

Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

SETTORE DISCIPLINARE BIO/06

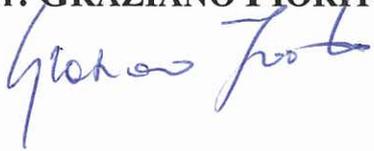
CICLO XX

**Identificazione e caratterizzazione di FoxP
nel sistema nervoso centrale di
Octopus vulgaris (Mollusca, Cephalopoda)**

Dott.ssa Maria Sirakov

Tutor

Dr. GRAZIANO FIORITO



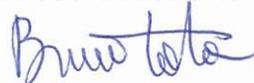
Co-Tutor

Dr. MARCO BORRA



Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof BRUNO TOTA



ANNO ACCADEMICO 2006-2007

	Pag.
Abstract	1
1. Introduzione	4
1.1 Premessa	4
1.2 I fattori di trascrizione Forkhead: cenni	5
1.3 FoxP	12
1.4 FoxP negli invertebrati	14
1.5 Focus su FoxP2	16
2. Alla ricerca di FoxP nel polpo: aspetti generali e scopi della tesi	22
2.1 I Cefalopodi e la loro complessità	22
2.2 Il polpo: <i>Octopus vulgaris</i>	24
2.3 Il polpo: il modello animale di questo studio	27
2.4 Scopo della tesi	29
3. Materiali, Metodi e Strategie sperimentali	31
3.1 Animali e loro campioni	31
3.2 Verificare la presenza di un FoxP in <i>O. vulgaris</i>	32
3.2.1 Analisi bioinformatica e disegno dei primers	32
3.2.2 Estrazione di RNA	33
3.2.3 Retrotrascrizione 'one-step'	34
3.2.4 Estensione del trascritto	36
3.3 Analisi del profilo di espressione di FoxP in <i>O. vulgaris</i> : RealTime qPCR	38
3.3.1 La Real Time PCR: cenni	39
3.3.2 La Real Time PCR: effetto dell'efficienza	42
3.3.3 La Real Time PCR: normalizzazione ed analisi dei dati	43
3.4 Localizzazione di FoxP nel sistema nervoso centrale di <i>O. vulgaris</i>	45
3.5 Analisi dei dati	48
4. Risultati	49
4.1 FoxP in <i>Octopus vulgaris</i> : identificazione e sue caratteristiche	49
4.2 FoxP in <i>Octopus vulgaris</i> : profilo di espressione	54
4.3 FoxP in <i>Octopus vulgaris</i> : localizzazione nel sistema nervoso centrale	61
5. Discussione e conclusioni	64
6. Bibliografia	69
7. Appendici	

ABSTRACT

In this study, I searched and was able to identify FoxP in the transcriptome of the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*, an invertebrate. In addition, I attempted to analyze the expression of Ov-FoxP in the brain of this animal. The results of this analysis are preliminary at this stage.

Fox proteins are a set of transcription factors highly conserved in metazoans. They are characterized by a typical DNA binding domain (Forkhead) that, among others, allows to identify 15 different classes of Fox genes. Fox proteins are reported to act as activators/repressors of transcription during both development (including differentiation) and the adult life (e.g. lung, brain, etc.). In vertebrates, FoxP2 (together with FoxP1), in particular, are known to be involved in the development of the neural circuit controlling bird-song and human speech.

Our interest for the octopus derives from the fact that this animal, together with other cephalopods, is considered as the most evolved among molluscs. The complexity of the architecture and wiring of the cephalopod nervous system stems from the simpler nervous systems of other taxa belonging to the phylum. In addition, cephalopods show a highly rich behavioral repertoire including the unique capability of changing the appearance of their body (through body patterning) in fractions of seconds and for both mimetic and communicative purposes. Taken all together, these features allow these animals to be considered analogous to higher vertebrates.

In the first part of my project, a detailed analysis of the aminoacidic and nucleotidic sequences available for FoxP2 (vertebrates) and FoxP (invertebrates), allowed us to design

appropriate oligos that were utilized in subsequent PCR experiments to identify the gene of interest in the transcriptome of the brain of *O. vulgaris*. FoxP resulted in a fragment of 220 bp that corresponded to the Forkhead domain. Further efforts allowed us to identify a 1111bp mRNA sequence of Ov-FoxP corresponding to almost the entire part of the mature mRNA codifying for this protein (the 5' extremity of the gene results unidentified at this stage).

During the second part of my project, I attempted to analyze the expression pattern of Ov-FoxP in the octopus brain using Real Time qPCR and in-situ hybridization. This was carried out with the aim of investigating the possible variability of expression of the gene in different parts of the brain (i.e. supra-, sub-esophageal masses and optic lobes) relative to another tissue (muscular tissue of the mantle) here considered as control. Other genes (16S, tubulin, actin) were also cloned for the aims of this project and their expression was taken as reference; an analysis that is carried out for the first time in *O. vulgaris*.

By Real-Time qPCR I was able to recognize a different pattern of expression in different parts of the brain (N = 10). The data allowed to identify a gradient in the expression levels of FoxP (relative to reference genes) in the subesophageal mass, when the smallest individual of my sample (30 g body weight) was compared with the others (150-2100 g body weight).

In situ hybridization (N=6) allowed to localize the expression of FoxP in the lobes of the octopus brain. Ov-FoxP transcripts were identified in neurons of: *i.* the optic lobes (several sparse cells possibly related with visual input processing); *ii.* the superior buccal and the lateral part of the basal lobes (high-order motor centers of the supraesophageal mass), and *iii.* the pedal tracts and anterior and posterior chromatophore lobes (subesophageal mass).

An elevated number of cells was revealed through in-situ hybridization in the last two lobes. It is noteworthy to mention that these structures are known to play a key role in the neural control of the chromatic expression of the skin of *O. vulgaris* (and other cephalopods): namely the animal's body pattern.

Our data seems to suggest that Ov-FoxP is expressed during different phases of the life of the octopus. In addition the localized expression in definite lobes and the variability among individuals of its expression in the same brain parts allows us to formulate the working hypothesis of the role of Ov-FoxP in the plasticity and/or maintainance of neural networks. My project in *O. vulgaris* confirms similar results deduced from other studies in both invertebrates (*i.e.* motor neurons in *C. elegans*) and vertebrates (*i.e.* song-birds, mouse, etc).

1. INTRODUZIONE

1.1 - PREMESSA

Il polpo, *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda), è stato a lungo considerato – tra gli invertebrati – un modello classico per lo studio del correlato neurale delle capacità di apprendimento e memorizzazione (rassegne in: Young, 1961; Sanders, 1975; Wells, 1978; Hanlon & Messenger, 1996). Nuove evidenze sperimentali ne garantiscono l'attualità e richiedono un rinnovato sforzo di ricerca (review in: Williamson & Charachiri, 2004; Hochner et al., 2006). Ciò nonostante, le informazioni genomiche e le conoscenze inerenti i meccanismi molecolari e cellulari del taxon sono scarse o quasi assenti. Fanno eccezione importanti contributi recenti che hanno permesso di riconoscere nei Cefalopodi membri di famiglie di fattori di trascrizione quali Hox, Pax e Engrailed (ad es. Tomarev *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003; Baratte *et al.*, 2007).

Nel corso di questi ultimi cinque anni alla Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli è stata iniziata una analisi dei meccanismi biologici che sottendono le capacità di apprendimento nella specie. In tal senso sono stati intrapresi nel polpo studi molecolari di base che hanno permesso l'identificazione per omologia di alcuni geni. Entro tale ottica si configura questo progetto di dottorato.

Oggetto dello studio è stata la ricerca, l'identificazione e l'analisi del profilo di espressione nel sistema nervoso centrale di *O. vulgaris* di un membro di una famiglia di fattori di trascrizione, i geni fox o forkhead ed in particolare di FoxP.

Fino ad ora la presenza di tale gene non era stata indagata in alcun cefalopode nè, più in generale, nei molluschi.

1.2 - I FATTORI DI TRASCRIZIONE FORKHEAD: CENNI

La scoperta dell'esistenza dei geni forkhead è da ricondursi all'analisi di un mutante di *Drosophila* caratterizzato da una larva con testa a due punte (fork-head; Weigel *et al.*, 1989a, b). Successivamente fu scoperta in roditori una analoga famiglia di proteine che legano il DNA (NHF-3; Weigel and Jackle, 1990). Nel corso di questi quasi 20 anni si è assistito al rapido accrescersi del riconoscimento di questi fattori di trascrizione. Essi sono largamente rappresentati nel regno animale e riconosciuti svolgere un ruolo chiave nell'embriogenesi e nel mantenimento del differenziamento cellulare (review in: Carlsson and Mahlapuu, 2002).

Ciò che li caratterizza è un dominio di legame (forkhead, 110 amino acidi) con il DNA altamente conservato tra le diverse specie. Tale dominio si ripiega in una tipica struttura realizzata da tre alfa-eliche ricoperte ad un estremo da tre foglietti antiparalleli ed accompagnate da due grossi cappi denominati 'ali'; da ciò deriva il termine "winged helix" con cui viene contrassegnato. Il dominio forkhead si lega al DNA riconoscendone specifiche sequenze nucleotidiche generalmente in forma di monomeri (Kaufmann and Knochel, 1996; Gajiwala and Burley, 2000). Fanno eccezione alcuni membri della famiglia (Foxp1, Foxp2, Foxp4) per i quali il legame con il DNA avviene in forma dimerica (ad es., Li *et al.*, 2004).

Ad oggi sono state identificate - dai funghi all'uomo¹ - più di 900 proteine appartenenti a questa famiglia di geni. Il rapido accumulo di sequenze nucleotidiche o proteiche da parte di numerosi laboratori in diversi paesi del mondo portò ad una imponente fioritura di denominazioni e sistemi di classificazione di questa famiglia di fattori di trascrizione. Il problema fu affrontato e risolto al primo convegno internazionale su “Forkhead/Winged Helix Proteins” che si tenne a La Jolla (California) nel novembre del 1998; sulla base dell'esito di questo incontro, e di successivi accordi inter-laboratori, fu stabilita una standardizzazione della nomenclatura di queste proteine (Kaestner *et al.*, 2000). Tale nomenclatura si basa su un'analisi filogenetica delle sequenze di questi fattori di trascrizione e sul fatto che, come accennato in precedenza, tutte le proteine Fox sono caratterizzate da un dominio “winged helix” molto conservato e da altre porzioni che lo sono meno (ad es. domini di trans-attivazione o trans-repressione). Fox (Forkhead box) è diventato l'acronimo adottato per tutti i fattori di trascrizione “winged helix/forkhead” identificati nei Cordati (Kaestner, *et al* 2000). Sulla base di questa nomenclatura i fattori di trascrizione Fox sono suddivisi, oggi, in 23 classi ciascuna identificata da una lettera dell'alfabeto; le diverse proteine presenti nello stesso organismo (membri) e appartenenti alla stessa classe sono contrassegnate da un numero arabo. Pertanto, il nome di una proteina Fox è dato dalla sequenza dei termini: **F**ox, sottoclasse **X**, membro **N** (per esempio: Foxd3).

Come accennato, poche similarità esistono tra le regioni delle diverse proteine Fox esterne al dominio di legame con il DNA. Ciononostante è possibile ricondurre delle caratteristiche

¹ Sembrano non essere presenti nelle piante.

comuni che ne determinano le proprietà regolatorie². Essi possono agire da attivatori o repressori dell'espressione di geni target e in alcuni casi in entrambi i modi sulla base dell'interazione con co-fattori o -repressori (Tabella 1.1).

Tabella 1.1 - Ruolo attivatore e/o repressore della trascrizione in alcune delle proteine Fox (fonte: Wijcher, 2005).

	ATTIVATORE	REPRESSORE
FoxA	X	
FoxC1	X	
FoxC2	X	X
FoxD1	X	
FoxD2	X	X
FoxD3		X
FoxE1		X
FoxF1-F2	X	
FoxG1		X
FoxH1	X	
FoxI1	X	
FoxJ1-J2	X	
FoxK1		X
FoxK2	X	
FoxL2		X
FoxM1	X	
FoxN1	X	
FoxO1-6	X	X
FoxP1-4		X
FoxQ1		X

I geni codificanti per i fattori di trascrizione forkhead sono largamente distribuiti nel genoma anche se non sembra che tale distribuzione sia causale (spesso formano cluster di geni forkhead). Nell'uomo le proteine FOX sono molto variabili in numero di amino acidi costituenti (ad es.: 319 per FOXE3, 801 per FOXM1) e la loro grandezza appare correlata all'organizzazione genomica, giacché la maggior parte dei geni forkhead contiene pochi

² Vengono riconosciuti: 'transactivation domains', 'nuclear localization signals', 'PKB phosphorylation-motifs' e 'acetylation-motifs' e 'Smad interaction domains'

introni. Wijchers (2005) riporta, tra l'altro, che un certo numero di geni forkhead sono codificati da un singolo esone (FoxC e FoxD), mentre un introne divide il dominio forkhead in FoxI e FoxG. In altri casi gli introni sono diversi (FoxM e FoxP). E' comunque degno di nota che le caratteristiche genomiche relative alla struttura eso/intronica sono altamente conservate nei membri delle diverse classi di geni fox (Wijchers, 2005).

L'analisi della letteratura di questi anni mostra una disproporzione tra i lavori che riportano e descrivono l'esistenza e l'espressione (spazio-temporale) dei diversi geni fox e quelli che ne descrivono il loro ruolo nei meccanismi di attivazione/repressione dell'espressione genica (cfr. anche Tab. 1.1): solo il 5% dei lavori indicizzati in Pubmed e relativi ai "geni forkhead" affronta questo aspetto (fonte Pubmed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>; ultimo accesso settembre 2007).

Un cenno finale, in questo breve esame delle conoscenze disponibili, deve essere fatto sulle funzioni dei geni forkhead.

Così come la grande maggioranza delle famiglie di fattori di trascrizione, i fattori forkhead sono coinvolti nello sviluppo embrionale. In particolare nella gastrulazione (Chevalier *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2006 per citarne alcuni) o nella formazione delle strutture necessarie alla determinazione del piano corporeo (ad es. El-Hodiri *et al.*, 2001; Friedman and Kaestner, 2006), nel differenziamento cellulare e nell'organogenesi (rassegna Kaufmann and Knochel, 1996; Carlsson and Mahlapuu, 2002; Lehmann *et al.*, 2003). I geni fox, al pari di altri fattori di trascrizione (i.e. Hox), agiscono in cluster nel corso dell'ontogenesi. E' interessante notare che geni come FoxF, FoxC e FoxL (FoxL1) sono rintracciabili sia nei

protostomi sia nei deuterostomi (Mazet *et al.* 2006; si veda anche Mazet *et al.*, 2003) e che essi costituiscono un cluster che si attiva sequenzialmente nel corso dello sviluppo dell'endo-mesoderma; meccanismo che si è mantenuto nel corso della filogenesi per oltre 500 milioni di anni in diverse linee evolutive (Mazet *et al.*, 2006).

Una citazione a parte merita il ruolo che i geni fox hanno nello sviluppo del sistema nervoso centrale. Come riassunto da Wijchers (2005) nel topo, ad esempio, alcuni membri di FoxA sono espressi nella parte anteriore della notocorda contribuendo all'induzione del differenziamento neurale e alla formazione del tubo neurale (è possibile che con essi cooperino altri fox quali membri della classe FoxH). Foxb1 è espresso negli interneuroni del midollo spinale ed in altre regioni del cervello incluso l'ipotalamo e i collicoli (corpi mammillari). Foxd1 riveste un ruolo nello sviluppo del sistema visivo e nella formazione del chiasma ottico e delle proiezioni retiniche (un ruolo complementare in tal senso è svolto da Foxg1). Membri di FoxO sono espressi nel cervello sia nell'embrione che nell'adulto e sembrano essere fattori chiave della regolazione della sopravvivenza neuronale e della morte cellulare suggerendone una funzione neuroprotettiva (basata su esperimenti in vitro, non ancora corroborati da evidenze in vivo).

Probabilmente il più famoso tra i geni forkhead è diventato, in questi ultimi anni, il FOXP2 dal momento che mutazioni in eterozigosi del gene FoxP2 sono state riconosciute come responsabili di disfunzioni nello sviluppo del linguaggio (Vargha-Khadem *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001). Infatti, una mutazione puntiforme sul braccio lungo del cromosoma 7 (Lai *et al.*, 2000), descritta in individui appartenenti alla famiglia KE, si è rivelata direttamente

correlata ad anomalie nel controllo di movimenti orofacciali necessari per l'articolazione del linguaggio (Lai *et al.*, 2001; Wassink *et al.*, 2002; Marcus and Fisher, 2003; O'Brien *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2003) nonché mostrano deficit di comprensione di strutture sintattiche complesse (Fisher *et al.*, 1998; Vargha-Khadem *et al.*, 1998; Pinker, 2001; Newbury and Monaco, 2002; Watkins *et al.*, 2002; Watkins *et al.*, 2002; MacDermot *et al.*, 2005). Questa mutazione comporta la sostituzione di un amminoacido all'interno della regione codificante per il dominio Forkhead di FoxP2. Dal punto di vista neuroanatomico ciò corrisponde ad anomalie strutturali di alcune aree del cervello (nucleo caudato, putamen, cervelletto e area di Broca) cui corrisponde una ridotta volumetria rispetto ai membri sani della famiglia (Tabella 1.2; Vargha-Khadem *et al.*, 1998).

Sono stati in seguito identificati altri individui al di fuori della famiglia KE, affetti dalla stessa patologia correlata alla medesima mutazione puntiforme o a delezioni a carico di FOXP2 tali da rendere impossibile l'interazione della proteina con il DNA (Newbury and Monaco, 2002; Kaminen *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003; Liegeois *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2003; MacDermot *et al.*, 2005; Vernes *et al.*, 2006).

In conseguenza di ciò, FOXP2 è stato considerato da alcuni autori il «gene chiave» per la comprensione dell'evoluzione del linguaggio nell'uomo (Balter, 2001, , 2002; Haesler *et al.*, 2004; Webb and Zhang, 2005).

Per i fattori di trascrizione forkhead sono stati anche riportate funzioni cellulari quali la regolazione del ciclo cellulare, la vitalità (FoxO), il metabolismo (FoxA, FoxC e FoxO) e l'immunoregolazione (ad es. FoxD2, FoxN1, FoxP1, FoxP3, FoxQ1).

Tabella 1.2 - Rilevazioni volumetriche effettuate, mediante risonanza magnetica, sui membri di tre generazioni della famiglia KE che presentavano una mutazione di FoxP2 (“malati”, n=6) e su membri non affetti dalla mutazione (“sani”, n=7; fonte: Vargha-Khadem *et al.*, 1998)

AREA CELEBRALE	“MALATI”	“SANI”
NUCLEI CAUDATI [destro, cm ³]	4.09 ±0.42	5.11±0.64
NUCLEI CAUDATI [sinistro, cm ³]	4.19±0.48	5.28±0.60
VOLUME INTRACRANIALE [cm ³]	1402±49	1431±139

Infine, a parte FoxP2, altre sindromi sono state riconosciute come dovute a mutazioni dei geni forkhead: ad esempio nel glaucoma congenito e nell’anomalia di Axenfeld-Rieger (FOXC1), nel linfoedema (FOXC2) ed in alcune anomalie oculari (FOXE3), nella sindrome “blepharophimosis-epicanthus inversus” (FOXL2). Altre anomalie riconducibili a mutazioni del gene FOXE1 includono agenesia tiroidea e palatoschisi. Analogamente membri della classe FOXO sono considerati implicate in diverse forme tumorali quali il rhabdomyosarcoma e la leucemia, infine, mutazioni nel gene FOXP3 risultano coinvolte nella syndrome detta IPEX (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked; i.e. immuno deficienza ed endocrinopatie).

E’, infine, degno di nota che le diverse sottoclassi (e membri) di geni Forkhead sono rappresentate nei diversi taxa con modalità diverse: nel lievito sono state identificate solo 4 proteine, mentre più di 35 nel topo e nell’uomo. Ciò ha portato diversi autori a supporre che il numero di geni forkhead nelle varie specie sia correlabile alla accresciuta complessità anatomica ed organizzativa (Carlsson and Mahlapuu, 2002; Lehmann *et al.*, 2003; Mazet *et al.*, 2003; Larroux *et al.*, 2006; Mazet *et al.*, 2006).

1.3 - FOXP

Nell'ambito dei Fox la classe P presenta caratteristiche peculiari rispetto agli altri.

Dalla comparazione delle strutture primarie risulta che la peculiare composizione amminoacilica del dominio Forkhead di tipo P sia – come per gli altri fox - altamente conservata (Figura 1.1). Molto conservati, tra le specie, risultano anche gli altri domini presenti in questa classe: Leucin Zipper, Zinc finger e la regione di Poliglutammine (assente in *Danio rerio*: Bonkowsky and Chien, 2005; Shah *et al.*, 2006). La regione di poliglutammine (poliQ), assente in FoxP3, risulta più corta in FoxP1; nelle diverse specie è variabile anche la sua distanza dalla regione N-terminale (Figura 1.1).

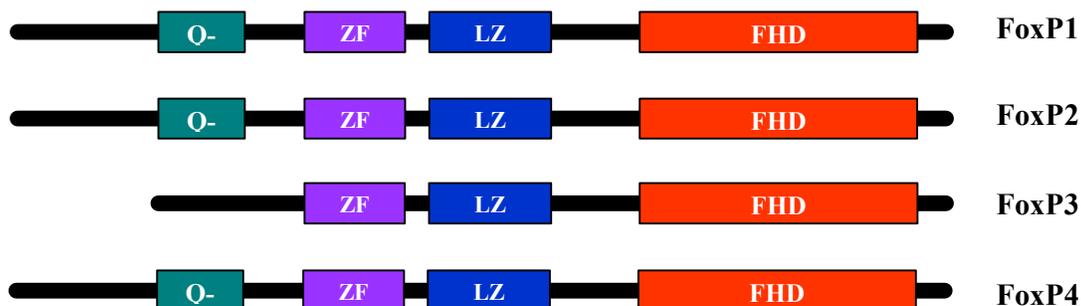


Figura 1.1 - Rappresentazione schematica dei domini FoxP nei vertebrati. Il dominio Forkhead (FHD) è costituito nelle diverse specie da 100-110aa; il motivo Leucin Zipper (LZ) da 28aa mentre il motivo Zinc Finger (ZF) da 25aa. La regione ricca in glutamina (Q-) è la più variabile in composizione e lunghezza. All'interno di questa regione, nei vertebrati FoxP2 presenta un caratteristico stretch di poliglutammine (30aa c.a.) assente in *Danio rerio*, mentre FoxP1 presenta uno stretch simile ma in posizione diversa nel topo (Teufel *et al.* 2003). La distanza in aa tra i diversi domini non è rispettata nello schema; essa risulta variabile nelle diverse specie.

La presenza di questi domini suggerisce – come accennato - che, a differenza degli altri Fox, l'attività dei FoxP come repressori della trascrizione possa essere regolata dalla formazione di omo-eterodimeri (Shu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Stroud *et al.*, 2006). Infine, FoxP4 presenta una maggiore affinità strutturale con FoxP1 e FoxP2, rispetto a FoxP3 (Li *et al.*, 2004).

Dal punto di vista genomico, i FoxP risultano essere alquanto complessi: numerose sono le isoforme e i trascritti di grandezza variabile dovuti a splicing alternativo, spesso tessuto-specifiche (Schon *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2006; Vernes *et al.*, 2006).

Dal punto di vista funzionale, nei vertebrati, FoxP1, FoxP2 e FoxP4 sono tutti coinvolti nello sviluppo dei sistemi gastrointestinale ed cardiorespiratorio, con peculiarità nei profili di espressione per ciascuno di essi. Nel topo, ad esempio, FoxP1 è espresso nel cuore anche allo stadio adulto, mentre FoxP2 è espresso nel sistema cardiovascolare solo durante l'embriogenesi (Shu *et al.*, 2001). Inoltre, durante lo sviluppo embrionale i profili di espressione dei tre Fox sono sovrapponibili nei diversi tessuti (Lu *et al.*, 2002; Ferland *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2003; Teufel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Teramitsu *et al.*, 2004; Schon *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2007), per questo motivo è stato ipotizzato che FoxP4 svolga un ruolo simile a FoxP1 e FoxP2.

Per quanto riguarda il sistema nervoso del topo FoxP1 e FoxP2 sono espressi sia nella fase embrionale che allo stadio adulto (Ferland *et al.*, 2003). Più in particolare, nel FoxP1 sembra essere coinvolto nel differenziamento dei neuroni motori del midollo spinale e, insieme a FoxP2, è espresso negli interneuroni dei neuroni motori dorsali. Nel cervello i due geni sono espressi negli emisferi cerebrali in via di sviluppo (Ferland *et al.*, 2003).

Il profilo di espressione di FoxP3 suggerisce un ruolo completamente diverso dagli altri membri; questo fattore di trascrizione infatti svolge un ruolo predominante nel processo di differenziamento dei linfociti T (Brunkow *et al.*, 2001; Bettelli *et al.*, 2005).

1.4 - FOX P NEGLI INVERTEBRATI

In banca dati sono disponibili sequenze proteiche³ di ortologi dei FoxP per diverse specie di invertebrati; fino ad oggi non risultano sequenze note in Molluschi. Dall'esame di queste risulta che, contrariamente a quanto accade nei vertebrati – dove sono riconosciuti quattro membri di FoxP (FoxP1, FoxP2, FoxP3, FoxP4) –, negli invertebrati sembra essere presente un solo FoxP, la cui struttura è assimilabile ai FoxP1/2/4 (Figg. 1.2; 1.3). In alcune specie di invertebrati sono state descritte isoforme, ma la loro presenza non è stata correlata ad eventuali splicing tessuto specifici.

Per gli scopi di questa Tesi di Dottorato sono state allineate e confrontate per analisi di similarità le sequenze proteiche dei FoxP noti in dieci specie di invertebrati con i FOX P1, FOX P2, FOX P3 e FOX P4 dell'uomo (Fig. 1.2).

La comparazione delle sequenze conferma che il dominio Forkhead è molto conservato, così come gli altri domini caratterizzanti la proteina. L'analisi supporta fortemente la conclusione che i FoxP della maggior parte delle specie di invertebrati sono simili ai FOX P1, FOX P2, FOX P4 e che il FOX P3 è ben distinto da essi (Fig. 1.3).

In aggiunta, il FoxP della spugna (*S. domuncula*) presenta caratteristiche abbastanza distinte ed è qui allocato come outgroup tra i FoxP degli invertebrati e distinto, comunque da FOX P3 (Fig. 1.3).

³ Alcune predette dalle sequenze nucleotidiche.

