

Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

SETTORE DISCIPLINARE BIO/09

CICLO XIX

Sviluppo larvale e prime fasi di metamorfosi dell'ascidia *Ciona intestinalis*: espressione spaziale e temporale dell'ossido nitrico sintasi, localizzazione e ruolo dell'ossido nitrico

Dott.ssa Stefania Comes

Tutor

Ch.ma Dott.ssa Anna Palumbo

Coordinatore

Ch.mo Prof. Bruno Tota

Anno Accademico 2005 – 2006

INDICE

INTRODUZIONE	1
Biosintesi, ruolo biologico e vie di trasduzione dell'ossido nitrico	1
Il sistema sperimentale: <i>Ciona intestinalis</i>.....	10
Lo sviluppo embrionale	13
Lo sviluppo larvale.....	15
Il processo di metamorfosi.....	20
Scopo della ricerca	25
MATERIALI E METODI.....	26
Animali.....	26
Espressione temporale del gene NOS e Arginasi	26
NOS e Arginasi	26
Estrazione dell' RNA totale dalle uova, dagli stadi larvali ed early juveniles di <i>Ciona intestinalis</i>	27
Analisi e quantizzazione dell'RNA totale.....	28
Sintesi del cDNA.....	29
Scelta e sintesi degli oligonucleotidi specifici per la NOS, l'Arginasi e i possibili geni di riferimento	30
Reazioni di Real Time PCR.....	32
Calcolo dell'efficienza delle reazioni di Real time PCR.....	34
Analisi dei dati di Real Time	35
Espressione spaziale della NOS	35
Estrazione e quantizzazione dell' mRNA da larve di <i>Ciona intestinalis</i>	35
Sintesi del cDNA.....	37
Sintesi degli oligonucleotidi	38
Amplificazione mediante PCR.....	38
Analisi della lunghezza dei frammento di DNA della NOS ottenuto per PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio	39
Eluizione da gel.....	40
Trasformazione e clonaggio della molecola ricombinante.....	41
Preparazione del DNA plasmidico in piccola scala	43
Digestione con enzimi di restrizione e sequenziamento del DNA plasmidico.....	44
Preparazione delle ribosonde: trascrizione in vitro	45
Quantizzazione delle ribosonde.....	48
Ibridazione <i>in situ</i> “whole mount” per gli stadi larvali.....	50
Ibridazione <i>in situ</i> per lo stadio early juvenile.....	53

Rivelazione e localizzazione dell'NO endogeno in diversi stadi di sviluppo larvale e nei primi stadi di metamorfosi.....	54
Variazione dei livelli di NO in larve e studio dell'effetto sulla metamorfosi.....	55
Diminuzione della produzione di NO	55
Aumento dei livelli di NO	56
Inibizione della guanilato ciclasi e studio dell'effetto sulla metamorfosi	57
Saggio di attività caspasi-3	58
RISULTATI.....	60
Espressione temporale del gene NOS e Arginasi durante lo sviluppo larvale e le prime fasi di metamorfosi	60
Espressione spaziale del gene NOS durante lo sviluppo larvale e i primi stadi di metamorfosi.....	66
Rivelazione e localizzazione dell'NO in larve ed early juveniles.....	70
Studio dell'effetto prodotto sulla metamorfosi in seguito a variazione dei livelli di NO	75
Coinvolgimento del cGMP nel processo di ritrazione della coda.....	81
La caspasi-3 è un possibile bersaglio molecolare dell'NO durante il processo di ritrazione della coda	83
DISCUSSIONE.....	87
TABELLE.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	101
PUBBLICAZIONI	115
COMUNICAZIONI A CONVEGNI.....	115

INTRODUZIONE

Biosintesi, ruolo biologico e vie di trasduzione dell'ossido nitrico

L'ossido nitrico (NO) è una specie radicalica altamente reattiva, è un gas che si genera nei sistemi biologici ad opera dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) che catalizza la reazione di ossigenazione della L-arginina in L-citrullina con formazione di NO attraverso l'intermedio N^G-idrossi-L-arginina (Knowles e Moncada, 1994). La reazione, riportata in figura 1, consiste di due stadi di mono-ossigenazione: nel primo stadio la L-arginina viene convertita nell'intermedio stabile N^G-idrossi-L-arginina, nel secondo stadio quest'ultima viene convertita in L-citrullina e NO.

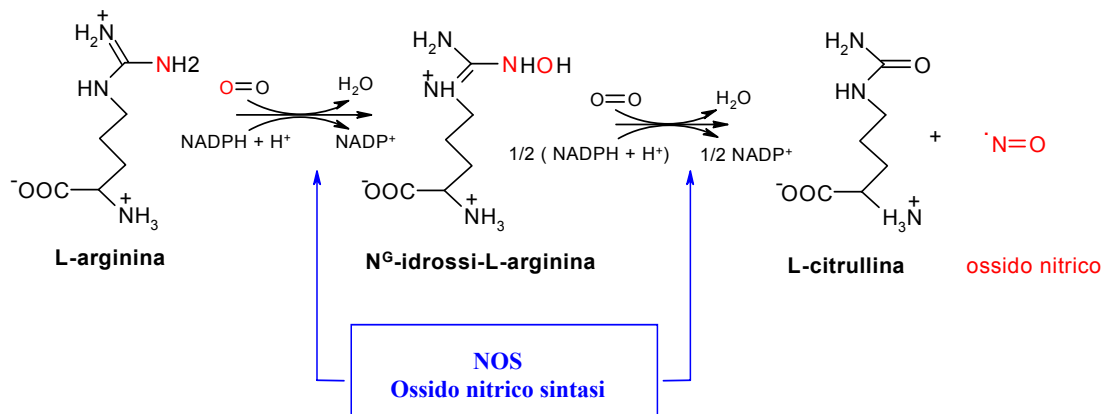


Figura 1. Biosintesi dell'ossido nitrico.

Numerosi studi di caratterizzazione e di clonaggio della NOS hanno rivelato che questo enzima esiste nei mammiferi in tre principali isoforme, che hanno diversa localizzazione e sono il prodotto di 3 differenti geni. Due isoforme sono costitutive, la neuronale (nNOS

o NOS di tipo I) (Bredt e Snyder, 1992) e la endoteliale (eNOS o NOS di tipo III) (Moncada et al., 1991), mentre la terza, la macrofagica è inducibile (iNOS o NOS di tipo II) (Furchgott, 1990; Stuehr e Griffith, 1992).

Ciascuna isoforma è attiva come omodimero e ciascuna subunità (130-160 kDa) dell'omodimero della NOS può essere suddivisa da un punto di vista funzionale e strutturale in due domini principali: un dominio C-terminale reduttasico e un dominio N-terminale ossigenasico (figura 2). Il dominio C-terminale reduttasico contiene i siti di legame per i cofattori NADPH, FAD ed FMN e presenta una buona omologia tra le tre isoforme ed è inoltre omologo alla citocromo P450 reduttasi NADPH dipendente. Il dominio N-terminale ossigenasico lega ad un residuo di cisteina un gruppo prostetico ferro protoporfirina IX (eme) e rappresenta il sito di legame per il substrato L-arginina e per il cofattore (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH₄), andando a costituire il centro catalitico dell'enzima (Ghosh e Salerno, 2003). Tuttavia la regione N-terminale è quella che presenta minore omologia tra le tre isoforme.

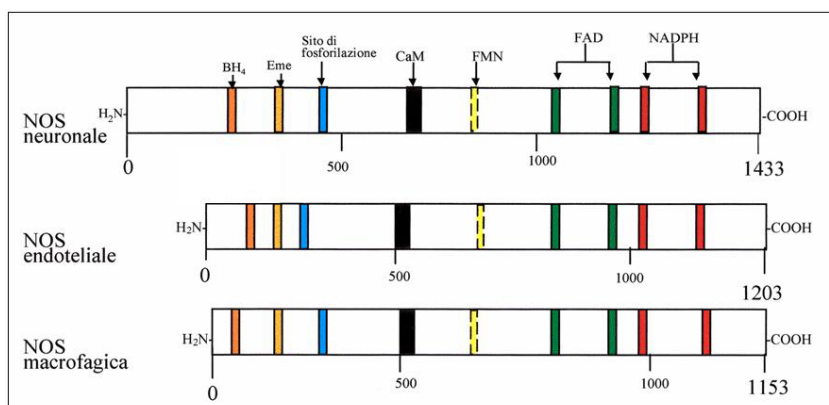


Figura 2. Le tre isoforme della NOS nell'uomo (Da: Knowles e Moncada, 1994).

Tutte e tre le isoforme hanno nella regione centrale un sito di legame per la calmodulina (CaM), che è indispensabile per l'allineamento dei due domini e quindi per il trasferimento di elettroni dall'FMN della regione C-terminale, al gruppo eme della

regione N-terminale (figura 3). In assenza di calcio e CaM, i due domini non sono allineati per cui la NOS non è attiva (Griffith e Stuehr, 1995). L'isoforma neuronale ed endoteliale sono costitutive e la loro attività è regolata dall'aumento della concentrazione intracellulare di ioni calcio e quindi dalla formazione del complesso calcio-calmodulina che, in combinazione con BH_4 , si lega all'enzima per iniziare la produzione di NO. La NOS inducibile è invece indipendente da calcio e CaM poiché tenendo legata la CaM come subunità costitutiva è già attiva alle basse concentrazioni di calcio presenti *in vivo* ed ha i due domini, reduttasico ed ossigenasico sempre allineati. La NOS inducibile viene rapidamente espressa in risposta ad endotossine (lipopolisaccaridi) e citochine proinfiammatorie.

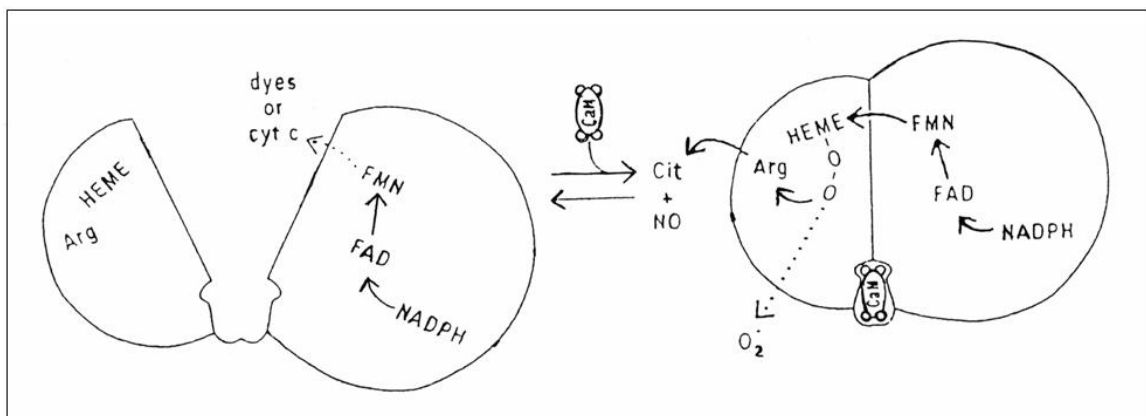


Figura 3. Allineamento dei due domini ossigenasico e reduttasico.

Nei mammiferi l'NO è implicato come mediatore in una varietà di funzioni biologiche tra cui la regolazione della pressione sanguigna, la neurotrasmissione, l'aggregazione piastrinica e l'eliminazione degli agenti patogeni ad opera dei macrofagi (Moncada et al., 1991).

Per quanto concerne le vie di trasduzione del segnale dell' NO queste possono essere cGMP dipendenti o cGMP indipendenti.

La via di trasduzione cGMP dipendente ha origine dall'attivazione della guanilato ciclastasi, l'enzima responsabile della biosintesi del cGMP a partire dal GTP. L'NO si lega al ferro del gruppo prostetico eme dell'enzima generando una variazione conformazionale che attiva la guanilato ciclastasi e conduce alla biosintesi del cGMP (Snyder e Brecht, 1992). Il secondo messaggero prodotto è in grado poi di regolare una serie di proteine chinasi cGMP dipendenti, canali ionici e cGMP fosfodiesterasi (figura4).

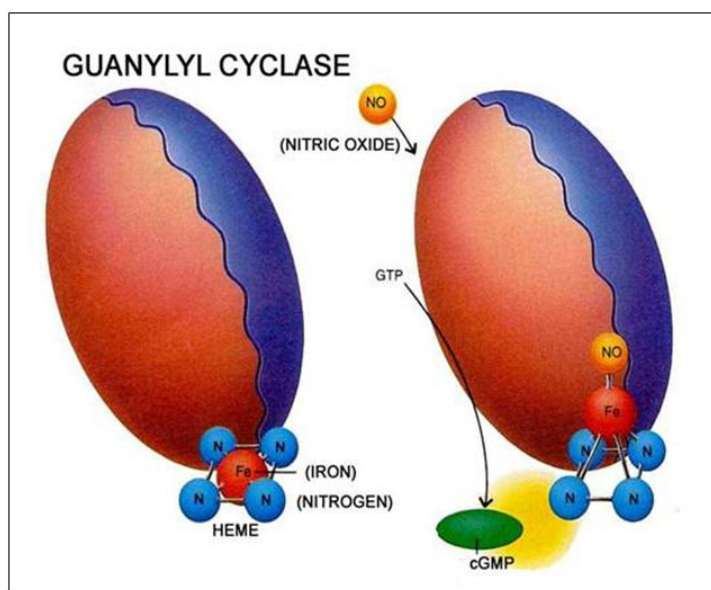


Figura 4. Attivazione della guanilato ciclastasi (Da: Snyder e Brecht, 1992).

Tuttavia negli ultimi anni una grossa attenzione è stata rivolta ai meccanismi di trasduzione del segnale cGMP indipendenti. Infatti l'ossido nitrico è una specie radicalica altamente reattiva con un tempo di semivita di pochi secondi ed è in grado di reagire con specie ossigenate reattive quali l'acqua ossigenata (H_2O_2), l'ossigeno (O_2), lo ione superossido ($O_2^{\cdot-}$) per generare specie azotate reattive dotate di proprietà nitranti e/o nitrosanti, quali il biossido di azoto (N_2O), il nitrito (NO_2^-) e il perossinitrito ($ONOO^-$).

Tali specie diffondono rapidamente dal sito in cui si generano per interagire con vari costituenti cellulari tra cui gli acidi nucleici, i lipidi polinsaturi e le proteine (Eiserich et al., 1998). Per quanto riguarda le proteine, le specie azotate reattive sono in grado di nitrosilare i residui di cisteina generando la S-nitrosocisteina o nitrare l'anello fenolico della tirosina generando residui di 3-nitrotirosina.

E' stato dimostrato che la nitrificazione può alterare la struttura, la conformazione, l'attività catalitica e/o la suscettibilità alla digestione proteolitica delle proteine. Livelli elevati di proteine nitate sono stati evidenziati in diverse condizioni patologiche (Ehsan et al., 2002; Goto et al., 1999) ma recentemente, la nitrificazione delle proteine è stata riportata essere coinvolta anche in normali processi biologici, come la trasduzione del segnale (Greenacre et al., 2001), il differenziamento cellulare (Cappelletti et al., 2003), e lo sviluppo embrionale (Giannopoulou et al., 2002). La S-nitrosilazione è un processo reversibile, è una modificazione post traduzionale coinvolta nella regolazione di numerose proteine bersaglio, tra cui enzimi metabolici, canali ionici, proteine segnale, proteine strutturali e fattori di trascrizione (Jaffrey et al., 2001). In alcuni casi la S-nitrosilazione ne determina l'attivazione come per la molecola segnale H-Ras, in altri è responsabile dell'inattivazione come per gli enzimi ornitina decarbossilasi, glicogeno fosforilasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e l'enzima proteolitico coinvolto nei processi apoptotici caspasi-3.

Alla fine degli anni 80, la scoperta dell'NO come nuovo messaggero chimico in grado di regolare una vasta gamma di funzioni biologiche nei mammiferi ha stimolato un'enorme mole di ricerche volte ad investigare i possibili meccanismi molecolari che regolano la biosintesi e la vasta gamma di proprietà biologiche che questa molecola poteva esercitare in altri organismi. In breve tempo un enorme numero di pubblicazioni è apparso

sull'argomento ed hanno evidenziato che questa molecola pleiotropica è largamente diffusa lungo l'intera scala filogenetica.

In particolare, notevole attenzione è stata rivolta agli invertebrati e numerosi sono i lavori apparsi in letteratura, non solo sulla caratterizzazione dell'enzima ma anche sul ruolo biologico svolto dall'NO.

Recentemente la NOS è stata clonata da alcuni invertebrati, quali gli artropodi *Drosophila melanogaster* (Regulsky e Tully, 1995), *Rhodnius prolixus* (Yuda et al., 1996), *Manduca sexta* (Nighorn et al., 1998), *Bombyx mori* (Imamura et al., 2002) e il granchio *Decapodina lateralis* (Kim et al., 2004), la zanzara *Anopheles stephensi* (Luckhart et al., 1999; 2001), i molluschi *Lymnaea stagnalis* (Korneev et al., 1999), *Sepia officinalis* (Scheinker et al., 2005).

Negli invertebrati la NOS è stata identificata in una varietà di tessuti come nel sistema nervoso (Nighorn et al., 1998; Gelperin, 1994; Moroz et al., 1996; Palumbo et al., 1999), negli organi escretori (Broderick et al., 2003; Davies et al., 1997), nelle ghiandole salivari (Yuda et al., 1996), negli emociti (Radomsky et al., 1991) e negli immunociti (Franchini et al., 1995).

Molte delle informazioni sulla presenza della NOS negli invertebrati sono state ottenute mediante l'utilizzo di saggi istochimici NADPH diaforasici, una tecnica largamente usata per studiare la distribuzione della NOS nel cervello dei mammiferi (Hope et al., 1991; Dawson et al., 1991), mediante approcci che prevedevano l'uso per immunostochimica di anticorpi contro la NOS dei mammiferi oppure mediante l'utilizzo di saggi enzimatici, per misurare la produzione di citrullina radioattiva a partire dal substrato radioattivo arginina.

Da questi studi è emerso che le NOS di questi invertebrati sono simili alle NOS dei mammiferi e presentano i siti di riconoscimento per i cofattori eme, BH₄, CaM, FMN,

FAD e NADPH. L'unica eccezione è rappresentata dalla NOS identificata in *Helix pomatia* (Huang et al., 1997). Questo enzima non contiene i siti di legame per NADPH, FAD, arginina e CaM ma è simile all'enzima GTPasi trovato nei batteri, negli insetti, nei mammiferi e nelle piante (Zemojtel et al., 2004).

A parte l'elevato e diversificato numero di funzioni svolte dall'NO nei diversi invertebrati terrestri e di acqua dolce (*Hydra vulgaris* Colasanti et al., 1997, *Lymnaea stagnalis* Korneev et al., 2005, nell'artropode *Rhodnius prolixus* Ribeiro et al., 1993, *Drosophila melanogaster* Gibbs e Truman, 1998; Kuzin et al., 1996; Kuzin et al., 2000; Wingrove e O'Farrel, 1999; Nappi et al., 2000; Dow et al., 1994)), in via di espansione è il numero di conoscenze delle funzioni svolte dall' NO negli invertebrati marini, che oggi rappresentano un interessante nuovo campo di ricerca per l'NO.

Come riportato in tabella 1 molteplici sono le funzioni biologiche svolte dall' NO negli invertebrati marini. E' stato dimostrato che l'NO è coinvolto in molti processi biologici quali la risposta allo stress ambientale nel porifero *Axinella polypoides* (Giovine et al., 2001), la difesa nello cnidario *Aiptasia diaphana* (Salleo et al., 1996) e nel mollusco *Mytilus edulis* (Franchini et al., 1995), la risposta al cibo nei molluschi *Aplysia californica* (Katzoff et al., 2002) e *Pleurobranchaea californica* (Moroz , 2000), l'apprendimento visivo e tattile nel mollusco *Octopus vulgaris* (Robertson et al., 1996), il nuoto nella medusa *Aglantha digitale* (Moroz et al., 2004), l'aggregazione degli emociti nell' artropode *Limulus polyphemus* (Radomski et al., 1991), il sistema di difesa, il comportamento manipolativo durante la fase di predazione, la regolazione della pressione sanguigna e l'attività delle statocisti nel mollusco *Sepia officinalis* (Fiore et al., 2004; Palumbo et al., 2000; Halm et al., 2003; Schipp e Gebauer, 1999; Tu e Buldemann, 2000).

Phylum	Specie	Ruolo biologico	Riferimento
Poriferi	<i>Axinella polypoides</i>	Stress ambientale	Giovine et al., 2001
	<i>Petrosia ficiformis</i>		
Cnidari	<i>Aglanta digitale</i>	Nuoto	Moroz et al., 2004 Salleo et al., 1996
	<i>Aiptasia diaphana</i>	Difesa	
Artropodi	<i>Limulus polyphemus</i>	Aggregazione emociti	Radomski et al., 1991
Molluschi	<i>Aplysia californica</i>	Risposta al cibo	Moroz, 2000
	<i>Pleurobranchaea californica</i>		
	<i>Aplysia californica</i>	Memoria	Katzoff et al., 2002
	<i>Clione limacina</i>	Risposta al cibo	Moroz, 2000
		Locomozione	
	<i>Ilyanassa obsoleta</i>	Metamorfosi	Leise et al., 2004
	<i>Ruditapes decussatus</i>	Difesa	Tafalla et al., 2003
	<i>Mytilus edulis</i>	Difesa	Stefanio e Ottaviani, 2002
			Franchini et al., 1995
			Ottaviani et al., 1993
	<i>Euprymna scolopes</i>	Simbiosi	Davidson et al., 2004
	<i>Octopus vulgaris</i>	Apprendimento	Robertson et al., 1996
	<i>Sepia officinalis</i>	Difesa	Fiore et al., 2004
			Palumbo et al., 2000
Echinodermi		Comportamento manipolativo	Halm et al., 2003
		Regolazione pressione sanguigna	Schipp e Gebauer, 1999
		Attività statocisti	Tu e Buldemann, 2000
	<i>Lytechinus pictus</i>	Fecondazione	Leckie et al., 2003
	<i>Psammechinus miliaris</i>		
Cordati	<i>Lytechinus pictus</i>	Metamorfosi	Bishop e Brandhorst, 2001
	<i>Ciona intestinalis</i>	Fecondazione	Grumetto et al., 1997
	<i>Boltenia villosa</i>	Metamorfosi	Bishop et al., 2001
	<i>Cnemidocarpa finmarkiensis</i>		

Tabella 1. Ruoli svolti dall'NO in diversi invertebrati marini.

Inoltre, di notevole interesse è il ruolo svolto dall'NO in diversi invertebrati marini che presentano un ciclo vitale bifasico (Bishop e Brandhorst, 2003), caratterizzato da uno stadio larvale planctonico e da uno stadio adulto bentonico, quali i molluschi *Ilyanassa obsoleta* (Leise, 2004) e *Crepidula fornicata* (Pechenik et al., 2002), l'echinoderma *Lytechinus pictus* (Bishop e Brandhorst 2001) e i cordati *Boltenia villosa* e *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Bishop et al., 2001). In tutti questi organismi l'NO si comporta da inibitore endogeno della metamorfosi. Infatti, un considerevole aumento della frequenza di metamorfosi è stato osservato in larve trattate con inibitori specifici della NOS.

In *Ciona intestinalis*, un altro cordato dotato di ciclo vitale bifasico, è stato dimostrato che l'NO agisce durante la fecondazione attivando i canali ionici ionici negli ovociti maturi (Grumetto, 1997).

Il sistema sperimentale: *Ciona intestinalis*

Il sistema modello utilizzato in questo studio è l'ascidia *Ciona intestinalis*, appartenente al phylum dei Cordati, subphylum Urocordati. Allo stesso phylum afferiscono gli altri due subphyla dei Cefalocordati e Vertebrati. Tutti questi organismi, pur molto diversi fra loro, sono accomunati da alcune caratteristiche basilari. Sono dotati, durante la vita embrionale e/o adulta, di una struttura assiale di sostegno, la notocorda, fiancheggiata da muscoli segmentali, di un tubo neurale cavo, dorsale ad essa, e di un tubo digerente ventrale.

Le caratteristiche distintive dei Cordati sono evidenti in *Ciona* soltanto nello stadio larvale, da cui l'adulto si origina per metamorfosi. La larva possiede, lungo la coda, la notocorda e un tubo neurale dorsale cavo, quest'ultimo si ridurrà nell'adulto in un singolo ganglio. L'anatomia della forma adulta, invece, poco giustifica la collocazione di questa ascidia nella scala evolutiva dei Cordati, l'unica caratteristica distintiva dei cordati ancora evidente nell'individuo adulto è la presenza di fessure branchiali faringee.

L'animale adulto è sessile e ubiquitario e vive solitamente in acque marine poco profonde attaccato, mediante un peduncolo fibroso, a diversi substrati tra cui rocce, corde, chiglie di barche e sabbia ed ha un corpo di forma cilindrica rivestito da un involucro contenente cellulosa, la tunica, da cui prende il nome di tunicato. All'esterno dell'organismo si notano due sifoni: un sifone inalante attraverso cui l'acqua, contenente le particelle alimentari, è convogliata verso l'estesa camera branchiale filtrante, ed un sifone esalante attraverso cui l'acqua, carica di materiali di rifiuto e di gameti, è eliminata verso l'esterno. *Ciona intestinalis* è una ascidia solitaria ed ermafrodita insufficiente. Le cellule germinali vengono trasportate lungo i dotti nella cavità atriale e poi espulse attraverso il sifone esalante nell'acqua circostante dove avviene la fecondazione.

In figura 5 sono rappresentate rispettivamente l'individuo adulto e i suoi organi e tessuti.



Figura 5. Foto dell'individuo adulto (a sinistra) e rappresentazione schematica dei suoi organi e tessuti (a destra).

Le ascidie rappresentano, da lungo tempo e per diversi motivi, un valido sistema modello per studi di sviluppo ed evoluzione dei Cordati. Innanzitutto per la loro peculiare posizione evolutiva, sono infatti organismi alla base del phylum dei Cordati. Inoltre presentano un ciclo vitale breve, schematizzato in figura 6, bifasico, caratterizzato sia da uno stadio larvale pelagico che di adulto sessile (Jeffery e Swalla, 1997).

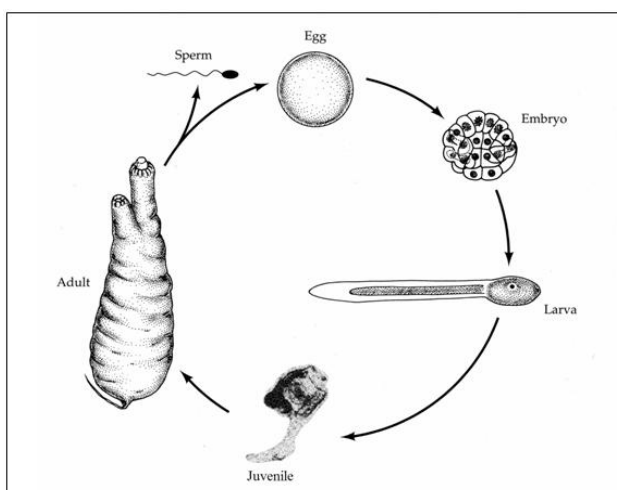


Figura 6. Ciclo vitale bifasico di *Ciona intestinalis*.

La formazione dell'individuo adulto maturo richiede ~ 3 mesi e prevede il passaggio attraverso diverse fasi embrionali, larvali e di metamorfosi, tutte facilmente seguibili in laboratorio e ben documentate (Satoh, 1994). Lo studio dei diversi stadi di sviluppo in *Ciona* è reso più semplice anche grazie alla trasparenza e al numero relativamente piccolo di cellule che caratterizza sia gli stadi embrionali che larvali (Passamanek e Di Gregorio, 2005; Satoh et al., 2003a). Inoltre, recenti studi filogenetici hanno dimostrato che i tunicati, e non i cefalocordati, rappresentano la forma vivente più vicina ai vertebrati (Delsuc et al., 2006).

Tutte queste caratteristiche rendono le ascidie ed in particolare *Ciona intestinalis* un valido sistema modello per studi sui meccanismi molecolari, di trasduzione dei segnali e di regolazione genica coinvolti nelle prime fasi dello sviluppo dei Cordati. Inoltre, le ascidie presentano allo stesso tempo la semplicità cellulare e genomica degli invertebrati e molte caratteristiche morfologiche dello sviluppo di base dei vertebrati.

Un notevole contributo agli studi di espressione genica in *Ciona* è dato dal recente sequenziamento e assemblaggio del suo genoma (<http://genome.jgi-psf.org>, Dehal et al., 2002), che permette una rapida identificazione dei geni di interesse e delle regioni non codificanti che le fiancheggiano. La semplicità di questo tunicato è rispecchiata dal suo genoma piccolo e compatto, della grandezza di ~160 Mb, circa venti volte più piccolo rispetto al genoma umano, e contenente ~16000 geni, circa la metà di quelli contenuti nel genoma umano. Oltre alla sequenza genomica, è stato condotto anche un progetto in larga scala per la sintesi di ESTs (expressed sequence tags), che ha portato alla caratterizzazione di circa 18.000 cloni di cDNA, che, si stima, rappresentano circa 85% dei trascritti di *Ciona intestinalis* (Satoh et al., 2003a; Satou et al., 2005). Le sequenze di questi cloni sono disponibili sul sito dell'università di Kyoto (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>).

Lo sviluppo embrionale

Gli embrioni di *Ciona intestinalis* sono l'unico esempio conosciuto di Deuterostomi con *sviluppo a mosaico o autonomo*. Negli ovociti a mosaico la separazione dei due blastomeri dà vita a due mezze larve, dimostrando una non totipotenza delle cellule embrionali legata alla compartimentalizzazione e a domini precostituiti nel citoplasma dell'ovocita.

