

Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA ANIMALE

CICLO XIX

Settore disciplinare BIO/09

**Pathway infiammatorio del
Sistema del Complemento nelle ascidie:
sequenziamento e caratterizzazione funzionale del
recettore dell'anafilatossina C3a di *Ciona intestinalis***

Dott.ssa Daniela Melillo

TUTOR

Ch.ma Prof.ssa Maria Luisa Panno

CO-TUTOR

Dott.ssa Maria Rosaria Pinto

COORDINATORE

Ch.mo Prof.re Bruno Tota

Anno Accademico 2005-2006

Abstract

In mammals, the bioactive fragment C3a, released from C3 during complement activation, is a potent mediator of inflammatory reactions and exerts its functional activity through the specific binding to cell surface G protein-coupled seven-transmembrane receptors. Recently, a C3a-mediated chemotaxis of hemocytes has been demonstrated in the deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* and an important role for this molecule in inflammatory processes has been suggested.

In this study, we have cloned and characterized the *CiC3aR* molecule involved in the *CiC3a*-mediated chemotaxis and studied its expression profile. The sequence of *CiC3aR*, encoding a 95,394 Da seven-transmembrane domain protein, shows the highest sequence homology with mammalian C3aRs. Northern blot analysis revealed that the *CiC3aR* is expressed abundantly in the heart and neural complex and to a lesser extent, in the ovaries, hemocytes, and larvae. Three polyclonal antibodies raised against peptides corresponding to *CiC3aR* regions of the first and second extracellular loop and of the third intracellular loop, react specifically in Western blotting with a single band of 98-102 kDa in hemocyte protein extracts. Immunostaining performed on circulating hemocytes with the three specific antibodies revealed that *CiC3aR* is constitutively expressed only in hyaline and granular amoebocytes. In chemotaxis experiments, the antibodies against the first and second extracellular loop inhibited directional migration of hemocytes toward the synthetic peptide reproducing the *CiC3a* C-terminal sequence, thus providing the compelling evidence that *C. intestinalis*

expresses a functional C3aR homologous to the mammalian receptor. These findings further elucidate the evolutionary origin of the vertebrate complement-mediated proinflammatory process.

INDICE

| | |
|--|---------|
| INTRODUZIONE | pag. 1 |
| Il sistema del complemento | pag. 7 |
| Via classica | pag. 11 |
| Via lectinica | pag. 13 |
| Via alternativa | pag. 14 |
| C3 | pag. 15 |
| Meccanismi effettori | pag. 17 |
| L'anafilatossina C3a e sue funzioni biologiche | pag. 21 |
| Funzioni diverse del sistema del complemento | pag. 28 |
| Cenni sull'evoluzione del sistema del complemento | pag. 30 |
| Il sistema sperimentale: <i>Ciona intestinalis</i> | pag. 35 |
| Gli emociti delle ascidie | pag. 39 |
| | |
| SCOPO DELLA RICERCA | pag. 44 |
| | |
| MATERIALI E METODI | pag. 48 |
| Preparazione degli emociti | pag. 49 |
| Isolamento e purificazione di RNA da diversi tessuti di <i>Ciona intestinalis</i> | pag. 49 |
| Sintesi del cDNA | pag. 50 |
| Sintesi degli oligonucleotidi | pag. 51 |
| Amplificazione mediante PCR | pag. 51 |
| Analisi della lunghezza dei frammenti di DNA ottenuti per PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio | pag. 52 |
| 5'- e 3'-RACE | pag. 53 |
| Analisi di DNA genomico mediante Southern blot | pag. 54 |
| Analisi di RNA totale mediante Northern blot | pag. 58 |
| Determinazione ed analisi delle sequenze di DNA | pag. 61 |
| Analisi filogenetica | pag. 61 |
| Sintesi dei peptidi e produzione degli anticorpi | pag. 62 |
| Analisi di estratti proteici mediante Western blot | pag. 64 |

| | |
|---|----------|
| Immunorilevazione di emociti circolanti | pag. 65 |
| Esperimenti di chemiotassi | pag. 67 |
| RISULTATI | pag. 69 |
| Identificazione ed analisi della sequenza del gene codificante il recettore di C3a di <i>Ciona intestinalis</i> | pag. 70 |
| Southern blot ed organizzazione genomica di <i>CiC3aR</i> | pag. 76 |
| Analisi di espressione di <i>CiC3aR</i> mediante Northern blot | pag. 79 |
| Analisi della sequenza amminoacidica dedotta di <i>CiC3aR</i> | pag. 85 |
| Analisi mediante Western blot di proteina estratte da emociti circolanti | pag. 88 |
| Reazione di immunocitochimica su emociti circolanti | pag. 90 |
| Inibizione della migrazione degli emociti mediante anticorpi specifici anti- <i>CiC3aR</i> | pag. 93 |
| DISCUSSIONE | pag. 98 |
| TABELLE | pag. 105 |
| Tabella 1: Tamponi impiegati nelle corse elettroforetiche per i gel di agarosio e nelle tecniche di Southern e Northern blot | pag. 106 |
| Tabella 2: Tamponi impiegati nelle tecniche di Western blot ed immunocitochimica | pag. 108 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 110 |

INTRODUZIONE

Tutti gli organismi pluricellulari hanno sviluppato la capacità di rispondere a virus, batteri e parassiti per neutralizzarne la possibile azione dannosa. Tale capacità (risposta immune) presenta meccanismi molecolari e cellulari diversi nei vari phyla.

In quest'ambito, uno dei più affascinanti problemi è la comprensione di come l'organismo dell'ospite rileva la presenza degli agenti infettivi e li elimina senza distruggere i propri tessuti. Questo problema è complesso, per l'enorme diversità molecolare dei patogeni e la loro elevata capacità di mutazione e replicazione. Pertanto, gli organismi pluricellulari hanno sviluppato diversi distinti sistemi di riconoscimento immune. Nei vertebrati questi sistemi possono essere essenzialmente classificati come "sistema immune innato" e "sistema immune adattativo"(Fig. 1).

Il riconoscimento immune adattativo è prerogativa dei soli vertebrati mandibolati, nei quali i meccanismi che comportano una enorme espansione del repertorio di specificità hanno raggiunto un livello di altissima efficienza con la simultanea comparsa degli anticorpi, dei recettori dei linfociti T, delle molecole del sistema maggiore di istocompatibilità e dei prodotti dei geni della ricombinazione RAG1 e RAG2. Infiammazione, citotossicità, clearance degli immunocomplessi, fagocitosi, induzione di apoptosi, costituiscono il corredo dei meccanismi effettori innescati dall'attivazione della risposta immune. Gli immunologi hanno definito tale sistema caratteristico dei mandibolati anche "sistema dell'immunità acquisita", intendendo sottolineare in tal modo il carattere di elaborazione somatica delle molecole immunitarie. Un grande impegno di ricerca ha permesso negli ultimi decenni alla comunità

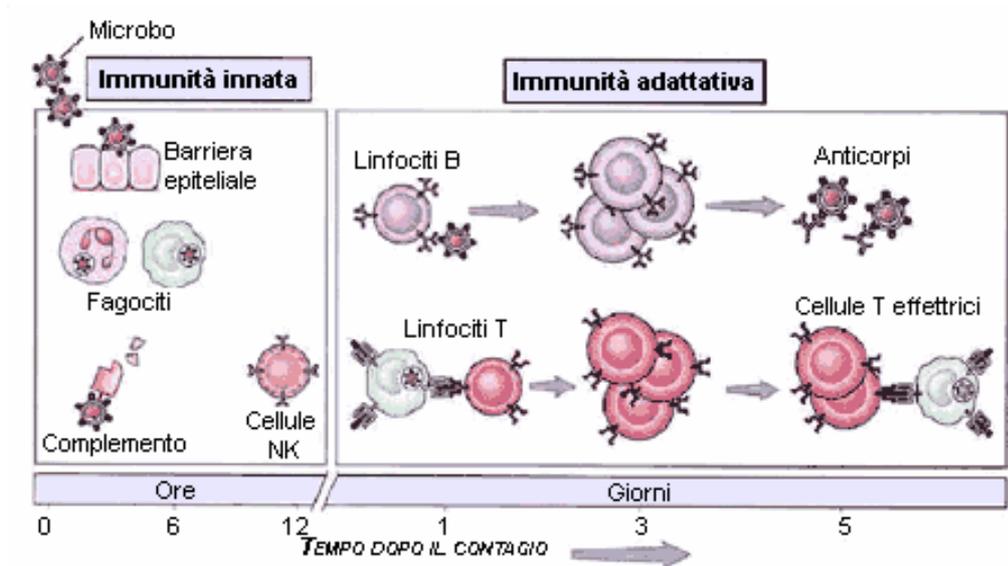


Fig. 1: Il sistema immunitario dei vertebrati è classicamente suddiviso in due sottosistemi, il sistema immune innato e quello adattativo. L'immunità innata usa meccanismi di difesa non specifici che entrano in gioco immediatamente dopo l'incontro con l'antigene. Questi meccanismi includono barriere fisiche come la pelle, agenti chimici presenti nei fluidi biologici e cellule del sistema immunitario che riconoscono e attaccano gli agenti infettanti. L'immunità adattativa comporta una risposta immune antigene-specifica e suo carattere distintivo è la "memoria" che rende più efficienti le successive risposte nei confronti dello stesso antigene.

scientifici degli immunologi di chiarire quasi completamente i meccanismi molecolari, cellulari e genetici che compongono tale quadro. Le caratteristiche più rilevanti di tale sistema sono: l'enorme potenzialità del repertorio di riconoscimento anticorpale, la capacità di accrescere durante la risposta la specificità e l'affinità degli anticorpi, la selezione di classi anticorpali diverse con funzioni specifiche ed infine la memorizzazione di cloni di linfociti con specificità acquisita. Tuttavia, la risposta immune adattativa ha due limiti principali. Primo tra tutti, i recettori degli antigeni, generati in maniera random, non sono in grado di stabilire la fonte ed il contesto biologico degli antigeni per i quali essi mostrano specificità. Inoltre, la distribuzione clonale dei recettori per gli antigeni richiede che i cloni specifici vadano incontro ad un processo di differenziamento ed espansione delle cellule effettrici prima di poter contribuire alla difesa dell'ospite. Come risultato, la risposta immune adattativa primaria è ritardata di 4-7 giorni, un intervallo temporale troppo lungo per combattere gli agenti microbici che si replicano velocemente. Tuttavia, il sistema immune adattativo funziona in un contesto più ampio. Infatti, quasi tutti gli aspetti della risposta immune adattativa sono controllati da una combinazione di segnali permissivi e istruttivi, che sono forniti dal sistema immune innato, evolutivamente più antico e più universale. Quest'ultimo, sente la presenza e la natura dell'infezione, fornisce la prima linea di difesa all'ospite, e controlla la risposta immune adattativa determinandone l'inizio e la classe effettrice.

Sebbene il sistema immune innato sia stato identificato per la prima volta da Elie Metchnikoff più di un secolo fa, i progressi compiuti nella sua analisi sono stati ampiamente messi in ombra dall'affascinante complessità

dell'immunità adattativa. Carattere distintivo del sistema immune innato, presente in tutti i metazoi, è il riconoscimento di prodotti costitutivi e conservati del metabolismo microbico, esclusivi dei microrganismi e assenti nella cellula ospite: per esempio, i lipopolisaccaridi (LPS), le lipoproteine, i peptidoglicani e gli acidi lipoteicoici (LTA), tutte molecole prodotte dai batteri, ma non dalle cellule eucariotiche. Pertanto, queste sostanze possono essere considerate “firme molecolari” degli agenti microbici, ed il loro riconoscimento da parte del sistema immune innato può segnalare la presenza di un'infezione. Un aspetto importante del riconoscimento operato dal sistema immune innato è nei suoi bersagli che non sono totalmente identici tra differenti specie di microrganismi. Tuttavia, sebbene diverse siano le variazioni della fine struttura chimica, ceppo- o specie-specifiche, queste sono sempre presenti nel contesto di un pattern molecolare comune, che è altamente conservato ed invariato tra microrganismi di una data classe. Per esempio, la porzione lipidica A dell'LPS rappresenta il pattern costante che si ritrova in tutti i batteri Gram-negativi ed è responsabile degli effetti pro-infiammatori dell'LPS, mentre la porzione O-antigenica varia tra le diverse specie di batteri e non è riconosciuta dal sistema immune innato. Poiché i bersagli del riconoscimento mediato dal sistema immune innato sono pattern molecolari conservati, questi sono stati denominati pattern molecolari associati al patogeno (PAMP), ed i loro recettori del sistema immunitario “recettori di riconoscimento di pattern” (PRR) (Pancer e Cooper, 2006; Litman et al., 2005).

I PAMP hanno tutte le caratteristiche che li rendono bersagli ottimali per il riconoscimento immune innato. Innanzitutto, sono prodotti soltanto dai

microbi e non dalle cellule ospiti. Pertanto, il riconoscimento dei PAMP da parte del sistema immunitario innato consente di discriminare tra “self” e “non-self microbico”. In secondo luogo, i PAMP sono identici tra microrganismi di una data classe. Questo consente a un numero limitato di PRR, codificati dalle linee germinali, di individuare la presenza di qualsiasi infezione microbica. E’ così, per esempio che il lipide A, che rappresenta il pattern conservato nell’LPS, permette a un singolo PRR di individuare la presenza di quasi tutte le infezioni causate da batteri Gram-negativi. Infine i PAMP sono essenziali per la sopravvivenza dei microrganismi, quindi mutazioni o perdita dei PAMP possono risultare letali o ridurre enormemente la capacità di adattamento di una data classe di microrganismi.

Queste caratteristiche dei PAMP indicano che il loro riconoscimento deve essere emerso molto precocemente nell’evoluzione dei sistemi di difesa dell’ospite, come confermato dai dati che i PAMP sono riconosciuti dal sistema immune innato non solo dei mammiferi, ma anche degli invertebrati e delle piante.

Il sistema immune innato usa vari PRR che sono espressi sulla superficie cellulare, in compartimenti intracellulari, o secreti nel circolo sanguigno e nei fluidi tissutali. Le principali funzioni dei PRR includono: opsonizzazione, fagocitosi, attivazione dei pathway infiammatori, induzione di apoptosi e attivazione delle cascate di reazioni della coagulazione e del sistema del complemento (Medzhitov e Janeway, 1997).

Il sistema del complemento

Il sistema del complemento è una delle maggiori componenti dell'immunità innata, ed è senza dubbio il maggiore sistema effettore dell'immunità innata dei mammiferi.

Esso è composto da oltre 30 proteine umorali e di superficie cellulare. Questo sistema, oltre a fornire una prima linea di difesa nei confronti dei patogeni, gioca anche un ruolo molto importante nell'induzione e nella regolazione della risposta immune di tipo adattativo (Volanakis e Arlaud, 1998; Song et al., 2000).

I primi studi sul complemento risalgono alla seconda metà del XIX secolo, quando rilevante è stato l'interesse della comunità scientifica per la comprensione dei meccanismi coinvolti nella protezione degli organismi dall'attacco dei patogeni. All'epoca due teorie apparentemente contraddittorie si sono fronteggiate: “la teoria cellulare”, sostenuta da Elie Metchnikoff che dimostrò l'esistenza di cellule del sangue in grado di ingerire i microrganismi patogeni, e “la teoria umorale”, sostenuta da Nuttall e Buchner, che individuarono capacità batteriolitiche associate ad una componente termolabile del siero, da loro denominata “alexina” (dal greco “senza un nome”).

Verso la fine del secolo le osservazioni di Pfeiffer, estese da Bordet, e confermate successivamente da Ehrlich e Morgenroth, confermavano l'idea che due “principi” presenti nel sangue erano richiesti per la lisi batterica: uno termo-stabile, che essi chiamarono “ambocettori” o “corpi immuni”, identificato successivamente con gli anticorpi, ed un secondo principio termolabile, che essi chiamarono “complemento”, perché sembrava complementare l'attività degli “ambocettori”. Si deve tuttavia a Bordet e Gengou la messa

a punto del primo test di fissazione del complemento, con il quale si stabiliva in termini quantitativi il ruolo giocato dal complemento nella lisi cellulare e che consentiva di assegnare al complemento un ruolo non puramente accessorio a quello esercitato dagli anticorpi. Per questa ragione Bordet è generalmente ritenuto lo scopritore del sistema del complemento.

Nei successivi 40 anni i progressi registrati nello studio del sistema del complemento andarono abbastanza a rilento. Alla fine del secondo ventennio del XX secolo si deve al lavoro di Ferrata inizialmente, e a Coca e Gordon successivamente, l'individuazione di quattro frazioni del siero con attività corrispondente a quattro diverse componenti del sistema del complemento, la cui natura proteica è stata poi confermata da Pillemer e collaboratori nel 1941.

Nel 1950 Louis Pillemer chiarì ulteriormente il ruolo del complemento affermando che l'attivazione di sue componenti poteva essere indipendente dagli anticorpi, esistendo delle sostanze capaci di attivarle autonomamente. Dimostrò, infatti, l'esistenza di un fattore del siero che chiamò "properdina" (dal latino distruzione, rottura) e indicò quello della properdina come un sistema secondario di attivazione del complemento, anticorpo-indipendente. Solo successivamente, fu dimostrato che il sistema del complemento è coinvolto anche nella lisi cellulare, nella risposta infiammatoria oltre che nell'eliminazione dei patogeni mediante fagocitosi (Paul, 1999).

Il sistema del complemento, quindi, agisce come un sistema ausiliario nell'immunità, sia mediante azione diretta, sia mediante l'interazione con altri elementi dell'immunità umorale. Esso rappresenta un sistema di difesa primitivo che, con l'evoluzione della risposta immune nei vertebrati gnatostomi, ha acquisito la capacità di interagire con il sistema immune

umorale adattativo, divenendo così il maggiore sistema effetore per gli anticorpi.

Il sistema del complemento, come accade per qualunque potente macchinario, ha bisogno di costanti controlli. A questo scopo, circa metà delle componenti del complemento sono coinvolte nel controllo dei momenti più critici che caratterizzano soprattutto la fase di attivazione del sistema.

La biosintesi delle proteine del sistema del complemento avviene principalmente nel fegato, dove sono prodotte circa il 90% delle componenti plasmatiche. Tuttavia, sono stati identificati molti altri organi e tipi cellulari, coinvolti nella sintesi di tali componenti, come i monociti/macrofagi, le cellule endoteliali, i linfociti, le cellule gliali, l'epitelio renale, gli organi deputati alla riproduzione e molti altri. In particolare è stato osservato che i monociti/fagociti sono in grado di produrre tutte le componenti del sistema del complemento e lo stesso vale per gli astrociti. Il contributo fornito da queste fonti extra-epatiche nella produzione delle componenti del complemento non è stato ancora ben definito: come per gli astrociti e le altre cellule gliali, esse rappresentano l'unica fonte di tali componenti all'interno della barriera cerebrale. Per quanto riguarda i macrofagi, la loro presenza in forma attiva nei siti di infezione potrebbe fornire ulteriori molecole, contribuendo all'aumento locale del livello di proteine del complemento (Paul, 1999).

Il sistema del complemento include tre vie convergenti (Fig. 2), la via classica, alternativa, e lectinica, che si differenziano per il meccanismo d'attivazione e che funzionano nell'amplificazione del segnale d'inizio attraverso dei sistemi di "feedback" di attività controllate da proteasi a serina.

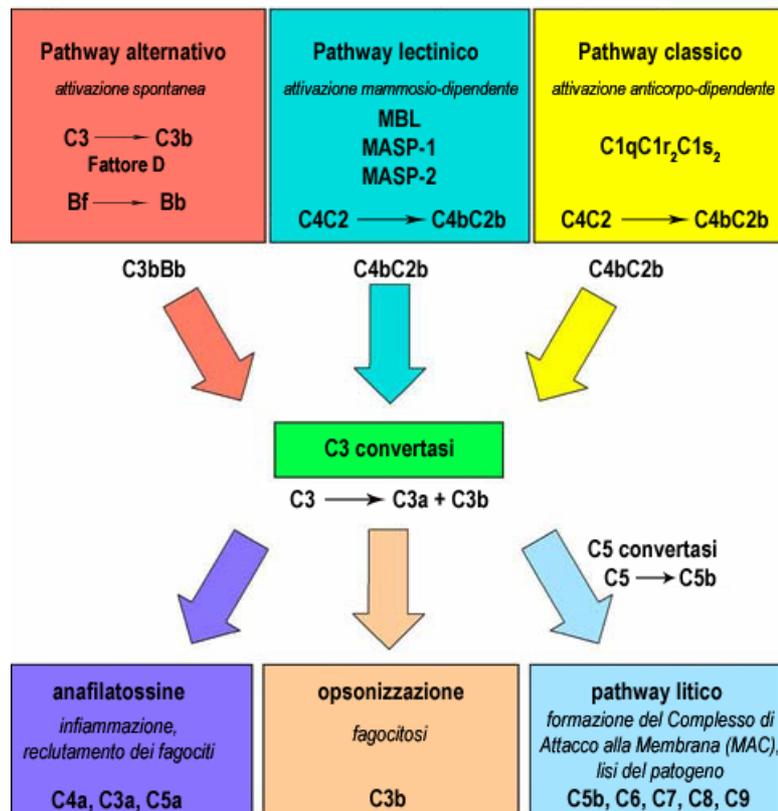


Fig. 2: Illustrazione schematica del sistema del complemento dei mammiferi. Le vie di attivazione del complemento sono tre: la via classica, attivata dagli anticorpi; la via lectinica che è iniziata dal legame di una lectina che riconosce il mannosio (MBL) sulla superficie batterica; e la via alternativa che è innescata dall'attivazione spontanea di C3, che si lega direttamente alla superficie del patogeno. Tutte le vie d'attivazione convergono verso l'attivazione di C3 che, a sua volta, avvia i meccanismi effettori del complemento. Le tre principali conseguenze dell'attivazione del complemento sono l'opsonizzazione del patogeno, il reclutamento di cellule coinvolte nella risposta infiammatoria, e l'eliminazione diretta dei patogeni. (Adattato da: Janeway, 2001)

Le tre diverse vie convergono verso l'attivazione di C3, componente centrale del sistema, che rappresenta a sua volta il punto di partenza delle tre diverse vie effettrici, cioè infiammatoria, opsonica, e terminale o litica (Janeway, 1999).

Via classica

La via classica è, tra le tre, quella filogeneticamente più recente; essa infatti si è sviluppata nei vertebrati in seguito alla comparsa degli anticorpi.

Nel corso di un processo immune, la formazione di anticorpi specifici richiede molti giorni, durante i quali la difesa dell'organismo è garantita da tutti quei meccanismi che sono alla base del sistema immune innato. La presenza degli anticorpi potenzia quei meccanismi già in atto e garantisce maggiore specificità di azione.

La via classica è iniziata dal legame dell'anticorpo all'antigene e può essere considerata un sistema effettore dell'immunità adattativa (Fig. 3a). La prima componente della via classica di attivazione del complemento è C1, un complesso di tre proteine C1q, C1r e C1s. La proteina C1q si compone di sei subunità identiche, ciascuna delle quali è costituita da tre catene omologhe. Ciascuna catena possiede una testa globulare, un collo e una porzione terminale, simile ad uno stelo, con struttura "coiled-coil". Le sei subunità sono tenute insieme a livello dello stelo, mentre i domini globulari di C1q si legano alla porzione Fc delle immunoglobuline. C1q interagisce con due molecole di C1r e due molecole di C1s a livello dello stelo. Ciascuna molecola di C1r e C1s possiede un dominio serin-proteasico (dominio

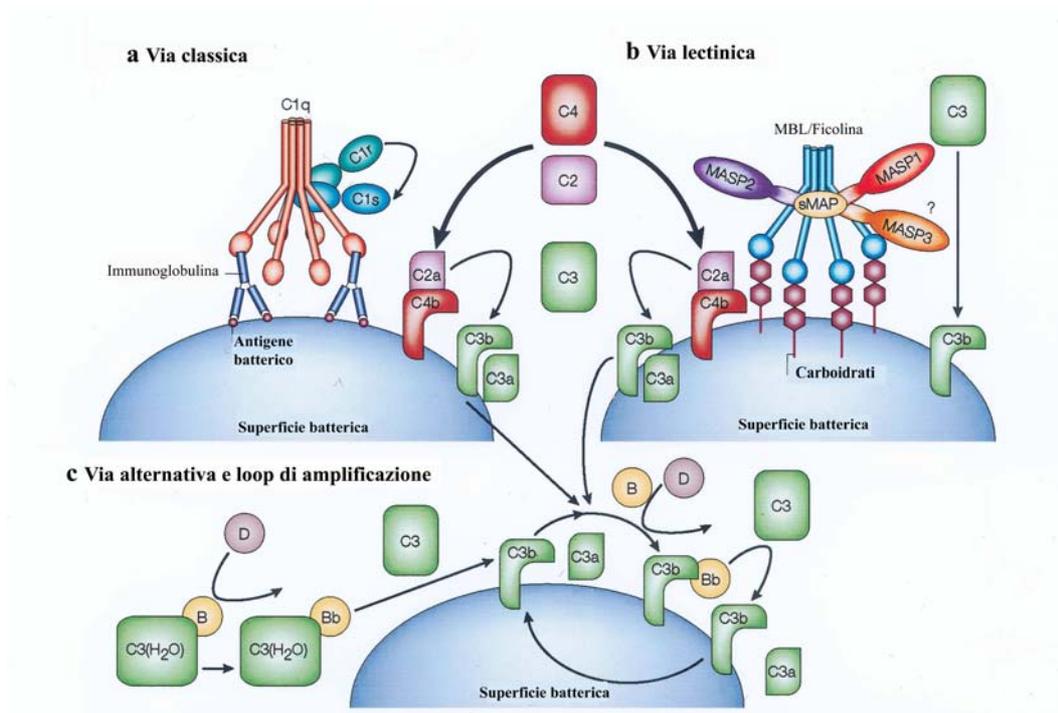


Fig. 3: Attivazione della via classica, lectinica e alternativa. **a.** La via classica è iniziata dal legame del complesso C1 agli anticorpi che sono legati agli antigeni della superficie dei batteri. Il complesso C1 è costituito da una molecola di C1q, due molecole di C1r e due molecole di C1s. Il legame di C1q con la porzione Fc delle immunoglobuline porta all'attivazione della proteasi a serina C1r. C1r quindi, taglia ed attiva C1s che traduce l'attivazione del complesso C1 nell'attivazione del complemento mediante il taglio di C4 e C2, con la formazione del complesso enzimatico C4bC2a. C4bC2a agisce da C3 convertasi e taglia C3, inducendo la formazione di molecole che si legano al patogeno causandone la morte. **b.** La via lectinica è iniziata dal legame di una lectina che lega il mannosio (MBL), o dalla ficolina, ai carboidrati della superficie batterica. Partecipano a tale interazione le proteasi a serina 1 associate a MBL (MASP1), le proteasi a serina MASP2 e MASP3, e piccole proteine associate a MBL (sMBL). Similmente a C1s, MASP2 è responsabile dell'attivazione di C4 e C2, che conduce alla formazione della C3 convertasi, C4bC2a, come nella via classica. MASP1 è invece capace di tagliare C3 direttamente. **c.** La via alternativa è iniziata dall'attivazione spontanea di C3 -C3(H₂O)- e dall'attivazione del fattore B (Bb). Il prodotto di attivazione C3b lega il fattore B (Bf), che è, a sua volta, tagliato in Bb dal fattore D per formare la C3 convertasi della via alternativa, C3bBb. Quando C3b si lega alla superficie della cellula, il loop di amplificazione delle componenti della via alternativa è attivato, e la C3-convertasi forma molte molecole di C3b, che si legano covalentemente intorno al sito di attivazione del complemento. (Da: Fujita, 2002).

catalitico) ed un dominio strutturale di interazione. Prima dell'attivazione tutti i quattro domini catalitici sono nascosti all'interno del complesso e sono inattivi. L'attivazione di C1 avviene in seguito al legame con il complesso antigene-anticorpo (IgG o IgM). Il legame si realizza attraverso almeno due dei sei domini globulari C-terminali di C1q con una molecola di IgM, oppure sono richieste almeno due molecole di IgG per garantire l'attivazione. L'attivazione comporta una variazione conformazionale di C1q, alla quale segue l'idrolisi reciproca delle due molecole di C1r. Le porzioni catalitiche di C1r, poi, attivano C1s, che è l'enzima responsabile dell'attivazione di C4 e di C2. La molecola di C4 è idrolizzata in due frammenti, un piccolo peptide attivo, C4a, che possiede una bassa attività chemotattica, e un frammento più grande, C4b che subisce una notevole variazione conformazionale con l'esposizione del dominio tioestere, altamente reattivo. Attraverso tale dominio, C4b si lega alla particella antigenica, nelle immediate vicinanze del complesso attivo C1q-anticorpo. A questo punto C2 si lega a C4b ed è idrolizzata da C1s con formazione dei frammenti C2a e C2b. Il complesso C4bC2a (Fig. 3a) rappresenta la C3 convertasi, responsabile dell'attivazione di C3 nella via classica (Paul, 1999).