Figura 1.2 - continua

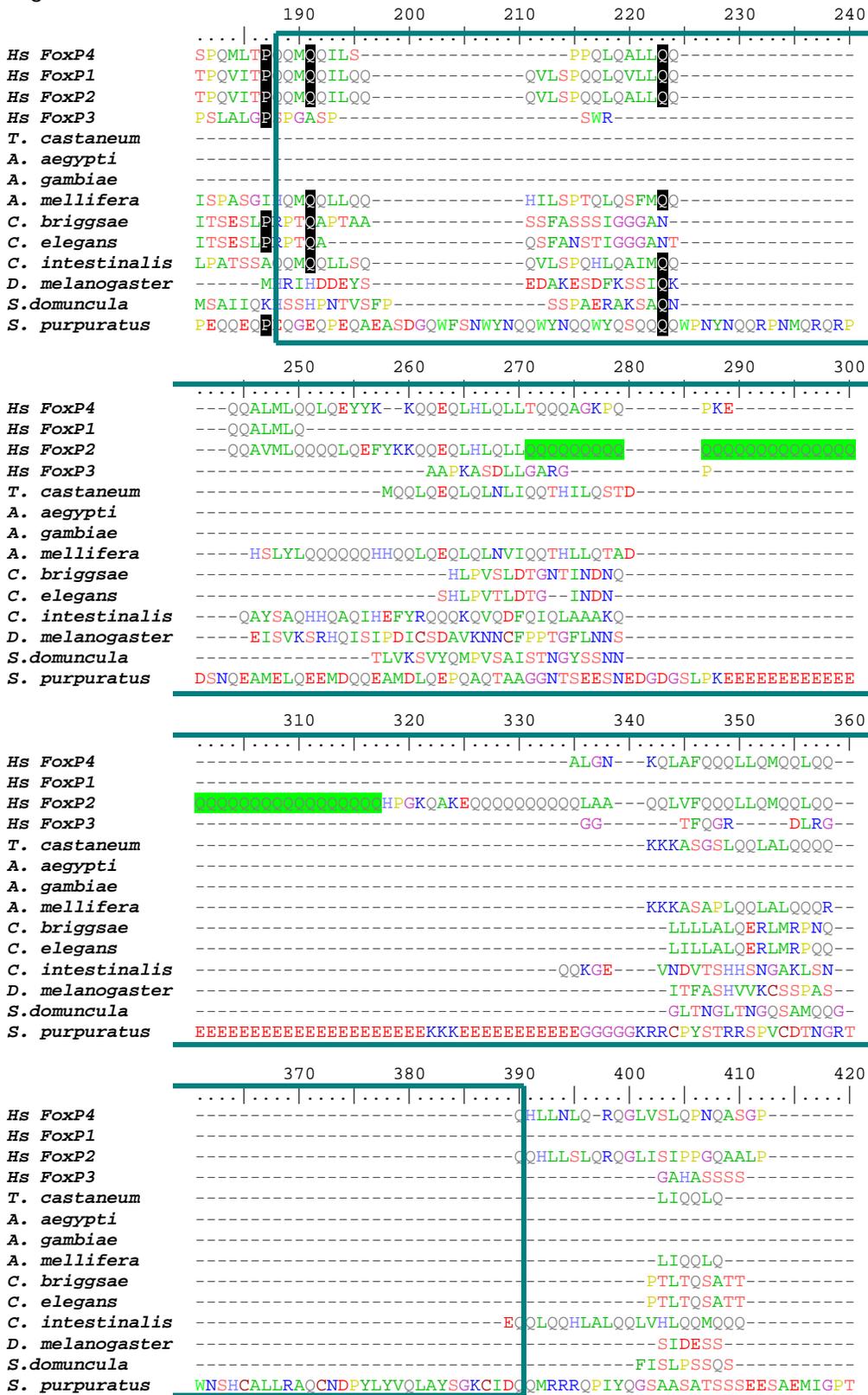


Figura 1.2 - continua

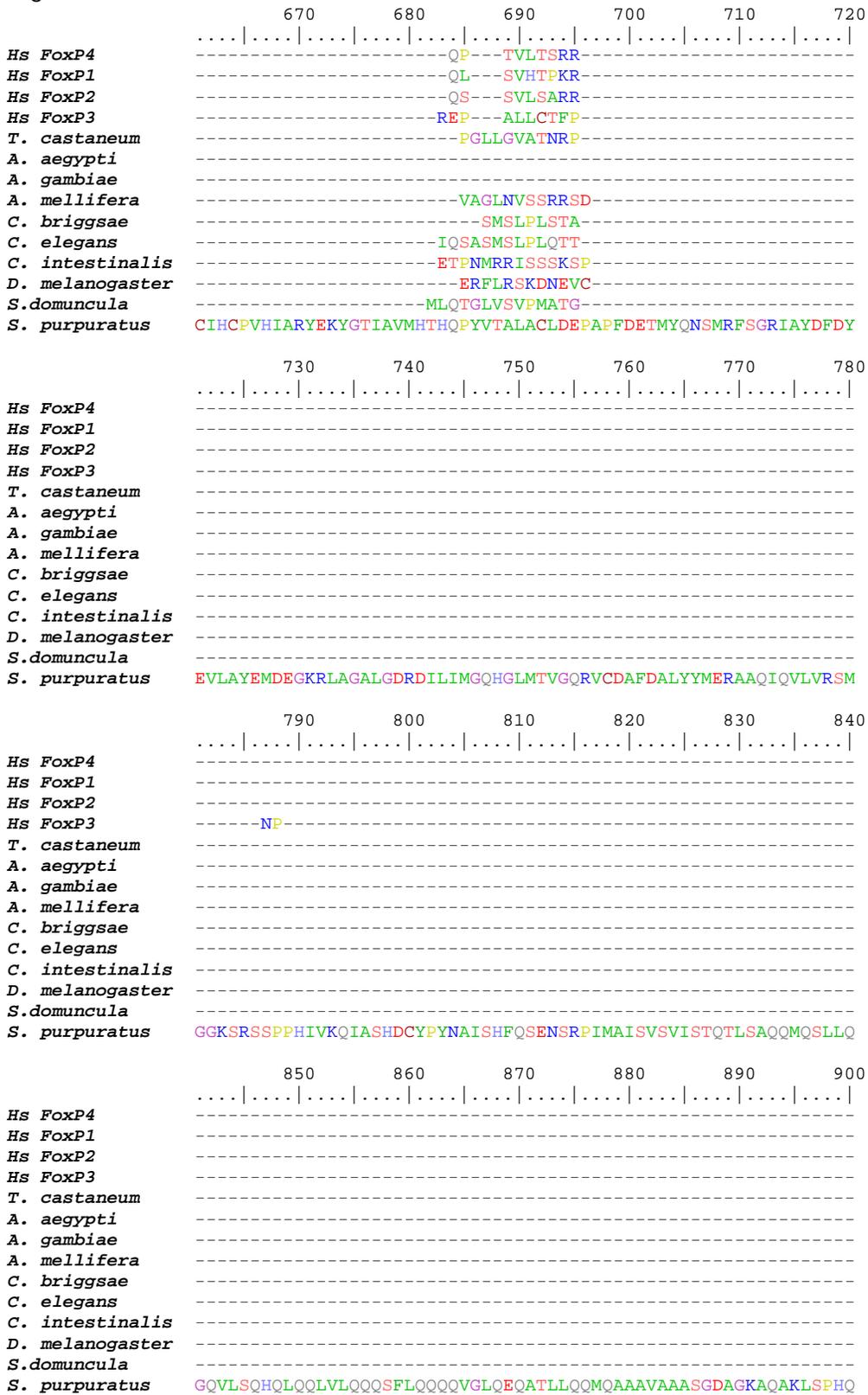


Figura 1.2 - continua

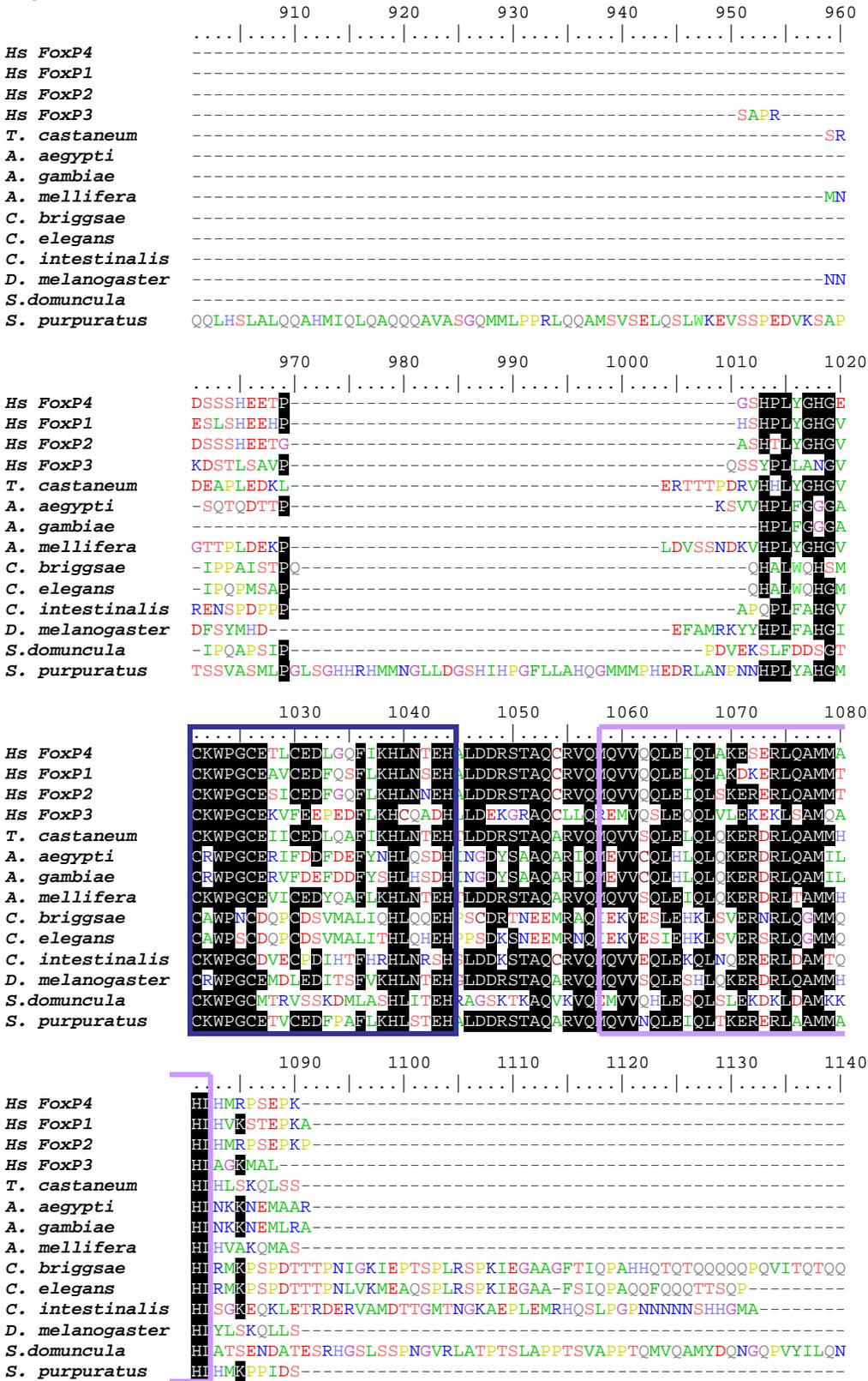


Figura 1.2 - continua

```

1150      1160      1170      1180      1190      1200
Hs FoxP4      P--FSQPVTVS--AADFDPDGLVHP--PTSAAAPVTPLR
Hs FoxP1      -----APQPLNLVSSVTLKSAASEASPLPHT---PTTPTAPLTPVT
Hs FoxP2      -----SPKPLNLVSSVTMSKNMLETSPQSLPQT---PTTPTAPVTPIT
Hs FoxP3      -----TKASSVASS--DKGSCCIVAAG--SQGPVVPAWSP
T. castaneum  -----PEPHKDG--VVTPTKMAVNTSLSQPSVS--IGPMVSAV
A. aegypti    -----IPMAGASPFVQPILPPPPPYDLIAGLRF--PAGEVTDGSMVE
A. gambiae    -----TPAAALAVERSGPPSTRP-----RTA-TVGLFGTGSOSA
A. mellifera  -----PEPECLSGTTLDRKLSSEKKQSLPMSN--MSGMPLPNNMP
C. briggsae  I-----TQVSPFSEAASSLLSIAASIAASTVGT--QMTTVPVSSMP
C. elegans    -----QVSPFSEAASSLLSIAATVAASTAAAVTSPINQISTVPSVSSMP
C. intestinalis -----LAPFPAPVTSRTPTISLSPSSPISAPHLGAF--PSTLFPATSV
D. melanogaster -----PTKIDRKD--VPGREGK--FCRSPPLTVNS--IGRPPIRQTNSP
S.domuncula  VNNQGTALIPLQLQQMSSSAQPLASQSHHSASTVPTSLKIDQSLSAKGGVVTSPGTP
S. purpuratus -----KQETPKSSVQSSPSLSKPVSVVQHTA---PSLPMVPSSTTP

```

```

1210      1220      1230      1240      1250      1260
Hs FoxP4      P--PGLGASLHGGGP--ARRRSSDKFCSPIS
Hs FoxP1      Q-----GPSVITTTSMHTVGP--IRRRYSDKYNVPISS
Hs FoxP2      Q-----GPSVITTPASVPNVGA--IRRRHSDKYNIPMS
Hs FoxP3      R-----EAPDSLFA-----VRRHLWGSHGNSTF
T. castaneum  R-----SPVLHSPAANVAGP--IRRRRLNDKKSALSLAGGLPYMLERA
A. aegypti    AALQLTNKQQQALHHHHQQQQQQ--QQHQQQQQAGRSKAGSIRAKYFGSPQDIDAGGYKEV
A. gambiae    PTLIASRSFP-----SP--SRAELSGRAGRNTQSGSLKLYS
A. mellifera  G-----SMPTMPTMPSMAGP--IRRRISDKSALSAG
C. briggsae  TFINHQSTSSQPSTNGPSGSGP--LLLQRAASSASTETSPNPD-RNFVARRSR---ISDK
C. elegans    SFLNHQLSTSSQPSSQASGSSG--LLLQRAASSASTETSPNPD--SKSFVPRRSR---ISDK
C. intestinalis -----SSPPLFNLYLNTSMTSGSRDAMSQ--ASKRR--HSAAVPIS
D. melanogaster S-----PLNLPVMVNSTNLCS--IKKRNDKNTFSINGGLPYMLERA
S.domuncula  KNITVTQTYTPNFESLIQPGGLKAVMLPTGSAGTLNSEAGFVRHGRQAAKER---PSPV
S. purpuratus VPITSIASAPYHLTSHHVTPGCP--IRRRNSEKYGSLIS

```

```

1270      1280      1290      1300      1310      1320
Hs FoxP4      -----SELAQNHEFYKNAD--RPPFTYASLIRQAILETPDRQLTLNEIYNWFTRMFAFWR
Hs FoxP1      -----ADIAQNQEFYKNAD--RPPFTYASLIRQAILESPDRQLTLNEIYNWFTRMFAFWR
Hs FoxP2      -----SEIABNYEFYKNAD--RPPFTYATLIRQAILESSDRQLTLNEIYNWFTRMFAFWR
Hs FoxP3      -----PEFLHNDYFKFHN--RPPFTYATLIRQAILEAPDRQLTLNEIYNWFTRMFAFWR
T. castaneum  -GLDVQQEIQNRREFYKNAD--RPPFTYASLIRQSIIESPDKQLTLNEIYNWFQNTFCYFR
A. aegypti    HFPDQDDVQNRREFYRSHD--RPPFTYASLIRQSIIESPDKQLTLNEIYNWFQNTFCYFR
A. gambiae    -LVPFADVHKNRREFYRSHD--RPPFTYASLIRQAILESPDRQLTLNEIYNWFQNTFCYFR
A. mellifera  -EIQRNREFYKNAD--RPPFTYASLIRQSIIESPDKQLTLNEIYNWFQNTFCYFR
C. briggsae  TVQPIATDIANKRDFYRND--RPPFTYASLIRQAILESPDQLTLNEIYNWFTETFAFWR
C. elegans    TVQPIATDIANKRDFYRND--RPPFTYASLIRQAILESSDQLTLNEIYNWFTETFAFWR
C. intestinalis -----TDLSONQEFYKNAD--RPPFTYASLIRQAILEAPDRQLTLNEIYNWFQKFAFWR
D. melanogaster -GLDVQQEIHNRREFYKNAD--RPPFTYASLIRQAILESPDKQLTLNEIYNWFQNTFCYFR
S.domuncula  AFDESQDALRKAIPRYSNID--RPPFTYASLIRQAILESSDQLTLCEIYAWFMKNFVYFR
S. purpuratus -----TEIHNNSDFYKNID--RPPFTYASLIRQAILEAPDRQLTLNEIYNWFTRMFAFWR

```

```

1330      1340      1350      1360      1370      1380
Hs FoxP4      RNITATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEVEYOKRRPKMT--GSPFLVK
Hs FoxP1      RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEVEYOKRRPKIS--GNPSLIK
Hs FoxP2      RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEVEYOKRRSOKIT--GSPFLVK
Hs FoxP3      NHPATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--SEKGAVWTVDELEFVKRRSQRPSRC--SNPTPGP
T. castaneum  RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEVEFYKRRPQ-----RS-
A. aegypti    RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NIKGAVWTVNEAEFCOKRRPQKLGIIQFKFQNSSG
A. gambiae    RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NIKGAVWTVNEAEFCOKRRPQK
A. mellifera  RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEVEFYKRRPQRACSTGGVPSKSP
C. briggsae  RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVEQ--NVKGAVWTVDDSEFYRNRSSA--RSQPOTPLP
C. elegans    RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVEQ--NVKGAVWTVDDSEFYRNRASA--RSQPOTPLP
C. intestinalis RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDENEYOKRRPQKFS--GSPAIRN
D. melanogaster RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEIEFYKRRPQR-----
S.domuncula  DNNPTWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVELNKSRAVWTVDDSLYKRRHMLVNDGDAQPTDS
S. purpuratus RNAATWKNVAVRHNLRLSHKCFVRVE--NVKGAVWTVDEIEFYKRRPQRMGSL--NTPPSTP

```

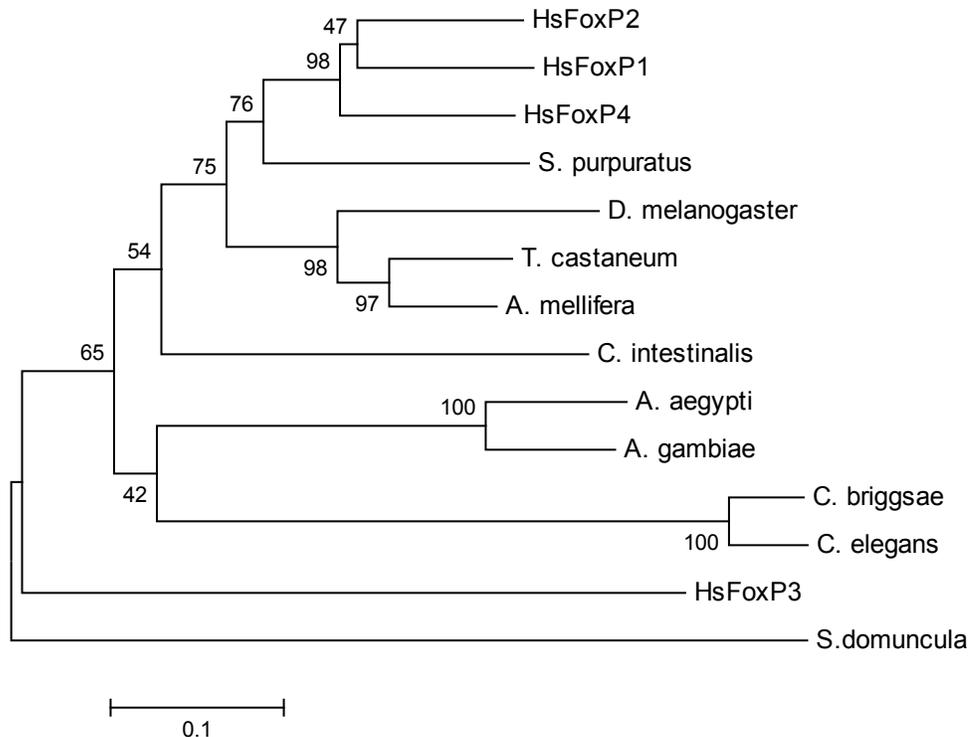



Fig.1.3 - Filogenesi molecolare delle proteine FoxP in invertebrati. L'albero è stato generato attraverso il metodo del "neighbor-joining" comparando le sequenze amminoacidiche dei FoxP di invertebrati. I quattro FoxP della specie umana (Hs) sono utilizzati come "outgroup". I numeri su ciascun ramo indicano la percentuale di bootstrap. Si veda anche l'allineamento mostrato in Figura 1.2.

Solo di alcune delle specie di invertebrati è noto il profilo di espressione di FoxP (Tab. 1.3) e un rapido esame dei dati disponibili non permette di individuare una funzione conservata di questo gene nelle diverse specie. E' tuttavia da rilevare che – in analogia a quanto accade nei Vertebrati – è riscontrabile l'espressione al livello del sistema nervoso di varie specie confermando la visione del ruolo di FoxP nel differenziamento neuronale (Tab. 1.3).

Tabella 1.3 - Riassunto schematico delle informazioni disponibili circa le aree corporee dove FoxP risulta essere espresso in alcune specie di invertebrati.

SPECIE	FASE	TESSUTO/REGIONE DI ESPRESSIONE	FONTE
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Adulto	Gangli (testa e coda); cordone nervoso centrale; coda	Hope <i>et al.</i> 2003 ¹
<i>Drosophila melanogaster</i>	Larva ²	Sacco vitellino; sistema nervoso centrale; cordone ventrale	Lee e Frash, 2004 ³
<i>Ciona intestinalis</i>	Larva ⁴	Endostilo; faringe; cuore; intestino; ganglio neurale; epidermide; stomaco; esofago.	http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html ³
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Larva ⁵	Polo vegetale; intestino (anteriore e medio)	Tu <i>et al.</i> , 2006 ³

- 1 - attraverso studio di "gene expression reporter"
- 2 - stadi 10, 13, 14
- 3 - evidenze dedotte da studi di ibridazione *in situ*
- 4 - vari stadi da gastrula a larva "giovanile"
- 5 - studiato fino allo stadio di Pluteus

1.5 - FOCUS SU FOXP2

FoxP2 è stato considerato da numerosi autori come una pietra miliare nell'evoluzione della specie umana (Zhang *et al.*, 2002; Gentilucci and Corballis, 2006) soprattutto in relazione al suo ruolo per la determinazione nel circuito neurale sensoriale-motorio che sottende le capacità di produzione (e controllo) del linguaggio articolato (si vedano ad es. Lai *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 2002; Marcus and Fisher, 2003; Vargha-Khadem *et al.*, 2005; si veda anche White *et al.*, 2006).

Numerosi sono gli studi condotti allo scopo di acquisire conoscenze e informazioni circa l'espressione e possibili funzioni di FoxP2 in altri Vertebrati. Qui di seguito citerò solo alcuni esempi.

Durante diversi stadi di sviluppo, il profilo di espressione di FoxP2 nel cervello del topo e nel feto umano mostra forti omologie (Ferland *et al.*, 2003).

Analogamente, molte similitudini sono state riscontrate comparando uccelli e rettili (Haesler *et al.*, 2004) e pesci (Shah *et al.*, 2006). In particolare, sono risultate interessate all'espressione di FoxP2 aree quali la parte ventrale del telencefalo (striato), il tetto ottico, la regione collicolare, il cervelletto, il talamo dorsale e l'ipotalamo (Shah *et al.*, 2006).

Questo approfondimento su FoxP2 non può trascurare gli studi condotti sugli uccelli.

La specie umana e gli uccelli canori rappresentano due dei pochi taxa noti, in cui la capacità innata di produrre vocalizzazioni viene modificata nell'individuo a seguito dell'esperienza. In questi animali, la comunicazione vocale appresa (compreso il linguaggio umano) è – infatti – una caratteristica comportamentale determinata essenzialmente dall'esperienza sociale. Affinchè la “vocalizzazione” si modifichi è necessario un feedback audio-motorio che consente all'individuo di valutare “on-line” il suono emesso/ascoltato in maniera da raggiungere l'ottenimento del desiderato “output” vocale⁴.

Analogamente a quanto accade nei Mammiferi, negli uccelli i suoni sono prodotti da una struttura, il siringe, che è “governata” da un circuito neurale che mostra caratteristiche comuni in tutte le specie di uccelli (rassegne in: Gahr, 2000; Farries, 2004). Alcune differenze nell'organizzazione e neuroarchitettura di questi circuiti sono, però, riconducibili

⁴ Sia emesso in contemporanea con il suo modello, sia successivamente sulla base dei ricordi.

al fatto che le specie siano capaci di modificare il canto a seguito di apprendimento o meno. (si veda ad es.: Brenowitz *et al.*, 1997; Marler, 1997; Gahr, 2000).

Nel corso di questi anni numerosi contributi hanno sottolineato il coinvolgimento di FoxP2 nella determinazione del circuito neurale che sottende la produzione del canto negli uccelli canori. Tra questi è degno di nota il contributo di White e collaboratori che hanno mostrato per mezzo di ibridazione in situ che FoxP1 e FoxP2 in *Taeniopygia guttata* si esprimono in aree corticostriate congruenti con quelle note – da studi sulla famiglia KE – essere coinvolte nel processamento senso-motorio del linguaggio articolato nell'uomo (Teramitsu *et al.*, 2004; Fig. 1.4). Gli autori hanno, infatti, riscontrato che l'espressione di FOXP1 e FOXP2 nel cervello del feto sono simili a quelle della specie di uccelli in esame.

In contributi seguenti, gli autori hanno anche cercato di stabilire se FoxP2 avesse un ruolo nel circuito neurale che controlla il canto in uccelli adulti (Fig. 1.4). In particolare, tali studi hanno evidenziato che, quando un maschio adulto di *Taeniopygia guttata* canta, i livelli di espressione di mRNA di FoxP2 sono inferiori (nell'area X⁵) rispetto a quelli osservati quando l'animale non canta. Questa “downregulation” è particolarmente evidente in maschi che cantano in isolamento, ma non si riscontra in maschi che “indirizzano” il loro canto a femmine (Teramitsu & White, 2006). Di conseguenza, la ridotta espressione di FoxP2 non sembra essere conseguenza dell'azione motoria dovuta al canto.

⁵ La regione all'interno dello striato che è deputata al controllo del canto.

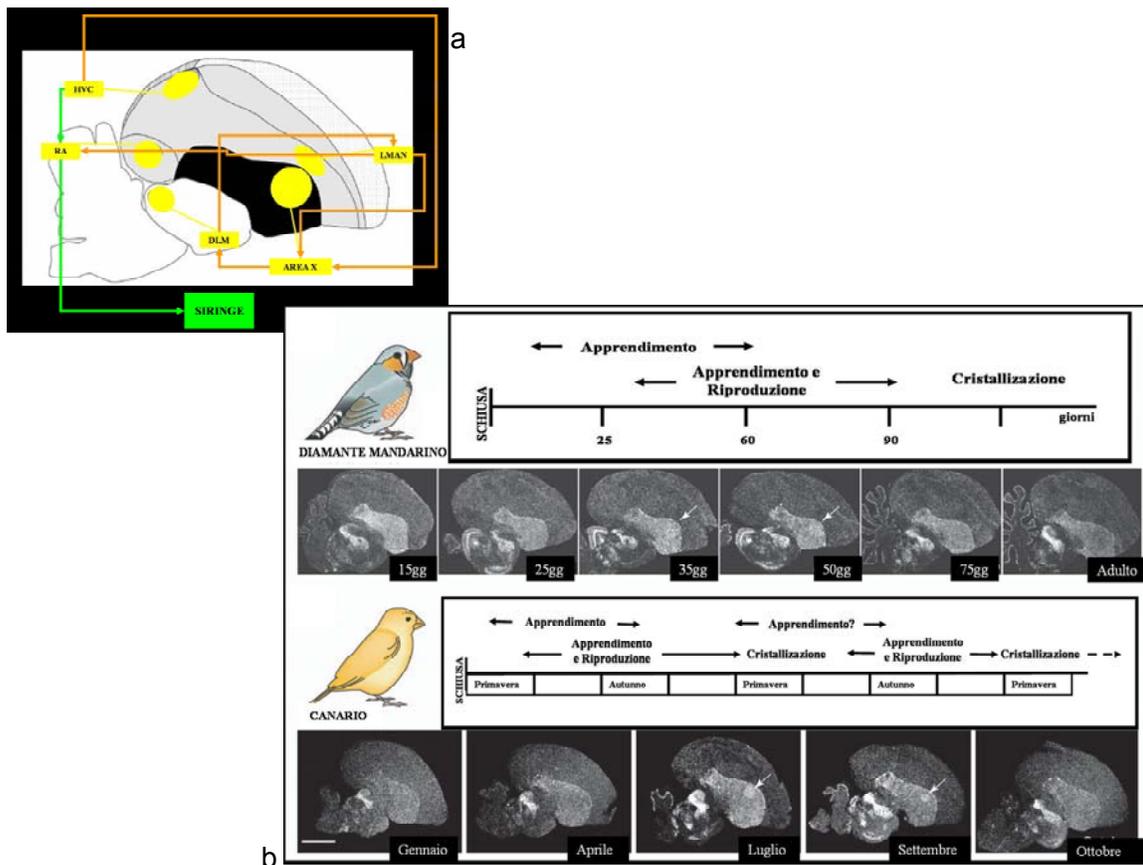


Figura 1.4 - Il circuito neurale che controlla il canto negli uccelli (a). Le aree sono indicate e localizzate in uno schema del cervello di questi animali. Nella parte bassa della figura (b) sono riportate le localizzazioni di espressione di FoxP1 e FoxP2 nelle aree del cervello di due specie di uccelli canori. L'espressione è correlata con la vita dell'animale e le diverse fasi (apprendimento del canto ed eventuale sua "cristallizzazione"). Dettagli nel testo.