Il citoplasma dell'uovo fecondato, infatti, non è omogeneo poiché riarrangiamenti citoplasmatici sono responsabili della ripartizione, in distinte aree dell'uovo non-segmentato, dei componenti morfogenetici che controllano la determinazione verso un particolare tipo cellulare (Conklin, 1905a).

Da studi di "cell lineage" emerge un quesito fondamentale: come è determinato il destino di ogni blastomero? Da lungo tempo si ritiene che ciò sia dovuto a sostanze già presenti nella cellula uovo, dette determinanti citoplasmatici (Uzman e Jeffrey, 1986; Nishida, 2002), che vengono distribuiti in blastomeri diversi dopo la fecondazione e le prime divisioni. Una diversa ripartizione spaziale di tali sostanze crea un microambiente citoplasmatico diverso per ogni blastomero che può influenzare il nucleo e l'espressione genica. Recentemente è stato dimostrato che tra le sostanze in grado di regolare il corretto sviluppo embrionale ci siano gli RNA messaggeri materni, che codificano per fattori di trascrizione o componenti di trasduzione di segnali responsabili di un'attività genica differenziata (Jeffrey, 2001). In tal modo ogni blastomero eredita un differente set di fattori regolatori e diventa, così, in grado di seguire il proprio destino di sviluppo autonomamente (Conklin, 1905b).

Numerosi studi di "cell lineage" (Conklin, 1905b, Nishida e Satoh, 1983; Nishida e Satoh, 1985; Nishida, 1987) hanno permesso l'elaborazione di una mappa dettagliata dei destini cellulari fino allo stadio di 110 cellule. A questo stadio il destino di quasi tutti i

blastomeri dell'embrione è determinato, e le successive divisioni hanno il solo scopo di incrementare la popolazione cellulare. Non tutti i tessuti dell'embrione delle ascidie, però, si sviluppano in una maniera puramente autonoma e lo sviluppo della notocorda, del sistema nervoso centrale, delle cellule muscolari del lineage secondario (Nishida, 1990), e di alcune cellule mesenchimali (le "Trunk Lateral Cells", TLC), richiede l'induzione tra cellule adiacenti (Satoh, 1994). Queste interazioni induttive avvengono durante il ciclo cellulare che precede la determinazione e causano la polarizzazione della cellula che va incontro alla divisione cellulare. In tal modo i determinanti citoplasmatici prima menzionati segregano in maniera differente tra le due cellule figlie ed esse acquisiscono un potenziale di sviluppo diverso.

Lo sviluppo embrionale delle ascidie si attua mediante divisioni simmetriche bilaterali. Dopo circa 50 minuti dalla fecondazione, lo zigote si divide per mitosi in due blastomeri, destro e sinistro, secondo un piano meridiano lungo l'asse animale/vegetativo. Le divisioni cellulari procedono ogni 35 minuti circa e allo stadio di 110 cellule comincia la gastrulazione. Nelle ascidie questo processo avviene per invaginazione dei blastomeri dell'emisfero vegetale (i precursori dell'endoderma, della notocorda, del mesenchima e, infine, delle cellule muscolari), seguita dall'epibolia delle cellule dell'emisfero animale che ricoprono, prima parzialmente e poi completamente, l'intero embrione. Si formano, così, tre foglietti cellulari che sono rispettivamente, dall'esterno verso l'interno, l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma e si determina il futuro assetto del corpo dell'animale.

Segue la neurulazione che si realizza con la differenziazione delle cellule nervose, fino ad arrivare allo stadio di tailbud o di bottone caudale, che consiste di tre fasi di sviluppo early, middle e late tailbud, quest'ultimo è lo stadio che precede la schiusa. In figura 7 sono rappresentati i principali stadi di sviluppo embrionale.

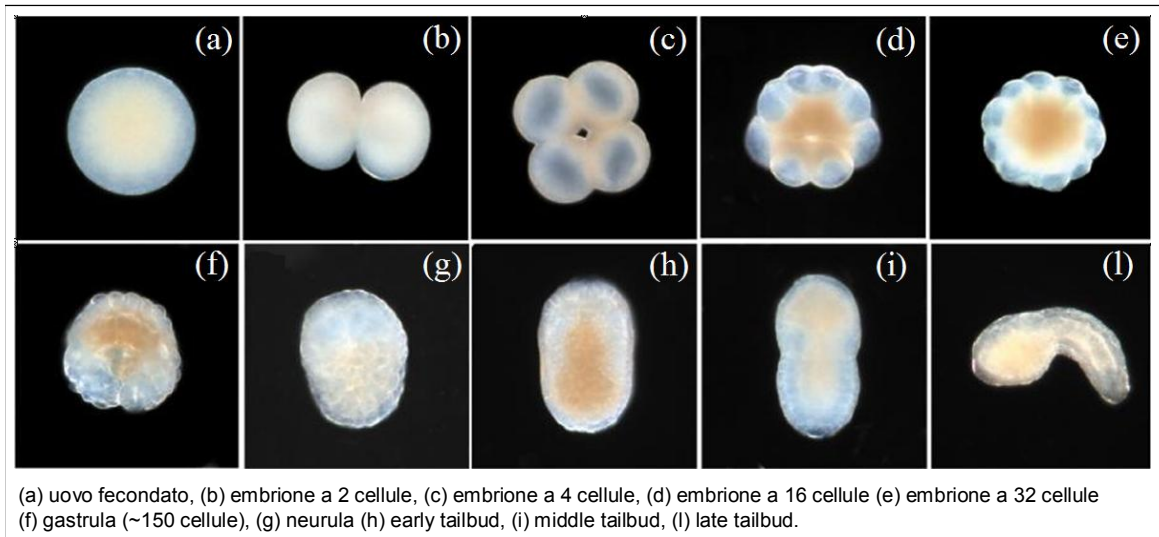


Figura 7. Principali stadi di sviluppo embrionale dell'ascidia *Ciona intestinalis* (Adattata da: Satoh et al., 2003b).

Lo sviluppo larvale

Le larve natanti dell'ascidia *Ciona intestinalis* rappresentano uno stadio di sviluppo transitorio, adattato alla dispersione e alla selezione dell'habitat, da cui si originerà, attraverso un complesso processo di metamorfosi, l'individuo sessile adulto.

Durante il loro sviluppo le larve di *Ciona* non si procacciano il cibo ma utilizzano sostanze di riserva accumulate nell'organismo (Cloney, 1982), inoltre lo sviluppo larvale procede attraverso il passaggio per diversi stadi ben definiti, rappresentati in figura 8.

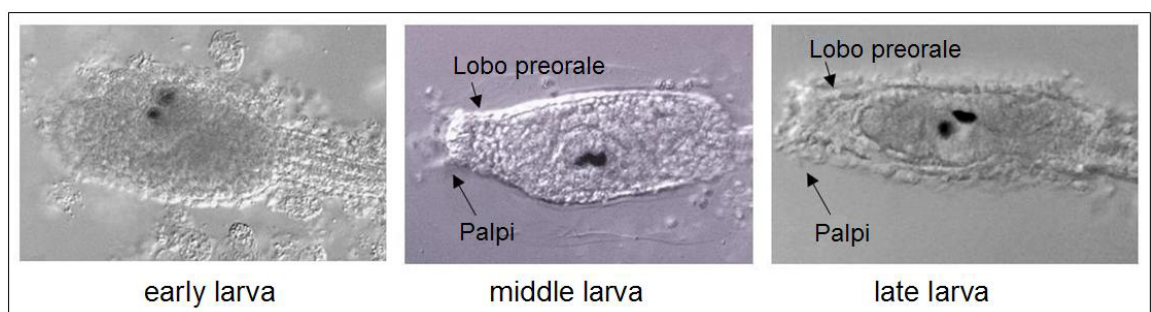


Figura 8. I tre stadi di sviluppo larvale dell'ascidia *Ciona intestinalis* (Adattata da: Chiba et al., 2004).

Alla schiusa, che generalmente avviene dopo 18-20h dalla fecondazione per embrioni allevati ad una temperatura costante di 18°C, è possibile osservare il primo stadio larvale, detto early larva. In questo breve stadio (0-2h dalla schiusa), la larva della lunghezza di ~1mm, costituita da due regioni testa e coda, presenta tutti i principali tessuti larvali: notocorda, muscoli, epidermide, endoderma, mesenchima e sistema nervoso. La testa ha una caratteristica forma rotondeggiante e, in questo stadio, è ancora assente alla sua estremità anteriore l'organo adesivo, costituito da tre papille, che secernono sostanze necessarie all'adesione al substrato, l'evento che dà inizio al processo di metamorfosi. Queste strutture adesive sono invece ben evidenti nello stadio successivo, middle larva (2-4h dalla schiusa), dove nella parte anteriore della testa è possibile osservare la formazione di un lobo preorale che ne determina l'allungamento e le fa assumere la caratteristica forma ovoidale. A questo stadio le larve possono attaccarsi ad un opportuno substrato ma non sono in grado di iniziare la ritrazione della coda. Nello stadio successivo, late larva (4-9h dalla schiusa), le larve presentano un tubo pre-orale allungato e sono evidenti nella testa il disco intestinale ed endostiliale, che rappresentano i primordi degli organi dell'individuo adulto. In questo stadio le larve diventano "competenti", ovvero acquisiscono la capacità di sentire, discriminare e rispondere ai diversi stimoli ambientali che inducono l'attaccamento al substrato e/o la metamorfosi.

In figura 9 è riportata una rappresentazione schematica dei principali tessuti e organi della larva di *Ciona intestinalis*, costituita da ~2600 cellule.

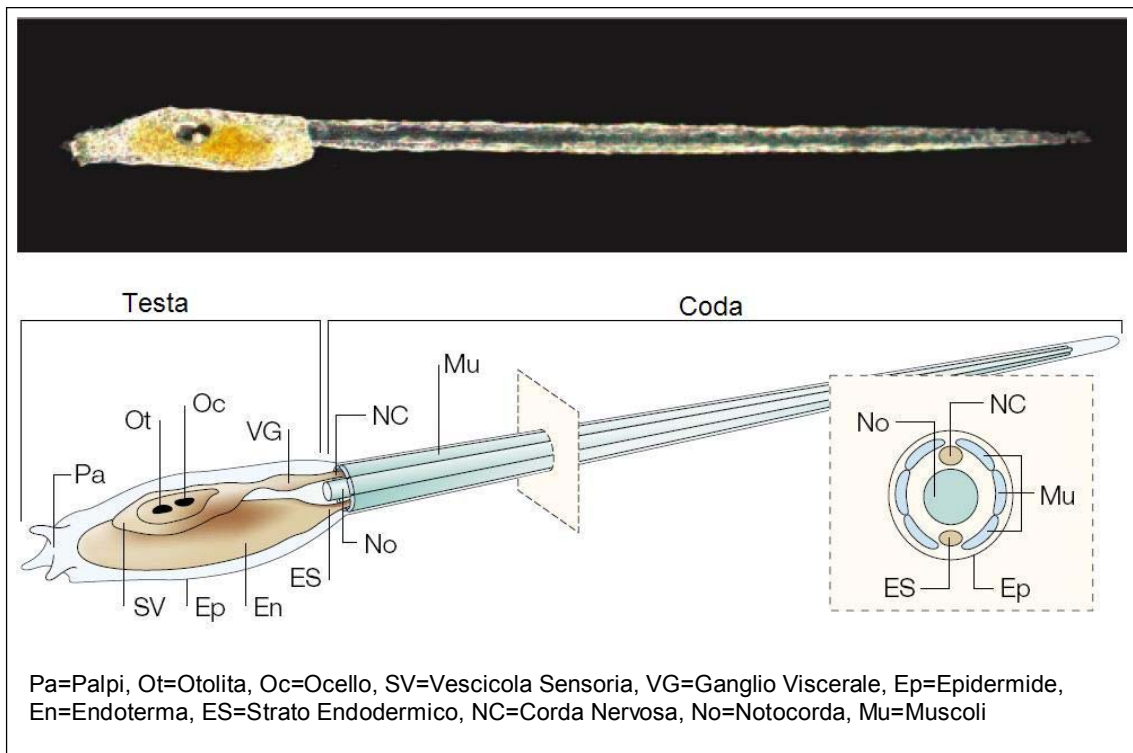


Figura 9. Morfologia di una late larva osservata al microscopio con ottica Normarsky (in alto) e rappresentazione schematica dei principali organi e tessuti larvali (in basso) (Adattata da: Satoh, 2003a).

Limitatamente alla coda, la larva possiede una struttura di sostegno, la notocorda, formata da una fila longitudinale di 40 cellule allineate e, lateralmente ad essa, due serie di cellule muscolari striate, 36 in totale, suddivise in tre bande longitudinali. Il sistema nervoso è dorsale rispetto alla notocorda ed è costituito da un corda nervosa che attraversa tutta la coda e si collega al ganglio viscerale nella testa; mentre sempre nella coda è localizzata una fila di cellule endodermiche, “endodermal strand”, localizzate in posizione ventrale, al di sotto della notocorda.

Per quanto riguarda la testa, essa presenta altre cellule endotermiche che daranno origine dopo la metamorfosi a diversi organi dell’individuo adulto, tra cui l’endostilo, il sacco branchiale e gli organi digestivi (Hirano e Nishida, 2000).

Due tipi di tasche costituite da cellule cuboidali, il primordio del faringe e una coppia di atri sono localizzati l’uno anteriormente e gli altri posteriormente rispetto alla vescicola

sensoria e al momento della metamorfosi si fondono contribuendo alla formazione del sacco branchiale dell'adulto, in particolare del sifone orale (o inalante), derivato dal primordio del faringe e del sifone atriale (o esalante), derivato dalla fusione dei due atri (Satoh, 1994). Sempre nella testa sono presenti tasche di cellule mesenchimali (~900 cellule). Sebbene esse siano morfologicamente omogenee, si ritiene che almeno tre differenti tipi di cellule mesenchimali possano essere distinte sulla base della loro posizione e del loro potenziale di sviluppo. Le "trunk ventral cells" (TVC) sono localizzate lateralmente all'endoderma ventrale e danno origine nell'adulto al cuore, al pericardio e alla muscolatura della parete del corpo. Il mesenchima propriamente detto, invece, ha una posizione più centrale, lateralmente all'endoderma della testa, e contribuisce essenzialmente alla formazione delle cellule della tunica. Le "trunk lateral cells" TLC, infine, sono posizionate dorsalmente nella testa ai lati del ganglio viscerale, e rappresentano i precursori delle cellule del sangue, e, assieme alle TVC, di una parte della muscolatura del corpo dell'adulto (Satoh, 1994).

Accanto a tutte queste popolazioni cellulari, che rappresentano i precursori degli organi dell'individuo adulto, è presente nella larva delle ascidie un sistema nervoso pienamente funzionale, pur nella sua semplicità, deputato essenzialmente a controllare il comportamento della larva durante il suo sviluppo e l'adesione al substrato. Il sistema nervoso centrale larvale, costituito da ~330 cellule, può essere suddiviso in quattro regioni: vescicola sensoria, collo, ganglio viscerale e corda nervosa. La vescicola sensoria si trova al di sopra del primordio dell'intestino e contatta col suo margine anteriore sinistro il primordio del faringe. Essa presenta un'ampia cavità entro cui sono localizzate le strutture sensoriali centrali: l'otolite, l'ocello e un terzo organo di senso ancora non completamente caratterizzato. L'otolite e l'ocello sono cellule pigmentate, in grado quindi di produrre melanina, deputate rispettivamente alla percezione di stimoli di natura

gravitazionale (l'otolite) o luminosa (l'ocello). Il terzo organo di senso centrale, costituito da cellule localizzate nella parete posteriore sinistra, dette cellule corona (Dilly, 1969), sembrano svolgere una funzione recettoriale della pressione idrostatica (Eakin e Kuda, 1971). Posteriormente alla vescicola sensoria, in una regione che si estende fino al confine fra testa e coda, si trova il ganglio viscerale, una struttura nervosa dall'aspetto bulbare che giace al di sopra dell'estremità anteriore della notocorda. Esso è costituito da corpi cellulari neuronali e da una parte fibrosa ventrale, il neuropilo, da cui fibre nervose si proiettano fin nella coda. Il ganglio viscerale rappresenta il centro di integrazione di tutto il sistema nervoso larvale. In questa sede giungono i tratti assonici che si dipartono dagli organi di senso e da qui partono gli impulsi dei neuroni motori che si trasmettono nella coda. Dal ganglio viscerale emerge la corda nervosa, che si estende poi per tutta la lunghezza della coda.

Un singolo strato di ~ 800 cellule epidermiche ricopre interamente la testa e la coda delle larve di *Ciona* (Satoh, 1994). L'epidermide produce i componenti della tunica che riveste esternamente l'intera larva ed è costituita da strati cuticolari, filamenti extracellulari e cellulosa (Satoh, 1994; Matthysse et al., 2004).

Infine, nella larva di *Ciona* è possibile distinguere almeno due diversi sistemi nervosi periferici. Neuroni sensori primari sono localizzati nei palpi, dove controllano le caratteristiche chimico-fisiche del substrato e cellule sensoriali risiedono tra le cellule stesse dell'epidermide della testa e della coda. L'utilizzo di un anticorpo monoclonale UA301, specifico per il sistema nervoso di *Ciona*, ha consentito di evidenziare le connessioni tra il sistema nervoso centrale e periferico (Takamura, 1998). Quello periferico è costituito da neuroni epidermici dorsali e ventrali (DCEN, VCEN) presenti in numero discreto lungo la coda e da neuroni epidermici apicali e rostrali (ATEN e RTEN) nella testa, rappresentati in figura 10.

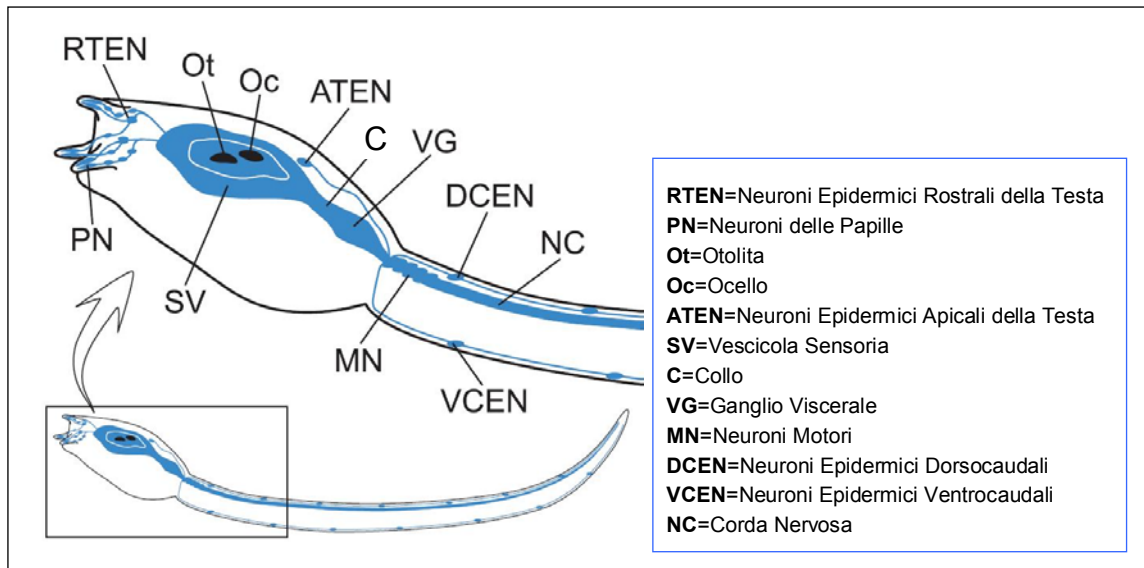


Figura 10. Sistema nervoso centrale e periferico dell'ascidia *Ciona intestinalis*. (Adattata da: Mochizuki et al., 2003).

I neuroni dorso e ventrocaudali (DCEN e VCEN) posseggono assoni che si diramano anteriormente al ganglio viscerale ed hanno cilia che si estendono attraverso la tunica verso l'ambiente esterno. I neuroni apicali della testa (ATEN) sono collegati alla parte posteriore del ganglio viscerale mentre quelli rostrali (RTEN) sono collegati ai neuroni localizzati nei palpi e alla vescicola sensoria (Takamura, 1998; Mochizuki et al., 2003).

Il processo di metamorfosi

Attraverso un complesso processo di metamorfosi le larve natanti, subiscono un completo rimodellamento dell'organismo e vengono trasformate in animali adulti sessili. Questo processo dinamico prevede numerosi movimenti morfogenetici coordinati e cambiamenti fisiologici attraverso i quali i tessuti larvali vengono distrutti o rimodellati per dare origine a nuovi organi e tessuti dell'individuo adulto, alcuni dei quali sono già presenti come cellule indifferenziate nella testa delle larve (Cloney 1978, 1982; Jeffery and Swalla, 2004; Swalla, 2004).

Il processo di metamorfosi inizia quando la larva, come descritto precedentemente, diventa competente, ovvero acquisisce la capacità di discernere e rispondere agli stimoli ambientali o endogeni che inducono il processo. In letteratura è riportato che la metamorfosi nelle ascidie richiede una combinazione di stimoli ambientali (Jackson et al., 2002) e segnali endogeni (Patricolo, 1981) ed è stato dimostrato che diverse sostanze possono accorciare il tempo che intercorre tra la schiusa e l'inizio della metamorfosi. Tra queste sono state identificate l'ormone tiroxina (Patricolo, 1981), ioni rame (Whittaker, 1964), il dimetilsolfossido, l'acetilcolina (Coniglio et al., 1998), ioni potassio (Degnan et al., 1997) e ioni ammonio (Berking e Herrmann, 1990). Recenti studi hanno evidenziato che nell'ascidia *Herdmania curvata*, la larva sviluppa più rapidamente la competenza alla metamorfosi in risposta ad uno stimolo esterno, quale l'elevata concentrazione in acqua di mare di ioni potassio. L'induzione avviene mediante attivazione dei neuroni sensori delle papille che stimolano le vicine cellule epidermiche a secernere la proteina Hemps che viene poi rilasciata nella tunica (Degnan et al., 1997; Eri et al., 1999). Questa proteina è stata descritta in *Herdmania* come fattore indispensabile di inizio della metamorfosi. Questo processo viene completamente bloccato trattando le larve con anticorpi anti-Hemps prima dell'aggiunta dell'induttore.

Tuttavia, per l'ascidia *Ciona intestinalis*, ancora poche sono le informazioni in letteratura riguardanti i possibili stimoli ambientali, i segnali endogeni e le vie di trasduzione del segnale che regolano la metamorfosi. Negli ultimi anni notevole attenzione è stata rivolta allo studio dei geni coinvolti durante la metamorfosi in *Ciona*. Mediante screening differenziale degli RNA messaggeri di larve natanti e juveniles (Nakayama et al., 2001, 2002), sono stati identificati sei geni, Ci-meta1-6. Questi geni iniziano ad essere espressi allo stadio late larva o successivamente fino a juvenile in diverse regioni, tra cui palpi,

mesenchima ed endoderma, ma nessuno di questi è espresso nella coda prima o durante il processo di ritrazione (Nakayama et al., 2002).

Il processo di metamorfosi in *Ciona* prevede diversi stadi ed inizia quando la larva si attacca ad un opportuno substrato, mediante le papille adesive, dopodichè si verifica la ritrazione della coda, favorita dalle proprietà contrattili dell'epidermide, dei muscoli e della notocorda. Studi recenti hanno evidenziato (Chambon et al., 2002) che l'adesione al substrato è una condizione sufficiente ma non necessaria affinché abbia inizio la metamorfosi, infatti gli autori hanno osservato che molte larve allevate in acqua di mare in capsule di Petri ritraggono la coda pur rimanendo disperse in acqua.

In figura 11 è riportato l'intero processo di metamorfosi di *Ciona* ed in particolare sono rappresentate larve a diversi stadi di ritrazione della coda, fino alla sua completa ritrazione e formazione di una early juvenile.

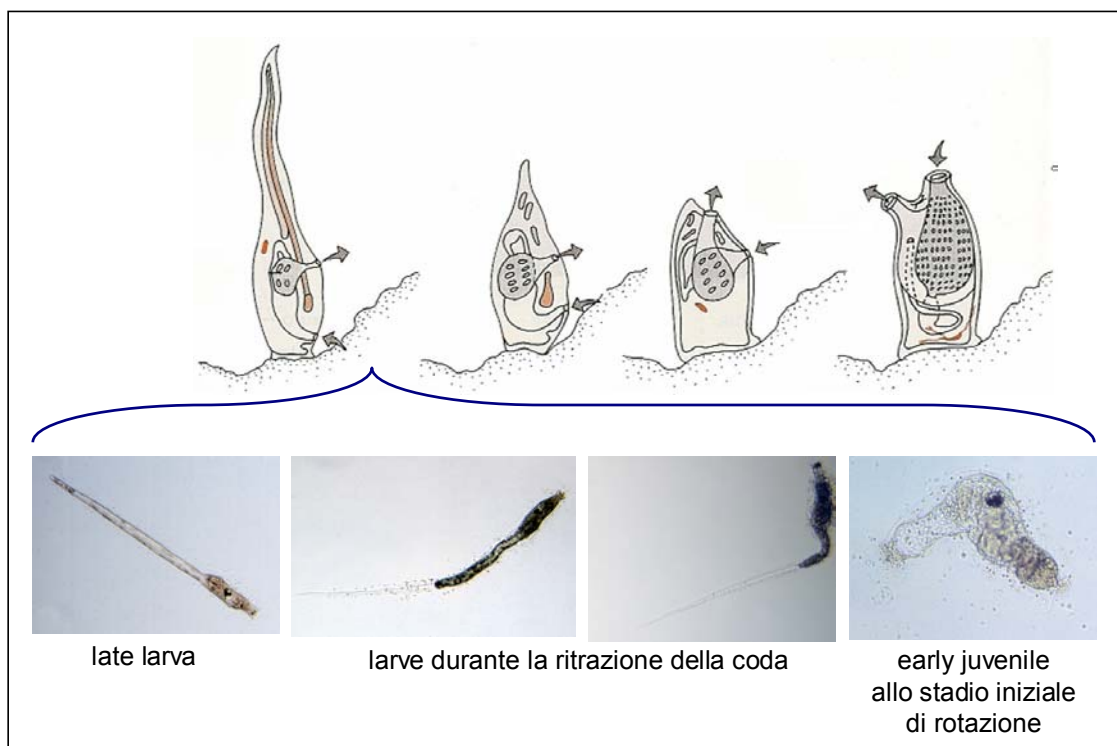


Figura 11. Processo di metamorfosi dell'ascidia *Ciona intestinalis*.

Oltre alla ritrazione della coda, il processo di metamorfosi prevede il riassorbimento delle papille, la scomparsa nella testa della vescicola sensoria, del ganglio viscerale e degli altri organi di senso e la formazione nella testa della larva di nuovi organi e tessuti. In particolare, le early juveniles che si formano in seguito alla completa ritrazione della coda, iniziano una fase di rotazione di 90°C intorno al loro asse e sottostanno ad un completo rimodellamento dell'intero organismo, che prevede la distruzione o la trasformazione di vecchi organi o primordi in nuovi organi e tessuti dell'individuo adulto (Cloney, 1978). Mentre le prime fasi della metamorfosi, quali l'attaccamento al substrato e la ritrazione della coda, sono estremamente veloci e dinamiche, dell'ordine di alcune ore, le fasi successive di sviluppo delle juveniles e la formazione dell'individuo adulto risultano più lunghe e richiedono un tempo complessivo di 2-3 mesi. Una dettagliata e precisa descrizione dei tempi di sviluppo di organi e tessuti delle juvenile è stato recentemente descritto da Chiba et al. (2004).

Un aspetto fondamentale delle prime fasi di metamorfosi in *Ciona* è il verificarsi di due onde apoptotiche, la prima che interessa il sistema nervoso centrale delle late larve (Tarallo e Sordino, 2004) e la seconda in ordine temporale interessa la coda (Chambon, 2002).

Di notevole interesse è la seconda onda apoptotica responsabile della ritrazione della coda. Quest'onda si genera nella parte terminale della coda e poi si propaga fino alla base col procedere del processo attraverso un processo apoptotico caspasi-3 dipendente che interessa le cellule della tunica, dell'epidermide, dei muscoli e della notocorda, come mostrato in figura 12 (Chambon, 2002).

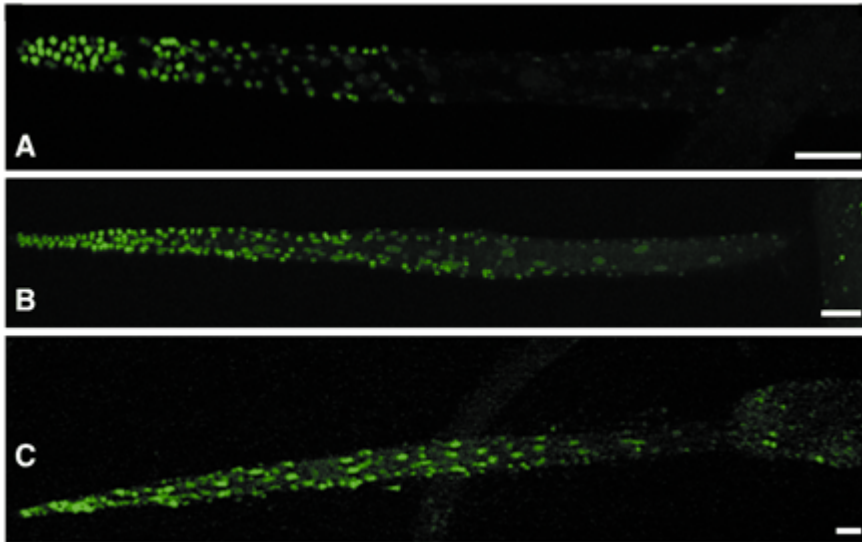


Figura 12. Metodo TUNEL che evidenzia l'origine dell'onda apoptotica all'estremità della coda (A) e poi si propaga fino alla base (B e C). Barra di scala: corrisponde a 220 μ m in A, 140 μ m in B e 80 μ m in C. (Adattata da Chambon et al., 2002).