Via lectinica

Questa via di attivazione del complemento è indipendente dagli anticorpi, e costituisce un sistema effetore dell'immunità innata o naturale (Fujita, 2002; Fujita et al., 2004). Le molecole chiave di questa via di attivazione del complemento sono un gruppo di lectine sieriche, ad alto peso molecolare, appartenenti alla famiglia delle collectine, strutturalmente simili al collagene

e con funzioni tipiche delle lectine. Queste lectine, anche dette “mannose binding lectins” (MBL), sono capaci di legare residui di mannosio e di N-acetilglucosamina presenti sulla parete della cellula batterica.

La via lectinica è iniziata dal legame di queste lectine con i carboidrati di superficie dell'agente patogeno (Fig. 3b). Tale interazione è accompagnata dalla variazione conformazionale delle proteasi a serina associate a MBL, MASP-1, MASP-2 e MASP3. Queste molecole sono omologhe a C1r e C1s. La forma attiva di MASP-2, come C1-s, attiva C4 e porta alla formazione della C3 convertasi C4bC2a della via classica, C1-indipendente.

Via alternativa

La via alternativa, come la via lectinica, è indipendente dagli anticorpi e rappresenta un meccanismo rapido di attivazione del complemento (Fig. 3c). Essa può essere attivata ed amplificata istantaneamente in presenza di materiale estraneo (non-self).

Un sistema del complemento primitivo, molto probabilmente costituito da C3 e Bf, e quindi molto simile al pathway alternativo dei mammiferi, doveva essere già presente nell'antenato comune di Cnidaria e Bilateria, più di 1.300 milioni di anni fa. Infatti, geni codificanti per C3 e Bf sono stati identificati nel genoma di *Nematostella vectensis* (Cnidaria).

C3 è la componente chiave della via alternativa, ma altre tre proteine, il fattore B, il fattore D e la properdina sono essenziali per l'amplificazione di questa via (Fig. 3c). Il primo evento di attivazione consiste nell'idrolisi di C3, processo che nel siero avviene di continuo, spontaneamente, ma in misura limitata. Esso è mediato dall'acqua e conduce alla formazione di un prodotto

intermedio instabile, C3(H₂O), che è conformazionalmente e funzionalmente simile a C3b. Tale prodotto instabile, nel siero, rappresenta circa lo 0.5% della quantità totale di C3 nativo. C3(H₂O) è in grado di legare il fattore B, in presenza di ioni Mg²⁺, divenendo così substrato del fattore D, un'altra proteasi a serina della via alternativa, che scinde il fattore B in Bb e Ba. Il prodotto di idrolisi Bb si lega a C3(H₂O) formando il complesso C3Bb che è tuttavia instabile e si degrada rapidamente a meno che non venga stabilizzato dal legame con la properdina. Si genera così il complesso attivo C3Bb che è chiamato "C3 convertasi iniziale"; al suo interno il frammento Bb funziona da proteasi a serina capace di scindere C3 in C3b e C3a. Il legame di C3b con la superficie dei microrganismi (Fig. 3c) conduce all'attivazione della C3 convertasi stabile. In questo modo la C3 convertasi della via alternativa rappresenta anche un meccanismo di amplificazione di un'attivazione del complemento iniziata per la via classica.

C3

C3, C4 e C5, insieme alla α_2 -macroglobulina, proteina che non appartiene al sistema del complemento, sembra si siano evolute da un comune gene ancestrale. Carattere distintivo di queste molecole, sebbene mancante in C5, è la presenza nella molecola di un legame tioestere (Fig. 4). Tra le componenti del complemento, C3 ha la più elevata concentrazione sierica (1.4 mg/ml nell'uomo) ed è anche tra le più abbondanti proteine del siero. E' una proteina ad alto peso molecolare (185-205 KDa, secondo la specie), che è sintetizzata come singolo precursore, ed è maturata con formazione di due catene polipeptidiche, α e β , tenute insieme da un ponte disolfuro e da forze

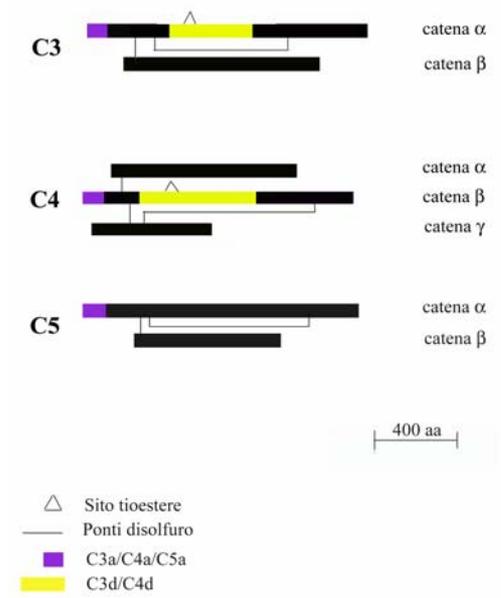


Fig. 4: Molecole del sistema del complemento appartenenti alla famiglia delle α 2-macroglobuline.

non covalenti (Lambris, 1989; Sahu e Lambris, 2001). L'attivazione di C3, con la conseguente formazione di C3b e C3a, è la reazione centrale della cascata di attivazione del complemento. Questa reazione è comune a tutte e tre le vie di attivazione ed è catalizzata da due differenti C3 convertasi. Tuttavia anche altre proteasi, come la Plasmina, o tossine, quali il fattore del veleno del cobra, possono attivare C3. La formazione di C3b avviene con un cambiamento conformazionale che consente l'esposizione del legame tioestere estremamente reattivo (Fig. 5), e con conseguente formazione di legami covalenti con i gruppi OH o NH₂ di diverse molecole bersaglio, solubili o presenti sulla superficie dei microrganismi (Dodds, 1998). Per azione della C3 convertasi, la molecola di C3 nativa è scissa in C3a e C3b al livello di uno specifico residuo di arginina della catena α . Il peptide C3a, di circa 9 KDa è una potente anafilatossina, che agisce lontano dal sito di attivazione di C3 come mediatore dei processi infiammatori.

Meccanismi effettori

Le modalità di attivazione sopra descritte convergono tutte, attraverso una serie di passaggi proteolitici, verso l'attivazione della molecola chiave del sistema del complemento, C3. Quest'ultima in forma attiva è in grado di generare le molecole effettrici che danno inizio agli eventi tardivi della cascata del complemento. I tre principali effetti prodotti dall'attivazione del complemento sono l'opsonizzazione del patogeno, il reclutamento delle cellule coinvolte nei processi infiammatori e la lisi del patogeno (Fig. 6).

Uno dei prodotti dell'attivazione di C3, cioè C3b, è direttamente coinvolto nella opsonizzazione del patogeno. Infatti, le molecole di C3b

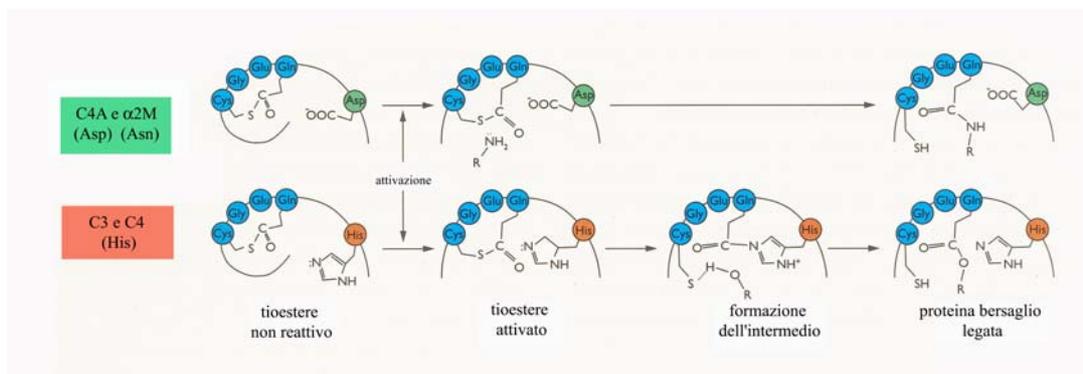


Fig. 5: Rappresentazione schematica del meccanismo di attivazione delle molecole contenenti il sito tioestere. (Da: Dodds, 1998)

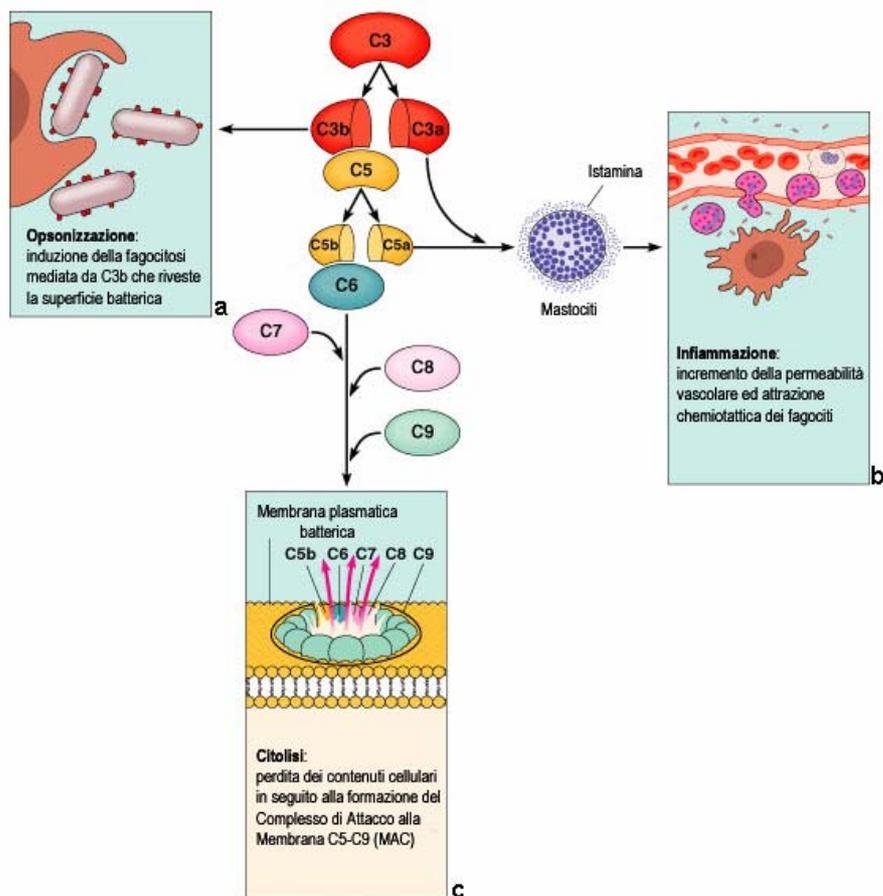


Fig. 6: Le tre vie di attivazione del complemento prevedono una serie di differenti reazioni a cascata che convergono nella formazione della C3 convertasi, capace di scindere la componente C3 del complemento in C3a e C3b. Quest'evento genera tre diverse vie effettrici. **(a)** Il frammento C3b si lega alle membrane del bersaglio opsonizzandole e facilitandone l'internalizzazione da parte dei fagociti. **(b)** I due frammenti C3a e C5a, noti come anafilatossine, sono due peptidi dotati di potente attività chemiotattica, che innescano il pathway infiammatorio. **(c)** Infine, l'attivazione di C5 ad opera della C5 convertasi attiva la cascata delle componenti terminali del complemento. Le componenti terminali si associano sulle membrane cellulari a formare un complesso che induce la formazione di pori nella membrana del patogeno determinandone la morte per lisi (Adattato da: Pearson Education, Inc. 2004).

prodotte nel processo di attivazione, formano un rivestimento sulla superficie dell'agente patogeno, indirizzandolo verso l'eliminazione da parte di cellule specializzate.

C3b può legarsi, in alternativa, al complesso C4bC2a attivato per formare il complesso C4bC2aC3b che rappresenta la C5 convertasi della via classica. Questo complesso è in grado di legare e scindere C5, mediante l'attività serin-proteasica di C2a, iniziando così la generazione del complesso di attacco alla membrana (MAC). Anche nel caso della via alternativa alcune molecole di C3b, generate dalla C3 convertasi, formano un nuovo complesso insieme a C3bBb e cioè C3bBbC3b, che rappresenta la C5 convertasi della via alternativa la cui funzione è di tagliare C5. Dopo questa tappa la via classica e alternativa convergono.

Gli elementi che conducono alla formazione del MAC sono comuni alle tre vie, classica, lectinica ed alternativa. Dopo la proteolisi di C5, mediata dalla C5 convertasi, le componenti terminali del complemento C6, C7, C8 e C9 sono successivamente attivate portando alla formazione del MAC. Il primo passo di tale processo, è il legame di C5b, prodotto dalla scissione di C5, con la molecola C6. Il complesso C5bC6 a sua volta lega una molecola di C7. Questa reazione produce un cambiamento conformazionale nelle molecole costituenti, con esposizione di un sito idrofobico di C7 che è così in grado di inserirsi nel doppio strato lipidico della membrana cellulare del patogeno. Successivamente, al complesso C5bC6C7 attivato si lega una molecola di C8 costituita da due sub-unità, delle quali C8 β si lega a C5b, e C8 α - γ s'inserisce nel doppio strato lipidico. Infine C8 α - γ induce la polimerizzazione di 10-16 molecole di C9 che si organizzano a formare un

anello chiamato MAC. Il MAC ha una faccia esterna idrofobica ed un canale interno idrofilico, il cui diametro di 100 Å consente il passaggio di ioni e piccole molecole. Questo comporta uno squilibrio osmotico, con conseguente perdita dell'omeostasi cellulare, rigonfiamento della cellula e sua lisi. L'ingresso nella cellula di enzimi come il lisozima, contribuisce alla morte del patogeno (Fig. 7).

L'anafilatossina C3a e sue funzioni biologiche

Nei mammiferi la migrazione e l'accumulo di leucociti dal sangue ai siti di infezione, danno tissutale, o infiammazione è un processo ben descritto e caratterizzato. Questo è regolato da diverse molecole esogene ed endogene con capacità chemioattrattante, quali i lipopolisaccaridi batterici (LPS) e gli N-formil peptidi, da mediatori di natura lipidica, varie chemochine, ed i potenti frammenti bioattivi C3a, C4a e C5a che sono rilasciati rispettivamente da C3, C4 e C5 durante l'attivazione della cascata del complemento (Hugli, 1989; Wetsel et al., 2000). Questi frammenti sono anche conosciuti come anafilatossine, termine introdotto da Friedberger circa 90 anni fa, con il quale si sottolineava una particolare attività biologica associata al siero complemento-attivato. Quest'ultimo, infatti, procura una rapida morte anafilattico-simile se iniettato in animali da laboratorio.

In particolare, l'anafilatossina C3a è un peptide di 74-78 amminoacidi (secondo la specie considerata), derivante dalla proteolisi dell'estremità N-terminale della catena α di C3 in seguito all'attivazione dei pathway classico, lectinico o alternativo del sistema del complemento (Lambris, 1989; Song et al., 2000). C3a media una varietà di risposte biologiche *in vivo* ed *in vitro*,

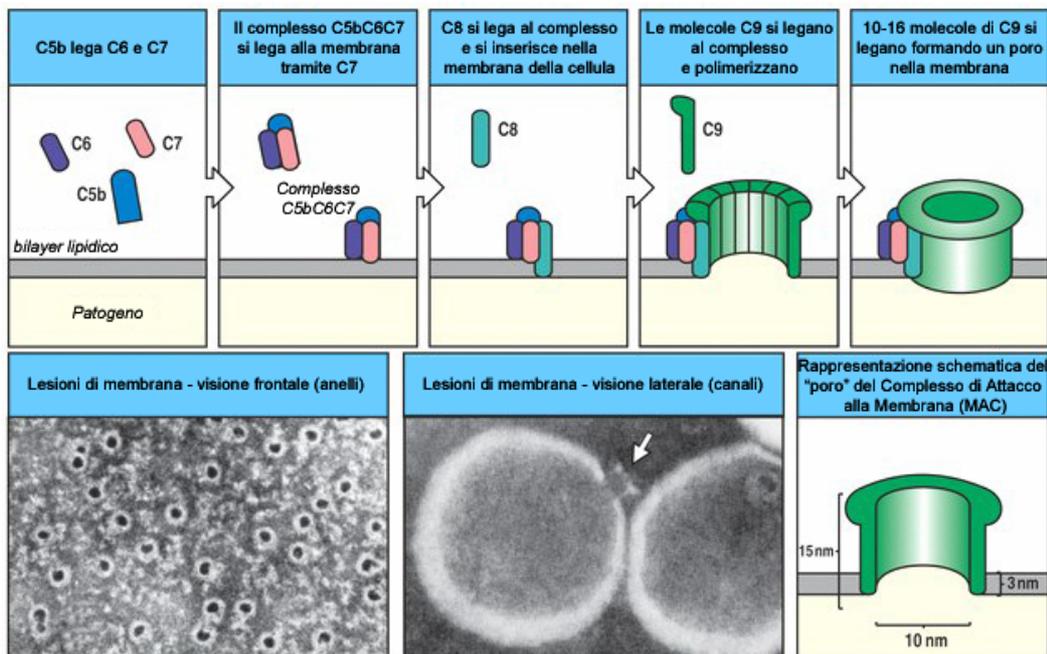


Fig. 7: Formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC) e formazione del poro nel doppio strato lipidico. C5b inizia il processo di formazione del MAC legandosi, in successione, a molecole di C6, C7 e C8. C7 e C8, una volta legati, vanno incontro a modificazioni conformazionali, con esposizione di domini idrofobici che si inseriscono nella membrana. Il complesso C6/C7/C8 causa danni limitati alla membrana, ma è necessario per indurre la polimerizzazione di C9, che si inserisce nella membrana attraverso il suo sito idrofobico. Fino a 16 molecole di C9 sono aggiunte per formare un canale di 100 Å di diametro nella membrana. Questo canale induce lesioni alla membrana cellulare batterica portando alla morte del patogeno. Le immagini di microscopia elettronica mostrano membrane di eritrociti che presentano il MAC in visione frontale e laterale. Strutture di questo tipo sono prodotte anche dalla perforina 1. C9 e la perforina 1 sono codificate da geni correlati. Foto: S. Bhakdi e J. Trantum-Jensen. (Da: Janeway, 1999).

quali il rilascio di istamina, e la mobilitazione degli ioni calcio intracellulare nei mastociti umani, il rilascio di enzimi lisosomiali dai leucociti, la contrazione della muscolatura liscia, l'aggregazione delle piastrine in *Cavia porcellus*, e la modulazione delle risposte immuni cellulare ed umorale (Hugli, 1990; Ember et al., 1998). Più recentemente, è stato dimostrato che, insieme a C5a, C3a è la molecola con la più elevata attività pro-infiammatoria sugli eosinofili (Daffern et al., 1995) e sui mastociti umani (Nilsson et al., 1996; Hartmann et al., 1997). Gli eosinofili, in seguito a stimolazione con C3a, C3a umano ricombinante, o peptidi sintetici che riproducono la sequenza C-terminale di C3a, esibiscono polarizzazione concentrazione dipendente, chemiotassi, e rilascio di enzimi (Daffern et al., 1995).

Tra le proprietà chimico-fisiche caratteristiche di C3a, ed in generale di tutte le anafilatossine, vi è un elevato numero di cariche positive superficiali e l'alta resistenza e stabilità ad elevati valori di temperatura, pH e concentrazioni saline. Infatti, la struttura secondaria di C3a è caratterizzata dalla presenza di un alto livello di elicità (56%), come confermato anche da analisi cristallografiche eseguite sulla molecola di C3a umana (Hugli, 1975; Chazin et al., 1988).

In particolare, l'analisi delle molecole di C3a da diverse specie di mammiferi ha individuato due regioni, il dominio anafilatossinico e la porzione C-terminale, rilevanti sia da un punto di vista strutturale, che funzionale (Ember et al., 1998). Il dominio anafilatossinico è caratterizzato da sei cisteine in posizioni conservate, e studi strutturali hanno indicato che tre ponti disolfuro stabilizzano un nucleo strettamente impacchettato che consiste di quattro eliche antiparallele. La regione C-terminale delle molecole di C3a

dei mammiferi è costituita da una diecina di amminoacidi in conformazione “random coil”, con la sequenza LGLAR degli ultimi cinque amminoacidi conservata in tutti i mammiferi. Mentre vi è accordo nell’assegnare alla porzione C-terminale di C3a un ruolo effettore nel riconoscimento e legame con recettori specifici di membrana, sia la lunghezza che la sequenza primaria dell’estremità C-terminale, che contribuisce alla funzione dell’anafilatossina, sono oggetto tuttora di intensa attività di ricerca. L’uso di analoghi sintetici di C3a che riproducono la sequenza di questa regione ha consentito di stabilire che il tripeptide LAR è essenziale per il legame agli eosinofili e cruciale per l’induzione di effetti biologici, quali il cambiamento di concentrazione del Ca^{2+} intracellulare ed il rilascio di specie di ossigeno reattivo.

La maggior parte delle attività biologiche di C3a, incluso il reclutamento e l’attivazione dei leucociti ed altre cellule effettrici ai siti dell’infiammazione, è mediata dal legame specifico a recettori di superficie cellulare a sette domini transmembrana, accoppiati alla proteina G (Ember et al., 1998), ed appartenenti alla famiglia delle rodopsine (C3aR). Carattere distintivo di questo tipo di recettori è l’induzione di una risposta cellulare di tipo transitoria, detta desensitizzazione omologa, consistente nella incapacità transiente di mettere in moto i meccanismi effettori anche in presenza del ligando (Naik et al., 1997). Inoltre l’attività di questi recettori accoppiati a proteine G è finemente regolata dalla loro fosforilazione.

C3aR è stato clonato in diverse specie di mammiferi (Ames et al., 1996; Crass et al., 1996; Roglic et al., 1996; Hsu et al., 1997; Tornetta et al., 1997; Fukuoka et al., 1998; Hollmann et al., 1998), e la sua caratterizzazione funzionale è stata condotta principalmente in uomo e topo. Una caratteristica

comune a tutti i C3aR dei mammiferi è l'ampio pattern di espressione tissutale, che include anche organi linfoidei (Ames et al., 1996; Crass et al., 1996; Roglic et al., 1996; Hsu et al., 1997; Tornetta et al., 1997; Fukuoka et al., 1998; Hollmann et al., 1998). Carattere distintivo di tali recettori dei mammiferi è, inoltre, la presenza di un secondo loop extracellulare, insolitamente grande, di circa 175 amminoacidi, tra il IV e il V dominio transmembrana (Fig. 8), a livello del quale vi è bassa omologia di sequenza tra le specie (Ember et al., 1998). Questa caratteristica strutturale che li rende unici, ha suggerito un ruolo speciale per questo loop nel legame con il ligando. Infatti, l'analisi di mutanti chimerici e di delezione di C3aR umano ha stabilito che gran parte (65%) della sequenza di questo loop (residui amminoacidici 198-308) può essere rimossa senza che il legame di C3a o la mobilizzazione del calcio siano influenzati (Chao et al., 1999). Questa analisi ha anche suggerito un modello d'interazione C3a-C3aR (Fig. 9) coinvolgente due siti: un primo sito effettore sul recettore interagirebbe con la sequenza C-terminale GLAR di C3a, mentre i residui anionici vicino all'estremità N- e C-terminale del secondo loop extracellulare costituirebbero un sito d'interazione secondario con i residui cationici nella regione ad elica C-terminale di C3a (Chao et al., 1999). Più recentemente è stato dimostrato che la sulfazione della tirosina 174 di C3aR umano è essenziale per il legame di C3a (Gao et al., 2003).