Queste osservazioni aprono importanti prospettive di studio dei meccanismi molecolari che sottendono il controllo del circuito neurale che controlla il canto (e il linguaggio) e della comunicazione in contesti sociali e non, in particolare al di fuori di periodi ritenuti classicamente "sensibili" (durante lo sviluppo del circuito nervoso, ad esempio).

La comparazione di mutazioni sinonime e non nelle sequenze di FoxP2 di topo, scimmie e uomo rileva che il gene ha subito pressione selettiva durante l'evoluzione umana recente (Enard et al., 2002; Clark et al., 2003). Dalla divergenza dalle scimmie antropomorfe, l'analisi filogenetica evidenzia nell'uomo solo due sostituzioni non-sinonime. Una di queste sono state rilevate anche in altri mammiferi (i.e. carnivori). La sola rimanente ad esclusivo carico della specie umana è relativa a un dominio proteico non ancora meglio caratterizzato e il suo significato funzionale resta a tutt'oggi non chiaro.

Inoltre, la variabilità di sequenza in *Homo sapiens* suggerisce che l'allele "uomo-specifico" è stato fissato nella popolazione come risultato di una selezione positiva piuttosto che di una riduzione di selezione negativa. Tale fissazione è stimata essere occorsa durante gli ultimi 200000 anni durante i quali è noto che la comunicazione basata sul linguaggio "umano" è apparsa (Enard et al., 2002).

Considerato che l'apprendimento del linguaggio necessita di imitazione vocale nell'uomo, l'ipotesi della correlazione aminoacidica è stata investigata anche in altre specie note per essere capaci di imitazione dei suoni e di vocalizzazioni (i.e. uccelli canori, pipistrelli, balene e delfini; Webb et al, 2005; Haesler et al. 2004).

I risultati ottenuti non hanno confermato questa ipotesi: non c'è correlazione tra la capacità di apprendimento vocale di una data specie e una particolare versione di FoxP2 (Sharff & Haesler, 2005). Ciò lascia concludere che FoxP2 non è stato direttamente coinvolto nell'evoluzione delle capacità di apprendimento canoro negli uccelli.

In alternativa, la selezione potrebbe aver agito sulla grande regione non codificante di FoxP2. Tale possibilità è supportata da evidenze teoriche e sperimentali che sottolineano l'importanza di sequenze regolatorie nell'evoluzione di caratteri complessi (Carroll, 2005).

Gli studi su FoxP2 sono solo all'inizio ed in particolare restano aperte importanti domande come:

- quali sono i geni regolati da FoxP1 e FoxP2?
- cosa regola l'espressione di FoxP2 nell'area X degli uccelli?
- qual'è il ruolo – se esiste - di FoxP1 nel canto degli uccelli e nel linguaggio umano?
- quale è l'identità e caratterizzazione di neuroni di aree palliali e corticali che esprimono FoxP1 e FoxP2?

Certamente altre domande possono essere formulate e molte ne deriveranno dai risultati che ci si aspetta numerosi per il futuro.

2. ALLA RICERCA DI FOXP NEL POLPO:

ASPETTI GENERALI E SCOPO DELLA TESI

2.1 - I CEFALOPODI E LA LORO COMPLESSITÀ

I Molluschi rappresentano uno straordinario taxon caratterizzato da una elevatissima diversità di morfotipi (Kandel, 1979; Lee et al., 2003).

A tale complessa varietà corrisponde una altrettanto diversificata morfologia strutturale (e funzionale) del sistema nervoso (review in: Bullock, 1965; Kandel, 1979). Nel phylum si passa da forme semplici con sistema nervoso dove le strutture gangliari sono assenti o ridotte (ad es. Monoplacofori), a forme dove i gangli sono “tipicamente” sviluppati (Gasteropodi), a forme altamente complesse dove il sistema nervoso centrale è caratterizzato da una estrema cerebralizzazione dei gangli, come accade nei Cefalopodi.

Questi ultimi, in particolare, sono un taxon alquanto diversificato (sono note circa 800 specie viventi) che si è evoluto acquisendo forme complesse, innovative e distinte quando confrontate a quelle del putativo Monoplacoforo ancestrale (Runnegar and Pojeta, 1974).

Essi condividono con gli altri taxa di Molluschi le caratteristiche morfologiche essenziali (conchiglia, mantello e piede) che qui assumono adattamenti e modificazioni straordinarie e del tutto peculiari. Ad esempio, il mantello acquisisce nuove funzioni (i.e. assistenza al nuoto e alla locomozione in generale), mentre il piede si trasforma in una corona di braccia (e nel sifone) la cui flessibilità e capacità prensile garantiscono a queste specie il successo come predatori.

Le novità morfologiche sono accompagnate da altrettante “innovazioni” nel sistema sensoriale e neurale che hanno permesso a questi animali di competere nel corso dell’evoluzione – dal Cambriano superiore ad oggi – con i loro rivali: i Pesci. E’, infatti, grazie alla competizione (compresa la pressione predatoria) dei vertebrati che i Cefalopodi Coleoidi (*i.e.* seppie, calamari e polpi) hanno evoluto le singolarità e gli adattamenti morfologici, fisiologici, comportamentali ed ecologici che li caratterizzano (Packard, 1972; si vedano anche: Aronson, 1991; O’Dor & Webber, 1991).

La grande complessità del sistema nervoso dei Cefalopodi – la più elevata del phylum – può essere riconosciuta a tre livelli.

- 1: la grandezza del cervello (relative alla taglia corporea) è comparabile a quella dei vertebrati, posizionando i cefalopodi solo al di sotto dei vertebrati superiori (*i.e.* uccelli e mammiferi; Packard, 1972).
- 2: in un polpo di un chilogrammo di peso corporeo è possibile contare circa 500 milioni di neuroni. Un terzo di essi (almeno 200 milioni di cellule) costituiscono il sistema nervoso centrale (Young, 1963): un numero di cellule che è da duecento a diecimila volte più grande di quello di altri invertebrati (quali *Apis* e *Aplysia*, rispettivamente).
- 3: La complessità del sistema nervoso centrale del polpo non si limita alla taglia relativa e al numero di neuroni nel “cervello”, ma è anche correlabile al livello di organizzazione neuronale (rassegne in: Budelmann, 1995; Williamson and Chrachri, 2004).

2.2 - IL POLPO, *OCTOPUS VULGARIS*

Tra tutti i cefalopodi, il più “famoso” per gli studi sulla capacità di apprendimento è il polpo, *Octopus vulgaris*.

L’interesse scientifico per questo animale raggiunse negli anni ’50 e ’60 il suo massimo grazie all’iniziativa di J.Z. Young e dei suoi collaboratori.

Il loro scopo era di analizzare le capacità di apprendimento di questo animale combinando osservazioni comportamentali a lesioni di centri nervosi per ricavarne informazioni sull’organizzazione funzionale del cervello del cefalopode che è “disegnato” per il controllo di vari comportamenti, in particolar modo la risposta predatoria.

O. vulgaris apparve essere il candidato ideale per una serie di ragioni:

- i.* la facilità di mantenimento in acquari in spazi relativamente ristretti;
- ii.* la sua naturale “curiosità”: pochi giorni in cattività sono normalmente sufficienti a che l’animale mostri le sue attitudini distintive (voracità ed esplorazione verso stimoli naturali e artificiali);
- iii.* l’estrema facilità nel recupero dopo interventi chirurgici anche estesi, in contrasto con quanto succede con altri cefalopodi (ad esempio: *S. officinalis*; Sanders and Young, 1940).

La versatilità del polpo e dei protocolli di addestramento ad esso applicati consentì una rapida crescita delle ricerche consentendo l’espandersi degli studi in una sorta di ampio respiro (per una review si veda: Wells, 1965).

Le conoscenze disponibili ad oggi sono accurate ed estese per quanto riguarda l’anatomia del sistema nervoso dei cefalopodi (review in: Nixon & Young, 2003) e gli aspetti

fisiologici caratterizzanti l'assone gigante del calamaro (Adelman *et al.*, 1990). Tuttavia, l'informazione disponibile sulla fisiologia e le connessioni caratteristiche dei circuiti neurali (i.e. sistema delle fibre giganti; sistema del controllo neurale dei cromatofori; il network delle statocisti; il sistema sensori-motorio visivo e tattile) all'interno del sistema nervoso centrale di questi animali è tuttora largamente incompleta.

La stessa conoscenza del “circuitto di apprendimento e memorizzazione” del polpo – benchè estesamente studiato da Young e collaboratori (rassegne in: Young, 1991, 1995; Hochner *et al.*, 2006) – presenta lacune funzionali (Williamson and Chrachri, 2004) ad esempio nella comprensione di come l'informazione è classificata e come la risposta comportamentale modulata dal punto di vista cellulare e molecolare.

Tra i circuiti neurali presenti nel sistema nervoso centrale di *O. vulgaris* (e di tutti i Cefalopodi) merita una particolare menzione il cosiddetto sistema dei lobi cromatofori (Boycott, 1953; Messenger, 2001) che rappresenta il sistema di controllo centralizzato della più peculiare caratteristica comportamentale dei cefalopodi: il cambiamento di aspetto o “Body Patterning”.

I cefalopodi sono, infatti, in grado di modificare il proprio aspetto (forma, colore, tessitura della pelle) in risposta ai diversi contesti ambientali, non solo a scopi mimetici ma anche comunicativi (rassegne in: Hanlon & Messenger, 1996; Borrelli *et al.*, 2006).

A differenza dei Vertebrati (Teleostei), nei Cefalopodi il cambiamento cromatico non è sotto controllo ormonale ma neurale (Demskey, 1992; Messenger, 2001). Ciò grazie al controllo fine di migliaia di organuli presenti nella pelle degli animali, i cromatofori. Ogni cromatoforo è costituito da una cellula sacciforme contenente un pigmento e circondata da

muscoli radiali, la contrazione di questi muscoli espande la sacca rendendone visibile il colore, mentre il loro rilassamento provoca la contrazione del cromatoforo rendendolo quindi invisibile e permettendo così di evidenziare gli strati muscolari sottostanti (review in: Messenger, 2001). In *O. vulgaris* sono presenti cromatofori di diverso colore, dal giallo chiaro al nero (in relazione all'età di ogni singolo cromatoforo; Froesch and Packard, 1979; Packard, 1985).

Il controllo nervoso centralizzato della muscolatura dei cromatofori consente il cambiamento istantaneo del colore di intere aree della pelle. Tale controllo è basato – per quel poco che si sa oggi - su un'organizzazione gerarchica del “sistema” con il coinvolgimento di diversi distretti neurali (lobi ottici, lobi laterali basali e lobi dei cromatofori, anteriori e posteriori). Sulla base delle informazioni disponibili, i lobi dei cromatofori anteriori controllano i cromatofori presenti sulla testa e braccia dell'animale, mentre quelli posteriori controllano i cromatofori presenti sul mantello (Boycott, 1953; review in: Messenger, 2001).

Come accennato il sistema si sviluppa durante l'accrescimento e la vita dell'animale: nel corso della vita il “body patterning” (cioè la capacità di produrre variazioni del proprio aspetto) matura nel polpo. Animali giovani esibiscono componenti cromatiche semplificate (ad esempio per dissuadere un predatore) che invece si complicano e diversificano da adulti; l'esempio classico è la reazione denominata Flamboyant/Dymantic (review in: Borrelli et al., 2006).

Fino ad oggi non si sa se la diversa risposta comportamentale sia dovuta a variazioni strutturali nell'architettura e nelle connessioni all'interno dei lobi (specialmente basali laterali e cromatofori) o, ad esempio, a variazioni nella risposta fisiologica dei cromatofori. In aggiunta, molto resta ancora da capire sull'ontogenesi di questo sistema, sull'influenza dell'ambiente circostante e sui circuiti che ne permettono non solo la produzione ma anche la regolazione dell'intensità e della durata. Quest'ultima caratteristica potrebbe essere correlata alla percezione che l'animale ha di sé stesso rispetto all'ambiente circostante, come recentemente mostrato in alcuni studi condotti su *Sepia*, che si auspicano più numerosi in futuro (Chiao & Hanlon, 2001a,b; Barbosa et al., 2004; Chiao et al., 2004, 2005).

Nessuno studio, fino ad ora, è stato intrapreso allo scopo di identificare possibili basi molecolari e cellulari del sistema di controllo del body patterning nei cefalopodi.

2.3 – IL POLPO: IL MODELLO ANIMALE DI QUESTO STUDIO

Nonostante le difficoltà incontrate con un sistema modello così nuovo, anche se largamente impiegato, i Cefalopodi restano un gruppo di animali estremamente affascinante capace di produrre un ampio repertorio di risposte comportamentali; proprio per questo essi rappresentano un eccellente modello animale – tra gli invertebrati – per la comprensione del comportamento nei termini degli aspetti computazionali e della macchina biologica e neurale ad esso connesso.

In tempi più recenti particolare attenzione alle procedure di mantenimento, manipolazione e addestramento (Walker et al., 1970), e una approfondita conoscenza del repertorio comportamentale del polpo e dei cefalopodi in generale (Maldonado, 1963; Packard, 1963; Messenger, 1968; Packard & Sanders, 1969, 1971; Packard & Hochberg, 1977; Hanlon, 1978; Hanlon & Messenger, 1988) hanno permesso di superare le difficoltà implicite della “preparazione” (i.e. polpo) e di sollecitare un rinnovato interesse per approcci sperimentali centrati allo studio della biologia del comportamento e dell’apprendimento in questi animali (review in: Hanlon & Messenger, 1996; Borrelli et al., 2006; Hochner et al., 2006). Questo ha consentito il rapido incremento – in questi ultimi anni – del numero di studi pubblicati sull’argomento.

In aggiunta e più di recente, sono state anche evidenziate particolarità geniche dei Cefalopodi: ad esempio nei geni Hox; particolarità che appaiono strettamente connesse alle innovazioni morfologiche caratteristiche del taxon (Lee *et al.*, 2003).

Ad esempio, una caratteristica della famiglia dei geni Hox altamente conservata tra i diversi taxa è il suo pattern di espressione collineare. In *Euprymna scolopes*, infatti, l’espressione di otto dei nove geni Hox noti nella specie mostra che essi sono stati impiegati in maniera “multipla” per dare origine a nuove strutture morfologiche. Il pattern di espressione collineare – conservato in altri taxa – non è qui conservato. Ad esempio, nello sviluppo della corona di braccia, i geni Hox non specificano una posizione antero-posteriore, ma vengono impiegati indipendentemente e in maniera multipla per lo sviluppo delle otto braccia. Ancora, nel sifone - che deriva dalla parte posteriore del piede dei molluschi –

vengono espressi quattro orologi Hox che includono membri notoriamente espressi in strutture anteriori e mediane (Lee *et al.*, 2003).

I recentissimi sforzi di ricerca per la conoscenza della genomica di *Octopus* (Ogura *et al.*, 2004; Choy *et al.*, 2006) hanno fornito importantissime nozioni di base che aprono la speranza al futuro.

2.4 – SCOPO DELLA TESI

Sulla spinta di questo rinnovato interesse sperimentale per il polpo e la sua biologia, questa tesi di dottorato fa parte di un progetto più ampio teso alla comprensione dei meccanismi che sottendono il controllo della modulazione del repertorio comportamentale in *O. vulgaris*.

Identificare geni forkhead - specificatamente noti per essere coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso⁶ - nei Cefalopodi certamente potrebbe essere di stimolo a studi comparativi e filogenetici che possano in qualche modo contribuire all'analisi dell'evoluzione della diversità strutturale (e possibilmente funzionale) del cervello di questi affascinanti organismi.

Sulla base delle informazioni disponibili nei Molluschi sono scarsissime le informazioni circa la presenza di orologi di proteine Fox. Fa eccezione FoxA identificato in *Patella*

⁶ Si veda la Sezione 1 di questa Tesi e anche ad esempio: Scharff & White (2004), Scharff & Haesler (2005), Vargha-Khadem et al (2005), Wijchers (2005), Bracha (2006), Fisher (2006) e Tang (2006).

vulgata dove esso sembra essere coinvolto nella specificazione dell'asse antero-posteriore (Lartillot et al., 2002).

In tal senso, obiettivi di questo progetto di dottorato sono:

1. verificare la presenza di un FoxP in *O. vulgaris*;
2. caratterizzarne omologie e differenze rispetto ad altre specie;
3. fornire un'analisi del profilo di espressione, con particolare riferimento al sistema nervoso centrale, di individui di diverse classi di età;
4. analizzarne la localizzazione nei diversi distretti del cervello.

3. MATERIALI, METODI E PROCEDURE SPERIMENTALI

3.1 – ANIMALI E LORO CAMPIONI

Tutti gli animali impiegati in questo studio (N=40) appartengono alla specie *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda). Gli animali sono stati pescati nel Golfo di Napoli tra luglio del 2005 e settembre del 2006. I polpi - di entrambi i sessi e di peso compreso tra i 30 e i 2100 g - costituiscono un campione rappresentativo di diverse età e coorti che vivono nel Mar Mediterraneo (Guerra, 1979). Gli animali oggetto di questo studio sono stati identificati e sacrificati al loro arrivo in Laboratorio alla Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli (Appendice 1). L'identificazione dell'animale comprende la determinazione del sesso⁷ e del peso corporeo (in grammi).

I tessuti di interesse (masse cerebrali, lobi ottici, muscolo) sono stati prelevati *post-mortem* da animali sacrificati dopo anestesia terminale secondo le pratiche chirurgiche sviluppate per questa specie (Young, 1971).

I polpi sono stati anestetizzati per immersione in acqua di mare a 4-5°C secondo le procedure indicate da Andrews & Tansey (1981). La prolungata permanenza in acqua fredda produce un effetto analgesico durante i primi minuti (entro i 2 minuti), che successivamente produce uno stato di anestesia profonda che – con il perdurare della stessa – induce la morte dell'animale (Andrews & Tansey, 1981; Boyle, 1991).

Per prevenire la degenerazione di DNA e RNA le operazioni chirurgiche sono state effettuate su letto di ghiaccio di acqua di mare.

⁷ I maschi hanno il terzo braccio di destra ectocotilizzato o una piega cutanea che corre lungo questo braccio.

I campioni di tessuto prelevati sono stati messi in tubi da 4 ml contenenti 1-2 ml di Trizol (soluzione lisante; Invitrogen). In ogni caso si è rispettata la proporzione di 1ml di agente lisante ogni 100 mg di tessuto. I campioni così raccolti sono stati tenuti in ghiaccio se processati entro 2h dal sacrificio o conservati a -80°C se il loro impiego è stato differito a giorni successivi al prelievo.

3.2 - VERIFICARE LA PRESENZA DI UN FOXP IN *O. VULGARIS*

Allo scopo di individuare nel trascrittoma del polpo FoxP la strategia sperimentale che ho seguito è stata quella di identificare parti del gene da pool di RNA totale estratto dalle masse cerebrali di *O.vulgaris* attraverso amplificazione per mezzo di reazione a catena della polimerasi (PCR).

In tal senso, per mezzo di analisi bioinformatica ho identificato regioni conservate del gene e – sulla base di queste – disegnato primers che sono stati poi impiegati nelle reazioni di PCR; come qui di seguito specificato.

3.2.1 - ANALISI BIOINFORMATICA E DISEGNO DEI PRIMERS

Per disegnare primers specifici è necessario individuare regioni amminoacidiche (o nucleotidiche) caratterizzanti il gene di interesse che risultino conservate anche tra taxa filogeneticamente distanti tra di loro.

Questo tipo di analisi è stata condotta utilizzando le diverse opzioni offerte dal programma BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). In tal modo è possibile identificare regioni di

similarità “locali” confrontando sequenze nucleotiche o aminoacidiche rispetto a sequenze depositate in vari database⁸.

Le sequenze delle diverse specie sono state poi allineate mediante la funzione ClustaW del programma BioEdit Sequence Alignment Editor così da focalizzare l’attenzione su regioni che anche al livello nucleotidico presentavano la maggiore omologia.

Una volta identificate, sulle regioni conservate sono stati disegnati primers da utilizzare per le reazioni di PCR, utilizzando come template DNA genomico, cDNA o RNA.

Nel disegno degli oligonucleotidi primers e nei casi in cui le basi mostrassero alcune sostituzioni tra le diverse specie, è stata impiegata l’Inosina (per minimizzare la degenerazione dei primers) considerata come nucleotide universale giacché la base azotata di cui è costituita (l’ipoxantina) risulta complementare a Citosina, Timina ed Adenina. I diversi primers impiegati nel corso di questi esperimenti sono riportati nell’appendice 2.

3.2.2 - ESTRAZIONE DI RNA

I campioni di tessuto prelevati dagli animali sono stati impiegati per l’estrazione dell’RNA dopo omogenizzazione (ULTRA-TURRAX-T25: J&K-Labortechnik) con punta tenuta sempre in condizioni di sterilità⁹. Dopo l’omogenizzazione 1ml di campione è stato trasferito in un’ependorf da 1.5 ml e si è proceduto per ogni campione nel seguente modo:

1. aggiunta di 200µl di cloroformio, mix vigoroso per 30min;
2. centrifugazione a freddo alla massima velocità (12000g) per 15min;

⁸ Qui sono stati impiegati: nr (all non-redundant GenBank CDS translations); RefSeq Proteins; PDB; SwissProt; PIR; PRF; refseq (RefSeq protein sequences from NCBI's Reference Sequence Project); swissprot (last major release of the SWISS-PROT protein sequence database).

⁹ Prima di iniziare l’omogenizzazione le punte sono state trattate con NaOH 1M (1h a 37°C) e lavate in acqua DEPC. Tra il trattamento di un campione e il successivo la punta è stata lavata e i residui di tessuto rimossi con etanolo 70% DEPC e poi con acqua DEPC.

3. trasferimento del surnatante (500µl c.a.) in una nuova eppendorf (la fase sottostante, di colore rosa intenso, contiene DNA mentre nell'interfase sono presenti le proteine);
4. aggiunta di 500µl di isopropanolo freddo, 10min. in ghiaccio;
5. precipitazione a freddo alla massima velocità (12000g) per 20min.;
6. lavaggio del pellet con 750µl di ETOH 75% (H₂O DEPC).

Dopo l'aggiunta di 50-100µl di H₂O DEPC il campione è stato vortexato fino al completo scioglimento dell'RNA.

Per verificare la presenza di contaminazioni genomiche i campioni di RNA (200ng) sono stati utilizzati come template in reazioni di PCR utilizzando i primers ACTfw e ACTrev (cfr. Appendice 2).

La qualità e concentrazione dell'RNA totale così ottenuto è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica (ND-1000, NanoDrop). La sua integrità è stata anche verificata mediante corsa elettroforica (500ng di RNA; Agarosio 1%, buffer TBE 0.5x; 10V/cm)¹⁰.

3.2.3 - RETROTRASCRIZIONE 'ONE STEP'

Le reazioni di PCR sono state eseguite realizzando sia controlli positivi che negativi. Per effettuare i controlli positivi sono stati disegnati primers specifici (ACTfw, ACTrv; cfr. Appendice 2) per amplificare un frammento noto di β-actina (ID AB053937). I primers sono stati disegnati utilizzando il programma Primer3¹¹ e sono stati testati su DNA

¹⁰ I campioni di RNA utilizzati per qRT-PCR sono stati trattati con DNAsi I (Roche) utilizzando 1µl/2µg di RNA secondo le istruzioni riportate; la reazione è durata 20min. a 37°C ed è stata stoppata aggiungendo EDTA (20µM/µl) a 65°C per 10min. Per la sintesi di cDNA da utilizzare in esperimenti di Real-time i campioni sono stati trattati con Trizol per eliminare i residui della reazione, quantizzati e corsi su gel (vedi estrazione dell'RNA).

¹¹ http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

genomico (cfr. appendice 3). I parametri utilizzati per effettuare le PCR su DNA genomico sono riportati in Appendice 4.

La retrotrascrizione e l' amplificazione della regione di interesse è stata effettuata a partire da RNA totale (templato) in singolo passaggio (one step) impiegando la coppia di primers (cfr. Appendice 2) disegnati sulle regioni conservate selezionate a seguito dell'analisi bioinformatica. Per la retrotrascrizione è stato impiegato il kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with PlatinumTaq (Invitrogen).

La retrotrascrizione “one step” permette di limitare le possibilità di contaminazione riducendo il numero dei passaggi da effettuare. Inoltre, utilizzando un primer specifico (GSP) per la retrotrascrizione si ottiene un cDNA a singolo filamento (sscDNA) in partenza arricchito per la sequenza di interesse.

Per la reazione di PCR è stata utilizzata una mix utilizzando RNA ottenuto da sistema nervoso centrale di un pool di animali come qui di seguito specificato.

COMPONENTI	QUANTITÀ	CONC. FIN.
2x Reaction Mix	25 µl	1x
RNA trattato con Dnasi	11µl	1 µg c.a.
Primer fw (25pm/µl)	2µl	1pm/ µl
Primer rev (25pm/µl)	2 µl	1pm/ µl
RT/Taq	1 µl	
H ₂ O DEPC	9µl	

Le reazioni sono state effettuate utilizzando i primers RPPfw e AVWrev con tre diverse temperature di annealing (45°C, 51°C, 55°C) in modo da poter ottimizzare la reazione ed individuare la presenza di eventuali aspecifici. Come controllo positivo di entrambe le reazioni i primers dell'actina (Appendice 2) sono stati sostituiti a quelli per FoxP (55°C).

Un termociclatore (DYAD™) è stato opportunamente programmato come qui di seguito specificato.

TEMPERATURA			DURATA	CICLI	STEP
40°C	46°C	50°C	30min.	1	Sintesi cDNA
94°C			2min.	1	Pre-denaturazione DNA disattivazione I enzima attivazione II enzima
94°C			30sec.	35	Denaturazione DNA
45°C	51°C	55°C	40sec.		Annilamento primers
72°C			2min.		Elongazione
72°C			10min.	1	Elongazione finale
25°C			10min.	1	
4°C			ON	1	

Per verificare l'assenza di eventuali contaminazioni è stato effettuato anche un controllo in assenza di template.

I prodotti della reazione sono stati corsi su gel di agarosio (1.5%, TBE 0.5x). I frammenti di DNA amplificati sono stati clonati (cfr. Appendice 5) e sequenziati (Appendice 6).

3.2.4 - ESTENSIONE DEL TRASCRITTO

L'identificazione delle sequenze per mezzo delle reazioni di PCR nel trascrittoma del sistema nervoso centrale di *O. vulgaris* ha avuto come obiettivo successivo la ricerca della sequenza intera di mRNA per il FoxP di polpo.

Ciò è stato realizzato con due metodiche: RACE e Screening di Librerie Fagiche.

La tecnica denominata RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) permette l'allungamento per amplificazione delle estremità di frammenti di cDNA sia in direzione 3' che 5'; essa è stata qui realizzata utilizzando un kit (GeneRacer, Invitrogen). In breve la metodica applicata si basa su reazioni di "oligo-capping" e "RNA ligase-mediated" (Maruyama and Sugano, 1994; Volloch et al., 1994; Schaefer, 1995).

Per amplificare la porzione del gene al 3' rispetto alla sequenza nota, è stata sfruttata la regione di poli-A presente nell' RNA messaggero, retrotrascritta con un primer specifico contenente, oltre alle T (complementari alle A), una sequenza specifica utilizzata per l'amplificazione degli RNA messaggeri di interesse. Una reazione di amplificazione di questo tipo, sfrutta la sequenza nota inserita dal primers per la retratrascrizione come reverse (rw), mentre il primer forward (fw) è disegnato sulla base del frammento noto del gene di interesse.

In assenza di un prodotto singolo dopo la prima reazione di amplificazione è possibile disegnare primers interni (nested) per discriminare i prodotti specifici.

