGTCTGCT - 3'



disegnati, in modo da contenere la regione codificante per il dominio PTB, in base all'analisi della sequenza nucleotidica di 1811 bp riportata nel modello genico ci0100139295 (Fig. 12).

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 50 µl con i seguenti componenti: 2 µl di campione di cDNA, 5 µl tampone di sintesi con MgCl<sub>2</sub> "PCR reaction buffer" 10x (Roche), 5 µl 2 mM dNTP mix, 10 pmoli per ogni oligonucleotide, H<sub>2</sub>O ad un volume finale di 35.5 µl. La miscela è stata tenuta alla temperatura di denaturazione di 94°C per 3 minuti e dopo la denaturazione sono stati aggiunti 0.5 µl di Taq DNA polimerasi. I successivi 30 cicli di amplificazione sono stati condotti in un "PTC-100 Peltier Thermal Cycler" (MJ Research), secondo il seguente schema:

- 94°C per 15 secondi
- 54.2°C per 30 secondi
- 72°C per 1 minuto

Per l'aggiunta di nucleotidi adenilici all'estremità 3' dei prodotti di amplificazione, la miscela del probe è stata ulteriormente sottoposta ad un ciclo di 10 minuti a 72°C.

### **Protocollo per la preparazione di tessuti e di juvenile per la microscopia elettronica**

Per le osservazioni al microscopio elettronico i campioni di faringe, stomaco e i juvenile sono stati fissati in una soluzione di glutaraldeide al 2,5%, paraformaldeide-MOPS al 4% e sodio-cacodilato 0,1 M preparata in acqua di mare "over night" a 4°C. Successivamente i campioni sono stati lavati in sodio-cacodilato 0,1 M sciolto in acqua di mare prima di una postfissazione di un'ora in una soluzione di osmio 1%, saccarosio

4% e sodio-cacodilato 0,1M preparata in acqua di mare. Dopo la post-fissazione i campioni vengono lavati in sodio-cacodilato 0,1 M preparato in acqua distillata e disidratati in concentrazioni crescenti di EtOH, 50%, 70%, 90% e 3 lavaggi di 30 minuti in 100%. Si procede poi all'inclusione, incubando i campioni per 10 ore o per tutta la notte in resina. In seguito, i campioni sono orientati in modo consono al taglio nei supporti specifici, per poi procedere al taglio in sezioni di 1  $\mu\text{m}$  con l'ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica). Le sezioni vengono poi trasferite su "greed" (EMS) di rame o nichel e contrastate con uranile acetato e piombo citrato per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (Leo 912 AB- Zeiss).

### **“Immunogold”**

Per gli esperimenti di “Immunogold” i campioni di faringe, stomaco e i “juvenile” sono stati fissati in una soluzione di glutaraldeide al 2,5% e paraformaldeide-MOPS al 4% preparata in acqua di mare o/n a 4°C. Successivamente i campioni sono stati lavati in acqua di mare e poi disidratati in concentrazioni crescenti di EtOH, 50%, 70%, 90% e 3 lavaggi di 30 minuti in 100%. Si procede poi all'inclusione e al taglio come descritto in precedenza.

Negli esperimenti di immunogold i “greed” contenenti le sezioni vengono prima lavati per 3 volte in acqua sterile filtrata per 5 minuti e poi incubati per 15 minuti in una soluzione di TBS contenente BSA all'1%. Quindi, le sezioni sono state incubate con anticorpo primario, anti-PCNA (Sigma) o anti-Ci-Numb, entrambi diluiti in TBS con BSA all'1%, o/n a 4°C in camera umida; l'anticorpo anti-PCNA è stato utilizzato con una diluizione di 1:250 mentre l'anticorpo anti-Ci-Numb è stato utilizzato alla

concentrazione di 50 µg/ml. “Greed” di controllo sono stati trattati in parallelo con le IgG preimmuni corrispondenti, alle stesse concentrazioni degli anticorpi primari. Al termine dell’incubazione con gli anticorpi primari, i greed sono stati lavati :

5 volte per 2 minuti in TBS

5 volte per 2 minuti in TBS con lo 0,5% di BSA

1 volta per 15 minuti in TBS con l’1% di BSA

Successivamente sono stati incubati per 1 h a temperatura ambiente con l’anticorpo secondario corrispondente diluito in TBS 1:50.

Per i “greed” trattati con l’anticorpo anti-Ci-Numb è stato usato un anticorpo secondario anti-rabbit IgG (BB International) coniugato con particelle di oro colloidale del diametro di 30 nm mentre, per i “greed” trattati con l’anticorpo anti-PCNA è stato utilizzato un anticorpo secondario anti-mouse IgG (BB International) coniugato con particelle di oro colloidale del diametro di 15 nm. Al termine dell’incubazione con gli anticorpi secondari, i “greed” sono stati lavati :

1 volta per 15 minuti in TBS con l’1% di BSA

5 volte per 2 minuti in TBS con lo 0,5% di BSA

5 volte per 2 minuti in TBS

3 volte per 2 minuti in acqua sterile filtrata

Le sezioni sono state poi contrastate con uranile acetato e piombo citrato per l’osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (Leo 912 AB- Zeiss).

## Trascrizione *in vitro*

Per generare la ribosonda, utilizzata negli esperimenti di ibridazione *in situ*, è stato utilizzato il segmento genico amplificato per PCR e clonato nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen). Il segmento è stato poi linearizzato alternativamente con un enzima che taglia al 5' del segmento genico, per ottenere lo stampo per la ribosonda antisenso, e con un enzima che taglia al 3' del segmento genico, per ottenere lo stampo della ribosonda senso. Un'aliquota di ogni reazione è stata caricata su un gel di agarosio 1% in TBE 0,5X (Tab.) per verificarne la qualità. In seguito, per liberare i campioni dalle proteine contaminanti che potrebbero creare problemi nei passaggi successivi, si è proceduto al trattamento con proteinasi K (50 µg/ml) ad una temperatura di 45°C per 30 minuti. Si è effettuata, quindi, un'estrazione con un volume di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (24:24:1) ed una seconda estrazione con un volume di cloroformio:alcool isoamilico (24:1). Infine il DNA plasmidico è stato precipitato con 0,1 volumi di Na acetato 3 M pH 5,2 e 2,5 volumi di etanolo assoluto per 30 minuti a -20°C. Dopo la precipitazione il DNA è stato lavato con etanolo 70% e quindi risospeso in H<sub>2</sub>O sterile trattata con DEPC (dietilpirocarbonato). Aliquote di ognuno dei due campioni sono state analizzate su gel di agarosio 1% in TBE 0,5X per valutarne la concentrazione.

La trascrizione *in vitro* è stata effettuata utilizzando il “kit DIG-RNA labeling” fornito dalla ditta Roche. Con questo sistema è possibile marcare gli RNA messaggeri prodotti *in vitro* utilizzando la digossigenina, un composto steroide, isolato dalla pianta *Digitalis planaria*. La digossigenina funziona come aptene legato covalentemente, attraverso un braccio spaziatore contenente 11 atomi di carbonio, alla posizione C-5 di uno dei precursori della sintesi dell'RNA: l'UTP. Il precursore DIG-UTP verrà

incorporato nel frammento di RNA neosintetizzato, perchè riconosciuto come normale nucleotide dalle RNA polimerasi utilizzate, producendo così sonde di RNA marcate.

Per produrre gli RNA messaggeri, senso ed antisenso, è stata preparata dunque la seguente miscela di reazione:

- DNA plasmidico linearizzato 1 µg
- Miscela di NTP 10X 2 µl
- Tampone di trascrizione 10X 2 µl
- Inibitore delle RNAsi 20 U/µl 1 µl
- T7 RNA polimerasi 20 U/µl 0,5 µl

oppure

- Sp6 RNA polimerasi 20 U/µl 0,5 µl

aggiungendo H<sub>2</sub>O trattata con DEPC fino ad un volume finale di 20 µl. La reazione di sintesi è stata effettuata alla temperatura di 37°C per 2 h, successivamente sono stati aggiunti 2 µl di DNAasi I, priva di attività RNAasica (10 U/µl), ed incubata ancora a 37°C per 15 minuti per rimuovere il DNA stampo. La reazione è stata infine bloccata mediante aggiunta di 2 µl di EDTA 0,2 M pH 8. Le ribosonde sono state purificate su colonnine mini Quick Spin RNA (Boehringer Mannheim) per eliminare l'eccesso di nucleotidi. Un'aliquota delle ribosonde è stata caricata su gel di agarosio al 2% in TAE 1M pH 6,5 (Tab.) per verificarne la qualità.

## **Quantizzazione delle ribosonde**

Per valutare la concentrazione degli RNA, prodotti per trascrizione *in vitro*, è stato utilizzato un saggio immunoenzimatico, che prevede l'uso di anticorpi anti-

digossigenina coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina. Tale enzima in presenza di due substrati, il 5-bromo 4-cloro 3-indolil-fosfato (BCIP) ed il sale Nitro blu di tetrazolio (NBT), produce un substrato insolubile di colore blu. La visualizzazione delle molecole di RNA è determinata confrontando l'intensità del colore sviluppato da diverse diluizioni seriali delle stesse con quella corrispondente alle diluizioni seriali di un RNA marcato di controllo a concentrazione nota. In genere si preparano cinque diluizioni seriali 1:4 dell'RNA di riferimento e delle ribosonde nel tampone 1 (H<sub>2</sub>O DEPC, SSC 20x e formaldeide nel rapporto 5:3:2) ed 1µl di ciascuna diluizione è deposto su un filtro di nylon e lasciato asciugare all'aria. Per consentire all'RNA di legarsi stabilmente al filtro, questo è poi esposto a radiazioni UV per 30 secondi.

Successivamente il filtro è equilibrato per 30 minuti nel tampone 2 (MBT e Blocking solution nel rapporto 9:1) al quale si aggiunge l'anticorpo anti-DIG AP (0,15 U/µl) (Roche) lasciandolo a temperatura ambiente per 1h. L'eccesso di anticorpo è allontanato facendo due lavaggi di 15 minuti ciascuno con il tampone MBT (Tab.). Il filtro è poi equilibrato per 5 minuti nel tampone AP (Tab.) di rivelazione e, successivamente, incubato al buio in una soluzione di rivelazione composta dal tampone AP a cui si aggiungono 3,5 µl/ml di BCIP 50mg/ml e NBT 100mg/ml. Il precipitato colorato comincia a formarsi dopo circa 10 minuti; la reazione è quindi bloccata lavando il filtro in un opportuno volume di H<sub>2</sub>O sterile.

## **Ibridazione *in situ* su sezioni**

L'ibridazione *in situ* con le ribosonde marcate con digossigenina è stata effettuata su sezioni contenenti le regioni di stomaco e faringe di *C. intestinalis*. I campioni di faringe e stomaco sono stati prelevati e fissati in paraformaldeide al 4% "over night" a 4°C. Dopo la disidratazione, effettuata attraverso passaggi in etanolo a concentrazione crescente, fino ad etanolo assoluto, i campioni sono stati inclusi in paraffina e sezioni di 7 µm sono state preparate con un microtomo rotativo RM2255 (Leica). Le fette sono state montate su vetrini Superfrost plus (Thermo Scientific). Le sezioni così ottenute sono state poi sparaffinate in xilene e reidratate in etanolo, con percentuali decrescenti, diluito in H<sub>2</sub>O sterile trattata con DEPC:

- 3 volte per 10 minuti in xilene
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 100%
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 95%
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 90%
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 80%
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 60%
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 50%
- 1 volta per 2 minuti in EtOH 30%

Dopo la reidratazione i campioni sono stati lavati 2 volte per 5 minuti in PBS (Tab.), sottoposti ad una post-fissazione per 30 minuti a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4% - MOPS pH 7,5 0,1M - NaCl 0,5 M e lavati ancora 2 volte per 5 minuti in PBS. Per aumentare l'accessibilità delle sonde agli RNA messaggero

bersaglio, le sezioni sono state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente in una soluzione contenente:

Proteinasi K 1.80 µg/ml

Tris-HCl 20 mM

EDTA pH 7,2 1 mM

Dopo la digestione con la proteasi, è stato eseguito un lavaggio in PBS per 5 minuti ed un'altra post-fissazione a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4% in PBS. Si procede lavando i campioni 2 volte per 5 minuti in PBS, 2 volte per 5 minuti in SSC 2X ed 1 volta nel tampone Tris/Glicina (Tab). A questo punto le sezioni erano pronte per l'ibridazione. Ad ogni singolo vetrino è stata aggiunta una soluzione di ibridazione (Tab.) nella quale erano stati precedentemente diluiti 100 ng di sonda, costituita da RNA marcato con DIG. I vetrini sono stati coperti singolarmente con strisce rettangolari di Parafilm ed incubati per 16 h a 60°C.

Dopo 3 lavaggi di 20 minuti a temperatura ambiente in SSC 5X, i campioni sono stati lavati per 40 minuti a 60°C in una soluzione contenente formammide al 20% e SSC 0.5X pre-riscaldata a 60°C, e, poi, a temperatura ambiente per un tempo non definito necessario affinché la temperatura della soluzione scendesse a circa 37°C. Successivamente è stato eseguito un lavaggio per 15 minuti a 37°C in NTE (Tab) pre-riscaldato a 37°C. Per eliminare l'eccesso di ribosonda non legata, le sezioni sono state trattate con RNAasi diluita ad una concentrazione di 10 µg/ml in NTE per 30 minuti a 37°C, quindi lavati in NTE per 15 minuti a 37°C.

E' stato eseguito, poi, un lavaggio in formammide al 20% e SSC 0.5X per 30 minuti a 60°C ed un lavaggio in SSC 2X per 30 minuti a temperatura ambiente. Prima dell'aggiunta dell'anticorpo anti-DIG, i campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione contenente Blocking Solution (Tab) al 2% in



MBT. Ad ogni sezione è stata aggiunta la soluzione Blocking Solution al 2% in MBT contenente l'anticorpo anti-DIG (750 U/ml) (Roche) diluito 1:2000 ed ogni vetrino è stato ricoperto con strisce rettangolari di Parafilm.

Dopo un'incubazione per tutta la notte a 4°C, i campioni sono stati lavati per 6 volte a temperatura ambiente in TBS 100 mM ed 1 volta per 30 minuti in una soluzione contenente Tween-20 allo 0,1% e Levamisole ad una concentrazione di 0,5 mg/ml. L'incubazione in quest'ultima soluzione è necessaria per inattivare possibili fosfatasi endogene.

La rivelazione è effettuata utilizzando il BM-purple (Roche), un substrato per la fosfatasi alcalina. Le sezioni sono incubate in una soluzione contenente Tween-20 allo 0,1% e Levamisole (0,5 mg/ml) per ogni ml di substrato. In genere la formazione del precipitato colorato avviene in 2-3 h. La reazione è poi bloccata lavando con PBS ed EDTA 1mM per 30 minuti. L'osservazione e la fotografia sono state condotte utilizzando un microscopio ottico Axiophot (Zeiss) e le immagini ottenute sono state acquisite col programma Axiovision.

### **Ibridazione *in situ* in “Whole mount”**

L'ibridazione *in situ* in “Whole mount” con le ribosonde marcate con digossigenina è stata effettuata su “juvenile” fissati come descritto nel paragrafo: “Immunogold”. I “juvenile” sono stati reidratati in etanolo, con percentuali decrescenti, diluito in H<sub>2</sub>O sterile trattata con DEPC:

1 volta per 15 minuti in EtOH 50%

1 volta per 10 minuti in EtOH 50%

1 volta per 15 minuti in EtOH 30%

1 volta per 10 minuti in EtOH 30%

Dopo la reidratazione i campioni sono stati lavati 2 volte per 5 minuti in PBT (PBS con 0,1% di Tween 20), sottoposti ad una post-fissazione per un'ora a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4% in PBT e lavati ancora 2 volte per 5 minuti in PBS con 0,1% di Tween 20. Per aumentare l'accessibilità delle sonde agli RNA messaggero bersaglio, i juvenile sono stati incubati per 30 minuti a 37°C in una soluzione di PBT contenente 0,3 µg/ml di Proteinasi K.

Dopo la digestione con la proteasi, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 5 minuti in PBT ed un'altra post-fissazione a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4% in PBT. Si procede lavando i campioni 3 volte per 5 minuti in PBT, 10 minuti in trietanolamina 0,1 M a pH 8.0 e 3 volte per 10 minuti in anidride acetica allo 0,25 %. A questo punto i "juvenile" erano pronti per la pre-ibridazione di un'ora a 42°C e la successiva ibridazione. Per l'ibridazione i "juvenile" sono stati incubati per 16 h a 42°C con una soluzione di ibridazione (Tab) nella quale sono stati precedentemente diluiti 0,1 ng/µl di sonda, costituita da RNA marcato con DIG.