Nonostante l'enorme mole di dati che derivano da tutti questi studi, ancora poche e frammentarie sono le informazioni sulle possibili molecole coinvolte nelle varie fasi della metamorfosi e gli eventi di trasduzione del segnale che controllano il processo di ritrazione della coda e la formazione di nuovi organi e tessuti dell'individuo adulto di *Ciona intestinalis*.

Indizi su possibili molecole in grado di controllare il processo di metamorfosi in *Ciona* derivano da studi recenti condotti sulle ascidie *Boltenia villosa* e *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Bishop et al., 2001), in cui gli autori hanno dimostrato che la proteina HSP90 e l'NO sono coinvolti nel processo. Inoltre, mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-NOS universale hanno dimostrato che la NOS è espressa nei muscoli della coda di *Cnemidocarpa finmarkiensis* e che inibendo la produzione di NO, si verifica un'accelerazione del processo di ritrazione della coda. Tuttavia in tale studio nessuna indicazione è stata fornita sull'espressione del gene NOS durante le varie fasi larvali e di metamorfosi, sulla localizzazione dell' NO prodotto e sui meccanismi di azione del gas.

In *Ciona* l' NO è stato riportato agire solo a livello della fecondazione, dove attiva i canali ionici in ovociti maturi (Grumetto, 1997). Non si hanno, invece, notizie sul possibile coinvolgimento dell'NO durante le fasi di sviluppo e metamorfosi di questa ascidia.

Scopo della ricerca

In questo contesto si inserisce il mio lavoro di tesi di dottorato rivolto allo studio del ruolo svolto dall'NO durante lo sviluppo larvale e le prime di metamorfosi di *Ciona intestinalis*.

Più in dettaglio gli obiettivi sono stati i seguenti:

- Studio dell'espressione spaziale e temporale del gene NOS durante lo sviluppo larvale e le prime fasi di metamorfosi.
- Localizzazione dell'NO in larve e juveniles.
- Studio dell'effetto prodotto sulla metamorfosi in seguito a variazione dei livelli endogeni di NO.
- Studio delle vie di trasduzione del segnale e delle molecole bersaglio dell'NO.

MATERIALI E METODI

Animali

Esemplari di *Ciona Intestinalis* prelevati in località Fusaro (Pozzuoli) sono stati stabulati per due giorni in vasche contenenti H₂O di mare circolante sotto luce continua. Le fecondazioni, effettuate dal Servizio di allevamento degli organismi marini della Stazione Zoologica A.Dohrn di Napoli, sono state condotte in capsule di Petri, in H₂O di mare filtrata, aggiungendo alle uova raccolte da ogni singolo animale, una miscela di spermatozoi (1×10^6 / ml) prelevati da più individui. Gli embrioni sono stati allevati a temperatura costante (18°C) e lo sviluppo è stato seguito mediante uno stereomicroscopio della Olympus. In queste condizioni la schiusa delle larve si verificava dopo 18-20 ore dalla fecondazione. Campioni di larve e juveniles allo stadio di sviluppo desiderato sono stati raccolti per centrifugazione a bassa velocità. I pellets sono stati congelati a -80°C per l'estrazione dell'RNA e proteine o fissati per gli esperimenti di ibridazione *in situ*. Per altri esperimenti il contenuto di piastre con larve appena schiuse è stato suddiviso in due o più aliquote uguali (1000-2000 larve) in piastre di Petri con griglia da conteggio e trattate con gli inibitori della NOS, dell'arginasi e della guanilato ciclasi come descritto nei paragrafi successivi.

Espressione temporale del gene NOS e Arginasi

NOS e Arginasi

I geni di *Ciona intestinalis*, la cui espressione durante lo sviluppo larvale e i primi stadi di metamorfosi sono stati oggetto di studio di questa tesi, sono NOS e Arginasi. I numeri di

accesso in banca dati (Doe Joint Genome Institute (JGI) <http://genome.jgi-psf.org>, Dehal et al., 2002) per le sequenze di NOS e Arginasi sono rispettivamente genewise.674.4.1 e ci0100135911.

Estrazione dell' RNA totale dalle uova, dagli stadi larvali ed early juveniles di *Ciona intestinalis*

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata utilizzando i componenti del kit SV total RNA Isolation System della Promega. Gli stadi esaminati sono: uova, early, middle e late larva, larve in metamorfosi, ed early juveniles agli stadi di rotazine iniziale e tardivo.

Per evitare problemi di degradazione, durante la preparazione e l'analisi dell'RNA è stato usato materiale da laboratorio di plastica sterile.

Pellet da 80-200µg totali congelati a -80°C per i diversi stadi di sviluppo sono stati rapidamente omogeneizzati con un Ultra-Turrax T25 dopo l'aggiunta, nella proporzione di 175µl per ogni 30mg di pellet (peso umido), del tampone di lisi SV (tabella 1) contenente tiocianato di guanidina 4M. All'omogenato sono stati aggiunti 2 volumi di tampone di diluizione (tabella 1), i campioni contenuti in eppendorf sono stati agitati per inversione, e poi successivamente incubati in bagno ad acqua a 70°C per un tempo non superiore ai 3'. Dopo la fase di riscaldamento i campioni sono stati centrifugati a temperatura ambiente per 10' a 14000 rpm con centrifuga PK121R della ALC dotata di rotore T527, dopodichè i supernatanti sono stati raccolti in nuovi tubi sterili. A ciascun campione di lisato si è aggiunto 200µl di etanolo al 95%, i campioni sono stati mescolati e poi centrifugati a temperatura ambiente. I successivi passaggi prevedono la purificazione dei campioni di RNA che è stata effettuata con le colonnine spin fornite dal

kit. Ciascun campione è stato trasferito nell'apposita colonnina e centrifugato a 14000 rpm per 1', gli eluati sono stati scartati. Nelle fasi successive è stato effettuato un lavaggio con 600µl di tampone di lavaggio (tabella 1), il campione è stato nuovamente centrifugato e l'eluato scartato. A questo punto il kit prevede la digestione del DNA in colonnina, allo scopo al centro di ciascuna colonnina contenente il campione è stato aggiunta una miscela composta da: 40µl di tampone di digestione (tabella 1), 5µl di $MnCl_2$ 0.09M e 5µl di Dnasi, incubando per 15 minuti a temperatura ambiente. La reazione di digestione con la Dnasi è stata bloccata per aggiunta di 200µl di soluzione bloccante (tabella 1). Sono seguiti due lavaggi con 600 e 250µl di tampone di lavaggio, centrifugando ogni volta i campioni a 14000 rpm per 1' e gli eluati scartati. Infine le colonnine con i campioni di RNA totale sono state trasferite in nuovi tubi eppendorf sterili e l'eluizione dell'RNA è stata condotta caricando al centro di ogni colonnina 100 µl di H_2O depc, si è lasciato equilibrare per 1' e poi è stata effettuata la centrifuga a 14000 rpm per 1'. Gli eluati sono stati conservati a $-80^{\circ}C$ fino al momento dell'utilizzo.

Analisi e quantizzazione dell'RNA totale

La qualità dell'RNA estratto è stata analizzata caricando i campioni in TE 1x in H_2O depc (tabella 2) su gel di agarosio al 2% in TBE1x pH 6.5 in H_2O depc (tabella 2). La concentrazione di ciascun campione è stata determinata spettrofotometricamente, misurando l'assorbanza a 260nm, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Beckman DU 65, utilizzando la relazione 1 O.D.= 40 µg/ml di RNA. La purezza dei campioni invece è stata valutata dall'analisi dei seguenti rapporti di assorbanza: A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} . I rapporti calcolati per tutti i campioni sono risultati ottimali e compresi nel range: $1.7 < A_{260}/A_{280} < 2.1$ e $1.8 < A_{260}/A_{230} < 2.2$, indicativi dell'assenza di agenti

contaminanti che inficerebbero le fasi successive. Infatti valori bassi del rapporto A_{260}/A_{230} si verificano in caso di contaminazione da guanidina tiocianato che può interferire nelle fasi successive di utilizzo dell'RNA. Valori bassi dei rapporti A_{260}/A_{280} sono invece indicativi di contaminazione proteica. Infine valori alti dei rapporti A_{260}/A_{280} si ottengono in caso di contaminazione da fenolo; nel nostro caso il kit utilizzato non prevede in alcuna fase l'utilizzo di fenolo, ed è stato preferito al posto delle tecniche classiche di estrazione di RNA in quanto tracce sia pur piccole di fenolo inficerebbero le reazioni di Real Time PCR.

Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando i componenti del kit della PE Biosystems e materiale di laboratorio sterile. È stato impiegato come stampo l'RNA totale estratto dalle uova e dai differenti stadi di sviluppo larvale ed early juveniles utilizzando come innesco gli oligonucleotidi esameri random.

Le reazioni di sintesi per ciascuno stadio di sviluppo esaminato sono state condotte in duplicato ciascuna in un volume totale di 50 μ l come segue:

1 μ g di RNA totale in 19,25 μ l di H₂O depc

5 μ l di tampone di sintesi Taq Man 10X

10 μ l dNTP mix 10 mM

11 μ l MgCl₂ 25 mM

2.5 μ l oligonucleotidi esameri random 50mM

1 μ l inibitore delle ribonucleasi

1.25 μ l trascrittasi inversa Taq RT-polimerasi

Utilizzando il termocicizzatore “Thermal cycler Perkin-Elmer-Cetus” è stato seguito il seguente programma di temperature come consigliato dal manuale della PE Biosystem:

25°C per 10’

42°C per 60’

95°C per 5’

Al termine della reazione di sintesi, le due miscele di reazione per ogni stadio di sviluppo sono state inizialmente riunite per uniformare la resa finale e poi sono state preparate per tutti gli stadi delle aliquote da 10µl conservate in frigo a -20°C fino al momento dell’utilizzo. La preparazione delle aliquote è necessaria onde evitare continui cicli di scongelamento e ricongelamento dei campioni che alla lunga causerebbero degradazione e perdita del cDNA compromettendo gravemente la riproducibilità delle reazioni di Real Time PCR.

Scelta e sintesi degli oligonucleotidi specifici per la NOS, l’Arginasi e i possibili geni di riferimento

La scelta degli oligonucleotidi specifici per i geni di interesse NOS e Arginasi e dei possibili geni di riferimento esaminati: ubiquitina (UBI), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH), proteine ribosomiali S18 e S27 (RP-S18, RP-S27) è stata effettuata utilizzando il programma Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) sulla base delle sequenze individuate per i geni in esame nel genoma di *Ciona intestinalis*, recentemente sequenziato (<http://genome.jgi-psf.org>, Dehal et al.,2002).

Tutti gli oligonucleotidi sintetici impiegati sono stati preparati dalla ditta Primm s.r.l. di Milano.

Le sequenze degli oligonucleotidi senso e antisenso utilizzate come innesco nelle reazioni di PCR per la preparazione della sonda per la NOS, sono le seguenti:

NOS:

oligo senso

5'-AGAGTGAAAGCCTGTCGCATA-3'

oligo antisenso

5'-AACCAATGCGGTGGTTGTTA-3'

Arginasi:

oligo senso

5'-GAAATGGGGTCAAGCCTAAA-3'

oligo antisenso

5'-GTATGCGTATTTGCCCCAGT-3'

GADPH:

oligo senso

5'-TGAAGGCCTCATGACAACCTG-3'

oligo antisenso

5'-GGAATAACTTTGCCGACAGC -3'

UBI:

oligo senso

5'-GCACGTGCTGGTAAAGTGAA -3'

oligo antisenso

5'-TTAGGAGTTGGCGTTTGGTC-3'

RP-S18:

oligo senso

5'-AAACCCTCGCCAGTACAAGA-3'

oligo antisenso

5'-GTAGTGTCGCAAACCCCTGT-3'

RP-S27:

oligo senso

5'-AATCCACCCTTCACCTTGTG-3'

oligo antisenso

5'-GGGAGATCTTGCCATTTTCA-3'

Reazioni di Real Time PCR

Negli ultimi anni la tecnica quantitativa di Real Time PCR è considerata la tecnica più sensibile ed efficiente per la quantizzazione degli RNA messaggeri. Consente mediante l'uso di appropriate strategie di rilevamento fluorescenti in combinazione con un'appropriata strumentazione di quantizzare l'ammontare di acidi nucleici da cui si parte nella reazione di PCR. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde o sostanze intercalanti. In questo lavoro è stata utilizzata come sostanza intercalante il SYBR Green. In soluzione, il colorante non legato emette solo una debole fluorescenza che aumenta enormemente, più di 200 volte, quando si lega al solco minore della doppia elica del DNA. SYBR Green è presente nella miscela di reazione di PCR e durante l'elongazione numerose molecole si

legano al DNA neosintetizzato. Questa tecnica, basata sul monitoraggio e il rilevamento continuo, in "real time", della fluorescenza emessa durante tutte le fasi della reazione di PCR, è estremamente sensibile e consente un'efficace e precisa quantizzazione dell'espressione genica.

Nelle varie fasi della reazione di PCR lo strumento rileva gli aumenti di fluorescenza. Queste misurazioni di fluorescenza vengono poi riportate in un grafico che mette in relazione i cicli di amplificazione con la fluorescenza emessa. Da questo grafico è possibile determinare il ciclo soglia ("Threshold Cycle", C_T), che rappresenta il ciclo della reazione di amplificazione nel quale il segnale di fluorescenza supera il valore soglia. Il valore C_T correla fortemente con il numero di copie del cDNA di partenza.

Le reazioni di Real Time PCR per ciascun gene e per ciascuno stadio di sviluppo sono state condotte almeno in triplicato utilizzando le apposite piastre a 96 pozzetti e ripetute più volte per verificare la riproducibilità degli esperimenti. Le miscele di reazione di Real-Time PCR, in un volume finale di 25 μ l, contenevano 2 μ l di cDNA (diluizione 1:2 del materiale di partenza), 12.5 μ l di SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem) e 10.5 μ l di miscela della coppia di oligo specifici per ciascun gene (7.5 pmol). È stato utilizzato l'apparecchio Chromo 4 sequence detection system (MJ Research) e il seguente programma di temperature: 95°C per 10' (denaturazione), 40 cicli di amplificazione (15" a 95°C e 1' a 60°C). I dati sono stati analizzati col software Opticon Monitor 2.3 e i valori di C_T ottenuti elaborati come riportato nei paragrafi successivi. La specificità di ogni reazione di amplificazione è stata inoltre verificata dall'analisi delle curve di melting. La presenza di un'unica banda per ogni reazione di amplificazione è indicativa dell'amplificazione specifica del frammento di gene in esame.

Dall'analisi dei valori di C_T per i diversi possibili geni di riferimento è emerso che l'unico la cui espressione si mantiene costante nei diversi stadi di sviluppo e metamorfosi esaminati è il gene RP-S27.

Calcolo dell'efficienza delle reazioni di Real time PCR

Al fine di effettuare un'accurata quantizzazione relativa al gene di riferimento interno RP-S27, il passo successivo è stato assicurarsi che le efficienze delle reazioni di PCR dei geni di interesse, NOS e arginasi, e del controllo, RP-S27, per i diversi campioni di cDNA ai vari stadi di sviluppo fossero simili. A tale scopo le efficienze di reazione sono state calcolate riportando in grafico i valori di C_T in funzione del log cDNA di partenza. Sono stati scelti due stadi di sviluppo, early larva ed early juvenile, e sono state condotte per ogni gene e per ciascuno stadio reazioni in duplicato per diverse diluizioni del cDNA di partenza. Sono state effettuate diluizioni seriali del cDNA di partenza in modo che la concentrazione finale del DNA espressa in percentuale fosse pari a: 100%, 50%, 25%, 12.5% e 1%. I valori di C_T ottenuti sono stati interpolati con rette dei minimi quadrati e il valore dell'efficienza per ciascun gene è stato calcolato sulla base dei coefficienti angolari (m) delle rette, utilizzando la seguente formula: $Eff = 10^{-1/m}$. I valori di efficienza calcolati per la NOS, l'arginasi e RP-S27 sono pari a 2.0, 2.0, 2.1 rispettivamente e, per ciascun gene in esame, sono risultati uguali per i due stadi di sviluppo esaminati. I valori calcolati per i tre geni sono praticamente uguali tra loro e al valore teorico dell'efficienza e sono indicativi della buona scelta degli oligos per l'amplificazione e dell'ottimizzazione delle condizioni di reazione.

Analisi dei dati di Real Time

I valori di C_T sono stati normalizzati rispetto al riferimento interno RP-S27, per ciascuno stadio. Inoltre i dati dell'arginasi sono riportati relativamente all'espressione della NOS, e sia i valori di espressione dell'arginasi che della NOS sono riportati in percentuale rispetto al valore massimo di espressione trovato. Tale massimo di espressione corrisponde al valore dell'espressione del trascritto della NOS nelle uova. L'analisi dei dati è stata effettuata con il programma Excel e sono state utilizzate le seguenti formule:

$$\Delta = C_T \text{ RP-S27} - C_T \text{ gene di interesse}$$

Il valore più alto di questa differenza è stato trovato per il gene NOS nelle uova e corrisponde a Δ_{\max}

$$\Delta\Delta = \Delta - \Delta_{\max}$$

L'espressione relativa al riferimento interno ed espressa come valore percentuale del massimo di espressione trovato è data per un certo stadio (x) da:

$$\% \text{ del max} = 100 * E(x) / E_{\max} = 100 * 2^{\Delta} / 2^{\Delta_{\max}} = 100 * 2^{-\Delta\Delta}$$

I dati di espressione per il gene NOS e Arginasi sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{d.s.}$

Espressione spaziale della NOS

Estrazione e quantizzazione dell' mRNA da larve di *Ciona intestinalis*

L'estrazione dell' RNA poli-A⁺ da un campione di larve appena sgusciate è stata effettuata utilizzando i componenti del FastTrack™ 2.0 mRNA isolation kit della Invitrogen. In tutte le fasi del protocollo è stato usato materiale da laboratorio di plastica sterile per evitare problemi di degradazione dell'RNA.

Un pellet congelato a -80°C di early larve da 50mg è stato trattato con 7,15 ml di tampone di lisi preparato al momento mescolando 7ml di tampone stock (tabella 1) con 150 μl di protein/RNase degrader fornito dal kit e rapidamente omogeneizzato con Ultra-Turrax T25 effettuando 3 cicli da 30'' alla massima potenza in ghiaccio. L'omogenato è stato poi incubato a 45°C per 60 minuti per completare la digestione delle proteine e delle ribonucleasi. Il campione è stato centrifugato a 5500 rpm per 5' a temperatura ambiente con centrifuga PK121R della ALC dotata di rotore T527 e al supernatante trasferito in una nuova falcon sterile sono stati aggiunti 475 μl di NaCl 5M in H_2O depc. Per distruggere il DNA genomico il lisato è stato fatto passare 3-4 volte attraverso una siringa sterile con ago 18 , poi si è aggiunto al lisato circa 40mg di oligo dT cellulosa a cui si legerà l'RNA messaggero. La falcon è stata poi tenuta sotto agitazione orizzontale su piastra per 1 h in modo che tutto l'RNA messaggero potesse legarsi alla resina. Successivamente il campione è stato centrifugato a 5000 rpm per 5' e il supernatante rimosso. A questo punto sono stati effettuati una serie di lavaggi della resina come segue: 2 lavaggi con 10 e 5 ml di tampone di legame (tabella 1) e 3 lavaggi con 5ml di tampone a bassa concentrazione salina (tabella 1), centrifugando ad ogni passaggio a 5000 rpm per 5'. I lavaggi nel tampone a bassa concentrazione salina servono ad allontanare l'eccesso di SDS e tracce di altri contaminanti. Dopo l'ultimo lavaggio la resina è stata risospesa in 800 μl di tampone a bassa concentrazione salina, trasferita in una colonnina spin e centrifugata a 5500rpm per 10''. Quindi sono stati effettuati altri 2-3 lavaggi con lo stesso tampone ripetendo la centrifugazione nelle stesse condizioni. Infine la colonnina è stata trasferita in un nuova eppendorf e l'RNA messaggero legato alla resina è stato eluito aggiungendo in 2 volte 100 μl di tampone di eluizione (tabella 1), la resina è stata rimescolata con una la punta sterile di una pipetta e la colonnina centrifugato alla stessa velocità. Infine per precipitare l'RNA è stato aggiunto all'eluato 0.15 volumi di sodio

acetato 2M pH 5.2 in H₂O depc e 2.5 volumi di etanolo assoluto. Si è incubato il campione a -80°C per 12 ore per favorire la precipitazione. Il campione è stato poi centrifugato a 14000 rpm per 15' a 4°C, il supernatante eliminato e il pellet, prima lavato con etanolo al 70% è sciolto in 20µl di tampone di eluizione. La concentrazione è stata infine determinata mediante lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro a capillare Gene Quant II (Pharmacia Biotech) utilizzando la relazione 1 O.D.= 40 µg/ml di RNA. La concentrazione del campione di mRNA estratto dalle early larve è risultata pari a 30ng/µl.

Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando i componenti del SuperScript first strand synthesis system kit della Invitrogen e materiale di laboratorio sterile. E' stato impiegato come stampo l'RNA poli-A⁺ estratto dalle larve appena schiuse e come innesco gli oligonucleotidi formati da una coda di poli-dT per permettere l'appaiamento alla popolazione degli RNA poli-A⁺.

La reazione è stata condotta a partire da: 50 ng di RNA poli A⁺, 0.5 µg di innesco, 1 µl dNTP mix 10 mM ed H₂O trattata con depc per un volume finale di 8 µl. Per l'iniziale fase di denaturazione la miscela è stata riscaldata per 5' a 65°C e poi portata immediatamente a 0°C in ghiaccio fondente. Successivamente sono stati aggiunti 4 µl di tampone di sintesi 5x (Tris-HCl 100 mM, pH 8.4, KCl 250 mM), 2 µl DTT 100 mM, 4 µl MgCl₂ 25 mM ed 1µl inibitore delle ribonucleasi Rnase OUT. Per favorire l'appaiamento degli oligo dT nucleotidi con gli RNA poli-A⁺ la miscela è stata portata alla temperatura di 42°C per 2'. E' stato aggiunto, quindi, 1µl di Trascrittasi inversa Superscript II RT(200 U/µl) e la reazione di sintesi è stata condotta a 42°C per 60'. Al termine l'enzima è stato

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

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

Sintesi degli oligonucleotidi

Tutti gli oligonucleotidi sintetici impiegati sono stati preparati dalla ditta Primm s.r.l. di Milano.

Le sequenze degli oligonucleotidi senso e antisenso utilizzate come innesco nelle reazioni di PCR per la preparazione della sonda per la NOS, sono le seguenti:

NOS:

oligo senso

5'-CTGGAGATCATCTAGGTATCTATCC-3'

oligo antisenso

5'-CGTATGATTCACTTATGCGACAGGC-3'

La lunghezza del frammento di NOS da amplificare con questa coppia di oligo è pari a 1192 cb e corrispondente alla sola regione codificante vicina alla regione 3'UTR.

Amplificazione mediante PCR

Il cDNA ottenuto mediante il protocollo precedentemente descritto può essere direttamente amplificato senza una precedente purificazione o diluizione dal momento

che il tampone utilizzato per la sintesi del primo filamento di cDNA è compatibile con la Taq DNA polimerasi.

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 50 µl con i seguenti componenti: 2 µl campione di cDNA, 5 µl tampone di sintesi 10x, 5 µl mix dNTP 2 mM, 33 pmol per ogni oligonucleotide, H₂O ad un volume finale di 49 µl. Infine è stato aggiunto 1µl di Taq DNA polimerasi. Utilizzando il termocicizzatore “Thermal cycler Perkin-Elmer-Cetus” la miscela di reazione è stata inizialmente riscaldata alla temperatura di denaturazione di 94°C per 30’’ ed è stato poi seguito il seguente programma di temperature per i successivi 40 cicli di amplificazione: 94°C per 45’’ (denaturazione), 60°C per 2’(appaiamento), 72°C per 2’(polimerizzazione).

Infine per il completamento della reazione di polimerizzazione e l’aggiunta di un nucleotide adenilico all’estremità 3’ dei prodotti di amplificazione, la miscela di reazione è stata ulteriormente sottoposta per 10’ a 72°C. Le miscele sono state conservate a -20°C.

Analisi della lunghezza dei frammento di DNA della NOS ottenuto per PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio

Al fine di verificare la riuscita della reazione di PCR e controllare la lunghezza del frammento amplificato, il DNA ottenuto mediante la reazione di PCR è stato sottoposto a elettroforesi su un gel di agarosio allo 0.8% in TAE 1x (tabella 2), in presenza di bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 0.25 ng/ml. Abbiamo caricato l’intera miscela di reazione di reazione (50µl) con 10 µl di colorante per DNA 6x. La lunghezza del frammento ottenuto per PCR è stata ricavata dal confronto della sua distanza di migrazione con quella dei frammenti di lunghezza nota del marcatore di peso molecolare

1kb. Alla fine della corsa elettroforetica, le bande nel gel sono state visualizzate su uno schermo a raggi UV e sono state fotografate. Abbiamo ottenuto una banda di 1192 per la NOS.

Eluizione da gel

Dopo aver effettuato la corsa elettroforetica per purificare il prodotto di PCR, ed ottenere amplificati omogenei, si procede con eluizione da gel, eseguita utilizzando il QIAquick gel extraction Kit della Quiagen. I prodotti di PCR visualizzati con un transilluminatore UV sono recuperati da gel tagliando con un bisturi le porzioni di agarosio che li contengono. Con l'uso di una bilancia si determina il peso delle fettine di agarosio. L'agarosio è dissolto in 3 volumi di tampone QG incubando a 50°C per 10', agitando ogni 2-3'. Il DNA così eluito da gel è fatto adsorbire ad una resina contenuta in una colonnina QIAquick si centrifuga per 1' a 4000rpm, con centrifuga PK121R della ALC dotata di rotore T527, e si scarta l'eluato. Successivamente si lava la resina contenente il DNA adsorbito con 500µl di tampone QG si centrifuga ancora a 4000 rpm per 1', si scarta l'eluato e si procede all'aggiunta di 750µl di tampone PE, centrifugando nuovamente nelle stesse modalità. Infine per eliminare completamente l'etanolo contenuto nel tampone di lavaggio che potrebbe inibire gli enzimi utilizzati nei passaggi successivi, si effettua un'ulteriore centrifuga a 11000 rpm per 1'.

Si procede, quindi, con l'eluizione del DNA legato alla resina, risospingendola in due passaggi in 50 e poi 30µl di H₂O sterile e centrifugando ogni volta a 4000 rpm. Gli eluati sono infine raccolti. Le centrifugazioni sono state condotte utilizzando una microcentrifuga Eppendorf.

Trasformazione e clonaggio della molecola ricombinante

La ligazione, la trasformazione e il clonaggio del frammento amplificato mediante PCR sono stati effettuati utilizzando il kit TOPO-TA Cloning della ditta Invitrogen. Il vettore usato, pCRII-TOPO è lungo 3.9 kb ed è stato realizzato esplicitamente per accettare i prodotti di PCR, che contengono di solito una A all'estremità 3', dovuta all'azione 3' transferasica della Taq polimerasi.

Il frammento amplificato eluito da gel è stato sottoposto alla reazione di ligazione, che risulta semplice e veloce, seguendo le indicazioni riportate sul manuale:

4 μ l di prodotto della PCR purificato e risospeso in H₂O sterile

1 μ l di tampone diluito per TOPO-TA

1 μ l di vettore

L'utilizzo del tampone a bassa concentrazione salina è indispensabile quando, come nel nostro caso, si utilizzano cellule elettrocompetenti, per le quali alte concentrazioni di sali potrebbero provocare, durante lo shock elettrico necessario per la trasformazione batterica, la lisi cellulare. Si agita delicatamente la mix di reazione che viene lasciata a temperatura ambiente per 15'. Al termine della reazione la miscela è stata microdializzata contro H₂O per 1h utilizzando una membrana millipore da 0.025 μ m. Questo passaggio è necessario per allontanare l'eccesso di sali che inficerebbero i successivi passaggi.

I plasmidi circolari ottenuti, sono stati usati per la trasformazione di cellule batteriche del ceppo di *Escherichia coli* TOP 10 competenti per l'elettroporazione. Questa tecnica permette di inserire costrutti di DNA in cellule batteriche che sono sottoposte ad uno shock elettrico che provoca l'apertura dei pori sulla membrana plasmatica. Si è utilizzata una elettrocuvetta Bio-Rad Gene Pulser in cui si inseriscono 6 μ l di reazione di ligazione

e 40µl di cellule elettrocompetenti, evitando accuratamente la possibile formazione di bolle. La cuvetta è stata posizionata nell'apposito alloggiamento dell'elettroporatore Bio-Rad Gene Pulser ed è stato applicato un impulso elettrico a voltaggio costante di 1.7 V, immediatamente le cellule sono state riprese in 250 µl di terreno di coltura SOC (tabella 3), vengono trasferite in una falcon da 15ml poste sotto agitazione a 37°C per 30', per risvegliare il metabolismo dei batteri e favorire l'espressione dei geni per la resistenza agli antibiotici. Al termine dell'incubazione aliquote di 1, 5, 50,100µl di cellule risospese sono state piastrate, sul terreno di coltura solido LB (tabella 3) contenuto in una capsula Petri preriscaldata a 37°C. Il terreno di coltura solido LB contiene l'antibiotico ampicillina, per il quale il plasmide reca il gene per la resistenza, e che quindi consente la selezione dei batteri trasformati. Per effettuare il riconoscimento delle cellule trasformate mediante lo screening bianco/blu, prima di trasferire i batteri, le piastre vengono ricoperte uniformemente con una mix così composta: 32 µl di 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galattoside (X-gal) 50 mg/ml, 4 µl di isopropil-D-galattoside (IPTG) 1M. Questo trattamento delle piastre consente l'identificazione dei batteri contenenti il vettore con l'inserito. L'ampicillina permette la crescita solo dei batteri che hanno inglobato il vettore, mentre X-gal e IPTG servono per distinguere le cellule che hanno ricevuto il vettore contenente l'inserito da quelle che hanno ricevuto unicamente il vettore, dato che solo quest'ultime sono in grado di far virare il colore dell'IPTG al blu (le colonie bianche sono quelle contenenti l'inserito, quelle blu invece non contengono l'inserito). Le piastre vengono incubate per un massimo di 16h a 37°C.