Il legame ligando-recettore fa sì che C3aR sia internalizzato nel giro di pochi minuti, e la fosforilazione dei residui di Ser e Thr dell'estremità citosolica C-terminale sembra giocare un ruolo cruciale in questo processo (Langkabel et al., 1999; Settmacher et al., 2003).

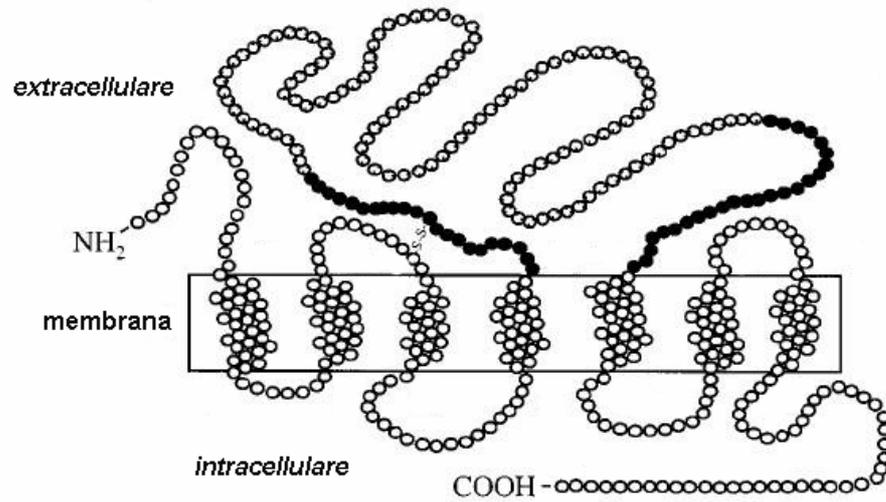


Fig. 8: Rappresentazione schematica del recettore di C3a umano. I cerchi pieni rappresentano la porzione di sequenza del II loop extracellulare ritenuta indispensabile per la funzionalità del recettore, così come si evince da un'analisi per delezione. (Da: Chao et al., 1999)

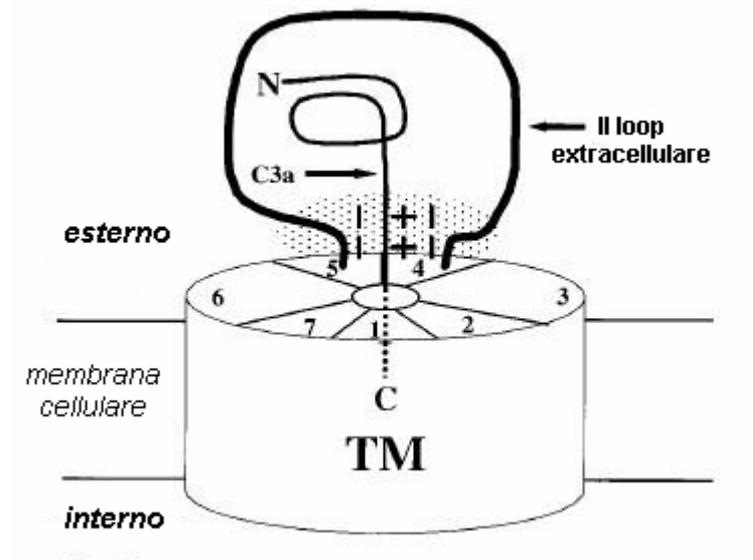


Fig. 9: Il recettore di C3a dei mammiferi è schematicamente mostrato come un cilindro suddiviso in sette sezioni corrispondenti ai sette domini transmembrana. Il modello di interazione “carica-carica” di C3a con il suo recettore prevede che le due regioni a carica negativa, localizzate alle estremità del II loop extracellulare del recettore, siano in grado di interagire con le cariche positive della porzione C-terminale del peptide C3a. Questo meccanismo faciliterebbe l’interazione che si realizza tra il sito effettore primario del recettore e la sequenza C-terminale GLAR di C3a. (Da: Chao et al., 1999)

Nei mammiferi il pathway infiammatorio del sistema del complemento è ben caratterizzato sia a livello molecolare che funzionale, al contrario sono ancora poche le informazioni disponibili circa la sua struttura, funzione ed evoluzione negli altri vertebrati ed invertebrati (Sunyer et al., 2005).

Recentemente è stato riportato in letteratura il clonaggio di un cDNA di trota che codifica per una molecola di 364 aa che mostra un elevato grado di omologia di sequenza ed una forte relazione filogenetica con C3aR dei mammiferi (Boshra et al., 2005). Il recettore di trota, tuttavia, manca di una porzione significativa del secondo loop extracellulare, elemento caratterizzante il recettore di C3a dei mammiferi.

Funzioni diverse del sistema del complemento

Per molti decenni il sistema del complemento è stato considerato esclusivamente come un braccio effettore della risposta immune, e quindi il suo studio è stato indirizzato a funzioni ben definite all'interno di un ambiente strettamente immunologico. Studi recenti, tuttavia, hanno dimostrato funzioni differenti del sistema del complemento, distanti da quelle tradizionalmente considerate. L'esistenza di diversi profili d'espressione di varie molecole del complemento in differenti tessuti e stadi di sviluppo embrionale, come anche attività biologiche connesse a tali profili di espressione, suggeriscono ruoli nuovi di questo sistema quali modulatori di attività cellulari durante lo sviluppo (osteogenesi), destino e differenziamento delle cellule staminali (ematopoiesi, proliferazione delle cellule B), riproduzione e processi di rigenerazione di tessuti ed organi (fegato dei mammiferi, coda, arto, e strutture dell'occhio degli urodeli). In figura 10 sono

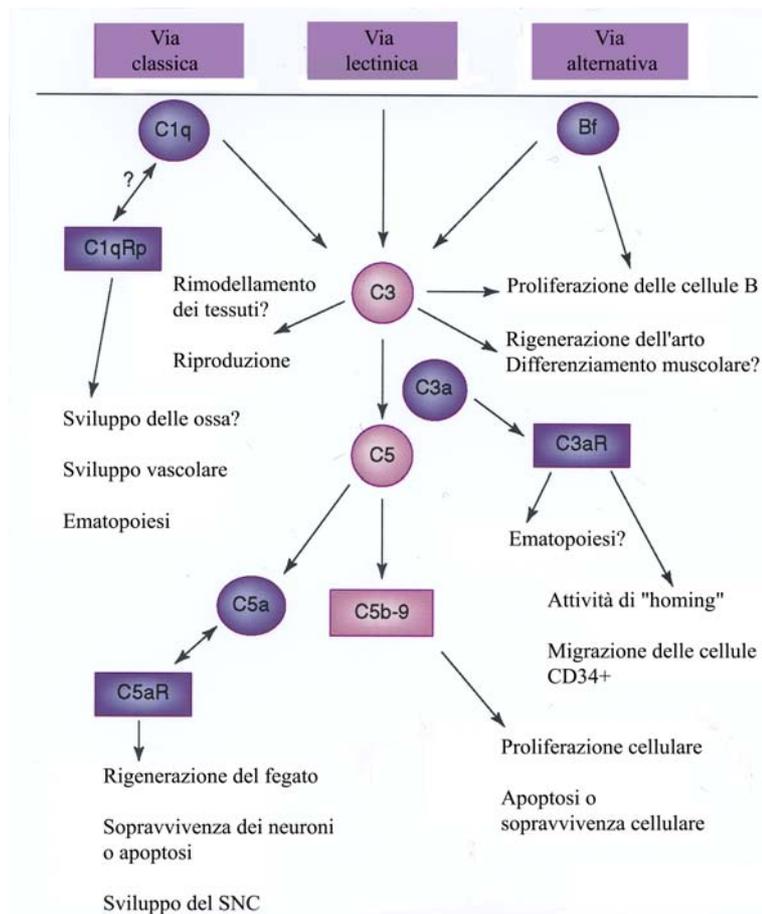


Fig. 10: L'attivazione del complemento, innescata da ciascuna delle tre vie (classica, lectinica ed alternativa), conduce ad una cascata di eventi proteolitici che generano frammenti bio-attivi e complessi proteici che mediano funzioni diverse attribuibili al sistema del complemento. Nello schema sono riportate le varie componenti ed i recettori del complemento che sono coinvolti nella regolazione di questi differenti processi. (Da: Mastellos e Lambris, 2002)

schematicamente rappresentati questi processi, trattati in modo esauriente in una recente pubblicazione (Mastellos e Lambris, 2002).

Cenni sull'evoluzione del sistema del complemento

Tutti i geni del sistema del complemento sono condivisi da mammiferi, uccelli e teleostei (Fig. 11); alcune particolarità sono costituite dalle assenze di C2 e C9 in *Gallus gallus*, di properdina e inibitore di C1 negli anfibi, e MASP-1 e MASP-3 nei teleostei. La mancanza di questi geni può essere imputata a perdite secondarie, mentre l'assenza del fattore D e di taluni membri appartenenti alla famiglia di geni dell'attivazione del complemento (RCA), riscontrata in altre specie, potrebbe piuttosto essere dovuta a difficoltà nella loro identificazione. Infatti, il fattore D, caratterizzato dalla presenza di un solo dominio di proteasi a serina (Volanakis e Arlaud, 1998), ha una struttura troppo semplice che ne rende difficile l'identificazione. Similmente, tutti i membri delle RCA potrebbero essere presenti ma non facilmente identificabili nel genoma di alcune specie; infatti essi hanno una struttura semplicissima costituita da "short consensus repeats" (SCR), poco conservati persino tra diverse specie di mammiferi, e presenti anche in geni non appartenenti al sistema del complemento.

Quanto appena detto, consente di concludere che la maggior parte delle duplicazioni geniche che hanno determinato la complessità del sistema del complemento, sono avvenute prima della divergenza dei teleostei e tetrapodi, e cioè circa 500 milioni di anni fa.

La mancanza d'informazioni a livello genomico per condroitti e agnati rende difficile la valutazione del loro sistema del complemento. Tuttavia,

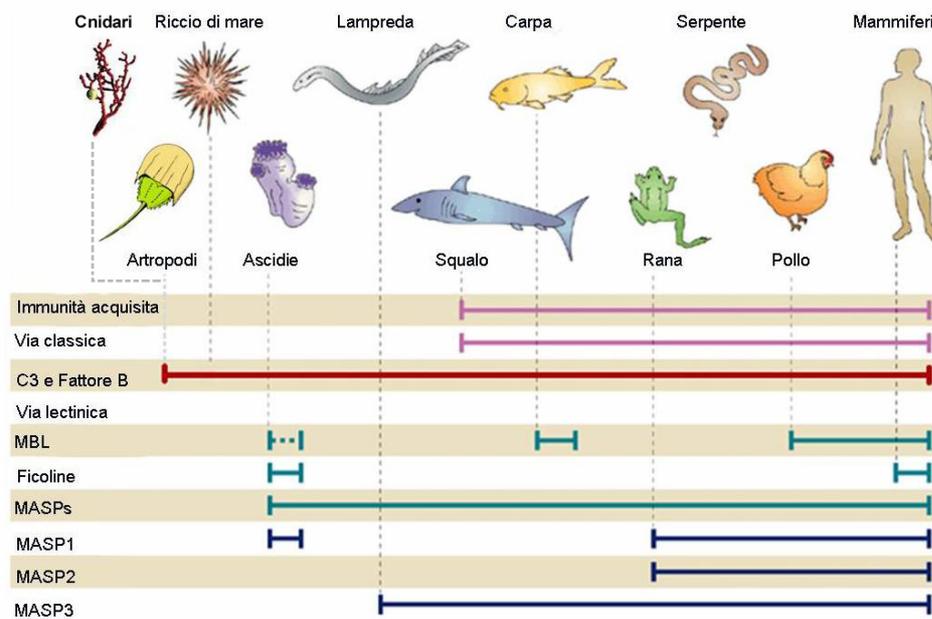
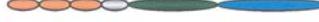


Fig. 11: Evoluzione del sistema del complemento. L'immunità acquisita, come illustrato in figura, si è affermata in una fase precoce dell'evoluzione dei vertebrati mandibolati (circa 450 milioni di anni fa), con i pesci cartilaginei. Studi sull'evoluzione del sistema immune hanno dimostrato che gli squali e i vertebrati più evoluti hanno un sistema del complemento ben sviluppato, che comprende tutte e tre le vie di attivazione, sebbene non tutte le componenti per ciascuna via siano state identificate. Recentemente, C3, la componente centrale del sistema del complemento, ed il fattore B sono state identificate in Cnidaria e Artropoda, indicando così che la parte centrale del sistema si è affermata almeno 1.300 milioni di anni fa. Le stesse componenti centrali del sistema sono state identificate in un echinoderma. Nelle ascidie (comparse circa 540 milioni di anni fa) sono state identificate molecole cruciali del sistema del complemento, quali ficoline, MBL, MASP, C3 e il fattore B. (Adattato da: Fujita, 2002).

analisi funzionali indicano che il sistema del complemento di squalo possiede attività emolitica assente in quello di lampreda (Jensen et al., 1981; Nonaka et al., 1984). Inoltre, lavori condotti su geni individuali rafforzano l'idea che il sistema del complemento dei condroitti è simile a quello dei vertebrati più evoluti (Fig. 11). Riguardo agli agnati, viceversa, sembrano sussistere differenze importanti. Ciò comporta che le duplicazioni geniche che avrebbero interessato C3/C4/C5 e Bf/C2 siano avvenute nei vertebrati mandibolati dopo la divergenza degli agnati. Inoltre, in tali specie non sono mai stati individuati né i geni C6, C7, C8A, C8B, e C9, né alcun gene primordiale all'origine delle loro duplicazioni (Nonaka e Kimura, 2006). In conclusione, sembrerebbe che il sistema del complemento sia andato incontro ad un drastico cambiamento dopo la divergenza degli agnati ma prima di quella dei condroitti. Sebbene questa affermazione per essere confermata abbia bisogno di un'analisi di genomi da entrambi i gruppi, è plausibile che i cambiamenti drastici nel sistema del complemento siano avvenuti contemporaneamente alla comparsa dell'immunità adattativa, e cioè tra 530 e 650 milioni di anni fa.

Andando indietro agli urocordati, l'analisi del genoma di *C. intestinalis* ha dimostrato che la maggioranza delle famiglie geniche del sistema del complemento (Fig. 12) era già presente negli urocordati e che, tra le famiglie, molti geni sono presenti in più copie (Azumi et al., 2003). Tuttavia, la molteplicità di geni non presenta un rapporto ortologo uno-a-uno con i membri delle stesse famiglie geniche dei vertebrati superiori, indicando così che le duplicazioni geniche tra membri di ciascuna famiglia sono avvenute indipendentemente negli urocordati e nei vertebrati.

| | <i>Ciona</i> | Uomo |
|---|--------------|------|
| collectina/ficolina | 21 | 10 |
|  | 2 | 3 |
|  | 9 | 3 |
|  | 10 | 4 |
| MASP/C1s/C1r | 4 | 4 |
|  | 3 | 1 |
|  | 0 | 3 |
|  | 1 | 0 |
| C3/C4/C5/A2M | 4 | 5 |
| Bf/C2 | 2 | 2 |
|  | 0 | 2 |
|  | 2 | 0 |
| C6/C7/C8/C9/perforina | 11 | 6 |
|  | 9 | 0 |
|  | 0 | 1 |
|  | 0 | 3 |
|  | 0 | 1 |
|  | 0 | 1 |
|  | 2 | 0 |
| SCR | 136 | 53 |
| integrine di tipo alpha | 12 | |

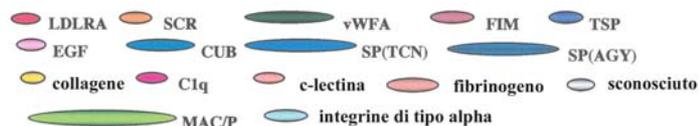


Fig. 12: Molti geni del complemento sono stati individuati nel genoma di *Ciona intestinalis*. Nell'elenco sono riportati i geni che mostrano una significativa omologia con i geni del complemento dei vertebrati e che presentano domini strutturali specifici di tali molecole. A sinistra sono mostrate schematicamente le strutture dei geni trovati nel genoma di *Ciona*, e a destra il numero di copie presenti in *Ciona* e nell'uomo (Da: Azumi et al., 2003).

A tutt'oggi, non sono state riportate sequenze geniche da emicordati e soltanto informazioni frammentarie sono disponibili per i cefalocordati e gli echinodermi. Tuttavia, il sequenziamento in corso dei genomi di anfibio e riccio di mare potrebbe fornire informazioni utili sui primi stadi dell'evoluzione del sistema del complemento dei deuterostomi.

Poichè i genomi dei primi protostomi analizzati *Drosophila melanogaster* e *Coenorabditis elegans*, non contenevano geni del sistema del complemento, si era ipotizzato che questo fosse un sistema esclusivo dei deuterostomi. Ciò si è rivelato errato dopo la recente identificazione di alcuni geni del complemento in *Carcinoscorpius rotundicauda* (Arthropoda) (Zhu et al. 2005) e *Swiftia exserta* (Cnidaria) (Dishaw et al., 2005), retrodatando l'origine del sistema a più di 1.300 milioni di anni fa, alla divergenza degli eumetazoi in Cnidaria e Bilateria. Pertanto, l'assenza del sistema del complemento in *Drosophila melanogaster* e *Coenorabditis elegans* sembra dovuta ad una perdita secondaria, avvenuta più volte ed indipendentemente nel lineage dei protostomi.

Questa conclusione è stata rafforzata dall'analisi del genoma dell'anemone di mare *Nematostella vectensis*, contenente solo due geni del complemento, C3 e Bf (Nonaka e Kimura, 2006). Questo risultato suggerisce che il suo sistema del complemento è molto semplice, essendo composto soltanto dalle due componenti centrali del sistema, che da sole costituirebbero un primitivo pathway alternativo: C3 sarebbe direttamente attivato da Bf e formerebbe legami covalenti con molecole nonself, usando il suo ponte tioestere intramolecolare. Tuttavia, non si può escludere la possibilità che

altre componenti siano presenti nell'anemone di mare, ma che le loro sequenze divergano troppo per consentirne un'identificazione in banche dati.

Il sistema sperimentale: *Ciona intestinalis*

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

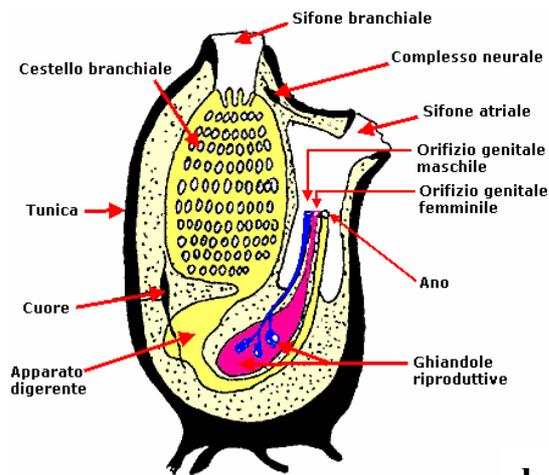
Il phylum è suddiviso in tre subphyla: urocordati, cefalocordati e vertebrati, e tra questi gli urocordati erano considerati i più antichi, ed i cefalocordati i più prossimi ai vertebrati (Rowe, 2004). Tuttavia, recenti studi di filogenesi molecolare pongono gli urocordati, e non i cefalocordati, alla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

Nel subphylum degli urocordati è collocata la classe degli ascidiacei, animali marini sessili cui appartiene la specie *Ciona intestinalis*, il modello sperimentale utilizzato in questi studi (Fig. 13a).

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



a



b

Fig. 13: (a) Individui adulti di *Ciona intestinalis*. (b) Rappresentazione schematica della struttura corporea di un individuo adulto. In questa visione laterale sono evidenziati i principali organi interni.

L'anatomia della forma adulta delle ascidie, invece, poco giustifica la loro collocazione nella scala evolutiva dei Cordati. Gli individui adulti (Fig. 13b) (Barnes, 1987; Brusca e Brusca, 1990), infatti, sono di forma cilindrica o globosa, aderiscono al substrato attraverso un peduncolo fibroso e sono rivestiti da uno speciale involucro, la tunica, da cui prendono il nome di Tunicati.

La tunica delle ascidie, il cui costituente principale è la tunicina, ha una speciale caratteristica: contiene cellule ameboidi (o cellule della tunica) e cellule del sangue, che sono migrate dalle strutture mesenchimali corporee. Una delle funzioni della tunica è quella di permettere l'ancoraggio al substrato; funge, inoltre, da supporto esoscheletrico protettivo. Il lato posteriore dell'animale è quello coinvolto nell'ancoraggio al substrato, il lato antero-superiore dell'animale presenta due aperture: un sifone inalante ventrale branchiale (orale o buccale) ed un sifone esalante dorsale atriale.

Il corpo delle ascidie può essere suddiviso in tre regioni: una regione faringea (o toracica) anteriore, che contiene il faringe, una regione addominale che contiene il tratto digerente e gli altri organi interni, ed un post-addome. Il post-addome di solito non si distingue facilmente dall'addome; tuttavia, in alcune ascidie coloniali, esso assume una forma allungata e contiene il cuore e gli organi preposti alla riproduzione. L'acqua di mare, contenente cibo ed altre componenti inorganiche, entra attraverso il sifone branchiale; acqua, prodotti di scarto e cellule riproduttive sono rilasciati attraverso il sifone atriale. Ciascun sifone è regolato da speciali muscoli sfinterici, che ne determinano la chiusura. La bocca, collocata dietro il sifone branchiale, è collegata con un grande faringe, o cestello branchiale,

una camera perforata da fila dorsoventrali di numerose fessure branchiali, dette stigmi. I vasi sanguigni attraversano la parete del faringe a livello di queste fessure, dove si realizzano gli scambi gassosi. Lungo il margine ventrale del cestello branchiale c'è un organo specializzato chiamato endostilo, che sembra avere, da un punto di vista evolutivo, relazioni con la ghiandola tiroide dei vertebrati. Quest'organo produce grandi quantità di muco, che raggiunge le particelle alimentari e le avvolge, indirizzandole al tratto digerente. Il tratto digerente conduce allo stomaco, che si estende nella parte terminale del tratto a forma di U, e poi a un intestino che termina con l'ano che si apre nella cavità atriale.

Il sistema nervoso consiste di un unico ganglio cerebrale localizzato tra i due sifoni. Dal ganglio si originano i nervi diretti a varie parti del corpo, come i muscoli, il faringe e i sifoni. Una ghiandola neurale, adiacente al ganglio, è collegata, attraverso un dotto, al faringe. La funzione di questa ghiandola è tuttora sconosciuta.

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

Gli emociti delle ascidie

Studi di microscopia ottica ed elettronica a trasmissione (TEM), hanno consentito di raggruppare gli emociti delle ascidie in quattro tipi cellulari: le cellule staminali, gli amebociti, le cellule vacuolate e le cellule pigmentate (Rowley et al., 1984).

Le cellule staminali (Fig. 14a) sono note anche col termine di emoblasti (Milanesi e Burighel, 1978), emocitoblasti (Ermak, 1976) o cellule linfocita-simile (LLC) (Overton, 1966; Fuke, 1979; Wright, 1981). Le cellule staminali si ritrovano principalmente nei noduli emopoietici, localizzati a livello delle pareti che rivestono l'intera struttura corporea delle ascidie e a livello delle pareti del faringe. Tali cellule sono coinvolte in questi tessuti in una intensa attività proliferativa, che suggerisce il loro coinvolgimento nella risposta immunitaria (Wright, 1981). Sono state ritrovate, inoltre, anche nell'emolinfa circolante. Le cellule staminali hanno un elevato rapporto nucleo/citoplasma e manifestano i tipici caratteri ultrastrutturali delle cellule indifferenziate. Sono cellule generalmente piccole, dai 5 ai 7 μm di diametro, e presentano un nucleo centrale contenente una grande quantità di eterocromatina (Milanesi e Burighel, 1978; Rowley, 1982a). Il citoplasma è omogeneo e contiene un gran numero di ribosomi liberi, talvolta organizzati in poliribosomi, dei mitocondri ed un reticolo endoplasmatico rudimentale. Secondo Ermak (1976), queste cellule rappresentano una fonte, ancora indifferenziata, dei vari tipi di emociti. Egli riteneva, infatti, che le cellule staminali contenute nei noduli emopoietici producessero le LLC, dalle quali successivamente si sarebbero differenziati tutti gli altri tipi di emociti. Le cellule linfocita-simile presentano un grande nucleo, che manca di nucleolo, ed una piccola porzione

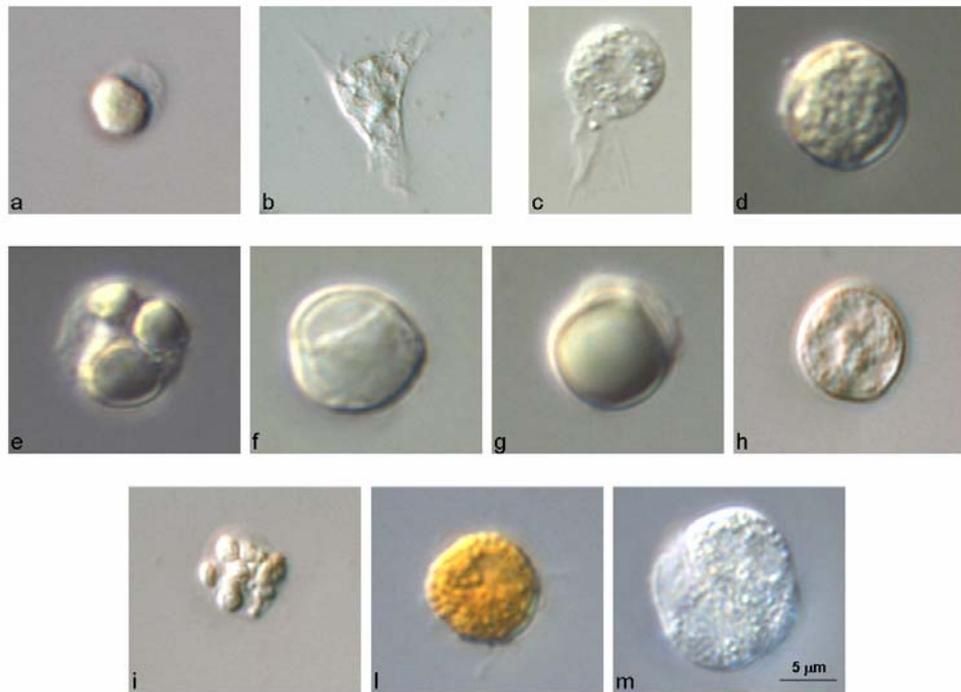


Fig. 14: Emociti di *Ciona intestinalis*. Osservazione effettuata con ottica Nomarski. **(a)** Cellula staminale; **(b)** amebocita ialino non vacuolato; **(c)** amebocita ialino vacuolato; **(d)** amebocita granulare; **(e)** amebocita refrattile; **(f)** granulocita univacuolare refrattile (URG); **(g)** “signet ring”; **(h)** cellula compartimentata; **(i)** morula; **(l)** cellula pigmentata; **(m)** nefrocita.

di citoplasma, contenente poche piccole vescicole. Si ritiene che le LLC siano coinvolte nel riconoscimento del tessuto allogenico (Raftos et al., 1987), fungendo da cellule immunocompetenti.