Per amplificare l'estremità al 5' del gene di interesse è stato utilizzato il metodo "cap-finder" sfruttando il GTP (cappuccio di Guanidina trifosfato) presente all'estremità 5' dei messaggeri eucariotici. Utilizzando l'enzima CIP (Calf Internal Phosphatase) le molecole di RNA prive del cappuccio, quindi non integre, sono state defosforilate. Il cappuccio delle molecole di mRNA intatte, aperto con l' enzima TAP (Tobacco Acid Pirophosphatase) sono state rese accessibili alla ligasi. Per la reazione di ligasi è stato utilizzato un oligonucleotide di RNA utilizzato come adattatore per le reazioni di amplificazione. Anche in questo caso un secondo primer è stato utilizzato per applicazioni PCR-nested (cfr. Appendici 2 e 7).

Mediante PCR è stato anche fatto uno screening di due librerie fagiche realizzate, a partire da m-RNA estratto da cervello di polpo (circa 30 individui; Branno & Fiorito, unpublished).

Lo screening mediante PCR (parametri in Appendice 4) è stato possibile in quanto i frammenti erano clonati direzionalmente all'interno del vettore (Appendice 8). Primers specifici per l'amplificazione di sequenze presenti nel vettore (Appendice 2) sono stati utilizzati in combinazione con primers specifici a FoxP in modo da confermare le sequenze al 5' ed al 3' ottenute con la tecnica della Race.

3.3 - ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DI FOXP IN *O. VULGARIS*: REAL TIME PCR

L'analisi dell'espressione di FoxP nel polpo è stata realizzata mediante Real Time qPCR. Questa è risultata essere, negli ultimi anni, una delle tecniche più sensibili ed efficienti per la quantizzazione degli RNA messaggeri (Bustin 2000; 2002; si veda anche la review di Ginsberg & Mirnics, 2006). Essa ha di fatto soppiantato, grazie alle sue caratteristiche di elevata sensibilità e relativa semplicità, le tecniche classiche (ad es.: Northern, end-point PCR, PCR semi quantitativa).

L'alta sensibilità della Real Time PCR è insita nella natura stessa della tecnica che implica una amplificazione del segnale (essendo di fatto una PCR) a partire da basse quantità di materiale di partenza. Tale proprietà rappresenta un enorme vantaggio nello studio di sistemi per i quali è possibile ottenere solo scarse quantità di RNA.

3.3.1 - LA REAL TIME PCR: CENNI

In breve, la Real Time PCR è una PCR nella quale, sfruttando un sistema di marcatura fluorescente del DNA prodotto e un sistema in grado di rilevare tale fluorescenza, è possibile calcolare la quantità di DNA presente nel campione al ciclo 0 (ciclo di partenza).

La tecnica sfrutta la natura logaritmica dei primi cicli della PCR durante i quali è possibile assumere che il DNA, amplificato esponenzialmente, raddoppi in quantità ad ogni ciclo.

Con la Real Time PCR si possono ottenere risultati quantitativi assoluti o relativi. Nel primo caso ciò è possibile quando si ha a disposizione un marcatore in quantità nota. Nel secondo caso, i dati vengono “normalizzati” rispetto a uno o più geni che sono impiegati come riferimento “interno” e dei quali non è necessario conoscere la quantità assoluta. Uno dei punti critici dell’applicazione di questa metodica sta nella difficoltà di monitorare l’efficienza della retrotrascrizione dei diversi campioni, così come la reale quantità e qualità dell’RNA da retrotrascrivere. Per questo motivo è preferito normalizzare i dati ottenuti per il gene di interesse con uno o più geni di riferimento per ogni preparazione di cDNA.

Le reazioni di Real Time PCR sono state realizzate utilizzando come marcatore fluorescente il SYBR Green, un intercalante del DNA, la cui principale caratteristica è quella di emettere un’elevata fluorescenza solo quando incorporato all’interno della doppia elica, in confronto alla bassissima fluorescenza emessa se libero.

Realizzando esperimenti con quaranta cicli di amplificazione e monitorando i valori di fluorescenza, per ogni campione, ad ogni ciclo (in tempo reale), si ottiene un grafico dove la fluorescenza è correlata ai cicli di amplificazione (Fig. 3.1a). Visualizzando tale grafico in scala semilogaritmica (Fig. 3.1b), secondo la natura esponenziale della PCR, è possibile

apprezzare correttamente la porzione lineare dei tracciati nella quale la reazione procede con la massima efficienza.

Al valore di fluorescenza più basso possibile, ma sufficiente a distinguere il segnale dei campioni dal background, al quale tutti i tracciati sono nella fase lineare della reazione (e quindi paralleli tra di loro) viene fissato arbitrariamente il valore soglia (threshold).

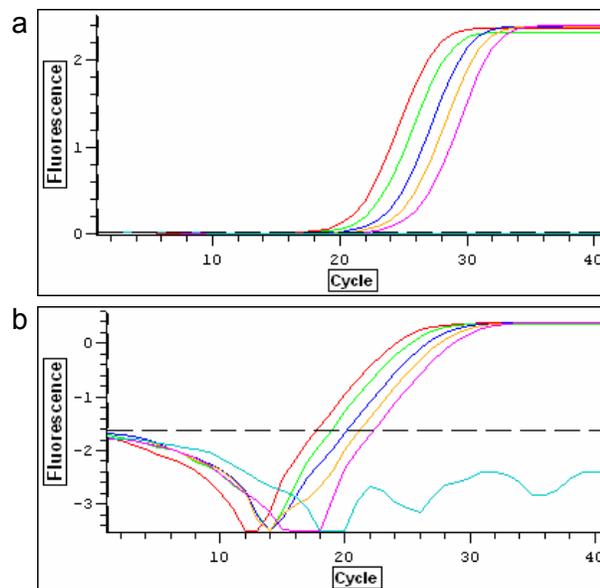


Figura 3.1 - Fluorescenza emessa da diverse diluizioni (1:50; 1:100; 1:250; 1:500; 1:1000) dello stesso campione (curve di diverso colore). Le curve di fluorescenza sono espresse in scala aritmetica (a) e semilogaritmica (b). La linea tratteggiata corrisponde al valore soglia (o threshold). Maggiori dettagli nel testo.

Il ciclo di amplificazione al quale il tracciato di ogni campione intercetta la threshold (C_T : ciclo soglia) definisce il numero di cicli necessari perché in ogni dato campione si raggiunga, di fatto, la stessa concentrazione di DNA (concentrazione tale da essere correttamente rilevata dallo strumento). Essendo la fluorescenza direttamente dipendente dal numero di molecole presenti nel campione e fissata la threshold, i campioni che

presentano valori elevati di C_T hanno impiegato un numero maggiore di cicli di amplificazione per raggiungere la stessa concentrazione di quelli che hanno valori di C_T inferiori. Ne consegue che dal confronto dei campioni è possibile calcolare il ΔC_T (la differenza di concentrazione degli stessi al ciclo 0).

Essendo il SYBR green un marcatore non specifico, al termine della reazione di amplificazione si realizza una curva di dissociazione (melting) nella quale, seguendo un gradiente di temperatura da 60°C a 95°C, la fluorescenza di ogni campione è stata rilevata ogni 0.5°C. La temperatura di dissociazione delle molecole di DNA varia non solo a secondo della lunghezza del frammento ma anche in dipendenza della composizione in basi dello stesso ed è quindi specifica per ogni amplicone. Ciò premesso, dall'analisi dei profili delle curve di melting, si ottiene un'indicazione sulla specificità della reazione così da essere certi che il segnale di fluorescenza rilevato sia tutto a carico del campione e non derivi, in tutto o in parte, dall'amplificazione aspecifica del template o da altri fattori contaminanti (dimeri, etc.).

Per maggiore chiarezza le curve di melting sono riportate in un grafico dove la fluorescenza è espressa come negativo del rapporto fra fluorescenza del campione e fluorescenza totale (Fig. 3.2) in modo da apparire come un picco.

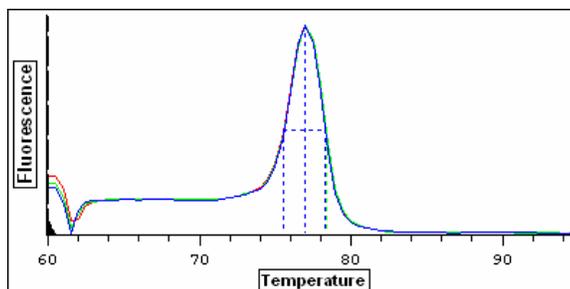


Figura 3.2 - Una tipica curva di melting.

3.3.2 – LA REAL TIME PCR: EFFETTO DELL'EFFICIENZA

Per poter correttamente confrontare i dati di C_T di diversi amplificati è necessario calcolare la reale efficienza di reazione dei primer che li generano. Tale efficienza viene calcolata analizzando per Real time PCR cinque punti di diluizione di un template amplificato con i primer da utilizzare. Riportando in grafico (Fig. 3.3) il logaritmo delle concentrazioni dei campioni ed i C_T rilevati si ottengono¹², cinque punti il cui coefficiente di correlazione lineare sarà ≈ 1 .

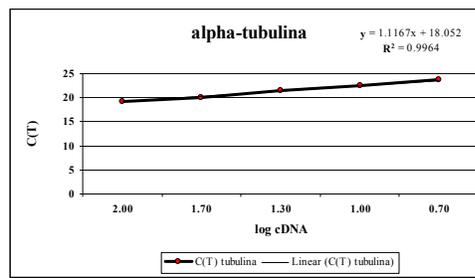


Figura 3.3 - Variazione dei C_T in funzione del logaritmo delle quantità di cDNA presente in diverse diluizioni del campione. Tali dati si utilizzano per calcolare l'efficienza della reazione secondo Radonic et al (2004). L'equazione dell'efficienza è $= (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$.

Dalla pendenza della retta di tendenza passante per i cinque punti si calcola il valore di efficienza secondo le seguenti equazioni:

$$\text{Efficienza} = 10^{\left(\frac{1}{\text{slope}}\right)}$$

oppure

$$\text{Efficienza} = \left(10^{\left(\frac{1}{\text{slope}}\right)} - 1\right) * 100$$

¹² se l'esperimento è correttamente eseguito

E' chiaro, quindi, che la pendenza della porzione lineare dei tracciati di Real time PCR dipende direttamente dai valori di efficienza dei primer utilizzati che, se possibile, dovrebbero essere simili.

3.3.3 – LA REAL TIME PCR: NORMALIZZAZIONE ED ANALISI DEI DATI

Come accennato in precedenza le variazioni del gene di interesse, misurate con la Real time PCR, devono essere normalizzate con un gene di riferimento.

La caratteristica principale che un gene di riferimento dovrebbe possedere - per essere utilizzato con successo in questo tipo di esperimenti - è di mostrare un'espressione il più possibile costante nei diversi campioni da analizzare e, comunque, non correlata all'espressione del gene oggetto di studio (o dipendente da esso) e/o ai diversi stati fisiologici o di sviluppo dei campioni da confrontare.

Più in generale volendo confrontare l'espressione di un gene in due diverse condizioni, ad esempio di controllo e sperimentali, l'equazione generale da risolvere è la seguente:

$$R = \frac{VTar}{VRe}$$

Dove:

R = variazione reale del gene oggetto di studio nelle diverse condizioni;

VTar = variazione di espressione osservata del gene oggetto di studio nelle diverse condizioni;

VRe = variazione del gene di riferimento nelle diverse condizioni.

Tutte le diverse equazioni proposte per la normalizzazione e l'analisi dei dati di questo tipo di esperimento sono comunque riconducibili a questa forma generale.

La normalizzazione dei dati e la conseguente analisi dei risultati ottenuti nel corso di questa tesi è stata realizzata utilizzando il programma REST basato sul metodo di Pfaffl (Pfaffl, 2001; Davidson & Hinkley, 2002; Pfaffl et al., 2002; Vandesompele et al., 2002).

Tale metodo si basa sulla seguente equazione dove R = variazione normalizzata del gene oggetto di studio nelle diverse condizioni; E = l'efficienza dei primer; ΔCP = differenza dei valori di CT nelle diverse condizioni da confrontare, i valori sono media dei triplicati.

$$R = \frac{(E_{T \text{ arg et}})^{\Delta CP_{t \text{ arg et}}(Meancontrol-Meansample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(Meancontrol-Meansample)}}$$

Questa equazione è largamente usata ed estremamente efficace perché nella normalizzazione dei dati tiene conto delle diverse efficienze dei primer precedentemente calcolate. I valori di espressione normalizzati così calcolati sono poi espressi con istogrammi che rappresentano l'espressione relativa del gene di interesse.

Per gli scopi di questo progetto di dottorato la Real Time PCR è applicata, per la prima volta, su un cefalopode.

In prima istanza è stato quindi necessario individuare (e testare) diversi geni da utilizzare come riferimento senza poter usufruire di alcuna informazione preliminare per questa tecnica. In particolare, un esame delle sequenze disponibili in banca dati ha permesso di individuare tre geni che con le caratteristiche necessarie ad essere impiegati come

“normalizzatori” nei nostri esperimenti: 16S, β -actina ed α -tubulina. Quest’ultima, in particolare, era stata precedentemente indicata come ubiquitaria nei diversi tessuti di *O. vulgaris*, a differenza di quanto riportato per la β -tubulina (Tomarev, 1993).

3.4 - LOCALIZZAZIONE DI FOXP NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DI *O. VULGARIS*

La localizzazione tissutale del trascritto di FoxP di polpo è stata determinata attraverso ibridazione *in situ*.

Campioni di masse (sopra- e sotto-esofagea) e dei lobi ottici sono stati prelevati da animali anestetizzati in una soluzione di cloruro di magnesio (Messenger et al., 1985) post-mortem e fissati in una soluzione di paraformaldeide (4% in acqua di mare) per la notte (4°C). Dopo lavaggi (PBS) e crioprotezione (30% saccarosio in PBS) i campioni sono stati inclusi in resina (OCT)¹³ e rapidamente congelati (circa -65°C) in modo da preservare l’integrità dei tessuti.

Sono state, successivamente, fatte sezioni seriali di ogni parte del sistema nervoso centrale di *O. vulgaris* (spessore 12-20 μ m) per mezzo di un criostato.

Le sezioni (longitudinali e trasversali) seriali sono state sistemate su serie di vetrini in modo da poter utilizzare per i controlli positivi e negativi regioni contigue delle singole parti. I vetrini con le sezioni sono stati conservati a -80°C fino alla reazione di ibridazione.

Una delle serie è stata anche processata con colorazioni istologiche (Cresyl Violet o Fast-Red) in modo da poter fungere da riferimento per la qualità istologica del preparato e agevolare il riconoscimento delle diverse aree e lobi. Le serie impiegate per l’ibridazione sono state, in qualche caso, anche contro-colorate (Fast-Red).

¹³ utilizzando scatoline confezionate in modo da conservarne l’orientamento

L'ibridazione *in situ* permette di localizzare l'espressione di un gene utilizzando una sonda costituita da DNA o RNA sintetizzati *in vitro* e rappresentante la sequenza antisenso, complementare all' m-RNA di interesse.

Nel caso di questa tesi di dottorato, la scelta di utilizzare una sonda di m-RNA per ibridare il tessuto di interesse è stata dettata dalla maggiore stabilità di un ibrido RNA-RNA rispetto ad un ibrido DNA-RNA.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un sonda specifica per l' α -tubulina come controllo positivo della reazione ed un probe contenente una sequenza senso, non ibridabile con il gene di interesse, come controllo negativo.

Le procedure sperimentali impiegate per l'ibridazione *in situ* sul sistema nervoso di *O. vulgaris* sono state in parte modificate da quelle impiegate per la stessa specie per lo studio dell'espressione di altri geni (Kanda et al. 2003; Takuwa-Kuroda et al. 2003).

Dettagli circa la preparazione delle sonde sono riportati in Appendice 9.

Le sonde di m-RNA sono state retrotrascritte *in vitro*. Come templatato per la retrotrascrizione è stato utilizzato DNA plasmidico contenente il frammento relativo al gene di interesse, opportunamente linearizzato. La marcatura dell'm-RNA è stata effettuata utilizzando per la retrotrascrizione un precursore contenente digossigenina. La presenza gli ibridi RNA-RNA, infatti, può così essere rilevata mediante un saggio enzimatico (Appendice 9) ed una successiva rivelazione colorimetrica (Appendice 9).

Per ibridare le sezioni destinate al controllo sperimentale (tubulina) è stata utilizzata una sonda per l' α -tubulina della grandezza di 550bp.

Per il riconoscimento del trascritto di FoxP, anche allo scopo di evitare la possibilità che la sonda ibridasse altri potenziali trascritti appartenenti alla famiglia Fox, sono state utilizzate due sonde contenenti frammenti differenti del gene di interesse. In particolare, una sonda di 650 bp è stata disegnata includendo i domini Zinc Finger e Leucin Zipper per intero e una sola estremità del dominio Forkhead (solo 20bp). L'altra sonda (500bp) include buona parte del dominio Forkhead.

Le sequenze dei primers utilizzati per la sintesi delle sonde sono riportate in Appendice 2, le procedure per la sintesi del cDNA sono riportate in appendice 1.9.

3.5 - ANALISI DEI DATI

In questa tesi, per le analisi dei dati e della loro presentazione il riferimento è stato un manuale classico di statistica applicata alla biologia (Zar, 1999).

I dati della “PCR quantitativa”, hanno però richiesto analisi ulteriori; in particolare è stata applicata l’Analisi delle Componenti Principali (PCA).

La PCA è un’analisi multivariata basata sulla trasformazione ortogonale e lineare dei dati (in genere un gran numero di variabili o misure) che permette così di riferirli a un nuovo sistema di coordinate (o dimensioni) in modo che la più alta varianza dei dati viene riferita alla prima coordinata (denominata: prima componente principale), la successiva varianza più grande osservata alla seconda e così via.

La tecnica viene impiegata essenzialmente nei casi in cui si hanno a disposizione più variabili che rappresentano un campione e – per riuscire a trarre delle conclusioni – è importante prevedere la riduzione della dimensionalità (numero di variabili). In questo la PCA è capace di trattenere le caratteristiche dei dati tali da rappresentarne comunque la loro varianza.

Numerose, in questi ultimi anni, sono state le applicazioni della PCA alla rappresentazione e all’interpretazione di dati di espressione genica (Albanese et al., 2007; de Haan et al., 2007; Kim et al., 2007; Pickering et al., 2007; Riva et al., 2005; Weninger et al., 2007).

Nel caso oggetto di questa tesi, l’impiego della PCA ha permesso di identificare profili di espressione differenziale tra i diversi animali contribuendo all’analisi dei risultati ottenuti dalla RT-qPCR.

4. RISULTATI

Per semplicità espositiva, i risultati ottenuti sono qui di seguito organizzati sulla base dei singoli obiettivi.

4.1 – FOXP IN *OCTOPUS VULGARIS*: IDENTIFICAZIONE E SUE CARATTERISTICHE

Tutti i campioni di RNA totale estratti da “pool” del sistema nervoso centrale di polpo sono risultati di buona qualità¹⁴. I campioni che hanno presentato contaminazioni di DNA genomico sono stati ulteriormente purificati dopo trattamento con DNasi.

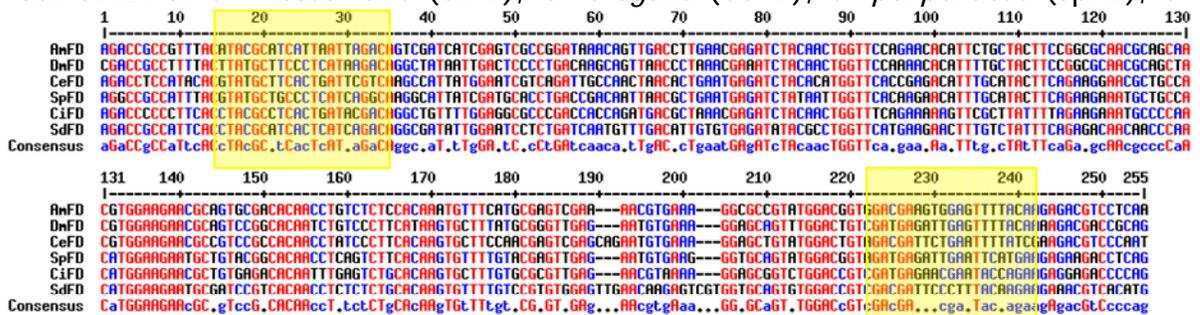
I campioni di RNA totale di “cervello” di polpo hanno costituito il “templato” per le reazioni di PCR con tecnica “One Step”. Per queste reazioni i primer impiegati sono stati dedotti dall’analisi bioinformatica condotta in via preliminare per questo studio (cfr. Sezione 1.4). Qui di seguito, riassumo i principali risultati dell’analisi bioinformatica.

L’allineamento delle sequenze amminoacidiche dei FoxP note in dieci specie di invertebrati e i FOXP di *Homo sapiens* (Figure 1.2 e 1.3) ha permesso di individuare regioni conservate nel dominio Forkhead ed in altri motivi caratterizzanti la proteina (Fig. 1.2); fa eccezione la regione poliQ (presente solo nei Vertebrati superiori). Tenuto conto dell’elevata conservazione amminoacidica del dominio Forkhead, si è provveduto a confrontare le sequenze nucleotidiche relative al solo dominio Forkhead per le sequenze di FoxP note per

¹⁴ Sono stati utilizzati, in ogni caso, solo i campioni di RNA dove entrambe le subunità ribosomiali sono risultate ben distinguibili dopo corsa elettroforetica

sei specie di invertebrati (Figura 4.1); ciò ha permesso di verificarne l'elevata conservazione anche a livello nucleotidico il che ha consentito di disegnare primers con degenerazione relativamente bassa (cfr anche Appendice 2).

Figura 4.1 - Allineamento delle sequenze nucleotidiche del dominio Forkhead P dai cDNA di *C. intestinalis* (CiFD), *C. elegans* (CeFD), *S. purpuratus* (SpFD), *S.*



domuncula (SdFD), *D. melanogaster* (DmFD), *A. mellifera* (AmFD). Per l'allineamento è stato utilizzato il programma Multalin. I nucleotidi in rosso sono identici. I primers utilizzati sono stati disegnati sulla base delle regioni evidenziate in giallo.

I primers così disegnati sono stati impiegati nelle PCR successive utilizzando RNA totale di polpo. Ciò ha permesso l'isolamento di bande discrete di circa 220bp (Fig. 4.2). Il sequenziamento di queste bande ha evidenziato che si trattava di sequenze corrispondenti al dominio Forkhead di tipo P.

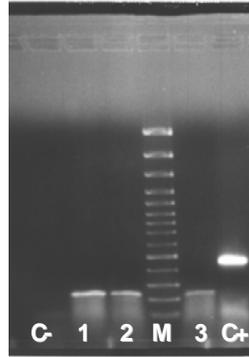


Figura 4.2 - Corsa su gel di agarosio (1,5%, TBE 0,5x) dei prodotti di PCR (1,2,3) da diverse temperature usate sia per la retrotrascrizione che per l'amplificazione. Sono anche caricati su gel un controllo negativo (C-), un controllo positivo (C+) e il marker (M).

Il successivo clonaggio ha permesso di individuare diverse colonie, 200 delle quali sono state sequenziate per poter accertare la presenza di un unico FoxP o di una “famiglia” Fox.

Il successivo sequenziamento ha evidenziato differenze nucleotidiche solo in corrispondenza delle basi degenerate contenute nei primers utilizzati. Una volta tradotto, la sequenza individuata nel trascrittoma di *O. vulgaris* è stata confrontata con le sequenze amminoacidiche dei FoxP umani presenti in GeneBank (Fig 4.3).



Figura 4.3 - Allineamento delle sequenze amminoacidiche tradotte dal trascritto di 220 bp di polpo con quelle note per le 4 proteine note nell'uomo (Hs). In nero sono evidenziati gli amminoacidi identici, in grigio gli amminoacidi con caratteristiche simili e in colore gli amminoacidi con proprietà differenti.

La successiva analisi bioinformatica ha permesso di riscontrare elevate omologie del frammento isolato con il forkhead box P di *Apis mellifera* (65/73 aa; 89% identità) e con i forkhead box P4 (isoforme 1 e 2) di *Pan troglodytes* e *Macaca mulatta*.

L'alta omologia riscontrata tra la traduzione del frammento isolato in *Octopus* e le sequenze proteiche presenti in GeneBank ha costituito la conferma della possibilità di utilizzare questo frammento per disegnare nuovi primers da utilizzare per i successivi passi necessari all'estensione della sequenza di interesse

La combinazione di RACE e dello screening di librerie di cDNA di polpo ha permesso l'estensione del frammento ottenuto per PCR. Per la RACE è stato impiegato RNA totale estratto dalla massa sottoesofagea di alcuni individui di polpo. Un oligo disegnato all'interno del dominio Forkhead di polpo ha permesso di estendere il frammento isolato fino al 3'; al contrario strategie analoghe non hanno reso possibile di raggiungere l'estremità completa al 5' del gene.

Che il frammento esteso così ottenuto fosse effettivamente presente nel trascrittoma delle masse nervose di *O. vulgaris* è stato ulteriormente confermato dallo screening delle librerie fagiche disponibili per i lobi ottici e le masse sopra- e sotto-esofagea. Il sequenziamento dei cloni positivi ha permesso di confermare la sequenza isolata al 3' mediante la RACE; la sequenza ottenuta al 5' è risultata non essere comprensiva della regione UTR (*UnTranslated Region*).

In complesso, la sequenza nucleotidica ottenuta alla fine di questi approcci sperimentali è risultata essere di 1111bp (Figura 4.5).

```

1 C K W P G C R L L S G G L G G S L L N Q
1 T G C A A G T G G C C G G G G T G C A G G C T G T T A T C A G G T G G T C T T G G T G G T A G T C T A T T G A A T C A G
21 S A V S I K Q E Q E A S S P S H P L F R
61 T C G G C T G T T A G C A T T A A C A G G A G C A G G A A G C G T C T A G T C C A T C G C A C C C A C T T T T C C G A
41 H G V C K W P G C D T P N E D F P S F I
121 C A T G G T G T T T G T A A A T G G C C G G G T G T G A T A C G C C A A A T G A A G A C T T T C C T T C C T T C A T T
61 K H L N S E H Q L D D R S T A Q A R V Q
181 A A G C A T C T G A A C T C T G A G C A C C A G T T A G A T G A C A G A A G T A C A G C A C A A G C A A G A G T A C A A
81 M Q V V S Q L E I Q L I R E K D L L Q A
241 A T G C A G G T T G T T A G T C A A C T T G A A A T A C A G C T T A T A C G G G A A A A A G A T C T T C T G C A A G C A
101 M M Q H L H M K P Q V D K S D I I L P V
301 A T G A T G C A G C A C T T A C A C A T G A A A C C T C A A G T A G A T A A A T C A G A T A T T A T T C T C C C A G T A
121 L P K Q Q P H Q Q Q Q Q T Q Q A L Q Q A
361 C T T C C A A A G C A G C A G C C G C A C C A G C A G C A G C A G A C C C A A C A A G C T T T G C A A C A G G C C
141 H M D I T S Q L P S I P P L S N A S V Q
421 C A C A T G G A T A T T A C A T C T C A A C T C C C T T C A A T T C C C A T T G T C C A A T G C T T C A A A T G T C
161 P L L T S T P A M S L S P T T T C T S P
481 C C C T T T T A A C C T C C A C A C C T G C C A T G A G T T T A T C A C C C A C T A C T A C C T G T A C A T C A C C T
181 Q M V I S T A H P A H S P V Q Q S P Q H
541 C A A A T G G T C A T C T C T A C T G C C C A T C C T G C A C A T T C A C C T G T C C A G C A G T C A C C C A G C A C
201 Q Q Q A S S S V G P I R R R V S D K C N
601 C A A C A G C A A G C C T C C A G C A G T G T G G G A C C A A T C C G T C G A C G G G T A T C A G A C A A G T G C A A T
221 L P I S A G M Q R D M E N A F L S F V E
661 C T G C C T A T C T C T G C T G G A A T G C A G A G A G A C A T G G A G A A C G C A T T T C T T T C T T T T G T A G A A
241 I Q R N R E F Y R T T D V R P P F T Y A
721 A T C C A G A G A A A T C G C G A A T T T T A C C G A A C A A C A G A C G T C C G A C C T C C A T T C A C A T A T G C C
261 S L I R Q A I I E S P H R Q L T L S E I
781 T C T C T C A T C G T C A G G C C A T C A T A G A A T C T C C A C A T C G A C A A T T A A C A T T G A G T G A A A T C
281 Y Q W F A N T F A Y F R R N E A T W K N
841 T A T C A G T G G T T C G C A A A C A C A T T T G C T T A T T T C C G G C G G A A T G A A G C T A C G T G G A A G A A T
301 A V R H N L S L H K C F M R V E N V K G
901 G C C G T G C G C C A C A A C C T T A G T C T T C A C A A A T G T T T A T G C G A G T T G A G A A T G T T A A G G G G
321 A V W T V D E V E F Y K R R P Q K L S G
961 G C T G T A T G G A C C G T C G A C G A G G T A G A G T T Y T A C A A A C G G A G A C C A A A A A C T G A G T G G G
341 Y V F F L F A * 3' UTR - - - - -
1021 T A T G T T T T T T T T T G T T T G C T T G A T T G T G C A T T T T T T T T T T A C A A A A C T T T A C G A A
- - - - -
1081 A A G C A A A A A C T C A C A A A A A A A A A A A A A A A A

```

Figura 4.5 - Sequenza nucleotidica di *OvFoxP* con la relativa traduzione. Il dominio Forkhead è evidenziato in rosso. Le prime 18bp sono riportate in arancio in quanto corrispondono all'oligo degenerato (CKWfw, cfr. Appendice 2), utilizzato per l'isolamento del frammento a partire dalle librerie fagiche.