Dopo 2 lavaggi di 20 minuti a 55°C in 4X SSC, formammide al 50% e 0,1% Tween 20, i campioni sono stati lavati per 2 volte per 20 min a 55°C in 2X SSC, formammide al 50% e 0,1% Tween 20. Per eliminare l'eccesso di ribosonda non legata, i campioni sono stati trattati con RNAasi diluita ad una concentrazione di 20µg/ml in una soluzione A (Tab.) per 30 minuti a 37°C.

Sono stati eseguiti, poi, i seguenti lavaggi:

2 lavaggi in formammide al 50% e 2X SSC per 20 minuti a 55°C

2 lavaggi in formammide al 50% e 0.5X SSC per 20 minuti a 55°C

2 lavaggi in formammide al 50% e 0.2X SSC per 20 minuti a 55°C

1 lavaggio di 15 minuti a temperatura ambiente in PBT e SSC 0.2X in rapporto 1:1.

Prima dell'aggiunta dell'anticorpo anti-DIG, i campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione contenente Blocking solution allo 0.5% in PBT. Successivamente è stata aggiunta la soluzione Blocking Solution allo 0.5% in PBT contenente l'anticorpo anti-DIG (750 U/ml) (Roche) diluito 1:3000. Dopo un'incubazione per un'ora a temperatura ambiente, i campioni sono stati lavati per 4 volte a temperatura ambiente in PBS per 10 min e conservati over night a 4°C.

I campioni erano poi equilibrati nel tampone AP (Tab.) di rivelazione e, successivamente, incubati al buio in una soluzione di rivelazione composta dal tampone AP a cui si aggiungono 4,5 µl/ml NBT 100mg/ml e 3,5 µl/ml di BCIP 50mg/ml. La detection viene seguita detunicando i "juvenile" con micro-ago. La reazione è poi bloccata lavando con PBT. L'osservazione e le foto sono state condotte utilizzando un microscopio ottico Axiophot (Zeiss) e le immagini ottenute sono state acquisite col programma Axiovision.

## **RISULTATI**

## Ricerca di geni omologhi in *C.intestinalis* mediante PCR

L'identificazione e l'amplificazione degli omologhi in *C.intestinalis* dei geni *Ikaros*, *Bmi*, *PU.1*, *GATA-a* e *Numb* è stata effettuata mediante PCR.

L'analisi preliminare di *Ci-Ikaros* è stata condotta mediante PCR su cDNA sintetizzato da RNA totale, estratto da embrioni allo stadio di 110 cellule, utilizzando i seguenti oligonucleotidi specifici:

- oligo senso 5' - ACAAAT GACTGCTTGC GACTC - 3'
- oligo antisenso 5' - CGCTTTCTTCTCTTTCACCATC - 3'

costruiti, in modo da contenere il suo dominio “*zinc finger*” all'estremità ammino terminale, sulla sequenza nucleotidica di 1155 bp riportata nel modello genico ci0100144428, Scaffold\_26:62221-65539, del genoma di *C. intestinalis*.

Per l'identificazione di *Ci-PU.1* la PCR è stata condotta su cDNA sintetizzato da RNA totale estratto da intestino e utilizzando i seguenti oligo specifici:

- oligo senso 5' - AGGAGAAAGCGAAGGCAACCGA - 3'
- oligo antisenso 5' - CAAAGCGCGTTATTACAATG - 3'

costruiti sulla sequenza nucleotidica di 584 bp riportata nel modello genico ci0100140005, Scaffold\_271:69202-70362, del genoma di *C. intestinalis*.

L'omologo di *C. intestinalis* del gene *Bmi* è stato amplificato mediante PCR condotta su cDNA sintetizzato da RNA totale, estratto da uova defollicolate, utilizzando i seguenti oligonucleotidi specifici:

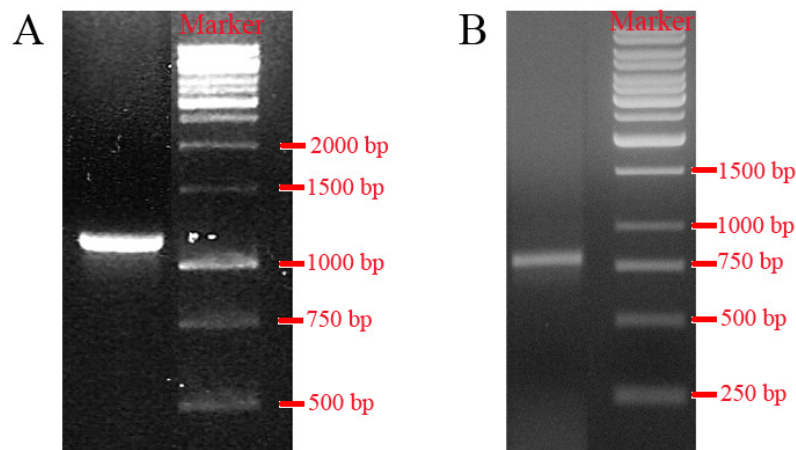
- oligo senso 5' - GCCGTCAT AATGAACCGA AGTG - 3'
- oligo antisenso 5' - AATGGCAGCTTGGCTCTCTCGTGT - 3'

costruiti, in modo da contenere il suo dominio “*ring finger*”, sulla sequenza nucleotidica di 1168 bp riportata nel modello genico ci0100133709, Scaffold\_868:9658-17220, del genoma di *C. intestinalis*.

Il gene *GATA-a* di *C. intestinalis* è stato identificato mediante PCR condotta su cDNA sintetizzato da RNA totale, estratto da embrioni allo stadio di 110 cellule, utilizzando i seguenti oligonucleotidi specifici:

- oligo senso 5' - CAGTGAAGAACCCGCAGAA - 3'
- oligo antisenso 5' - TCCAATAGCGAAGCCGATAGAA - 3'

costruiti, in modo da contenere entrambi i suoi domini “*zing finger*”, sulla sequenza nucleotidica di 2740 bp riportata nel modello genico ci0100133709, Scaffold\_69:70745-82038, del genoma di *C. intestinalis*. La PCR ha dato come risultato una singola banda di amplificato del peso atteso, di circa 1156 bp (Fig. 14 A).



**Figura 14.** Analisi condotta mediante PCR su cDNA dello stadio embrionale di 110 cellule. (A) Amplificato del cDNA di *Ci-GATA-a*. (B) Amplificato del cDNA di *Ci-Numb*.

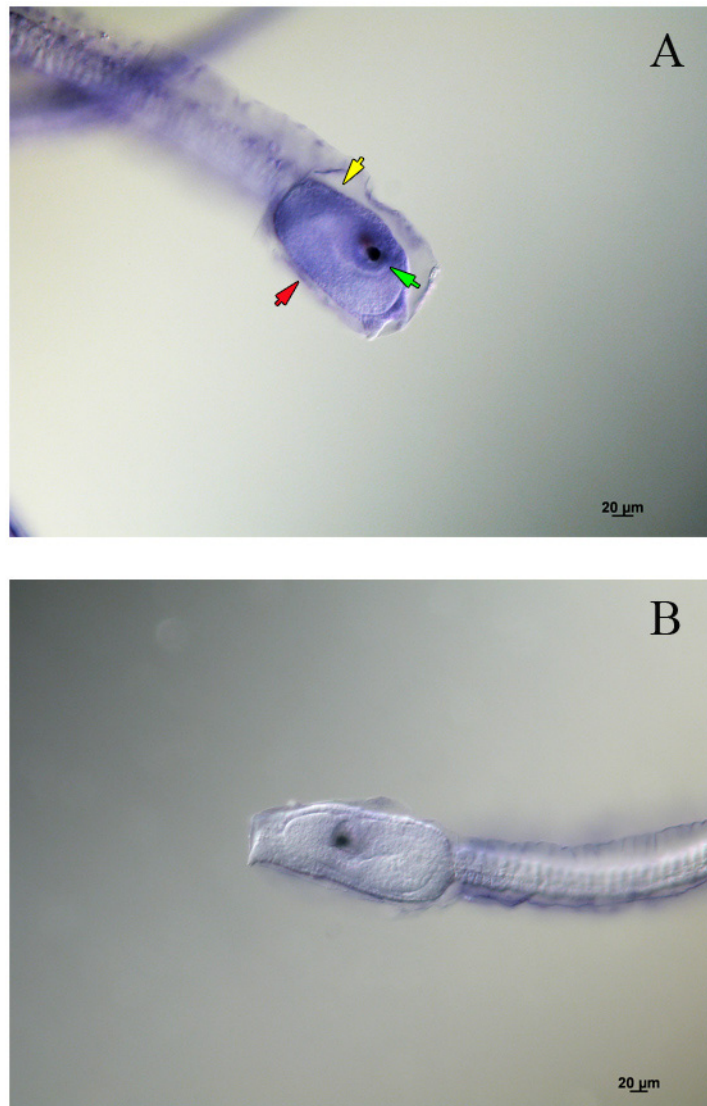
Il cDNA a singolo filamento di *Ci-Numb* è stato amplificato per PCR, come già descritto in “Materiale e Metodi”, mostrando una singola banda del peso atteso, di circa 814 bp (Fig. 14 B).

I prodotti PCR di tutti i geni citati sono stati utilizzati per generare ribosonde utilizzate negli esperimenti di ibridazione *in situ*. Con queste tecniche i soli *Ci-GATA-a* e *Ci-Numb* mostravano pattern di espressione di interesse per la mia indagine.

### **Reazioni di ibridazione *in situ* in “Whole mount” per *Ci-GATA-a* su larve.**

L'espressione di *Ci-GATA-a* è stata valutata nello stadio larvale mediante tecniche di ibridazione *in situ* in “Whole mount”. La tecnica permette di visualizzare la distribuzione spaziale dell'RNA messaggero di *Ci-GATA-a* mediante l'uso di sonde antisense di RNA marcate con digossigenina (DIG-UTP). Contemporaneamente altre larve sono state ibridate mediante l'utilizzo di sonde senso come controllo. Questi esperimenti mostravano un'espressione di *Ci-GATA-a* nelle regioni corrispondenti a tre diversi tessuti dello stadio larvale: mesenchima, vescicola neurale e “trunk lateral cells” (Fig. 15).

Questo risultato confermava dati già presenti in letteratura (D'Ambrosio et al., 2003) ed era di particolare interesse per l'espressione di *Ci-GATA-a* nelle “trunk lateral cells” che si differenziano in diversi tessuti mesenchimali, tra cui le cellule del sangue. Nonostante le buone indicazioni, non è stato possibile utilizzare *Ci-GATA-a* per la mia indagine in quanto la sua espressione non è stata trovata negli stadi successivi dello sviluppo e nei tessuti dell'adulto.



**Figura 15.** Espressione di *Ci-GATA-a* in ibridazione *in situ* in “Whole mount” su larva. (A) Il gene è espresso in tre diversi tessuti :mesenchima (freccia rossa), vescicola neurale (freccia verde) e “trunk lateral cells” (freccia gialla). (B) Ibridazione di controllo ottenuta con la sonda senso.

### **Immunoistochimica anti-PCNA su sezioni**

L’identificazione di aree di proliferazione cellulare nel corpo dell’animale, tra le quali potessero essere identificati possibili siti di ematopoiesi, è stata considerata come un passo preliminare all’analisi dell’espressione di *Ci-Numb*. La possibilità offerta dalla

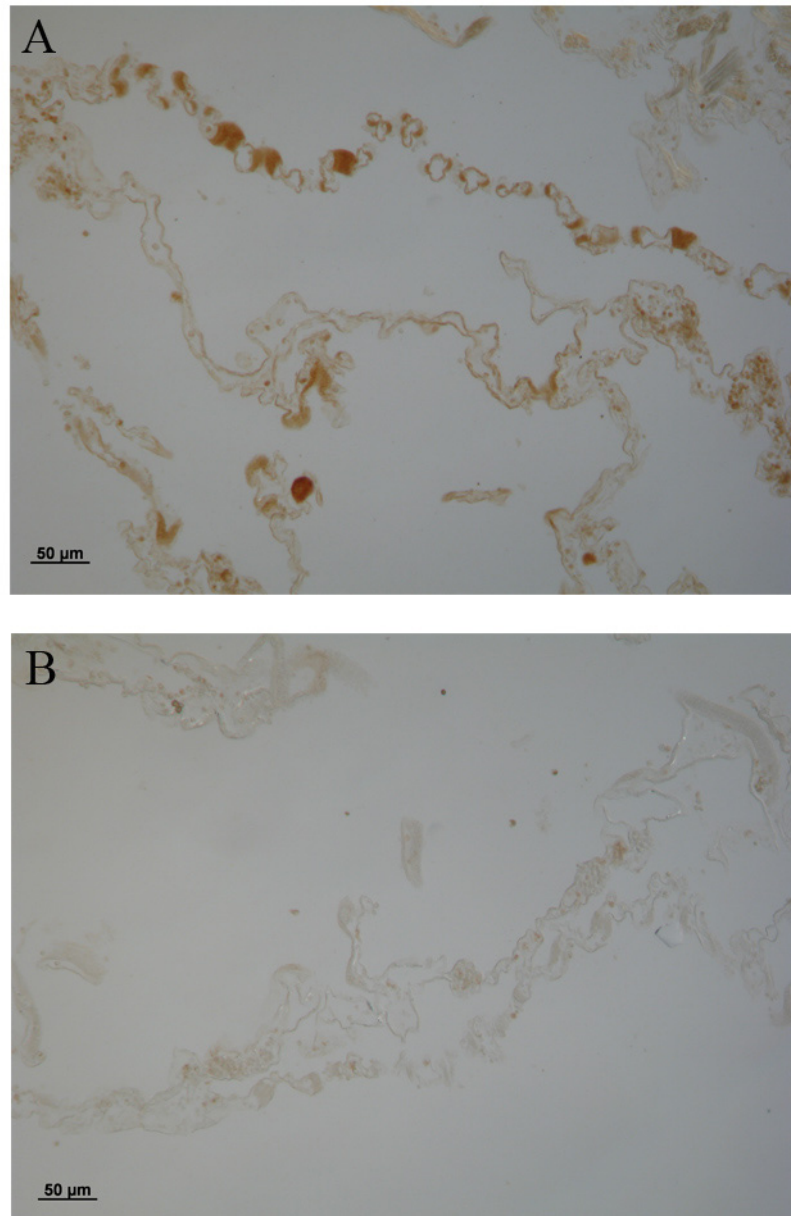


tecnica dell'immunoistochimica, basata sulla reazione antigene-anticorpo, di evidenziare la localizzazione specifica di una determinata molecola, non solo a livello di tessuti, ma anche a livello cellulare, è risultata particolarmente utile per questa indagine esplorativa. A tale scopo, infatti, è stata applicata una tecnica di immunoistochimica utilizzando anticorpi contro il "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA). Il gene *PCNA* codifica per una proteina associata alla DNA polimerasi  $\delta$ , inizialmente identificata come un antigene espresso nel nucleo delle cellule durante la sintesi del DNA nel corso della divisione cellulare. Il *PCNA* è, quindi, considerato ed utilizzato come un marcatore di cellule e tessuti in divisione (Bacchi and Gown, 1993).

Per la ricerca dei siti di proliferazione cellulare nei tessuti nell'adulto di *C. intestinalis* sono state utilizzate sezioni trasversali del corpo dell'animale, tagliate a vari livelli e, quindi, comprendenti strutture ed organi anatomicamente identificabili. Esperimenti di immunoistochimica utilizzando l'anticorpo anti-PCNA sono stati eseguiti su tali sezioni, parallelamente a reazioni di controllo, eseguite su sezioni comprendenti gli stessi tessuti, utilizzando IgG di topo come anticorpo primario.