Gli amebociti, in genere molto abbondanti nel sangue delle ascidie, hanno un diametro che varia tra i 6 e i 12 μm e possono essere raggruppati in quattro sottocategorie: amebociti ialini non-vacuolati, amebociti ialini vacuolati, amebociti granulari ed amebociti refrattili (Rowley, 1981; 1982a). Questi quattro tipi di amebociti si distinguono non solo per la loro morfologia ma anche per le diverse funzioni. Gli amebociti ialini non vacuolati (Fig. 14b) *in vitro* si agglutinano rapidamente attraverso un meccanismo che richiama quello più complesso dell'emostasi. In presenza di particelle estranee, come batteri, queste cellule non sono coinvolte in processi di fagocitosi. Al contrario, gli amebociti ialini vacuolati (Fig. 14c) e gli amebociti granulari (Fig. 14d) sono cellule che mostrano elevata attività fagocitica verso una ampia varietà di antigeni, sia *in vivo* che *in vitro* (Rowley, 1981). Queste cellule sono caratterizzate da un citoplasma contenente molte vescicole, una piccola quantità di reticolo endoplasmatico rugoso (RER), complessi di Golgi e pochi mitocondri. La presenza delle numerose vescicole, e vacuoli di diverse dimensioni suggerisce il possibile coinvolgimento di entrambi i tipi di cellule nell'accumulo e nella conservazione del vanadio (Rowley, 1982b; 1983). Si è visto infatti, che in seguito alla fagocitosi i microrganismi sono accumulati nei vacuoli contenenti vanadio: quest'ultimo, essendo un potente veleno metabolico, potrebbe giocare un importante ruolo nell'eliminazione dei microbi. Per quanto riguarda gli amebociti refrattili (Fig. 14e), la loro funzione non è ben nota, sebbene siano stati osservati piccoli fenomeni di

fagocitosi. Anch'essi, quindi, potrebbero essere coinvolti nelle reazioni di difesa cellulare.

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

Le cellule vacuolate sono distinte in almeno tre sottotipi: granulociti univacuolari, cellule compartimentate e cellule a morula (Wright, 1981). Al primo sottotipo appartengono cellule che hanno un diametro di 6-12 μm , con un unico grande vacuolo contenente materiale granulare, un nucleo localizzato in periferia, ribosomi liberi e pochi mitocondri nel citoplasma. Appartengono a questo sottotipo i granulociti univacuolari refrattili (URG) (Fig. 14f) e le cellule "signet-ring" (Fig. 14g). Le cellule compartimentate (Fig. 14h) sono poco comuni e hanno forma sferica, con un diametro che varia tra gli 8 e i 12 μm . Nel citoplasma presentano un numero variabile di vacuoli in posizione periferica, il nucleo è centrale e non contiene il nucleolo e il citoplasma intorno al nucleo e ai compartimenti non è granulare. Le morule (Fig. 14i) sono cellule circolari, con un diametro di 8-16 μm , spesso con aspetto simile alle more, e contengono grandi vacuoli circondati da membrana, ripieni di materiale elettrondenso. Le morule sono state spesso indicate anche con il termine di "vanadociti" per la loro capacità di accumulare una grande varietà di metalli, tra cui il vanadio (Kustin et al., 1976). Tali cellule rappresentano anche un sito di accumulo di altre componenti, tra cui proteine e polisaccaridi (Wright, 1981), e possono essere

coinvolte nella risposta infiammatoria (Anderson, 1971) e nella sintesi della tunica (Endean, 1961).

Le cellule pigmentate (Fig. 14l) hanno un diametro di 6-13 μm e contengono un numero variabile di granuli di pigmento di diverso colore, il più frequente dei quali è il giallo (Rowley, 1981). Alcuni studiosi ritengono che i pigmenti contenuti in questi granuli siano basati su componenti contenenti vanadio (George, 1926); secondo altri, invece, si tratta di granuli ricchi di melanina o carotenoidi (Wright, 1981). Le cellule pigmentate si ritrovano spesso attaccate alle pareti dei vasi, in particolare quelli che circondano il sifone atriale e la tunica. La funzione di queste cellule non è ancora stata stabilita.

Oltre a queste quattro classi di cellule le cui caratteristiche e funzioni sono ben note, esistono altre cellule chiamate nefrociti (Fig. 14m). Queste cellule, che sono spesso molto più grandi degli altri emociti circolanti e raggiungono i 40 μm di diametro, si ritiene siano coinvolte nell'accumulo di vari prodotti escretivi (Wright, 1981).

SCOPO DELLA RICERCA

Una grande varietà di risposte di difesa riconducibili a quelle di tipo immunitario quali fagocitosi, reazioni citotossiche ed incapsulazione sono state descritte in diverse specie di invertebrati (Ratcliffe et al., 1995). Nelle ascidie, queste reazioni sono state analizzate principalmente a livello morfologico. In particolare, in *C. intestinalis*, è stata descritta una reazione infiammatoria procurata dall'iniezione nella tunica di eritrociti o di antigeni solubili (Parrinello et al., 1993; Parrinello et al., 1984; Parrinello e Patricolo, 1984). Questi trattamenti della tunica inducono localmente infiltrazione di amebociti granulari, granulociti univacuolari refrattili e più in generale di emociti di tipo vacuolato. La migrazione di queste cellule dai noduli emopoietici del tessuto connettivo, immediatamente sotto l'epidermide (Ermak, 1976), al sito del danno è mediato da una gamma di molecole chemoattrattanti endogene ed esogene la cui natura è quasi totalmente sconosciuta. In *Styela clava*, la migrazione degli emociti sembra essere influenzata da fattori multipli, che incrementano tanto la chemocinesi che la chemotassi, e che sono sotto il controllo di diversi meccanismi molecolari il cui contributo relativo non è stato ancora stabilito (Raftos et al., 1998). In *Pyura stolonifera*, un peptide di 8,5 kDa, solo parzialmente purificato, presiede tale attività di migrazione cellulare (Raftos et al., 2003), anche se non sono state presentate prove definitive che l'estratto usato induca vera chemotassi piuttosto che migrazione di cellule prodotta da un incrementata motilità cellulare (Hugly, 1989).

In *C. intestinalis*, è stata precedentemente dimostrata la presenza di un pathway infiammatorio effettore del sistema del complemento (Pinto et al., 2003). E' stata, infatti, dimostrata un'attività chemotattica specifica esercitata

sugli emociti di *Ciona* dall'emolinfa priva di cellule o dalla proteina ricombinante riprodotte l'intera sequenza del frammento di C3a di *Ciona* (rCiC3a). La migrazione degli emociti di *Ciona* verso rCiC3a è dose dipendente, raggiunge un massimo alla concentrazione di 500 nM, ed è specifica di rCiC3a poiché è inibita da uno specifico anticorpo anti-rCiC3a. Analogamente a quanto trovato nei mammiferi, l'attività chemotattica di CiC3a è localizzata all'estremità C-terminale, poiché un peptide di 18 amminoacidi, riprodotte l'estremità C-terminale di CiC3a (CiC3a⁵⁹⁻⁷⁶), è in grado di promuovere la chemotassi con andamento dose dipendente. Ma a differenza di quanto accade nei mammiferi, l'arginina C-terminale non è cruciale per l'attività chemotattica, dal momento che anche il peptide CiC3a⁵⁹⁻⁷⁵, privato dell'arginina C-terminale è in grado di promuovere la chemotassi con andamento dose dipendente .

L'attività chemotattica mediata da CiC3a è inibita dal pretrattamento delle cellule con l'anticorpo specifico o la tossina della pertosse, suggerendo il possibile coinvolgimento di recettori di membrana accoppiati alla proteina G in questo processo, come accade nei mammiferi (Pinto et al., 2003).

In questo studio la nostra attenzione si è rivolta all'identificazione, al sequenziamento e alla caratterizzazione del recettore di C3a in *C. intestinalis* (CiC3aR), un cordato che si colloca filogeneticamente alla base dei vertebrati. Le conoscenze attuali sulla struttura e le funzioni dei recettori per C3a derivano essenzialmente dallo studio di quelli dei mammiferi, e sono del tutto assenti informazioni sulle origini evolutive di questa importante molecola pro-infiammatoria. Non essendo stato finora identificato alcun recettore per C3a in invertebrati, lo studio presente è stato intrapreso per caratterizzare un

recettore omologo in un'antica specie di cordato, allo scopo di comprendere meglio gli importanti elementi strutturali e funzionali che sono stati conservati lungo la storia evolutiva di questa molecola.

MATERIALI E METODI

Preparazione degli emociti

Esemplari di *C. intestinalis* sono stati raccolti nel Golfo di Napoli e mantenuti in vasche con acqua di mare circolante. L'emolinfa è stata recuperata dalla cavità periviscerale mediante l'uso di una siringa.

Per ottenere gli emociti, l'emolinfa è stata immediatamente diluita 1:2 in acqua di mare artificiale fredda, priva di Ca^{2+} e Mg^{2+} , contenente 10 mM EDTA (pH 7.4) (FSW-EDTA). Dopo centrifugazione a 500 g per 5 minuti, a 4°C, il pellet di emociti è stato risospeso in "marine solution" (MS): 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl_2 , 11 mM KCl, 45 mM Tris e 12 mM CaCl_2 (pH 7.4). Le cellule presenti nella sospensione sono state contate mediante l'uso della camera di Neubauer. Quando gli emociti erano utilizzati per allestire saggi di chemiotassi, il volume della sospensione è stato modificato in maniera da ottenere la concentrazione di 2.5×10^6 cellule/ml.

Isolamento e purificazione di RNA totale da diversi tessuti di *Ciona intestinalis*

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

L'RNA totale è stato estratto da pellet di emociti, ovari, cuori, complesso neurale e larve di *C. intestinalis*, mediante l'uso del kit SV Total RNA

Isolation System (Promega). Il complesso neurale includeva il singolo ganglio cerebrale dell'individuo adulto di *Ciona* e la ghiandola neurale ad esso associata. I tessuti suddetti sono stati prelevati, pesati ed immediatamente omogeneizzati a freddo mediante tre cicli di 30 secondi con Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel Ika-Labortechnik) in 175 µl di "SV RNA Lysis Buffer" (4 M GTC, 0.01 M Tris pH 7.5, 0.97% β-Mercaptoetanolo) per ogni 60-100 mg di tessuto, come indicato nel protocollo. I passaggi successivi sono stati effettuati come da protocollo del kit fino al recupero del RNA in H₂O depc.

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

Allo scopo di valutare la qualità degli RNA preparati, aliquote da 0.5 µg delle preparazioni sono state separate elettroforeticamente su gel di agarosio 2% in tampone TAE 1x (Tab. 1), applicando una differenza di potenziale di 30 Volts.

Sintesi del cDNA

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

La miscela di reazione era così composta: 5 µg di RNA, 0.5 µg di innesco, 1 µl di 10 mM dNTP mix ed H₂O trattata con depc per un volume

finale di 10 μ l. Dopo 5 minuti a 65°C la miscela è stata portata immediatamente a 0°C in ghiaccio fondente. Successivamente sono stati aggiunti 2 μ l di tampone di sintesi 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 μ l 100 mM DTT, 4 μ l 25 mM MgCl₂, 1 μ l di Inibitore di RNAsi (40 U/ μ l) ed il tutto è stato portato alla temperatura di 42°C per 2 minuti. E' stato aggiunto, quindi, 1 μ l di Trascrittasi inversa (50 U/ μ l) e la reazione è stata condotta a 42°C per 50 minuti. Al termine, l'enzima è stato inattivato a 70°C per 15 minuti e quindi il campione è stato raffreddato mediante incubazione in ghiaccio fondente.

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

Sintesi degli oligonucleotidi

Tutti gli oligonucleotidi sintetici impiegati sono stati preparati con un apparecchio Beckman SM-DNA Synthesizer dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica "Anton Dohrn" di Napoli.

Amplificazione mediante PCR

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

oligo senso

5' – GATTCAAATCGCCGCAACAGA - 3'

oligo antisenso

5' – ATGAAGCTCGGCAGTGCGCATGA – 3'

disegnati in base all'analisi della sequenza nucleotidica di 381 bp riportata nel modello genico ci0100141062, Scaffold_455:55844-58678, del genoma di *C. intestinalis*, versione 1.0, disponibile su JGI (<http://www.jgi.doe.gov>).

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 50 µl con i seguenti componenti: 2 µl di campione di cDNA, 5 µl tampone di sintesi + MgCl₂ "PCR reaction buffer" 10x (Roche), 5 µl 2 mM dNTP mix, 10 pmoli per ogni oligonucleotide, H₂O ad un volume finale di 35.5 µl. La miscela è stata tenuta alla temperatura di denaturazione di 94 °C per 3 minuti e dopo la denaturazione sono stati aggiunti 0.5 µl di Taq DNA polimerasi.

I successivi 30 cicli di amplificazione sono stati condotti in un "PTC-100 Peltier Thermal Cycler" (MJ Research), secondo il seguente schema: 94°C per 15 secondi, 56.3°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto.

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

Analisi della lunghezza dei frammenti di DNA ottenuti per PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio

Al fine di valutare la lunghezza dei frammenti amplificati, il DNA ottenuto mediante la reazione PCR è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TBE 0.5x (Tab. 1), in presenza di bromuro di etidio 0.5 µg/ml. Sono stati caricati 5 µl di reazione con l'aggiunta di 1 µl di colorante per DNA 6x. La lunghezza dei frammenti ottenuti per PCR è stata ricavata dal confronto della loro distanza di migrazione con quella dei frammenti di

lunghezza nota dei marcatori di peso molecolare. Alla fine della corsa elettroforetica, le bande nel gel sono state visualizzate su uno schermo a raggi UV e sono state fotografate. E' stata ottenuta una singola banda della lunghezza attesa di circa 350 bp. Questo prodotto è stato clonato nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen), seguendo le indicazioni suggerite dal produttore, ed è stato controllato mediante sequenziamento, che ha confermato il peso atteso di 333 bp.

5'- e 3'- RACE

Al fine di determinare le sequenze alle estremità 5' e 3' del trascritto di *CiC3aR*, sono state condotte la 5'- e la 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends). Queste tecniche consentono di amplificare sequenze di acidi nucleici da uno stampo di RNA messaggero, tra un definito sito interno e le estremità 3' o 5' del mRNA. Sono stati usati i sistemi 5'- e 3'-RACE della Invitrogen, seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

Per determinare la sequenza all'estremità 3', un oligo (dT) contenente un primer adattatore è stato usato per la sintesi del primo filamento di cDNA da RNA totale di emociti. L'amplificazione di questo cDNA è stata effettuata usando un "abridged universal amplification primer" (AUAP) fornito dal kit ed un primer gene-specifico (5'-GATTCAAATCGCCGCAACAGA-3'), disegnato sulla sequenza del clone di 333 bp. Il prodotto PCR, di 2894 bp, che ibridava con un oligo (5'-TGATTTCCACACGGCAACGC-3') localizzato a valle dell'oligo gene-specifico, è stato clonato e sequenziato, consentendo di completare la sequenza nella porzione 3'-terminale.

Per determinare la sequenza all'estremità 5', l'oligo antisenso 5'-GGTTGTTGTCAGATGCGTGTT-3', disegnato sulla sequenza del prodotto PCR della 3'-RACE, è stato usato per la sintesi del primo filamento di c-DNA da RNA totale di emociti. Dopo il "tailing", mediante il quale una sequenza bersaglio, fornita dal kit, è stata aggiunta al 5' del cDNA a filamento singolo, il cDNA specifico è stato amplificato mediante PCR usando "l'anchor primer" fornito dal kit ed un secondo oligo gene-specifico (nested) (5'-ATGAAGCTCGGCAGTGCGCATGA-3'), localizzato a monte del primo oligo specifico. Il prodotto PCR che ibridava con un altro oligo specifico (5'-TGATTTCCACACGGCAACGC-3') localizzato al 5'- dell'oligo nested è stato clonato e sequenziato.

I prodotti della 5'- e della 3'- RACE sono stati clonati nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen) come da protocollo suggerito dal produttore.

Analisi di DNA genomico mediante Southern blot

Il DNA genomico è stato isolato da spermatozoi di *Ciona* secondo il seguente protocollo. Con l'aiuto di una pipetta pasteur sono stati prelevati gli spermatozoi da singoli animali e raccolti in eppendorf. A ciascun campione di spermatozoi è stato aggiunto 1 ml di tampone Tris 10 mM (pH 8.0), contenente 0.1 M EDTA, 0.5% SDS, e 400 µg/ml di RNasi A (30 U/mg, Roche); i campioni sono stati incubati a 37°C per 90 minuti. Dopo l'aggiunta di 150 µg/ml di Proteinasi K (48 U/mg, Roche), i campioni sono stati incubati per 3 ore a 50°C. L'estrazione del DNA è stata effettuata aggiungendo 200 µl di tampone Tris, 1 M (pH 8.0) e 2 ml di una soluzione 1:1 Fenolo/Cloroformio-isoamilico (24:1 cloroformio/alcool isoamilico), e

centrifugando i campioni per 7 minuti a 3.000 rpm. Ai sopranatanti sono stati aggiunti 1/10 di volume di sodio acetato 3 M, pH 5.2 e 2 volumi di etanolo 95%. I campioni, quindi, sono stati trasferiti a -20°C, per 16 ore, per consentire la precipitazione del DNA. Il DNA precipitato è stato trasferito in eppendorf, centrifugato a 3.000 rpm per 8 minuti ed i pellet così ottenuti sono stati lavati ripetutamente con Etanolo 75% freddo. I pellet asciugati sono stati risospesi in 10 mM Tris pH 8.0.

La concentrazione dei campioni di DNA è stata valutata in uno spettrofotometro SmartSpectm 3000 (Bio-Rad), alla lunghezza d'onda di 280 nm, utilizzando la relazione 1 O.D.= 50 µg/ml di DNA.

Il DNA (4 µg) è stato digerito per 16 ore a 37°C con gli enzimi di restrizione *EcoRI* o *HindIII*, 6.25 U/µg di DNA nei tamponi corrispondenti forniti con gli enzimi; è stato, quindi, separato su gel di agarosio 0.8% in TBE 0.5x (Tab. 1) e trasferito su membrana di nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences).

Prima del trasferimento il gel è stato trattato per 10 minuti con 10 mM HCl, e successivamente, dopo un lavaggio rapido in acqua sterile, è stato incubato, con due cambi, in una soluzione denaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) per un totale di 30 minuti. Il gel è stato poi lavato 2 volte con una soluzione neutralizzante (0.5 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl, 1 mM EDTA pH 7.5), per un totale di 30 minuti, ed equilibrato, infine, nel tampone di trasferimento SSC 20x (Tab. 1). Al termine dei lavaggi, il gel è stato posto su di una lastra di vetro e su di esso è stato poggiato il filtro di nylon, precedentemente equilibrato prima in acqua sterile e poi nel tampone di trasferimento. Sul filtro sono stati poggiati in successione 3 fogli di carta

Whatmann 3MM precedentemente inumiditi nel tampone di trasferimento, una pila di carta Whatmann 3MM, una pila di carta bibula ed, infine, un peso di circa 500 grammi. Il trasferimento è proceduto per 16 ore a temperatura ambiente.

Dopo un rapido lavaggio del filtro con SSC 2x, il DNA trasferito è stato fissato al filtro mediante esposizione a luce UV a 120 mJ/cm² (Stratalinker 2400, Stratagene). Il filtro è stato, quindi, equilibrato per almeno 2 ore nel tampone di pre-ibridazione contenente: SSC 5x, “Denhardt’s solution” 5x (Prodotti Gianni), 5 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 200 µg/ml “Salmon sperm”, 50 mM Sodio fosfato pH 7.2.

Il filtro è stato successivamente ibridato per 16 ore a 60°C nello stesso tampone di pre-ibridazione a cui è stata aggiunta la sonda di 843 bp (Fig. 15) marcata con ³²P (~750 000 cpm/ml) (Feinberg e Vogelstein, 1983), corrispondente alla regione 597-1439 della sequenza codificante. Una precedente analisi condotta sul DNA genomico mediante PCR, con diverse coppie di oligonucleotidi, aveva indicato che questo frammento, tra i vari amplificati, non conteneva introni.

La marcatura della sonda è stata effettuata con la tecnica del “random priming” di seguito descritta.

A 40 ng del frammento di DNA sono stati aggiunti 2 µl di ottanucleotidi random, pd(N)₈ (1 pmol/µl), ed H₂O fino a raggiungere il volume di 38 µl. Questa miscela di reazione è stata denaturata a 100°C per 5 minuti e posta in ghiaccio. A questa mix, sono stati aggiunti altri 16 µl di una miscela di reazione contenente il radioattivo, così composta: 7 µl di OLB (“oligo labelling buffer”, tab. 1), 2 µl di 10 mg/ml BSA (Boehringer Mannheim), 3 µl

ACGAACCGCTCAAACACGCATCTGACAACAACCTCACTTATGTCATGGATTA
CGATGGAATATCCGCAGTGGATTGCTATGATATCATGCAGGAGGATTATTTA
TCATTGATTGATGAGATAGATACTGGTATGATGGATCCAATGTATGAGGAAT
ACCAGGAGTTATATACAGATGATATATATGGGGATACCGGTAACATAACCAT
GCTACCGGAGTTGATGCAATTTGTGTACCAAGTCACATTACCTAACGGTGAT
AACATGACCGTGGTTGACCACCAGATATATTTCTCATTATTCCACGGGATTA
TTTCGCATATTCATAATAAATCTAAGAAGGAACCACTAGGTGGCATATGCGA
TCCAAGGTTGAACAAAGACGCGAAGATATACAACATCATAGTGAACCTCATC
ATCGGGTTCTTCATCCCTTTCCTTGGCATTCCTCATAAGTTATGTTTCAATCG
CTCACATGATCCGAGTGCGTGCGTTGGACCGTATGGAGAACGATTGTGATGT
CATAGAGAGCGAGAGCACACTGGGACGAAGAATGTCGGATTTCTTGCGACAG
TTTGTAAGCGGGGGCGGGCCCGTGAAAAATGTGGGTGAAAGCACCCACCTT
ATAATAAAGGTAGTTCCCCCTTGTTGAGAAGAAGTTTGAGGAAGAAAGCTCG
CGATCGTGGGACGGGGTTGGAGGGGAGCGAGGTCAAATCATCCAGAGATGAT
GTAGTTAAACCTCCAGTGGTGAGGAGGGAGGAGAAACCTGTAGTCAGGGATG
CGGGGGTCGATAGAAGACCTCGTTTGTGTCATTCTCGCACCCAACGCACAG
CAGAAGGACAA

Fig. 15: Sonda di 843 bp utilizzata nell'esperimento di Southern blot. Per la realizzazione della sonda sono state utilizzate rispettivamente la sequenza 5'-ACGAACCGCTCAAACACGCATCT-3' come oligo upper e la sequenza 5'-TTGTCCTTCTGCTGTGCGTTGG-3' come oligo lower.

$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences), 3 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) e 1 μl di Klenow (frammento I della DNA polimerasi I) 5 U/ μl .

La reazione è stata incubata a 37°C per 2 ore e bloccata mediante l'aggiunta di 50 μl di TE 1x (Tab.1) contenente 0.1% SDS. La sonda marcata è stata separata dal radioattivo libero su colonne NICKTM (Amersham Biosciences). L'attività specifica della sonda era 2×10^9 cpm/ μg di DNA.

Trascorso il tempo della reazione di ibridazione, il filtro è stato rapidamente risciacquato in SSC 2x, 0.1% SDS, a temperatura ambiente, e quindi lavato in SSC 2x, 0.1% SDS, per 15 minuti a temperatura ambiente e per altri 15 minuti a 60°C. Successivamente sono stati effettuati altri due lavaggi da 15 minuti ciascuno in SSC 0.5x, 0.1% SDS a 60°C. Al termine dei lavaggi, il filtro è stato esposto a lastre X-ray BioMax MS (Eastman Kodak) in una cassetta per autoradiografia a - 80°C, con schermi intensificatori. Lo sviluppo della lastra è stato effettuato dopo 2-4 ore di esposizione.

Analisi di RNA totale mediante Northern blot

Per evitare problemi di degradazione dell'RNA tutti gli utensili di laboratorio sono stati sterilizzati e trattati con RNaseZAP (Ambion) e tutte le soluzioni sono state trattate con depec o preparate con H₂O trattata con depec.

L'RNA totale (6 μg caricati per ciascun campione) è stato separato mediante elettroforesi su gel denaturante (1.2 % di agarosio, 14% formaldeide, tampone MOPS 1x) (Tab. 1). I campioni di RNA, a ciascuno dei quali sono stati aggiunti 25 μl di "RNA loading buffer" (Eppendorf), sono stati denaturati per 15 minuti a 65°C; a questi, infine, è stato aggiunto il

Bromuro di Etidio (1.4 μ l di una soluzione stock 1 μ g/ μ l per ogni 35 μ l di campione). L'RNA usato come marcatore di pesi molecolari nella corsa elettroforetica, era della Invitrogen, ed aveva bande comprese nel range 0.24-9.5 kb. La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone MOPS 1x a 45 Volts per circa 5 ore, successivamente si è proceduto con il trasferimento su un filtro di nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) secondo il procedimento descritto di seguito.