Tale frammento è stato confrontato con le altre sequenze di FoxP note per specie di invertebrati e il FoxP2 dell'uomo che ha confermato un'alta omologia amminoacilica con Forkhead box di tipo P (Figura 4.6). Nel complesso, l'analisi bioinformatica ha permesso di

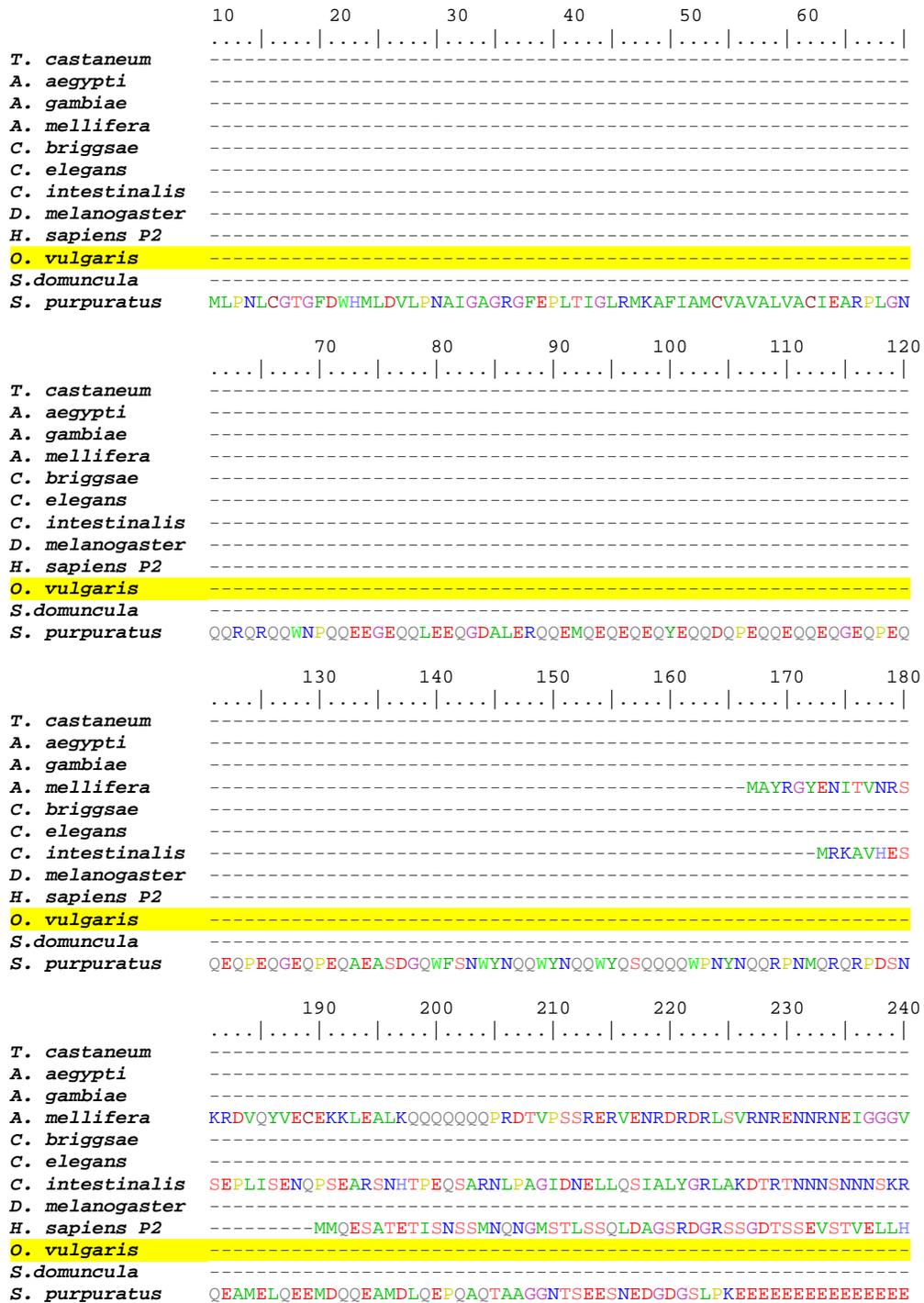


Figura 4.6 - Allineamento tra i diversi FoxP noti in invertebrati (compreso quella del polpo derivata da questi esperimenti, in giallo) e il FOXP2 dell'uomo (si veda anche la Fig 1.2). In nero sono evidenziate le regioni amminoacidiche conservate. La regione nel riquadro viola corrisponde alla regione annotata, nelle altre sequenze proteiche come motivo Leucin Zipper.

250 260 270 280 290 300
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera TEQSQPAQQQQQQQQQQQELTIEYQSNGLSPAGHAVTAAPMTQKQPIITQ-----
 C. briggsae -----
 C. elegans -----
 C. intestinalis QYSGNSPQSRKSPRLDQSPRADYNKESEGQLGVLELAALQRQAMQLAFLQQSTFKN---
 D. melanogaster -----
 H. sapiens P2 LQQQQALQAARQLLQQLQTSGLKSPKSSDKQRPLQVPVSVAMMTPQVITPQQMQ-----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----
 S. purpuratus EEEEEEEEEEEEEEEEEKKKEEEEEEEEEEGGGGKRRCPYSTRRSPVCDTNGRTWNS

310 320 330 340 350 360
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera -----QSQPPSSGAPGPPSPHQPQAPQ
 C. briggsae -----
 C. elegans -----
 C. intestinalis -----QDKSDLPSSPEEDGNMNSVAAGYK
 D. melanogaster -----
 H. sapiens P2 -----QILQQQVLSPPQLQALLQQQQAVM
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----
 S. purpuratus HCALLRAQCNDPYLYVQLAYSGBKIDQQMRRRQPIYQGSAAATSSSEESAEMIGPTVPA

370 380 390 400 410 420
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera RGSPPNPSQGGPPGPPGAPPSONPSQMMIS-----
 C. briggsae -----
 C. elegans -----
 C. intestinalis NPMAVAMAAGVLPATSSAQMQQLLSQQVLS-----
 D. melanogaster -----
 H. sapiens P2 LQQQQLQEFYKKQEQQLHLQLLQQQQQQQQQ-----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----MAADPPVLTVPVQVTPSTPPLSSWQG-----
 S. purpuratus IGRTTIKPANNPTLAPDGVMPYPCPLQCAPSTKQVCGSDGYTYDSVCHMRMEACRTRDRS

430 440 450 460 470 480
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera -----PASGIHQMQQLLQQHILS-----
 C. briggsae -----MCEREDPNQRHQSTTTLNNVL
 C. elegans -----
 C. intestinalis -----PQHLQAIMQQQAYSQHHQAQIHEFYR
 D. melanogaster -----MHRIHDDDEYSEDAK-----
 H. sapiens P2 -----QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ-----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----VLGEMAMSAIQKHSSHP-----
 S. purpuratus LIVNYSGPCQCPDVCMPVYEPVCAVSRRLGFRERFTTSVCEMQKDACRHSDSGQTSVAA

490 500 510 520 530 540
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera -----
 C. briggsae AP-----
 C. elegans -----
 C. intestinalis QQ-----
 D. melanogaster -----
 H. sapiens P2 -----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----
 S. purpuratus CQNQTAGLLSRWQSTVSIPTETKRAPMDQATREKANYEARVELAVAYRSVDHYGLGEGI

550 560 570 580 590 600
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera -----
 C. briggsae -----
 C. elegans -----
 C. intestinalis -----
 D. melanogaster -----
 H. sapiens P2 -----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----
 S. purpuratus CNHLTMRAPGSNSEDDVMLVVPYGLPWKQVTASSLIGIDFKTGEKVEGDGVALESAVCIH

610 620 630 640 650 660
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera -----PTQLQSFMQQHSLYLQ-----
 C. briggsae -----PMITSESLPRPTQAPT-----
 C. elegans -----MITSESLPRPTQA-----
 C. intestinalis -----QKQVQDFQIQLAALKQQ-----
 D. melanogaster -----ESDFKSSIQKEISVKS-----
 H. sapiens P2 -----QQQQQQQQQQHPGKQ-----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----NTVSFPSSPAER-----
 S. purpuratus CPVHIARYEKYGTIAVMHHTQPYVTALACLDEPAPFDETMYNQSMRFSGR IAYDFDYEVL

670 680 690 700 710 720
 T. castaneum|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 A. aegypti -----
 A. gambiae -----
 A. mellifera -----Q-----
 C. briggsae -----A-----
 C. elegans -----
 C. intestinalis -----QKGEVNDVTS-----
 D. melanogaster -----R-----
 H. sapiens P2 -----AK-----
O. vulgaris -----
 S.domuncula -----
 S. purpuratus AYEMDEGKRLAGALGDRDILIMGQHGMLTVGQRVCDAFDALYYMERAAQIQVLVRSMMGGK


```

          970      980      990      1000     1010     1020
T. castaneum  CKWPGCEIICEDLQAFIKHLNTEHLLDDRSTAQARVCMQVVSQLEHQLQKERDRLQAMMH
A. aegypti   CRWPGCEIRIFDDFDEFYNHLQSDHINDYSAAQARVCMQEVVQQLHQLQKERDRLQAMIL
A. gambiae   CRWPGCEIRVDFDFDDFYSHLHSDHINDYSAAQARVCMQEVVQQLHQLQKERDRLQAMIL
A. mellifera CKWPGCEVICEDYQAFIKHLNTEHLLDDRSTAQARVCMQVVSQLEHQLQKERDRLQAMMH
C. briggsae  CAWPNCDQPCDSVMALIQHLQCEHPSCDRINEMRACIEKVESLEHKLVSERNRLQAMMQ
C. elegans   CAWPSCDQPCDSVMALITHLQHEHPSPDKSNEEMRACIEKVESIEHKLVSERNRLQAMMQ
C. intestinalis CKWPGCDVECDIHTFHRHLNRSLSLDDKSTAQCRVCMQVVEQLEHQLNQRERLQAMTQ
D. melanogaster CRWPGCEMDLEDITSEFVKHLNTEHLLDDRSTAQARVCMQVVSQLESHLQKERDRLQAMMH
H. sapiens P2 CKWPGCEISICEDFGQFLKHLNTEHLLDDRSTAQCRVCMQVVSQLEHQLSKERERLQAMMT
O. vulgaris  CKWPGCDTINEDFPSEFIKHLNSEHLLDDRSTAQARVCMQVVSQLEHQLIRKDLQAMMQ
S.domuncula  CKWPGCMTRVSSKDMLASHLTEHRAGSKTKAQVKVCEMVVQHLSEQLSLKDKLDAMKK
S. purpuratus CKWPGCEITVCEDFPFIKHLNSTEHALDDRSTAQARVCMQVVSQLEHQLTKERERLQAMMA

```

```

          1030     1040     1050     1060     1070     1080
T. castaneum  HILHLSKQLS-----SPEPHKDG-----VVTPTKMAVN-----
A. aegypti   HLNKKNEMA-----ARIPMAGASPFVVPQIPPPPPYDLIA-----
A. gambiae   HLNKKNEML-----RATPAALAVERSGPSTSRP-----
A. mellifera HILHVAKQMA-----SPEPTECLSG-----TTLDRKLSSE-----
C. briggsae  HLRMKPSPD-----TTPNIGKIEPTSPLRSPKIEGAAGFTIQPAHHQTQTTQQQQQPQVI
C. elegans   HLRMKPSPD-----TTPNLVKMEAQSPLRSPKIEGAA-FSIQPAQQFQQQTTSQP----
C. intestinalis HILSGKEQKLETRDERVAMDTTGMTNGKAEPLMRHQSLPGFNNNNNSHHGMALAPFP---
D. melanogaster HLYLSKQLL-----SPTKIDRKD-----VPGREGK-----
H. sapiens P2 HILHMRPSE-----PKPSPKPLNLVSSVTMSKNMLETSPQS-----
O. vulgaris  HILHMKPQVDKSD-----IILVLPKQCPHQQQQQTQALQQAHMDDITSQLPSIPPLS---
S.domuncula  HILATSENDATESRHGSLSSPNGVRLATPISLAPPTSVAPPTQMVAQMYDQNGQPVIYILQN
S. purpuratus HILHMKPPID-----SKQETPKSSVQSSPSLSPVSVVQH-----

```

```

          1090     1100     1110     1120     1130     1140
T. castaneum  -----TSLSQPSVS-----IGPMVSAVRS-----PVLHSPAANV-----
A. aegypti   -----GLRFPPAGFVTDGSMVEAALQLTNKQQQ-----ALHHHHQQQ-----
A. gambiae   -----RTATVGLFGTGSCSAPTLIASRSFP-----
A. mellifera -----KKQSIINMSNMSGMPPLPNMPGS-----MPTMPTMPSM-----
C. briggsae  TQTQ--QITQVSPTSEAASSLLSIAASIAASTVGT-----QMTTVPVSSMPTF---IN
C. elegans   -----QVSPTSEAASSLLSIAATVAASTAAVTSPIINQISTVPSVSSMPSF---LN
C. intestinalis -----AHPVTSRTPSTISLPSSEISAPHLGAFPS-----TLFPPATSV-----
D. melanogaster -----FCRSLTVNSIGRPIRQTNPSPP-----LNLPMVNSTN-----
H. sapiens P2 -----LPQTPTPTAPVTEITQGPS-----VITPASVFN-----
O. vulgaris  -----NASNVLLTSTAMSLSEITTCFSPQMV-----STAHFAHSEVQQ---SE
S.domuncula  VNNQGTALIPQLQQQSSSAQPLASQSHHSASTVPTSLKIDQSILSAKGGVVTPSPGTP
S. purpuratus -----TAPSLPMVPSSTPPVITSIASAP-----YHLTSHHVTP-----

```

```

          1150     1160     1170     1180     1190     1200
T. castaneum  -----AGPIRRRLND-----KSALSLAGGLPYMLER-----AG-----
A. aegypti   -----QQQQHQQQQA-----GRSAKGSIRAKYFGSPQD-----AGGYKEV-----
A. gambiae   -----SPSRBELSGRA-----GRNTORGSQLKLYS-----
A. mellifera -----AGPIRRRLSD-----KSALSLAG-----
C. briggsae  HQLSTS--SQPSTNGPSGSG-----PLLLQRAASSASTETSPNPD-RNFVARRSRISDK
C. elegans   HQLSTS--SQPSSQQAAGSS-----GPLLQRAASSASTETSPNPDKSFVPRRSRISDK
C. intestinalis -----SSPPLFNLYLTNSM-----TSGSRDAMSQAS-----KRRHS-----AA-----
D. melanogaster -----LCSIKKRNH-----KNTFSINGGLPYMLER-----AG-----
H. sapiens P2 -----VGAIRRRHSD-----KYNIPMSS-----
O. vulgaris  HQQQQASSVGPPIRRVSD-----KCNLPIISAGMORDMEN-----AF-----
S.domuncula  KNITVTQTYTPINFESLIQPGGLKAVMLPTGSAAGTLNSEAGFVRHGRQAAKERPS---PV
S. purpuratus -----GCPIRRRLNSE-----KYGLSLST-----

```

```

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
T. castaneum  --LDVQCEIQRNREFYKNA D VRPPFTYASLRQSI I E S P D K Q L T L N E I Y N W F Q N T F C Y F R
A. aegypti   HF P D V Q D D V Q K N R E F Y R S H D V R P P F T Y A S L R Q S I I E S P E K Q L T L N E I Y N W F Q N T F C Y F R
A. gambiae   -L V P A F A D V H K N R E F Y R S H D V R P P F T Y A S L R Q A I E S P E K Q L T L N E I Y N W F Q N T F C Y F R
A. mellifera -----E I Q R N R E F Y K N A D V R P P F T Y A S L R Q S I I E S P D K Q L T L N E I Y N W F Q N T F C Y F R
C. briggsae  T V Q P I A T D I A K N R D F Y R A N D V R P P F T Y A S L R Q A I E S P D K Q L T L N E I Y T W F T E T F A Y F R
C. elegans    T V Q P I A T D I A K N R D F Y R I N D V R P P F T Y A S L R Q A I E S S D C Q L T L N E I Y T W F T E T F A Y F R
C. intestinalis --V P I S T D L S Q N Q E F Y R N A D V R P P F T Y A S L R Q A I L E A P D R Q M T L N E I Y N W F Q K K F A Y F R
D. melanogaster --L D V Q C E I H R N R E F Y K N A D V R P P F T Y A S L R Q A I L D S P D K Q L T L N E I Y N W F Q N T F C Y F R
H. sapiens P2 -----E I A P N Y E F Y K N A D V R P P F T Y A T L I R Q A I E S S D R Q L T L N E I Y S W F T R T F A Y F R
O. vulgaris   --L S F V - E I Q R N R E F Y R T D V R P P F T Y A S L R Q A I E S P H R Q L T L - E I Y Q W F A N T F A Y F R
S.domuncula   A F D E S Q D A L R K A I P R Y S N I D Q R P P F T Y A S L R Q A I E S S D C Q L T L E I Y A W F M K N F V Y F R
S. purpuratus -----E I H R N S D F Y K N I D V R P P F T Y A A L I R Q G I I D A P D R Q L T L N E I Y N W F T R T F A Y F R

```

```

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
T. castaneum  RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVDE V E F Y K R R P Q -----R S -
A. aegypti   RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --IKGAVWTVN E A E F C K R R P Q K L G I M Q F K F Q N S S -
A. gambiae   RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --IKGAVWTVN E A E F C K R R P Q K L -----
A. mellifera RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVDE V E F Y K R R P Q R A C S T T G G V P S K S P
C. briggsae  RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVD D S E F Y R R R P N R S S A T R S Q P Q T P L P
C. elegans    RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVD D S E F Y R R R P N R A S A T R S Q P Q T P L P
C. intestinalis RNAE T W K N A V R H N L S L H K C F V R V E N --VKGAVWTVDE N E Y Q K R R P Q K F S G S P A I R N R I E T
D. melanogaster RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVDE I E F Y K R R P Q R -----
H. sapiens P2 RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVDE V E Y Q K R R S Q K I T G S P T L V K N I P T
O. vulgaris   R N E A T W K N A V R H N L S L H K C F M R V E N --VKGAVWTVDE V E F Y K R R P Q K L S G Y V F F L F A ---
S.domuncula   D N N P T W K N A I R H N L S L H K C F V R V E L N K S R G A V W T V D D S L Y K K R H M K L V N V D G E A Q P T D S
S. purpuratus RNAATWKNNAVRHNL SLHKCFMRVEN --VKGAVWTVDE I E F M K R R P Q R M G S L N T P P S T P N T

```

```

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
T. castaneum  -----A G L G D -----
A. aegypti   -----G M P Q Q M Q P G G G G K K K Q L T L G G -----
A. gambiae   -----
A. mellifera T L T -----H S P T M Y G D A L N A N L Q A A L G D S N M G F L N S M C -----T
C. briggsae  D D I S P H R -----M F D S N A L S S F L E M Q N F D P A S L S G E P F Q L N G N S -----
C. elegans    D D I S Q Q K -----L F D T S A L S S F L E M Q N F D P A S L T G D Q F Q L N G N -----
C. intestinalis P S S -----A S F Y S N P A M N L A T M Q M A L G E N -----
D. melanogaster -----T A G I G N N L T G A T N -----
H. sapiens P2 S L G -----Y G A A L N A S L Q A A L A E S S L P L L S N -----
O. vulgaris   -----
S.domuncula   T A N -----S P V N D M A V G E E E G G A K L I D M P -----
S. purpuratus P T T P I S K S V D M L P T E D M P L N L E T H M H P M G G S L P L L S D A A A A A A D H A I Q V L D N E E D D L D G D

```

```

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
T. castaneum  -----
A. aegypti   -V V G P P Q A A P P L A S A V V S A A A A S A L A L K H P P P P -----
A. gambiae   -----
A. mellifera S T T T S P D K E H V L A H N D L M S P L D E P A V H I K Q E G Q S -----
C. briggsae  -----L D N V L S M L A N S T D V N N P L H M L S A A A V A G -----
C. elegans    -----L D S V L S L L A N - A D V N N P L Q M L S A A A A A G N -----
C. intestinalis -----P F N Q A Q L V S Q A A M F G G -----T P S P Y G A -----
D. melanogaster -----S P D T N Y F V A M N I G Y V G L K -----
H. sapiens P2 -----P G L I N N A S S G L L Q A V H E D L N G S L D H I D S N G N S -----
O. vulgaris   -----
S.domuncula   --E S I P L V T L P T T Q D Y P S P P Q D R A F H E R G E I S S E -----
S. purpuratus E Y P G D R R G R Y P G D E R D T Y P E E E R E R Y L L E V E D R G E Y P G G E R G G G D P F P D D D R D S Y P Q C G S

```

```

                                1450      1460      1470      1480      1490      1500
T. castaneum      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. aegypti       -----VGFYYKRFVVGGATCCQCGNKTVMKLKL-----
A. gambiae       -----
A. mellifera     ---PEGGKLTRLIKRELVDAPADQEG-DDDQVDEREYPESHGHDSGQDEDMAEDLSMAPD
C. briggsae     --HSGSLDGPPLNNVKEELMDVVEQHNGHTLKVAVNALTED-RPICAL-----
C. elegans       -HSGGILEGQLLNNVKEEMMDVSEPHNGHLLRVARHIQKASKRPASANPSNLC-----
C. intestinalis  -----FFTQRVHTWPQYVC-----
D. melanogaster  -----
H. sapiens P2    SPGCSPPQPHIHSIHVKEEPVIAEDEDPCMSLVTTANHSPELEDDREIEEPLSEDL-----
O. vulgaris      -----
S.domuncula      ---DESDGESSERDLEIKSEAPSPPTTHFYPSQPHSTPGTPTYTVSINVSSQNDLYAN--
S. purpuratus    AHPDTCRDVYPPGREERSPGDAVSEGELHYRVEQRERFASEESERFMAEERIETHQSAANR

```

```

                                1510      1520      1530      1540
T. castaneum      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. aegypti       -----
A. gambiae       -----
A. mellifera     IMTPEDQIEA-----
C. briggsae     -----
C. elegans       -----
C. intestinalis  -----
D. melanogaster  -----
H. sapiens P2    -----
O. vulgaris      -----
S.domuncula      -----
S. purpuratus    RKVVGQLTMEQLKRMHHNPMMPVPTNGQSEHHPEPSLEGPSQGV

```

riconoscere, oltre al dominio Forkhead, i motivi Zinc Finger e Leucin Zipper. Il FoxP di polpo è, anche, risultato simile ai FOXP (1, 2, 4) noti per la specie umana.

Una volta verificati che i primi due obiettivi sono stati ottenuti si è passato all'esame del profilo di espressione e della localizzazione di FoxP nel polpo.

4.2 – FOX P IN *OCTOPUS VULGARIS*: PROFILO DI ESPRESSIONE

Il primo passo sperimentale per l'applicazione della RealTime qPCR all'analisi del profilo di espressione è stato quello di verificare l'efficienza delle reazioni settate. Per tutti i primers utilizzati è stata calcolata una curva di efficienza (dati non mostrati) ed è stata calcolata un'efficienza di reazione che è risultata essere: $E_{ACT}=1.92$; $E_{TUB}=1.98$; $E_{16S}=1.91$; $E_{FOX P}=1.98$. In base ai risultati ottenuti per tutte le reazioni di amplificazione si è optato per l'utilizzazione della stessa diluizione di cDNA (Figura 4.7). In aggiunta alla verifica della TM per verificare la presenza di un solo prodotto le reazioni a diversa diluizione sono state corse su Gel di Agarosio (2%, TBE 0.5x) e sequenziate (Figura 4.8)

Sono state quindi allestite piastre che permettessero di comparare l'espressione dei geni di riferimento nei diversi tessuti e nei diversi animali con il gene di interesse. In prima istanza sono stati presi in considerazione solo i valori di C_T mediati dai triplicati, considerando lo stesso valore di fluorescenza (Threshold=0.020) come riferimento.

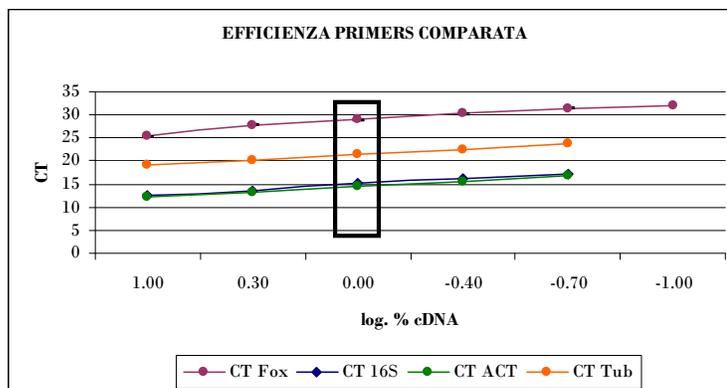


Figura 4.7 - Valori di C_T rilevati dalle diverse diluizioni di cDNA ed ai diversi primers, evidenziando la diluizione che si è scelto di usare equivalente ad 1:100.

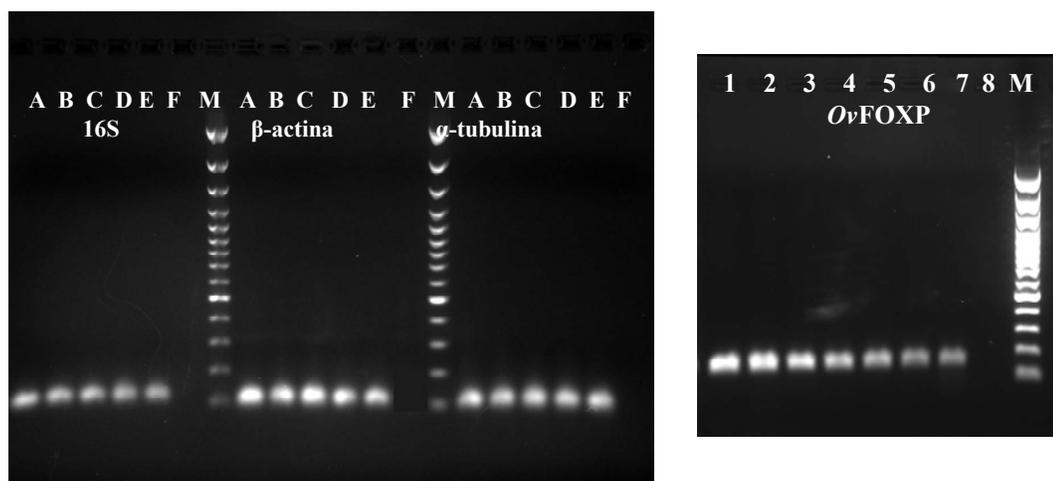


Figura 4.8 - Prodotti di reazione di PCR ottenuti utilizzando come template 2 μ l di cDNA. Sinistra: geni di riferimento (diluizioni A=1:50; B=1:100; C=1:250; D=1:500; E=1:1000; F= controllo negativo); Destra: OvFOxp (diluizioni 1=1:5; 2=1:10; 3=1:50; 4=1:100; 5=1:250; 6=1:500; 7=1:1000; 8=controllo negativo).