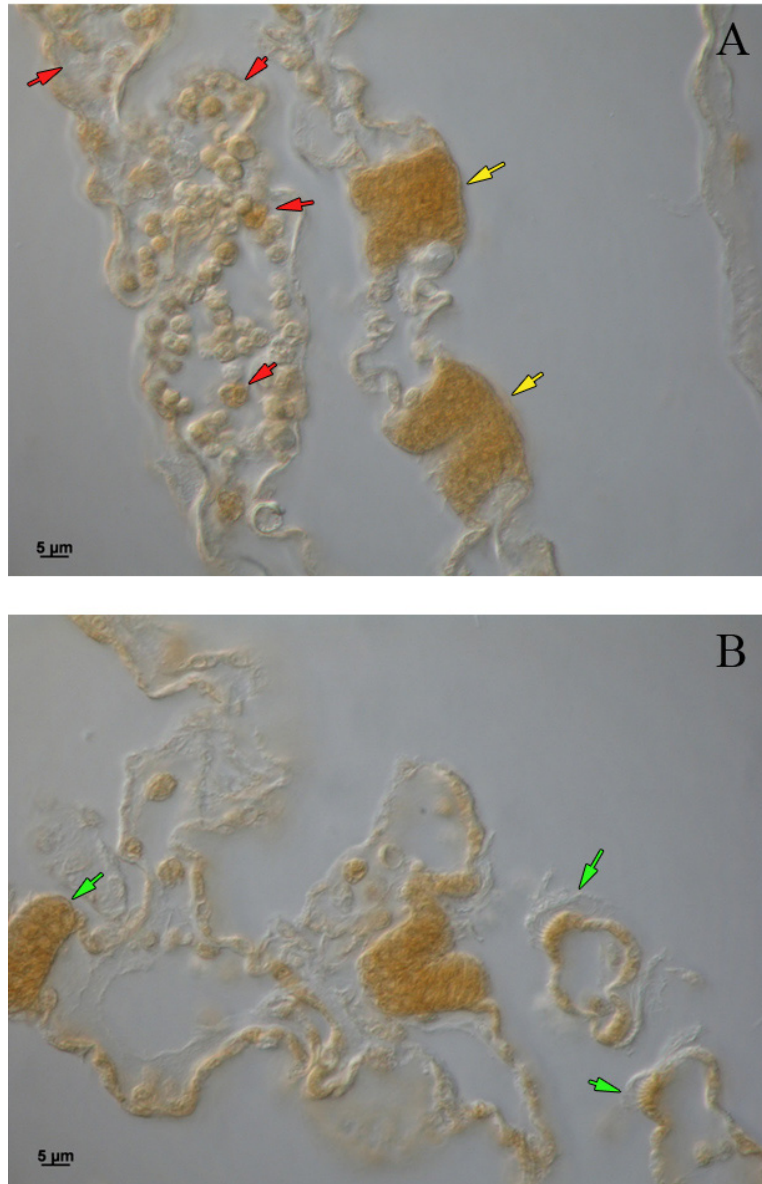
La rivelazione della reazione, effettuata con DAB, come descritto in dettaglio nella sezione "Materiali e Metodi", su sezioni tagliate a vari livelli della regione apicale del corpo dell'animale, mostrano un'intensa marcatura limitata alle strutture relative al faringe (Fig. 16 A). In particolare, il PCNA è espresso a livello di gruppi compatti di cellule, identificabili come emociti, localizzati nelle barre trasversali (Fig. 17 A). È interessante notare che questi "cluster" sono costituiti da singoli tipi cellulari, riconoscibili come amebociti, raccolti in anse del connettivo che delimita le barre. Proprio a livello del connettivo risultano marcate alcune delle cellule che lo costituiscono. In particolare, alcune aree fortemente positive sono costituite da cellule

distinguibili per una morfologia rotondeggiante, distinta dalla struttura fusiforme delle cellule che costituiscono le pareti delle barre trasversali (Fig. 17).



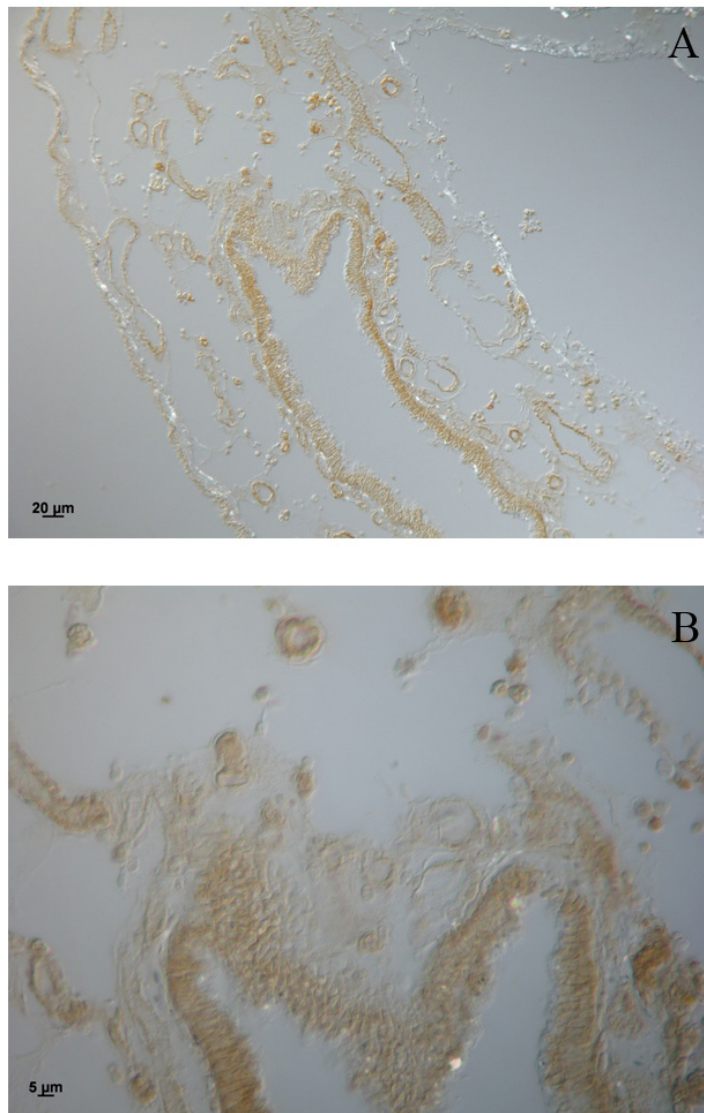
**Figura 16.** Esperimento di immunistochemica su sezioni di faringe utilizzando l' anticorpo anti-PCNA; la rivelazione è stata effettuata con DAB. **(A)** La marcatura di colore marrone è presente al livello delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali, delle cellule cigliatedello stigma e le papille primarie. **(B)** La sezione di controllo trattata con Ig purificate dal siero preimmune corrispondente.

Inoltre, a livello del faringe risultano positive per l'espressione del PCNA le cellule cigliate che costituiscono gli stigmi e le papille primarie (Fig. 17).



**Figura 17.** Immagini a maggiore ingrandimento dell'esperimento di immunohistochimica su sezioni di faringe mostrato in Figura 16. **(A)** Le frecce rosse indicano la marcatura a livello delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali; le frecce gialle indicano la marcatura delle papille primarie. **(B)** Le frecce verdi indicano la marcatura delle cellule cigliate dello stigma.

Nelle sezioni contenenti la regione basale del corpo dell'animale, nella quale sono raccolti la maggior parte degli organi, l'espressione di PCNA è presente nello stomaco. In particolare, sono marcate le cellule che costituiscono le anse della parete dello stomaco, zone descritte come sede di intensa attività proliferativa dovuta ad un continuo turn-over cellulare (Ermak, 1982), e gruppi di cellule del sangue localizzate nel tessuto connettivo adiacente a questo organo (Fig. 18).



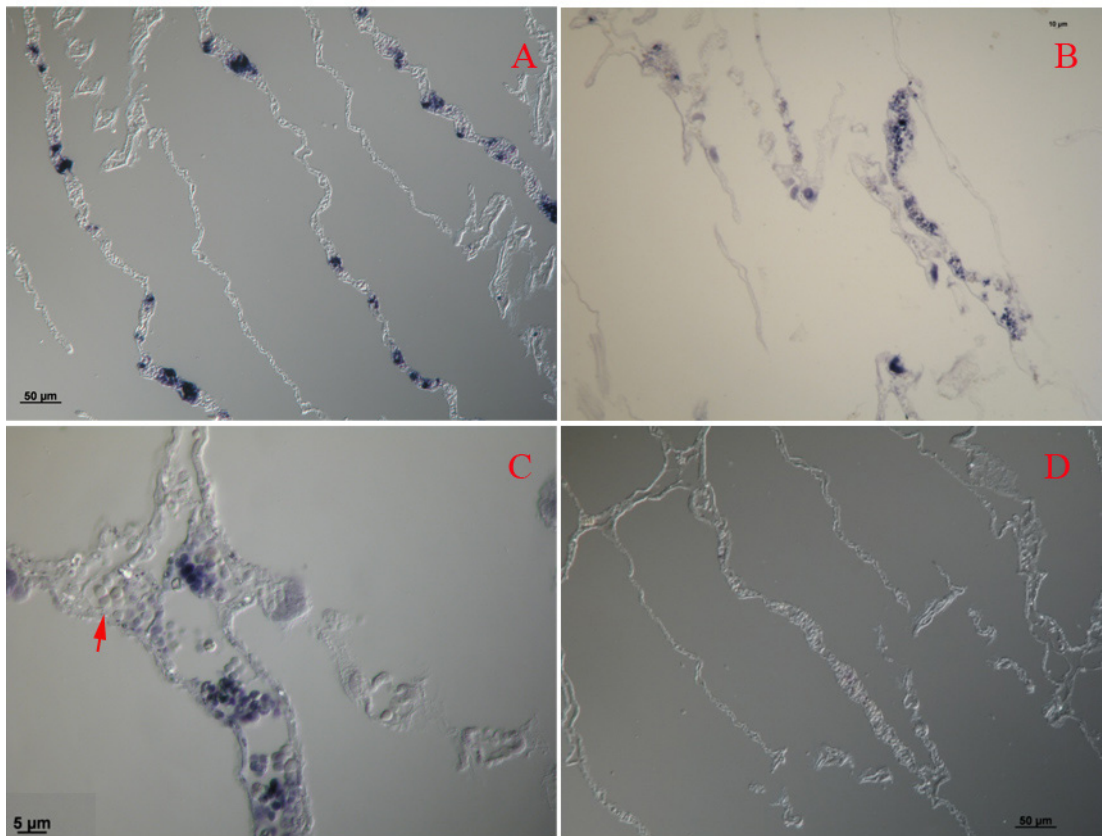
**Figura 18.** Esperimento di immunohistochimica su sezioni di stomaco utilizzando l' anticorpo anti-PCNA; la rivelazione è stata effettuata con DAB. (A) La marcatura è presente nelle cellule che costituiscono le anse della parete dello stomaco e in gruppi di cellule del sangue localizzate nel tessuto connettivo adiacente a questo organo. (B) Immagine a maggiore ingrandimento.

La specificità della reazione è confermata dall'assenza di segnale nei controlli, come illustrato in Figura 16.B.

### **Reazioni di ibridazione *in situ* per Ci-Numb su sezioni**

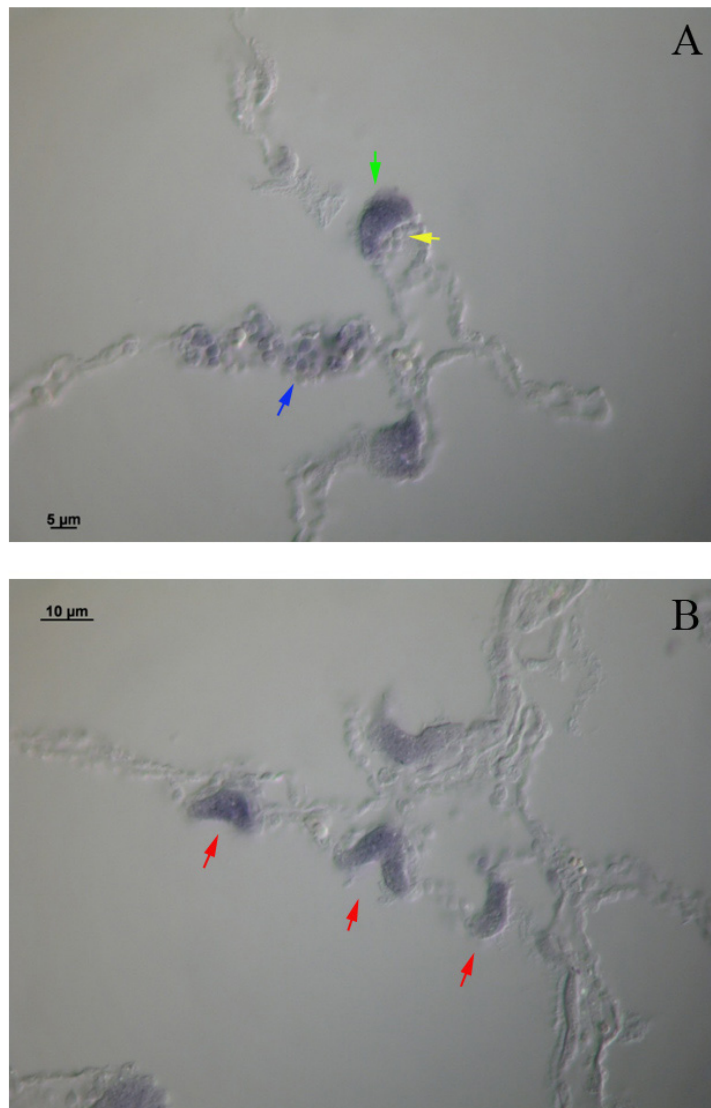
Sulla base dei risultati degli esperimenti descritti sopra, è stato intrapreso lo studio dell'espressione di *Ci-Numb* per verificare il suo pattern di espressione e valutare la possibile corrispondenza tra questo ed i siti di proliferazione cellulare evidenziati dall'espressione del PCNA. A tale scopo sono stati condotti esperimenti di ibridazione *in situ* su sezioni di individui adulti di *Ciona* con le modalità descritte per gli esperimenti esposti nel paragrafo precedente e tendenti ad ottenere un quadro completo dell'espressione nei vari tessuti dell'animale. La tecnica dell'ibridazione *in situ* permette di visualizzare la distribuzione spaziale dell'RNA messaggero mediante l'uso di sonde antisenso di RNA marcate con digossigenina (DIG-UTP). Nel caso di *Ci-Numb* la sonda utilizzata comprendeva le sequenze codificanti per il dominio PTB (Fig. 12). Contemporaneamente sezioni di controllo sono state ibridate mediante l'utilizzo di sonde senso.

Dalle immagini relative all'ibridazione *in situ* su sezioni contenenti le regioni del faringe (Fig. 19), si evidenzia l'espressione di *Ci-Numb* nelle cellule del sangue che popolano le barre trasversali del faringe. E' da notare che non tutte le cellule presenti in queste aree risultano marcate, ma l'espressione del gene è ristretta ad alcuni gruppi di cellule, possibilmente riconducibili ad una sottopopolazione di amebociti. Risultano, invece, costantemente negativi altri tipi cellulari, quali le URG (Fig.19 C).



**Figura 19.** Immagini relative all'esperimento di ibridazione *in situ* su sezioni di faringe per l'espressione di *Ci-Numb*. (A-B) Panoramica delle barre trasversali con marcatura in gruppi di cellule del sangue in esse contenute. (C) Ingrandimento di una barra trasversale dove risultano marcati gli amebociti; altri tipi cellulari, quali le URG (freccia rossa), sono costantemente negativi. (D) Sezione di controllo ibridata con la sonda senso.

L'mRNA per *Ci-Numb* si ritrova anche nella regione delle papille primarie e negli stigmi. Le cellule che costituiscono queste strutture risultano fortemente marcate ed è da rilevare come nelle aree del lume delle barre adiacenti ad esse siano quasi costantemente presenti gruppi di cellule di taglia inferiore a quella attribuibile agli amebociti o ad altri emociti (Fig. 20).

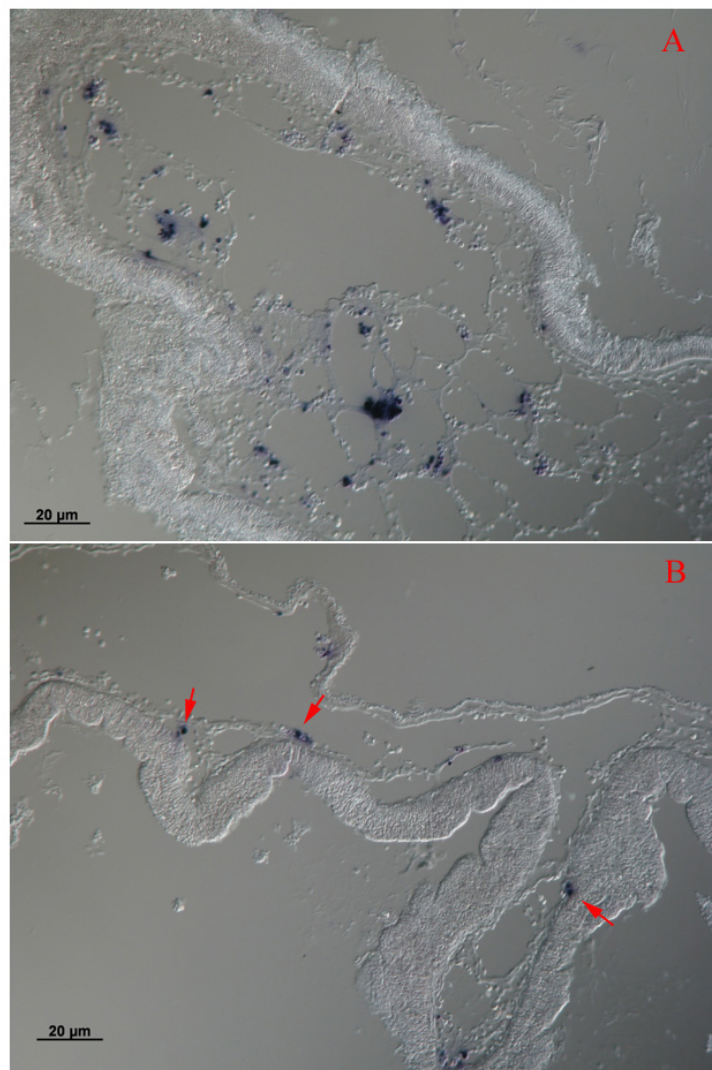


**Figura 20.** Immagini a maggiore ingrandimento dell'esperimento di ibridazione *in situ* mostrato in Figura 19. (A) La freccia blu indica la marcatura a livello delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali; la freccia verde indica la marcatura delle cellule cigliate dello stigma; la freccia gialla indica gruppi di cellule di taglia inferiore a quella attribuibile agli emociti presenti nelle aree del lume delle barre. (B) Le frecce rosse indicano la marcatura delle papille primarie.