Al termine dell'incubazione, le colonie bianche, cioè quelle contenenti il vettore con l'inserito, sono state prelevate con un'ansa sterile che è stata immersa in 5 ml di LB con

ampicillina 100 µg/ml, per ottenere minipreparazioni di DNA plasmidico contenente il frammento clonato. Gli inoculi sono stati incubati a 37°C per circa 16h sotto agitazione.

Preparazione del DNA plasmidico in piccola scala

Per estrarre il DNA plasmidico dai batteri abbiamo utilizzato il QUIAprep Spin Miniprep kit della ditta Qiagen L'estrazione del DNA plasmidico con questo kit prevede tre fasi fondamentali:

- 1) lisi alcalina delle cellule batteriche e purificazione del lisato batterico;
- 2) adsorbimento del DNA sulla membrana in silica-gel di una colonna cromatografica a scambio ionico in presenza di elevata forza ionica e
- 3) lavaggio della colonna ed eluizione del DNA plasmidico. Tutti i passaggi vengono condotti in assenza di fenolo, cloroformio, CsCl, bromuro di etidio o alcool. E' stato seguito il seguente protocollo:

- ogni inoculo è stato centrifugato per 10' a 3000 r.p.m. in una centrifuga Beckman con rotore GH 3.7. Si allontana il supernatante e si lascia asciugare il precipitato per 2' capovolgendo la falcon

-il precipitato batterico è stato risospeso in 250 µl di tampone P1 e la sospensione trasferita in un tubo Eppendorf sterile da 1.5 ml

-si aggiungono 250 µl di tampone P2 e si miscela invertendo i tubi 4-6 volte

-si aggiungono 350 µl di tampone N3 e si invertono i tubi immediatamente 4-6 volte

-si centrifuga per 10' a 14000 rpm in una centrifuga da banco

-si applica il sopranatante (contenente il DNA) alla colonna cromatografica spin QIAprep in eppendorf da 2ml

- si centrifuga per 1' a 4000 rpm si elimina l'eluato
- si lava la colonna con 0.5 ml di tampone PB e si centrifuga nuovamente per 1'; si elimina l'eluato
- si lava la colonna con 0.75 ml di tampone PE e si centrifuga a 4000 rpm per 1'.
- si elimina l'eluato e si centrifuga ancora per eliminare residui di buffer alla velocità massima
- si lasciano asciugare le colonnine aperte per 5'
- si pone ogni colonna in un nuovo tubo Eppendorf da 1.5 ml sterile e si eluisce il DNA aggiungendo 50 µl di H₂O sterile al centro della colonna; si attende 1' e si centrifuga, sempre a velocità massima, per 1'. La quantizzazione del DNA plasmidico è stata valutata su gel all'1% di agarosio in TAE 1x per confronto col marker di peso molecolare λII, ed è risultata pari a 330 ng/µl.

Digestione con enzimi di restrizione e sequenziamento del DNA plasmidico

Per verificare che il DNA plasmidico da MiniPrep contenga effettivamente l'inserto del gene NOS è stata effettuata la digestione con l'enzima EcoRI che taglia il DNA plasmidico a valle e a monte dell'inserto. La miscela di reazione conteneva: 1.5µl di EcoRI (Roche, 10U/µl), 3 µl di tampone H 10x, 20.5 µl di H₂O sterile e 5µl di DNA plasmidico. La reazione è stata condotta a 37°C per 2h. L'analisi del gel di agarosio all'1x in TAE 1x condotto sul campione digerito ha evidenziato la presenza di due bande, una a ~1200cb relativa all'inserto di NOS e l'altra a ~3900cb relativa al vettore di clonaggio.

A questo punto per stabilire l'orientamento del segmento genico subclonato nel plasmide pCRII-TOPO, si è proceduto al sequenziamento del plasmide utilizzando come "primers" T7 e SP6, oligonucleotidi che riconoscono zone del vettore a monte e a valle dell'inserito. Il DNA plasmidico è stato sequenziato dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica di Napoli "A. Dohrn".

Preparazione delle ribosonde: trascrizione in vitro

Si è proceduto, quindi, linearizzando il plasmide alternativamente con un enzima che taglia al 5' del segmento genico, HindIII, per ottenere lo stampo per la ribosonda antisenso e con un enzima che taglia al 3' del segmento genico, Xho, per ottenere lo stampo della ribosonda senso. La miscela di reazione di linearizzazione per la ribosonda antisenso era costituita da: 50µl di DNA plasmidico, 8µl di HindIII, 10µl di buffer B e 32µl di H₂O sterile. La miscela di reazione di linearizzazione per la ribosonda senso era costituita da: 26.7µl di DNA plasmidico, 6µl di Xho, 10µl di buffer H e 57.3µl di H₂O sterile. Le reazioni sono state condotte a 37°C per 2h.

Successivamente per eliminare eventuali proteine contaminanti che potrebbero creare problemi nei passaggi successivi, alla miscela di reazione contenente i plasmidi linearizzati sono stati aggiunti 25µl di TE 1x, 2,5µl di proteinasi K (10mg/µl), 2,5µl di SDS 10x e H₂O sterile per un volume totale di 250µl. La miscela è stata riscaldata ad una temperatura di 42°C per 30'.

Si è effettuata, quindi, un'estrazione con un volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) ed una seconda estrazione con un volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1), agitando vigorosamente e centrifugando ad ogni passaggio a 14000rpm

per 3' con centrifuga PK121R della ALC dotata di rotore T527 e recuperando il supernatante per il passaggio successivo. Infine il DNA plasmidico è stato precipitato aggiungendo 1µl di glicogeno carrier (20mg/ml), 0.1 volumi di Na-Acetato 3 M, pH 5.2 e 2.5 volumi di etanolo assoluto, ed incubando per 30' a -80°C.

Successivamente è stata effettuata una centrifugazione a 14000 rpm per 30' a 4°C. Eliminato il supernatante, il DNA precipitato è stato lavato con etanolo al 70% in H₂O depe preraffreddato, ricentrifugato, eliminato nuovamente il supernatante ed infine i campioni di DNA plasmidico linearizzati con Xho e Hind III sono stati risospesi in 10µl di H₂O depe ciascuno.

Aliquote di ognuno dei campioni sono analizzate su gel di agarosio 1% in TAE 1x per valutarne la concentrazione per confronto con un marker di peso molecolare, ed è risultata per il DNA plasmidico linearizzato con l'enzima di restrizione Hind III o con Xho rispettivamente pari a 1.5 e 0.6µg/µ l.

La trascrizione *in vitro* è stata effettuata utilizzando il "kit DIG-RNA labeling" fornito dalla ditta Roche.

Con questo sistema è possibile marcare gli RNA messaggeri prodotti *in vitro* usando la digossigenina, un composto steroideo, isolato dalla pianta *Digitalis planaria*; che funziona come aptene legato covalentemente, attraverso un braccio spaziatore contenente undici atomi di carbonio, alla posizione C-5 dell'UTP, uno dei precursori della sintesi di RNA.

Il precursore DIG-UTP verrà incorporato nel frammento di RNA neosintetizzato poiché riconosciuto come un comune nucleotide dalle RNA polimerasi utilizzate, producendo così sonde di RNA marcati.

Per produrre gli RNA messaggeri, antisenso e senso, sono state dunque preparate le seguenti miscele di reazione:

Reazione per sintesi sonda antisenso

1 µg di DNA plasmidico linearizzato con Hind III,
2 µl di tampone di trascrizione 10x (tabella 4) ,
2 µl di miscela di dNTP 10x con UTP-digossigenina,
0.5 µl di inibitore delle RNAsi 20 U/µl,
2 µl di T7 RNA polimerasi 20 U/µl
ed H₂O trattata con depc, fino a raggiungere il volume finale di 20 µl.

Reazione per sintesi sonda senso

1 µg di DNA plasmidico linearizzato con XhoI,
2 µl di tampone di trascrizione 10x (tabella 4),
2 µl di miscela di dNTP 10x con UTP-digossigenina,
0.5 µl di inibitore delle RNAsi 20 U/µl,
2 µl di SP6 RNA polimerasi 20 U/µl,
ed H₂O trattata con depc, fino a raggiungere il volume finale di 20 µl.

Le reazioni di sintesi sono state condotte alla temperatura di 37°C per 2h, successivamente sono stati aggiunti 2 µl di DNasi I (10 U/µl), priva di attività RNasica, ed il tutto incubato ancora a 37°C per 15' per rimuovere il DNA stampo. Le reazioni, infine, sono state bloccate mediante aggiunta di 2µl di EDTA 0.2 M pH 8.0 in H₂O depc. La purificazione delle ribosonde è stata effettuata mediante cromatografia ad esclusione molecolare utilizzando le colonnine mini Quick Spin RNA della Roche che contengono la resina sephadex G-50 in tampone STE 1x (tabella4). Il passaggio delle miscele di

reazione in queste colonnine permette di eliminare l'eccesso di UTP-Dig e degli altri nucleotidi non incorporati. Dopo aver eliminato l'eccesso di tampone che bagna la resina per centrifugazione a 1000g per 1', le due miscele di reazione sono state diluite in tampone STE 1x ad un volume finale di 70 μ l e caricate al centro di due colonnine ciascuna contenuta in un tubo sterile. Dopo la fase di centrifuga a 1000g per 4' sono state prelevate due aliquote per ciascuna ribosonda di 1 e 2 μ l e poi si è aggiunto un volume di formammide a ciascuna ribosonda prima di conservarle a -80°C. Le aliquote da 1 μ l delle ribosonde sono state caricate su gel di agarosio al 1% in TBE 1x pH 6.5 in H₂O depc (tabella2) per verificarne la qualità. Le aliquote da 2 μ l sono state invece utilizzate per la quantizzazione delle ribosonde come descritto nel successivo paragrafo.

Quantizzazione delle ribosonde

Per valutare la concentrazione degli RNA, prodotti per trascrizione *in vitro*, è stato utilizzato un saggio immuno enzimatico, che prevede l'uso di anticorpi anti-digossigenina coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina. Una volta avvenuta l'interazione tra l'anticorpo ed il corrispondente aptene DIG-UTP, la rivelazione delle molecole di RNA viene realizzata attraverso una successiva reazione colorimetrica catalizzata dalla fosfatasi alcalina. Tale enzima in presenza di due substrati, il 5-bromo 4-cloro 3-indolil-fosfato (BCIP) ed il cloruro di nitroblu di tetrazolio (NBT) catalizza la produzione di un substrato insolubile di colore blu. La concentrazione delle ribosonde deriva dal confronto dell'intensità del colore sviluppato da diverse diluizioni seriali delle stesse con quella corrispondente alle diluizioni seriali di un RNA marcato di controllo di concentrazione nota (100 ng/ μ l).

Sono state effettuate 5 diluizioni seriali 1:4 dell'RNA di riferimento e delle ribosonde nel tampone di diluizione costituito da H₂O depc, SSC 20x (tab. 4) e formammide rispettivamente nel rapporto 5:3:2.

1 µl di ciascuna diluizione è stato caricato su un filtro di nylon Hybond-N+ che si lascia asciugare all'aria. Il filtro è stato, quindi, esposto a radiazioni UV per consentire all'RNA di legarsi.

Successivamente il filtro è stato lavato in SSC 2x per 2', equilibrato per 30' in tampone 2 (tab.4), e quindi incubato, a temperatura ambiente sotto agitazione per 1h, in una diluizione 1:5000 di anticorpo anti-DIG AP 0.75 U/µl (Roche) nello stesso tampone 2.

L'eccesso d'anticorpo è stato allontanato con due lavaggi di 15' ciascuno con il tampone 1, MBT 1x (tab.4). Il filtro è stato poi equilibrato per 5' nel tampone di rivelazione AP (tab.4) e, successivamente, incubato al buio nella soluzione di rivelazione così composta:

10ml tampone AP

35µl di BCIP 50mg/ml(Roche)

45µl di NBT 100mg/ml (Roche)

Il precipitato colorato comincia a formarsi dopo pochi minuti, e la reazione, seguita a vista, è stata bloccata dopo 10', lavando il filtro sotto acqua corrente.

Dall'analisi delle intensità delle macchie dei campioni rispetto all' RNA marcato di controllo è stato possibile valutare la concentrazione della sonde che è risultata pari a 15 ng/µl sia per la sonda antisenso che senso.

Ibridazione *in situ* “whole mount” per gli stadi larvali

L'ibridazione *in situ* su larve a vari stadi di sviluppo di *C. intestinalis* è stata effettuata con le ribosonde senso e antisense per la NOS marcate con digossigenina, preparate come descritto nei paragrafi precedenti. Al fine di preservarne la morfologia, le larve ai vari stadi di sviluppo sono state fissate per 90' a temperatura ambiente in tampone MOPS 0.1 M, pH 7.5 (tab. 4) contenente 4% paraformaldeide e 0.5 M NaCl. Dopo la fissazione le larve sono state sottoposte a 2 lavaggi da 10' ciascuno in PBS 1x (tab.4), e disidratati mediante 2 passaggi da 15' rispettivamente in etanolo 25, 50, 70%, ed infine conservati fino all'uso in 70% alcol etilico a -20°C.

Fase di pre-ibridazione:

Aliquote di larve, per ogni esperimento d'ibridazione *in situ*, sono stati idratati mediante una serie di passaggi in alcol a concentrazione decrescente (2x50%, 2x30%), ed infine equilibrati in PBS 1x contenente 0.1% Tween-20 (PBT). Lo schema d'idratazione prevedeva due passaggi per ogni concentrazione di etanolo (50%, 30%), il primo per 15' ed il secondo per 10', e 3 passaggi da 8' in PBT. Successivamente le larve sono state post-fissate in 4% paraformaldeide in PBS per 1h, di seguito lavate 3 volte per 5' in PBT e poi incubate a 37° C in PBT contenente Proteinasi K della Roche per 30'. Le concentrazioni di proteinasi K utilizzate sono state ottimizzate per i diversi stadi di sviluppo larvale come segue:

Early, middle, e late larva: pK 0.8µg/ml

larve in metamorfosi: pK 0.7µg/ml

Il trattamento con la proteasi suddetta serve per aumentare l'accessibilità all' RNA messaggero bersaglio digerendo eventuali proteine ad esso legate. Dalla digestione con la proteinasi K fino all'incubazione con le ribosonde, il protocollo prevede condizioni di sterilità assoluta, quindi l'uso di materiale sterile monouso, privo di RNAsi, e soluzioni e tamponi sterili preparate in H₂O depc.

Dopo la digestione con proteasi, le larve sono state sottoposte di nuovo a fissazione per 1h a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4 % in tampone PBS, e, quindi, a 3 lavaggi da 5' in PBT.

Allo scopo di diminuire ibridazioni aspecifiche degli RNA, gli embrioni sono stati sottoposti a 3 lavaggi da 10' con anidride acetica 0.25 % e 0.1 M di trietanolamina pH 8.0 in H₂O depc.

Dopo tre lavaggi di 5' ciascuno in PBT a temperatura ambiente, le larve, pronte per l'ibridazione, sono state incubate in una soluzione PBT: miscela di ibridazione (tabella 4) nel rapporto 1:1 per 10' a temperatura ambiente, poi 10' nella sola soluzione di ibridazione a temperatura ambiente, ed infine per 1h a 55°C nella stessa soluzione di ibridazione.

Fase di ibridazione:

La reazione d'ibridazione è stata condotta a 55° C per circa 16h nella stessa miscela d'ibridazione in presenza della sonda antisenso o senso in concentrazione 0.4µg/ml. Prima di aggiungere le sonde alla miscela di ibridazione queste sono state denaturate a 95°C per 3'. Per evitare possibili ibridazioni aspecifiche, il giorno successivo sono state effettuate una serie di lavaggi variando la temperatura e le condizioni di salinità. Quindi i campioni sono stati sottoposti a lavaggio a 55°C secondo il seguente schema:

a) due volte per 15' in 4x SSC, 50% formammide, 0.1% Tween-20;

b) due volte per 15' in 2x SSC, 50% formammide, 0.1% Tween-20.

Successivamente i campioni sono stati lavati tre volte per 10' a 37°C in tampone A (tab.4). Per eliminare l'eccesso di ribosonda non legata ai corrispondenti mRNA endogeni, gli embrioni sono stati trattati per 30' a 37°C con RNasi A (20 µg/ml), diluita in tampone A, quindi ancora lavati in tampone A per 15' a 37°C.

A questo punto è stata eseguita un'altra serie di lavaggi nelle seguenti condizioni: a) 1 volta per 20' in SSC 2x, 50% formammide, 0.1% Tween-20, a 55°C b) 2 volte per 15' in SSC 0.5x, 50% formammide, 0.1% Tween-20 a 55°C; c) un lavaggio a temperatura ambiente in SSC 0.5x :PBT 1x (1:1) per 15'; d) 4 lavaggi in PBT 1x per 5' a temperatura ambiente.

Immunoreazione e rivelazione:

Le larve sono state di seguito equilibrate per 30' a temperatura ambiente in PBT e quindi posti in una miscela di reazione contenente l'anticorpo anti-DIGcongiugato con la fosfatasi alcalina (Roche) diluito 1:2000 in PBT. Dopo incubazione per la notte a 4°C con leggera agitazione, i campioni sono stati lavati a temperatura ambiente come segue: a) un lavaggio da 10' in PBT; b) 3 lavaggi da 20' in PBT; c) 2 lavaggi da 30' in PBT; d) 2 lavaggi da 10' nel tampone AP (tabella 4). Per rivelare i trascritti della NOS legati alla ribosonda antisenso, marcata con digossigenina e riconosciuti dall'anticorpo anti DIG coniugati con fosfatasi alcalina, sono stati forniti gli opportuni substrati che vengono convertiti dalla fosfatasi alcalina in un precipitato di colore blu. I tempi di formazione del

precipitato sono condizionati dalla quantità di anticorpo legatosi e, quindi, indirettamente dal tipo di sonda utilizzata.

La reazione d'ibridazione è stata evidenziata incubando le larve in 1ml di tampone AP contenente 4.5µl. di NBT (Roche) e 3.5µl. di BCIP (Roche), per tempi variabili da 3 a 24h, secondo gli stadi larvali, e l'efficienza di trascrizione e marcatura delle ribosonde.

La reazione colorimetrica, seguita al microscopio ad intervalli regolari, è stata bloccata lavando gli embrioni tre volte per 15' in PBT.

L'osservazione e la documentazione fotografica sono state condotte utilizzando un microscopio ottico AxioImager (Zeiss).

Ibridazione *in situ* per lo stadio early juvenile

L'ibridazione *in situ* sulle early juveniles nello stadio di rotazione tardivo di *C. intestinalis* è stata effettuata con le ribosonde senso e antisenso marcate con digossigenina seguendo lo stesso protocollo sopra indicato con le seguenti modifiche:

Fase di pre-ibridazione:

Early juvenile: pK 0.85µg/ml

La pre-incubazione nella soluzione di ibridazione è stata condotta a 48°C.

Fase di ibridazione:

La reazione d'ibridazione è stata condotta a 48°C per circa 16h nella stessa miscela d'ibridazione in presenza della sonda antisenso o senso in concentrazione 0.2µg/ml.

Rivelazione e localizzazione dell'NO endogeno in diversi stadi di sviluppo larvale e nei primi stadi di metamorfosi

La localizzazione *in vivo* dell'NO prodotto dall'enzima NOS nei diversi stadi di sviluppo larvale e nei primi stadi di metamorfosi fino ad early juveniles è stata condotta mediante l'utilizzo di un derivato della fluoresceina il 4-ammino-5-metilammino-2',7'-difluoresceindiacetato (DAF-FM-DA, Molecular Probes). Questo composto non fluorescente, è permeabile e diffonde passivamente attraverso le membrane biologiche. All'interno della cellula tale composto viene rapidamente de-esterificato ad opera dell'esterasi intracellulari e reagisce rapidamente con l'NO per formare un benzotriazolo fluorescente. Il nuovo composto formato può essere facilmente rivelato mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza dotato degli appositi filtri. I valori massimi delle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione specifiche per il benzotriazolo prodotto sono: $\lambda_{ecc}= 495\text{nm}$, $\lambda_{em}= 515\text{nm}$.

Larve a vari stadi di sviluppo ed early juveniles sono state incubate al buio a temperatura ambiente per 20' sotto agitazione in acqua di mare filtrata in presenza di una concentrazione 5 μM di DAF-FM-DA. Successivamente sono stati effettuati 6 lavaggi in acqua di mare da 5' ciascuno per allontanare l'eccesso di reattivo e per favorire la completa de-esterificazione del DAF-FM-DA in DAF-FM che rapidamente reagisce con l'NO. Dopo i lavaggi le larve natanti sono state sedate con mentolo per facilitarne l'osservazione e poi sia per le larve che per le juveniles si è proceduto alla rivelazione mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza AxioImager della Zeiss dotato di filtri adatti per la fluoresceina ($\lambda_{ecc}= 470\pm 40\text{ nm}$ $\lambda_{em}= 525\pm 50\text{ nm}$).

Successivi esperimenti sono stati condotti per rivelare la diminuzione o l'aumento *in vivo* della produzione di NO incubando larve alla schiusa in H₂O di mare filtrata a 18°C in presenza di una concentrazione 1mM di inibitore della NOS, N^G-nitro-L-arginina (L-NA), o 1mM dell'inibitore dell'arginasi, N^G-idrossi-nor-L-arginina (nor-NOHA). Inibendo l'arginasi, l'enzima che compete con la NOS per lo stesso substrato, si ottiene un aumento della biodisponibilità della L-arginina, che può essere utilizzata dall'enzima NOS per la produzione di NO. Dopo 6-8 ore di incubazione, è stata osservata, con uno stereomicroscopio Olympus, una significativa differenza nel numero di larve in ritrazione e nel grado di ritrazione della coda delle larve trattate con i due inibitori rispetto ai controlli (larve incubate solo in H₂O di mare filtrata). Le larve trattate con gli inibitori L-NA, nor-NOHA e i corrispondenti controlli sono state incubate con DAF-FM-DA seguendo il protocollo sopra descritto.

Variazione dei livelli di NO in larve e studio dell'effetto sulla metamorfosi

Diminuzione della produzione di NO

Allo scopo di studiare l'effetto prodotto sul processo di metamorfosi di *Ciona intestinalis* in seguito alla diminuzione dei livelli endogeni di NO, larve appena schiuse sono state incubate solo in H₂O di mare filtrata (controllo) a 18°C oppure in H₂O di mare in presenza di diverse concentrazioni (0.1, 1, 5µM) dell'inibitore della NOS, N^G-nitro-L-arginina (L-NA, Sigma) o dell'isomero ottico inattivo D-NA (Sigma) in concentrazione 5µM. Dopo 24 ore di trattamento sono stati esaminati, con uno stereomicroscopio Olympus, gli individui presenti nelle piastre di Petri con griglia di conteggio e suddivisi

in due categorie, larve a coda lunga o parzialmente ritratta ed early juveniles nello stadio iniziale di rotazione. In grafico sono state riportate le percentuali delle due categorie di individui e i dati sono stati espressi come $media \pm s.e.m.$ La significatività di tutti i trattamenti rispetto al controllo e tra loro è stata valutata mediante il metodo ANOVA utilizzando il software per l'analisi statistica SYSTAT 7.0 (Systat Software Inc., California, USA). Il numero di esperimenti effettuati è 12.

Aumento dei livelli di NO

Fonte esogena di NO:

In una prima serie di esperimenti l'aumento dei livelli di NO *in situ* è stato realizzato mediante l'utilizzo di un donatore di NO, il 2-(N,N-dietilammino)-diazenuolato-2-ossido (DEA/NO). Tale composto appartiene alla classe dei diazeniumdiolati (NONOati) che sono stabili in soluzione basica (la soluzione stock viene preparata in 10mM NaOH e conservata a -20°C) ma si decompongono in soluzione a valori più bassi di pH. Questa reazione di decomposizione prevede il rilascio di due moli di NO e una mole dell'ammina controparte, la dietilammina. Inoltre la quantità e il tempo di rilascio dell'NO dipendono fortemente dalle condizioni di pH, temperatura e dalla natura dell'ammina controparte. Il DEA/NO ha un tempo di semivita a 37°C a pH 7.4 di 4'. Tenendo conto del breve tempo di rilascio del donatore, larve appena schiuse sono state trattate a tempi diversi (0, 1h, 1h30') a 18°C aggiungendo ogni volta aliquote di una soluzione stock 100mM di DEA/NO (in 10mM NaOH) in modo che la concentrazione finale di donatore aggiunta fosse pari a 10, 30, e 75µM. Come ulteriore controllo, oltre alle larve incubate solo in H₂O di mare, larve appena schiuse sono state incubate in H₂O di mare a 18°C in presenza di 75µM dimetilammina (ammina controparte). Dopo 24h di

incubazione si è proceduto alla conta degli individui presenti nelle piastre per i diversi trattamenti effettuati come riportato precedentemente per gli esperimenti con L-NA. Il numero di esperimenti effettuati è 10.

Aumento dei livelli endogeni di NO

In una nuova serie di esperimenti è stata aumentata la produzione endogena dell'NO agendo sulla biodisponibilità dell'L-arginina. Quest'ultima è substrato di un altro enzima l'arginasi, per cui è possibile aumentarne la concentrazione *in vivo* inibendo l'enzima che compete con la NOS per lo stesso substrato. Allo scopo larve appena schiuse sono state incubate in H₂O di mare filtrata a 18°C in assenza o in presenza di una concentrazione 300µM dell' inibitore specifico per l' arginasi, N^G-idrossi-nor-L-arginina (nor-NOHA, Calbiochem) (Tenu et al., 1999). Dopo 24 ore di trattamento si è proceduto alla conta degli individui come descritto per L-NA. In grafico sono state riportate le percentuali delle due categorie di individui e i dati sono stati espressi come media ± s.e.m. La significatività del trattamento con nor-NOHA rispetto al controllo è stato valutato mediante il metodo ANOVA utilizzando il software per l'analisi statistica SYSTAT 7.0. Il numero di esperimenti effettuati è 8.

Inibizione della guanilato ciclasi e studio dell'effetto sulla metamorfosi

Per studiare il coinvolgimento del cGMP nel processo di ritrazione della coda, larve appena schiuse sono state incubate in H₂O di mare filtrata a 18°C in presenza di diverse concentrazioni (0.1, 1, 5µM) di inibitore della guanilato ciclasi, 1H-

[1,2,4]ossadiazolo[4,3-a]chinossalin-1-one (ODQ). Dopo 24 ore di trattamento si è proceduto alla conta degli individui come descritto per L-NA. Anche in questo caso in grafico sono state riportate le percentuali delle due categorie di individui e i dati sono stati espressi come $media \pm s.e.m.$ La significatività di tutti i trattamenti rispetto al controllo e tra loro è stata valutata mediante il metodo ANOVA utilizzando il software per l'analisi statistica SYSTAT 7.0. Il numero di esperimenti effettuati è 10.

Saggio di attività caspasi-3

Per la preparazione dei campioni è stato seguito il seguente protocollo: larve alla schiusa sono state incubate in H₂O di mare filtrata a 18°C in presenza o meno dell'inibitore della NOS, N^G-nitro-L-arginina (L-NA) in concentrazione 20μM, per il tempo necessario (6-8 ore) ad osservare un'evidente differenza morfologica di larve trattate rispetto al basale (larve allevate solo in H₂O di mare filtrata). La differenza è stata valutata paragonando il numero di larve che stavano ritraendo la coda e la percentuale di ritrazione, ovvero il grado di avanzamento del processo. Dopo aver notato una marcata differenza nei due gruppi di larve, si è proceduto alla raccolta delle larve centrifugando il contenuto di ciascuna piastra a bassa velocità per 8'. I pellets dei campioni trattati e i rispettivi basali sono stati poi rapidamente congelati fino al momento dell'estrazione delle proteine. L'estrazione è stata condotta risospendendo i pellets nel tampone di lisi costituito da: 100mM HEPES pH 7.4, 20% glicerolo, 0.5mM EDTA, 5mM ditioneitrato, 1mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 10μg/ml pepstatina A, 10μg/ml aprotinina, 20μg/ml leupeptina. L'omogenizzazione è stata effettuata sonicando i campioni 2 volte per 20'' al 20% della massima potenza con un Sonifier 250 (Branson Ultrasonic

Corporation). Successivamente gli omogenati sono stati centrifugati a 14000rpm per 10' a 4°C con una centrifuga PK121R della ALC dotata di rotore T527. Un'aliquota dei supernatanti è stata utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica mentre i campioni sono stati rapidamente congelati a -80°C fino al momento del saggio. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il metodo spettrofotometrico del Kit Protein Assay della Bio-Rad e utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU 65. Il saggio si basa sull'utilizzo di un substrato costituito da una particolare sequenza peptidica (DEVD \equiv Asp-Glu-Val-Asp) a cui è legata un derivato della curarina, la 7-ammino-4-trifluorometil curarina (AFC). In seguito a digestione proteolitica del substrato Ac-DEVD-AFC (Alexis) da parte dell'enzima attivo caspasi-3 viene rilasciato nel mezzo di reazione l'AFC, la cui concentrazione è stata determinata mediante uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 50B ($\lambda_{ecc}= 395$ nm and $\lambda_{em}=530$ nm). La quantizzazione dell'attività enzimatica è stata effettuata mediante l'utilizzo di una retta di taratura per l'AFC. In ciascuna miscela di reazione sono stati aggiunti 10 μ g di proteine totali per ciascun campione, 50 μ M di substrato Ac-DEVD-AFC, 50 μ l di tampone di reazione (100mM HEPES, 20% v/v glicerolo, 0.5mM EDTA, 5mM DTT), H₂O bidistillata per un volume totale di 100 μ l. Le miscele condotte in triplicato per ciascun campione sono state incubate per 30' a 37°C e poi effettuate le letture spettrofluorimetriche. Per ciascun campione sono stati effettuati tre bianchi caricando al posto del campione proteico un pari volume di tampone di lisi. L'attività caspasi è stata calcolata come nmol di AFC prodotto/minuto/ μ g di proteine. I dati sono stati espressi come media \pm s.d. La significatività del trattamento rispetto al basale è stata valutata mediante il metodo Student *t*-test utilizzando il programma Excel. Il numero di esperimenti effettuati è 5.