I diversi campioni sono stati- di conseguenza - normalizzati in base alla quantità di RNA utilizzata per la sintesi del cDNA ed i valori di C_T (medie aritmetiche dei C_T dei triplicati) direttamente confrontati tra di loro.

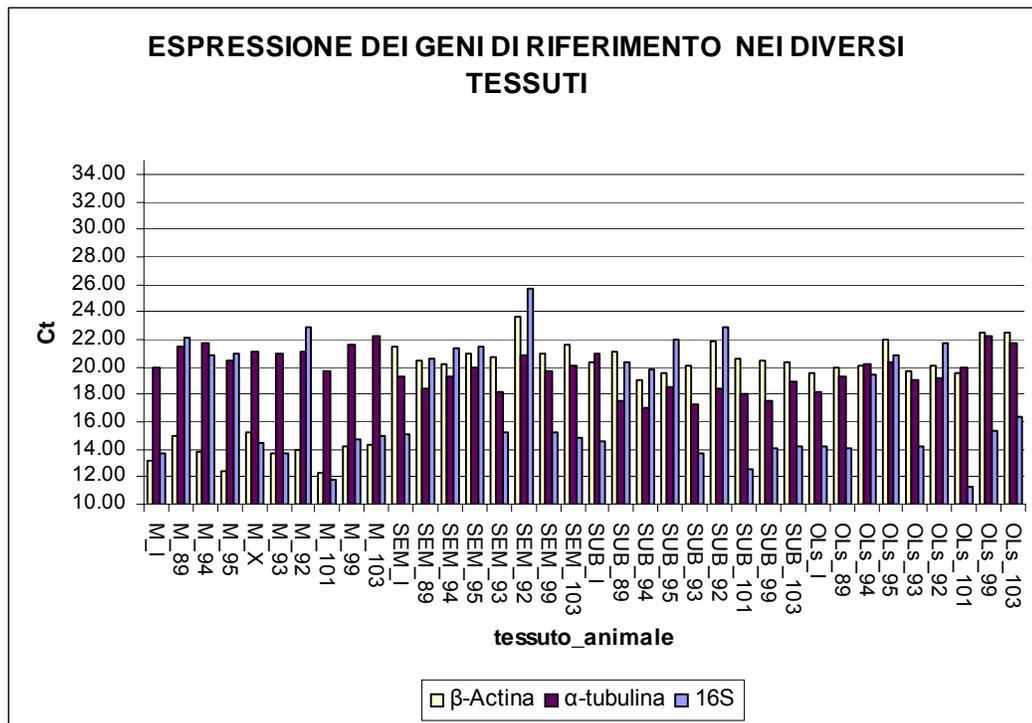


Figura 4.9 - Espressione dei geni di riferimento nei diversi tessuti (M: mantello; SEM: massa sopraesofagea; SUB: massa sotto esofagea; OL: lobi ottici) di 10 polpi. I valori di C_T sono stati ricavati dalla media dei valori di fluorescenza ottenuti dagli esperimenti (in triplicato) relativi ad ogni campione di cDNA; la deviazione standard (non mostrata in grafico) è compresa tra 0.01 e 0.7.

Le forti variazioni di C_T osservate per il 16S rispetto agli altri due non permettono il suo utilizzo come normalizzatore. Di conseguenza, per tutte le analisi successive sono stati considerati geni di riferimento solo l'actina e la tubulina.

A questo punto è stato possibile analizzare il profilo di espressione di Ov-FoxP nei dieci animali utilizzati per questo esperimento (cfr Appendice 1).

Innanzitutto i confronti sono stati fatti, per ciascun animale, considerando i livelli di espressione di Ov-FoxP nel mantello come riferimento.

I risultati ottenuti mostrano che l'espressione del gene nel sistema nervoso centrale è più elevata rispetto a quella del mantello in tutti gli animali (dati non mostrati).

In particolare, sei animali presentano livelli di espressione simili nelle tre parti del "cervello"; altri animali, invece, mostrano delle peculiarità che possono essere così schematizzate:

1. livelli di espressione di Ov-FoxP più bassi nella sottoesofagea (relativamente alle altre parti del cervello) in un solo animale;
2. gradiente di espressione (minima vs. massima; range 2.5 volte) tra i lobi ottici e la massa sopraesofagea (passando per la sottoesofagea) in un altro animale;
3. gradiente di espressione (minima vs. massima; range 2.5 volte) tra massa sopraesofagea e lobi ottici (passando per la sottoesofagea) in un terzo animale;
4. espressione di Ov-FoxP minima nella massa sottoesofagea (inferiore di 1.5 volte rispetto ai lobi ottici e 3.1 volte alla massa sopraesofagea) nell'ultimo animale.

Nel complesso l'analisi dei dati ha evidenziato due sub-popolazioni di individui che presentano oscillazioni differenti nell'espressione del gene nelle diverse parti del sistema nervoso centrale del polpo.

Allo scopo di evidenziare eventuali trend nel set di dati ottenuti e tenuto conto che le variazioni di espressione del singolo gene potrebbero essere in qualche modo relazionate

allo stato di attività di trascrizione dell'individuo in quel momento, ho applicato un'analisi delle componenti principali (PCA) ai risultati ottenuti dalla Real Time qPCR. Questa volta i valori di espressione dei singoli geni (per i 10 animali e tutti i tessuti qui considerati) sono stati riferiti alla tubulina, qui impiegata come normalizzatore. La PCA ha evidenziato 4 componenti (Tab. 4.1) che spiegano nel loro complesso l'88% della varianza dei campioni.

Tabella 4.1 - Autovalori (eigenvalues) ottenuti dalla PCA per i risultati di RealTime qPCR dei diversi tessuti (masse sopra- e sotto esofagea, lobi ottici e mantello) dei 10 animali utilizzati in questo studio.

Total Variance Explained

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	3.719	30.995	30.995	3.719	30.995	30.995	3.546	29.546	29.546
2	3.119	25.995	56.989	3.119	25.995	56.989	2.793	23.272	52.818
3	2.582	21.520	78.509	2.582	21.520	78.509	2.152	17.935	70.753
4	1.121	9.340	87.849	1.121	9.340	87.849	2.051	17.096	87.849
5	.709	5.910	93.759						
6	.407	3.392	97.151						
7	.248	2.063	99.214						
8	.079	.661	99.875						
9	.015	.125	100.000						
10	8.87E-017	7.39E-016	100.000						
11	1.85E-017	1.54E-016	100.000						
12	-3.0E-016	-2.46E-015	100.000						

Extraction Method: Principal Component Analysis.

L'esame dei coefficienti ottenuti dalla PCA e la loro correlazione con le variabili considerate (espressione nei diversi tessuti dei geni considerati; Tab. 4.2) mostra che la prima componente (circa il 30% della varianza) è relativa all'espressione del 16S nei diversi tessuti. L'espressione dell'actina si distribuisce in tre componenti (2, 3, e 4) che condivide in due casi (componente 2 e 4) con Ov-FoxP, rispettivamente per la massa sopraesofagea e la sottoesofagea. E' la combinazione di queste due componenti (circa il 33% della varianza) che giustifica l'espressione del Fox nel polpo.

Un esame dei valori che l'analisi assegna¹⁵ ai singoli individui mostra (Figura 4.10) che è possibile distinguere due animali che si dispongono ai poli opposti delle due componenti considerate. Essi sono stati identificati come il più piccolo e il più grande del campione considerato, e cioè l'animale di 30 g e quello di più di due chilogrammi di peso.

Tabella 4.2 - Valori di correlazione delle quattro componenti estratte dall'analisi delle componenti principali relativamente ai tessuti (M: mantello, S: sopraesofagea, B: sottoesofagea, O: lobi ottici) e ai geni considerati (FOX: Ov-FoxP; ACT: Ov-Actina; 16S: Ov-16S). In blu sono evidenziate le correlazioni

Rotated Component Matrix

	Component			
	1	2	3	4
M_FOX	-.109	.589	-.153	-.593
M_ACT	.194	-.220	.883	-.175
M_16S	.969	.038	-.004	-.064
S_FOX	.182	.891	-.264	-.174
S_ACT	.070	.844	-.103	.108
S_16S	.950	-.178	-.013	.213
B_FOX	-.042	.398	-.343	.761
B_ACT	.127	-.166	-.227	.940
B_16S	.930	-.054	-.179	.234
O_FOX	-.302	.809	.144	.018
O_ACT	-.131	-.017	.971	-.161
O_16S	.790	.115	.321	-.184

Extraction Method: Principal Component Analysis.
Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization.

significant.

¹⁵ Valori di regressione derivati dalla matrice normalizzata.

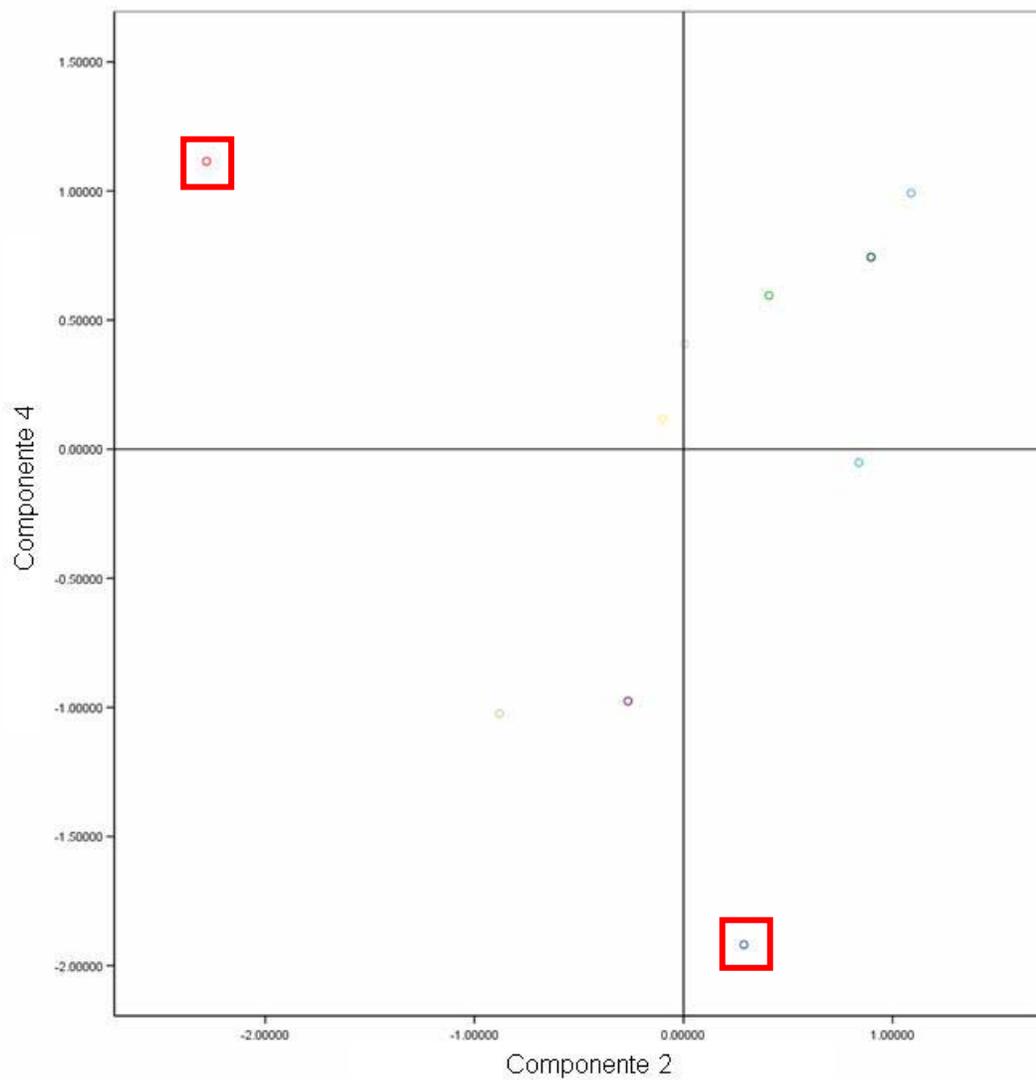


Figura 4.10 - Distribuzione dei valori ottenuti per i singoli individui dopo analisi delle componenti principali relativamente alla loro espressione di geni considerati per le componenti 2 e 4 (Ov-Fox in massima parte). Sono evidenziati i due estremi. Dettagli nel testo.

4.3 – FOX P IN *OCTOPUS VULGARIS*: LOCALIZZAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Come menzionato nella sezione metodologica (Sezione 3.4) gli esperimenti di ibridazione in situ sono stati condotti utilizzando sonde¹⁶ per la tubulina (controllo positivo dell'esperimento) e per Ov-FoxP. L'esame dei risultati ottenuti nei diversi animali non ha mostrato differenze apprezzabili nella distribuzione delle cellule risultate positive impiegando la tubulina¹⁷. Effettivamente il gene si è rivelato per lo più ubiquitario negli strati cellulari dei diversi lobi del cervello del polpo (dati non mostrati).

Per quanto riguarda Ov-FoxP gli esperimenti condotti su tutti gli animali non hanno mostrato differenze significative tra essi; in aggiunta, l'impiego delle due sonde non ha portato a risultati sostanzialmente diversi nella localizzazione cellulare del segnale.

La figura 4.11 mostra che Ov-FoxP è risultato espresso, nelle nostre condizioni sperimentali, solo nei corpi cellulari di alcune e ristrette aree del cervello del polpo. Nella maggior parte dei casi sono risultate positive solo poche cellule; in altri la positività è estesa all'intero strato di cellule (lobi dei cromatofori della massa sottoesofagea). I risultati ottenuti dagli esperimenti di ibridazione in situ sono riassunti nella Tabella 4.3.

Esperimenti successivi sono necessari per verificare se il pattern di espressione osservato nel corso di questo progetto è riscontrabile anche in animali significativamente più piccoli o più grandi di quelli impiegati in questo campione (150 – 350 g).

¹⁶ Senso e antisenso.

¹⁷ L'espressione della tubulina è risultata rilevabile già dopo 1-2h dall'aggiunta del substrato; per il FoxP sono stati necessari più di 24 ore.

Tabella 4.3 - Risultati ottenuti dagli esperimenti di ibridazione in situ (N=6) per l'espressione di Ov-FoxP nelle varie regioni del cervello di polpo. L'espressione è classificata in maniera qualitativa come riguardante poche cellule (+) o la gran parte dei corpi cellulari dello strato esterno o corticale (*).

Regione/Lobo	Espressione
Lobo ottico ¹	+
Massa sopra-esofagea	
Lobo buccale	+
Lobo frontale inferiore	+
Lobo frontale superiore	
Lobo sub-frontale	
Lobo verticale	
Lobo sub-verticale	
Lobo basale anteriore	+
Lobo basale mediano ²	+
Lobo basale dorsale	
Massa sub-esofagea	
Lobo brachiale	
Lobo cromatoforo	*
Lobo pedale	+
Lobo cromatoforo	*
Lobo pallioviscerale	
Lobo vasomotore	*

¹ limitatamente ad alcune cellule dello strato plessiforme e a diverse della ghiandola ottica

² limitatamente ad alcune cellule della parte laterale del lobo

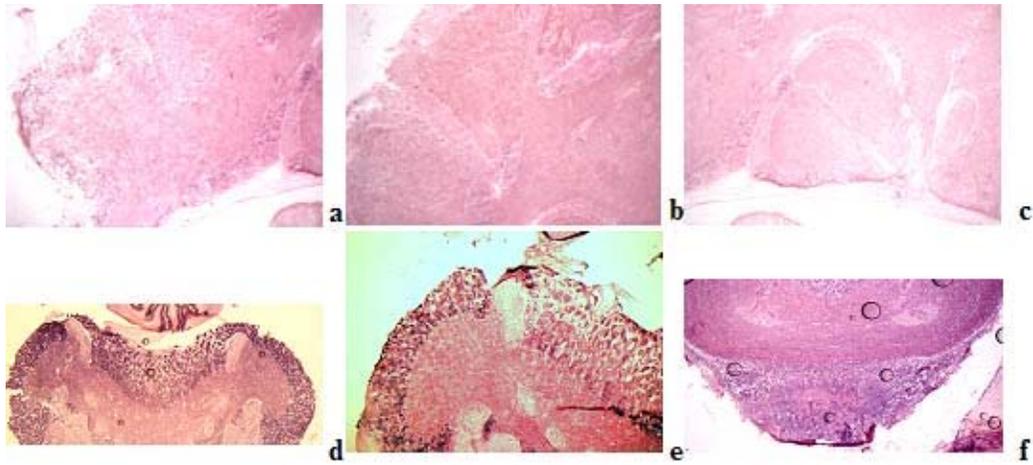


Figura 4.11 - Esempi di sezioni di masse sopra e sottoesofagea di *O. vulgaris* ottenute da esperimenti di ibridazione in situ. Il segnale positivo è stato rilevato con l'utilizzo della sonda antisenso (gli esperimenti con la sonda senso corrispondente non mostrati). Per la massa sopraesofagea (sezioni sagittali, ingr.: 50x): A - buccale superiore (ingrandimento 63x); B- Frontale Inferiore; C - Basale anteriore. Per la massa sottoesofagea (sezioni coronali, ingr: 40x (d) e 63x): D - lobo dei cromatofori anteriore; E - lobo dei cromatofori posteriore; F - lobo vasomotore (lobo pedale).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tutti gli obiettivi prefissati per questo progetto di Dottorato sono stati raggiunti. L'analisi del trascrittoma del sistema nervoso centrale di *O. vulgaris* ha permesso di indentificare una sequenza nucleotidica (1111 bp) corrispondente a gran parte del trascritto di Ov-FoxP. Che si tratti di un FoxP è stato confermato dall'analisi bioinformatica considerando sia la sequenza nucleotidica che la relativa traduzione amminoacidica.

Sulla base delle conoscenze disponibili Ov-FoxP è il primo membro della classe P dei geni Fox ad essere stato identificato ad oggi nei Molluschi. In questo phylum, infatti, fino ad oggi è stata identificato solo FoxA in *Patella vulgata* (Lartillot et al., 2002); con quest'ultimo l'analisi bioinformatica ha rivelato un'omologia di circa il 40%.

Ov-FoxP mostra un'elevata conservazione sia rispetto ai geni ortologi noti per gli altri invertebrati (in media 85% di similarità, range: 72.6 – 89); la minore similarità è stata rinvenuta con il FoxP della spugna. In aggiunta, Ov-FoxP mostra anche una elevata omologia con i FOXP1, FOXP2 FOXP4 dell'uomo (86% circa). Più in dettaglio, si è rilevata molto elevata omologia amminoacidica dei motivi funzionali (Leucin Zipper, Zinc Finger e il Dominio Forkhead), similarità che fa supporre ad un'omologia funzionale conservata nelle diverse specie.

Pur avendo ristretto la nostra analisi ad individui appartenenti a classi di età limitate e comunque considerati – sulla base della taglia corporea – sub-adulti e/o adulti, i risultati ottenuti dalla RealTime qPCR hanno evidenziato una variabilità nell'espressione genica tra i diversi individui e nei diversi tessuti considerati. In particolare, Ov-FoxP è maggiormente espresso nel sistema nervoso centrale (relativamente al mantello privato di pelle e di grosse componenti nervose¹⁸). L'utilizzo della PCA applicata ai dati ottenuti ha rivelato un gradiente di espressione di Ov-FoxP nel sistema nervoso centrale nei diversi animali a partire dall'animale più piccolo (di taglia corporea e certamente il più piccolo di età nel campione studiato) a finire all'altro estremo che è stato identificato nell'animale più grande del campione. Un'esame in dettaglio dei livelli relativi di espressione di Ov-FoxP nei diversi tessuti ha permesso di riconoscere che le maggiori escursioni dei livelli di espressione sono imputabili alla massa sottoesofagea.

L'ibridazione *in situ* ha confermato i risultati ottenuti dalla Real Time qPCR identificando espressioni differenti nelle diverse parti. La maggior parte dei neuroni che esprimono Ov-FoxP sono localizzate nella massa sottoesofagea.

In aggiunta, l'analisi della distribuzione topologica dell'espressione nei vari lobi e distretti cellulari costituenti il cervello del polpo ha mostrato che l'espressione di FoxP è ristretta (nel campione studiato) a specifiche aree del cervello. Ciò giustifica, da una parte, i bassi livelli di espressione monitorabili per RealTime qPCR a causa dei rapporti di diluizione delle cellule considerate

¹⁸ Non si può escludere che alcune terminazioni nervose di nervi periferici non siano presenti nei campioni di mantello utilizzati in questo studio.

nel campione impiegato per estrarre l'RNA (intere parti). In futuro, l'impiego di metodi di campionamento seriali e/o l'analisi di parti di lobi (mediante ad esempio Laser Capture) potrebbero risultare vantaggiosi per poter meglio correlare i dati di espressione ottenuti attraverso Real Time qPCR e ibridazione in situ..

Il fatto che in tutti gli individui considerati l'espressione di Ov-FoxP è risultata particolarmente rilevante nella massa sottoesofagea e la gran parte dei corpi cellulari dei lobi dei cromatofori (anteriore e posteriore¹⁹) ha mostrato un evidente segnale positivo alle sonde di Ov-FoxP pone le basi per un'ipotesi di lavoro che la funzione di FoxP come fattore di trascrizione sia in qualche modo conservata tra invertebrati e alti Vertebrati.

Gli esperimenti di ibridazione in situ permettono di individuare, nel polpo, un ideale circuito neurale che a partire dai lobi ottici e passando per il lobo basale si concentrano nei lobi dei cromatofori e in poche altre strutture ristrette della massa sottoesofagea. E' interessante notare che tale circuito corrisponde a quello individuato, sulla base di esperimenti di stimolazione e ablazione nervosa, a quello deputato al controllo motorio del body pattern nei cefalopodi (Boycott, 1953; rassegna in Messenger, 2001).

Benchè questa, allo stato, rappresenti solo una ipotesi che necessita di futuri approfondimenti i dati raccolti nell'ambito di questo progetto di dottorato lascerebbero ipotizzare che questo gene svolga una funzione nella plasticità e/o mantenimento delle reti neurali deputate al controllo motorio. Ciò in analogia a

¹⁹ Entrambi parte della massa sottoesofagea.

quanto recentemente dimostrato in Vertebrati (si vedano ad esempio: Teramitsu et al., 2004; Teramitsu & White, 2006).

Non è, inoltre, da sottovalutare che l'espressione di FoxP in altri invertebrati è stata localizzata a livello di distretti neurali specifici (ad esempio neuroni motori in *C. elegans*: Hope et al. 2003).

Infine, merita una menzione l'osservazione di un gradiente di espressione di Ov-FoxP in individui ordinati per taglia (dal più piccolo/giovane al più grande/adulto). Tra le conoscenze disponibili sul repertorio comportamentale di *O. vulgaris* merita a tale proposito la nota che due pattern, utilizzati dal polpo in risposta a nemici potenziali vengono espressi in maniera diversa a seconda dell'età dell'individuo (Packard & Sanders, 1971; rassegna in Borrelli et al., 2006). Nei giovani la presenza di un "intruso" o un nemico nel territorio o nelle immediate vicinanze dell'animale porta all'individuo a manifestare un pattern criptico denominato Flamboyant: l'animale tende ad assomigliare a un ciuffo di alghe fluttuanti.

Con la crescita, e la maturazione comportamentale, gli animali mostrano – in risposta all'intruso – sempre meno frequentemente il Flamboyant. A questo viene sostituita un'altra reazione, denominata Dymantic, che comporta l'allargamento dell'apparenza della propria massa con incremento del contrasto rispetto all'ambiente circostante. In pratica l'animale manifesta una specie di maschera "chiara" bordata da una sottile marcatura bruna in prossimità del contorno dell'animale stesso. Tale "maturazione del body patterning" – che è

qui citata solo con due esempi – costituisce una regola nei cefalopodi ed è associata – dal punto di vista morfo-funzionale alla comparsa di nuovi cromatofori nella pelle dell'animale con adeguamento del relativo sistema di innervazione periferico e di controllo neurale centrale (a carico dei lobi dei cromatofori).

Studi futuri sono necessari per tentare di gettare luce alla possibile funzione di Ov-FoxP nel polpo e più in particolare sul suo eventuale ruolo nella regolazione del circuito neurale deputato al controllo del repertorio comportamentale: nominalmente il Body Pattern.

Bibliografia

- Adelman, W. J., Alberghina, M., Aldrich, F. A., Arnold, J. M., Bezanilla, F., Brinley, F. J., Brown, A., Budelmann, B. U., Cohen, L. B., Cohen, R. S., Gainer, H., Gilbert, D. L., Gould, R. M., Hanlon, R. T., Hoskin, F. C. G., Landowne, D., Langford, G. M., Lasek, R. J., Mangum, C. P., Meinertzhagen, I. A., Meyer, M. A., Mueller, R., Mullins, L. J., O'Dor, R. K., Pant, H. C., Pörtner, H. O., Rice, R. V., Saibil, H. R., Salzberg, B. M., Shadwick, R. E., Stanley, E. F., Summers, W. C., Vandenberg, C. & Weiss, D. G. 1990. Squid as experimental animals. New York and London: Plenum Press.
- Albanese, J., Martens, K., Karkanitsa, L. V. & Dainiak, N. 2007. Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology. *Exp Hematol*, 35, 47-54.
- Andrews, P. L. R. E. M. T. 1981. The effects of soe anaestheticagents in *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70.
- Balter, M. 2001. Genetics. First gene linked to speech identified. *Science*, 294, 32.
- Balter, M. 2002. Language evolution. 'Speech gene' tied to modern humans. *Science*, 297, 1105.
- Baratte, S., Andouche, A. & Bonnaud, L. 2007. Engrailed in cephalopods: a key gene related to the emergence of morphological novelties. *Dev Genes Evol*, 217, 353-62.
- Barbosa, A., Florio, C., Chiao, C. C. & Hanlon, R. T. 2004. Visual background features that elicit mottled body pattern in cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Biol Bull (Woods Hole)*, 207.
- Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5138-43.
- Bonkowsky, J. L. & Chien, C. B. 2005. Molecular cloning and developmental expression of foxP2 in zebrafish. *Dev Dyn*, 234, 740-6.
- Borrelli, L., Gherardi, F. & Fiorito, G. 2006. A Catalogue of Body Patterning in Cephalopoda. Napoli, Italy: stazione Zoologica A. Dohrn; Firenze University Press.

- Boycott, B. B. 1953. The chromatophore system of cephalopods. Proceedings of the Linnaean Society (London) 164, 235-240.
- Boyle, P. R. 1991. The UFAW Handbook on the Care and Management of Cephalopods in the Laboratory. Pottes Bar: Universities federation for Animal Welfare.
- Bracha, H. S. 2006. Implication for the Reclassification of fear-circuit-related traits and for studying resilience to warzone-related posttraumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30, 827-853.
- Brenowitz, E. A., Margoliash, D. & Nordeen, K. W. 1997. An introduction to birdsong and the avian song system. *J Neurobiol*, 33, 495-500.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. & Ramsdell, F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27, 68-73.
- Budelmann, B. U. 1995. The cephalopods nervous system: what evolution has made of the molluscan design. In: *The Nervous System of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach* (Ed. by Kutsch., O. B. a. W.), pp. 115-138. Basel: Birkhauser Verlag.
- Bullock, T. H. & Horridge, G. A. 1965. *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*. San Francisco: Freeman.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29, 23-39.
- Carlsson, P. & Mahlapuu, M. 2002. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol*, 250, 1-23.
- Carroll, S. B. 2005. Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS Biol*, 3, e245.
- Chevalier, S., Martin, A., Leclere, L., Amiel, A. & Houliston, E. 2006. Polarised expression of FoxB and FoxQ2 genes during development of the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. *Dev Genes Evol*, 216, 709-20.
- Chiao, C. C. & Hanlon, R. T. 2001. Cuttlefish cue visually on area-not shape or aspect ratio-of light objects in the substrate to produce disruptive body patterns of camouflage. *Biol Bull (Woods Hole)*, 201, 269-270.