Prima del trasferimento il gel è stato lavato in H₂O depec per 15 minuti, con agitazione moderata, ed infine è stato equilibrato in SSC 10x mediante due lavaggi, per un totale di 30 minuti. Il filtro è stato equilibrato prima in H₂O depec per 10 minuti e poi nel tampone di trasferimento SSC 10x. Il trasferimento, allestito come descritto nel paragrafo precedente, è durato 16 ore. Dopo un rapido lavaggio del filtro con SSC 2x, l'RNA trasferito è stato fissato al filtro mediante esposizione a luce UV a 120 mJ/cm² (Stratalinker 2400, Stratagene). Il filtro è stato, quindi, equilibrato per almeno 2 h nel tampone di pre-ibridazione contenente: SSC 5x, "Denhardt's solution" 5x (Prodotti Gianni), 5 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 200 μ g/ml "Salmon sperm", 50 mM Sodio fosfato pH 7.2, ed, infine, ibridato per 16 ore a 60°C nello stesso tampone con l'aggiunta della sonda di 747 bp (Fig. 16) marcata con ³²P (~ 800 000 cpm/ml), corrispondente alla regione 126-872 della sequenza codificante.

Il procedimento di marcatura della sonda, i lavaggi del filtro dopo l'ibridazione e l'esposizione del filtro sono come descritti nell'analisi condotta mediante Southern blot.

GATTCAAATCGCCGCAACAGACCTCATTGTTTGCTTAGTATGGCTCATTATG
ACATCACTGTTCCCTACATGAACTACCAACGGAACCAACTTTGCAAGCTAATG
CAGAGCCTCCCCCACCTCTTCTCTCACGTTGTACAGATTCATATACGCGGT
GTACAACTTCCATTATTACATCAATATCTTTCTGCTTGCCACGATGAGTGTT
GAACGGTGCGTTGCCGTGTGGAAATCACTCAGGTGCCAACGATATCAGTTTA
ATCGGAAATTTATCTACGGTGTTAGTGCCCTCATGTGGTTGATAGCATTCTC
ATGCGCACTGCCGAGCTTCATTCGACTCGATCTCGTTACTGACAACATAAAC
ATCACACGACCGGCCAACATGAAGGTAGCAGAGACACACATGTACATGAAAT
GTTACGAACCGCTCAAACACGCATCTGACAACAACCTCACTTATGTCATGGA
TTACGATGGAATATCCGCAGTGGATTGCTATGATATCATGCAGGAGGATTAT
TTATCATTGATTGATGAGATAGATACTGGTATGATGGATCCAATGTATGAGG
AATACCAGGAGTTATATACAGATGATATATATGGGGATACCGGTAACATAAC
CATGCTACCGGAGTTGATGCAATTTGTGTACCAAGTCACATTACCTAACGGT
GATAACATGACCGTGTTGACCACCAGATATATTTCTCATTATTCCACGGGA
TTATTTTCGCATATTCATAA

Fig. 16: Sonda di 747 bp utilizzata nell'esperimento di Northern blot. Per la realizzazione della sonda sono state utilizzate rispettivamente la sequenza 5'-GATTCAAATCGCCGCAACAGA-3' come oligo upper e la sequenza 5'-TTATGAATATGCGAAATAATCCC-3' come oligo lower.

Determinazione ed analisi delle sequenze di DNA

Le sequenze dei prodotti PCR, clonati nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen), sono state determinate in entrambe le direzioni usando primers vettore- o gene-specifici.

Le reazioni delle sequenze, ottenute mediante l'uso della tecnologia "BigDye Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems), sono state purificate mediante l'uso del kit Millipore Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Millipore Corporate) e di una stazione robotizzata Biomek FX (Beckman Coulter). I prodotti sono stati analizzati dal sistema "Automated Capillary Electrophoresis Sequencer 3730 DNA Analyzer" (Applied Biosystems).

L'analisi delle sequenze ottenute è stata effettuata mediante una ricerca per BLAST nelle banche dati di GenBank.

Le sequenze amminoacidiche dedotte di *CiC3aR* e dei recettori di C3a di diverse specie di vertebrati sono state allineate usando il programma Clustal X 1.8 (Thompson et al., 1997); gli allineamenti ottenuti sono stati corretti manualmente in qualche posizione.

Analisi filogenetica

Per costruire un albero filogenetico è stato usato un allineamento ottenuto con il programma Clustal X 1.8 (Thompson et al., 1997) che comprendeva le sequenze amminoacidiche dedotte di *CiC3aR* e di altri recettori di anafilatossine dei vertebrati. Le inserzioni dei residui amminoacidici presenti nel terzo loop citoplasmatico e nella coda carbossi-terminale di *CiC3aR* non sono state incluse nell'analisi.

Le relazioni filogenetiche tra le sequenze correlate sono state ottenute mediante il metodo “maximum likelihood”, implementato nel PHY-ML (Guindon e Gascuel, 2003). Tra i modelli alternativi considerati, Blosum, Dayhoff, Jones-Taylor-Thornton (JTT), e Variable Time (VT) (vedi tabella I), è stato selezionato, usando il software Tree-Puzzle (Strimmer e von Haeseler, 1996), con stime ottenute da una distribuzione gamma, il modello di sostituzione JTT (Jones et al., 1992). Il valore stimato del parametro α secondo la distribuzione gamma era 1.11 +/- 0.08. La topologia dell’albero è stata ricostruita applicando il metodo “quartet puzzling maximum likelihood” implementato in Tree-Puzzle.

Sintesi dei peptidi e produzione degli anticorpi

Il peptide di 17 amminoacidi *CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹ (HELPTEPTLQANAEPSP), il peptide di 17 amminoacidi *CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴ (DPMYEEYQELYTDDIYG), ed il peptide di 15 amminoacidi *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹² (LRRSLRKKARDRGTG), che riproducono segmenti della sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3aR* e che sono localizzati rispettivamente nel primo (EL1) e secondo loop extracellulare (EL2) e nel terzo loop intracellulare (IL3), sono stati sintetizzati utilizzando un sintetizzatore di peptidi Applied Biosystems 430A (Sahu et al., 2000).

I peptidi sono stati successivamente coniugati all’ovalbumina mediante il metodo della glutaraldeide e sono stati usati per l’immunizzazione di conigli nella produzione degli anticorpi specifici anti-*CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹ (anti-EL1) (Primm, Milano, Italia), anti-*CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴ (anti-EL2) (Primm, Milano, Italia) e anti-*CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹² (anti-IL3) (Cocalico Biologics, ReamsTown, PA, USA).

Tabella I.

| MODELLO | TASSO | ML (logL) |
|----------------|--------------|------------------|
| BLOSUM | uniform | -10773.58 |
| BLOSUM | gamma | -10577.95 |
| DAYHOFF | uniform | -10791.83 |
| DAYHOFF | gamma | -10537.88 |
| JTT | uniform | -10694.96 |
| JTT | gamma | -10448.11 |
| VT | uniform | -10912.42 |
| VT | gamma | -10633.35 |

Stime di “maximum likelihood” della filogenesi del recettore per le anafilatossine secondo diversi modelli. Nella terza colonna sono riportati i valori di “maximum log-likelihood”, secondo i modelli elencati nella prima colonna, considerando la velocità di evoluzione dei siti, distribuiti secondo modalità “uniform” o “gamma”, come indicato nella tabella.

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

Analisi di estratti proteici mediante Western blot

Gli emociti, raccolti come descritto sopra, sono stati risospesi in “sample buffer” (60 mM Tris, 2% SDS, 10% 2-mercaptoetanolo, 10% glicerolo, 0.01% blu di bromofenolo, pH 6.8) contenente inibitori di proteasi, Mini Complete (Roche Applied Science), nelle quantità suggerite dal produttore.

I campioni sono stati omogenizzati a mano in un omogenizzatore Elvehjem con un pestello di Teflon, sono stati bolliti per 10 minuti, ed infine centrifugati a temperatura ambiente per 30 minuti a 13'400 rpm in una centrifuga Mini Spin (Eppendorf). Il sopranatante è stato recuperato e conservato in aliquote a -20°C .

La reattività degli estratti proteici da emociti di *Ciona* agli anticorpi anti-EL1, anti-EL2, e anti-IL3 è stata saggiata mediante Western blotting, descritto di seguito in maggior dettaglio.

Le proteine, 80 μg di proteina/pozzetto, corrispondenti a 4.8×10^6 emociti, sono state separate su gel di poliacrilammide contenente SDS (SDS-PAGE) con concentrazione 7.5% (vedi tabella 2). La corsa elettroforetica è stata effettuata con “Running buffer” 1x (Tab. 2) a 100 Volts in un apparecchio Mini Protean 2 Cell (Bio-Rad Laboratories). Sono stati usati come standard di riferimento 10 μl di “Precision Plus Protein Standard All Blue” (Bio-Rad Laboratories). Le proteine sono state successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham

Biosciences) mediante l'uso dell'apparecchio Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) in "Blotting buffer" 1x (Tab. 2), applicando 100 Volts, per 1 ora. La presenza negli estratti proteici separati per elettroforesi della banda corrispondente a *CiC3aR* è stata rilevata mediante l'uso degli anticorpi purificati per affinità anti-EL1, anti-EL2, o anti-IL3 alla concentrazione di 10 µg/ml.

Legami non-specifici degli anticorpi alla membrana sono stati prevenuti mediante incubazione del filtro in "blocking buffer" (PBS 1x contenete 5% latte e 0.05% Tween 20). Il legame tra l'antigene e gli anticorpi specifici è stato rilevato mediante l'uso di Proteina A coniugata con perossidasi (Bio-Rad), secondo le indicazioni del produttore.

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

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

Immunorilevazione di emociti circolanti

Gli emociti, raccolti come descritto sopra, sono stati fissati per 30 minuti a temperatura ambiente in 4% paraformaldeide con 0.5 M NaCl e 0.1 M tampone MOPS pH 7.5. Al termine dell'incubazione, 100 µl di sospensione di emociti, contenenti $\sim 1.5 \times 10^6$ cells/ml, sono stati applicati su vetrini porta-

oggetto Superfrost Plus (VWR International) mediante l'uso di una citocentrifuga Cytopro (Wescor), a temperatura ambiente per 6 minuti a 400 rpm. Dopo tre lavaggi, di 5 minuti ciascuno, in PBS 1x (Tab. 2) contenente 0.1% Tween 20 (PBT), i vetrini sono stati incubati per 20 minuti in 0.3% perossido di idrogeno (v/v) in PBT e, poi ancora, 10 minuti in PBT contenente 10% "normal goat serum", ed infine di nuovo lavati tre volte per 5 minuti in PBT. L'incubazione con gli anticorpi purificati per affinità anti-EL1, anti-EL2, o anti-IL3 è stata effettuata per 1 ora, a temperatura ambiente, in una camera umida alle concentrazioni, rispettivamente, di 15 µg/ml, 45 µg/ml, e 30 µg/ml, in tampone PBT contenente 1% BSA. I vetrini sono stati immuno-rivelati mediante l'uso dei kit, in successione, Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) e Sigma Fast Dab (Sigma), secondo le indicazioni dei rispettivi produttori. In parallelo, sono stati condotti esperimenti di controllo utilizzando le IgG preimmuni corrispondenti, purificate per affinità con Proteina G Sepharose, alle stesse concentrazioni. La colorazione è stata osservata con un microscopio Zeiss Axioskop, con ottica Nomarski.

Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti con lo stesso procedimento descritto sopra, omettendo il solo trattamento con perossido di idrogeno. L'immunorivelazione è stata realizzata incubando i preparati, per 1 ora a temperatura ambiente, nell'anticorpo secondario purificato per affinità anti-rabbit IgG, marcato con fluoresceina (Vector Laboratories), diluito 1:250 in PBS 1x; tale incubazione è stata seguita da due lavaggi rapidi di 30 minuti ciascuno in PBS 1x e da un lavaggio lungo "overnight", sempre in PBS.

Esperimenti di chemiotassi

Gli esperimenti di chemiotassi sugli emociti di *C. intestinalis* sono stati condotti in camere di chemiotassi singole, Blind Well Chambers, modello BW200L (Neuro Probe). Filtri di policarbonato, con pori di 5.0 μm (Whatman), sono stati utilizzati per separare il pozzetto inferiore della camera di chemiotassi da quello superiore. Il pozzetto inferiore conteneva 200 μl di chemioattrattante, consistente di una soluzione 10 μM di peptide sintetico *CiC3a*⁵⁹⁻⁷⁶ (IALARLNSGTRRQRVQGR) in MS. Gli emociti (300 μl di MS con 2.5×10^6 cellule/ml) sono stati aggiunti nel pozzetto superiore e lasciati migrare per 2 ore a 20°C. Alla fine del tempo d'incubazione, il fluido contenuto nella camera superiore e le cellule non migrate sono stati rimossi con un tampone di cotone. Il numero di emociti migrati nel pozzetto inferiore, determinato contando 16 campi scelti a caso in una camera contacellule di Neubauer, è stato espresso come percento rispetto al numero totale di emociti aggiunti nel pozzetto superiore della camera di chemiotassi. Esperimenti di controllo sono stati effettuati sostituendo il chemioattrattante specifico nel pozzetto inferiore della camera con due peptidi non relazionati.

Negli esperimenti di inibizione della chemiotassi con gli anticorpi anti-EL1, anti-EL2, o anti-IL3, gli emociti (2.5×10^6 cellule/ml in MS) sono stati previamente incubati in tubi eppendorf contenenti i singoli anticorpi negli intervalli di concentrazione tra 0.5 $\mu\text{g/ml}$ e 15 $\mu\text{g/ml}$. Dopo 20 minuti di incubazione a 20°C, 300 μl di sospensione di cellule sono stati trasferiti nel pozzetto superiore della camera di chemiotassi ed il saggio di chemiotassi verso il peptide sintetico *CiC3a*⁵⁹⁻⁷⁶, è stato eseguito come descritto sopra.

Esperimenti di controllo della chemiotassi sono stati condotti in parallelo con le stesse quantità delle IgG corrispondenti da conigli preimmuni o con un anticorpo di specificità non relazionata (anticorpo anti-fattore H di trota), purificato per affinità.

I risultati degli esperimenti di inibizione sono riportati come percentuale di inibizione della migrazione cellulare e sono espressi come media \pm DS di cinque esperimenti indipendenti condotti in duplicato.

Un ulteriore esperimento di controllo è stato effettuato usando i peptidi sintetici utilizzati per produrre in coniglio gli anticorpi contro il primo ed il secondo loop extracellulare in esperimenti di competizione nei quali gli emociti, incubati con 5 μ g/ml di anticorpo in presenza di 0.06 μ M del corrispondente peptide, sono stati sottoposti al saggio di chemiotassi.

RISULTATI

Identificazione ed analisi della sequenza del gene codificante il recettore di C3a di *Ciona intestinalis*

Al fine di identificare il gene che codifica per il recettore di C3a in *C. intestinalis*, cioè *CiC3aR*, è stata innanzitutto condotta una ricerca approfondita nel sito web del genoma di *C. intestinalis* (<http://genome.jgipsf.org/Ciona4/Ciona4.home.html>) di sequenze che mostrassero una significativa omologia con i recettori di C3a dei mammiferi. Tale ricerca ha avuto come risultato l'identificazione di un unico modello genico (ci0100141062), corrispondente ad una sequenza di 381 bp, comprendente tre esoni, e localizzata all'estremità 3'- dello scaffold 455 (nt 55844-58678) (Fig. 17). L'analisi della sequenza amminoacidica dedotta indicava la presenza di regioni attribuibili ad un recettore a sette domini transmembrana accoppiato alla proteina G, e più precisamente le regioni del secondo, terzo e quarto dominio transmembrana, più pochi altri residui amminoacidici appartenenti al secondo loop extracellulare di un presuntivo recettore per C3a.

Allo scopo di verificare che la sequenza ricostruita corrispondesse effettivamente ad un trascritto, è stato estratto l'RNA dagli emociti circolanti, tipo cellulare che con maggiore probabilità poteva rappresentare uno dei siti di espressione della proteina; da questo è stato poi sintetizzato il cDNA a singolo filamento. Quest'ultimo è stato amplificato per PCR utilizzando due oligonucleotidi specifici disegnati in base all'analisi della sequenza nucleotidica riportata nel modello genico. Come prodotto dell'amplificazione si è ottenuta un'unica banda il cui peso molecolare corrispondeva a quello atteso, e cioè 333 bp. Per assicurarsi che tale prodotto corrispondesse alla

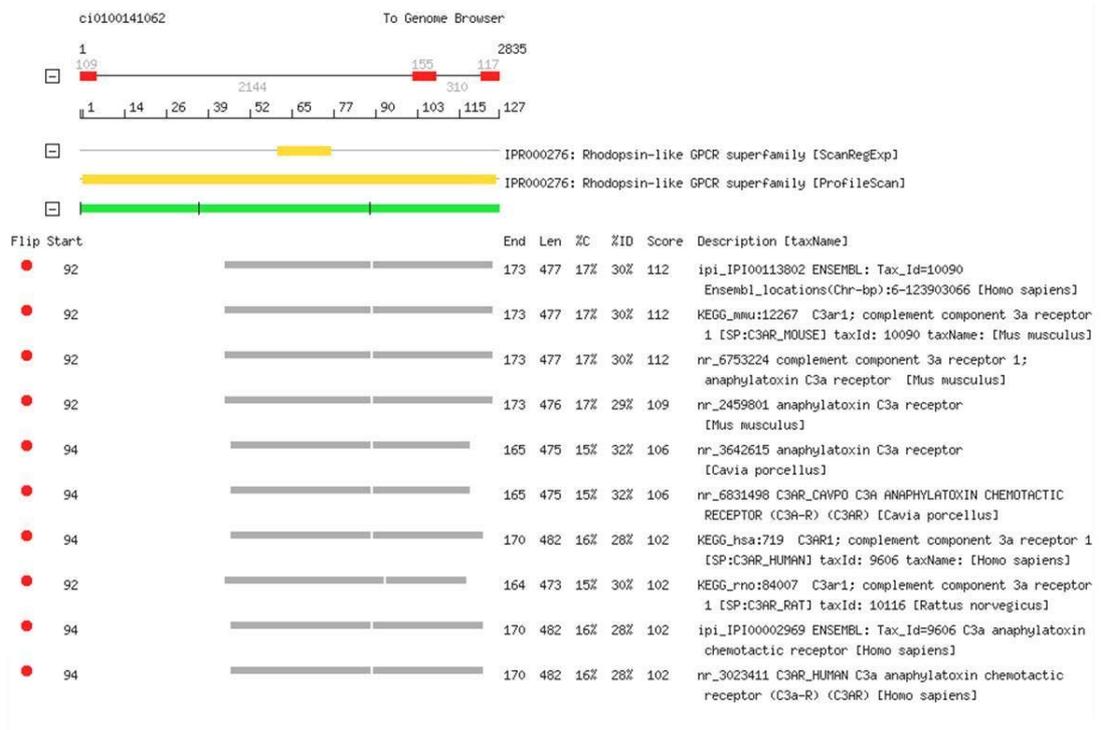


Fig. 17: Modello genico (ci0100141062) identificato nel sito web del genoma di *Ciona intestinalis* (<http://genome.jgipsf.org/Ciona4/Ciona4.home.html>). Tale modello corrisponde ad una sequenza di 381 bp, localizzata all'estremità 3'- dello scaffold 455 (nt 55844-58678).

sequenza del modello genico identificato nel genoma, esso è stato clonato e ne è stata determinata la sequenza nucleotidica. Questa analisi confermava la totale corrispondenza di sequenza tra il prodotto PCR ed il modello genico individuato nel genoma di *Ciona*.

Lo stadio successivo è stato il completamento della sequenza in direzione 3' e 5'. Non avendo trovato nel genoma di *Ciona* scaffold che si sovrapponevano alle porzioni terminali del frammento disponibile, è stata condotta una 3'-RACE al fine di determinare la sequenza della porzione 3'-terminale del presuntivo trascritto di *CiC3aR*. Questa analisi ha permesso di isolare un prodotto di amplificazione di 2894 bp, che consentiva di completare la sequenza nella porzione 3'-terminale. Parimenti, la sequenza della porzione 5'-terminale del trascritto è stata determinata utilizzando la tecnica della 5'-RACE.

Quest'approccio ha consentito di determinare la sequenza dell'intero trascritto di 3071 bp, registrato nella banca dati dell'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), con numero di accesso AJ966353. In esso sono state identificate una regione 5'-UTR di 52 bp, una regione codificante di 2544 bp con il codone della metionina iniziale inserito nel contesto del motivo Kozac canonico, ed infine una regione 3'-UTR di 475 bp con due possibili segnali consecutivi di poliadenilazione alle posizioni 3030 e 3037, ed una coda di poly(A) terminale (Fig. 18).

L'analisi mediante BLAST di questa sequenza nel genoma di *Ciona*, versione 1.0, rivelava che le regioni del trascritto di *CiC3aR* comprese tra i nucleotidi 1-750 e 1673-3053 erano localizzate rispettivamente sugli scaffold 455 e 438, mentre la regione compresa tra i nucleotidi 751-1672 non era