RISULTATI

Espressione temporale del gene NOS e Arginasi durante lo sviluppo larvale e le prime fasi di metamorfosi

In una fase preliminare del lavoro di dottorato l'attenzione è stata rivolta all'analisi del genoma di *Ciona* (<http://genome.jgi-psf.org>, Dehal et al., 2002) che ha evidenziato la presenza di un unico gene che codifica per l'enzima NOS (genewise.674.4.1), che si è rivelato simile alle tre isoforme umane, con un'identità del 54% con la NOS neuronale (Hall et al., 1994), del 50% con la NOS endoteliale (Strausberg et al., 2002) e del 47% con la macrofagica (Adams et al., 1998).

In figura 13 è riportato un confronto tra la NOS di *Ciona* con l'isoforma neuronale umana, con cui presenta maggior similarità. Dal confronto delle sequenze realizzato col programma BLASTP è possibile osservare che la NOS di *Ciona* presenta un'alta percentuale di identità per i domini di legame dei diversi cofattori rispetto alla NOS neuronale umana.

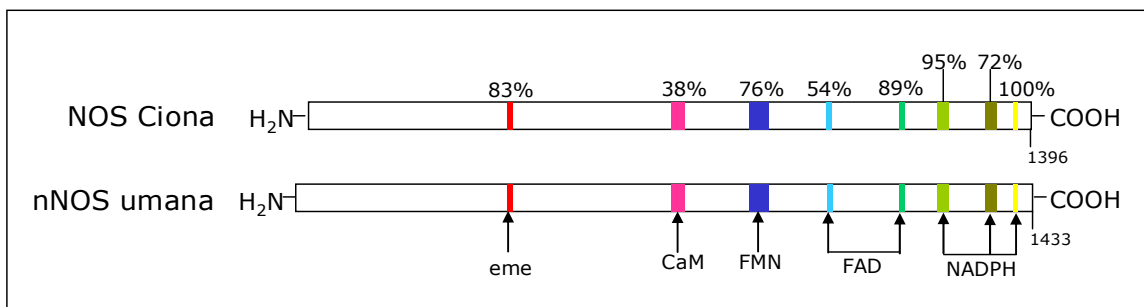


Figura 13 Rappresentazione schematica della NOS di *Ciona* e dell'isoforma neuronale umana. In figura sono riportate le percentuali di identità per le sequenze dei domini di legame dei cofattori della NOS di *Ciona* rispetto all'isoforma neuronale umana.

E' importante inoltre ricordare che i livelli di NO *in vivo* dipendono dalla biodisponibilità della L-arginina che è substrato anche di un altro enzima l'arginasi (figura 14).

Quest'ultimo compete con la NOS per lo stesso substrato e catalizza la biosintesi della L-ornitina e urea (Wu e Morris, 1998).

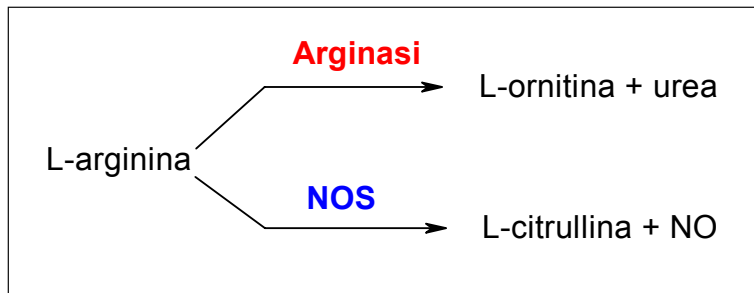


Figura 14 Gli enzimi NOS e Arginasi competono per lo stesso substrato.

In diversi sistemi biologici, è stato dimostrato che l'inibizione selettiva dell'arginasi, mediata dalla N^G-idrossi-nor-L-arginina (nor-NOHA) (Tenu et al., 1999), è un sistema utile per aumentare la biodisponibilità della L-arginina, che può essere utilizzata dalla NOS per produrre una maggior quantità di NO in diversi tessuti e cellule (Berkowitz et al., 2003; Maarsingh et al., 2005). Nell'uomo esistono due diverse isoforme dell'arginasi, che sono il prodotto di due differenti geni ed hanno diversa localizzazione (Wu e Morris, 1998). Queste sono l'isoforma I presente principalmente nel citoplasma delle cellule epatiche e l'isoforma II mitocondriale non epatica. Dall'analisi del genoma di *Ciona* è stato identificato, anche in questo caso, un unico gene che codifica per l'arginasi (ci0100135911), simile alle isoforme I e II umane, che presenta rispettivamente un'identità del 45 e 49% con l'isoforma I e II (Strausberg et al., 2002).

Uno degli obiettivi iniziali del lavoro di dottorato è stato finalizzato allo studio dell'espressione temporale dei geni NOS e arginasi mediante la tecnica quantitativa di Real Time PCR per verificare se entrambi i geni erano espressi negli stessi stadi di

sviluppo larvale e le prime fasi di metamorfosi fino ad early juveniles nell'ascidia *Ciona intestinalis*.

Negli ultimi anni la Real Time PCR si è rivelata una tecnica estremamente sensibile ed efficace per una precisa quantizzazione degli RNA messaggeri, che può essere relativa o assoluta. Per effettuare una quantizzazione relativa dei livelli di espressione dei geni di interesse, NOS e arginasi, è stato necessario normalizzare i dati di espressione rispetto ad un gene di controllo interno, un riferimento endogeno, al fine di correggere per piccole differenze di quantità e/o di qualità del cDNA che veniva utilizzato come template nelle reazioni di PCR. Generalmente come controllo endogeno viene scelto un gene "housekeeping", il cui livello di espressione rimane costante durante i diversi stadi di sviluppo esaminati nelle condizioni sperimentali in esame. Allo scopo di identificare un possibile riferimento interno, in una prima fase del lavoro, sono state cercate nel genoma di *Ciona* le sequenze di diversi possibili geni "housekeeping", tra cui la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH), l'ubiquitina e due geni che codificano per le proteine ribosomiali S-18 e S-27 (RP-S18 e RP-S27). La scelta di questi geni è stata dettata sia dall'utilizzo in diversi sistemi biologici della GADPH e dell'ubiquitina come riferimenti interni e dall'utilizzo da parte di Olinski et al (2006) dei geni RP-S18 e RP-S27 come riferimenti interni per l'analisi dell'espressione genica per alcuni stadi di sviluppo nell'ascidia *Ciona intestinalis*.

Tra tutti questi geni esaminati i più promettenti sono risultati l'ubiquitina, la RP-S18 ed RP-S27, i cui livelli di espressione allo stadio uova e nei diversi stadi di sviluppo larvale e di metamorfosi sono confrontati in figura 15. Nel grafico sull'asse delle ordinate è riportato il valore di C_T per lo stadio in esame, questo valore indica il ciclo della reazione di amplificazione nel quale il segnale di fluorescenza supera il valore di soglia, tale

valore è indicativo del livello di espressione perché correla fortemente con il numero di copie del cDNA template di partenza.

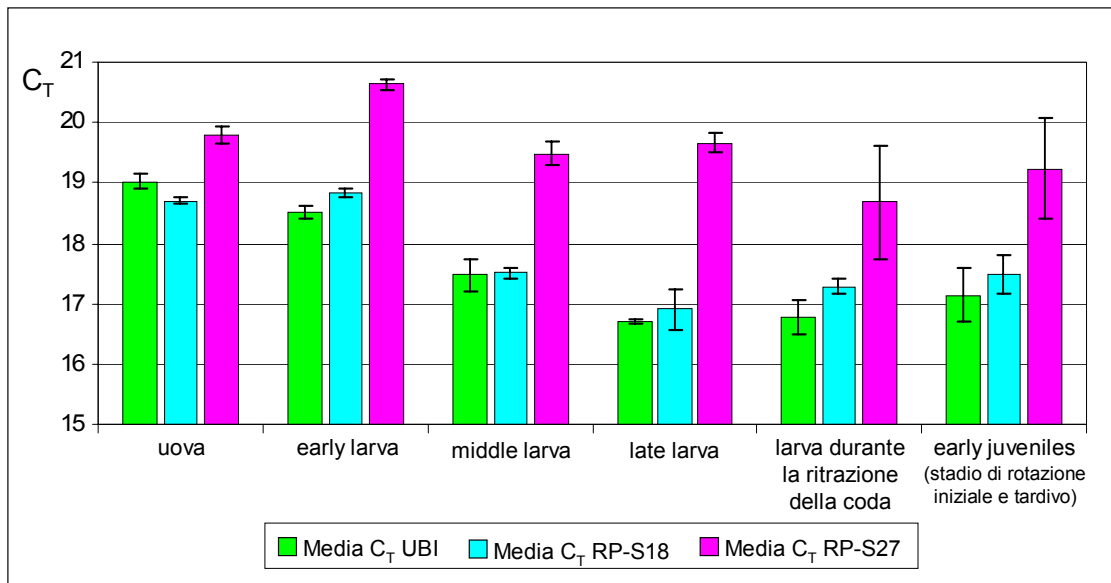


Figura 15 Confronto dei livelli di espressione temporale dei geni ubiquitina, RP-S18 e RP-S27. I dati sono espressi come media \pm s.d.

Dall'analisi del grafico in figura 15 risulta chiaro che il migliore riferimento interno è il gene che codifica per la proteina ribosomiale S-27 in quanto i suoi livelli di espressione non variano significativamente negli stadi esaminati e possono essere considerati costanti.

Al fine di effettuare un'accurata quantizzazione, il passo successivo è stato assicurarsi che le efficienze delle reazioni di PCR dei geni di interesse, NOS e arginasi, e del controllo, RP-S27, per i diversi campioni di cDNA ai vari stadi di sviluppo fossero simili. A tale scopo le efficienze di reazione sono state calcolate riportando in grafico i valori di C_T in funzione del log cDNA di partenza. Sono stati scelti due stadi di sviluppo, early larva ed early juvenile, e sono state condotte per ogni gene e per ciascuno stadio reazioni in duplicato per tutte le diluzioni del cDNA di partenza.

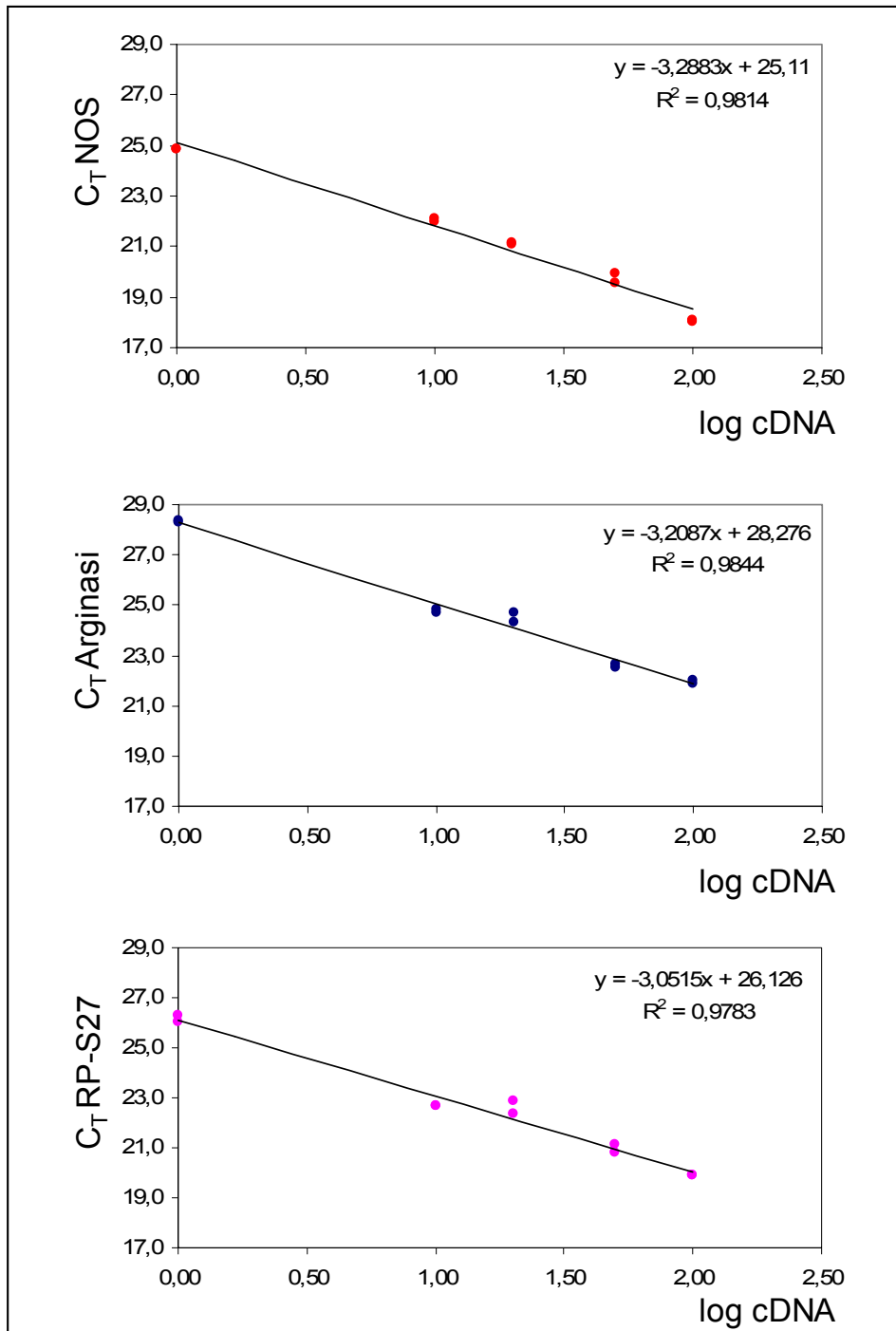


Figura 16 Grafici per il calcolo dell'efficienza per i geni NOS, Arginasi e RP-S27 per lo stadio early larva ($y=mx + c$, $Eff=10^{-1/m}$).

I punti riportati nei grafici in figura 16, relativi allo stadio early larva, sono stati interpolati con rette dei minimi quadrati e il valore dell'efficienza per ciascun gene è stato

calcolato sulla base dei coefficienti angolari (m) delle rette, utilizzando la seguente formula: $Eff = 10^{-1/m}$. I valori di efficienza calcolati per la NOS, l'arginasi e RP-S27 sono pari a 2.0, 2.0, 2.1 rispettivamente e, per ciascun gene in esame, sono risultati uguali per i due stadi di sviluppo esaminati. I valori calcolati per i tre geni sono praticamente uguali tra loro e al valore teorico dell'efficienza e sono indicativi della buona scelta degli oligos per l'amplificazione e dell'ottimizzazione delle condizioni di reazione.

Su questa base è stato possibile valutare i profili di espressione degli RNA messaggeri della NOS e dell'arginasi mediante l'utilizzo della tecnica quantitativa di Real-Time PCR. Maggiori dettagli sul protocollo seguito e sull'elaborazione dei dati sono riportati nella sezione Materiali e Metodi.

Tutti i dati, riportati in figura 17, sono stati normalizzati rispetto al riferimento interno, per ciascuno stadio. Inoltre i dati dell'arginasi sono riportati relativamente all'espressione della NOS, e sia i valori di espressione dell'arginasi che della NOS sono riportati in percentuale rispetto al valore massimo di espressione trovato. Tale massimo di espressione corrisponde al valore dell'espressione del trascritto della NOS nelle uova.

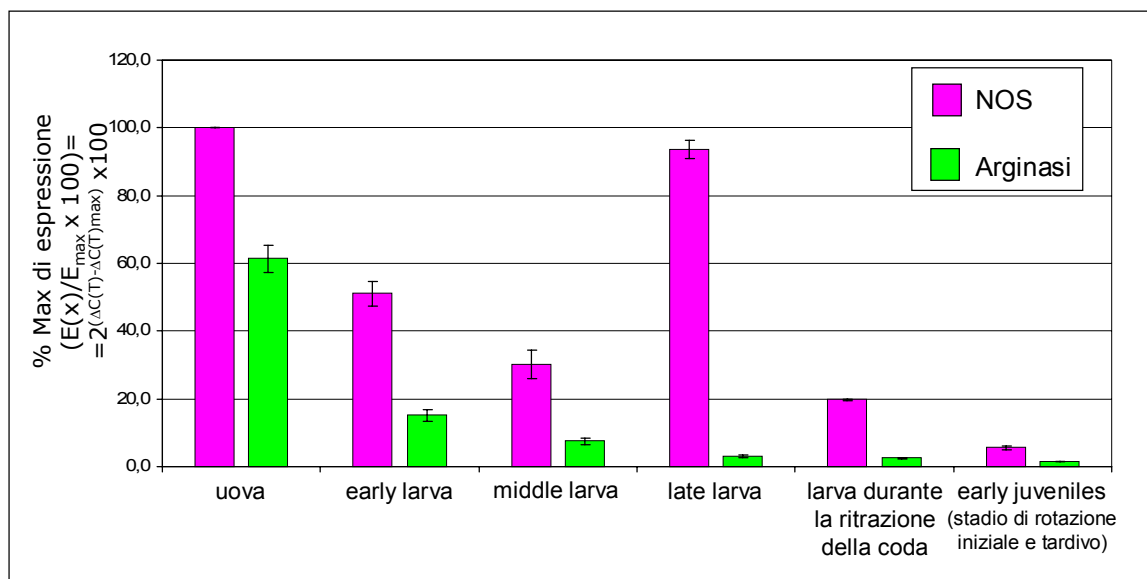


Figura 17 Espressione temporale (Real Time PCR) dei geni NOS e Arginasi durante lo sviluppo larvale e i primi stadi di metamorfosi dell'ascidia *Ciona intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.d.

Analizzando il grafico in figura 17 è possibile notare che sia la NOS che l'arginasi sono presenti come trascritti materni. Il valore massimo di espressione trovato corrisponde all'espressione della NOS allo stadio di uova non fecondate. I livelli di espressione del gene NOS variano significativamente durante lo sviluppo larvale e i primi stadi di metamorfosi. Diminuisce dallo stadio early larva a middle larva e poi aumenta raggiungendo un valore del 94% del massimo a late larva, che è lo stadio che precede immediatamente la metamorfosi. Nelle fasi successive di metamorfosi, l'espressione dell'mRNA NOS diminuisce raggiungendo il valore più basso allo stadio iniziale/tardivo di rotazione delle early juveniles, quando il processo di ritrazione della coda è ormai completato. Per quanto riguarda il gene l'arginasi, la sua espressione allo stadio uova è pari al 61% del massimo della NOS. Durante tutti gli stadi di sviluppo esaminati il gene arginasi è sempre espresso e i suoi livelli di espressione sono sempre più bassi rispetto al gene NOS, diminuendo gradualmente dallo stadio early larva fino ad early juveniles allo stadio iniziale/tardivo di rotazione.

Espressione spaziale del gene NOS durante lo sviluppo larvale e i primi stadi di metamorfosi

Il pattern di espressione spaziale del gene NOS, durante gli stadi di sviluppo larvale e le prime fasi di metamorfosi fino ad early juveniles, è stato analizzato mediante la tecnica di ibridazione *in situ*.

In una prima serie di esperimenti, condotti su larve a diversi stadi di sviluppo, è stata utilizzata una ribosonda senso e antisenso marcata con UTP-digossigenina preparata a partire da un clone di cDNA per la NOS (ID: R1CiGC14k10) appartenente ad una

collezione di cloni di cDNA di *Ciona intestinalis* gentilmente concessa dal Prof. Noriuki Satoh del Dipartimento di Zoologia, Graduate School of Science, Sakyo-ku, Kyoto, Giappone. Questo clone, di ~500 cb, è costituito da una piccola regione codificante di 66 cb e dalla completa regione 3'UTR. Purtroppo l'utilizzo della ribosonda antisenso preparata a partire da questo clone non ha prodotto alcun segnale di ibridazione.

In una fase successiva è stato preparato un nuovo clone di cDNA per la NOS da utilizzare per la sintesi di una ribosonda marcata con UTP-digossigenina che avesse una maggiore specificità. A questo scopo, sono stati scelti una coppia di oligo sulla base della sequenza genomica della NOS di *Ciona* utilizzati per amplificare un inserto di 1192 cb, corrispondente alla sola regione codificante vicina alla regione 3'UTR, che è stato poi inserito nel vettore di clonaggio. Le ribosonde senso e antisenso preparate a partire dal nuovo clone di cDNA per la NOS sono state utilizzate per una nuova serie di esperimenti di ibridazione *in situ*.

Allo stadio di early larva (Fig.18A), che corrisponde al primo stadio larvale che si osserva alla schiusa, l'espressione del gene NOS è ristretta alla sola regione anteriore della testa, il segnale è visibile lateralmente alla posizione dei futuri palpi, a livello delle cellule dell'epidermide in posizione sia ventrale che dorsale, come è evidente dalla sezione trasversale semifine (Fig.18B). Allo stadio di sviluppo intermedio, early-middle larva (Fig.18C) il segnale di ibridazione è ancora presente nella parte anteriore della testa e un nuovo segnale, indicato dalla freccia, appare nella regione centrale della testa, localizzato nella parte posteriore della vescicola sensoria.

Allo stadio middle larva (Fig.18D, E) il segnale di ibridazione della NOS non è più visibile nell'epidermide della porzione anteriore della testa, mentre il segnale che interessa la regione posteriore della vescicola sensoria si estende in cellule disposte a formare un circolo. Un ulteriore segnale è visibile nelle fibre nervose che partono dalla

vescicola sensoria e si estendono posteriormente al collo fino a raggiungere il ganglio viscerale.

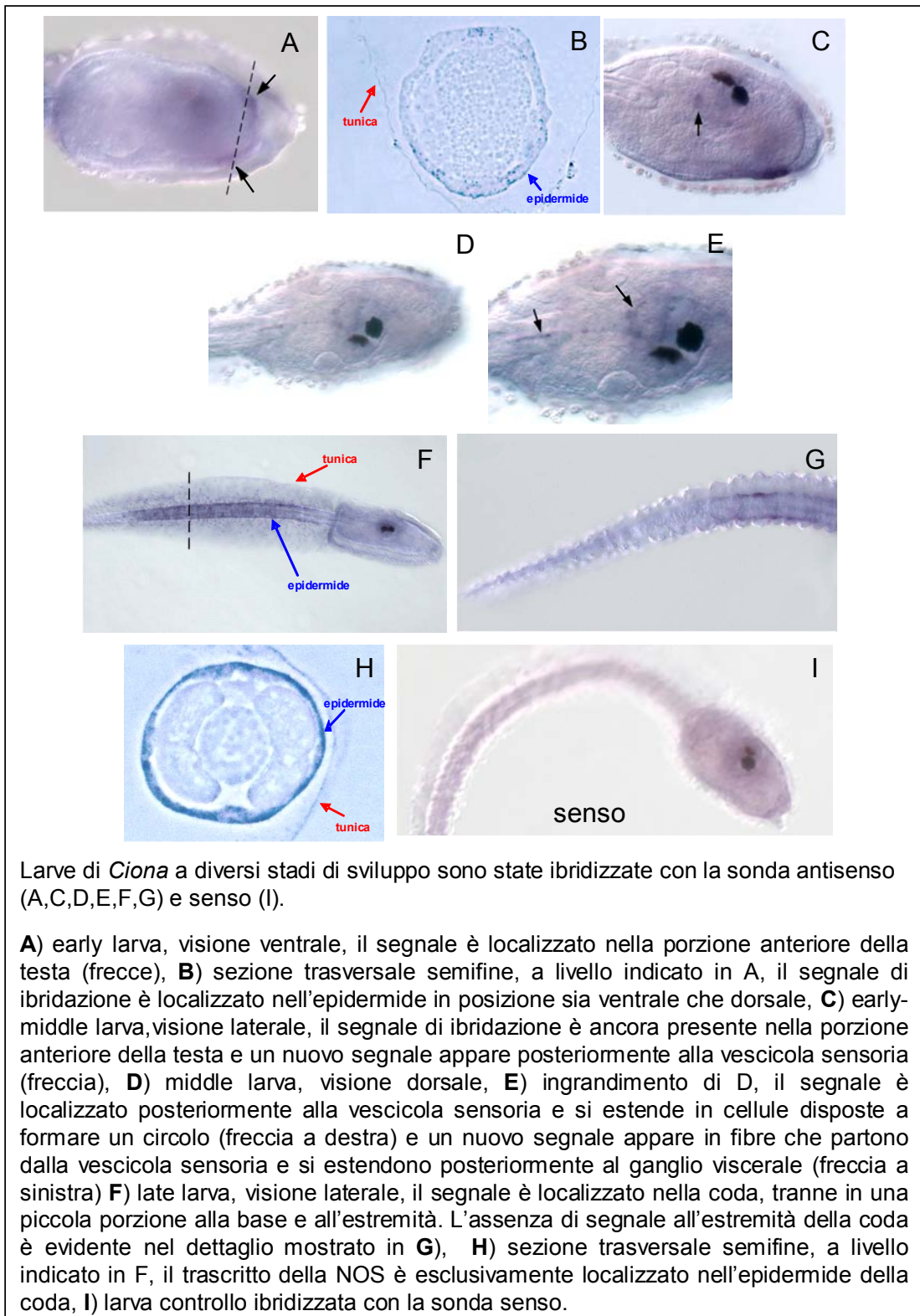


Figura 18 Espressione spaziale del gene NOS (ibridazione *in situ*, whole mount) per diversi stadi di sviluppo larvale di *Ciona intestinalis*.

Allo stadio late larva (Fig.18F), lo stadio che precede immediatamente la metamorfosi, il segnale di ibridazione non è più visibile nel sistema nervoso centrale, ma è esclusivamente localizzato nella coda, tranne in una piccola porzione alla base e alla estremità. L'assenza di segnale all'estremità della coda risulta evidente nel dettaglio mostrato in figura 18G.

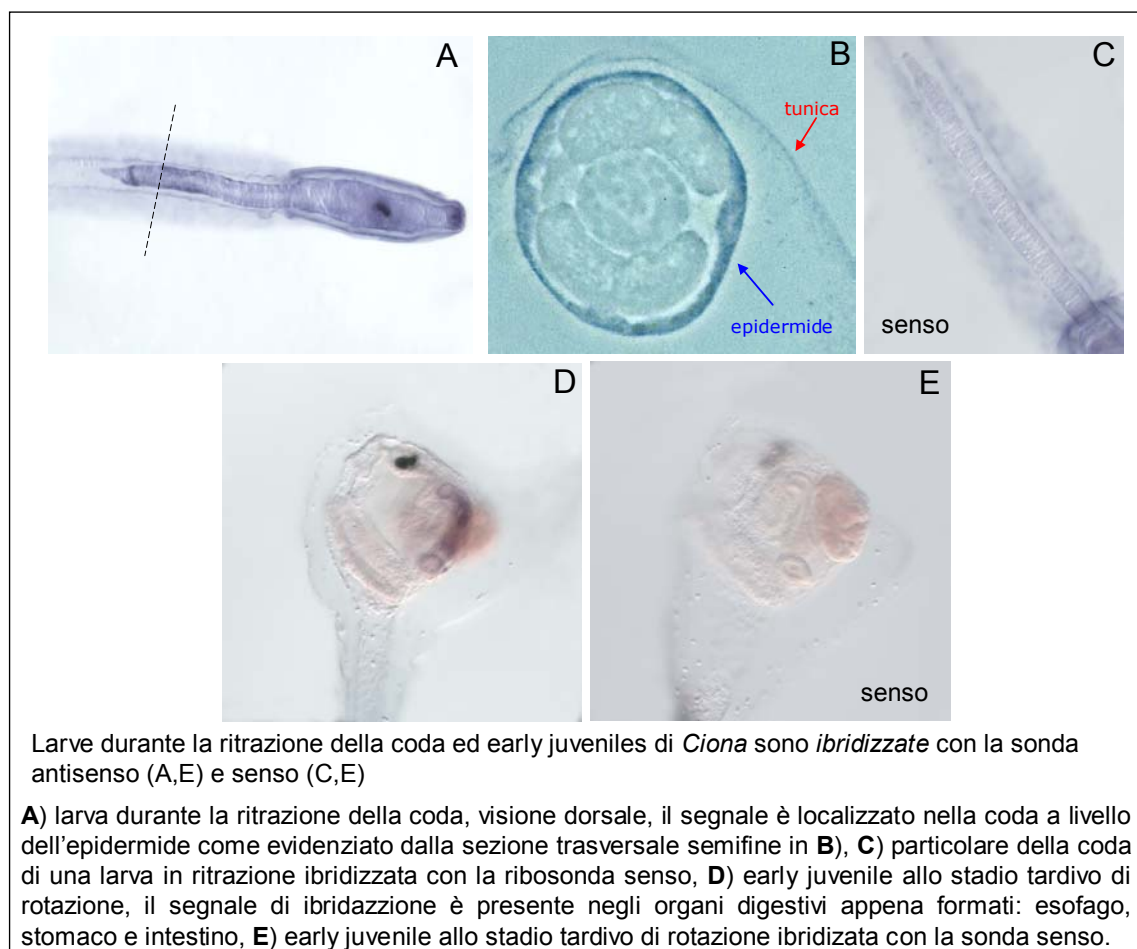


Figura 19 Espressione spaziale del gene NOS (ibridazione *in situ*, whole mount) durante le prime fasi di metamorfosi di *Ciona intestinalis*.