- Chiao, C. C. & Hanlon, R. T. 2001. Cuttlefish camouflage: visual perception of size, contrast and number of white squares on artificial checkerboard substrata initiates disruptive coloration. *J Exp Biol*, 204, 2119-2125.
- Chiao, C. C., Kelman, E. J. & Hanlon, R. T. 2004. Disruptive body patterning of cuttlefish (*Sepia officinalis*) requires visual information on edges and brightness of objects on natural substrate backgrounds. *Biol Bull (Woods Hole)*, 207, 153.
- Chiao, C. C., Kelman, E. J. & Hanlon, R. T. 2005. Disruptive body patterning of cuttlefish (*Sepia officinalis*) requires visual information regarding edges and contrast of objects in natural substrate backgrounds. *Biol Bull*, 208, 7-11.
- Choy, K. W., Wang, C. C., Ogura, A., Lau, T. K., Rogers, M. S., Ikeo, K., Gojobori, T., Tang, L. Y., Lam, D. S., Chung, T. K. & Pang, C. P. 2006. Molecular characterization of the developmental gene in eyes: through data-mining on integrated transcriptome databases. *Clin Biochem*, 39, 224-30.
- Clark, A. G., Glanowski, S., Nielsen, R., Thomas, P. D., Kejariwal, A., Todd, M. A., Tanenbaum, D. M., Civello, D., Lu, F., Murphy, B., Ferreira, S., Wang, G., Zheng, X., White, T. J., Sninsky, J. J., Adams, M. D. & Cargill, M. 2003. Inferring nonneutral evolution from human-chimp-mouse orthologous gene trios. *Science*, 302, 1960-3.
- Clayton, D. F. 1997. Role of gene regulation in song circuit development and song learning. *J Neurobiol*, 33, 549-71.
- Davidson, A. C. & Hinkley, D. V. 2002. *Bootstrap Methods and their Application*
- de Haan, J. R., Wehrens, R., Bauerschmidt, S., Piek, E., van Schaik, R. C. & Buydens, L. M. 2007. Interpretation of ANOVA models for microarray data using PCA. *Bioinformatics*, 23, 184-90.
- Demsky, L. S. 1992. Chromatophore system in teleost and cephalopods: a levels oriented analysis of convergent systems. *Brain Behavior and Evolution*, 40, 141-156.
- El-Hodiri, H., Bhatia-Dey, N., Kenyon, K., Ault, K., Dirksen, M. & Jamrich, M. 2001. Fox (forkhead) genes are involved in the dorso-ventral patterning of the *Xenopus* mesoderm. *Int J Dev Biol*, 45, 265-71.
- Enard, W., Przeworski, M., Fisher, S. E., Lai, C. S., Wiebe, V., Kitano, T., Monaco, A. P. & Paabo, S. 2002. Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature*, 418, 869-72.

- Farries, M. A. 2004. The avian song system in comparative perspective. *Ann N Y Acad Sci*, 1016, 61-76.
- Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrisey, E. E. & Walsh, C. A. 2003. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol*, 460, 266-79.
- Fisher, S. E. 2006. Tangled webs: tracing the connections between genes and cognition. *Cognition*, 101, 270-97.
- Fisher, S. E., Vargha-Khadem, F., Watkins, K. E., Monaco, A. P. & Pembrey, M. E. 1998. Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nat Genet*, 18, 168-70.
- Friedman, J. R. & Kaestner, K. H. 2006. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2317-28.
- Froesch, D. & Packard, A. 1979. Octopus chromatophores accumulate nickel. *Experientia*, 35, 828-829.
- Gahr, M. 2000. Neural song control system of hummingbirds: comparison to swifts, vocal learning (Songbirds) and nonlearning (Suboscines) passerines, and vocal learning (Budgerigars) and nonlearning (Dove, owl, gull, quail, chicken) nonpasserines. *J Comp Neurol*, 426, 182-96.
- Gajiwala, K. S. & Burley, S. K. 2000. Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 10, 110-6.
- Gentilucci, M. & Corballis, M. C. 2006. From manual gesture to speech: A gradual transition. *Neurosci Biobehav Rev*, 30, 949-60.
- Ginsberg, S. D. & Mirnics, K. 2006. Functional genomic methodologies. *Prog Brain Res*, 158, 15-40.
- Guerra, A. 1979. Fitting von Bertalanffy expression to *Octopus vulgaris* growth. *Inv. Pesq.*, 43, 319-326.
- Haesler, S., Wada, K., Nshdejan, A., Morrisey, E. E., Lints, T., Jarvis, E. D. & Scharff, C. 2004. FoxP2 expression in avian vocal learners and non-learners. *J Neurosci*, 24, 3164-75.
- Hanlon, R. T. 1978. *Aspect of the Biology of the Squid, Loligo (Doryteuthis) plei in Captivity.* . USA: University of Miami.

- Hanlon, R. T. & Messenger, J. B. 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L) : the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 320, 437-487.
- Hanlon, R. T. & Messenger, J. B. 1996. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge: University Press.
- Hauser, M. D., Chomsky, N. & Fitch, W. T. 2002. The faculty of language: what is it, who has it, and how did it evolve? *Science*, 298, 1569-79.
- Hernandez-Lopez, J. L., J.J. Castro-Hernandez & V. Hernandez-Garcia. 2001. Age determined from daily deposition of concentric rings on common octopus (*Octopus vulgaris*) beaks. *Fish. Bull.*, 99, 679-684.
- Hochner, B., Shomrat, T. & Fiorito, G. 2006. The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. *Biol Bull*, 210, 308-17.
- Hope, I. A., Mounsey, A., Bauer, P. & Aslam, S. 2003. The forkhead gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 304, 43-55.
- Kaestner, K. H., Knochel, W. & Martinez, D. E. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 14, 142-6.
- Kaminen, N., Hannula-Jouppi, K., Kestila, M., Lahermo, P., Muller, K., Kaaranen, M., Myllyluoma, B., Voutilainen, A., Lyytinen, H., Nopola-Hemmi, J. & Kere, J. 2003. A genome scan for developmental dyslexia confirms linkage to chromosome 2p11 and suggests a new locus on 7q32. *J Med Genet*, 40, 340-5.
- Kanda, A., Iwakoshi-Ukena, E., Takuwa-Kuroda, K. & Minakata, H. 2003. Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Peptides*, 24, 35-43.
- Kandel, E. R. 1979. *Behavioural Biology of Aplysia*. In: *A Contribution to the Comparative Study of Opisthobranch Molluscs*. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Kaufmann, E. & Knochel, W. 1996. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev*, 57, 3-20.
- Kim, K., Zhang, S., Jiang, K., Cai, L., Lee, I. B., Feldman, L. J. & Huang, H. 2007. Measuring similarities between gene expression profiles through new data transformations. *BMC Bioinformatics*, 8, 29.

- Lai, C. S., Fisher, S. E., Hurst, J. A., Levy, E. R., Hodgson, S., Fox, M., Jeremiah, S., Povey, S., Jamison, D. C., Green, E. D., Vargha-Khadem, F. & Monaco, A. P. 2000. The SPCH1 region on human 7q31: genomic characterization of the critical interval and localization of translocations associated with speech and language disorder. *Am J Hum Genet*, 67, 357-68.
- Lai, C. S., Fisher, S. E., Hurst, J. A., Vargha-Khadem, F. & Monaco, A. P. 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, 413, 519-23.
- Lai, C. S., Gerrelli, D., Monaco, A. P., Fisher, S. E. & Copp, A. J. 2003. FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain*, 126, 2455-62.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V. F., Gauthier, M., Gongora, M., Green, K., Worheide, G., Leys, S. P. & Degnan, B. M. 2006. Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evol Dev*, 8, 150-73.
- Lartillot, N., Le Gouar, M. & Adoutte, A. 2002. Expression patterns of fork head and gooseoid homologues in the mollusc *Patella vulgata* supports the ancestry of the anterior mesendoderm across Bilateria. *Dev Genes Evol*, 212, 551-61.
- Lee, H. H. & Frasch, M. 2004. Survey of forkhead domain encoding genes in the *Drosophila* genome: Classification and embryonic expression patterns. *Dev Dyn*, 229, 357-66.
- Lee, P. N., Callaerts, P., De Couet, H. G. & Martindale, M. Q. 2003. Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties. *Nature*, 424, 1061-5.
- Lehmann, O. J., Sowden, J. C., Carlsson, P., Jordan, T. & Bhattacharya, S. S. 2003. Fox's in development and disease. *Trends Genet*, 19, 339-44.
- Li, S., Weidenfeld, J. & Morrisey, E. E. 2004. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol*, 24, 809-22.
- Liegeois, F., Baldeweg, T., Connelly, A., Gadian, D. G., Mishkin, M. & Vargha-Khadem, F. 2003. Language fMRI abnormalities associated with FOXP2 gene mutation. *Nat Neurosci*, 6, 1230-7.
- Lu, M. M., Li, S., Yang, H. & Morrisey, E. E. 2002. Foxp4: a novel member of the Foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with Foxp1 and Foxp2 in pulmonary and gut tissues. *Mech Dev*, 119 Suppl 1, S197-202.

- MacDermot, K. D., Bonora, E., Sykes, N., Coupe, A. M., Lai, C. S., Vernes, S. C., Vargha-Khadem, F., McKenzie, F., Smith, R. L., Monaco, A. P. & Fisher, S. E. 2005. Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am J Hum Genet*, 76, 1074-80.
- Maldonado, H. 1963. The positive learning process in *Octopus vulgaris*. *Z. Vgl. Physiol.*, 47, 191.
- Marcus, G. F. & Fisher, S. E. 2003. FOXP2 in focus: what can genes tell us about speech and language? *Trends Cogn Sci*, 7, 257-262.
- Marler, P. 1997. Three models of song learning: evidence from behavior. *J Neurobiol*, 33, 501-16.
- Maruyama, K. & Sugano, S. 1994. Oligo-Capping: A Simple Method to Replace the Cap Structure of Eukaryotic mRNAs with Oligoribonucleotides. *Gene*, 138, 171-174.
- Mazet, F., Amemiya, C. T. & Shimeld, S. M. 2006. An ancient Fox gene cluster in bilaterian animals. *Curr Biol*, 16, R314-6.
- Mazet, F., Yu, J. K., Liberles, D. A., Holland, L. Z. & Shimeld, S. M. 2003. Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene*, 316, 79-89.
- Messenger, J. B. 1968. The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Anim Behav*, 16, 342-357.
- Messenger, J. B. 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 76, 473-528.
- Messenger, J. B., Nixon, M. & Ryan, K. P. 1985. Magnesium chloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comp Biochem Physiol C*, 82, 203-5.
- Newbury, D. F. & Monaco, A. P. 2002. Talking genes - the molecular basis of language impairment. *Biologist (London)*, 49, 255-60.
- Nixon, M. & J.Z., Y. 2003. *The Brains and Lives of Cephalopods*. New York: Oxford University.
- O'Brien, E. K., Zhang, X., Nishimura, C., Tomblin, J. B. & Murray, J. C. 2003. Association of specific language impairment (SLI) to the region of 7q31. *Am J Hum Genet*, 72, 1536-43.

- O'Dor, R. K. & Webber, D. M. 1991. Invertebrates Athletes. Trade-off between transport efficiency and power-density in cephalopod evolution. *J Exp Biol*, 160, 93-112.
- Ogura, A., Ikeo, K. & Gojobori, T. 2004. Comparative analysis of gene expression for convergent evolution of camera eye between octopus and human. *Genome Res*, 14, 1555-61.
- Packard, A. 1963. The behaviour of *Octopus vulgaris*. *Bull. Inst. Oceanogr.(Monaco)* 1D, 35-49.
- Packard, A. 1972. Cephalopod and fish: the limits of convergence. *Biological Reviews (Cambridge)*, 47, 241-307.
- Packard, A. 1985. Sizes and distribution of chromatophores during post-embryonic development in cephalopods. *Vie et Milieu*, 35, 285-298.
- Packard, A. & Hochberg, F. G. 1977. Skin patterning in *Octopus* and other Genera. *Symposia of the Zoological Society of London*, 38, 191-231.
- Packard, A. & Sanders, G. 1969. What the octopus shows to the world. *Endeavour*, 28, 92-9.
- Packard, A. & Sanders, G. 1971. Body patterns of *Octopus vulgaris* and maturation of the response to disturbance. *Anim Behav*, 19, 780-790.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30, e36.
- Pickering, C., Avesson, L., Lindblom, J., Liljequist, S. & Schioth, H. B. 2007. To press or not to press? Differential receptor expression and response to novelty in rats learning an operant response for reward. *Neurobiol Learn Mem*, 87, 181-91.
- Pinker, S. 2001. Talk of genetics and vice versa. *Nature*, 413, 465-6.
- Riva, A., Carpentier, A. S., Torresani, B. & Henaut, A. 2005. Comments on selected fundamental aspects of microarray analysis. *Comput Biol Chem*, 29, 319-36.
- Runnegar, B. & Pojeta, J., Jr. 1974. Molluscan Phylogeny: The Paleontological Viewpoint. *Science*, 186, 311-317.

- Sanders, F. K. & Young, J. Z. 1940. Learning and other functions of the higher nervous center of Sepia. *Journal of Neurophysiology* (Bathesda), 3, 501-528.
- Sanders, G. D. 1975. The Cephalopods. In: *Invertebrate Learning. Cephalopods and Echinoderms* (Ed. by W.C. Corning, J. A. D. A. O. D. W.), pp. 1-101. New York: N.Y. Plenum Press.
- Schaefer, B. C. 1995. Revolution in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Anal Biochem*, 227, 255-273.
- Scharff, C. & Haesler, S. 2005. An evolutionary perspective on FoxP2: strictly for the birds? *Curr Opin Neurobiol*, 15, 694-703.
- Scharff, C. & White, S. A. 2004. Genetic components of vocal learning. *Ann N Y Acad Sci*, 1016, 325-47.
- Schon, C., Wochnik, A., Robetner, A., Donow, C. & Knochel, W. 2006. The FoxP subclass in *Xenopus laevis* development. *Dev Genes Evol*.
- Shah, R., Medina-Martinez, O., Chu, L. F., Samaco, R. C. & Jamrich, M. 2006. Expression of FoxP2 during zebrafish development and in the adult brain. *Int J Dev Biol*, 50, 435-8.
- Shu, W., Lu, M. M., Zhang, Y., Tucker, P. W., Zhou, D. & Morrisey, E. E. 2007. Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. *Development*, 134, 1991-2000.
- Shu, W., Yang, H., Zhang, L., Lu, M. M. & Morrisey, E. E. 2001. Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *J Biol Chem*, 276, 27488-97.
- Stroud, J. C., Wu, Y., Bates, D. L., Han, A., Nowick, K., Paabo, S., Tong, H. & Chen, L. 2006. Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure*, 14, 159-66.
- Takahashi, K., Liu, F. C., Hirokawa, K. & Takahashi, H. 2003. Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *J Neurosci Res*, 73, 61-72.
- Takuwa-Kuroda, K., Iwakoshi-Ukena, E., Kanda, A. & Minakata, H. 2003. Octopus, which owns the most advanced brain in invertebrates, has two members of vasopressin/oxytocin superfamily as in vertebrates. *Regul Pept*, 115, 139-49.

- Tang, B. L. 2006. Molecular genetic determinants of human brain size. *Biochem Biophys Res Commun.*, 345, 911-6.
- Teramitsu, I., Kudo, L. C., London, S. E., Geschwind, D. H. & White, S. A. 2004. Parallel FoxP1 and FoxP2 expression in songbird and human brain predicts functional interaction. *J Neurosci*, 24, 3152-63.
- Teramitsu, I. & White, S. A. 2006. FoxP2 regulation during undirected singing in adult songbirds. *J Neurosci*, 26, 7390-4.
- Teufel, A., Wong, E. A., Mukhopadhyay, M., Malik, N. & Westphal, H. 2003. FoxP4, a novel forkhead transcription factor. *Biochim Biophys Acta*, 1627, 147-52.
- Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W. & Piatigorsky, J. 1997. Squid Pax-6 and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2421-6.
- Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D. & Piatigorsky, J. 1993. Primary structure and lens-specific expression of genes for an intermediate filament protein and a beta-tubulin in cephalopods. *Biochim Biophys Acta*, 1216, 245-54.
- Tomkins, J. P., Luo, M., Fang, G. C., Main, D., Goicoechea, J. L., Atkins, M., Frisch, D. A., Page, R. E., Guzman-Novoa, E., Yu, Y., Hunt, G. & Wing, R. A. 2002. New genomic resources for the honey bee (*Apis mellifera* L.): development of a deep-coverage BAC library and a preliminary STC database. *Genet Mol Res*, 1, 306-16.
- Tu, Q., Brown, C. T., Davidson, E. H. & Oliveri, P. 2006. Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. *Dev Biol*, 300, 49-62.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, RESEARCH0034.
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Copp, A. & Mishkin, M. 2005. FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat Rev Neurosci*, 6, 131-8.
- Vargha-Khadem, F., Watkins, K. E., Price, C. J., Ashburner, J., Alcock, K. J., Connelly, A., Frackowiak, R. S., Friston, K. J., Pembrey, M. E., Mishkin, M., Gadian, D. G. & Passingham, R. E. 1998. Neural basis of an inherited speech and language disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12695-700.

- Vernes, S. C., Nicod, J., Elahi, F. M., Coventry, J. A., Kenny, N., Coupe, A. M., Bird, L. E., Davies, K. E. & Fisher, S. E. 2006. Functional genetic analysis of mutations implicated in a human speech and language disorder. *Hum Mol Genet*, 15, 3154-67.
- Volloch, V., Schweitzer, B. & Rits, S. 1994. Ligation-Mediated Amplification of RNA from Murine Erythroid Cells Reveals a Novel Class of Beta-Globin mRNA with an Extended 5'-Untranslated Region. *Nucleic Acids Res*, 22, 2507-2511.
- Walker, J. J., Longo, N. & Bitterman, M. E. 1970. The octopus in the laboratory. Handling, maintenance, training. *Behavior Research Methods and Instrumentation*, 2, 15-18.
- Wang, B., Lin, D., Li, C. & Tucker, P. 2003. Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 forkhead transcriptional repressors. *J Biol Chem*, 278, 24259-68.
- Wassink, T. H., Piven, J., Vieland, V. J., Pietila, J., Goedken, R. J., Folstein, S. E. & Sheffield, V. C. 2002. Evaluation of FOXP2 as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet*, 114, 566-9.
- Watkins, K. E., Vargha-Khadem, F., Ashburner, J., Passingham, R. E., Connelly, A., Friston, K. J., Frackowiak, R. S., Mishkin, M. & Gadian, D. G. 2002. MRI analysis of an inherited speech and language disorder: structural brain abnormalities. *Brain*, 125, 465-78.
- Webb, D. M. & Zhang, J. 2005. FoxP2 in song-learning birds and vocal-learning mammals. *J Hered*, 96, 212-6.
- Weigel, D. & Jackle, H. 1989b. Novel homeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Cell Biol*, 67, 393-6.
- Weigel, D. & Jackle, H. 1990. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*, 63, 455-6.
- Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E. & Jackle, H. 1989a. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 57, 645-58.
- Wells, M. J. 1965. Learning in octopus. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 20, 477-507.
- Wells, M. J. 1978. *Octopus: Physiology and behaviour of an Advanced Invertebrate*. London: Chapman and Hall.

- Weniger, M., Engelmann, J. C. & Schultz, J. 2007. Genome Expression Pathway Analysis Tool--analysis and visualization of microarray gene expression data under genomic, proteomic and metabolic context. *BMC Bioinformatics*, 8, 179.
- White, S. A., Fisher, S. E., Geschwind, D. H., Scharff, C. & Holy, T. E. 2006. Singing mice, songbirds, and more: models for FOXP2 function and dysfunction in human speech and language. *J Neurosci*, 26, 10376-9.
- Wijchers, P. J. 2005. Forkhead transcription factor in brain development ' Fox hunting in midbrain dopaminergic neurons'. Germany: Universiteit Utrecht.
- Williamson, R. & Chrachri, A. 2004. Cephalopod neural networks. *Neurosignals*, 13, 87-98.
- Young, J. Z. 1961. Learning and discrimination in the octopus. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 36, 32-96.
- Young, J. Z. 1963. The number and sizes of nerve cells in Octopus. *Proc. Zool. Soc. Lond.* , 140 229.
- Young, J. Z. 1971. *The Anatomy of the Central Nervous System of Octopus vulgaris*. Clarendon Press, Oxford.
- Young, J. Z. 1991. The concept of neuroglia. *Ann N Y Acad Sci*, 633, 1-18.
- Young, J. Z. 1995. Multiple matrices in the memory system of Octopus. . In: *Cephalopod Neurobiology* (Ed. by N. Abbott, R. W. e. L. M.), pp. 431-443. Oxford: Oxford University Press.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. N.J.: Prentice Hall.
- Zhang, J., Webb, D. M. & Podlaha, O. 2002. Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: Foxp2 as an example. *Genetics*, 162, 1825-35.

APPENDICI

1 - ANIMALI

Per questo studio sono stati impiegati, in totale, 40 individui appartenenti alla specie *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda). Gli animali di entrambi i sessi (M: 18; F: 22) sono risultati, al sacrificio, di peso compreso tra i 30 e i 2100 g.

Qui di seguito vengono riportati alcuni dati solo per gli individui impiegati in esperimenti di RealTime qPCR e di ibridazione in situ.

IDENTIFICATIVO	PESO (g)	ETÀ	ESPERIMENTO
1	30g	101	Real Time (qRT-PCR)
2	78g	145	Real Time (qRT-PCR)
3	142g	168	Real Time (qRT-PCR)
4	178g	156	Real Time (qRT-PCR)
5	326g	189	Real Time (qRT-PCR)
6	499g	199	Real Time (qRT-PCR)
7	1800g	238	Real Time (qRT-PCR)
8	1970g	252	Real Tme (qRT-PCR)
9	2000g	219	Real Time (qRT-PCR)
10	2100g	298	Real Time (qRT-PCR)
11	158	152	Ibridazione in situ
12	165	140	Ibridazione in situ
13	190	165	Ibridazione in situ
14	350	190	Ibridazione in situ
15	250	179	Ibridazione in situ
16	326	201	Ibridazione in situ

L'età riportata è indicativa e basata su conte del numero di anelli di accrescimento determinabili sul becco superiore degli animali (post mortem) a seguito dell'applicazione del metodo di Hernandez-Lopez et alii (2001). La determinazione dell'età è stata effettuata da altri studenti del Laboratorio del Dr. G. Fiorito (P. Coppola, V. Petrella, I. Sepe) che qui ringrazio per la collaborazione.

Nel corso di questa Tesi di dottorato, la nomenclatura delle parti del sistema nervoso centrale di *O. vulgaris* è stata riferita a quella utilizzata da Young (1971).

2 - PRIMERS

Gli Oligonucleotidi sono stati sintetizzati dalla PRIMM s.r.l. di Milano. Le madri sono state diluite in MilliQ con una concentrazione finale pari a 100 μ M e conservate a -20°C. Le TA (temperature di annealing) sono state calcolate utilizzando una delle funzioni dello spettrofotometro GeneQuant launched at analytica '94 (Pharmacia Biotech) inserendo la sequenza del primer e i dati relativi alle condizioni di reazione utilizzate.

Primers utilizzati per il controllo positivo delle reazioni di PCR e per verificare la presenza di contaminazioni genomiche

PRIMER	SEQUENZA 5'-3'	PRODOTTO (BP)
ACTfw	TCCAGGCTGTGTTGTCTCTG	
ACTrev	CATCGCATTTCATGATGGAG	453 bp

Primers degenerati

Nei primers di questo tipo la TA viene calcolata escludendo l'Inosina (I) dalla composizione e quindi dalla lunghezza dell'oligo. In funzione delle posizioni degenerate sono state calcolate una TM min ed una TM max considerando rispettivamente sia la composizione massima teorica di A,T che di G,C separatamente.

PRIMERS	SEQUENZE 5'-3'	I/tot	DEG	DEG SENZA INOSINA
RPPfw	AGACCGCCITTYACITAYGC	2/20	4	64
WKNfw	TGGAAGAAYGCIGTICGICACAA	3/23	2	128
WKNrev	TTGTGICGIIACIGCRTTCTTCCA			
HKCrev	ACICGIIIRAARCACTTGTG	3/20	4	256
AVWrev	TCRTCIIACVGTCCAIIACIGC	3/20	6	384

Primers impiegati per il sequenziamento

Per le reazioni di sequenza sono stati utilizzati sia primers specifici complementari a porzioni del frammento di PCR di interesse che primers presenti nel vettore di clonaggio, in modo da verificare la direzionalità.

PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
T7seq	AATACGACTCACTATAGGG
M13fw	CGTTGTAAAACGACGGCCAGT
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

Primers impiegati per la RACE

PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
WKNfw	TGGAAGAATGCCGTGCGCCACAA
GeneRacer™ 3'Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
GeneRacer™ 3'Nested Primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
WKNrv	TTGTGGCGCACGGCATTCTTCCA
CKWfw	TGCAAGTGGCCGGGGTG
GeneRacer™ 5'Primer	GCACTGGAGCACGAGGACACTGA
GeneRacer™ 5'Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA

Primers impiegati per lo screening delle librerie di cDNA

Per le reazioni di sequenza sono stati utilizzati i primers specifici utilizzati per la RACE in combinazione con i primers presenti nel vettore di clonaggio.

PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
T7PCR	GCGCGCGTAATACGACTCACTATAG
T3PCR	GCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGG

Primers utilizzati per generare le sonde impiegate negli esperimenti di ibridazione *in situ*

GENE	ID	PRIMER	SEQUENZA 5'-3'	PRODOTTO (BP)
TUBULINA	X15845			550bp
OvFoxP	...	CKWfw2	TGTAAATGGCCGGGGTGT	650bp
		RPPrev	CATAGGTGAAGGGCGGTCT	
OvFoxP	...	493STPfw	TCCACACCTGCCATGAGTT	550bp
		AVW2rev	GCTGTATGGACCGTCGACGAG	

Primers impiegati negli esperimenti di RealTime qPCR

GENE	ID	PRIMER	SEQUENZA 5'-3'	PRODOTTO (BP)
16S	AJ616309.1	16SFW	TTGGGGCTAGAATGAATGGT	112bp
		16SRV	GGTCTTTTCGTCCCTTTAAACA	
β -actina	AB053937	Ac360F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	103bp
		Ac463R	TGGTCTCATGGATACCAGCA	
α -tubulina	X15845	tubRTF	ACTGGTGTCCAACCTGGCTTC	105bp
		TubRTR	TGCTTAACATGCACACAGCA	
OvFoxP	...	493STPfw	TCCACACCTGCCATGAGTT	149bp
		633GPIrw	GATTGGTCCCACACTGCTG	

3 – ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata prelevando la parte terminale del braccio di un animale (3cm, 90mg circa) e mettendola in un'eppendorf da 1,5ml a cui sono stati aggiunti 750µl di una soluzione di digestione contenete Tris-HCl (50mM, Ph 8), EDTA (100 mM), NaCl (100mM), SDS (1%), ProteinasiK (0.5mg/ml).

Il campione nella soluzione digestiva è stato incubato 'overnight' a 55°C, la mattina seguente è stato posto 5 min in un mixer (144 rpm) e processato nel modo seguente:

- aggiunta di NaCl (6M c.a.), mix 5min;
- centrifugazione al 12000g per 10min;
- prelievo e trasferimento dell'interfase (circa 850µl) in una nuova eppendorf;
- precipitazione mediante aggiunta di 750µl di isopropanolo (2h a -20°C e centrifuga a 4°C alla massima velocità per 5min.);
- lavaggio con 1.5ml di ETOH 70% ;

Dopo l' aggiunta 500µl di MilliQ, il DNA è stato sciolto incubando 2h a 37°C in un termomixer a 300rpm. Il controllo della qualità e della quantità del DNA genomico è stato effettuato verificando mediante lettura spettrofotometrica (ND-1000, NanoDrop) sia la concentrazione che il rapporto A260/A280, A230/A280. Il campione è stato inoltre corso su gel (5µl di DNA, Agarosio 0.7%, buffer TBE 0.5x, 3V/cm) per verificarne lo stato di frammentazione.