aataaggtatgtagggaaaatcaaaatgtttagttacgaagaccacgtgaccATGGCTTT 60
M A L 1

GGCCCAAGATGTAGTTATAATATTTCTATGCATATGCGGGATCGGCCTCAATACAGCTAT 120
A Q D V V I I F L C I C G I G L N T A M 4

GTTGGGATTGTTCTGTGTCAAGAAACAGGTCCGAGGTCCATATACACCACATATATGAT 180
L G L F C V K K Q V R G S I Y T T Y M I 24

TCAAAATCGCCGCAACAGACCTCATTGTTTGCTTAGTATGGCTCATTATGACATCACTGTT 240
Q I A A T D L I V C L V W L I M T S L F 44

CCTACATGAACTACCAACGGAACCAACTTTGCAAGCTAATGCAGAGCCTCCCCCACCTC 300
L H E L P T E P T L Q A N A E P P P T S 64

TTCTCTCACGTTGTACAGATTCATATACGCGGTGTACAACCTCCATTATTACATCAATAT 360
S L T L Y R F I Y A V Y N F H Y Y I N I 84

CTTTCTGCTTGCCACGATGAGTGTTGAACGGTGCCTGCGGTGGAAATCACTCAGGTG 420
F L L A T M S V E R C V A V W K S L R C 104

CCAACGATATCAGTTTAATCGGAAATTTATCTACGGTGTTAGTGCCCTCATGTGGTTGAT 480
Q R Y Q F N R K F I Y G V S A L M W L I 124

AGCATCTCATGCGCACTGCCGAGCTTCATTGCACTCGATCTCGTTACTGACAACATAAA 540
A F S C A L P S F I R L D L V T D N I N 144

CATCACACGACCGGCCAACATGAAGGTAGCAGAGACACACATGTACATGAAATGTTACGA 600
I T R P A N M K V A E T H M Y M K C Y E 164

ACCGCTCAAAACACGCATCTGACAACAACCTCACTTATGTATGGATTACGATGGAATATC 660
P L K H A S D N N L T Y V M D Y D G I S 184

CGCAGTGGATTGCTATGATATCATGCAGGAGGATTATTTATCATTGATTGATGAGATAGA 720
A V D C Y D I M Q E D Y L S L I D E I D 204

TACTGGTATGATGGATCCAATGTATGAGGAATACCAGGAGTTATATACAGATGATATATA 780
T G M M D P M Y E E Y Q E L Y T D D I Y 224

TGGGGATACCGGTAACATAACCATGCTACCGGAGTTGATGCAATTTGTGTACCAAGTCAC 840
G D T G N I T M L P E L M Q F V Y Q V T 244

ATTACCTAACGGTGATAACATGACCGTGGTTGACCACCAGATATATTTCTCATTATCCA 900
L P N G D N M T V V D H Q I Y F S L F H 264

CGGGATTATTTGCGATATTCATAATAAATCTAAGAAGGAACCACTAGGTGGCATATGCGA 960
G I I S H I H N K S K K E P L G G I C D 284

TCCAAGGTTGAACAAAGACGCGAAGATATACAACATCATAGTGAACCTCATCATCGGGTT 1020
P R L N K D A K I Y N I I V N L I I G F 304

CTTTCATCCCTTTCCTTGCATTCTCATAAGTTATGTTTCAATCGCTCACATGATCCGAGT 1080
 F I P F L A I L I S Y V S I A H M I R V 324

GCGTGCGTTGGACCGTATGGAGAACGATTGTGATGTCATAGAGAGCGAGAGCACACTGGG 1140
 R A L D R M E N D C D V I E S E S T L G 344

ACGAAGAATGTCGGATTTCTTGCACAGTTTGTAAAGCGGGGGCGGGCCCGTGAAAAATGT 1200
 R R M S D F L R Q F V S G G G P V K N V 364

GGGTGAAAGCACCCACCTTATAATAAAGGTAGTTCCTCCCTTGTGAGAAGAAGTTTGAG 1260
 G E S T P P Y N K G S S P L L R R S L R 384

GAAGAAAGCTCGCGATCGTGGGACGGGGTTGGAGGGGAGCGAGGTCAAATCATCCAGAGA 1320
 K K A R D R G T G L E G S E V K S S R D 404

TGATGTAGTTAAACCTCCAGTGGTGAGGAGGAGGAGAAACCTGTAGTCAGGGATGCGGG 1380
 D V V K P P V V R R E E K P V V R D A G 424

GGTTCGATAGAAGACCTCGTTTGTCTGTCATTCTCGCACCCAACGCACAGCAGAAGGACAAG 1440
 V D R R P R L S S F S H P T H S R R T S 444

CGGGGGCTCGGCCAGCTCTGCTGAAAGTTTCCAAACCGACCAACATCGTTGCATGCGGC 1500
 G G S A S S A E S F Q T D Q T S L H A A 464

GACACCAAGCCCTGGAGTGAGGCTCTCAGCTCCCATATTCGTACATGATAAGACCCCGGT 1560
 T P S P G V R L S A P I F V H D K T P V 484

ACAACGAGCGTCATCGACCGAAACCCCCACACACCCCGTTACCCCCACACGACGATG 1620
 Q R A S S T E T P T H P R S P P T R R W 504

GTCATCAGAAACCTTACGCAGCCCCATGAGGCTTCACCCCTGTATTAGATGAAACGGA 1680
 S S E T L R S P H E A S P P V L D E T E 524

GCCTCTTTACACCGTGTGATGATGCACAATGGCCAAACCAACGTCGCCTCCTAGTGG 1740
 P L Y D R V D D V T M A K P T S P P S G 544

GGACTCCACACAGGAATTATCCACGGAAGTTACGCGAGGTTATACTCACAGAAACCTGA 1800
 D S T Q E L F H G S Y A R L Y S Q K P D 564

CGCGCGCCAAGATACCAACGACAAGCATCAACGACCTCAAACCTACAGAAGCCGCGCTTA 1860
 A R P R Y Q R Q A S T T S N Y R S R A Y 584

CTCTGCCACGTCAAGGCAGCGCGGAGGGGTACCCCTTCGTAAAACAATCGTACACAA 1920
 S A T S R A G G G G T L R K T I V H K 604

GAACGCTGAACGTCACTACGAATATCACGAACCGCTCTCACATACGTTTGTGTGTTCCG 1980
 N A E R H L R I S R T A L T Y V C V F A 624

| | |
|--|------|
| TGTTTGTGGCTCCACAGAGGATTGTAGCTGTTGTGTATGTTGTTGAGGGCATGGTTGG | 2040 |
| V C W L P Q R I V A V V Y V V E G M V G | 644 |
| TTTAGGAGGCCACGCATGCCATGCAGTATTCACAGCTACCAGAATTCTCAGCTTTCTCAG | 2100 |
| L G G H A C H A V F T A T R I L S F L S | 664 |
| TGTTTGTCTCAACCCTATTGTATACGCGATGACACAACGTGAAATACGACATCTTTTGGC | 2160 |
| V L L N P I V Y A M T Q R E I R H L L R | 684 |
| ACGAAAACCTTGACGGGATGTGTAATGTATCCACCCTGGCCGTGAATCGAACCTGACCC | 2220 |
| R K L A G M C K C I H P G R E S N P D P | 704 |
| CCAGAACCAGCAGTGAACGTCTCGTTTGCGAACGCACGACGAGACTTTTCAGTTGTGTC | 2280 |
| Q N R D V N V S F A N A R R D F S V V A | 724 |
| TGATCATAATATAACGAGTGATGAGATTTTTATGAAACGAGAGAGACACGCACGTAACAA | 2340 |
| D H N I T S D E I F M K R E R H A R N K | 744 |
| AGAACGCTGGTCGAGGTTAATGCATAGATTGGGGGGAAAAAACCTCCGCTTATCGTTGAC | 2400 |
| E R W S R L M H R L G G K N L R L S L T | 764 |
| GGGTAGCGGGTCACTTCCCCGGTGAGAAGCAAAGTGACGGAACAATAGATGAAGACGA | 2460 |
| G S G F T S P G E K Q S D G T I D E D E | 784 |
| GGAGAAGGTCAAAGTTCGAAAGGTCAAAGTTCATCAACCTCATTTAAGTTAATTGGGGG | 2520 |
| E K G Q S S K G Q S S S T S F K L I G G | 804 |
| TTGGGAAGATTGTGTCAGCAGATGATTGACATGGCTGAGGTTAATAAAGGTCAAACCTAA | 2580 |
| W E D C Q Q M I D M A E V N K G Q T T N | 824 |
| CGAGGAAACCATACTCtgaacttttcggggcggaatgcatgaggatactgatttcaagt | 2640 |
| E E T I L * | 844 |
| ctcatcgctgtaccattgtggggaatgtgggcaaaacacttaacagcaattgatccaa | 2700 |
| cccagtggtcactaatgggttgtctgaattgtcagtcatacagaaaaacaatcaccaca | 2760 |
| aagttacatacgtgataacttgaagctggcacaaggtgtatgaaacagaacacccgtgt | 2820 |
| tataacgactgtcattgccccgcatgagagataaataagttacattctttaacctcaa | 2880 |
| gtgacataaacgtgtgagacctctaccagactacggtctattactataggtcgatagtga | 2940 |
| cctctggtggtcatgttttagtttaaatcccaaccttgggtgttatggagtcgtacct | 3000 |
| ctttgaggaagttccaaagttttttgtaataaaaaataaaattaacaatcatgaaaaaa | 3060 |
| aaaaaaaaa 3071 | |

Fig. 18: Trascritto di 3071 bp corrispondente al gene che codifica per il recettore di C3a di *Ciona intestinalis*, con relativa sequenza amminoacidica. In esso sono state identificate una regione 5'-UTR di 52 bp, una regione codificante di 2544 bp con il codone della metionina iniziale inserito nel contesto del motivo Kozac canonico, ed infine una regione 3'-UTR di 475 bp con due possibili segnali consecutivi di poliadenilazione alle posizioni 3030 e 3037, ed una coda di poly(A) terminale.

presente su nessuno degli scaffold sequenziati. Un'analisi successiva effettuata nel database NCBI rivelava la presenza di un clone di cDNA di *C. intestinalis* di 1536 bp (ciht004g05, numero di accesso AK174732) (Satou et al., 2002), corrispondente alla regione 1534-3071 del messaggero di *CiC3aR* (Fig. 19).

Southern blot ed organizzazione genomica di *CiC3aR*

Per verificare se il gene codificante *CiC3aR* fosse presente in singola copia o in copie multiple per genoma aploide, è stata condotta l'analisi mediante Southern blot su campioni di DNA genomico estratto da spermatozoi di tre differenti animali. Ciascun campione di DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HindIII* e la membrana di trasferimento è stata ibridata con una sonda marcata con ^{32}P corrispondente al frammento 597-1439 della sequenza codificante. E' stata usata questa sonda perché un'analisi preliminare del DNA genomico condotta con PCR indicava che all'interno di questo frammento non erano presenti introni. Ciascuno dei due enzimi di restrizione dava origine a una sola banda di ibridazione per i campioni di DNA degli animali 1 e 3, mentre la digestione del DNA dell'animale 2 produceva 3 bande per ciascuno degli enzimi di restrizione utilizzati, suggerendo la presenza di siti di polimorfismo allelico all'interno del gene (Fig. 20). Considerando che gli enzimi di restrizione utilizzati erano stati scelti in base all'assenza di specifici siti di restrizione nella sequenza del probe selezionato, i risultati del Southern blot consentono di concludere che questo gene è presente in singola copia per genoma aploide.

```

gcatattcgtacatgataagacccccggtacaacgagcgtcatcgaccgaaacccccacac 60
acccccggtcacccacacacgacgatggtcatcagaaaccttacgcagcccccatgagg 120
cttcacccccctgtattagatgaaacggagcctctttacgaccgtggtgatgatgtcacia 180
tggccaaaccaacgtcgctcctagtggggattccacacaggaattattccacggaagtt 240
acgcgaggttatacgcacagaaacctgacgcgcgccaagataccaacgacaagcgtcaa 300
cgacctcaaaactacagaagccgcgcttactctgccacgtcaagggcaagtggcggagggg 360
gtacccttcgtaaaacaatcgtgcacaagaacgctgaacgtcatctacgaatatcacgaa 420
ccgttctcacatacgtttgtgtgttcgctggttggtggcttccacagaggattgtagctg 480
ttgtgatgttggtgagggcatggttggttaggaggccacgcgtgccatgcagtattca 540
cagccaccagaattctcagctttctcagtggtttgctcaacctattgtatacgcgatga 600
cacaacgtgaaatacgcacatcttctgcgacgaaaactcgcagggatgtgtaaattgatcc 660
accctggccgtgaatcgaacctgacccccagaaaccgcgacgtgaacgtctcgtttgcga 720
acgcacgacgagacttttcagttggtgctgatcataatataacgagtgatgagatttcta 780
tgaaacgagagagacacgcacgtaacaaagaacgctggtcgaggttgatgcatagattgg 840
ggggaaaaaacctccgcttatcgttgacgggtagcgggttcaacttccccgggtgagaagc 900
aaagtgcggaacaatagatgaagacgaggagaagggtcaaagttcgaaaggtcaaagtt 960
catcaacctcatttaattaattgggggttgggaagattggcagcagatgattgacatgg 1020
ctgaggttaataaaggtcaaaccactaacgaggaaaccatactctgaactttcggggcgg 1080
cgaatgcatgaggatactgatttcaagtctcgtcgtgctaccattgtgggcgaatgtgg 1140
gcaaaacacttaacagcaattgatccaaccagtggtcactaatgggttgctgaattgt 1200
cagtcatacagaaaaacaatcaccacaaaagttacatacgtgataacttgaagcgggca 1260
caaggtgtataaaacagaacacccggtgtataacgactgtcgttaccctgccatgctgta 1320
aataagttacattctttaacctcaagtgacataaacgtgtgaaacctctaccagactacg 1380
gtctatactataggtcgatagtgacctctggtggtcatggttagtttaaatccaacca 1440
cttgggtgtgtatggagtcgtacctctttgaggaaagttccaaagtttttttgaataaa 1500
aataaaattaacaatcataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1536

```

Fig. 19: Clone AK174732 di *Ciona intestinalis* di 1536 bp, corrispondente alla regione 1534-3071 del messaggero di *CiC3aR*, individuato mediante BLAST nel database di NCBI.

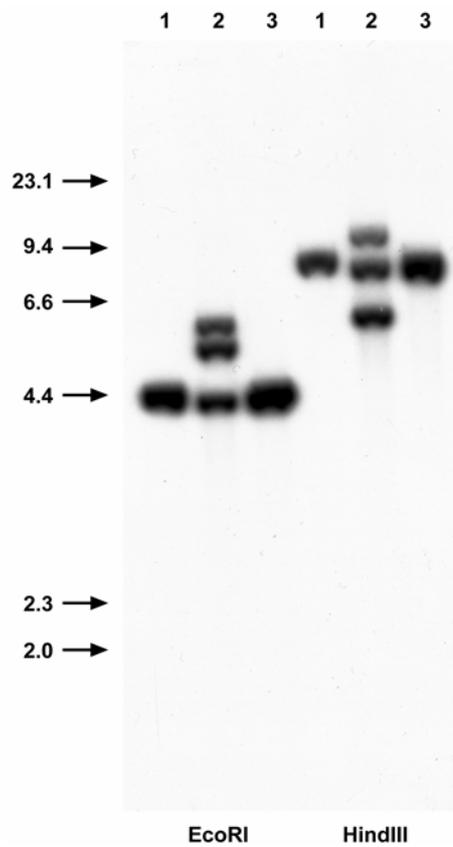


Fig. 20: Analisi mediante Southern blot di *CiC3aR*. Il DNA genomico (4 μ g), estratto da spermatozoi di tre individui diversi di *Ciona intestinalis*, è stato digerito con gli enzimi di restrizione EcoRI e HindIII, separato su gel di agarosio e trasferito su di una membrana di nylon. L'ibridazione è stata effettuata con una sonda corrispondente al frammento 597-1439 della sequenza codificante. I numeri sulla sinistra indicano i pesi molecolari dei marcatori espressi in kilobasi.

Questo risultato è stato confermato ed esteso dall'allineamento della sequenza del trascritto di *CiC3aR* con il genoma di *Ciona*, versione 2.0, disponibile in rete a partire dal Marzo 2005 al sito (<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html>). Infatti, una singola sequenza di *CiC3aR* è stata rintracciata nella versione più recente e completa del genoma. Essa era localizzata sullo scaffold 187 (filamento inverso) tra i nucleotidi 27219 e 39709. Un ulteriore risultato ottenuto da questo allineamento è stato la determinazione del numero degli esoni che contribuiscono alla struttura del gene, corrispondente a undici (Fig. 21). Il primo esone comprende le 52 bp della regione 5'-UTR e le prime 96 bp della regione codificante, la quale si estende dall'esone 1 all'esone 10; le 475 bp della regione 3'-UTR sono divise tra gli esoni 10 e 11. Tale organizzazione è completamente differente dalla struttura genica dei recettori di C3a dei mammiferi, essendo quest'ultima costituita da due soli esoni che codificano per l'intero trascritto, con l'intera sequenza codificante contenuta in un singolo esone (Tornetta et al., 1997; Hollmann et al., 1998).

Analisi di espressione di *CiC3aR* mediante Northern blot

Per valutare l'espressione del gene di *CiC3aR*, campioni di RNA totale estratti da diversi tessuti di individui adulti di *Ciona* e dallo stadio larvale dell'animale sono stati analizzati mediante la tecnica del Northern blot. Dopo il trasferimento a membrane di nylon, la presenza di trascritti di *CiC3aR* era rivelata usando una sonda a cDNA, marcata con ^{32}P , corrispondente ad una sequenza di 747 bp. Una singola banda di ~ 3.1 kb è stata identificata in tutti i tessuti analizzati (Fig. 22), confermando la dimensione del trascritto totale

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------|
| aaacacgatac | cgaaaatatg | ggatttaatt | gccaacggta | ccatcttgcc | 39760 |
| ctgacctact | gtgttttcca | tggactaata | tttaatatat | gattttctatg | 39710 |
| AAGGTATGTA | GGGAAAATCA | AAATGTTTAG | TTACGAAGAC | CACGTGACCA | 39660 |
| TGGCTTTGGC | CCAAGATGTA | GTTATAATAT | TTCTATGCAT | ATGTGGGATC | 39610 |
| GGCCTCAATA | CAGCTATGTT | GGGATTGTTC | TGTGTCAAGA | AACAG gtatt | 39560 |
| gcttttatag | acaactatgt | ttgttcacac | ttttatatta | tataaaataa | 39510 |
| agagaaaatt | gaaaaacgaa | ataggcactg | tgacgtcata | ctgcgtttat | 39460 |
| tcgattttaa | ttattattgt | tcttgaatgt | aaaatgattg | tgacatcata | 39410 |
| atggattgta | gaaacatcca | taaagcgacg | tttattatct | cctgtgacgt | 39360 |
| catgacgaga | aaagtccatg | ttgttgttcg | agaattcatc | cacgctttgt | 39310 |
| gacgtcacia | gcaaaagtgt | ccgcgttttc | gcgttacttg | cgggttcatt | 39260 |
| gtttcgtcac | aatcgaataa | aacaaaccac | gatttcgcgt | ttcttccaaa | 39210 |
| tatggaaata | catgtcacc | ataccgccac | catgtggtga | ttaatgaggt | 39160 |
| tattgtgatg | gttataagat | gtttatggcg | gtaggagaaa | attactttca | 39110 |
| atgaacaaca | acatcgcgtg | aagtataaac | acgggtgttc | tgtgtgccag | 39060 |
| cctaagttac | cacgtatgta | tattatttat | cctcgcattg | cggggaaaac | 39010 |
| gacagtcggt | ataacacagg | tgttctgctt | catacacctc | gtgcccgctt | 38960 |
| acaagttacg | agtttgcaaa | caatccgcac | attatgcata | gtcacaactg | 38910 |
| gcatttaaat | ttacgcaca | ttacgaccaa | ggtgatccta | gaatacagat | 38860 |
| attatagcgg | ccattttcga | taccttctac | tggtgccact | aacctaaaat | 38810 |
| ttggacactg | tactaaactag | acccagcgg | taccgattct | gaaatcaaaa | 38760 |
| attcaaaaatt | caaaaaata | ttaattatga | atattaatat | tcgtcataaa | 38710 |
| aacataattd | tagaattttc | gcacgcacca | gctttgaata | tggtgtagcg | 38660 |
| ctacttaata | gctacaaaat | gaaacatttt | ttcttcaaaa | aaaatggggg | 38610 |
| cttgggtatg | aaatattaaa | aagtatgacc | ataacttgaa | tcatataaat | 38560 |
| attaaaattd | caattttttt | tgcaaaaata | taacttacgc | atacatctat | 38510 |
| gttggctact | aacataccat | tcccattaaa | aaaataatta | attttaattd | 38460 |
| tttttaatta | tgaatattaa | tattcgtcat | aaaacatat | ttatagaatt | 38410 |
| cttcgcacnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38360 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38310 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38260 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38210 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38160 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38110 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | 38060 |
| ncgtacatgt | cattcacaaa | aataaataaa | tgcgaaaag | tttatgtact | 38010 |
| gcaccacggg | tccttttata | caagttttat | tcaccaaacc | acccaaagat | 37960 |
| ttttcaatat | ggctattaac | atacgtcata | aaagcattgt | aataaccatc | 37910 |
| tgtttcaaat | taaaatcgga | aatctaatag | ttccactaaa | taactaaaaa | 37860 |
| gtaaaacatt | aatttcctta | actgggtgcg | gggatgggtg | tcaaatattg | 37810 |
| tgaagaatat | tcgtataact | tatgtcactt | taccgtttat | tgactttttt | 37760 |
| tttattcaaa | cttaaaaaac | aaaagtgtgt | tttgtaaacta | aacatttggt | 37710 |
| ttgcaataac | atgttggtgt | tggttggtgt | ctaagtgcaa | gacttggtc | 37660 |
| cattttgact | gcgtcgctga | gaaataacct | agtgaggcta | aacgtaatcg | 37610 |
| cgttaaatgg | tttgtatca | attgttctga | ataatttggt | tactgcctaa | 37560 |
| ctatgtgttt | tcagttatat | tcttcaggta | tcagacgatg | atcaacgaac | 37510 |
| acacaacgag | gagatcacta | aatccttggt | cactattcct | cacattttac | 37460 |
| tcttctatta | attctgcata | gtacttctat | taattctgca | tcgtattaaa | 37410 |
| agataaaccc | taatcttaga | ggcttcaaga | acaaaaaac | ttttgtatta | 37360 |
| attgaaacaa | ataaattaaa | ttctcgatgt | ttctataact | acgtacggat | 37310 |
| aggataaagt | aaatgggtcg | acagtcgaag | actttattta | aattcaaagc | 37260 |
| atcacatttg | aatgtacgta | ttactggtt | attatattat | tttttattat | 37210 |
| atgtacaatt | ttgcgttcgt | gcaataaaaa | tatatgaaca | aggaattcta | 37160 |
| ggtatgactc | atacttgtct | gtattctgaa | ccaagcccg | catttttttg | 37110 |
| aagaaatgaa | agtttcattt | tgtagctaat | acgtagcgtc | ataacatatt | 37060 |
| cgaagctggt | tcgtgcgaaa | attctataaa | tatgttttta | tgacgaatat | 37010 |
| taataattcat | aattaaaaaa | aaattaaaat | taattatttt | tttaattgga | 36960 |
| atagtatggt | agtgaccaac | attgatgtat | gcgtaagtta | tattttcgca | 36910 |
| aaaaaatcg | aaaatttgat | atttatatga | tttgagttat | gaccatactt | 36860 |
| gtttgtattc | tgaaccaag | ccccatttt | tttaagaaa | ttaatgtttc | 36810 |
| attttgtagc | tattacgtag | cgctataaca | tattccaagc | tggtgcgtgc | 36760 |
| gaaaattcta | taaatatggt | tttatgacga | atattaatat | tcataattaa | 36710 |
| aaaaaaatta | aaattaatta | tttttttaat | gggaatggta | tgtagtgac | 36660 |
| caacatagat | aatgcggaa | gttatatttt | tgcaaaaaaa | aatgaaaaatn | 36610 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnt | 36560 |
| ataactcacg | catacatctg | tgtaggtcac | taacatattt | ttcccattaa | 36510 |
| caaaaataatt | aattttaatt | tttttttaat | tatgaatatt | aatattcgtc | 36460 |

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| ataaaaacat | atztatagaa | ttttcgcacg | caccatcttg | gaatatgtta | 36410 |
| tagcgctacg | tattagctac | aaaatgaaac | attaatctt | ttaaaaaaat | 36360 |
| gggggcttgg | gttcagaata | caaacaagta | tggtcataac | tcaaatcata | 36310 |
| taaaatcaaa | attttcgatt | tttttcgcaa | aatataactt | acgcacatat | 36260 |
| ctaagtaggt | cactaacata | tcattcccat | tacaaaaata | attaatctt | 36210 |
| acttttttta | attatgaata | ttaatatctg | tcataaaaaac | atattttatag | 36160 |
| aattttcgca | cgaaccagct | tcgaatatgt | tatagcgcta | cgtattagct | 36110 |
| acaaaatgaa | actttcattt | cttcaaaaaa | atgctgggctt | gggttcagaa | 36060 |
| tacagacaag | tatgagtcac | aactataaatt | ccttgttcat | atatttttatt | 36010 |
| tgacagaaag | ctaaaattat | acgcgcataa | atcgacgtac | atgtcattca | 35960 |
| caaaaataaa | taaagtcgga | aaagtcttatg | tactgcacca | cggttccttt | 35910 |
| tatacaagtt | ttattcacca | aaacacccaa | agatttttca | atatggctat | 35860 |
| taacatacgt | cataaaagca | ttgtaataacc | atcttgtttc | aaattaaan | 35810 |
| nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnnn | nnnnnnnnng | 35760 |
| caacgacagt | cgttataaca | cgggtgttct | gtttcataca | cctcgtgcc | 35710 |
| gcttacaagt | tacctcgtat | gtaacttatt | tatcctcaca | tggtcgtggca | 35660 |
| tcgacagtag | ttataacaca | gggttctgt | tcatacacc | tcgtgcccgc | 35610 |
| ttacaagtta | cctcgtatgt | aaactattta | tcctagcatg | gccgaaaac | 35560 |
| gccagatggt | ataacacggg | tggtctgctt | catacacctc | gtgcccgtt | 35510 |
| acaagttact | gagtttgcaa | acaatccgca | cattatgcat | cgtcacaact | 35460 |
| ggcattttaa | tttaagcac | attacgtcat | aatagatcaa | caatgacggt | 35410 |
| cgtttttacc | gcgattgtgg | attcgaaaca | tggttttgac | gtcataatac | 35360 |
| gtgtgtgca | tacgggcggt | accgttacgg | ttgttttgca | acatagatat | 35310 |
| ctcgtataat | ataacatgga | aatgtcatta | cacctcata | tatcacacac | 35260 |
| attactcagt | aatagcaact | cgacagcgag | catgggttga | atgcaacagc | 35210 |
| cacgctttta | actgatgcta | ttccaacac | tttttaacca | tagcgtgttt | 35160 |
| aaacgactgt | cgttttggcg | ctttccctt | ctttttgctg | tcgtgttgga | 35110 |
| aaacataaat | aaatttatga | tatgttatga | ggtaacctat | atattgacag | 35060 |
| CTCCGAGGTT | CCATATACAC | CACATATATG | ATTCAAATCG | CCGCAACAGA | 35010 |
| GCTCATTGTT | TGCTAGTAT | GGCTATTAT | GACATCACTG | TTCCTACATG | 34960 |
| AACTACCAAC | GGAACCAACT | TTGCAAGCTA | AcGCAG | gtac | 34910 |
| ctgtgggtat | gggggggggg | gcaaccatgg | ataagtcact | caagttccca | 34860 |
| cccacaagga | tataaatgac | caaaccaacc | aaaatgattg | atgataatac | 34810 |
| tgaaggtggt | tgcacacacc | accaaacat | aaacaaacac | aacatactaa | 34760 |
| gcttgaagat | caatttaaat | gaaaataaat | tctacagtta | taataaaatt | 34710 |
| ttactcaaat | taaagttaa | ataaattgat | ttattttaa | cataacatga | 34660 |
| cgttttttgt | ttaccgatca | tttaaaaact | taaaaaaaca | atcccattta | 34610 |
| caaaagaaa | aaacaaactg | atgaaacaac | aatccataaa | ctttaaacat | 34560 |
| agtgaagtct | cgatgctggtc | agcagaattt | ttaacaaaat | attgaaatat | 34510 |
| atgtgaattt | aaacctggtg | cagcaacaat | gcttaaaact | gtgaaacaaa | 34460 |
| gtttcaattt | caattttcaa | gatgttttca | gtttcaaaaca | aaactgtgtt | 34410 |
| gatctcagcg | gatatacgtg | cttgaaacac | aagggttoga | tattttgtac | 34360 |
| atagacatca | aatacttggt | atggactatg | acatcacaat | cactattatt | 34310 |
| actccacaat | ggtgacataa | cgggttcgaa | tgacacgtca | cgccccaacg | 34260 |
| acttttaaat | gctcgggtta | cagaaagtca | gtgaggcgtg | taataaaact | 34210 |
| tttaaacgag | tgaaacacca | cacggtatgc | catgatgcca | cgatagtttg | 34160 |
| ggtgaaaacc | aaacaggaaa | atatagctac | aacatatacgc | aattttagtc | 34110 |
| ataactgctt | ttacaactat | ttaaaaaaa | tgccgattat | tttaaat | 34060 |
| tggtgaaaaa | agtaaagt | attgatttat | aaataataga | agaagttatt | 34010 |
| ttacaataaa | ccaatgat | gtctggatta | tatcttcacc | ttaatcaaag | 33960 |
| aaaaactctg | aaaaatctaa | taacttggt | gaaagaataa | ataattgtga | 33910 |
| aaaaatgggg | gattatgaca | tcacaataag | tgaaaagtgg | tcactatagt | 33860 |
| tccattgttc | taatgaaagt | aaattgttta | aaatttcacg | attcagtaaa | 33810 |
| tttgaatggt | tggttttaaa | atggatgaga | ggtagggtta | acaccogtgt | 33760 |
| gtcaacaacc | atgggggtgg | gggtttgcat | ggctgggggt | ggttagaatg | 33710 |
| gatatgggg | gggtggggg | ttattataa | tgtatgtggt | cctacagagt | 33660 |
| tgcccatta | cccacacatt | gtatatgcac | attctatatg | ggtgaggtcc | 33610 |
| tacaagccat | gggacccaac | accaggggtg | ctaccacatg | gacctacca | 33560 |
| gatgaagcat | gtcgttccc | caccaggggt | tggtcacga | ggataagtgc | 33510 |
| actgagggct | gcaaacacag | ctgtgtcgtc | ataatagtag | ttggccggta | 33460 |
| gtattgtgat | gtcataatag | aggaacaat | gaatcaaat | tccgtttttt | 33410 |
| taaaaataga | aacctataa | atataatcga | tatttctcat | gggtataatt | 33360 |
| tccatatttg | gtgttcgtac | atcccttct | aatgcatggc | attatgggta | 33310 |
| atcaacctat | gatgtcaca | tcaacaatac | aattaatttt | tttcattaaa | 33260 |
| aaattagaaa | aaaaacacat | cgttcttaaa | aaataactgt | gacaaatata | 33210 |
| acagagtaaa | taaaacttac | ttttataaaa | agcaagcga | ctttctggac | 33160 |
| agttttaaca | aaacaaaacc | tttattaca | agcaacaaag | aaaccaatata | 33110 |

| | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------|
| atataaccaa | gcaattccat | aaaaaatcaa | taaccaatct | ttataccaag | 33060 |
| cataacactc | ccaacttccc | ccacagagca | tcaataaaaa | tgtgttgctg | 33010 |
| ctgattcccac | aataaagtat | aaattacccc | acattgattt | gtgtttatat | 32960 |
| aaataaccaa | aaatctttca | acctctctca | ccacaaaagc | ccatcattta | 32910 |
| taataaagtca | caatctactt | caatcactta | tagtgaatca | taacatattt | 32860 |
| gtaactttaa | tttctaatt | aagacacttg | tgtccgacct | acgcactggt | 32810 |
| atgtttgtac | caacttttaa | caatatagaa | accaactgta | caataacacc | 32760 |
| cacccccaca | gAGCCTCCCC | CCACCTCTTC | TCTCACGTTG | TACAGATTCA | 32710 |
| TATACGCGGT | GTACAACTTC | CATTATTACA | TCAATATCTT | TC TGCTTGCC | 32660 |
| ACGATGAGTG | TTGAACGGTG | CGTTGCCGTG | TGGAAATCAC | TCAGGTGCCA | 32610 |
| ACGATATCAG | TTTAATgtaa | gtttttgtac | tttagattta | tagtttattg | 32560 |
| atztatgctt | agaacattta | attttgatac | agtttataaa | tgaatgaatg | 32510 |
| agtgtagctt | gtttaacctt | acgagtttac | catgtatgta | actgtgtggt | 32460 |
| gattttttta | tgtataacta | gggataattc | aaacaaccga | ttagtgacct | 32410 |
| caccactgag | catgcacaac | actgagctgc | accactgaat | aaaaatattt | 32360 |
| atgtgtttta | ttttattttt | gtgttgacgc | attttttggt | gaaccattta | 32310 |
| tagtttcaaa | gtttatatta | tttctatggt | acagCGGAAA | TTTATCTACG | 32260 |
| GTGTTAGTGC | CtTCATGTGG | TTGATAGCAT | TCTCATGCGC | ACTGCCGAGC | 32210 |
| TTCAATCGAC | TCGATCTCGT | TACTGACAAC | ATAAACATCA | CACGACCgta | 32160 |
| agtttatagg | atttctatgg | gttttattat | gttttcgata | actgtgtggt | 32110 |
| tgattgacag | gtgtgtttga | ttgacaggtg | gtgtttgatt | gacaagttgt | 32060 |
| gtttgattga | caggtcgctg | ttgattgaca | agttgtggtt | gattgacagg | 32010 |
| tgggtgttga | ttgacagatt | atatttgatt | gacagGGCCA | ACATGAAGGT | 31960 |
| AGCAGAGACA | CACATGTACA | TGAATGTTA | CGAACCGCTC | AAACACGCAT | 31910 |
| CTGACAACAA | CCTCACTTAT | GTaATGGATT | ACGATGGAAT | ATCCGCAGTG | 31860 |
| GATTGCTATG | ATATCATGCA | GGAGGATTAT | TTATCATTGA | TTGATGAGAT | 31810 |
| AGATACTGGT | ATGATGGATC | CAATGTATGA | GGAATACCAG | GAGTTATATA | 31760 |
| CAGATGATAT | ATATGGGGAT | ACCGGTAACA | TAACCATGCT | ACCGGAGTTG | 31710 |
| ATGCAATTTG | TGTACCAAGT | CACATTACCT | AACGGTGATA | ACATGACCGT | 31660 |
| GGTTGACCAC | CAGATATATT | TCTCATTATT | CCACGGGATT | ATTTCCGATA | 31610 |
| TTCATAATAA | ATCTAAGAAG | GAACCACTAG | GTGGCATATG | CGATCCAAGG | 31560 |
| TTGAACAAAG | ACGCGAAGAT | ATAtAACATC | ATAGTGAACC | TCATCATCGG | 31510 |
| GTTCTTCATt | CCTTTCCTTG | CGATTCTCAT | AAGTTATGTT | TCAATCGCTC | 31460 |
| ACATGATCCG | AGTGCCTGCG | TTGGACCGTA | TGGAGAACGA | TTGTGATGTC | 31410 |
| ATAGAGAGCG | AGAGCACACT | GGGgCGAAGA | ATGTCGGATT | TCTTGCGACA | 31360 |
| GTTTGTAAAG | GGGGGCGGGC | CCGTGAAAAA | TGTGGGTGAA | AGCACCCAC | 31310 |
| CTTATAATAA | AGGTAGTTC | CCgTTGTTGA | GAAGAAGTTT | GAGGAAGAAA | 31260 |
| GCTCGCGATC | GTGGGACGGG | GTTGGAGGGG | AGCGAGGTCA | AATCATCCAG | 31210 |
| AGATGATGTA | GTAAACCTC | CAGTGGTGAG | GAGGGAGGAG | AAACCTGTgG | 31160 |
| TCAGGGATGC | GGGGTTCGAT | AGAAGACCTC | GTTTGTGTC | ATTTCTGCAC | 31110 |
| CCAACGCACA | GCAGAAGGAC | AAGCGGGGGC | TCGCCAGCT | CTGCTGAAAG | 31060 |
| TTTCCAACC | GACCAACAT | CGTTGCATGC | GaCGACACCA | AGCCCTGGAG | 31010 |
| TGAGGCTCTC | AGCTCCATA | TTCTGACATG | ATAAGgtgtg | tgatgtcata | 30960 |
| tataaagggt | gtgatgtcat | ataaagggtg | tgtgatgtca | tatataaggt | 30910 |
| gtgtgatgtc | atatataagg | tgtgtgatgt | catatataag | gtgtgtgatg | 30860 |
| tcatatataa | ggtgcgtgat | gtcatatata | aggtgtgtga | tgtcatatat | 30810 |
| aagggtgtgtg | atgtcatata | tacattaaac | atthaggttt | ttcaaaaata | 30760 |
| tttatttcat | aacattgtta | tattactgca | tataatcttg | tattattttc | 30710 |
| atataacccc | ctaaaccccc | agACCCGGT | ACAACGAGCG | TCATCGACCG | 30660 |
| AAACCCCCAC | ACACCCCGT | TCACCCCaCA | CACGACGATG | GTCACTAGAA | 30610 |
| ACCTTACGCA | GCCCCATGA | GGCTTCACCC | CCTGTATTAG | ATGgtgggtg | 30560 |
| taaaaagctt | taggaataat | tatagaaatt | aactttattt | cgaattatga | 30510 |
| cttacaaggt | cacatacgtt | tacaatggtg | gcagcatcaa | acctctagca | 30460 |
| aattgctaag | actttataga | aagttagga | ttttgtctca | actattctaa | 30410 |
| ctttatatca | tgatgttact | ttgtgaaagc | aaattttgaa | attttcctaa | 30360 |
| ttttctgtct | ggcccacaga | AACGGAGCCT | CTTTACGACC | GTGTTGATGA | 30310 |
| TGTCACAATG | GCCAAACCA | CGTCGCCTCC | TAGTGGGGAT | TCCACACAGG | 30260 |
| AATTATTCCA | CGGAAGTTAC | GCGAGGTTAT | ACgCACAGAA | ACCTGACGCG | 30210 |
| CGGCCAAGAT | ACCAACGACA | AGCgTCAACG | ACCTCAAAC | ACAGAAGCCG | 30160 |
| CGCTTACTCT | GCCACGTCAA | GGGCaGCGG | CGGAGgtgag | ttgtcaccgc | 30110 |
| taagttacaa | atcattagat | tagattgctt | taataaaatg | aagttccaag | 30060 |
| tgtttgttca | gggatggaat | gttcaacaaa | atacaaacct | ttaaatctat | 30010 |
| gcatatttaa | atttttcatt | ttttccacaa | ttggcaata | ctaattttat | 29960 |
| tccaccaacg | tttggtatgc | gatacgacaa | gacttcataa | gcttacaaca | 29910 |
| aaataaacca | aatattttaa | gtctcaaaac | aacgcatggc | agacagaaca | 29860 |
| ctggtataat | ataataacaa | tgttttttac | gatacgggtc | aatttatatt | 29810 |
| atattatgcc | ccgtcgcaac | aacaaaataa | tcaataactgt | ttatcacaat | 29760 |

| | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| tcacaactac | aataataaaa | cacaccagac | caccacatt | gtaggaaac | 29710 |
| aattctcatc | attgtgttt | ttacgaagca | atccacatta | tcgcatcaca | 29660 |
| atccacattc | ctgccaacaa | tgtttattat | gatgtaaaca | atcatctttt | 29610 |
| atcatcacat | tatcacatca | caaatctcat | tatgacatca | cacatacaaa | 29560 |
| caataaaactt | ctaacctctg | ttccaacaaa | ttttatcaag | aagagaat | 29510 |
| caagataaaa | acaacataaa | ctttcgatat | aatattgtga | acaattaata | 29460 |
| aaccagtagc | acggaactaa | ccacaccata | atatgttcta | acatgaatat | 29410 |
| aaggaagaaa | agttaagttt | ctctatcagg | aaacaacatg | aactttaaca | 29360 |
| gcataaacia | gcgacaatat | aatattaaga | caaggatata | aattaaatat | 29310 |
| tccttggat | atggctgatg | tattttcact | tcttaaagat | acagttcgat | 29260 |
| gggggaagat | gggacacatt | ttaactctat | tttctcgccc | catttagtag | 29210 |
| taaacaaga | atattcaaag | aaatatgaaa | ctatgtcctc | atgtgtccca | 29160 |
| tagactggtg | ttaattggtt | aaaacgcaat | cagaatacct | ggatattttg | 29110 |
| tgctaaaggt | gtcccacatt | ccccaccct | actataaata | ttaaacaaca | 29060 |
| cctacttgca | ttttccagat | agaaaaacia | cagttgacca | atataaacia | 29010 |
| tctacaatac | acgattatat | taaaactagt | cgtttaatgt | aattaaacc | 28960 |
| ttggaacia | ctatagtgtg | ataataacia | tccctcaaca | gGGGTACCC | 28910 |
| TTTCGTA | AAATCGTgCAC | AAGAACGCTG | AACGTCATCT | ACGAATATCA | 28860 |
| CGAACCGtTC | TCACATACGT | TTGTGTGTTT | GCTGTTTGTT | GGCTCCACA | 28810 |
| GAGGATTGTA | GCTGTGTGT | ATGTGTGTTGA | Ggtgaggtgt | atgttgggtg | 28760 |
| tagatggtag | caccctgggt | gttggggtaa | tggacctaca | tcccaggtct | 28710 |
| caggtgtgcc | tattttctat | tttattctat | atgggtgagg | tccttgtag | 28660 |
| aggtccagga | gtgtgcgat | tacccaaaa | caaacattg | catacttctt | 28610 |
| aatagaacat | gcacttgcaa | attgtgcggt | actaaagacc | tcactttatt | 28560 |
| taacagtaat | aaaccacaac | ccctatatac | gaataaccgc | ccccatctac | 28510 |
| acag GGCATG | GTTGGTTTAG | GAGGCCACGC | gTGCCATGCA | GTATTCACAG | 28460 |
| CcACCAGAAT | TCTCAGCTTT | CTCAGTGT | TGCTCAACCC | TATTGTATAt | 28410 |
| GCGATGACAC | AACGTGAAAT | ACGACATtTT | cTGCACGAA | AACTcGCAGG | 28360 |
| GATGTGTA | TGTATCCACC | CTGGCCGgGA | ATCGAACCT | GACCCCAAG | 28310 |
| ACCGCAGCT | GAACGTtTCG | TTTGCAACG | CACGACGAGA | CTTTTCAGTT | 28260 |
| GTTGCTGATC | ATAATATAAC | GAGTGATGAG | ATTTCATGA | AACGAGAGcG | 28210 |
| ACACGCACGT | AACAAAGAAC | GCTGGTCGAG | GTTAATGCAT | AGATTGGgtg | 28160 |
| ggtggaagt | ttatatttat | gtttatttgg | aaaaatagt | ttttttta | 28110 |
| tgaaaaagtt | ttgtttgac | taaaattaag | tagttttttt | tttaaaaga | 28060 |
| ttttatattt | tttaaatag | ctaaataact | tttaaat | tgttttcatt | 28010 |
| tgaactttt | cctcag GGG | AAAAACCTC | CGTTATCGT | TGACGGGTAG | 27960 |
| CGGTTCACT | TCCCCGGTG | AGAAGCAAAG | TGACGGAACA | ATAGATGAAG | 27910 |
| ACGAGGAGAA | GGTCAAAGT | TCGAAAGT | AAAGTTCATC | AACCTCATT | 27860 |
| AAaTTAATTG | GGGTTGGGA | AGATTGgCAG | CAGATGATTG | ACATGGCTGA | 27810 |
| GGTTAATAAA | GGTCAAACCA | CTAACGAGGA | AACCATACTC | TGAACTTTCG | 27760 |
| GGGCGCGAA | TGCATGAGGA | TACTGATTTT | AAGTCTCgTC | GCTGCTACCA | 27710 |
| TTGTGGGCGA | ATGTGGCAA | AACACTTAAC | AGCAATTGAT | CCAACCCAGT | 27660 |
| GGTCACTAAT | GGTTGTCTG | AATTGTCTG | CATACAGAAA | AACAATCACC | 27610 |
| CACAAAGTTA | CATACaTGgT | AACTTGTAAG | CgGGCACAAAG | GTGTATGgAA | 27560 |
| CAGAACACCC | GTGTTATAAC | GACTGTCg | atcccgtcat | gcaaggataa | 27510 |
| ataagttaca | tacatggtaa | cttgaagca | ggcatgaggt | gtatggaaca | 27460 |
| gaacaccggt | gttataacga | ctgtcgttac | cctgcgcatg | gc AAATAAGT | 27410 |
| TACATTCTTT | AACCTCAAGT | GACATAAACG | TGTGAaACCT | CTACCAGACT | 27360 |
| ACGGTCTATT | ACTATAGGTC | GATAGTGACC | TCTGGTGGTC | ATGTTTAGTT | 27310 |
| TAAATCCCAA | CCACTTGGTG | TTGTATGGAG | TCGTACCTCT | TTGAGGAAG | 27260 |
| TTCCAAAGTT | gTTTGTGAAT | AAAAATAAAA | TTAACAATCA | Taaaccagtg | 27210 |
| tggtggtaag | cggatattga | aagaacaaga | aaaatacaac | tatctagaat | 27160 |
| atgacaacia | acaactatat | gtcttacagc | caattcaaac | g | 27119 |

Fig. 21: Sequenza del gene di *CiC3aR* identificato nella versione più recente (2.0) del genoma di Ciona (<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html>). Tale sequenza è interamente localizzata sullo scaffold 187 tra i nucleotidi 27219 e 39709. Gli esoni, che contribuiscono alla struttura del gene, sono undici e corrispondono alle sequenze evidenziate in rosso.

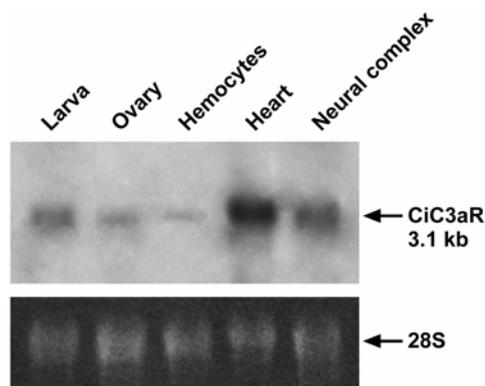


Fig. 22: Espressione tissutale di *CiC3aR* ottenuta mediante analisi per Northern blot. L'RNA totale (6 μg /pozzetto), estratto dai tessuti di *Ciona intestinalis* indicati nella figura, è stato separato su gel di agarosio, trasferito su di una membrana di nylon e ibridato con una sonda di 747 bp, marcata con ^{32}P . Il trascritto di *CiC3aR* è stato individuato come singola banda di ~ 3.1 kb in tutti i campioni esaminati. Nella parte bassa della figura sono mostrate le corrispondenti bande 28S, marcate con bromuro di etidio.

(3071 bp) ottenuta mediante l'analisi di sequenza dei prodotti della 3'- e della 5'-RACE. Nel cuore, nel complesso neurale e nel tessuto larvale la banda osservata era più intensa, indicando un'attività di trascrizione più elevata, mentre nell'ovario e negli emociti circolanti livelli minori di trascritto erano rivelati.

Analisi della sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3aR*

I 2544 nucleotidi, che costituiscono l'open reading frame di *CiC3aR*, codificano una proteina di 848 amminoacidi con un peso molecolare dedotto di 95.394 Da. L'analisi di idropaticità della sequenza amminoacidica dedotta (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) suggeriva la presenza di sette domini transmembrana (come schematicamente rappresentato nella figura 23), caratteristica comune ai recettori accoppiati alla proteina G, appartenenti alla famiglia delle rodopsine. L'allineamento di *CiC3aR* con sequenze omologhe di altre specie di vertebrati (Fig. 24), rivelava un'inserzione di 276 residui amminoacidici nel terzo loop citoplasmatico ed un allungamento di 105 residui della coda citoplasmatica. Non considerando queste regioni, la sequenza di *Ciona* che precede l'inserzione mostrava circa il 35% di similitudine con le altre specie, mentre quella che segue circa il 45%.

La lunga regione idrofilica posizionata tra il quarto ed il quinto dominio transmembrana, EL2, caratteristica comune a tutti i recettori di C3a, in *Ciona* consiste di 162 residui amminoacidici. In questo loop sono localizzati cinque dei sette siti di N-glicosilazione identificati mediante il programma (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGl_yc/).

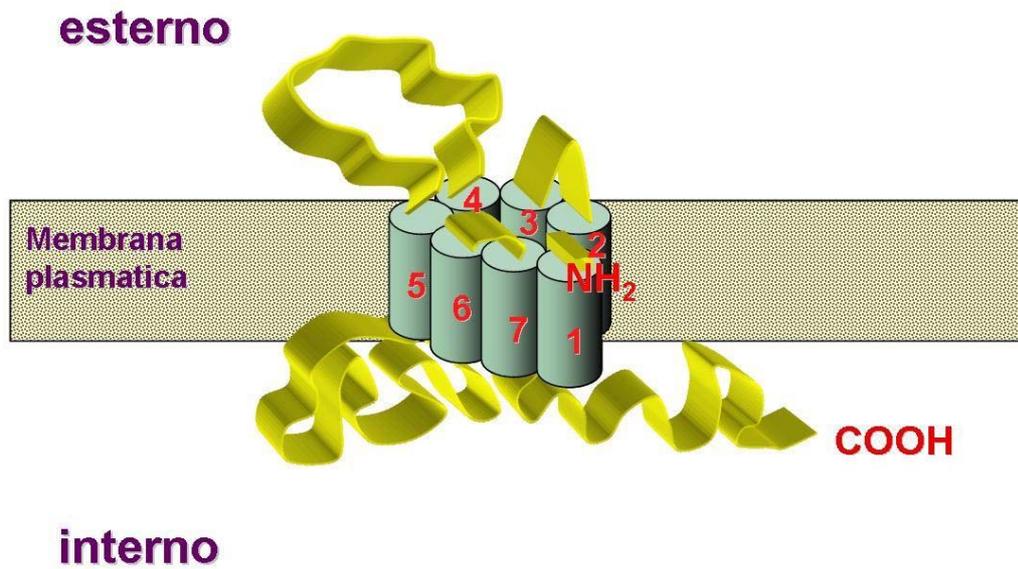


Fig. 23: Rappresentazione schematica di CiC3aR. I sette domini transmembrana di CiC3aR sono rappresentati da cilindri connessi da nastri che rappresentano le porzioni intracellulari ed extracellulari.

| | | | | | | |
|--------|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | TM1 | IL1 | TM2 | EL1 | |
| Ciona | -----MALAQDVVVIIFLCICGILNTAMLGLFCVKKQVRGSIYTYMIQIAATDLIVCLVWLIMTS-LFLHELPT | | | | | 70 |
| Rattus | MESFTADINSTDLSRPLFKPQDIASMVILSLTCLLGLPGNGLVVLVAVGVMKRTVNTVWFLHLTLADFLCCLSLPFSVAHLIL----- | | | | | 84 |
| Homo | MASFSAEINSTDLLSQWNEPPIVILSMVILSLTLLGLPGNGLVVLVAVGLKMQRTVNTIWFHLHLTLADLLCCLSLPFSLAHLAL----- | | | | | 84 |
| Gallus | MSPLLAN-NSSHVQDAVYVAPESISSLVIFILVPIIGIPGNGLVIVVAGLKMKRVSNIWFLNLAVADFMCCLSLPFIIVHFL----- | | | | | 83 |
| | | EL1 | TM3 | IL2 | TM4 | EL2 |
| Ciona | <u>PTLQANAEPPTSSSLTLRYRFIYAVYFNHYINIFLLATM</u> SVVERCVAVVWKSRLCQRYQFNRFIYGVVSALMWLIAFSCALPFI RLDLVTD | | | | | 160 |
| Rattus | -----RGHWPP--YGLFLCKLIPSVIILNMFASVFL LLTAISLDRCLMVHKKPIWCQNHR S-VRTAFVAVCGCVVWVTFVMCI PVFVYRDLV | | | | | 166 |
| Homo | -----QGQWP--YGRFLCKLIPSVIIVLNMFASVFL LLTAISLDRCLLVVFKPIWCQNHR N-VGMACSI CGCIWVAVFVMCI PVFVYREI FTT | | | | | 166 |
| Gallus | -----NAHWP--YGWFLCKVIPSIIIFTMFASVFL LLTVISIDRCLLVVMKPVWCQNHR T-VKFISLVCSGIIWILAFI IICCPVFHYRTVTN | | | | | 165 |
| | | EL2 | | | | |
| Ciona | NINITRANMKVAETHMYMKCY-EPLKHASD--NNLTY-VMDYDGI SA-VDCYDIMQEDYLSLIDEIDTGMDDPMYEEYQELYTDDIYGD | | | | | 245 |
| Rattus | DDYSVCGYNFDSRRAYDYWDYMYNSHLPEINFPDNTSGHVDDRTAPSSSV PARDL-WTATTALQSQTFTHTSPEDPFSQDSA--SQQPHYG | | | | | 253 |
| Homo | DHNRCGKYGKGLSSLDYDPDFYGDPLENRSLENIVQPPGEMDR LDPSFQTNDRHPWTVPTVFQPTFRPSADS LRGSRARLTSQNLYS | | | | | 256 |
| Gallus | GGKTECGYDFGDYEIPEYMDDSDPASGLLED-YSPLVPTVYVNTI FAHQPT-DTYPDFQANSISTNKGIS-----TAAHLSHA | | | | | 242 |
| | | EL2 | | | | |
| Ciona | TGNITMPELMQFVYQVTL-----PNGDNMTVVDHQIYFSLFHGI ISHIH-----NKSKEPLGGICDPRLNKDAKIYN-IIIVNLIIGFF | | | | | 324 |
| Rattus | GKPPVLIATIPG-GFPVEDHKSNTL--NTGAFLSAHTEPSLTASSS PLYA---HDFPDDY-FDQLMYGNHAWTPQVAITISRLVVGFL | | | | | 335 |
| Homo | NVFKPADVVSFKIPSGFPIEDHETSPLDNSDAFLSTHLKLFPSASNS FYESELPGFQDYNLGQFTDDQVPTPLVAITITRLVVGFL | | | | | 346 |
| Gallus | TVDVNSLLNSSAYPDIRLLESESDLPH--TSLPVPSNNDPDLK LLDPLDL-----ADFDSVFGDNDYAVSLPLIV-ITITRAVFGFI | | | | | 322 |
| | | TM5 | IL3 | | | |
| Ciona | <u>IPFLAILISYVIAHMIRVRALDRMENDCDVIESESTLGRMRMD</u> F LRQFVSGGGPVKNVGESTPPYKNGSPLLRRSLRKKARDRGTGLE | | | | | 414 |
| Rattus | <u>VPFIMITCYSLIV--FRMRKT</u> ----- | | | | | 355 |
| Homo | <u>LPSVIMIACYSFIV--FRMQRG</u> ----- | | | | | 366 |
| Gallus | <u>LPFSIVAACYAFIA--FRMRAS</u> ----- | | | | | 342 |
| | | IL3 | | | | |
| Ciona | GSEVKSRRDDVVKPPVVRREEKPVVRDAGVDRRPR LSSFSHPHTRSRRTSGGSASSAESFQTDQTSLHAATPSPGVRLSAPIFVHDKTPVQ | | | | | 504 |
| Rattus | ----- | | | | | 355 |
| Homo | ----- | | | | | 366 |
| Gallus | ----- | | | | | 342 |
| | | IL3 | | | | |
| Ciona | RASSTETPTHPRSPPTRRWSSETLRSPHEASPPVLD ETERLYDRVDDVTMAKPTSPPSGDSTQELFHGSYARLYSQKPDARPRYQROAST | | | | | 594 |
| Rattus | ----- | | | | | 355 |
| Homo | ----- | | | | | 366 |
| Gallus | ----- | | | | | 342 |
| | | IL3 | TM6 | EL3 | TM7 | |
| Ciona | TSNYR-SRAYSATSRAGGGGTLR KTIIVHKNAERHLRISRTALTYCVFVAVCWLPQRI VAVVYVVEGMVGLGGHACHAVFTATRILS FLS | | | | | 683 |
| Rattus | ---NLTKSRNKT-----LRVAVAVVT VFFVCWIPYHIVGILLVITDQESALREVVLWDHMSIALASAN | | | | | 416 |
| Homo | ---RFAKSQSKT-----FRVAVVVAV FVLCWTPYHIFGVLSLLTDPETPLGKTLMSWDHVCIALASAN | | | | | 427 |
| Gallus | ---NYRKPQNKM-----LKTIIILVVAV FFICWAPYHTVGI LSLVATPGTELKESLILWDHLSVALAYAN | | | | | 403 |
| | | TM7 | CT | | | |
| Ciona | <u>VLLNP</u> IVYAMTQREIRHLLRRKLAGMCKCIHPGRESNPDPQ NRDVNVVSFANARRDFS VVADHNITSDEIFMKRERHARKERWSRLMHRL | | | | | 773 |
| Rattus | <u>SCFN</u> PFYALLGKDFRKKARQSVKGI LEAAFSEELTHSTSTCTQDKAPSKRNHMSTDV | | | | | 473 |
| Homo | <u>SCFN</u> PFYALLGKDFRKKARQSIQGI LEAAFSEELTRSTHCPNNVI SERNSTTV----- | | | | | 482 |
| Gallus | <u>SCIN</u> PLLYVFGVGRD FRAKARQSLQGVLERVFTEEPTCSTP SYSLDK--SKTSKDKDISTTV----- | | | | | 461 |
| | | CT | | | | |
| Ciona | GGKNLRLSLTSGSGFTSPGEKQSDGTI DEDEEKQSSKQSSSTS FKLIGGWEDCQ QMDMAEVNKGQT TNEETIL | | | | | 848 |
| Rattus | ----- | | | | | 473 |
| Homo | ----- | | | | | 482 |
| Gallus | ----- | | | | | 461 |

Fig. 24: Allineamento della sequenza amminoacidica di *CiC3aR* con quelle dei recettori di *C3aR* di altre specie. La sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3aR* è stata allineata con le sequenze di *C3aR* di ratto, uomo e pollo, usando il programma Clustal X (1.8), con modifiche effettuate a mano. I residui identici per tutte le sequenze prese in esame sono indicati in grassetto. I sette putativi domini transmembrana (TM) sono marcati con una linea sovrastante la sequenza. I loop extracellulari ed intracellulari e la coda citoplasmatica sono rispettivamente indicati con le sigle EL, IL e CT. Le tre sequenze sottolineate corrispondono ai peptidi sintetici *CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹, *CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴ e *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹², usati come antigeni per produrre gli specifici anticorpi anti-*CiC3aR*. I numeri di accesso delle sequenze sono: *Ciona intestinalis*, AJ966353; *Rattus rattus*, AAC40071; *Homo sapiens*, CAA97504 e *Gallus gallus*, CAG32407.