L'analisi della sezione trasversale semifine (Fig.18H) ci ha permesso di effettuare una precisa localizzazione del segnale che interessa esclusivamente le cellule dell'epidermide. Durante tutte le fasi di ritrazione della coda, il trascritto della NOS continua ad essere espresso nella coda esclusivamente nell'epidermide (Fig.19A), come evidenziato

dalla sezione trasversale semifine (Fig.19B). In questo caso il segnale è più forte nella regione terminale della coda, in particolare alla sua estremità, dove avviene il processo apoptotico di ritrazione della coda, descritto da Chambon et al. (2002). Dopo la completa ritrazione della coda, le early juveniles iniziano una fase di rotazione di 90°C dell'organismo e sottostanno ad un completo rimodellamento del corpo, che prevede la distruzione o la trasformazione di vecchi organi o primordi in nuovi organi e tessuti dell'individuo adulto (Cloney, 1978). Per le early juveniles allo stadio di rotazione tardivo (Fig.19D), un nuovo segnale di ibridazione della NOS è evidente nei nuovi organi digestivi appena formati: esofago, stomaco, intestino. Gli esperimenti condotti su larve (Fig.18I e Fig.19C) ed early juveniles (Fig.19E) con la sonda senso per la NOS, utilizzata come controllo, non hanno prodotto alcun segnale.

Rivelazione e localizzazione dell'NO in larve ed early juveniles

In una fase successiva del lavoro di dottorato l'attenzione è stata rivolta allo studio della rivelazione *in vivo* dell'NO. La localizzazione dell'NO endogeno durante i diversi stadi di sviluppo larvale e di metamorfosi fino ad early juveniles è stata rivelata mediante l'utilizzo di un metodo fluorescente. Il metodo si basa sull'uso di un derivato della fluoresceina, il 4-ammino-5-metilammino-2',7'-difluoresceindiacetato (DAF-FM-DA). Questo composto permea rapidamente attraverso le membrane biologiche e in seguito a deacetilazione ad opera dell'esterasi intracellulari viene convertito in DAF-FM (Fig.20), dopodiché tale composto reagisce con l'NO per formare un benzotriazolo fluorescente (Kojima et al., 1999). Con questo metodo è quindi possibile bloccare l'NO sotto forma di

un nuovo composto fluorescente, la cui formazione è stata seguita utilizzando un apposito microscopio a fluorescenza AxioImager della Zeiss dotato dei filtri per la fluoresceina. La presenza di NO *in vivo* è stata rivelata trattando larve e juveniles ai diversi stadi di sviluppo per 30 minuti in H₂O di mare in presenza di DAF-FM DA 5μM, e dopo una serie di lavaggi, le larve sono state sedate con mentolo per facilitare le osservazioni.

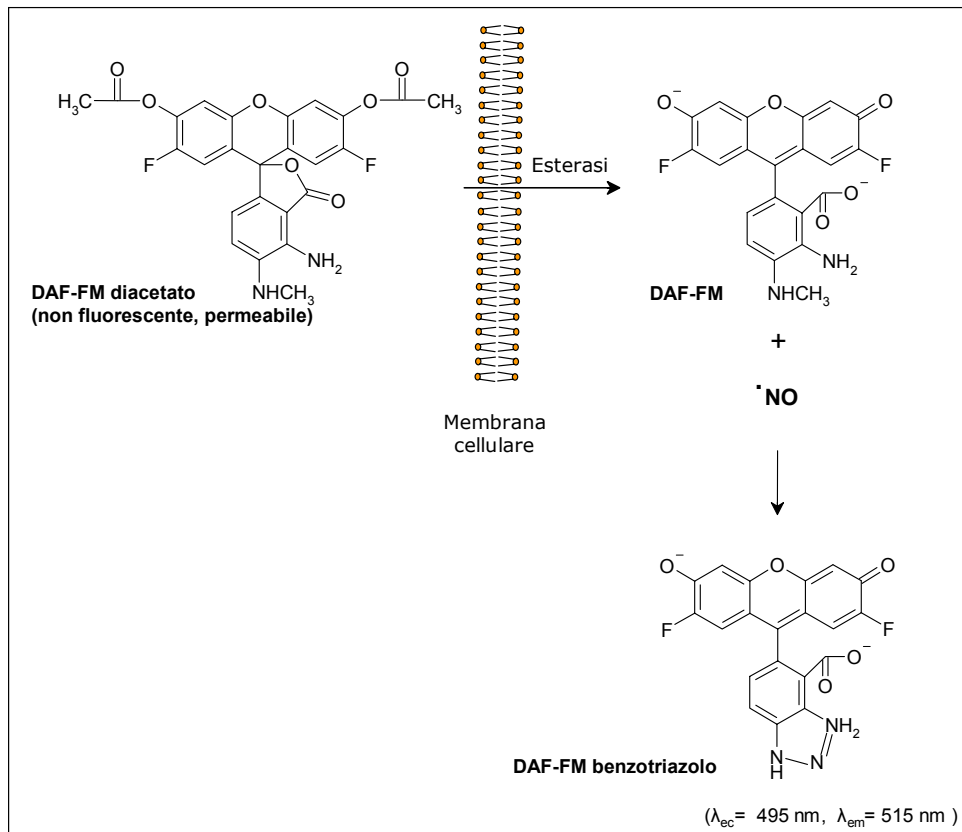


Figura 20 Metodo fluorimetrico per rivelare l'NO in sistemi biologici.

I risultati ottenuti in questi esperimenti sono riportati in figura 21 e 22.

Allo stadio middle larva (Fig.21A), un segnale fluorescente diffuso per l'NO è visibile solo nella parte posteriore della vescicola sensoria, in accordo con l'esperimento di ibridazione *in situ*.

Allo stadio late larva (Fig.21C), il segnale è presente sia nella parte posteriore della vescicola sensoria che nella coda. A questo stadio il segnale nella coda appare localizzato

in diversi strati cellulari. In alcune larve il segnale è stato osservato nei muscoli, come è evidente dall'analisi della sovrapposizione (Fig.21E) dell'immagine a fluorescenza (Fig.21C) con la corrispondente in campo chiaro (Fig.21D). In altre late larve il segnale nella coda è apparso localizzato sia nell'epidermide che nelle cellule della notocorda. Anche in questo caso l'esatta individuazione degli strati cellulari in cui è presente il segnale per l'NO è stato determinato dall'analisi della sovrapposizione (Fig.21H) dell'immagine fluorescente (Fig.21F) con la corrispondente in campo chiaro (Fig.2G). I dati ottenuti in questo esperimento sono in buon accordo con i risultati degli esperimenti di ibridazione *in situ*, da cui sappiamo che il trascritto della NOS allo stadio late larva è presente nelle cellule dell'epidermide della coda, dove avviene la produzione del gas NO. Dalle immagini di rivelazione dell'NO è evidente, inoltre, che l'NO, diffonde rapidamente dall'epidermide agli strati cellulari più interni della coda, muscoli e notocorda. Le differenze nelle immagini ottenute a questo stadio rispecchiano quindi sia la rapida e dinamica diffusione del gas che la variabilità individuale delle larve esaminate.

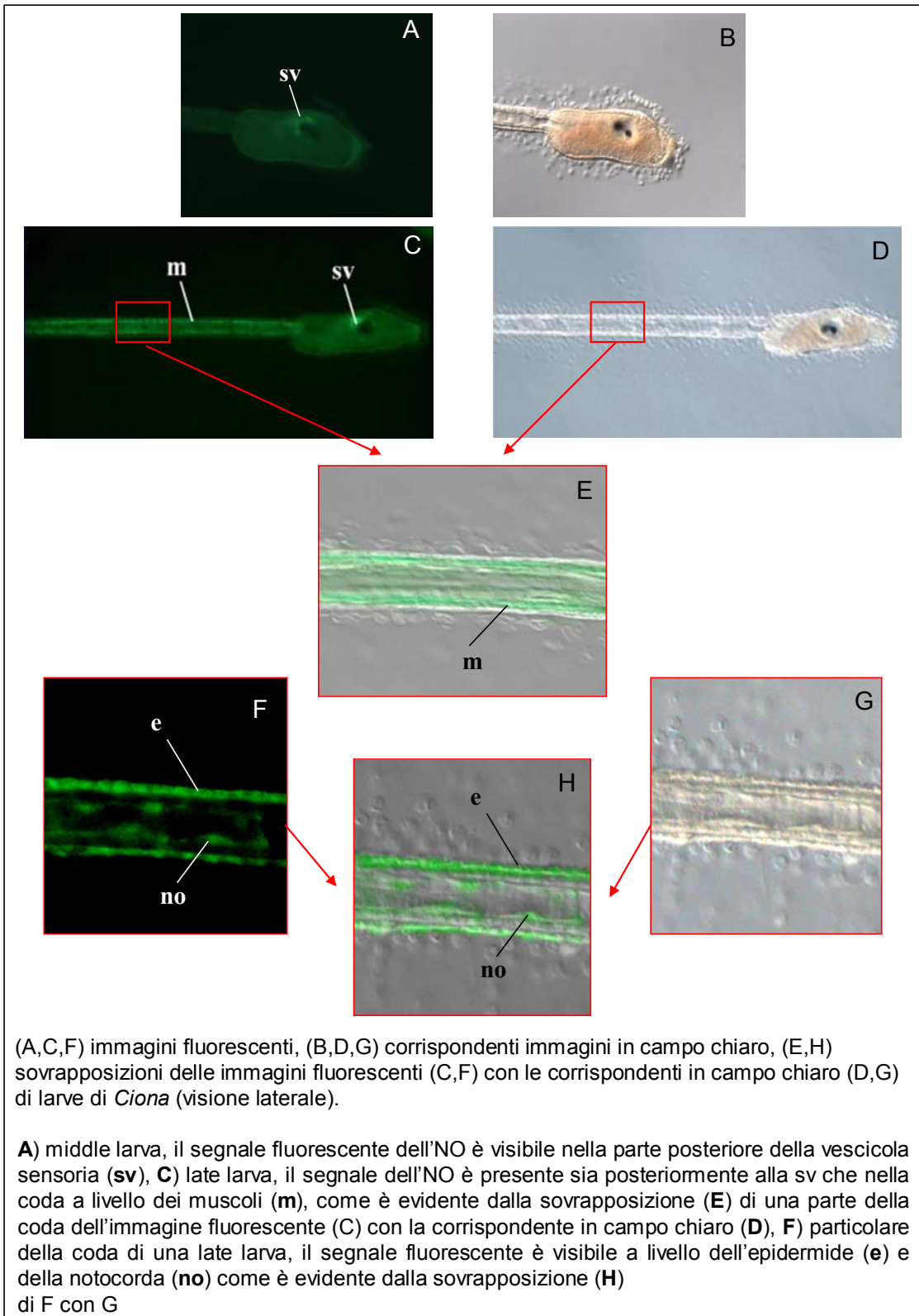


Figura 21 Localizzazione dell'NO endogeno mediante l'indicatore DAF-FM DA in larve di *Ciona* a diversi stadi di sviluppo.

All'inizio del processo di ritrazione della coda (Fig.22A) il segnale fluorescente per l'NO è presente sempre a livello delle cellule epidermiche e della notocorda ed è forte e diffuso all'estremità della coda, proprio in corrispondenza della regione dove è stato descritto avere inizio il processo apoptotico caspasi-3 dipendente (Chambon et al., 2002). Durante tutte le fasi di ritrazione (Fig.22C) il segnale appare più debole e diffuso in particolar modo nella parte terminale della coda. Infine, quando il processo di ritrazione della coda è ormai terminato, allo stadio iniziale di rotazione delle early juveniles (Fig.22E) il segnale fluorescente per l'NO è presente nei nuovi organi digestivi in formazione, esofago, stomaco ed intestino in buon accordo con i risultati ottenuti dall' ibridazione *in situ*.

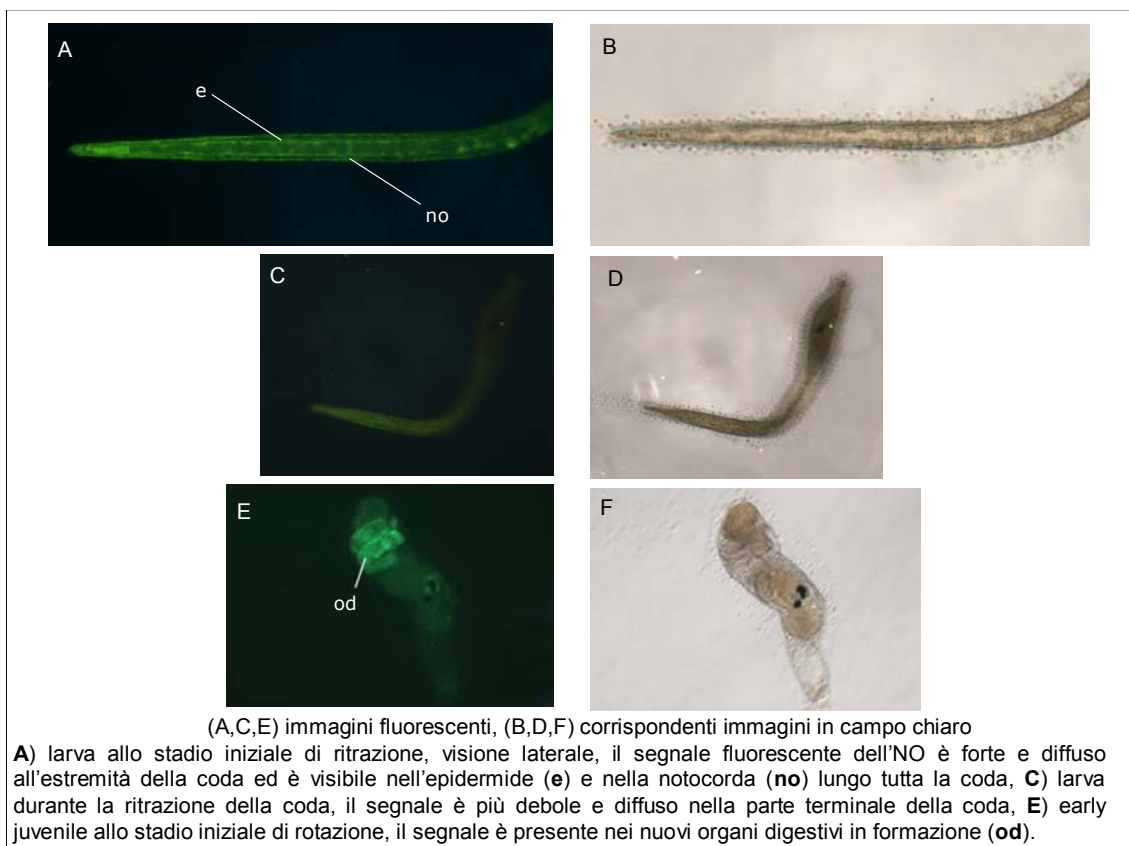


Figura 22 Localizzazione dell'NO endogeno mediante l'indicatore DAF-FM DA nei primi stadi di metamorfosi di *Ciona*.

Studio dell'effetto prodotto sulla metamorfosi in seguito a variazione dei livelli di NO

La presenza dell'NO nella coda di larve di *Ciona intestinalis* a livello delle cellule dell'epidermide, dei muscoli e della notocorda, prima e durante tutte le fasi di ritrazione, ci ha indotto ad investigare il possibile ruolo svolto dall'NO nelle prime fasi della metamorfosi di questa ascidia. A tale scopo sono stati variati i livelli di NO ed è stato studiato l'effetto prodotto sulla metamorfosi.

Differenti approcci sono stati utilizzati per variare i livelli di NO. Per diminuire i livelli endogeni di NO, larve appena schiuse sono state trattate con l'inibitore specifico per la NOS, N^G-nitro-L-arginina (L-NA). L'effettiva inibizione dell'enzima e quindi l'abbassamento dei livelli endogeni di NO è evidente dall'esperimento condotto col DAF-FM DA riportato in figura 23 in cui vengono confrontate larve allo stadio iniziale di ritrazione incubate alla schiusa in acqua di mare in presenza o meno dell'inibitore della NOS L-NA in concentrazione 1mM. Dall'analisi delle immagini riportate in figura 23 è evidente che larve allo stadio iniziale di ritrazione trattate con L-NA non mostrano alcun segnale fluorescente per l'NO rispetto alle larve in condizioni basali, indicando quindi, la completa inibizione dell'enzima.

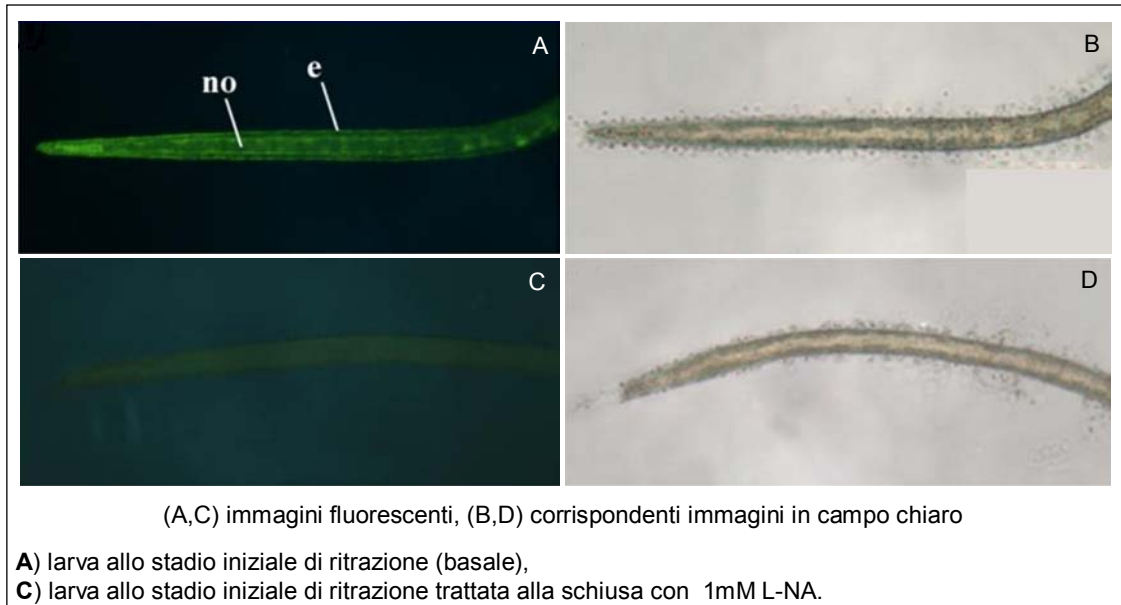


Figura 23 Confronto dei livelli endogeni di NO in larve allo stadio iniziale di ritrazione, trattate alla schiusa in presenza o meno dell'inibitore della NOS L-NA.

Per investigare l'effetto sulla metamorfosi prodotto da bassi livelli endogeni di NO, larve appena schiuse sono state trattate in acqua di mare a 18°C in presenza o meno di diverse concentrazioni di L-NA: 0.1, 1 e 5 μM . Come ulteriore controllo, oltre alle larve allevate solo in acqua di mare, campioni di larve sono state incubate in presenza dell'isomero inattivo sulla NOS N^G-nitro-D-arginina (D-NA) in concentrazione 5 μM nelle stesse condizioni. Dopo 24 h di trattamento sono stati contati gli individui presenti nelle piastre e suddivisi in due categorie, larve a coda lunga o parzialmente ritratta (riportate in rosso nel grafico in Fig.24) ed early juveniles nello stadio iniziale di rotazione (riportate in verde). Dal grafico in figura 24 si osserva che dopo 24 h di trattamento il controllo mostra un 60% di late larva o larve a coda parzialmente ritratta e un 40% di juveniles allo stadio iniziale di rotazione. Invece, alla concentrazione 0.1 μM di inibitore, si osserva un considerevole aumento delle early juveniles a coda completamente ritratta, che raggiungono un valore pari al 62% del totale degli individui rispetto ad un valore del 40% del controllo. Ad una concentrazione di inibitore 10 volte superiore l'effetto è più

marcato con un 76% di early juveniles rispetto ad un 40% nel controllo. La situazione rimane pressochè invariata a concentrazioni più alte di inibitore e ciò è indicativo del raggiungimento di un plateau a concentrazione 1µM.

L'osservazione delle larve per tempi più lunghi di incubazione, fino a 48h di trattamento, hanno dimostrato che una diminuzione della produzione di NO accelera il processo di metamorfosi senza influenzare lo sviluppo successivo delle juveniles, che procede normalmente. Il trattamento delle larve con 5µM D-NA, l'isomero inattivo sulla NOS, non ha prodotto alcun effetto.

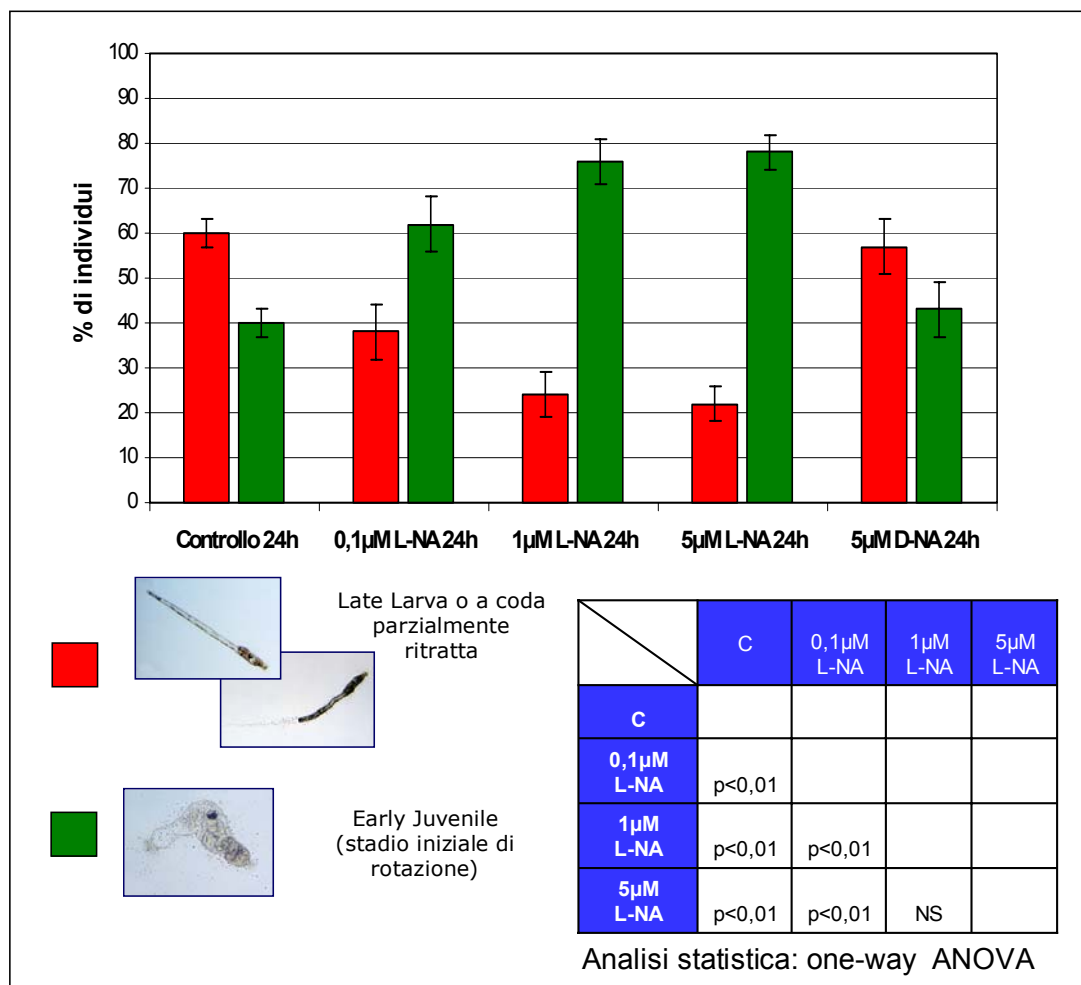


Figura 24 Effetto prodotto sulla metamorfosi di *Ciona intestinalis* in seguito a diminuzione dei livelli endogeni di NO. I dati sono espressi come media ± s.e.m. La significatività dei vari trattamenti, riportati in tabella, è stata valutata mediante il metodo one-way ANOVA.

La significatività dei diversi trattamenti rispetto al controllo e tra loro è stata valutata mediante il metodo ANOVA e i valori ottenuti sono stati riportati nella tabella in figura 24. Tutti e tre i trattamenti con L-NA sono risultati altamente significativi rispetto al controllo, gli esperimenti con L-NA 1 e 5 μM sono significativi rispetto a 0,1 μM , mentre 1 e 5 μM L-NA non sono significativi tra loro.

Alla luce di questi risultati l'effetto osservato in questi esperimenti è che una diminuzione dei livelli endogeni di NO determina un'accelerazione del processo di metamorfosi.

In una fase successiva l'attenzione è stata rivolta allo studio dell'effetto prodotto sulla metamorfosi in seguito ad aumento dei livelli di NO.

Per aumentare i livelli di NO sono stati utilizzati due metodi. Inizialmente si è utilizzata come fonte esogena di NO un donatore di NO, il 2-(N,N-dietilammino)-diazenuolo-2-ossido (DEA/NO). Tale composto appartiene alla classe dei diazeniumdiolati (NONOati) che sono stabili in soluzione basica ma si decompongono in soluzione a valori più bassi di pH (Keefer et al., 1996). Il DEA/NO quindi rilascia in acqua di mare (pH \approx 8) due moli di NO e una mole dell'ammina controparte. Tenendo conto del breve tempo di semivita del donatore, che è di circa 4 minuti a 37°C a pH 7.4, larve appena schiuse sono state incubate in acqua di mare a 18°C aggiungendo a tempi diversi (0, 1h, 1h30') aliquote di una soluzione stock 100mM di DEA/NO (in 10mM NaOH) in modo che la concentrazione finale di donatore aggiunta fosse pari a 10, 30, e 75 μM . Come ulteriore controllo, oltre alle larve incubate solo in H₂O di mare, larve appena schiuse sono state incubate in H₂O di mare a 18°C in presenza di 75 μM dimetilammina (ammina controparte). Dopo 24h di incubazione si è proceduto alla conta degli individui presenti nelle piastre per i diversi trattamenti effettuati come riportato precedentemente per gli esperimenti con L-NA. Dopo 24 h di trattamento si è osservato per le larve trattate a diverse concentrazioni di donatore un netto rallentamento del processo di metamorfosi

con alte percentuali di late larve o larve a coda parzialmente ritratta rispetto al controllo. E' da notare che lo stesso effetto è stato osservato per larve trattate in presenza della sola ammina controparte. In base ai risultati ottenuti, non è possibile imputare all'aumento dell'NO l'effetto prodotto sulla metamorfosi, per cui si è deciso di tralasciare l'utilizzo dei donatori di NO. L'utilizzo di questi composti è spesso controverso, sia a causa della difficoltà di controllare la quantità e il tempo di rilascio dell' NO, che dipendono dalle condizioni di pH, T e dalla natura dell'ammina controparte, sia a causa del possibile effetto esercitato dalla ammina controparte che viene rilasciata nel mezzo insieme all'NO.

Successivamente è stato seguito un metodo alternativo volto ad aumentare i livelli di NO endogeni, agendo sulla biodisponibilità del substrato della NOS, L-arginina. Come descritto precedentemente l'L-arginina è substrato anche dell'enzima arginasi e dagli esperimenti di Real Time PCR è emerso che il trascritto dell'arginasi è presente in tutti gli stadi larvali esaminati. Quindi, è stato utilizzato l' inibitore specifico dell' arginasi N^G-idrossi-nor-L-arginina (nor-NOHA), per aumentare la biodisponibilità dell' L-arginina. L'effettivo aumento della produzione di NO endogeno è stata dimostrata attraverso l' esperimento col DAF-FM DA riportato in figura 25 in cui vengono confrontate larve allo stadio iniziale di ritrazione incubate alla schiusa in acqua di mare in presenza o meno dell'inibitore dell' arginasi in concentrazione 1mM. Dall'analisi delle immagini in figura 25 è evidente che larve allo stadio iniziale di ritrazione trattate con 1mM nor-NOHA presentano un segnale fluorescente più forte e diffuso rispetto alle condizioni basali, indicando quindi, l'effettivo aumento dei livelli endogeni di NO. Il rallentamento del processo di metamorfosi, in larve trattate con l'inibitore dell'arginasi, è ulteriormente avvalorato dalla differente morfologia della coda riscontrata in larve trattate con nor-NOHA rispetto al controllo. Nelle larve, in condizioni basali (Fig.25B,

ingrandimento), il processo di cavitazione della coda appare completo. Questo processo interessa le cellule della notocorda che normalmente, poco dopo la schiusa, si allineano longitudinalmente per formare una struttura tubulare allungata. La non completa cavitazione della coda osservata allo stadio iniziale di ritrazione di larve trattate con l'inibitore dell'arginasi (Fig.25D, ingrandimento) indica che in condizioni di alte concentrazioni di NO il processo di allungamento della coda, dovuto alla cavitazione, è incompleto e ritardato rispetto alle condizioni basali.