4 – PCR

Tutte le reazioni di PCR sono state programmate in un termociclatore (DYAD™) seguendo in generale lo schema riportato nella tabella che segue

TEMPERATURA	DURATA	CICLI	STEP
94°C	5min.	1	Pre-denaturazione DNA,
94°C	1min.	30-40	Denaturazione DNA
TM-10°C	40sec.		Appaiamento primers
72°C	1min.		Elongazione
(68°C)	(1min./Kb)		
72°C	10min.	1	Elongazione finale
25°C	10min.	1	
4°C	ON	1	

PCR su DNA Genomico

Le PCR su DNA genomico sono state effettuate in un volume finale di 50µl, utilizzando 200ng di templatò, ogni primer nella concentrazione 1µM, DMSO 5%, TAQ 0.1U/µl.

PCR su ss cDNA

Le PCR su ss cDNA per amplificare geni riferimento sono state effettuate in un volume finale di 50µl, utilizzando 2µl di cDNA (vedi 2.8), ogni primer nella concentrazione 1µM, TAQ 0.2U/µl.

Le PCR su ss cDNA per amplificare frammenti di FoxP sono state effettuate in un volume di 25 μ l, utilizzando 2 μ l di cDNA (vedi 2.8), ogni primer nella concentrazione 2 μ M, TAQ 0.2U/ μ l.

PCR screening su colonie batteriche

Reazioni di PCR sono state utilizzate per identificare i cloni putativamente positivi dopo il clonaggio. Le colonie vengono prese singolarmente con un'ansa sterile la cui estremità viene immersa nella mix di reazione prima dell'inoculo. La mix è preparata in un volume finale di 20 μ l contenenti primers (specifici del vettore o del frammento clonato) nella concentrazione 1 μ M ognuno, TAQ 0.2U/ μ l.

PCR screening delle librerie di cDNA

Le librerie fagiche sono state utilizzate come template per reazioni di PCR utilizzando direttamente diluizioni (1:10 o 1:1 delle aliquote conservate a -80° contenenti i fagi) come template in reazioni del volume di 50 μ l, primers in concentrazione 1 μ M, TAQ 0.2U/ μ l.

5 – CLONAGGIO

Estrazione da gel

I prodotti PCR che presentavano le caratteristiche dei prodotti di reazione attesi sono stati tagliati da gel, estratti utilizzando il QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen), eluiti in MilliQ.

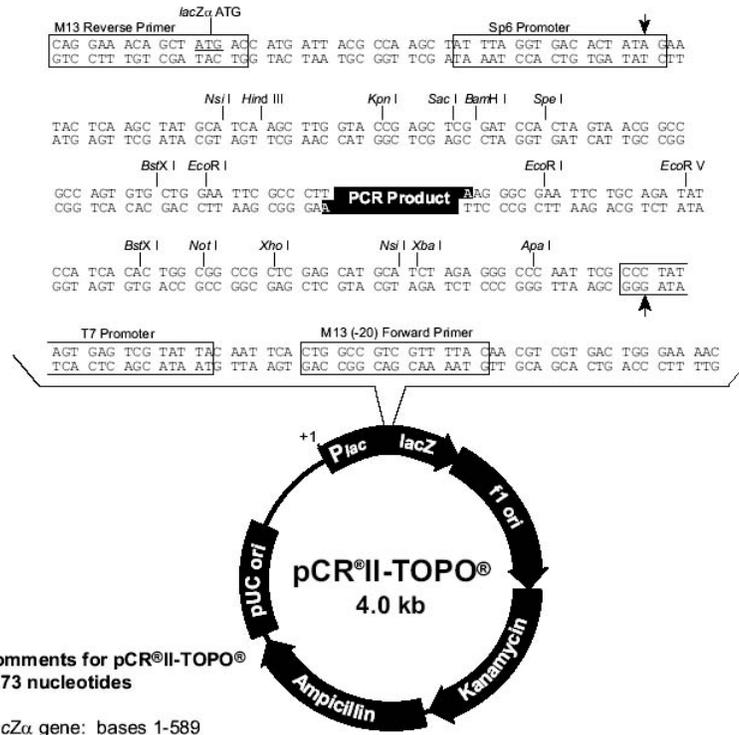
Vettori per il Clonaggio

Per il clonaggio dei frammenti di PCR è stato utilizzato il TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen): i siti promotori SP6 e T7 sono stati utilizzati per il sequenziamento o per la sintesi di sonde di mRNA utilizzando SP6/T7 polimerasi. La mappa del vettore è riportata nella pagina che segue.

La reazione di clonaggio è stata effettuata secondo la procedura prevista dal manuale seguita da una trasformazione batterica mediante elettroporazione. Il frammento clonato è stato utilizzato in una concentrazione 10 volte superiore alla quantità di vettore utilizzato per la reazione.

Map of pCR[®]II-TOPO[®]

pCR[®]II-TOPO[®] Map The map below shows the features of pCR[®]II-TOPO[®] and the sequence surrounding the TOPO[®] Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrows indicate the start of transcription for Sp6 and T7 polymerases. The complete sequence of pCR[®]II-TOPO[®] is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 24).



Trasformazione

La trasformazione delle cellule competenti è stata effettuata per elettroporazione utilizzando elettrocuvette da 0.1cm (BIO-RAD) ed un elettroporatore Gene Pulser[®] (BIO-RAD). Seguendo le istruzioni TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen), dopo l'elettroporazione le cellule sono state sospese per 60 min. a 37 gradi in SOC e poi piastrate sul terreno contenente agar-LB ed ampicillina 0.1µg/ml. Le colonie vengono lasciate a 37°C ON.

L'inoculo delle singole colonie è stato lasciato crescere in agitazione a 37°C ON in LB ed ampicillina 0.1µg/ml in un volume relativo alla quantità di DNA plasmidico da ottenere.

Ceppi Batterici

One Shot[®] TOP10 Electrocompetent *E. coli* (Invitrogen), specifiche per elettroporazione hanno un'efficienza di 10⁸ CFU. La verifica dell'inserzione del frammento è stata effettuata mediante PCR sulle colonie batteriche utilizzando primers specifici del frammento clonato.

Estrazione del DNA plasmidico

Per l'isolamento dei plasmidi dalle colture batteriche sono stati utilizzati due differenti kit, seguendo le procedure indicate nel manuale, a seconda della quantità di plasmide necessario. Entrambi i sistemi utilizzano colonne di tipo *silica-gel* basate sul principio della lisi alcalina.

- QIAprep[®] Miniprep (Qiagen);
- QIAprep[®] Maxiprep (Qiagen).

6 – SEQUENZIAMENTO

Le sequenze sono state realizzate mediante elettroforesi capillare presso il Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica “A. Dohrn” di Napoli. Le reazioni di sequenza, ottenute mediante l’utilizzo della chimica “Big Dye Terminator” (Applied Biosystem), sono state purificate in automazione mediante l’utilizzo di una piattaforma robotica per la gestione di campioni ad alta produttività (Beckam Culter BFX) utilizzando membrane “Millipore Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup kit”. Tali membrane, ad esclusione molecolare, sono in grado di rimuovere i nucleotidi non incorporati e gli altri contaminanti; mediante lo sviluppo di uno specifico protocollo sono state utilizzate in automazione sulla piattaforma robotica. Le reazioni di sequenza così purificate sono in seguito corse su un sequenziatore automatico ad elettroforesi capillare ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystem). I dati ottenuti sono poi stati analizzati utilizzando specifici software Sequencing Analysis (Applied Biosystem) in grado di valutare l’attendibilità di ogni singola base.

7 - RACE

Per cercare di ottenere la sequenza completa del gene sono state effettuate RACE utilizzando il sistema GeneRacer™ (Invitrogen) con SuperScript™ III (Invitrogen). Per la sintesi del sscDNA specifico per la reazione di Race stati utilizzati 5µg di RNA totale estratti dalla SUB di due individui, i due campioni non sono stati mescolati ma trattati in maniera parallela nei diversi passaggi previsti dal manuale e riassunti come segue.

TRATTAMENTO	ENZIMA/REAGENTE	FINALITÀ	RNA I	RNA II
Rimozione dei fosfati al 5'	CIP (fosfatasi alcalina)	Esclusione degli mRNA tronchi dalle reazioni successive	X	X
Estrazione fenolo/cloroformio, precipitazione in ETOH		Eliminazione dell'enzima e dei residui della reazione	X	X
Rimozione del cap al 5'	TAP (pirofosfatasi)	Siti al 5' degli mRNA full-length resi accessibili per la ligasi	X	X
Estrazione fenolo/cloroformio, precipitazione in ETOH		Eliminazione dell'enzima e dei residui della reazione	X	X
Ligasi GeneRacer™ oligo RNA	T4 ligasi	Inserimento di una sequenza nota al 5'	X	X
Estrazione fenolo/cloroformio, precipitazione in ETOH		Eliminazione dell'enzima e dei residui della reazione	X	X
Retrotrascrizione GeneRacer™ Oligo dT	SuperScript™ III	ss cDNA contenete sequenze full-length	X	
Retrotrascrizione con	SuperScript™ III	ss cDNA contenete sequenze full-length conteneti la sequenza caratterizzante del dominio forkhead		X

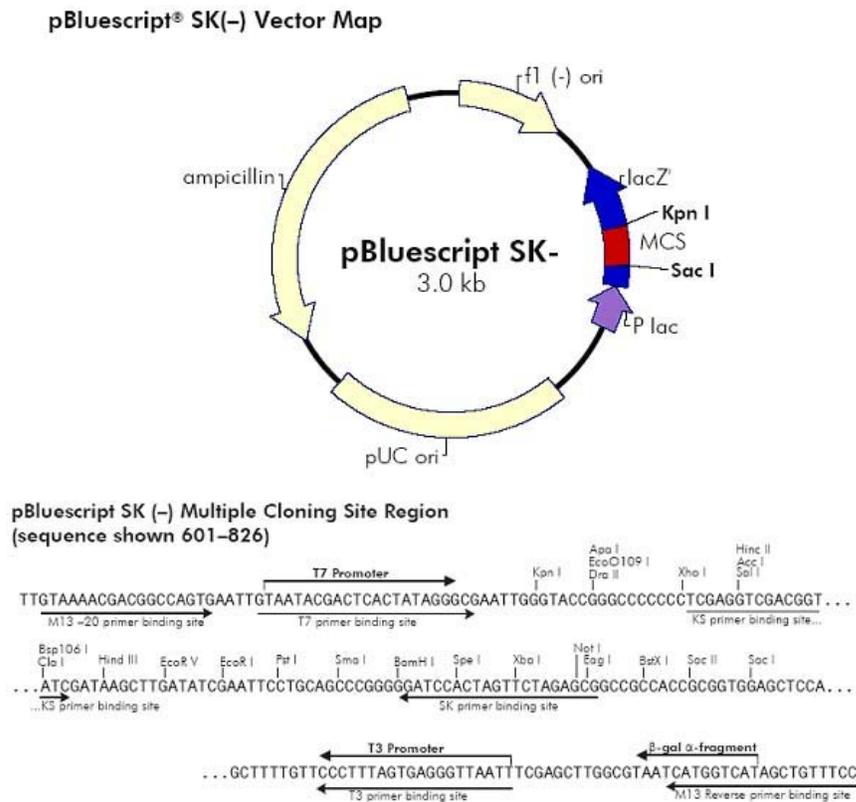
Per la sintesi di ss cDNA è stata utilizzato il kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, in un volume di reazione finale di 20µl è stata utilizzata la seguente mix riportata qui di seguito.

COMPONENTE	QUANTITA'
Rna totale	5µg
Oligo(dT) ₂₀ 50µM	1µl
Random hexamers 50ng/µl	1µl
dNTP mix 10mM	1µl
H ₂ O DEPC	xµl
DENATURAZIONE (65°C per 5min., 4°C per 2min.)	
10X RT Buffer	2µl
25mM MgCl ₂	4µl
0.1M DDT	2µl
RNaseOUT™ (40U/µl)	1µl
SuperScript™ III RT (200U/µl)	1µl

La reazione è stata incubata per 10min. a 25°C, 50min. a 50°C, 5min ad 85°C ed 1min. a 4°C. L'RNA totale utilizzato come template è stato infine eliminato aggiungendo 1µl di RnaseH (2U/µl) ed incubando 20min. a 37°C. Il cDNA è stato conservato a -20°C.

8 – LIBRERIE DI cDNA

In parallelo alla ricostruzione del gene del gene mediante RACE sono stati effettuati PCR screenings su due librerie di cDNA (massa sopraesofagea e lobi ottici). Queste librerie fagiche erano state precedentemente realizzate utilizzando m-RNA estratto dalla massa sopraesofagea e dai lobi ottici di un pool di polpi utilizzando cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA® Synthesis Kit e ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit (Invitrogen). Aliquote di 1ml contenenti i fagi di ogni libreria sono conservate a -80°C. Lo screening è stato possibile in quanto i frammenti sono stati clonati direzionalmente nel vettore pBluescript® incorporato nel fago (vedasi mappa qui sotto).



9 – IBRIDAZIONE IN SITU

Linearizzazione del DNA plasmidico

Le sonde utilizzate nell'ibridazione *in situ* sono state marcate con digossigenina utilizzando il sistema DIG RNA Labeling Kit (ROCHE). Dopo aver verificato mediante sequenziamento l'orientamento del frammento di interesse all'interno del plasmide PCR[®] II-TOPO[®] (Invitrogen) si è proceduto alla sua digestione utilizzando in modo da linearizzarlo rendendo accessibile solo uno dei due promotori per RNA polimerasi. Le due diverse digestioni sono state condotte utilizzando buffers e condizioni specifiche dell'enzima di restrizione, sono state utilizzate 3-5U di enzima per ogni µg di DNA. Dopo l'estrazione da gel il dna linearizzato è stato trattato con proteinasi K, purificato mediante estrazione fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), risospeso in H₂O DEPC e quantizzato mediante lettura spettrofotometrica.

Reagente	Volume
Dna linearizzato	xµl
Tris 1 M pH7,4	20µl
SDS 10x	10µl
Proteinasi K (10µg/µl)	4µ
H ₂ O DEPC	Fino a 200µl di volume finale
30 min alla temperatura di 50°C	

Retrotrascrizione in vitro

il DNA linearizzato è stato utilizzato come stampo in una reazione di trascrizione *in vitro* con la RNA polimerasi che riconosce il promotore posto al 3' del frammento in modo da ottenere un probe antisenso o senso dalle due diverse digestioni dello stesso plasmide. La reazione di trascrizione in vitro è stata preparata in un volume finale di 20µl ed incubata 2h a 37°C, tutti gli enzimi ed i buffers utilizzati nella mix sono riportati qui di seguito

COMPONENTE	QUANTITA'
Buffer 10x	2µl
Mix di NTP marcati con DIG (10x)	2µl
DNA linearizzato	1µg
SP6/T7 RNA polimerasi (20U/µl)	2µl
Inibitore Rnasi (40U/µl)	1µl
H ₂ O DEPC	Xµl

Al termine della reazione sono stati aggiunti 2U di DNaseI RNase-free (ROCHE) per eliminare il template (20min. a 37°C), per inattivare entrambi gli enzimi è stato aggiunto EDTA (0.2M, PH8) portando la temperatura a 65°C per 10min.

Le sonde sono state purificate usando mini Quick Spin RNA Columns (ROCHE) e la loro integrità e concentrazione è stata verificata correndole su un gel di agarosio (2%, TBE 0.5x, 15min, 10V/cm) insieme ad un rna di controllo a concentrazione nota (100ng/µl, ROCHE).

Verifica dell'incorporazione della DIG-UTP mediante saggio enzimatico

La concentrazione finale della sonda è stata calcolata tenendo in considerazione la quantità di digossigenina incorporata rispetto ad un RNA di controllo marcato DIG-UTP della

concentrazione di 100ng/μl. Il saggio enzimatico è stato effettuato utilizzando un anticorpo antidigossigenina coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina che catalizza la reazione colorimetrica. La concentrazione delle ribosonde deriva dall'intensità colorimetrica sviluppato da diluizioni seriali delle ribosonde con l'RNA di controllo. Sono state effettuate 5 diluizioni seriali 1:4 di ciascuna riosonda e del controllo utilizzando un tampone di diluizione contenete H₂O DEPC , SSC 20x e formammide (5:3:2). Su un filtro di nylon Hybond-N⁺ (Amersham), 1μl di ogni diluizione è stato spottato e fissato mediante UV e processato come segue tutto a RT:

- preparazione della membrana in 1x MBT e blocking solution (9:1) per 30min.in agitazione;
- incubazione in agitazione con un diluizione 1:5000 di anticorpo anti-DIG AP 0.75U/μl (Roche) in 1x MBT e blocking solution (9:1) per 60min. in agitazione;
- lavaggio della membrana con 1x MBT, per allontanare l'eccesso di anticorpo per 15 min. in agitazione (per 2 volte);
- preparazione della membrana con il tampone di rilevazione NTM per 5 min. in agitazione;
- incubazione al buio, senza agitazione con una soluzione di rilevazione (10ml NTM, 35μl di BCIP 50mg/ml (Roche) e 35μlNBT100mg/ml (Roche)).

Al termine dell'incubazione (10min. max) la membrana è stata lavata in acqua corrente e la colorazione delle diverse diluizioni e delle diverse sonde è stata confrontata per la quantizzazione in relazione all'RNA di controllo a concentrazione nota.

Trattamento ed ibridazione delle sezioni

I vetrini contenenti le sezioni sono stati scongelati e asciugati almeno un'ora prima di procedere con la reazione:

- fissaggio in 4%PFA in PBS per 20min.RT;
- lavaggio in PBT per 5min. RT (3 volte);
- trattamento con proteinasi K pr 5-10min. RT,
- neutralizzazione con glicina 2mg/ml in PBT fresca per 6min. RT;
- lavaggio in PBT per 5min. RT (2 volte);
- fissaggio in 4%PFA/0.2% glutaraldeide/PBT per 15min. RT;
- lavaggio in PBT per 5min. RT (3 volte);
- lavaggio in 2x SSC per 5min. RT (2 volte);
- lavaggio con tris-glicina per 30min. RT;
- Preibridazione nella soluzione preriscaldata per 60min. a 65°C.

Al termine della preibridazione i vetrini vengono ricoperti con 150µl di soluzione di preibridazione contenete 500ng di sonda. I vetrini, ricoperti con il parafilm per evitare l'evaporazione della soluzione, sono stati incubati in camera umida a 65°C ON.

Lavaggi di post-ibridazione ed immunoreazione

Dopo aver rimosso il parafilm in 2x SSC a RT (2 volte), si è proceduto ad effetturi i lavaggi per rimuovere l'eccesso di sonda non ibridata e procedere con il saggio enzimatico:

- lavaggio in 2x SSC/50% formammide per 20min. RT (2 volte);

- raffreddamento per 10min. RT;
- trattamento in NTE per 10min. a 37°C (2volte);
- trattamento con RNAsiA 20µg/ml in NTE per 30min. a 37°C;
- lavaggio in NTE per 5min. RT (3 volte);
- lavaggio in 2x SSC/50% formammide per 30 min. a 65°C;
- lavaggio in 2x SSC per 5min. RT (2 volte);
- trattamento in 1x Acido Maleico per 15min. RT (2 volte);
- saturazione con 2% blocking solution/10% siero per 60min. RT;

L'immunoreazione è stata condotta utilizzando una diluizione 1:1000 (in blocking solution) dell'anticorpo specifico Anti DIG AP 0.75U/µl (Roche). Ogni vetrino è stato ricoperto con 150µl della soluzione contenente l'anticorpo, ricoperto con parafilm e lasciato in camera umida a 4°C ON.

Rivelazione colorimetrica

Dopo aver proceduto alla rimozione dell'anticorpo utilizzando una soluzione 1x Acido Maleico per 15 min. RT (3 volte), si è proceduto alla rivelazione colorimetrica:

- trattamento in NTM per 10 min. a RT (2 volte);
- incubazione al buio, senza agitazione con una soluzione di rilevazione (10ml NTM, 35µl di BCIP 50mg/ml (Roche) e 35µlNBT100mg/ml (Roche) monitorando il segnale a RT;
- blocco della colorazione utilizzando 1mM EDTA in PBS;

dopo aver stoppato la reazione i vetrini sono stati bloccati in glicerolo. Per rendere visibili le strutture cellulari è stata utilizzata una colorazione con FAST RED (Roche) secondo le istruzioni della casa produttrice.

10 – SINTESI DEL SS cDNA

Per la sintesi di ss cDNA è stata utilizzato il kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, in un volume di reazione finale di 20µl è stata utilizzata la seguente mix riportata qui di seguito:

COMPONENTE	QUANTITA'
Rna totale	5µg
Oligo(dT) ₂₀ 50µM	1µl
Random hexamers 50ng/µl	1µl
dNTP mix 10mM	1µl
H ₂ O DEPC	xµl
DENATURAZIONE (65°C per 5min., 4°C per 2min.)	
10X RT Buffer	2µl
25mM MgCl ₂	4µl
0.1M DDT	2µl
RNaseOUT™ (40U/µl)	1µl
SuperScript™ III RT (200U/µl)	1µl

La reazione è stata incubata per 10min. a 25°C, 50min. a 50°C, 5min ad 85°C ed 1min a 4°C. L'RNA totale utilizzato come template è stato infine eliminato aggiungendo 1µl di RNaseH (2U/µl) ed incubando 20min. a 37°C. Il cDNA è stato conservato a -20°C.

11 – REAGENTI E SOLUZIONI

Tutti i reagenti utilizzati sono della ditta Baker. Tutte le soluzioni sono state preparate in milliQ (laddove non indicato diversamente) ed opportunamente sterilizzate e portate PH come indicato dal Sambrook *et al.* (1998).

Enzimi di restrizione

Gli Enzimi di Restrizione (comprensivi di bufer) sono stati forniti dalla New England Biolabs ed utilizzati secondo le istruzioni riportate.

Enzimi di modificazione

- DNA polimerasi: TAQ (Roche), PFU (Stratagene);
- DNase 1 RNase free (Invitogen o Roche);
- Rnase A Dnase free (Roche);
- T7/SP6 RNA polimerasi (Roche).

Gli enzimi sono stati utilizzati secondo le istruzioni dei produttori.

MARKER DI PESO MOLECOLARE

- Lambda DNA/HIND III Marker 2(Promega);
- Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas);
- Gene Ruler 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

TAMPONE DI CORSA ELETTROFORETICA (10x TBE, 1L)

Tris	108g
Acido borico	55g
EDTA 0.5M pH8.0	40ml
H ₂ O bidistillata	Fino a 1000ml

La soluzione è stata sterilizzata e diluita 1:20 per essere utilizzare come tampone nella corsa elettroforetica

TERRENI DI COLTURA

LB liquido (1lt)

Triptone	10g
Estratto di lievito	5g
NaCl	10g
H ₂ O bidistillata	Fino a 1000ml

LB è stato autoclavato prima dell'utilizzo. Per preparare le piastre batteriche prima della sterilizzazione è stato aggiunto agar (15g/1lt). Per terreni selettivi è stato aggiunta ampicillina per una concentrazione finale di 100µg/ml.

SOB (1lt)

Triptone	20g
Estratto di lievito	5g
NaCl	0.5g
H ₂ O bidistillata	Fino a 1000ml

SOC (1lt)

SOB	50ml
Glucosio 20%	1 ml
MgSO ₄ 1M	0.5 ml
MgCl ₂ 1M	0.5 ml
H ₂ O bidistillata	948ml

H₂O DEPC (1lt)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
DEPC	1ml	0.1%
H ₂ O bidistillata	999ml	

La soluzione è stata agitata e lasciata sotto cappa ON prima di essere autoclavata.

4% PFA-DEPC(1lt)

PFA	40mg
1x PBS DEPC	Fino a 1000ml

La PFA è stata aggiunta ad 800ml di 1x PBS DEPC e sciolta su uno stir a 60°C. Una volta sciolta è stata portata al volume finale aggiungendo 1x PBS DEPC.

Tampone Tris-Glicina (2lt)

Tris base	24.2g
Glicina	15g
H ₂ O DEPC	Fino a 2000ml

Il tris non è compatibile con il DEPC a meno che quest'ultimo non sia stato inattivato mediante autoclavaggio.

4% PFA-DEPC(1lt)

PFA	40mg
1x PBS DEPC	Fino a 1000ml

5x Acido Maleico-NaCl

Acido Maleico	58g
NaCl	36g
H ₂ O	Fino a 1000ml

La soluzione è stata portata a pH con 10M NaOH, filtrata ed autoclavata.

10% blocking solution(500ml)

BM Blocking Reagent (Roche)	50g
5x Acido Maleico	100ml
H ₂ O distillata	Fino a 500ml

Il blocking reagent è stato sciolto a caldo nell'acido maleico a 60°C, raggiunto il volume con H₂O, la soluzione è stata autoclavata.

SOLUZIONI PER LA REAZIONE DI IBRIDAZIONE *IN SITU* E L'IMMUNORIVELAZIONE

Soluzione per il trattamento con la proteinasi K (300ml)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
1M trisHCl pH7.5	6ml	20mM
0.5M EDTA	0.6ml	1mM
Proteinasi K 10mg/μl	300μl	10μg/ml
H ₂ O DEPC	293.4ml	

Miscela di pre-ibridazione (200ml)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
100% formammide	100ml	50%
20x SSC	50ml	5x
100x Denhardtts	10ml	5x
Salmon testis 10mg/ml	2ml	100µg/ml
tRNA 50mg/ml	0.4ml	100µg/ml
H ₂ O DEPC	48ml	

0.5x SSC-20% formammide (1l)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
100% formammide	200ml	20%
20x SSC	25ml	0.5x
H ₂ O bidistillata	774ml	

NTE (1lt)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
5M NaCl	100ml	0.5M
1M Tris pH7.0	10ml	10mM
0.5M EDTA	10ml	5mM
H ₂ O bidistillata	880ml	

2% blocking solution(200ml)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
10% blocking solution	40ml	2%
5x Acido Maleico	40ml	100mM
H ₂ O bidistillata	120ml	

NTM(1lt)

Soluzione stock	Volume	Concentrazione finale
5M NaCl	20ml	100mM
Tris HCl 1M pH9.5	100ml	100mM
MgCl ₂ 1M	50ml	50mM
H ₂ O bidistillata	830ml	

Ringraziamenti

Numerose persone hanno dato un valido contributo alla realizzazione di questa Tesi di Dottorato e tutte meritano di essere debitamente ringraziate. Non me ne avranno, spero, quelle che per fretta o sbadataggine dimenticherò, ma so che il Karma le ringrazierà per me.

Citando in ordine sparso devo tutta la mia gratitudine al Dr. **Graziano Fiorito**, ideatore del progetto per avermi offerto questa opportunità e a tutti “i polpi” del suo laboratorio. Un particolare ringraziamento va alla **Dr. Annamaria Rosica** per la realizzazione e l’ottimizzazione degli esperimenti di ibridazione *in situ*.

Non posso dimenticare i componenti del laboratorio dove ho svolto la maggior parte del lavoro, il “Servizio di Biologia Molecolare” della Stazione Zoologica “A. Dohrn” di Napoli, per avermi accolto con pazienza, sopportato, tollerato il mio caffè, nutrito (nel vero senso della parola), insegnato a lavorare e, alla fine, anche voluto bene (forse)! In particolare alla Dott. **Elvira Mauriello**, infaticabile produttrice di sequenze, sempre pronta ad offrirmi il suo aiuto e conforto senza remore; a **Raimondo Pannone**, paziente maestro di lavoro e insostituibile punto di riferimento i cui consigli non sono mai venuti a mancare; a **Fabrizio Campili** per tutti gli oligonucleotidi sintetizzati; a **Raffaele Sepe** per le soluzioni, i mezzi di coltura e le cellule competenti. Infine devo ringraziare il **Dr. Elio Biffali**, per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo laboratorio, per avermi messo in condizione di farlo al meglio credendo in me, per la sua disponibilità a discutere ed i suoi immancabili tentativi di farmi “cambiare idea”. Un ringraziamento particolare va al **Dr. Marco Borra** che mi ha accompagnato (nel vero senso della parola) in tutte le fasi della mia avventura cosentina ed ha consentito la comunicazione tra i laboratori a cui afferivo. Infine un ringraziamento a tutte le persone del laboratorio di “Biochimica e Biologia Molecolare” che, più o meno nell’ombra, mi hanno sostenuto sia psicologicamente che lavorativamente in questa impresa.