Nelle sezioni contenenti le regioni dello stomaco le tecniche di ibridazione *in situ* mostravano un'espressione di *Ci-Numb* in gruppi di cellule del sangue contenute nel connettivo adiacente alla parete dell'organo (Fig. 21). Una benché debole, espressione del gene si rileva anche nella zona basale della parete dello stomaco, descritta come una

zona di proliferazione del tessuto sottoposto ad un costante ricambio delle sue componenti cellulari.

Questi dati indicano, quindi, una quasi totale sovrapposibilità tra i pattern di espressione di *Ci-Numb* e dell'indicatore di proliferazione cellulare e restringono il pattern di espressione alle aree indicate come siti ematopoietici dal lavoro di Ermak (Ermak, 1976).

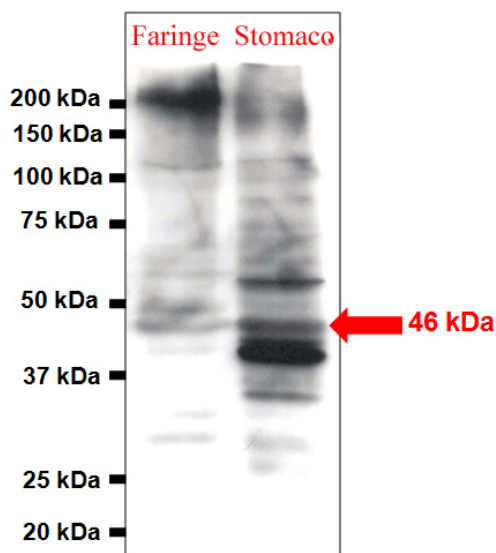


**Figura 21.** Esperimento di ibridazione *in situ* su sezioni di stomaco per l'espressione di *Ci-Numb*. (A) La marcatura è presente in gruppi di cellule del sangue contenute nel connettivo adiacente alla parete dello stomaco. (B) Le frecce rosse indicano la marcatura presente nella zona basale della parete dello stomaco.



## “Western Blot” per l’espressione di Ci-Numb

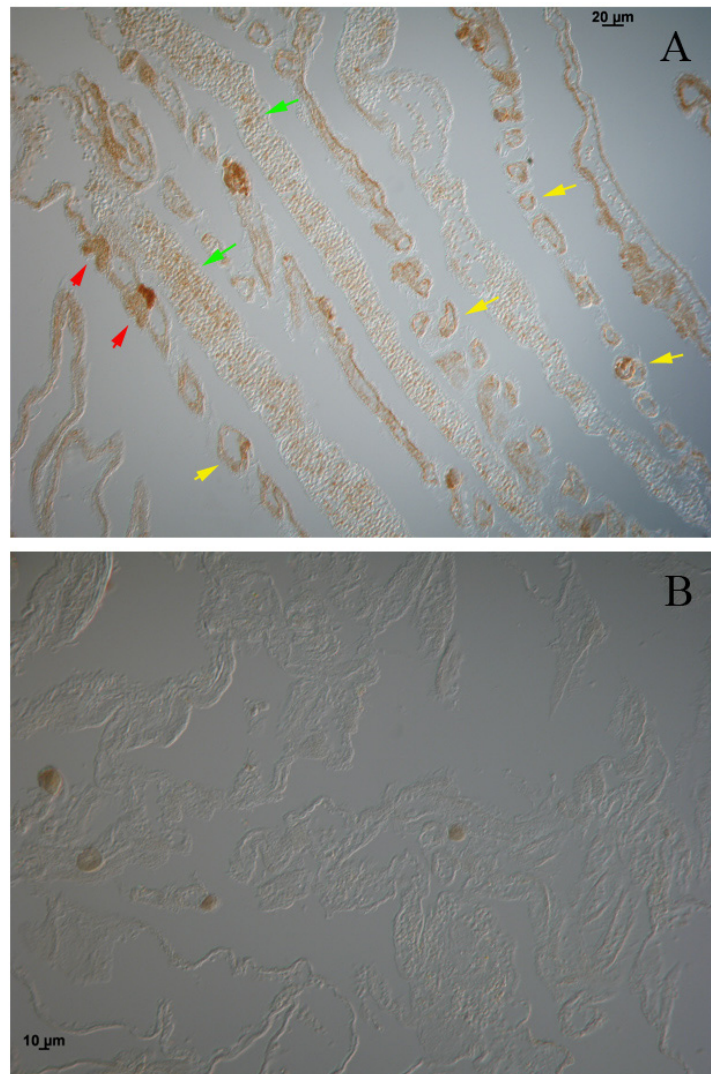
Per studiare l’espressione della proteina Ci-Numb è stato prodotto un antisiero policlonale contro un peptide immunogenico di 18 aminoacidi (NH<sub>2</sub>-HNPSAIPRRHAPLHLIRQ-COOH) corrispondente ad una regione amminoacidica conservata adiacente al dominio PTB (Fig. 12). IgG purificate per affinità sono state usate in una analisi per “Western blot” su estratti proteici di faringe e stomaco, tessuti nei quali si rileva l’espressione del gene corrispondente. Tra le proteine degli estratti risolte in una elettroforesi condotta in condizioni riducenti su gel di poliacrilammide al 10 %, l’anticorpo anti-Ci-Numb riconosceva sia nel faringe che nello stomaco una banda corrispondente ad una apparente massa molecolare di 46 kDa (Fig. 22), contro i 48 kDa di quella dedotta.



**Figura 22.** Analisi mediante “Western blot” di estratti proteici di faringe e stomaco. La rilevazione è stata fatta con l’anticorpo anti-Numb, su un gel di poliacrilammide-SDS al 10% in condizioni riducenti. La rivelazione degli anticorpi legati è stata ottenuta con un anticorpo secondario coniugato alla HRP e con ECL. La banda indicata con la freccia rossa di 46 kDa corrisponde alla proteina Ci-Numb.

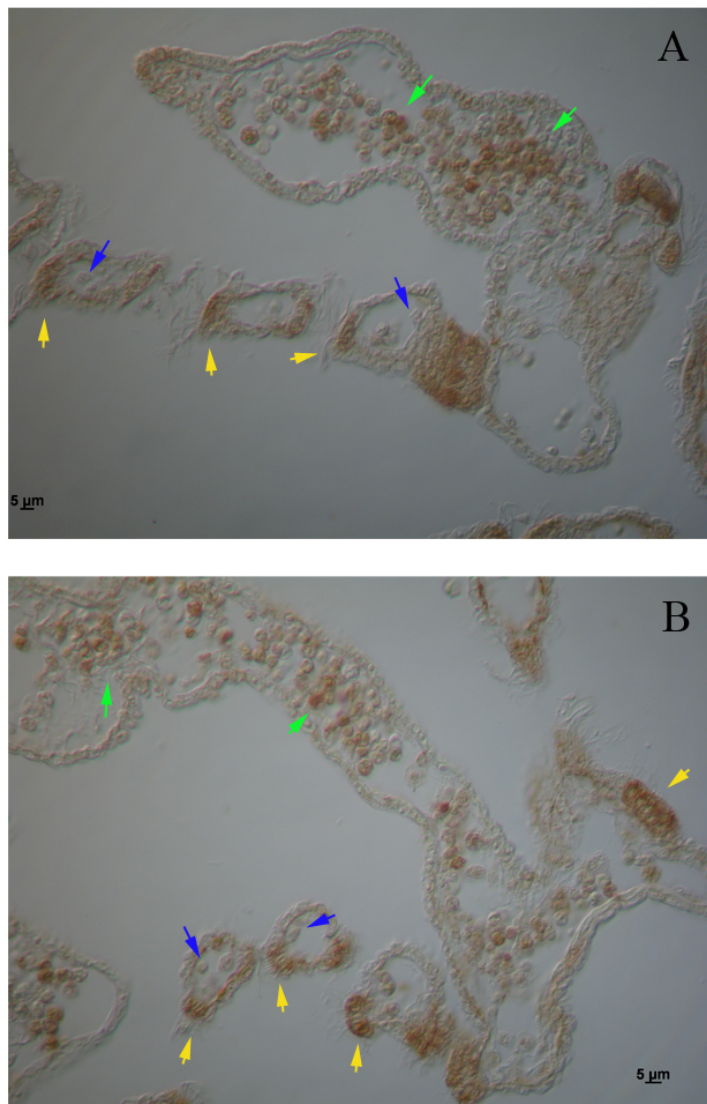
## Immunoistochimica anti-Ci-Numb su sezioni

L'anticorpo policlonale anti-Ci-Numb è stato utilizzato per esperimenti di immunoistochimica su sezioni contenenti le regioni del faringe e dello stomaco. Lo scopo di questi esperimenti era estendere i risultati ottenuti mediante le tecniche di ibridazione *in situ*, verificando se ed in quali dei tessuti interessati all'espressione di *Ci-Numb* veniva espressa la proteina.



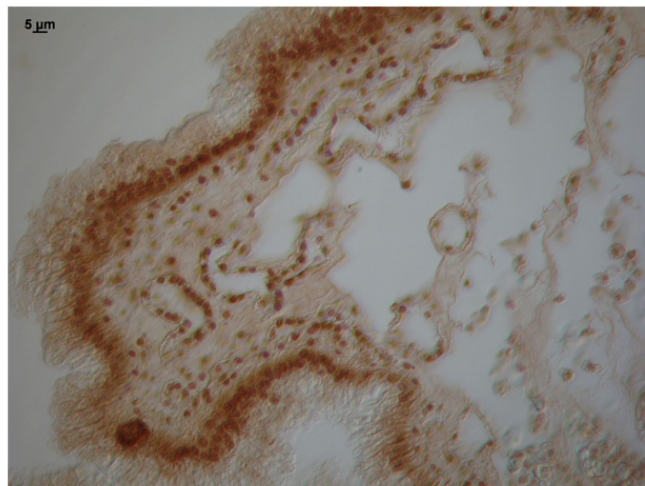
**Figura 23.** Esperimento di immunoistochimica su sezioni di faringe con anticorpo anti-Ci-Numb. **(A)** Le frecce verdi indicano la marcatura delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali; le frecce rosse indicano la marcatura delle papille primarie; le frecce gialle indicano la marcatura degli stigmi. **(B)** La sezione di controllo trattata con Ig purificate dal siero preimmune corrispondente.

Contemporaneamente, sezioni di controllo sono state trattate con IgG purificate da siero preimmune (Fig. 23 B). Gli esperimenti mostravano un'intensa marcatura a livello delle papille primarie e delle cellule che costituiscono gli stigmi della parete del faringe. Ci-Numb è espressa inoltre nei cluster di cellule del sangue contenute nelle barre trasversali (Fig. 23 A).



**Figura 24.** Immagini a maggiore ingrandimento dell'esperimento di immunohistochimica su sezioni di faringe mostrato in Figura 23. (A-B) Le frecce verdi indicano la marcatura a livello delle cellule del sangue all'interno delle barre trasversali; le frecce gialle indicano la marcatura delle cellule cigliate dello stigma; le frecce blu indicano cellule di taglia inferiore a quella dei granulociti o altri emociti addossati alle cellule che costituiscono gli stigmi.

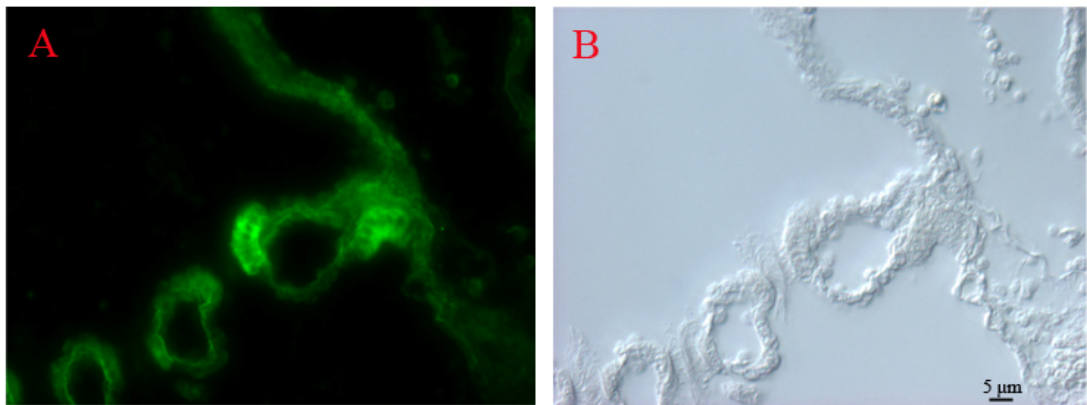
La reazione con la DAB, ancora più chiaramente che non quella con il BM-purple utilizzata per l'ibridazione *in situ*, permette di identificare i tipi cellulari marcati come amebociti granulari e di definire, quindi, che solo una sottopopolazione di queste cellule è interessata nell'espressione della proteina. E' da notare che la marcatura è chiaramente localizzata a livello citoplasmatico. Anche nelle immagini esaminate per questa tecnica persiste la presenza di cellule di taglia inferiore a quella dei granulociti o altri emociti addossati alle cellule che costituiscono gli stigmi (Fig. 24). Benché non si possa ricavare dalle immagini alcuna conclusione su un processo dinamico, la specifica collocazione di queste cellule sembra suggerire la loro derivazione dall'area stigmatica.



**Figura 25.** Immagini relative all'esperimento di immunohistochimica su sezioni di stomaco con anticorpo anti-Ci-Numb. L'espressione della proteina è presente nel citoplasma delle cellule che formano la parete dell'organo e nelle cellule del sangue del tessuto connettivo adiacente alla parete dello stomaco.

Nelle sezioni contenenti lo stomaco la proteina Ci-Numb era espressa nelle cellule che formano la parete dell'organo. Come già accennato, questa va incontro ad un processo di continuo rinnovamento a partire da cellule che si trovano nella zona basale del tessuto ed è proprio questa area, ed in particolare i nuclei delle cellule, che

risulta fortemente marcata. Ci-Numb è espressa anche nel tessuto connettivo adiacente alla parete dello stomaco. Le cellule marcate, anche in questo caso a livello dei nuclei, si trovano sia nel tessuto che riempie le anse formate dalla parete dello stomaco, che in cellule che delineano lacune del tessuto popolate da emociti (Fig. 25). I risultati ottenuti erano sovrapponibili con l'espressione del gene *Ci-Numb* verificata mediante le tecniche di ibridazione *in situ*. La specificità della reazione è confermata dall'assenza di segnale nei controlli trattati con IgG, come illustrato in Figura 23.B.



**Figura 26.** Esperimento di immunistoichimica a fluorescenza su sezioni di faringe con anticorpo anti-Ci-Numb e anticorpo secondario coniugato con la streptavidina. (A) Immagine di una sezione del faringe con la fluorescenza e marcatura presente a livello degli stigmi del faringe e delle barre trasversali. (B) Immagine della stessa sezione in campo chiaro.