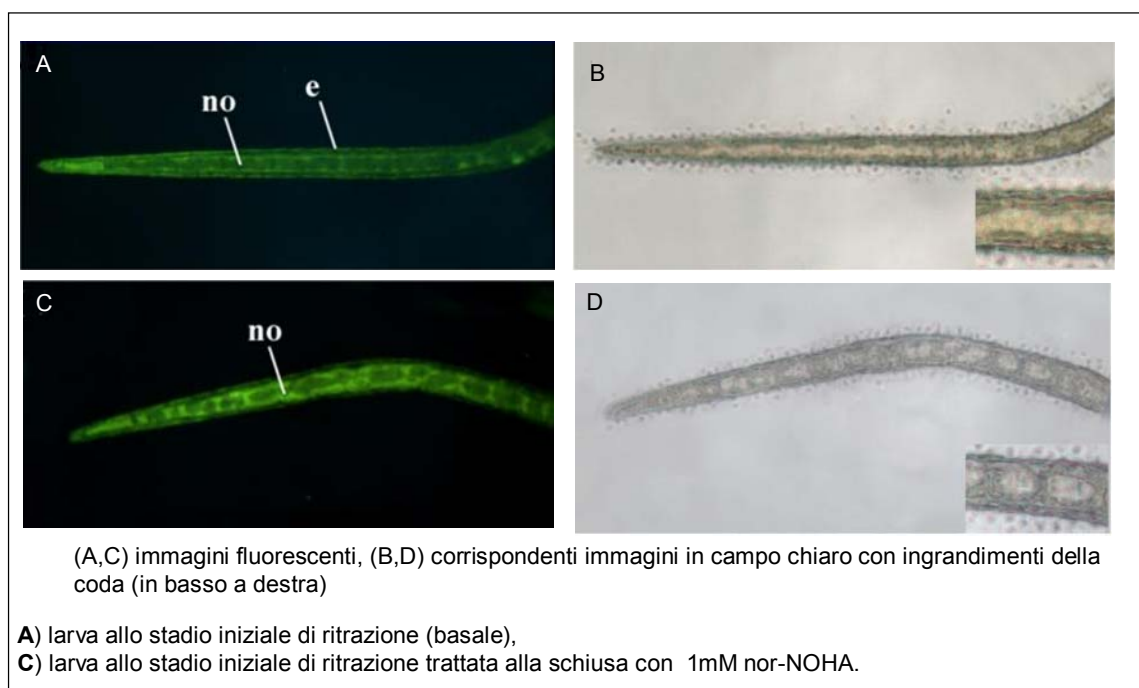


Figura 25 Confronto dei livelli endogeni di NO in larve allo stadio iniziale di ritrazione, trattate alla schiusa in presenza o meno dell'inibitore dell' Arginasi nor-NOHA.

Per investigare l'effetto prodotto sulla metamorfosi in seguito ad aumento della produzione endogena di NO, larve appena schiuse sono state trattate in acqua di mare a 18°C in presenza o meno dell'inibitore dell'arginasi nor-NOHA in concentrazione 300µM (Fig.26). Dopo 24 di trattamento si è osservato un notevole rallentamento del processo di ritrazione della coda, dovuto ad una netta diminuzione delle early juveniles a coda completamente ritratta che raggiungono un valore pari al 13,8% del totale degli individui rispetto ad un valore del 53,8% del controllo.

L'effetto osservato è quindi complementare a quello ottenuto inibendo la NOS.

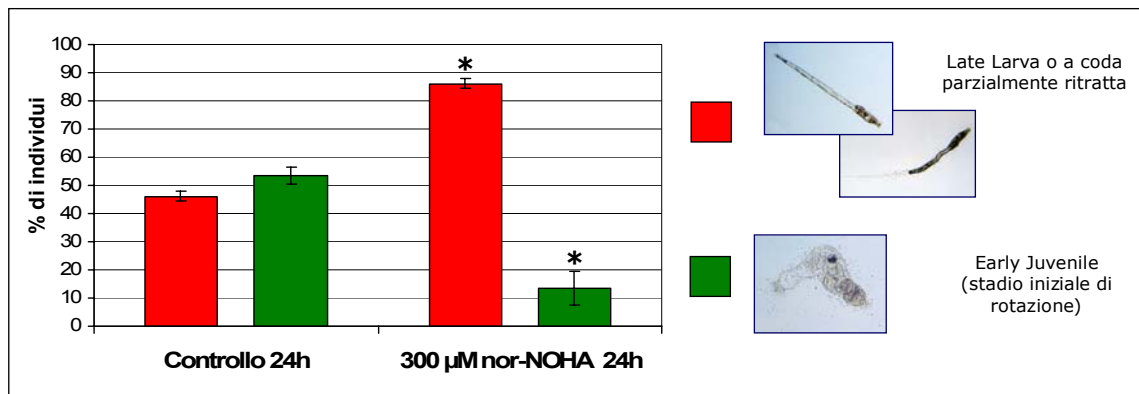


Figura 26 Effetto prodotto sulla metamorfosi di *Ciona intestinalis* in seguito all'aumento dei livelli endogeni di NO. I dati sono espressi come media \pm s.e.m. L'asterico (*) indica la significatività del trattamento con nor-NOHA rispetto al controllo (* $p < 0,01$, one-way ANOVA).

Anche in questo caso l'osservazione delle larve per tempi più lunghi di incubazione, fino a 48h di trattamento, ha dimostrato che un aumento della produzione endogena di NO determina un rallentamento del processo di metamorfosi senza influenzare lo sviluppo successivo delle juveniles, che procede normalmente anche se più lentamente.

Sulla base degli esperimenti fin qui descritti è possibile concludere che l'NO si comporta da modulatore endogeno della metamorfosi nell'ascidia *Ciona intestinalis*, poiché ogni diminuzione o aumento dei livelli endogeni di NO risultano in un'accelerazione o in un rallentamento del processo di metamorfosi, senza influenzare lo sviluppo successivo delle early juveniles.

Coinvolgimento del cGMP nel processo di ritrazione della coda

Ulteriori esperimenti sono stati rivolti allo studio dei possibili meccanismi di trasduzione del segnale e alle possibili molecole bersaglio dell'NO durante il processo di metamorfosi.

Inizialmente è stato verificato se il meccanismo di trasduzione del segnale dell'NO coinvolto nel processo di metamorfosi fosse cGMP dipendente, ovvero derivasse

dall'attivazione da parte dell' NO dell'enzima guanilato ciclastasi responsabile della biosintesi del secondo messaggero cGMP. A tale scopo, larve appena schiuse sono state incubate in acqua di mare a 18°C per 24 h in presenza o meno di diverse concentrazioni dell' inibitore della guanilato ciclastasi, l'1H-[1,2,4]ossadiazolo[4,3-a]chinossalin-1-one (ODQ). Dal grafico in figura 27 è possibile osservare che dopo 24 h di trattamento ad una concentrazione di inibitore 10 µM non si ottiene nessun effetto apprezzabile. L'effetto dell'inibitore è invece evidente a concentrazioni più alte, 50 e 100 µM, dove si osserva un notevole aumento delle percentuali di early juveniles che raggiungono valori pari rispettivamente al 76 e 94 % del totale degli individui contro un 42% del controllo.

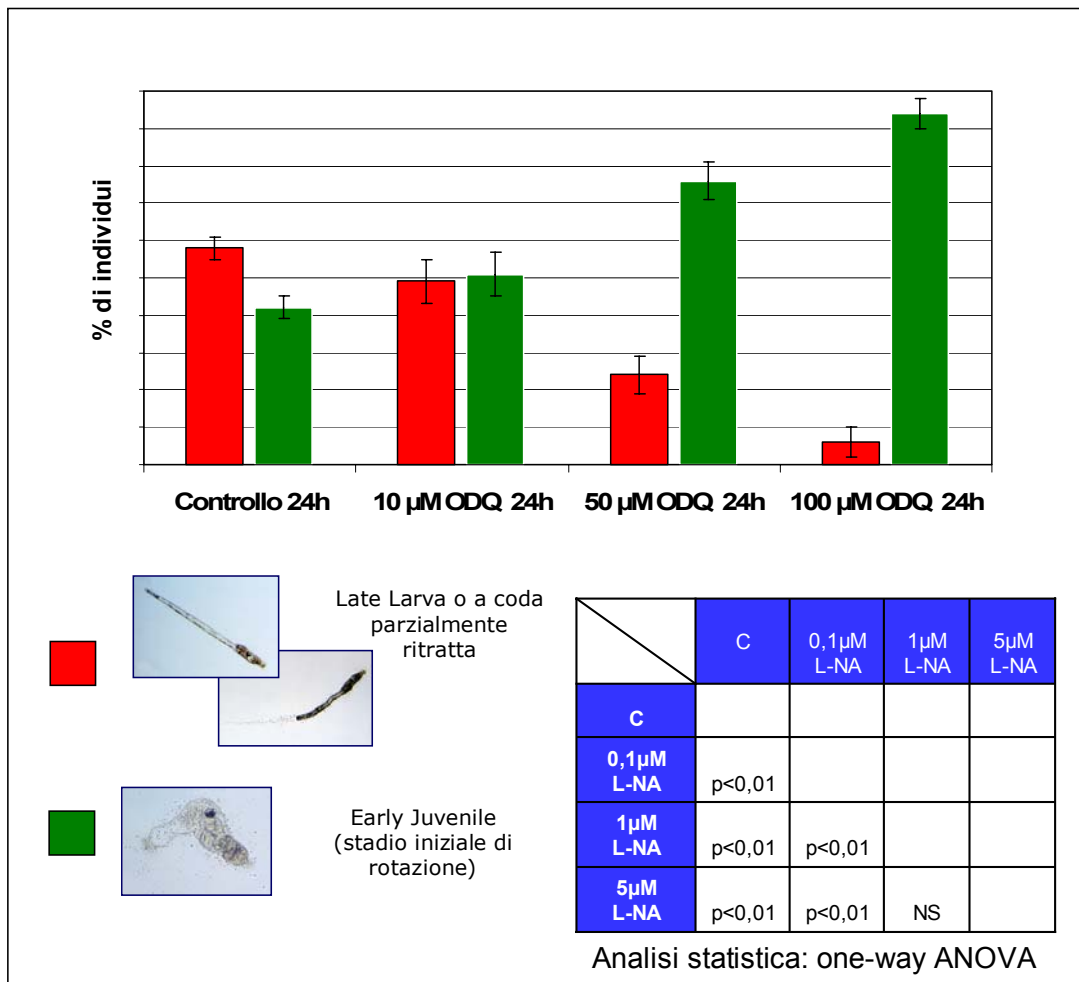


Figura 27 Effetto prodotto sulla metamorfosi di *Ciona intestinalis* in seguito ad inibizione della guanilato ciclastasi. I dati sono espressi come media ± s.e.m. La significatività dei vari trattamenti, riportati in tabella, è stata valutata mediante il metodo one-way ANOVA.

Quindi, l'inibizione della guanilato ciclastasi analogamente all'inibizione della NOS, ha prodotto un'accelerazione del processo di ritrazione della coda. L'osservazione a tempi più lunghi di incubazione ha evidenziato che l'inibizione della guanilato ciclastasi non influenza lo sviluppo delle juveniles.

La significatività dei vari trattamenti è stata valutata mediante il metodo ANOVA e i risultati ottenuti sono stati riportati nella tabella in figura 27. Tutti i trattamenti sono risultati significativi rispetto al controllo e tra di loro tranne l'esperimento a più bassa concentrazione di inibitore.

La caspasi-3 è un possibile bersaglio molecolare dell'NO durante il processo di ritrazione della coda

Studi recenti hanno evidenziato che l'enzima proteolitico caspasi-3 e le altre caspasi esecutrici sono possibili bersagli molecolari dell'NO durante i processi apoptotici (Kim et al., 1997, 1999; Boyd e Cadenas, 2002; Maejima et al., 2005). In letteratura è riportato che l'NO può assumere un ruolo anti-apoptotico inibendo direttamente o indirettamente l'enzima proteolitico caspasi-3 (Kim et al., 1997).

Poiché nel nostro sistema modello *Ciona intestinalis* è stato osservato che una diminuzione dei livelli endogeni di NO, derivante dall'inibizione della NOS con L-NA, determina un'accelerazione del processo di ritrazione della coda, che è un processo apoptotico caspasi-3 dipendente (Chambon et al., 2002), è stato investigato se l'inibizione della NOS produceva un effetto sull'attività caspasi-3. Su questa base è stato condotto un saggio di attività caspasi-3 su omogenati di larve di *Ciona* trattate alla schiusa in presenza o meno dell'inibitore della NOS L-NA. Allo scopo è stato utilizzato l'unico saggio fluorimetrico disponibile in commercio, quello per la caspasi-3 umana, che

recentemente si è rivelato efficace per misurare l'attività caspasi-3 negli embrioni di un altro invertebrato marino, il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Romano et al., 2003). Prima di effettuare il saggio è stata verificata la possibile omologia funzionale tra la caspasi-3 umana e quella di *Ciona*.

Inizialmente è stata effettuata una ricerca nel genoma di *Ciona* che ha evidenziato la presenza di 17 geni che codificano per 17 diverse caspasi, come descritto da Weill et al., 2005. In figura 28 è riportato l'allineamento, realizzato col programma BLASTP, delle sequenze della caspasi-3 umana (GeneBank n. CAC88866) con la caspasi-3 like di *Ciona intestinalis* (CiCASP:jgi|Cioin2|222420|fgenesh3_pg.C_chr_12p000217). La caspasi-3 di *Ciona* è simile alla caspasi-3 umana con un 42% di identità ed inoltre i residui coinvolti nell'attività catalitica, rappresentati nei rettangoli rossi, e quelli coinvolti nel legame al substrato, indicati dai quadrati neri, sono altamente conservati.

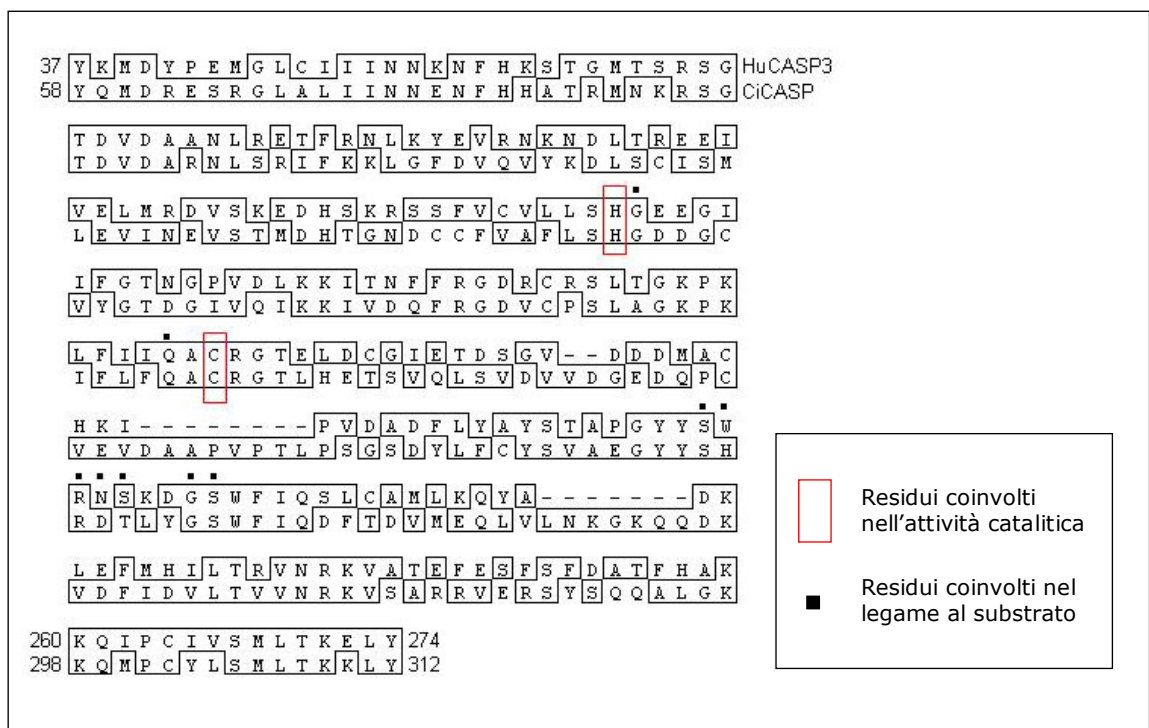


Figura 28 Confronto tra le sequenze amminoacidiche della caspasi-3 umana con la caspasi-3 like di *Ciona*, realizzato con il programma BLASTP.

Sulla base di tutte queste evidenze è risultato ragionevole l'utilizzo di questo saggio fluorimetrico per misurare l'attività caspatica in larve di *Ciona* nelle fasi iniziali di metamorfosi.

Il saggio si basa sull'utilizzo di un substrato costituito da una particolare sequenza peptidica (DEVD \equiv Asp-Glu-Val-Asp) a cui è legata un derivato della curarina, la 7-ammino-4-trifluorometil curarina (AFC). In seguito a digestione proteolitica del substrato Ac-DEVD-AFC da parte dell'enzima attivo caspasi-3 viene rilasciato nel mezzo di reazione l'AFC, la cui concentrazione può essere determinata mediante uno spettrofluorimetro.

Larve alla schiusa sono state incubate in acqua di mare a 18°C in presenza o meno dell'inibitore della NOS L-NA in concentrazione 20 μ M per il tempo necessario ad osservare una netta differenza morfologica nella ritrazione della coda rispetto al controllo (circa 6-8h). Il saggio è stato poi condotto su omogenati di larve come descritto nella sezione Materiali e Metodi. In figura 29 sono riportati i risultati ottenuti per l'attività caspatica. Le larve in condizioni basali mostrano un'attività specifica pari a 0.020 ± 0.011 nmol AFC/min/ μ g, mentre larve trattate con L-NA 20 μ M presentano un valore di attività caspatica pari 0.066 ± 0.014 nmol AFC/min/ μ g, ~ 3 volte maggiore rispetto alle condizioni basali.

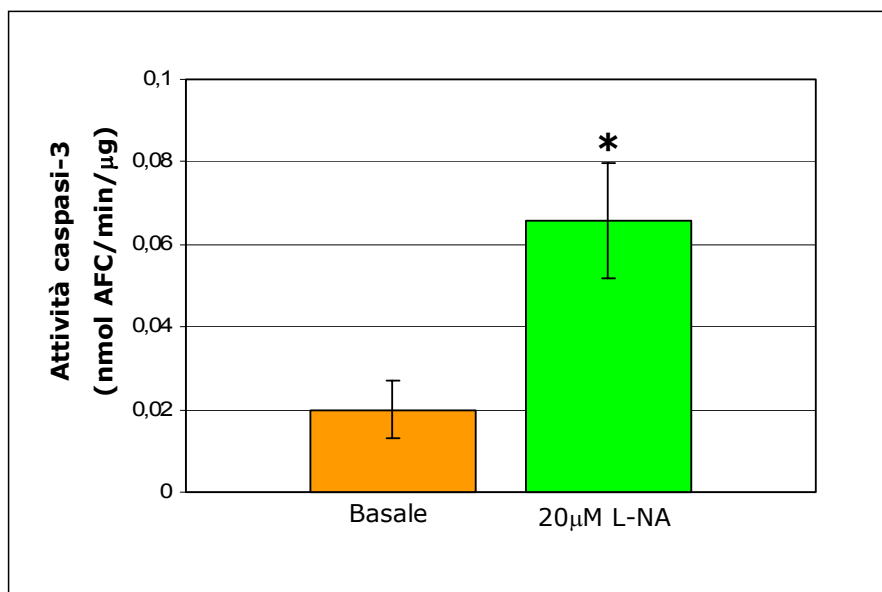


Figura 29 Saggio fluorimetrico di attività caspasi-3 per larve di *Ciona* nelle fasi iniziali di ritrazione trattate o meno alla schiusa in presenza dell'inibitore della NOS L-NA. I dati sono espressi come media \pm d.s. L'asterico (*) indica la significatività del trattamento con L-NA rispetto al basale (* $p < 0,05$, Student *t*-test).

Purtroppo, a causa dei bassi livelli basali di attività caspasi-3 quasi ai limiti di sensibilità, non è stato possibile condurre il saggio aumentando i livelli di NO endogeni, ovvero trattando larve alla schiusa in presenza o meno dell'inibitore dell'arginasi. Sulla base di questi risultati è ragionevole ipotizzare che a concentrazioni più alte l'NO possa inibire l'attività caspasi-3. Di conseguenza, a seconda dei suoi livelli endogeni, l'NO è in grado di modulare il processo apoptotico di ritrazione della coda, inibendo la caspasi-3.

DISCUSSIONE

Lo sviluppo larvale e la metamorfosi dell'ascidia *Ciona intestinalis* rappresentano processi molto dinamici e complessi e richiedono il coinvolgimento e l'interazione di diversi fattori ambientali ed endogeni, che, insieme ai meccanismi di trasduzione del segnale e di regolazione genica, concorrono all'attuazione di questi processi. Sino ad oggi poche e frammentarie erano le informazioni in letteratura circa i segnali endogeni e le molecole coinvolte nello sviluppo larvale e nel processo di metamorfosi di questa ascidia. In questo contesto, il mio lavoro di dottorato ha fornito un valido contributo alla comprensione delle molecole e dei meccanismi coinvolti nello sviluppo larvale e nei primi stadi di metamorfosi di *Ciona*, ampliando ulteriormente le conoscenze sulle funzioni svolte dall' NO nel campo degli invertebrati marini (Palumbo, 2005; Palumbo e d'Ischia, 2006).

I risultati riportati in questo studio hanno infatti evidenziato che l'NO agisce da modulatore endogeno del processo di ritrazione della coda dell'ascidia *Ciona intestinalis*, regolando il processo apoptotico caspasi-3 dipendente ed è inoltre coinvolto in altri processi di sviluppo e di metamorfosi che precedono e seguono la ritrazione della coda.

L'ascidia *Ciona intestinalis* si è rivelata un ottimo sistema modello per la modulazione della produzione endogena di NO e per lo studio degli effetti prodotti sulla metamorfosi in seguito alla variazione dei livelli del gas. L'effettiva diminuzione o aumento dei livelli endogeni di NO, ottenuti inibendo la NOS o aumentando la biodisponibilità del substrato L-arginina, è stata evidenziata rivelando l'NO endogeno con l'indicatore DAF-FM DA. Mediante questi approcci, è stato dimostrato che basse concentrazioni di NO determinano un aumento della percentuale di early juveniles rispetto al controllo, mentre ad alte concentrazioni del gas si osserva un rallentamento del processo di metamorfosi. Questo

marcato rallentamento è ulteriormente confermato dall'incompleta cavitazione della coda osservata in larve, allo stadio iniziale di ritrazione, in condizioni di alti livelli endogeni di NO (Fig.25D). Il processo di cavitazione è responsabile dell'allungamento della coda nelle fasi iniziali dello sviluppo larvale e deriva dall'allineamento delle cellule della notocorda. L' incompleta cavitazione in questo stadio avanzato di sviluppo larvale è indicativa di un rallentamento dell'intero processo di sviluppo della coda e si riflette successivamente anche in un rallentamento della sua ritrazione.

E' interessante notare che nell'ascidia *Ciona intestinalis* l'NO agisce da modulatore endogeno della metamorfosi senza influenzare lo sviluppo successivo delle early juveniles. Infatti, ogni aumento o diminuzione dei livelli endogeni di NO produce solo un rallentamento o un'accelerazione delle prime fasi di metamorfosi e non blocca lo sviluppo delle early juveniles.

In precedenti lavori l'NO è stato descritto agire da repressore endogeno della metamorfosi in diversi invertebrati marini dotati di ciclo vitale bifasico (Bishop e Brandhorst, 2003), quali i molluschi *Ilyanassa obsoleta* (Froggett and Leise, 1999) e *Crepidula fornicata* (Pechenik et al., 2002), l'echinoderma *Lytechinus pictus* (Bishop and Brandhorst, 2001) e i cordati *Boltenia villosa* e *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Bishop et al., 2001). In questi organismi il ruolo di repressore dell'NO è stato esclusivamente dedotto sulla base dell'incremento nella frequenza di metamorfosi osservato in larve in cui erano stati ridotti i livelli endogeni di NO.

Invece, nel nostro sistema modello, l'ascidia *Ciona intestinalis*, l'effetto prodotto sulla metamorfosi in seguito non solo alla diminuzione ma anche all'aumento dei livelli endogeni di NO, ci ha permesso di evidenziare che l'NO non è un semplice repressore della metamorfosi ma riveste un ruolo più complesso agendo da modulatore endogeno del

processo. Sulla base dei risultati presentati è emerso che i livelli endogeni dell'NO nelle larve di *Ciona* regolano i tempi biologici della metamorfosi.

Per quanto riguarda il meccanismo di trasduzione del segnale dell'NO coinvolto durante il processo di metamorfosi è stato dimostrato, attraverso esperimenti condotti inibendo la guanilato ciclastasi in larve appena schiuse, che il processo di ritrazione della coda è cGMP dipendente. Infatti, l'inibizione della guanilato ciclastasi ha prodotto un effetto analogo all'inibizione della NOS, in entrambi i casi è stata osservata un'accelerazione del processo di metamorfosi. Il coinvolgimento del cGMP durante le prime fasi di metamorfosi non esclude tuttavia la presenza di meccanismi di trasduzione cGMP indipendenti, quali la nitrificazione e la nitrosilazione di proteine strutturali ed enzimi, che possono concorrere parallelamente al cGMP nel regolare il processo di metamorfosi e che saranno oggetto di indagini future.

Lo studio dell'espressione spaziale e temporale del gene che codifica per l'enzima NOS ha avvalorato l'importante ruolo svolto dall'NO durante il processo di ritrazione della coda.

Infatti, è stato osservato che il gene NOS raggiunge un massimo di espressione allo stadio late larva, che rappresenta lo stadio di sviluppo in cui le larve di *Ciona* acquisiscono la "competenza" per la metamorfosi e che il trascritto è presente nelle cellule dell'epidermide della coda sia allo stadio late larva che durante tutti gli stadi di ritrazione. Negli stadi iniziali di metamorfosi il forte segnale di ibridazione osservato nella porzione terminale della coda in ritrazione, è indicativo del coinvolgimento dell'ossido nitrico nel processo.

Da questi dati e dallo studio dei lavori apparsi in letteratura, emerge che, in *Ciona*, il gene NOS è il primo la cui espressione è stata rivelata nell'epidermide della coda poco prima e durante tutte le fasi di ritrazione. Mediante studi di espressione differenziale sono stati

individuati da Nakayama et al. (2001, 2002) 6 geni, Ci-meta 1-6, coinvolti nel processo di metamorfosi. Nessuno di questi, però, è stato trovato essere espresso nella coda durante le diverse fasi di ritrazione. Solo Ci-meta 3 è espresso, nella regione dove si è appena conclusa la ritrazione (Nakayama et al.,2002), nelle early juveniles allo stadio iniziale di rotazione.

Dall'analisi dei dati di espressione spaziale e temporale della NOS emerge che l'NO è coinvolto anche in altri processi di sviluppo non strettamente relazionati alla ritrazione della coda. La presenza del trascritto della NOS in uova non fecondate, induce a considerare questo RNA messaggero materno un possibile determinante citoplasmatico che, distribuendosi in blastomeri diversi dopo le prime divisioni cellulari, può generare un microambiente citoplasmatico diverso per ogni blastomero andando ad influenzare il nucleo e l'espressione genica. Di conseguenza tale determinante può regolare il corretto sviluppo embrionale dell'ascidia *Ciona intestinalis*. Questa scoperta apre un nuovo campo di indagine per l'NO che potrebbe essere coinvolto in altre interessanti funzioni legate allo sviluppo embrionale dell'ascidia *Ciona intestinalis*, che saranno oggetto di futuri studi.

I risultati degli esperimenti di Real Time PCR hanno inoltre evidenziato che il gene NOS è espresso anche negli stadi early e middle larva, che rappresentano stadi iniziali di sviluppo in cui le larve non hanno ancora acquisito la "competenza" alla metamorfosi. L'espressione transitoria della NOS nelle cellule dell'epidermide della testa nelle early larve, nel sistema nervoso centrale sia nella parte posteriore della vescicola sensoria che nelle fibre nervose che si estendono al ganglio viscerale nelle middle larve, suggeriscono il coinvolgimento dell'NO nelle prime fasi di sviluppo larvale e nei processi neuronali. Inoltre la localizzazione del trascritto della NOS negli organi digestivi appena formati delle early juveniles allo stadio di rotazione tardivo, ha evidenziato che l'NO non è solo

coinvolto nello sviluppo larvale e nelle primissime fasi di metamorfosi ma anche in quelle successive, in particolare nello sviluppo delle early juveniles che sottostanno ad un completo rimodellamento dell'organismo con formazione di nuovi organi e tessuti dell'individuo adulto.

L'altro aspetto interessante emerso dagli studi di espressione temporale, riguarda il gene arginasi, i cui livelli di espressione durante tutti gli stadi larvali e di metamorfosi esaminati sono sempre più bassi rispetto al gene NOS e diminuiscono gradualmente. La presenza del trascritto dell'arginasi in tutti gli stadi di sviluppo larvale esaminati si è rivelata una informazione utile che ci ha permesso di utilizzare uno specifico inibitore dell'enzima arginasi per aumentare la biodisponibilità dell'L-arginina.