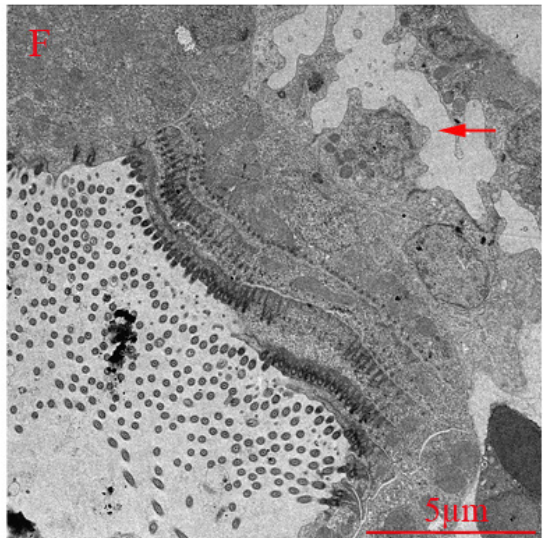
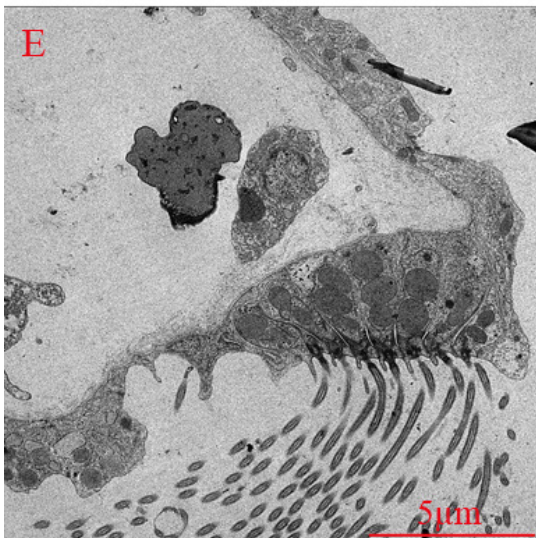
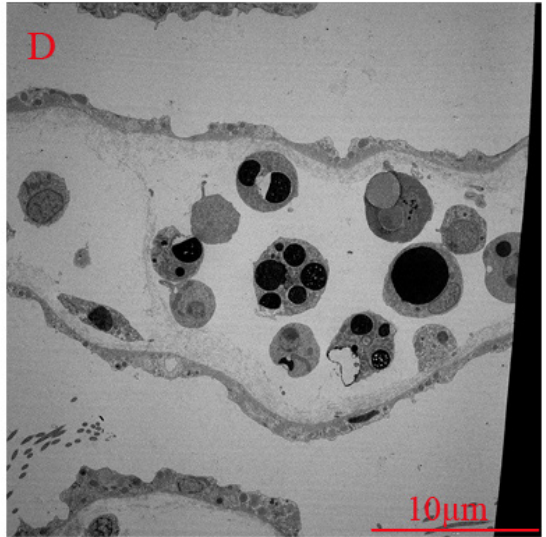
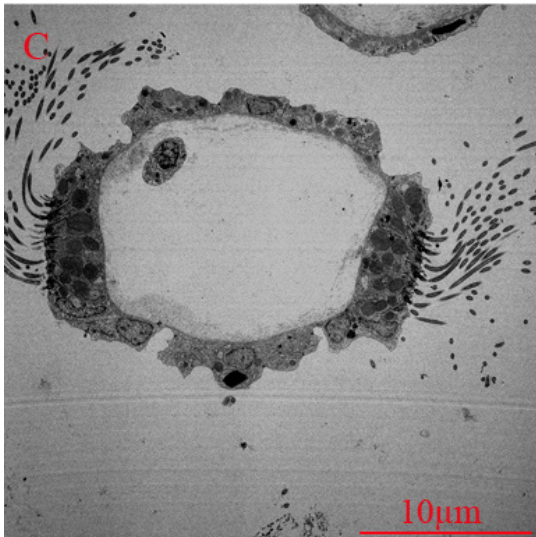
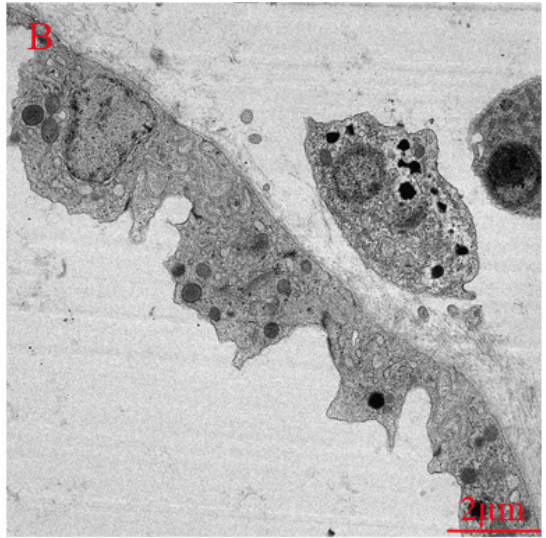
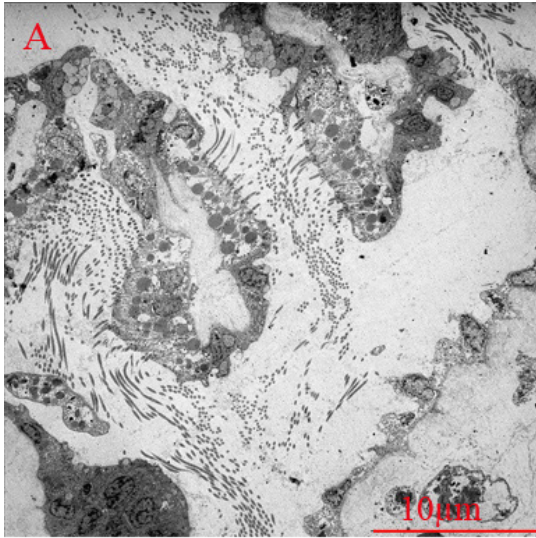
Benché la corrispondenza del segnale sulle stesse strutture di Ci-Numb e PCNA sia evidente, un esperimento di immunistoichimica per la rilevazione contemporanea di questi due antigeni è stato messo a punto per provare in modo più incisivo la sovrapposizione dei due segnali. A tale scopo è stato utilizzato per l'anti-Ci-Numb un anticorpo secondario coniugato con la streptavidina, che, se eccitata alla lunghezza d'onda di 488 nm, emette fluorescenza, e reazione con DAB per l'anti-

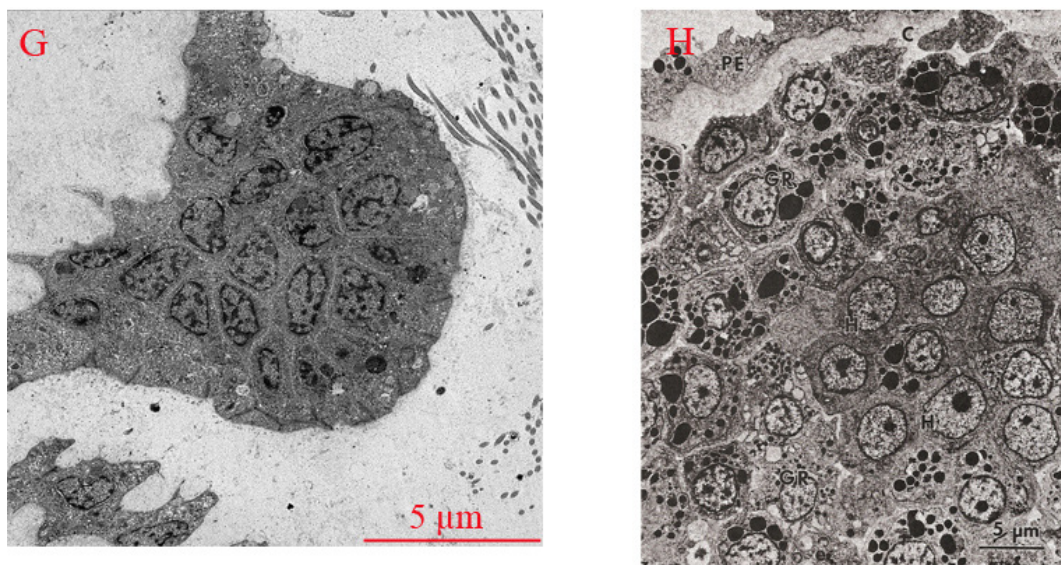
PCNA, o viceversa. L'esperimento, pur producendo buone immagini se considerate separatamente (Fig. 26), ha dato però esito negativo in quanto la rilevazione con la precipitazione della DAB preclude la reattività dell'anticorpo rilevato con la fluorescenza.

### **Analisi morfologica di regioni del faringe e “Immunogold” anti-PCNA e anti-Ci-Numb**

Un'analisi più dettagliata dell'espressione di Ci-Numb a livello ultrastrutturale, preceduta dalla ricerca del PCNA, è stata focalizzata in particolare sui tessuti del faringe. Infatti, sulla base delle indicazioni trovate in letteratura e quelle derivanti dalle nostre osservazioni, questo tessuto poteva essere considerato potenzialmente il più idoneo a fornire indicazioni sui siti di origine degli emociti.

Poiché le fissazioni routinariamente utilizzate per l'immunoistochimica in diversi campioni biologici tendono alla conservazione dell'antigenicità del preparato, compromettendone però l'integrità strutturale, si è reso indispensabile uno studio morfologico preliminare delle strutture del faringe. Queste osservazioni, come descritto nel paragrafo “Analisi morfologica di regioni del faringe e immunogold anti-Ci-Numb su sezioni di “juvenile” corrispondenti allo stadio 8”, hanno fornito non solo una base per l'interpretazione dei dati dell'immunoistochimica, ma hanno prodotto interessanti e originali osservazioni sulla genesi del faringe durante la metamorfosi.



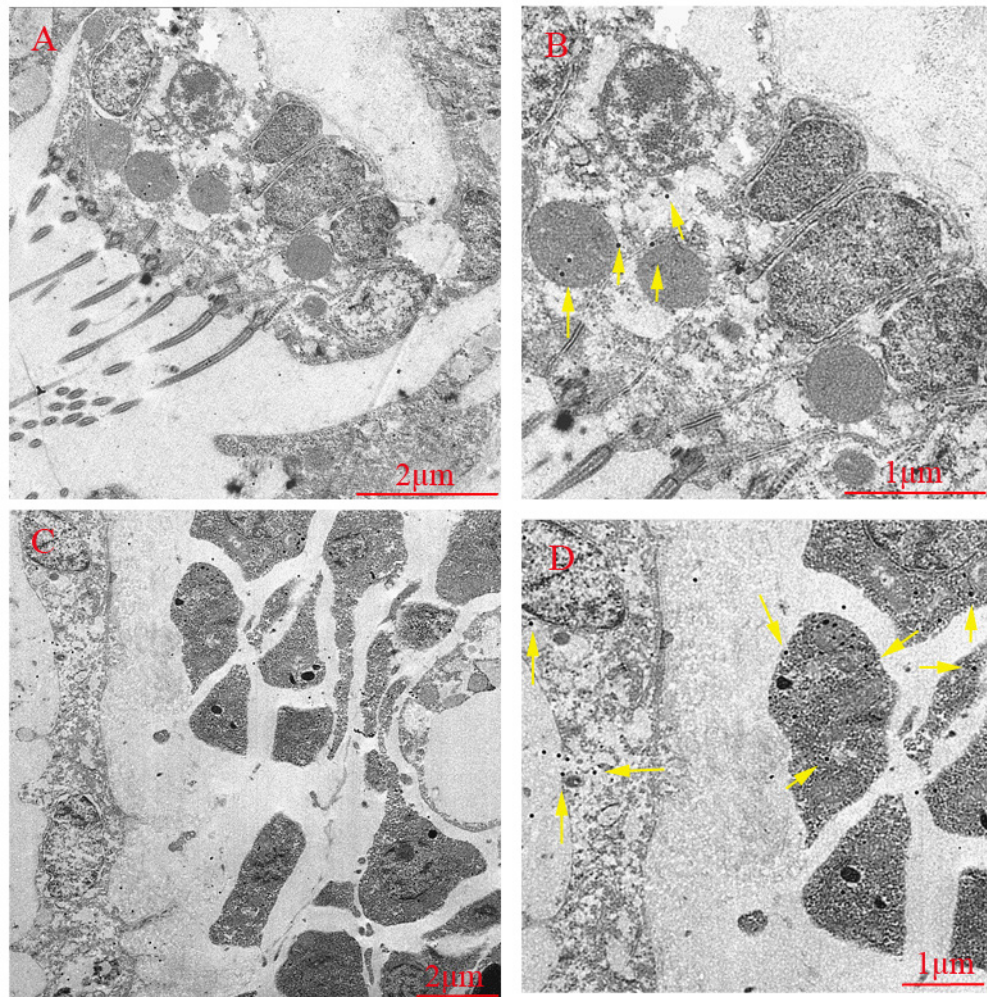


**Figura 27.** Immagini relative all'osservazione delle sezioni di faringe al microscopio elettronico a trasmissione. (A) Panoramica delle strutture del faringe. (B) Cellule lobate della parete. (C) Immagine di uno stigma. (D) Barra trasversale con le cellule del sangue in essa contenute. (E) Cellule cigliate dello stigma. (F) La freccia rossa indica amebociti che sembrano delaminarsi dalla parete dello stigma. (G) Gruppo di cellule interpretabile come un noduli ematopoietico nella regione dello stigma. (H) Noduli ematopoietici immagine originale di Ermak.

Immagini del faringe mostrano la struttura degli stigmi, costituiti da un numero costante di 6-8 cellule cigliate con nucleo basale e granuli elettrondensi, affiancate da cellule lobate con un cospicuo nucleo (Fig. 27 A-C-E). La parete del cestello branchiale è formata da un monostrato di cellule lobate (Fig. 27 B). Cellule del sangue identificabili in amebociti granulari, refrattili e URG si ritrovano all'interno delle barre e addossate agli stigmi ed alle pareti (Fig. 27 D). Alcuni, ma non frequenti, campi mostrano cellule, interpretabili come amebociti, che sembrano delaminarsi dalla parete dello stigma proiettando pseudopodi verso il lume della barra (Fig. 27 F). Quest'analisi morfologica ha consentito di riconoscere anche strutture a livello del faringe, particolarmente a livello degli stigmi, descritte da Ermak (Ermak, 1976) come noduli ematopoietici (Fig. 27 G-H).

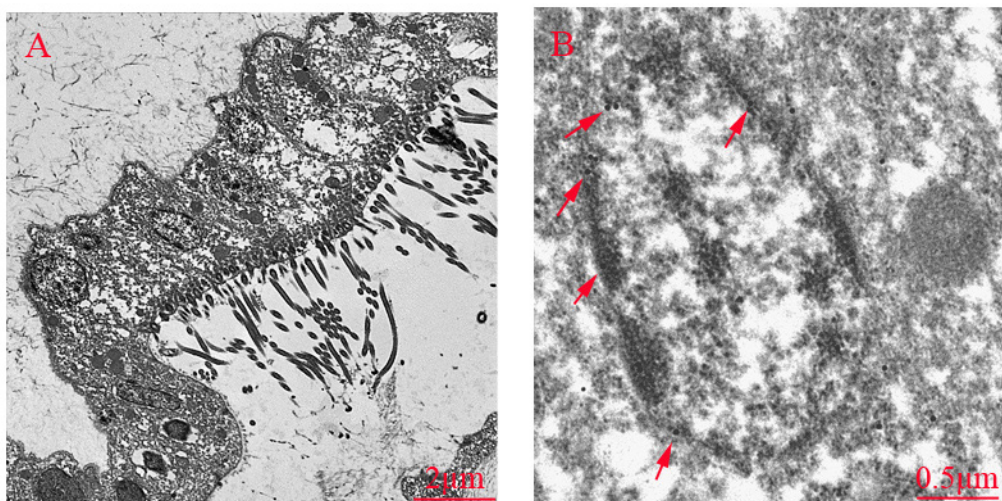


Il passo successivo è stato verificare quali tipi cellulari del faringe esprimessero la proteina Ci-Numb e se fossero gli stessi tipi cellulari interessati anche all'espressione di PCNA. A tale scopo sono stati effettuati esperimenti di "Immunogold" su sezioni contenenti le regioni del faringe utilizzando anticorpi secondari coniugati con particelle di oro colloidale.



**Figura 28.** Immagini relative all'esperimento di "Immunogold" su sezioni di faringe con anticorpo anti-Ci-Numb. (A-B) Regione degli stigmi con le frecce gialle che indicano la marcatura (grani d'oro dal diametro di 30 nm) a livello del citoplasma delle cellule cigliate dello stigma. (C-D) Regione delle barre trasversali con le frecce gialle che indicano la marcatura (grani d'oro dal diametro di 30 nm) a livello del citoplasma delle cellule che delimitano la barra e delle cellule del sangue in esse contenute.

Questi esperimenti, che hanno consentito un'analisi dell'espressione a livello cellulare delle proteine di interesse, confermavano i dati preliminari ottenuti, evidenziando un'espressione della proteina Ci-Numb proprio negli stessi tipi cellulari del faringe sede di intensa attività proliferativa in quanto anche positivi al PCNA. In particolare gli esperimenti di "Immunogold", condotti mediante l'utilizzo dell'anticorpo anti-Ci-Numb, mostravano che l'espressione di Ci-Numb nel faringe era presente nel citoplasma (Fig. 28), nell'area della membrana nucleare e nei vacuoli delle cellule cigliate. Grani d'oro si osservavano anche nelle cellule della parete degli stigmi ed in alcune cellule che formano "cluster" all'interno delle barre (Fig. 28). Queste cellule sono caratterizzate da citoplasma elettrondenso e pseudopodi, e non sono identificabili come cellule del sangue circolante nelle barre trasversali, sia per le caratteristiche suddette che per la loro taglia. Queste caratteristiche, infatti, potrebbero riportare alle cellule osservate anche negli esperimenti di immunohistochimica per Ci-Numb al microscopio ottico su sezioni dello stesso tessuto.



**Figura 29.** Esperimento di "immunogold" su sezioni di faringe con anticorpo anti-PCNA. (A) Regione di uno stigma. (B) Ingrandimento della regione nucleare di una delle cellule cigliate dello stigma di Figura 29.A; le frecce rosse indicano la marcatura (grani d'oro dal diametro di 15 nm) a livello del nucleo.

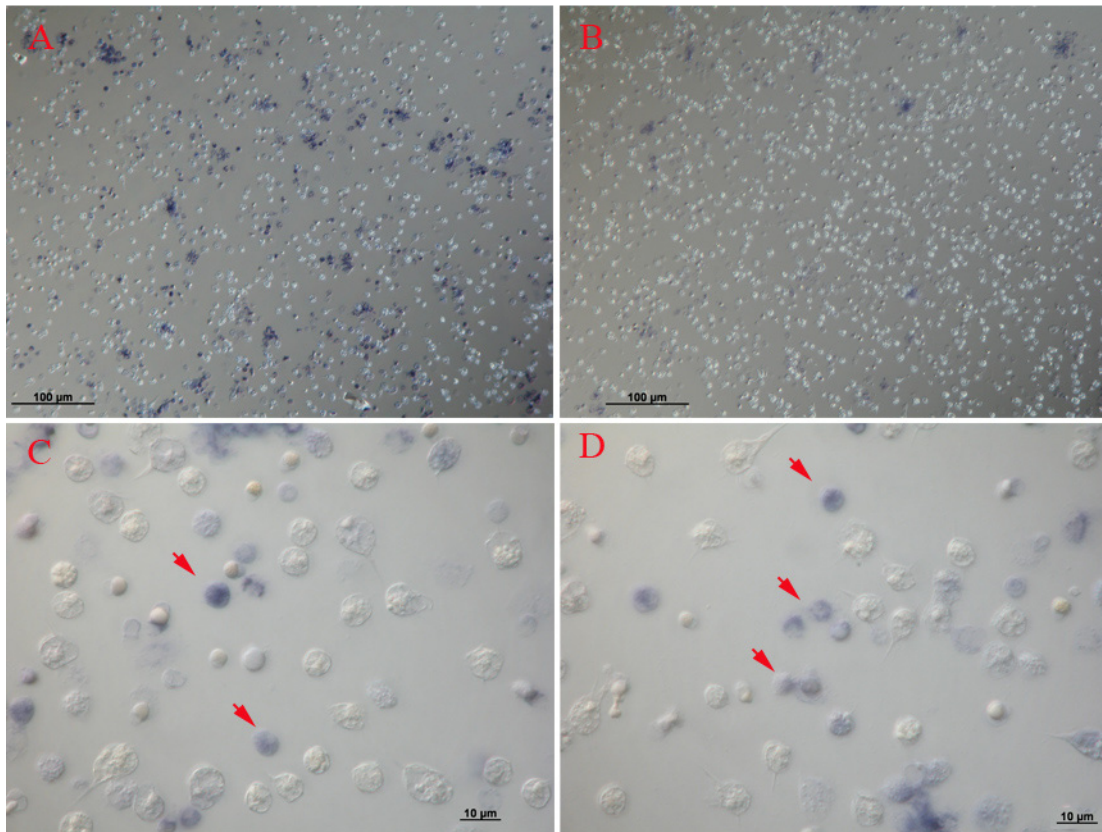
Gli esperimenti eseguiti in parallelo utilizzando l'anticorpo primario anti-PCNA e l'anticorpo secondario anti-mouse, mostravano una espressione nei tipi cellulari che esprimevano Ci-Numb, ma con una costante localizzazione prevalentemente nucleare (Fig. 29).

### **Reazioni di ibridazione *in situ* per *Ci-Numb* su sangue circolante**

Non esistono in letteratura informazioni esaurienti circa un'attività proliferativa a carico degli emociti circolanti in *Ciona*. E' stata però descritta, tra i vari tipi cellulari identificati nel sangue di questa ascidia, la presenza di cellule definite emoblasti (Milanesi and Burighel, 1978), noti anche come le cellule staminali ematopoietiche dell'adulto. Queste cellule sono generalmente di taglia inferiore rispetto agli altri tipi cellulari che si trovano nel sangue circolante e misurano dai 5 ai 7  $\mu\text{m}$  di diametro. Hanno, inoltre, un elevato rapporto nucleo/citoplasma, corti pseudopodi e manifestano i tipici caratteri ultrastrutturali delle cellule indifferenziate.

Questi dati mi hanno indotto a verificare l'espressione di *Ci-Numb* nel sangue circolante, ipotizzando che anche in questo tessuto il gene in esame potesse rappresentare un marcatore di cellule interessate a divisione differenziale e, di conseguenza, permettesse di definire la corrispondenza di tali cellule con quelle identificate come emoblasti. Esperimenti di ibridazione *in situ* sono stati condotti su emociti mediante l'utilizzo di sonde di RNA marcate con digossigenina (DIG-UTP) e comprendenti le sequenze codificanti per il dominio PTB. Questi esperimenti hanno mostrato un'espressione di *Ci-Numb* in una popolazione limitata di cellule che, ad un esame più dettagliato, presentavano una taglia di 5-7  $\mu\text{m}$ , la presenza di un grande

nucleo che occupava gran parte del volume della cellula, riducendo il citoplasma ad una porzione limitata periferica (Fig. 30). I dati ottenuti da questi esperimenti sembrano, quindi, indicare una corrispondenza tra queste cellule e gli emoblasti descritti in letteratura.



**Figura 30.** Immagini relative all'esperimento di ibridazione *in situ* su sangue circolante per l'espressione di *Ci-Numb*. **(A-C-D)** Cellule del sangue ibridate con la sonda antisense di *Ci-Numb* : le frecce rosse indicano le cellule marcate che per dimensioni e morfologia ricordano gli emoblasti. **(B)** Cellule del sangue ibridate con la sonda senso come controllo.

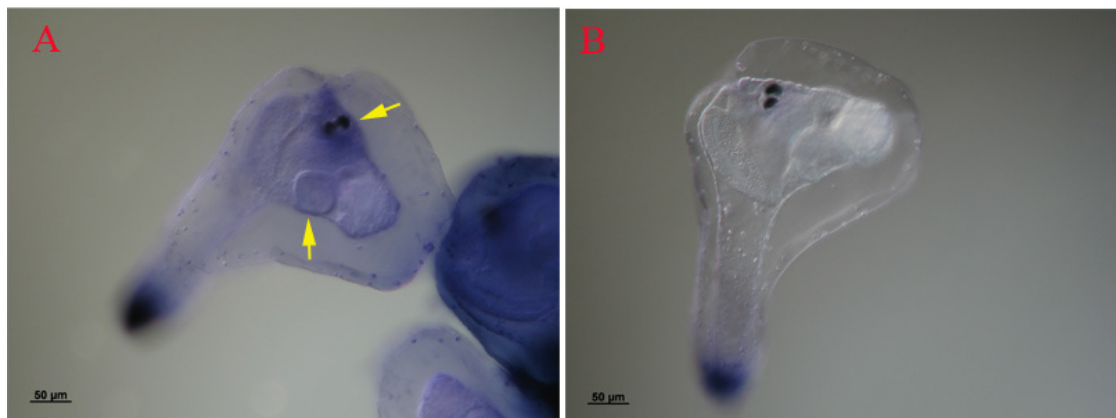
### Reazioni di ibridazione *in situ* in “Whole mount” per *Ci-Numb* su “juvenile”

Durante lo stadio larvale non esiste in *C. intestinalis* un sistema circolatorio e in diversi territori del corpo della larva si ritrovano solo cellule mesenchimali. Queste

comprendono le cellule del “lineage” degli emociti, per le quali ancora non esistono marcatori. Il sistema circolatorio con la formazione del cuore e la presenza di cellule circolanti si rileva a partire dai “juvenile” dello stadio 4 (Chiba et al., 2004). Al fine di identificare il momento di inizio e la localizzazione dell’ematopoiesi, la mia attenzione si è rivolta anche a diversi stadi dello sviluppo durante la metamorfosi.

Esperimenti di ibridazione *in situ* in “Whole mount” sono stati effettuati, sempre utilizzando sonde di RNA per *Ci-Numb* marcate con digossigenina e comprendenti le sequenze codificanti per il dominio PTB, sui diversi stadi dei “juvenile” corrispondenti allo stadio 3, stadio 4, stadio 5 e stadio 8 (Chiba et al., 2004).

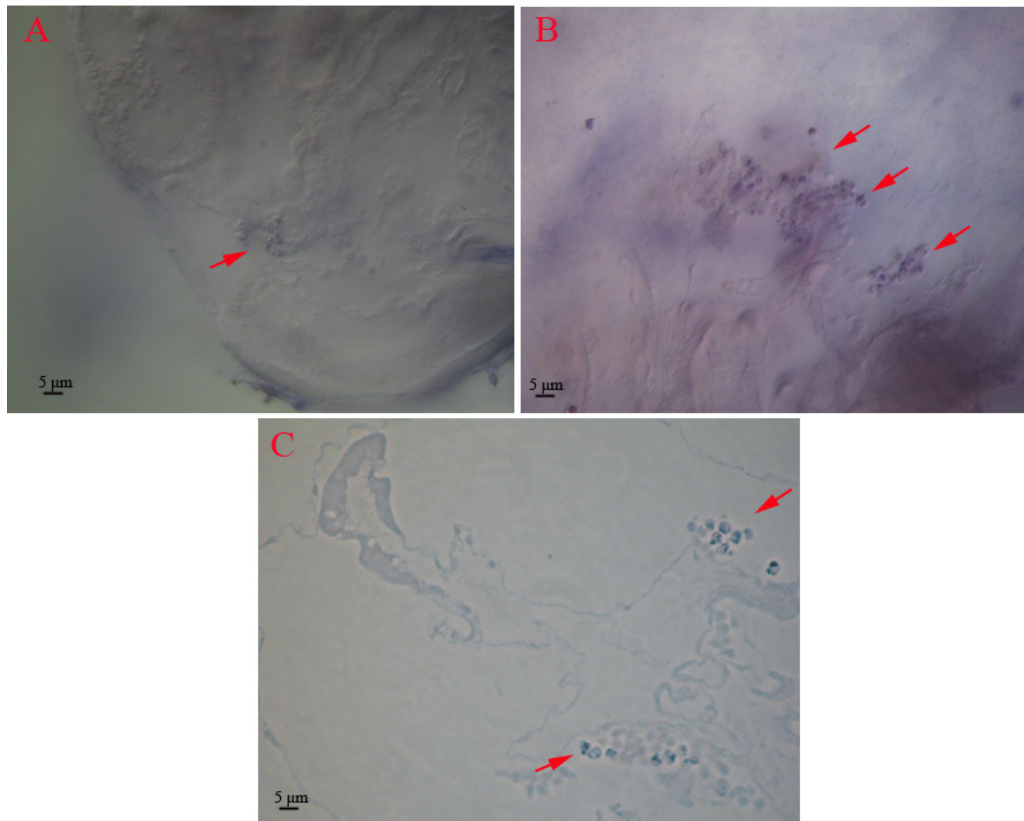
I “juvenile” corrispondenti al “rotation stage” (stadio 3) hanno evidenziato un’espressione nella vescicola neurale e nello stomaco (Fig. 31).



**Figura 31.** Immagini dell’esperimento di ibridazione *in situ* in “Whole mount” su “juvenile”, corrispondenti allo stadio 3, per l’espressione di *Ci-Numb*. (A) “Juvenile” con l’espressione del trascritto di *Ci-Num*: le frecce gialle indicano l’espressione nella vescicola neurale e nello stomaco. (B) “Juvenile” dello stadio 3 di controllo ibridato con la sonda senso.

L’ibridazione *in situ* sugli stadi di “juvenile” corrispondenti allo stadio 4 e stadio 5, mostrava un’espressione di *Ci-Numb* in gruppi di cellule, già identificabili come cellule del sangue, prospicienti l’endostilo in una zona descritta come sede di formazione del faringe (Fig. 32). Il risultato è ancora più evidente nell’immagine di

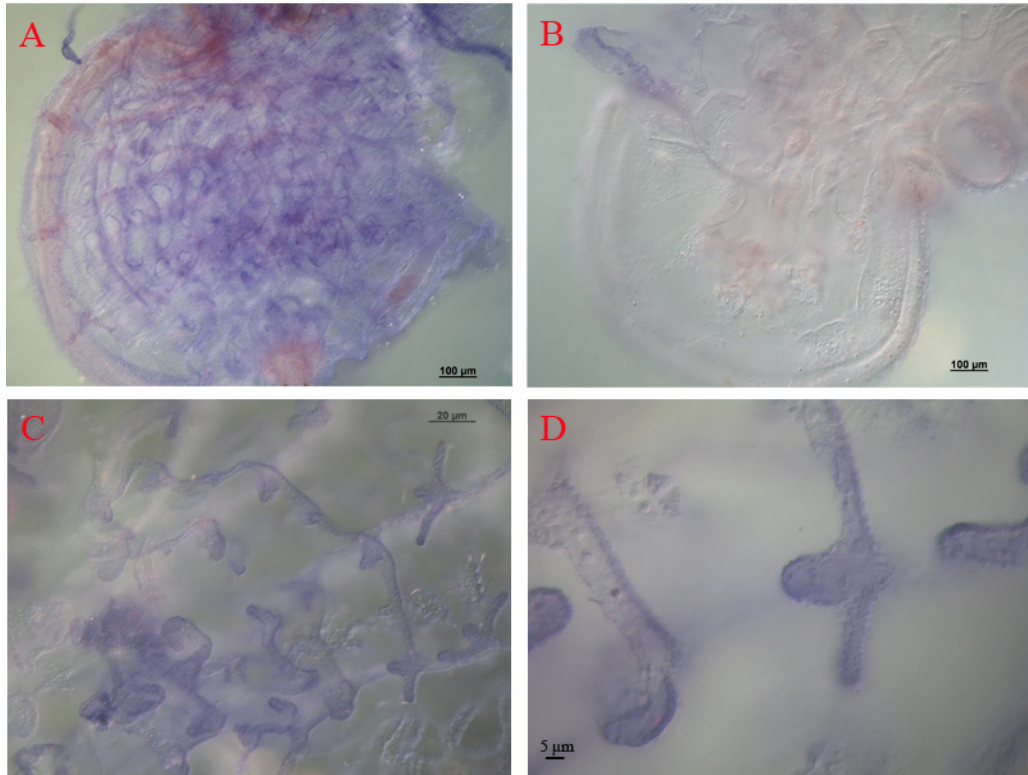
Figura 32.C che rappresenta una sezione di “juvenile” dello stadio 5 dopo ibridazione *in situ* e dove è possibile osservare l’espressione di *Ci-Numb* in due distinti gruppi di cellule del sangue ai lati dell’endostilo.



**Figura 32.** Immagini dell’esperimento di ibridazione *in situ* in “Whole Mount” su “juvenile”, corrispondenti agli stadi 4 e 5, per l’espressione di *Ci-Numb*. (A) “Juvenile” corrispondenti allo stadio 4. (B) “Juvenile” corrispondenti allo stadio 5. (C) Sezione di “juvenile” dello stadio 5 dopo ibridazione *in situ* in “Whole mount”. Le frecce rosse indicano l’espressione del trascritto di *Ci-Numb* nelle cellule del sangue in una regione in prossimità dell’endostilo.

Nei “juvenile” corrispondenti allo stadio 8, nel quale è possibile osservare la maggior parte delle strutture che poi si ritroveranno nell’animale adulto, l’ibridazione *in situ* ha poi evidenziato un pattern di espressione che mostra molti tratti dell’espressione osservata nell’adulto. Il segnale è infatti presente in piccoli e diffusi gruppi di cellule a livello delle barre trasversali e delle papille primarie e degli stigmi

del faringe (Fig. 33). Quindi mentre negli stadi 4 e 5 l'espressione di *Ci-Numb* è presente in cellule del sangue in zone di formazione del faringe, negli ultimi stadi di "juvenile" corrisponde con quella dell'adulto.