Ulteriori conferme sul ruolo svolto dall'NO durante lo sviluppo larvale e le prime fasi di metamorfosi dell'ascidia *Ciona intestinalis* derivano dagli esperimenti di rivelazione dell'NO endogeno mediante l'utilizzo dell'indicatore DAF-FM DA, che penetra facilmente attraverso le membrane cellulari e dopo deacetilazione ad opera delle esterasi intracellulari, reagisce con l'NO per formare un benzotriazolo fluorescente. Questo si è rivelato un metodo estremamente sensibile ed efficace per la rivelazione dell'NO *in vivo*, in larve semplicemente sedate.

Nelle late larva la presenza dell' NO nel sistema nervoso centrale a livello della vescicola sensoria correla con i dati di espressione spaziale del gene NOS e potrebbe essere relazionata, oltre alla possibile funzione neuronale dell'NO, alla prima onda apoptotica descritta da Tarallo e Sordino (2004), in buon accordo con il ruolo svolto dall'NO in diversi processi apoptotici (Chung et al., 2001; Brune, 2003). Quest'onda apoptotica, che interessa il sistema nervoso centrale, ha origine allo stadio late larva nella parte posteriore della vescicola sensoria, in prossimità dell'ocello, nella stessa regione dove è stato

evidenziato il segnale fluorescente per l'NO, e si propaga poi posteriormente al ganglio viscerale e al tubo neurale.

Un altro aspetto interessante che emerge da questo lavoro di tesi è la rapida e dinamica diffusione del gas NO, che attraversa facilmente le membrane cellulari e raggiunge strati cellulari diversi dai siti di produzione come è evidente dalle immagini fluorescenti dell'NO endogeno riportate per i diversi stadi larvali (Fig.21C, F; Fig. 22A, C). Gli esperimenti di ibridazione *in situ* hanno evidenziato che il trascritto della NOS, allo stadio late larva e durante le diverse fasi di ritrazione della coda, è presente nelle cellule dell'epidermide della coda, dove avviene la produzione del gas NO che poi rapidamente diffonde negli strati cellulari più interni della coda, passando attraverso i muscoli e raggiungendo le cellule della notocorda.

La rapida diffusione dell'NO spiega le differenze nel pattern di localizzazione dell'NO rispetto a quello di espressione del geneNOS.

Questi risultati sono in accordo con le attuali conoscenze sulla diffusione dinamica di questo gas (O'Shea et al., 1998). Recenti modelli matematici proposti per chiarire la diffusione dell'NO prodotto sulla superficie di strutture tubulari, che rispecchiano le strutture del sistema nervoso centrale degli invertebrati e le strutture tubulari delle cellule della coda delle larve delle ascidie, hanno evidenziato che questo messaggero gassoso raggiunge concentrazioni elevate all'interno di tali strutture piuttosto che esternamente ad esse. Di conseguenza l'NO può raggiungere molecole bersaglio distanti, diffondendo attraverso le fibre e le strutture tubulari del sistema nervoso e delle cellule della coda e può persistere per diversi secondi fino ad esplicare le sue funzioni.

Di notevole interesse è la presenza di un forte e diffuso segnale fluorescente per l'NO all'estremità della coda di larve allo stadio iniziale di ritrazione, dove ha origine la seconda onda apoptotica caspasi-3 dipendente descritta da Chambon et al.(2002), che

suggerisce il coinvolgimento dell'NO in questo processo apoptotico. A conferma di questa ipotesi sono i risultati ottenuti dal saggio fluorimetrico di attività della caspasi-3 condotti in larve trattate o meno con l'inibitore della NOS. Tali esperimenti hanno dimostrato che larve, in condizioni di bassi livelli endogeni di NO, presentano un netto incremento nell'attività caspasi-3 rispetto al controllo, suggerendo che a più alte concentrazioni l'NO può inibire l'attività caspasi-3, modulando in tal modo il processo apoptotico. L'enzima proteolitico caspasi-3 si è quindi rivelato un possibile bersaglio molecolare dell'NO durante il processo di ritrazione della coda.

Dai dati di letteratura emerge che l'inibizione della caspasi-3 mediata dall'NO può avvenire attraverso la S-nitrosilazione di un residuo di cisteina nel sito attivo dell'enzima (Boyd and Cadenas, 2002) oppure attraverso un meccanismo cGMP dipendente che prevede il coinvolgimento di una proteina chinasi G (Kim et al., 1999). Nel caso della caspasi-3 i due meccanismi possono coesistere nello stesso sistema biologico come negli epatociti di ratto (Kim et al., 1997). In alternativa, può prevalere il meccanismo di S-nitrosilazione, come nel caso dei cardiomiociti (Maejima et al., 2005) o il meccanismo cGMP dipendente, come nelle cellule PC12 (Kim et al., 1999). Quale di questi meccanismi sia operativo nel nostro sistema modello sarà oggetto di futuri studi.

TABELLE

Tabella 1

Tamponi impiegati per l'estrazione dell'RNA

Composizione dei tamponi del Kit SV total RNA Isolation System della Promega.

Tampone di lisi

Guanidina tiocianato	4 M
Tris pH 7.5	10 mM
β -mercaptoetanololo	0.97%

Tampone di diluizione

NaCl	400 mM
Tris pH 7.5	20 mM
EDTA pH 7.5	2 mM
Etanolo	50% (v/v)

Tampone di lavaggio

Acetato di potassio	60 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
Etanolo	60%

Tampone di digestione

Tris pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM

Soluzione bloccante

Guanidina tiocianato	2M
Tris-HCl pH 7.5	4 mM
Etanolo	57%

Composizione dei tamponi del FastTrack™ 2.0 mRNA isolation kit della Invitrogen.

Tampone stock

NaCl	200mM
Tris pH 7.5	200 mM
MgCl ₂	1.5 mM
SDS	2%

Tampone di legame

NaCl	500 mM
Tris pH 7.5	10 mM

Tampone a bassa concentrazione salina

Tris pH 7.5	10 mM
NaCl	250 mM

Tampone di eluizione

Tris pH 7.5	10 mM
-------------	-------

Tutti i tamponi sono preparati in H₂O depc

Tabella 2

Tamponi delle corse elettroforetiche per i gel di agarosio

TBE 10x (1 lt)

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

TAE 10x (1 lt)

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

TE 1x

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM

Tabella 3

Terreni di coltura

LB liquido (1 lt)

triptone	10 g
estratto di lievito	5 g
NaCl	10 g

SOB (1 lt)

triptone	20 g
estratto di lievito	5 g
NaCl	0.5 g

SOC (1 lt)

SOB	50 ml
glucosio 20%	1 ml
MgSO ₄ 1 M	0.5 ml
MgCl ₂ 1 M	0.5 ml

Tabella 4

Tamponi impiegati per la trascrizione *in vitro*, l'immunorivelazione e l'ibridazione *in situ*

Tampone di trascrizione

Tris-HCl pH 8.0	400 mM
MgCl ₂	60 mM
DTT	100 mM
spermidina	20 mM

STE 1x

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

Tampone 1 (MBT 1x)

Acido maleico pH7.5	100 mM
NaCl	150 mM

Tampone 2

Tampone 1	9 ml
Blocking reagent 10% (Roche)	1 ml

Tampone AP

Tris-HCl pH 9.5	100 mM
MgCl ₂	40 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0.1%

PBS 10x (1 lt)

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g

SSC 20x (1 lt)

NaCl	175.3 g
sodio citrato	88.2 g

Denhardt's 50x (500 ml)

ficoll 400	5 g
polivinilpirrolidone	5 g
albumina di siero bovina	5 g

MOPS 10x (1 lt)

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

Soluzione di ibridazione

Formammide	50%
SSC	5x
tRNA	50 µg/ml
soluzione di Denhardt	5x
Tween-20	0.1%
eparina	50 µg/ml

Soluzione A

NaCl	0.5M
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	5 mM
Tween-20	0.1%

BIBLIOGRAFIA

Adams V., Krabbes S., Jiang, H., Yu J., Rahmel A., Gielen S., Schuler G. and Hambrecht R. (1998). Complete coding sequence of inducible nitric oxide synthase from human heart and skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *Nitric Oxide* 2, 242-249.

Berking S. e Hermann, K. (1990). Dicapryloylglycerol and ammonium ions induce metamorphosis of ascidian larvae. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 198, 430-432.

Berkowitz D. E., White R., Li D., Minhas K. M., Cernetich A., Kim S., Burke S., Shoukas A. A., Nyhan D., Champion H. C. and Hare J. M. (2003). Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 108, 2000-2006.

Bishop C. D. e Brandhorst B. P. (2001). NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Biol. Bull.* 201, 394-404.

Bishop C. D. e Brandhorst B. P. (2003). On nitric oxide signaling, metamorphosis, and the evolution of biphasic life cycles. *Evol. Dev.* 5, 542-550.

Bishop C. D., Bates W. R. and Brandhorst B. P. (2001). Regulation of metamorphosis in ascidians involves NO/cGMP signaling and HSP90. *J. Exp. Zool.* 289, 374-384.

Boyd C. S. e Cadenas E. (2002). Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol. Chem.* 383, 411-423.

Bredt D.S., Snyder S.H.(1992). Nitric oxide: a novel neuronal messenger. *Neuron.* 8, 3-11.

- Broderick K. E., MacPherson M. R., Regulski M., Tully T., Dow J., Davies S. A. (2003). Interactions between epithelial nitric oxide signalling and phosphodiesterase activity in *Drosophila*. *Am. J. Cell Physiol.* 285, C1207-1218.
- Brune B. (2003). Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* 10, 864-869.
- Cappelletti G., Maggioni M. G., Tedeschi G. e Maci R. (2003). Protein tyrosine nitration is triggered by nerve growth factor during neuronal differentiation of PC12 cells. *Exp Cell Res.* 288, 9-20.
- Chambon J. P., Soule J., Pomies P., Fort P., Sahuquet A., Alexandre D., Paul-Henri Mangeat P. H. and Baghdiguian, S. (2002). Tail regression in *Ciona intestinalis* (Prochordate) involves a caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. *Development* 129, 3105-3114.
- Chiba S., Sasaki A., Nakayama A., Takamura K. and Satoh N. (2004). Development of *Ciona intestinalis* juveniles (through 2nd ascidian stage). *Zoolog. Sci.* 21, 285-298.
- Chung H. T., Pae H. O., Choi B. M., Billiar T. R. and Kim Y. M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1075-1079.
- Cloney R. A. (1978). Ascidian metamorphosis review and analysis. In *Settlement and Metamorphosis of Marine Invertebrate Larvae* (ed. F. S. Chia and M. E. Rice), 255-282. Elsevier North Holland Biomedical Press, New York.
- Cloney R. A. (1982). Ascidian larvae and the events of metamorphosis. *Amer. Zool.* 22, 817-826.
- Colasanti M., Venturini G., Merante A., Musci G., Lauro G. M. (1997). Nitric oxide involvement in *Hydra vulgaris* very primitive olfactory like system. *J. Neurosci.* 17, 493-499.

- Coniglio L., Morale A., Angelini C., Falugi C. (1998). Cholinergic activation of settlement in *Ciona intestinalis* metamorphosing larvae. *J Exp Zool.* 280(4), 314-320.
- Conklin E. G. (1905a). Mosaic development in ascidian eggs. *J. Exp. Zool.* 2, 146-223.
- Conklin E.G. (1905b). The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci.* 13, 1-119.
- Davies S. A., Stewart E. J., Huesmann G. R., Skaer N. J., Maddrell S. H., Tublitz N.J., Dow J. A. (1997). Neuropeptide stimulation of the nitric oxide signalling pathway in *Drosophila melanogaster* Malpighian tubules. *Am. J. Physiol.* 273, R823-827.
- Dawson T. M., Brecht D. S., Fotuhi M., Hwang P. M., Snyder S. H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7797-7801.
- Degnan B.M., Souter D., Degnan S.M., Long S.C. (1997). Induction of metamorphosis in larvae of the ascidian *Herdmania momus* with potassium ions requires attainment of competence and an anterior signalling center. *Dev. Genes Evol.* 206, 370-376.
- Dehal P., Satou Y., Campbell R. K., Chapman J., Degnan B., De Tomaso A., Davidson B., Di Gregorio A., Gelpke M. and Goodstein D. M., *et al.* (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157–2167.
- Delsuc F., Brinkmann H., Chourrout D., Philippe H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439(7079), 965-968.
- Dilly P.N. (1969). Studies on the receptors in *Ciona intestinalis*. 3. A second type of photoreceptor in the tadpole larva of *Ciona intestinalis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 96(1), 63-65.

Dow J. A., Maddrell S.H., Davies S.A., Skaer N.J., Kaiser K. (1994). A novel role for the nitric oxide-cGMP signaling pathway: the control of epithelial function in *Drosophila*. *Am. J. Physiol.* 266, R1716-R1719.

Eakin R.M., Kuda A.(1971).Ultrastructure of sensory receptors in Ascidian tadpoles. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 112(3), 287-312.

Ehsan A., Sommer F., Schmidt A., Klotz T., Koslowski J., Niggemann S., Jacobs G., Engelmann U., Addicks K., Bloch W. (2002). Nitric oxide pathways in human bladder carcinoma. The distribution of nitric oxide synthases, soluble guanylyl cyclase, cyclic guanosine monophosphate, and nitrotyrosine. *Cancer.* 95(11), 2293-2301.

Eiserich, J.P.; Patel, R.P.; O'Donnell, V.B. (1998). Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects Med* 19, 221-357.

Eri R., Arnold J.M., Hinman V.F., Green K.M., Jones M.K., Degnan B.M., Lavin M.F.(1999). Hemps, a novel EGF-like protein, plays a central role in ascidian metamorphosis. *Development.* 126(24), 5809-5818.

Fiore G., Poli A., Di Cosmo A., d'Ischia M., Palumbo A. (2004). Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. *Biochem J.* 378, 785-791.

Franchini A., Conte A., Ottaviani E. (1995). Nitric oxide: an ancestral immunocytes effector molecule. *Adv. Neuroimmunol.* 5, 463-478.

Froggett S. J. and Leise E. M. (1999). Metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*, Yes or NO?. *Biol. Bull.* 196, 57-62.

- Furchgott R.F. (1990). The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand.* 139(2), 257-270.
- Gelperin A. (1994). Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature.* 369(6475) 61-63.
- Ghosh D. K. e Salerno J. C. (2003). Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front. Biosci.* 8, d193-209.
- Giannopoulou E., Katsoris P., Polytarchou C., Papadimitriou E. (2002). Nitration of cytoskeletal proteins in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Arch Biochem Biophys.* 400(2), 188-198.
- Gibbs S. M., Truman J. W. (1998). Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron.* 20, 83-93.
- Giovine M., Pozzolini M., Favre A., Bavestrello G., Cerrano C., Ottavini F., Chiarantini L., Cerasi A., Cangiotti M., Zocchi E., Scarfi S., Sara M., Benfatti U. (2001). Heat stress-activated, calcium-dependent nitric oxide synthase in sponges. *Nitric oxide* 5, 427-431.
- Gosh D. K. e Salerno J. C. (2003). Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front. Biosci.* 8, d193-d209.
- Goto T., Ohnami S., Khedara A., Kato N., Ogawa H., Yanagita t. (1999). Feeding the nitric oxide synthase inhibitor L-N(omega)nitroarginine elevates serum very low density lipoprotein and hepatic triglyceride synthesis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 10(5), 274-278.
- Greenacre S. A. e Ischiropoulos H. (2001). Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res.* 34, 541-581.

- Griffith O.W., Stuehr D.J. (1995). Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 707-736.
- Grumetto L., Wilding M., De Simone M. L., Tosti E., Galione A. and Dale B. (1997). Nitric oxide gates fertilization channels in ascidian oocytes through nicotinamide nucleotide metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 723-728.
- Hall A. V., Antoniou H., Wang Y., Cheung A. H., Arbus A. M., Olson S. L., Lu W. C., Kau C. L. and Marsden P.A. (1994). Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J. Biol. Chem.* 269, 33082-33090.
- Halm MP, Chichery MP, Chichery R (2003). Effect of nitric oxide synthase inhibition on the manipulative behaviour of *Sepia officinalis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 134(1), 139-46.
- Hirano T., Nishida H. (2000). Developmental fates of larval tissues after metamorphosis in ascidian, *Halocynthia roretzi*. II. Origin of endodermal tissues of the juvenile. *Dev. Genes Evol.* 210, 55-63.
- Hope B. T., Michael G. J., Knigge K. M., Vincent S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2811-2814.
- Huang S., Kerschbaum H. H., Engel E., Hermann A. (1997). Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix Pomatia*. *J. Neurochem.* 69, 2516-2528.
- Imamura M., Yang J., Yamakawa M. (2002). CDNA cloning, Characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombix mori*. *Insect Mol. Biol.* 11, 257-265.
- Jackson D., Leys S. P., Hinman V. F., Woods R., Lavin M. F. and Degnan B. M. (2002) Ecological regulation of development: induction of marine invertebrate metamorphosis. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 679-686.

Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris C.D., Tempst P., Snyder S.H. (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 3(2): 193-197.

Jeffery W. R. and Swalla B. J. (1997). Embryology of the Tunicates. In *Embryology: Constructing the Organism* (ed. S. Gilbert), 331-364. Sinauer, Sunderland, MA.

Jeffery W. R.(2001). Determinants of cell and positional fate in acidianembryo. *Int.Rev.Cytol.*203, 3-62.

Katzoff A., Ben-Gedalya T., Susswein A.J. (2002). Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in aplisia. *J. Nerurosci.* 22, 9581-9594.

Keefer L. K., Nims R. W., Davies K. M. and Wink D. A. (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 268, 281-293.

Kim H.W., Batista L.A., Hoppes J.L., Lee K.J., Mykles D.L. (2004). A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*. *J Exp Biol.* 207, 2845-2857.

Kim Y. M., Chung H. T., Kim S. S., Han J. A., Yoo Y. M., Kim K. M., Lee G. H., Yun H. Y., Green A., Li J., Simmons R. L. and Billiar T. R. (1999). Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J. Neurosci.* 19, 6740-6747.

Kim Y. M., Talanian R. V. and Billiar T. R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138-31148.

- Knowles R. G., Moncada S.(1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298, 249-258.
- Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y. and Nagano T. (1999). Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 3209-3212.
- Korneev S.A. , Straub V., Kemenes I., Korneeva E.I., Ott S.R., Benjamin P.R., O'Shea M. (2005). Timed and targeted differential regulation of nitric oxide synthase (NOS) and anti-NOS genes by reward conditioning leading to long-term memory formation. *J. Neurosci.* 25, 1188-1192.
- Korneev S.A., Park J.H., O'Shea M. (1999). Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. *J Neurosci.* 19(18), 7711-7720.
- Kuzin B., Regulski M., Stasiv Y., Scheinker V., Tully T., Enikolopov G. (2000). Nitric Oxide interacts with the retinoblastoma pathway to control eye development in *Drosophila*. *Curr Biol.* 10, 459-462.
- Kuzin B., Roberts I., Peunova N., Enikolopov G. (1996). Nitric oxide regulates cell proliferating durin *Drosophila* development. *Cell* 87, 639-649.
- Leise E. M., Kempf S.C., Durham N.R., Gifondorwa D.J. (2004). Induction of methamorphosis in the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*: 5HT, NO and programmed cell desth. *Acta Biol.Hung.* 55, 239-300.
- Luckhart S., Li K. (2001). Transcriptional complexity of the *Anopheles stephensi* nitric oxide synthase gene. *Insect Biochem Mol Biol.* 31(3), 249-256.
- Luckhart S., Rosenberg R. (1999). Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene.* 232(1), 25-34.

- Maarsingh H., Tio M. A., Zaagsma J. and Meurs H. (2005). Arginase attenuates inhibitory nonadrenergic noncholinergic nerve-induced nitric oxide generation and airway smooth muscle relaxation. *Respir. Res.* 6, 23-29.
- Maejima Y., Adachi S., Morikawa K., Ito H. and Isobe M. (2005). Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 163-174.
- Matthysse A.G., Deschet K., Williams M., Marry M., White A.R., Smith W.C. (2004). A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(4), 986-991.
- Mochizuki Y., Satou Y., Satoh N. (2003). Large-scale characterization of genes specific to the larval nervous system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Genesis.* 36(1), 62-71.
- Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
- Moroz L., Meech R. W., Sweedler J. V., Mackie G. O. (2004). Nitric oxide regulates swimming in the jellyfish *Aglantha digitale*. *J. Comp. Neurol.* 471, 26-36.
- Moroz L.L., Chen D., Gillette M. U., Gillette R. (1996). Nitric Oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J. Neurochem* 66, 873-876.
- Moroz L.L., Norekian T.P., Pirtle T.J., Robertson K.J., Satterlie R.A. (2000). Distribution of NADPH-diaphorase reactivity and effect of nitric oxide on feeding and locomotory circuitry in the pteropod mollusc, *Clione limacina*. *J. Comp. Neurol.* 427, 274-284.
- Nakayama A., Satou Y. and Satoh N. (2001). Isolation and characterization of genes that are expressed during *Ciona intestinalis* metamorphosis. *Dev. Genes Evol.* 211, 184-189.
- Nakayama A., Satou Y., Satoh N. (2002). Further characterization of genes expressed during *Ciona intestinalis* metamorphosis. *Differentiation* 70, 429-437.

- Nappi A.J., Vass E., Frey F., Carton Y. (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4, 423-430.
- Nighorn A., Gibson N. J., Rivers D. M., Hildebrand J. G. (1998). Morton D. B. The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferent and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. *J. Neurosci.* 18,7244-7255.
- Nishida H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to tissue restricted stage. *Dev. Biol.* 121, 526-541.
- Nishida H. (1990). Determinative mechanisms in secondary muscle lineages of ascidian embryos: Development of muscle-specific feature in isolated muscle progenitor cells. *Development.* 108, 559-568.
- Nishida H. (2002). Specification of developmental fates in ascidian embryos: molecular approach to maternal determinants and signaling molecules. *Int Rev Cytol.* 217, 227-276.
- Nishida H., Satoh N. (1983). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage. *Dev Biol.* 99(2), 382-394.
- Nishida H., Satoh N. (1985). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages. *Dev Biol.* 110(2), 440-454.
- O'Shea M., Colbert R., Williams L., Dunn S. (1998). Nitric oxide compartments in the mushroom bodies of the locust brain. *NeuroReport.* 9, 333-336.
- Olinski R.P., Dahlberg C, Thorndyke M, Hallbook F. (2006). Three insulin-relaxin-like genes in *Ciona intestinalis*. *Peptides.* 27(11), 2535-46.
- Palumbo A. (2005). Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. A* 142, 241-248.

Palumbo A. e d'Ischia M. (2006). Nitric oxide biogenesis, signalling and roles in molluscs: the *Sepia officinalis* paradigm. In *Advances in Experimental Biology on Nitric Oxide* (ed. B. Trimmer and B. Tota). Elsevier, London. In press.

Palumbo A., Di Cosmo A., Poli A., Di Cristo C., D'Ischia M. (1999). A calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase, NMDAR2/3 receptor subunits, and glutamate in the CNS of cuttlefish *Sepia officinalis*: localization in specific neural pathway controlling the inking system. *J. Neurochem.* 73, 1254-1263.

Palumbo A., Poli A., Di Cosmo A., D'Ischia M. (2000). N-Methyl-D-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric oxide/cGMP signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 16885-16890.

Passamaneck A. J. and Di Gregorio A. (2005). *Ciona intestinalis*: chordate development made simple. *Dev. Dyn.* 233, 1-19.

Patricolo E., Ortolani G. and Casico A. (1981). The effect of L-thyroxine on the metamorphosis of *Ascidia malaca*. *Cell Tissue Res.* 214, 289-301.

Pechenik J. A., Li W. and Cochrane D. E. (2002). Timing is everything: the effects of putative dopamine antagonists on metamorphosis vary with larval age and experimental duration in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *Biol. Bull.* 202, 137-147.

Radmoski M. W., Martin G. F., Moncada S. (1991). Synthesis of nitric oxide by haemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B334, 129-133.

Regulski M., Tully T. (1995). Molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9072-9076.

- Ribeiro J. M., Hazzard J. M., Nussenzveig R. H., Champagne D. E., Walzer F. A. (1993). Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260, 539-541.
- Robertson J. D., Bonaventura J., Kohm A., Hiscat M. (1996). Nitric oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 263, 1261-1267.
- Romano G., Russo G. L., Buttino I., Ianora A. and Miralto A. (2003). A marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos. *J. Exp. Biol.* 206, 3487-3494.
- Salleo A., Musci G., Barra P., Calabrese L. (1996). The discharge mechanism of acontial nematocytes involves the release of nitric oxide. *J. Exp. Biol.* 199, 1261-1267.
- Satoh N. (1994). Embryogenesis. In *Developmental Biology of Ascidians*, 59-61. Cambridge University Press.
- Satoh N. (2003a). The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics. *Nat Rev Gene.* 4(4), 285-295.
- Satoh N., Satou Y., Davidson B., Levine M. (2003b). *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. *Trends Genet.* 19(7), 376-381.
- Satou Y., Kawashima T., Shoguchi E., Nakayama A. and Satoh N. (2005). An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: towards functional genomics. *Zoolog. Sci.* 22, 837-843.
- Scheinker V., Fiore G., Di Cristo C., Di Cosmo A., d'Ischia M., Enikolopov G., Palumbo A. (2005). Nitric oxide synthase in the nervous system and ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis*: Molecular cloning and expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1204-1215.

- Schipp R, Gebauer M. (1999). Nitric oxide: a vasodilatory mediator in the cephalic aorta of *Sepia officinalis* (L.) (Cephalopoda). *Invert Neurosci.* 4(1), 9-15.
- Snyder S.H., Brecht D.S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 266(5), 68-71 e 74-77.
- Strausberg R. L., Feingold E. A., Grouse L. H., Derge J. G., Klausner R. D., Collins F. S., Wagner L., Shenmen C. M., Schuler G. D., Altschul S. F. et al. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16899-16903.
- Stuehr D.J., Griffith O.W. (1992). Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 65, 287-346.
- Swalla B. J. (2004). Procurement and culture of ascidian embryos. *Methods Cell Biol.* 74, 115-141.
- Takamura K. (1998). Nervous network in larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev Genes Evol.* 208(1), 1-8.
- Tarallo R. and Sordino P. (2004). Time course of programmed cell death in *Ciona intestinalis* in relation to mitotic activity and MAPK signaling. *Dev. Dyn.* 230, 251-262.
- Tenu J.P., Lepoivre M., Moali C., Brollo M., Mansuy D., Boucher J.L. (1999). Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages *Nitric Oxide.* 3(6), 427-438.
- Tu Y, Budelmann BU. (2000). Effects of nitric oxide donors on the afferent resting activity in the cephalopod statocyst.. *Brain Res.* 865(2), 211-220.
- Uzman J.A. and Jeffery W.R. (1986). Cytoplasmic determinants for cell lineage specification in ascidian embryos. *Cell Differ.* 18(4), 215-224.

- Weill M., Philips A., Chourrout D., Fort P. (2005). The caspase family in urochordates: distinct evolutionary fates in ascidians and larvaceans. *Biol Cell*. 97(11), 857-866.
- Whittaker J.R. (1964). Copper as a factor in the onset of ascidian metamorphosis. *Nature*.202, 1024-1025.
- Wingrove J.A., O'Farrel P.H. (1999). Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell*. 98(1), 105-114.
- Wu G., Morris S.M. Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 336, 1-17.
- Yuda M., Hirai M., Miura K., Matsumura H., Ando K.,Chinzei Y. (1996). cDNA cloning expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Eur. J. Biochem*. 242, 807-812.
- Zemojtel T., Penzkofer T., Dandekar T., Schultz J. (2004). A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends Biochem Sci*. 29(5), 224-226.

PUBBLICAZIONI

Panzella L., Di Donato P., **Comes S.**, Napolitano A., Palumbo A., d'Ischia M.
Remarkable Chichibabin-type cyclotrimerisation of 3-nitrotyrosine, tyrosine and phenylalanine to 3,5-diphenylpyridine derivatives induced by hypochlorous acid.
Tetrahedron Letters 46 (2005) 6457-6460.

Comes S., Locascio A., Silvestre F., d'Ischia M., Russo G.L., Tosti E., Branno M., Palumbo A.
Dynamic patterns of nitric oxide localisation and nitric oxide synthase expression during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis*: nitric oxide is an endogenous modulator of tail regression.
inviato alla rivista *Developmental Biology*.

COMUNICAZIONI A CONVEGNI

Comes S., Locascio A., Silvestre F., Branno M., Tosti E., Palumbo A.
“*Effect of nitric oxide on Ciona intestinalis development*”
Proc. SEB Symposium. Nitric oxide: Comparative aspects of respiratory and cardiovascular homeostasis, Capri, Italia, September 2004.

Comes S., Tedeschi G., Locascio A., Branno M., d'Ischia M., Palumbo A.
“*Protein nitration during Ciona intestinalis development*”
Proc. Joint 62nd Harden Conference / EMBO Workshop – NO; a radical in control. The biological diversity of nitric oxide metabolism and signalling. Royal Agricultural College, Cirencester, UK, Aprile 2006.

Comes S., Locascio A., Silvestre F., d'Ischia M., Russo G.L., Branno M., Tosti E., Palumbo A.
Comunicazione orale: “*NO acts as an endogenous modulator of Ciona intestinalis metamorphosis*”
Proc. Marine Genomics International Conference
Sorrento, Italia, 28 Ottobre-1 Novembre 2006.