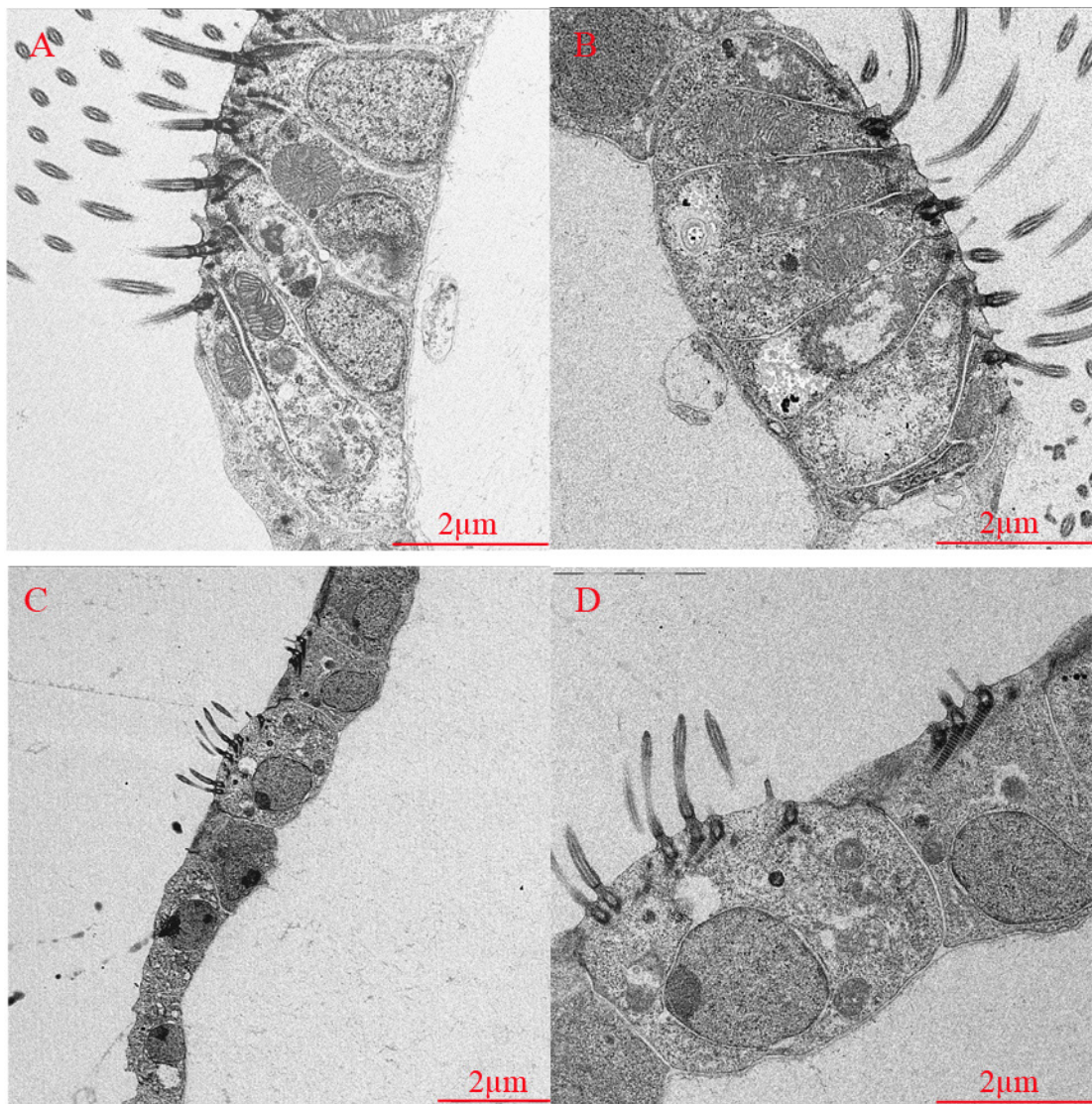


**Figura 33.** Esperimento di ibridazione *in situ* in "Whole mount" su "juvenile", corrispondenti allo stadio 8, per l'espressione di *Ci-Numb*. (A) Panoramica di un "juvenile" dello stadio 8 con espressione del trascritto di *Ci-Numb* in piccoli e diffusi gruppi di cellule a livello delle barre trasversali, delle papille primarie e degli stigmi del faringe. (B) "Juvenile" dello stadio 8 di controllo ibridato con la sonda senso. (C-D) Immagini a maggiore ingrandimento delle strutture del faringe con l'espressione di *Ci-Numb*.

### **Analisi morfologica di regioni del faringe e "Immunogold" anti-Ci-Numb su sezioni di "juvenile" corrispondenti allo stadio 8**

Nell'intento di verificare la struttura del faringe alla metamorfosi, ho intrapreso un'analisi morfologica mediante l'osservazione al TEM di sezioni di "juvenile" corrispondenti allo stadio 8 in cui al microscopio ottico si rilevava già la presenza delle cellule cigliate degli stigmi. A livello ultrastrutturale, mentre, come atteso, si

individuano gli stigmi che già presentano una organizzazione definitiva (Fig. 34 A-B), ho potuto raccogliere immagini che ne descrivono la genesi. Le cellule della parete si differenziano, infatti, con la comparsa di ciglia, inizialmente in un numero limitato di cellule, inferiore alle 6-8 che normalmente formano lo stigma. Si osserva anche un aumento del volume delle cellule, che sono a questo stadio rotondegianti (Fig. 34 C-D).

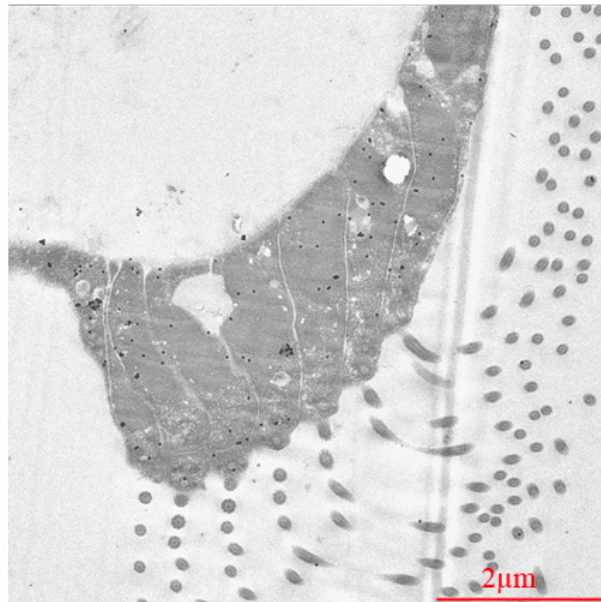


**Figura 34.** Immagini relative all'osservazione delle sezioni di faringe di "juvenile" dello stadio 8 al microscopio elettronico a trasmissione. (A-B) Immagini di stigmi già formati e definiti. (C-D) Immagini di stigmi in formazione dal "monolayer" cellulare della parete delle barre trasversali.



La Figura 34.C mostra proprio la presenza all'interno del monolayer cellulare delle barre trasversali di due delle cellule cigliate del margine dello stigma in formazione.

Anche su sezioni di juvenile dello stadio 8 contenenti le regioni del faringe sono stati effettuati esperimenti di "Immunogold" per verificare l'espressione e la localizzazione della proteina Ci-Numb. Sono stati così confermati i risultati ottenuti mediante le tecniche di ibridazione *in situ*, con l'espressione della proteina Ci-Numb presente nel citoplasma delle cellule cigliate e della parete degli stigmi (Fig. 35).



**Figura 35.** Immagine relativa all'esperimento di "immunogold" su sezioni di faringe di "juvenile" dello stadio 8 con anticorpo anti-Ci-Numb. L'espressione della proteina Ci-Numb è presente nel citoplasma delle cellule cigliate dello stigma e nelle cellule parietali (marcatore rappresentata dai grani d'oro dal diametro di 30 nm)

## **DISCUSSIONE**

L'informazione sull'origine degli emociti e della regolazione dell'ematopoiesi in *C. intestinalis*, come anche in altre ascidie, si basa solo su limitatissimi dati che lasciano pressoché intoccato questo tema di rilievo, particolarmente se messo in relazione col ruolo degli emociti come effettori della risposta immunitaria. L'identificazione di marcatori molecolari precoci che esibiscano pattern di espressione spazio-temporali specifici nelle cellule ematopoietiche, rappresenta un obiettivo importante ed una risorsa fondamentale per intraprendere lo studio dell'ematopoiesi e della sua regolazione.

Nelle prime osservazioni morfologiche sull'origine e il differenziamento degli emociti (Millar, 1953) gli Autori avevano individuato in noduli localizzati nella parete del faringe, nelle aree di connettivo che circonda lo stomaco e tra le cellule dell'emolinfa circolante, possibili siti di proliferazione cellulare, quindi interpretabili come sede di ematopoiesi. Le aree di proliferazione, in particolare, abbondanti nelle barre trasversali del faringe e più rare in quelle longitudinali, sarebbero organizzate in piccoli "cluster", definiti linfo-noduli, costituiti da poche cellule compatte, immerse nell'epitelio dell'organo. In ciascun nodulo si distinguerebbero pochi emoblasti in divisione, circondati da cellule del sangue in via di maturazione (Ermak, 1982). Questi risultati, seguiti da successive osservazioni che prevedevano l'uso di timidina triziata, preferenzialmente incorporata nel DNA delle cellule in divisione (Ermak, 1982; Raftos et al., 1987), lasciano però ancora aperti una serie di interrogativi. Tra questi, la conferma dell'effettiva corrispondenza tra le cellule in proliferazione e la loro natura quali emociti, e, in questo contesto, la definizione dei "lineare" dei vari tipi di emociti presenti nell'emolinfa.

In questo studio, attraverso un approccio che integra le osservazioni di tipo morfologico con quelle biomolecolari, si è tentata la ricerca di marcatori che possano

rappresentare un nuovo mezzo per affrontare il problema, tuttora irrisolto, della genesi degli emociti in *Ciona*, propedeutico allo studio della regolazione della loro omeostasi nella risposta immune.

L'approccio utilizzato di un'analisi iniziale dei geni, ritenuti possibili candidati per il loro coinvolgimento nell'ematopoiesi in altri organismi, ha portato alla scelta e allo studio in dettaglio del gene *Ci-Numb*. Questo gene, infatti, oltre ad essere uno specifico indicatore di cellule che vanno incontro a divisione differenziale, è coinvolto specificamente nell'ematopoiesi in altri sistemi animali (Allman et al., 2002).

Lo studio dell'espressione di *Ci-Numb* è stato svolto non solo in vari tessuti dell'animale maturo, ma anche nelle fasi della metamorfosi alle quali può essere riportato l'inizio dell'ematopoiesi (Chiba et al., 2004). Al fine di verificare ed estendere le osservazioni precedenti e per essere confortati nelle possibili conclusioni sul coinvolgimento di *Ci-Numb*, tutte le osservazioni sull'espressione della proteina sono state compiute in parallelo con quelle riguardanti l'espressione del PCNA, quale indicatore delle aree di proliferazione cellulare nello stomaco e nel faringe.

Le osservazioni al microscopio ottico ed in parallelo al microscopio elettronico, hanno messo in evidenza una corrispondenza tra l'espressione del PCNA e quella di *Ci-Numb* nelle regioni del faringe dell'adulto. *Ci-Numb* è presente nelle cellule cigliate e quelle della parete degli stigmi con una localizzazione citoplasmatica. Oltre a tipi cellulari, in prevalenza amebociti, che si ritrovano nell'emolinfa circolante nel lume delle barre, si osservano cellule distinguibili per la loro taglia ridotta addossate agli stigmi. Al TEM queste si identificano con cellule che sembrano delaminare direttamente dalla parete degli stigmi, ed assumono tratti propri degli amebociti, quali la presenza di pseudopodi.

E' da notare che tra le cellule con caratteristiche di amebociti circolanti nelle barre una ristretta sottopopolazione di cellule esprime *Ci-Numb*. Questa potrebbe essere identificata con gli stadi di differenziamento degli emociti la cui presenza è descritta nell'emolinfa delle barre del faringe di *Ciona* (Ermak, 1976; Parrinello et al., 1990). D'altra parte, l'espressione del gene *Ci-Numb* in cellule riconoscibili come emoblasti nel sangue circolante prelevato dalla cavità periviscerale, induce a valutare questo gene come un possibile marcatore anche del differenziamento degli emociti nell'emolinfa circolante. Anche questo ulteriore tema irrisolto potrebbe beneficiare da uno studio più approfondito che preveda proprio l'uso di marcatori specifici, quali *Ci-Numb*.

Come già detto, le funzioni svolte dal faringe sono molteplici: gli stigmi e le cellule cigliate che li delimitano non solo convogliano l'acqua e i nutrienti verso il sistema digerente, ma rappresentano un avamposto nell'interazione con l'ambiente esterno. L'ipotesi che a livello del faringe siano presenti effettori e meccanismi di difesa messi in atto per captare segnali potenzialmente dannosi per l'organismo, è avvalorato dall'espressione di geni coinvolti nella risposta immune in *Ciona* negli amebociti presenti nelle barre del faringe (Pinto et al. 2007). Sembra quindi plausibile che la presenza di elementi del sangue debba essere assicurata non solo attraverso il richiamo da altri compartimenti del corpo, ma anche attraverso la stimolazione e la produzione di queste cellule nello stesso organo.

I dati relativi all'espressione di *Ci-Numb* esposti sono peraltro in accordo con quelli forniti dalla letteratura circa la presenza di siti ematopoietici nel faringe. Tuttavia, portano a riconsiderare l'identità e l'ubicazione di questi come gruppi di cellule compatte adiacenti all'epitelio del faringe secondo la descrizione di Ermak. In base alle attuali osservazioni, che si avvalgono di nuovi mezzi di indagine, i siti di produzione degli emociti sarebbero da identificare proprio nelle strutture degli stigmi e,

particolarmente, nelle aree che affiancano le cellule cigliate. Solo un piano di taglio ortogonale a quello utilizzato in questo studio avrebbe indotto ad interpretare come noduli a sé stanti i gruppi di cellule appartenenti invece alla struttura dello stigma.

Nello stomaco i siti di proliferazione cellulare identificati dal PCNA sono localizzati nei nuclei delle cellule che formano la parete dell'organo, particolarmente nella regione basale in cui risiedono le cellule che assicurano il continuo rinnovamento cellulare del tessuto. Questa attività si estende ai nuclei di gruppi di cellule del sangue localizzate nel tessuto connettivo presente nelle anse formate dal ripiegamento della parete dello stomaco che corrispondono ai siti ematopoietici identificati da Ermak. L'espressione del gene *Ci-Numb* e del suo prodotto si sovrappone a quella del PCNA, indicando così che a carico di questi tessuti il gene potrebbe agire non solo nel differenziamento delle cellule che andranno a costituire la parete dello stomaco, ma anche, e più indicativo ai fini della ricerca, degli emociti che hanno origine in questa area. È da notare come in questo compartimento del corpo dell'animale la localizzazione dell'espressione di *Ci-Numb* sia esclusivamente a livello nucleare, lasciando aperto anche in questo caso il problema del significato funzionale della proteina. Infatti, in questo tessuto, la proteina *Ci-Numb* potrebbe essere coinvolta nella regolazione di "pathway" differenti da quelli in cui è coinvolta nelle regioni del faringe.

Benchè osservazioni precedenti (non pubblicate) sembrano indicare che in questo tessuto si differenzino preferenzialmente cellule di tipo URG, uno studio a livello ultrastrutturale, non eseguito nell'ambito di questa ricerca, potrebbe rispondere con maggiore precisione a questa domanda. E' interessante comunque ipotizzare una compartimentalizzazione dell'ematopoesi che preveda il differenziamento della/e linea/e relative agli amebociti preferenzialmente nei tessuti del faringe, restringendo al connettivo che riveste l'apparato digerente quello delle cellule a granuli refrattili

(URG). *Ci-Numb* potrebbe rappresentare un buon marcatore molecolare utilizzabile per procedere in queste indagini.

L'analisi dell'espressione di *Ci-Numb* in stadi che vanno dalla metamorfosi allo stadio di giovane adulto, permette inoltre di identificare la possibile sede dell'ematopoiesi che dallo stadio iniziale, nel quale l'apparato digerente sembra essere il sito di espressione del gene, si estende alle strutture del faringe in formazione, fino a riprodurre negli stadi più avanzati il pattern che si ritrova nell'adulto. L'approccio di tipo morfologico ha messo in luce aspetti della formazione di strutture del faringe durante la metamorfosi non descritti in precedenza. Infatti, è stata identificata la formazione delle cellule cigliate degli stigmi che si differenziano dalle cellule della parete del faringe

In accordo con il fine di questa indagine, i risultati ottenuti individuano un marcatore di fasi precoci dell'ematopoiesi e forniscono anche una serie di informazioni collaterali, di interesse per la comprensione di alcuni aspetti della fisiologia di *Ciona intestinalis*. Infatti, *Ci-Numb* identifica e marca specificamente siti di produzione di cellule che vengono immesse nel sistema circolatorio, e aggiunge forza all'interpretazione di cellule presenti nell'emolinfa circolante quali emoblasti. Inoltre, la localizzazione attraverso l'espressione di *Ci-Numb* dei siti di ematopoiesi nello stomaco e nel faringe, in progressione già dalle prime fasi della metamorfosi, sottolineano la presenza di siti di reclutamento di emociti in organi che sono un punto di contatto dell'animale con l'ambiente e perciò strettamente coinvolti nella difesa fin dai primi stadi di sviluppo dell'animale adulto.

*Ci-Numb* rappresenta, quindi, un utile mezzo per iniziare una più approfondita analisi a livello molecolare del differenziamento e della proliferazione degli emociti che

richiederà l'identificazione degli altri, e sicuramente innumerevoli, fattori che partecipano a questo pathway.



## **TABELLA SOLUZIONI**

**TAE 10x (1 lt)**

Tris 48.4 g

acido acetico glaciale 11.42 g

EDTA 0.5 M pH 8.0 20 ml

**TBE 10x (1 lt)**

Tris 108 g

acido borico 55 g

EDTA 0.5 M pH 8.0 40 ml

**TE**

Tris-HCl pH 8.0 10 mM

EDTA 1 mM

**TBS (1 lt)**

NaCl 80gr

KCl 2gr

Tris 30gr

**MOPS 10x (1 lt)**

MOPS 41.8 g

sodio acetato 11.8 g

EDTA 0.5 M pH 8.0 20 ml

**“Running buffer” 5x (1 lt)**

Tris 15 g

Glicina 72 g

SDS 5 g

**“Blotting buffer” 1x (1 lt)**

Tris 3.03 g

Glicina 14.4 g

Metanolo 20 %

**PBS 10x (1 lt)**

NaCl 80 g

KCl 2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11.5 g

**“Resolving gel” (10%)**

30% Acrilammide/Bis 8.25 ml

Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 6.5 ml

H<sub>2</sub>O MQ 10.1 ml

TEMED 12.5 µl

Ammonio persolfato 10% 125 µl

**“Stacking gel” (4%)**

30% Acrilammide/Bis 3.3 ml

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 6.5 ml

H<sub>2</sub>O MQ 15 ml

TEMED 25 µl

Ammonio persolfato 10% 125 µl

**SSC 20x (1 lt)**

NaCl 175.3 g

sodio citrato 88.2 g

**MBT**

Acido maleico pH 7,5 0,1 M

NaCl 0,15 M

**Blocking Solution**

Tris 0,1 M pH 7,5

NaCl 0,15 M

Sheep serum 5%

Blocking reagent (Boehringer) 0,5%

**Tampone AP**

NaCl 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 50 mM

Tris-HCl pH 9,5 100 mM

### **Tampone Tris-glicina**

Tris 12,1 gr.

Glicina 7,5 gr.

### **Soluzione di Denhardt 50x (500 ml)**

Ficoll 5 gr.

Polivinilpirrolidone 5 gr.

Sieroalbumina bovina 5 gr.

### **Soluzione di ibridazione**

Formammide 40%

SSC 5x

Soluzione di Denhardt 1x

DNA di testicolo di salmone 100 µg/ml

tRNA 100 µg/ml

### **NTE (1 lt.)**

NaCl 0,5 M

Tris pH 7,0 10 mM

EDTA 5 mM

### **Soluzione A**

NaCl 0,5 M

Tris pH 8,0 10 mM

EDTA 5 mM

Tween 20 0,1%

## **ABBREVIAZIONI**

- A $\beta$ : proteina  $\beta$ -amiloide
- AD: Alzheimer
- APP: proteina precursore dell'amiloide
- CLP: "Common Lymphoid Progenitor"
- CMP: "Common Myeloid Progenitor"
- EST: "expressed sequence tag"
- GMC: "ganglion mather cell"
- h: ora
- HSCs: "Hematopoietic Stem Cells"
- ICM: massa cellulare intermedia
- LLC: cellule linfocita simile
- LT-HSCs: "long-term" HSCs
- MHC: complesso maggiore di istocompatibilità
- min: minuti
- MPPs: progenitori multipotenti
- NICD: dominio intracellulare di Notch
- NK: "natural killer"
- o/n: "over night"
- PAMP: recettori di riconoscimento di pattern
- PCR: reazione a catena della polimerasi
- PTB: "phosphotyrosine binding domain"
- PRR: "proline rich region"
- RAG1 e RAG2: prodotti dei geni della ricombinazione
- RER: reticolo endoplasmatico rugoso
- ST-HSCs: "short-term" HSCs
- TCR: recettori dei linfociti T
- TEM: microscopio elettronico a trasmissione
- TFs: fattori di trascrizione
- URG: granulocita univacuolare refrattile

## **BIBLIOGRAFIA**



Allman D, Aster JC, et al. (2002) Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev* 187: 75-86.

Anderson AC, Robey EA, et al. (2001) Notch signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Genet Dev* 11(5): 554-60.

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

Arizza V, Parrinello D (2009) Inflammatory hemocytes in *Ciona intestinalis* innate immune response *ISJ* 6: 58-66

Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, Rigoutsos I, Yoshizaki F, Pinto MR et al. (2003) Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: waiting for Godot. *Immunogenetics* 55:570-581.

Bacchi CE and Gown AM (1993) Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res* 26(7): 677-87.

Bani-Yaghoub M, Kubu CJ, Cowling R, Rochira J, Nikopoulos GN, Bellum S et al. (2007) A switch in numb isoforms is a critical step in cortical development. *Dev Dyn* 236:696-705.

Bhalerao S, Berdnik D, et al. (2005) Localization-dependent and -independent roles of numb contribute to cell-fate specification in *Drosophila*. *Curr Biol* 15(17): 1583-90.

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

Burighel P and Milanesi C (1977) Fine Structure of the Intestinal Epithelium of the Colonial Aseidian *Botryllus schlosseri*. Cell Tiss. Res. 182:357-369

Cantor AB and Orkin SH (2001) Hematopoietic development: a balancing act. Current Opinion in Genetics & Development 11:513-519

Cerwenka A, Lanier LL (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. Nat Rev Immunol 1:41-49.

Chiba S, Sasaki A, Nakayama A, Takamura K, Satoh N (2004) Development of *Ciona intestinalis* juveniles (through 2nd ascidian stage). Zoolog Sci 21:285-298.

Cloney RA (1977) Larval adhesive organs and metamorphosis in ascidians. I. Fine structure of the everting papillae of *Distaplia occidentalis*. Cell Tissue Res 183:423-444.

Colaluca IN, Tosoni D, Nuciforo P, Senic-Matuglia F, Galimberti V, Viale G et al. (2008) NUMB controls p53 tumour suppressor activity. Nature 451:76-80.

Conklin EG, (1905) The organization and cell lineage of the ascidian egg. J Acad Nat Sci (Philadelphia) 13:1 -19.

Cupit PM, Hansen JD, et al. (2003) Ikaros family members from the agnathan *Myxine glutinosa* and the urochordate *Oikopleura dioica*: emergence of an essential transcription factor for adaptive immunity. *J Immunol* 171(11): 6006-13.

D'Ambrosio P, Fanelli A, Pischetola M, Spagnuolo A (2003) Ci-GATAa, a GATA-class gene from the ascidian *Ciona intestinalis*: isolation and developmental expression. *Dev Dyn* 226:145-148.

Davidson B. and Swalla BJ (2002) A molecular analysis of ascidian metamorphosis reveals activation of an innate immune response. *Development* 129(20): 4739-51.

Degnan BM, Souter D, Degnan SM and Long SC (1997) Induction of metamorphosis with potassium ions requires development of competence and an anterior signalling centre in the ascidian *Herdmania momus*. *Dev Genes Evol* 206: 370-376.

Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A et al. (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298:2157-2167.

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

Dho SE, French MB, Woods SA, McGlade CJ (1999) Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-

associated variants of the phosphotyrosine binding domain. J Biol Chem 274:33097-33104.

Di Bella MA, De Leo G (2000) Hemocyte migration during inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata, ascidiacea). J Invertebr Pathol 76:105-111.

Dooley CM, James J, Jane McGlade C, Ahmad I (2003) Involvement of numb in vertebrate retinal development: evidence for multiple roles of numb in neural differentiation and maturation. J Neurobiol 54:313-325.

Du Pasquier L, Zucchetti I. and De Santis R. (2004) Immunoglobulin superfamily receptors in protochordates: before RAG time. Imm Rev 198: 233-248.

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

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

Ermak TH (1981) A comparison of cell proliferation patterns in the digestive tract of ascidians. Journal of Experimental Zoology 217:325-329

Ermak TH (1982). The renewing cell populations of ascidians, Am. Zool. 22: 795-805.

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

Forsberg EC, Bhattacharya D, Weissman IL (2006) Hematopoietic stem cells: expression profiling and beyond. *Stem Cell Rev* 2:23-30.

Fritsch HA, Van Noorden S, et al. (1982) Gastro-intestinal and neurohormonal peptides in the alimentary tract and cerebral complex of *Ciona intestinalis* (Ascidaceae). *Cell Tissue Res* 223(2): 369-402.

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

Fuke MT (1980) Contact reaction between xenogeneic or allogeneic celomic cells of solitary ascidians. *Biol. Bull.* 158, 304-315.

Fuke MT (1990) Self and nonself recognition in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. In *Defence molecules*. Ed. Marchalonis J., Reinisch C. Alan. R. Liss., New York. 107-117.

George WC (1926) The histology of the blood of *Perophora viridis* (ascidian). *J. Morph.* 41, 311-331.

Georgopoulos K (2002) Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and Ikaros. *Nat. Rev. Immunol.* 2:162.

Godeaux JEA (1989) Functions of the endostyle in the tunicates. *Bull. Mar. Sci.* 45: 228-242.

Gupta P., Gurudutta GU, et al. (2009) PU.1 and partners: regulation of haematopoietic stem cell fate in normal and malignant haematopoiesis. *J Cell Mol Med* 13(11-12): 4349-63.

Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, and Smale ST (1998) Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 12:782.

Hartenstein V, Evans CJ, Banerjee U (2003) Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell.* 5(5):673-90

Hartenstein V (2006) Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:677-712.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-299.

Hinman VF, Becker E, Degnan BM (2000) Neuroectodermal and endodermal expression of the ascidian Cdx gene is separated by metamorphosis. *Dev Genes Evol* 210:212-216.

Juven-Gershon T, Shifman O, et al. (1998) The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. *Mol Cell Biol* 18(7): 3974-82.

Kalk M (1963) Absorption of vanadium by tunicates. *Nature*. 198: 1010-1011

Kosik KS, (2009) MicroRNAs tell an evo-devo story. *Nat Rev Neurosci* 10(10): 754-9.

Kowalesky A, (1866) *Enwickelungsgeschichte der einfachen Ascidien*. *Mem Acad Imp Sci St Petersburg* 7: 1-19

Kustin K, Levine DS, McLeod GC, Curby WA (1976) The blood of *Ascidia nigra*: blood cell frequency distribution, morphology, and the distribution and valence of vanadium in living blood cells. *Biol Bull* 150:426-441.

Kvell K, Cooper EL, et al. (2007) Blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Clin Dev Immunol* 2007: 83671.

Kyriazis GA, Wei Z, Vandermeij M, Jo DG, Xin O, Mattson MP et al. (2008) Numb endocytic adapter proteins regulate the transport and processing of the amyloid precursor protein in an isoform-dependent manner: implications for Alzheimer disease pathogenesis. *J Biol Chem* 283:25492-25502.

Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ (2005) Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 5:866-879.

Marchalonis JJ, Adelman MK, Schluter SF, Ramsland PA (2006) Antibody repertoire in evolution: chance, selection and continuity. *Dev.Comp. Immunol.* 30: 223-47.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.

Milanesi C., Burighel P. 1978. Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus Schlosseri*. I. Hemoblast, granulocytes, macrophage, morula cell and nephrocyte. *Acta Zool.* 59, 135-147.

Millar R.H. 1953. Ciona. In: Colman J.S. ed. *L.M.B.C. Memoirs*, vol. 35, Liverpool: The University Press of Liverpool.

Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, Wu P, Neben S, and Georgopoulos K (1997) Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 16:2004

Morrison SJ, Kimble J (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441:1068-1074.

Nishida H (1987) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev Biol* 121:526-541.



Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H et al. (2003) CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol* 5:819-826.

Ogasawara M, Nakazawa N, et al. (2006) Identification of thirty-four transcripts expressed specifically in hemocytes of *Ciona intestinalis* and their expression profiles throughout the life cycle. *DNA Res* 13(1): 25-35.

Oikawa T, Yamada T, et al. (1999) The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell Death Differ* 6(7): 599-608.

Orkin SH (1992) GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575–581.

Orkin SH (1995) Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 7:870-877.

Orkin SH (1996) Development of the hematopoietic system. *Curr Opin Genet Dev* 6:597-602.

Ortolani G, (1971) Sul cell-lineage delle ascidie. *Boll Zool* 38: 85-88.

Overton J (1966) The fine structure of blood cells in the ascidian *Perophora viridis*. *J Morphol* 119:305-326.

Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. Nature 430:174-180.

Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL and Morrison SJ, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult selfrenewing haematopoietic stem cells. Nature 2003, 423: 302–305

Parrinello N, Patricolo E and Canicatti C (1984). Inflammatory reaction in the tunic of *Ciona intestinalis* (Tunicata). I. Encapsulation and tissue injury. Biol Bull 167: 229-237.

Parrinello N (1996). Cytotoxic activity of tunicate hemocytes. Prog Mol Subcell Biol 15: 190-217.

Parrinello N, De Leo G, Di Bella MA (1990) Fine structural observations of the granulocytes involved in the tunic inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata). J Invertebr Pathol 56:181-189.

Parrinello N, Cammarata M and Arizza V (1996). Univacuolar refractile hemocytes from the tunicate *Ciona intestinalis* are cytotoxic for mammalian erythrocytes in vitro. Biol Bull 190: 418-425.

Pasgue E, Jamieson CH, et al. (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1: 11842-9.

Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V et al. (2004) Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 167:215-221.

Pestarino M, Fiala-Medoni A, Ravera F (1988) Ultrastructure of the branchial wall of lower chordate: the ascidian *Ciona intestinalis*. *J. Morphol.* 197:269-276

Pinto MR, Chinnici MC, Kimura Y, Melillo D, Marino R, Spruce LA, De Santis R, Parrinello N, Lambris JD (2003) CiC3-1a-mediated chemotaxis in deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* (Urochordata). *J. Immun.* 171: 5521-5528.

Pinto MR, Melillo D, Giacomelli S, Sfyroera G, Lambris JD (2007) Ancient origins of the complement system: emergine invertebrate models. In: *Innate Immunity. Advances in experimental medicine and biology, series*, John D. Lambris ed., Springer New York.

Raftos DA, Tait NN, Briscoe DA (1987) Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol* 11:713-725.

Reugels, A. M., B. Boggetti, et al. (2006). Asymmetric localization of Numb:EGFP in dividing neuroepithelial cells during neurulation in *Danio rerio*. *Dev Dyn* 235(4): 934-48.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.

Roncarati R, Sestan N, Scheinfeld MH, Berechid BE, Lopez PA, Meucci O et al. (2002) The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7102-7107.

Rowe T (2004) *Assembling the Tree of Life* Eds. Cracraft and Donoghue, Oxford University Press 384-409

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

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

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

Satoh N, Satou Y, Davidson B, Levine M (2003) *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. *Trends Genet* 19:376-381.

Satou Y, Yamada L, Mochizuki Y, Takatori N, Kawashima T, Sasaki A et al. (2002) A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*. *Genesis* 33:153-154.

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

Song L, Jiang L, Li J (2009) Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin* 41: 527–534

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90:489-519.

Thorndyke MC (1977) Observations on the Gastric Epithelium of Ascidians with Special Reference to *Styela clara*. *Cell Tiss. Res.* 184:539-550

Till JE, Mc CE (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-222.

Uemura T, Shepherd S, Ackerman L, Jan LY, Jan YN (1989) numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 58:349-360.

Van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H and van der Valk M, et al. (1994) Posterior transformation, neurological, abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* 8: 757–769

van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C (1999) The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 13:1675-1690.

Verdi JM, Bashirullah A, Goldhawk DE, Kubu CJ, Jamali M, Meakin SO et al. (1999) Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10472-10476.

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

Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287:1442-1446.

Weissman IL, Shizuru JA (2008) The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112:3543-3553.

Whittaker JR (1977) Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. *J Exp Zool* 202:139-153.

Wood W, Jacinto A (2007) *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:542-551.

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

Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H (2003) Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas. *Differentiation* 71:486-495.

Zhang, Q., C. M. Zmasek, et al. (2008). Novel genes dramatically alter regulatory network topology in amphioxus. *Genome Biol* 9(8): R123.

Zucchetti I, Marino R, Pinto MR, Lambris JD, Du Pasquier L, De Santis R (2008) ciCD94-1, an ascidian multipurpose C-type lectin-like receptor expressed in *Ciona intestinalis* hemocytes and larval neural structures. *Differentiation*. 2008 Mar;76(3):267-82.