Analizzando la sequenza di *CiC3aR* per la presenza di putativi siti di fosforilazione (Blom et al., 1999), sono stati identificati 43 residui di serina, 15 di treonina e 11 di tirosina. Inoltre la maggior parte dei residui di serina (39/43) e di treonina (12/15) sono localizzati nel terzo loop intracellulare e nella coda citoplasmatica. Nelle stesse regioni sono state anche identificate sei sequenze rappresentanti siti specifici dell'attività della protein-chinasi C ($(R/K_{1-3}, X_{2-0})S^*/T^*-(X_{2-0}, R/K_{1-3})$) (Kennelly e Krebs, 1991).

Un albero filogenetico è stato costruito a partire dall'allineamento della sequenza amminoacidica dedotta di *CiC3aR* con le sequenze note dei recettori per C3a e C5a dei vertebrati. *CiC3aR*, come evidenziato dalla figura 25, non apparteneva a nessuna delle cladi raggruppanti gli altri recettori di C3a e C5a, ed occupa una posizione basale rispetto a tutti i recettori di anafilatossine presi in esame.

Analisi mediante Western blot di proteine estratte da emociti circolanti

Allo scopo di avere dei reagenti capaci di rivelare la presenza della proteina *CiC3aR* e di verificarne l'attività biologica, sono stati preparati degli antisieri policlonali di coniglio di specificità determinata. A tal fine, sono state individuate nella sequenza amminoacidica dedotta tre regioni come potenziali epitopi antigenici: due nella porzione extracellulare del recettore, EL1 ed EL2, rispettivamente nel primo e secondo loop extracellulare, ed un altro, IL3, nel terzo loop intracellulare (sottolineati nella figura 24). I peptidi sintetici riproducenti tali regioni, *CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹, *CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴ e *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹², sono stati usati come antigeni immunizzanti; dagli antisieri ottenuti sono stati

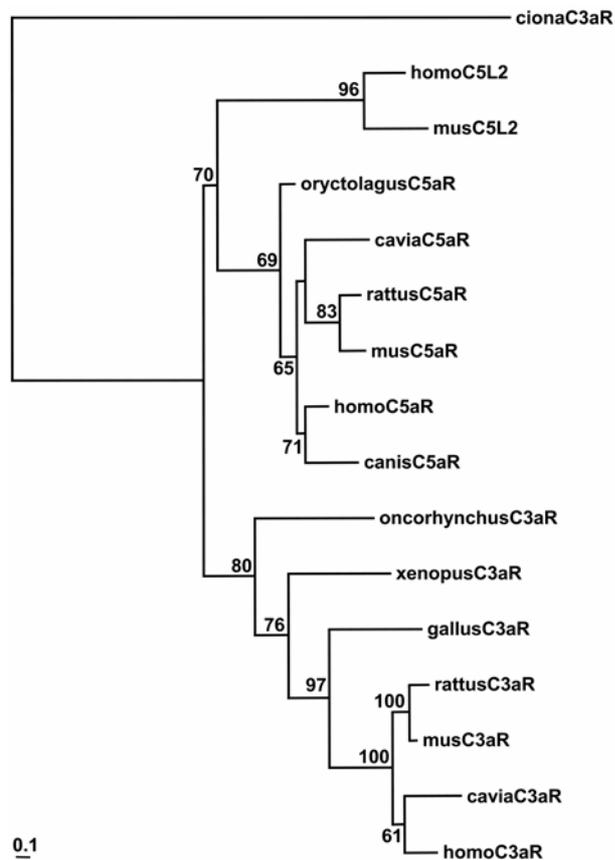


Fig. 25: Albero filogenetico di *CiC3aR* e delle sequenze amminoacidiche di altri recettori delle anafilatossine. L'albero è stato costruito con il metodo del "maximum likelihood", come indicato nella sezione materiali e metodi. A livello dei nodi sono indicati i valori dei "bootstrap". Numeri di accesso delle sequenze: *Homo sapiens* C5L2, BAA95414; *Mus musculus* C5L2, BAC35303; *Homo sapiens* C5aR, NP_001727; *Oryctolagus cuniculus* C5aR, Q9TUE1; *Canis familiaris* C5aR, P30992; *Cavia porcellus* C5aR, O70129; *Rattus norvegicus* C5aR, NP_446071; *Mus musculus* C5aR, AAB97774; *Rattus norvegicus* C3aR, AAC40071; *Mus musculus* C3aR, AAH03728; *Homo sapiens* C3aR, AAH20742; *Cavia porcellus* C3aR, O88680; *Gallus gallus* C3aR, CAG32407; *Onchorhynchus mykiss* C3aR, CAE83615 e *Ciona intestinalis* C3aR, AJ966353. La barra indica il numero di sostituzioni amminoacidiche attese per sito.

successivamente purificati, per cromatografia di affinità, i relativi anticorpi specifici anti-EL1, anti-EL2 ed anti-IL3.

Per verificare la presenza del prodotto del gene *CiC3aR* negli emociti circolanti di *Ciona*, è stata analizzata, mediante la tecnica del Western blotting, la reattività dei tre anticorpi specifici su estratti proteici di emociti. I tre anticorpi, anti-EL1, anti-EL2 ed anti-IL3, reagivano con la stessa banda proteica, che mostrava, in condizioni riducenti, un peso molecolare apparente di 98-102 kDa (Fig. 26); nella figura 26 è anche mostrato il pattern elettroforetico degli estratti proteici da emociti dopo colorazione con Coomassie (D). La leggera differenza tra il peso molecolare dedotto (95.394 Da) e quello determinato tramite SDS-PAGE (~100 kDa) potrebbe essere attribuita alla glicosilazione o ad altre eventuali modifiche post-traduzionali.

Reazioni di immunocitochimica su emociti circolanti

Per determinare quali tipi di cellule del sangue esprimevano *CiC3aR*, gli emociti circolanti di *Ciona* sono stati sottoposti ad analisi immunocitochimica usando gli anticorpi purificati per affinità anti-EL1, anti-EL2 ed anti-IL3. La reazione condotta utilizzando i tre diversi anticorpi dava luogo a pattern di espressione sovrapponibili: una chiara marcatura era presente nella maggior parte degli emociti identificati come amebociti granulari e ialini, secondo la classificazione degli emociti di Rowley et al. (1984). Nella figura 27 (A; B) è mostrato il risultato della reazione di immunorivelazione effettuata utilizzando l'anticorpo anti-IL3 e la diaminobenzidina (DAB) come substrato della perossidasi. Il citoplasma degli amebociti granulari e ialini è caratterizzato dalla presenza di granuli che spesso appaiono intensamente

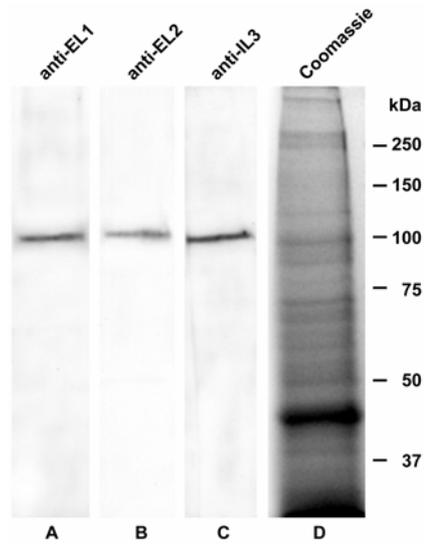


Fig. 26: Analisi mediante Western blot di estratti proteici di emociti di *Ciona intestinalis* usando anticorpi anti-*CiC3a*. Le proteine estratte da emociti di *Ciona* (80 µg/pozzetto) sono state sottoposte ad elettroforesi su un gel di poliacrilammide-SDS al 7.5% in condizioni riducenti, trasferite su membrane di nitrocellulosa e trattate con gli anticorpi purificati per affinità anti-EL1 (A) anti-EL2 (B) e anti-IL3 (C). La rivelazione degli anticorpi legati è stata ottenuta con la proteina A coniugata alla HRP e con ECL. In D è mostrato il pattern elettroforetico degli estratti proteici colorati con Coomassie. A destra è indicata la mobilità di marcatori di peso molecolare.

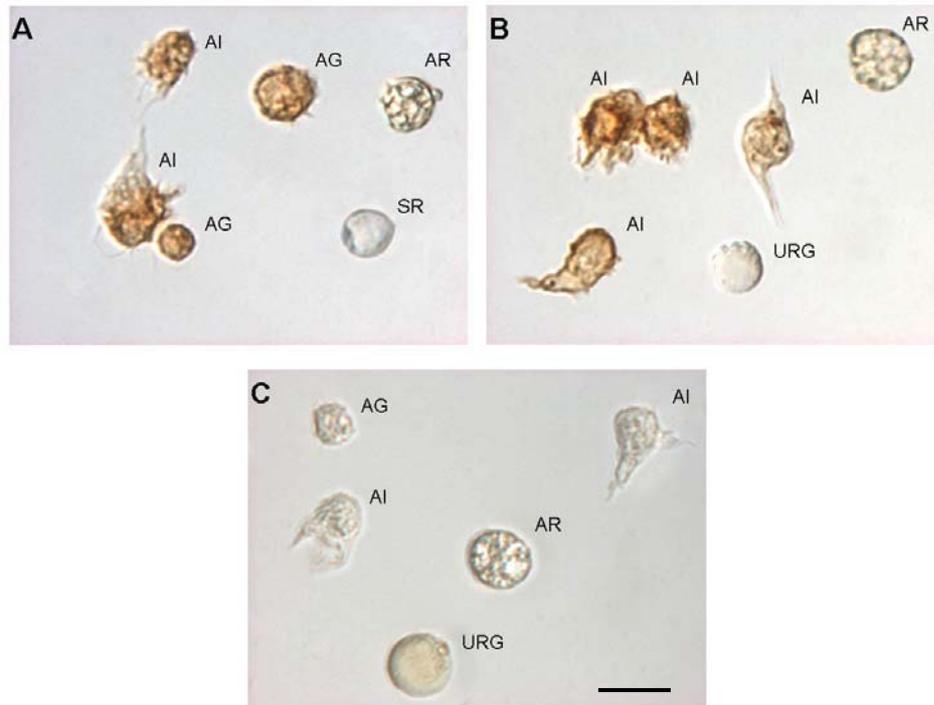


Fig. 27: Immunorivelazione effettuata utilizzando l'anticorpo anti-IL3 e la diaminobenzidina (DAB) come substrato della perossidasi. **A-B.** Il citoplasma degli amebociti granulari (AG) e ialini (AI) è caratterizzato dalla presenza di granuli intensamente marcati, mentre le cellule vacuolate del tipo univacuolari refrattili (URG) e "signet ring" (SR), non risultano mai marcate. Anche gli amebociti refrattili (AR) non hanno marcatura. **C.** Reazioni di controllo, effettuate sostituendo al primo anticorpo le corrispondenti IgG purificate per affinità dai sieri preimmuni, indicano che tutti i tipi cellulari presi in esame non sono marcati. La barra corrisponde a 10 μ m.

marcati. I tipi cellulari classificati come cellule vacuolate, rappresentate nella figura 27 (A; B) dalle cellule univacuolari refrattili (URG) e dalle “signet ring”, non sono mai marcati. Anche gli amebociti refrattili (Fig. 27. A; B) non hanno marcatura.

Per estendere l’analisi dell’espressione di *CiC3aR*, esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti utilizzando gli anticorpi purificati per affinità ed un anticorpo secondario coniugato con fluoresceina. Questi esperimenti hanno mostrato chiaramente che *CiC3aR* è espresso non solo nel citoplasma, ma anche sulla superficie cellulare di entrambi i tipi di amebociti, granulari e ialini (Fig. 28. A; C).

La specificità di entrambe le reazioni immunocitochimiche è stata validata da reazioni di controllo effettuate sostituendo al primo anticorpo le corrispondenti IgG purificate per affinità dal siero dei conigli prelevato prima dell’immunizzazione. Infatti, tali reazioni risultavano completamente negative (Fig. 27. C; 28. E).

Inibizione della migrazione degli emociti mediante anticorpi specifici anti-*CiC3aR*

Per dimostrare in maniera incontrovertibile che il gene *CiC3aR* identificato e sequenziato, codifica per il reale recettore dell’anafilatossina C3a, sono stati effettuati esperimenti di inibizione della chemiotassi utilizzando i tre anticorpi policlonali anti-EL1, anti-EL2 ed anti-IL3, prodotti contro i peptidi sintetici *CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹, *CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴, and *CiC3aR*³⁹⁸⁻⁴¹². È stata saggiata la capacità degli anticorpi rivolti alle porzioni extracellulari del recettore, cioè anti-EL1 ed anti-EL2, di inibire la chemiotassi degli emociti

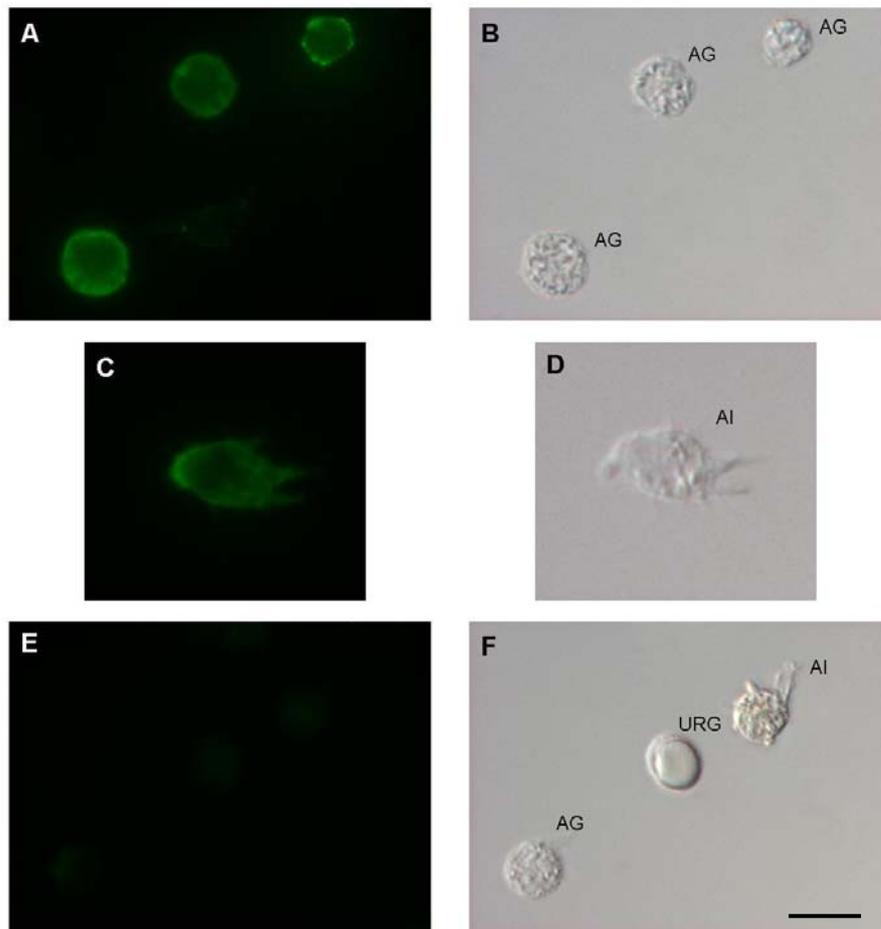


Fig. 28: Reazione di immunofluorescenza effettuata con l'anticorpo purificato per affinità anti-IL3, in combinazione con un anticorpo secondario coniugato con FITC. L'immunorivelazione indica chiaramente che *CiC3aR* è espresso nel citoplasma e sulla superficie cellulare degli amebociti granulari (A) e ialini (C). Osservazione degli stessi campi con ottica Nomarski (B; D). Immagine di uno stesso campo, in fluorescenza (E) e in ottica Nomarski (F), di una reazione di controllo condotta con il corrispondente anticorpo preimmune. AI, amebocita ialino; AG, amebocita granulare; URG, cellula univacuolare refrattile. La barra corrisponde a 10 μ m.

promossa dal peptide sintetico C3a⁵⁹⁻⁷⁶. Questo peptide, che riproduce la porzione C-terminale del frammento C3a di *Ciona*, promuove la chemiotassi specifica degli emociti in maniera dose-dipendente (Pinto et al., 2003). In questi esperimenti è stato utilizzato come controllo negativo l'anticorpo prodotto contro il loop citoplasmatico. La pre-incubazione degli emociti con gli anticorpi contro i loop extracellulari (anti-EL1, ed anti-EL2) inibiva quasi completamente (più del 90%) la loro migrazione verso il pozzetto inferiore della camera di chemiotassi contenente il peptide chemioattraente (Fig. 29). Al contrario, la pre-incubazione degli emociti con l'anticorpo contro il loop citoplasmatico (anti-IL3) non produceva alcuna inibizione. Gli anticorpi anti-EL1 ed anti-EL2 inibivano la chemiotassi in maniera dose-dipendente e producevano il 50% di inibizione rispettivamente alle concentrazioni di 1.2 e 3.7 µg/ml. Esperimenti di controllo sono stati effettuati in parallelo utilizzando sia IgG di coniglio preimmuni, sia un anticorpo policlonale non relazionato purificato per affinità, l'anti-fattore H di trota: entrambi gli anticorpi non hanno prodotto inibizione della chemiotassi. Un ulteriore esperimento di controllo è stato condotto con i peptidi sintetici *CiC3aR*⁶⁵⁻⁸¹ e *CiC3aR*²²⁸⁻²⁴⁴, usati come competitori dei rispettivi anticorpi in esperimenti di inibizione della chemiotassi. Quando gli emociti erano incubati con gli anticorpi in presenza dei peptidi corrispondenti, la capacità di inibizione degli anticorpi era completamente abolita, dimostrando la specificità di riconoscimento degli stessi.

Gli esperimenti di chemiotassi hanno anche consentito di identificare quali tipi cellulari del sangue fossero coinvolti. L'analisi microscopica degli emociti migrati verso il chemioattraente rivelava che i tipi cellulari coinvolti

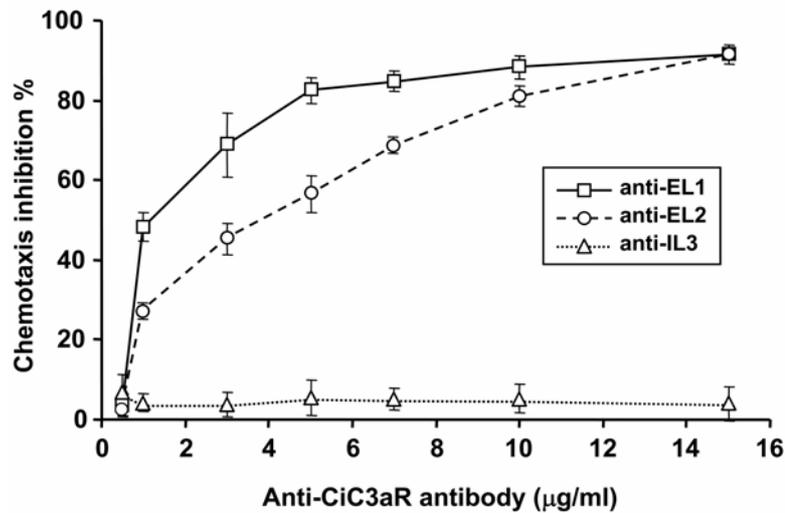


Fig. 29: Inibizione della migrazione degli emociti di *Ciona* mediante anticorpi specifici. Il peptide di 18 amminoacidi, $CiC3a^{59-76}$, che rappresenta la porzione C-terminale del frammento di $CiC3a$, è stato usato come chemioattrattante alla concentrazione di $10\mu M$. Gli anticorpi purificati per affinità, anti-EL1, anti-EL2 e anti-IL3, sono stati usati alle concentrazioni di $0.5-15\mu g/ml$. Esperimenti di controllo, effettuati in parallelo usando le IgG purificate dal corrispondente siero preimmune di coniglio, alle stesse concentrazioni, non hanno effetto sulla migrazione degli emociti. I valori riportati in figura sono percentuali di inibizione della migrazione cellulare e rappresentano la media $\pm SD$ di cinque esperimenti indipendenti.

in tale processo erano amebociti granulari e ialini e granulociti univacuolari refrattili. Dal pozzetto inferiore della camera di chemiotassi erano recuperati anche piccoli emociti, cellule non altrimenti classificabili a causa della loro dimensione.

DISCUSSIONE

In un precedente lavoro (Pinto et al., 2003) era stata dimostrata in *C. intestinalis*, un'attività chemiotattica esercitata sugli emociti dal peptide C3a, frammento proteolitico di C3. Tale evidenza indicava chiaramente la presenza di un pathway infiammatorio, mediato dal sistema del complemento, anche in invertebrati deuterostomi. Nello stesso lavoro, inoltre, si dimostrava che la tossina della pertosse inibiva tale attività chemiotattica, e si suggeriva il possibile coinvolgimento di un recettore a sette domini transmembrana accoppiato alla proteina G (Pinto et al., 2003). Tuttavia, la reale natura di questo recettore era sconosciuta. Sembrava, pertanto, importante intraprendere uno studio volto all'identificazione e caratterizzazione del recettore di C3a in *C. intestinalis*. Tale obiettivo assumeva un particolare rilievo non essendo stata mai identificata una molecola del genere in altre specie di invertebrati ed a causa della posizione filogenetica delle ascidie, alla base del subphylum dei vertebrati.

In questo studio è stato sequenziato un trascritto omologo ai recettori di C3a dei mammiferi ed è stato dimostrato che il suo prodotto è proprio la molecola di membrana che interagisce con *CiC3a*, il frammento attivo che media la chemiotassi degli emociti.

L'analisi dei trascritti mediante Northern blot rivelava che *CiC3aR* è espresso costitutivamente negli emociti circolanti, nell'ovario, nel cuore e nel complesso neurale dell'animale adulto, come anche nello stadio larvale. L'identificazione di una singola banda di circa 3.1 kb in tutti i tessuti presi in esame, esclude la presenza di messaggeri di differente lunghezza generati da eventi di splicing alternativo del trascritto primario. L'ampio pattern di distribuzione tissutale di *CiC3aR* è in accordo con quanto osservato nei

mammiferi (Ames et al., 1996; Roglic et al., 1996; Hsu et al., 1997; Tornetta et al., 1997; Fukuoka et al., 1998) e nei pesci (Boshra et al., 2005), ed è conforme al ruolo di C3a quale mediatore delle reazioni infiammatorie.

Da un punto di vista strutturale, l'analisi della sequenza amminoacidica dedotta ha confermato che *CiC3aR*, come i recettori delle anafilatossine dei mammiferi, è una molecola a sette domini transmembrana accoppiata alla proteina G.

Dall'allineamento mostrato nella figura 24 è evidente che in *Ciona* le differenze più rilevanti rispetto ai recettori di C3a dei vertebrati, sono localizzate a livello della coda citoplasmatica e del terzo loop intracellulare, che sono più lunghi rispettivamente di 105 e 276 residui amminoacidici. Sebbene differente per dimensione, la porzione C-terminale della coda citoplasmatica di *CiC3aR* contiene molti residui di serina e treonina, dei quali ben 8 nel segmento 808-819; tali residui sono risultati essere siti putativi di fosforilazione. L'alto contenuto di serina e di treonina in questa regione è comune a tutti i recettori di C3a dei mammiferi nei quali è stato dimostrato che questi residui sono coinvolti nei processi di internalizzazione e trasduzione del segnale (Settmacher et al., 2003).

Un'ulteriore differenza tra i recettori di C3a di *Ciona* e dei mammiferi riguarda la regione extracellulare amminicotermine, che in *Ciona* è più breve e manca del sito putativo di N-glicosilazione. Nei mammiferi questo sito, insieme ad un altro, localizzato nel secondo loop extracellulare, è ritenuto responsabile del legame con la componente glicidica che concorre alla differenza tra il peso molecolare dedotto (~ 54 kDa) e quello stimato in SDS PAGE (83-114 kDa) (Ember et al., 1998). In *Ciona* la differenza tra

stima elettroforetica (98-102 kDa) e peso molecolare dedotto (95.394 Da) è piccola. In *Ciona* i siti presuntivi di N-glicosilazione sono multipli, cinque, e tutti localizzati nel secondo loop extracellulare, con la probabilità di glicosilazione più alta in prossimità del quarto dominio transmembrana.

Carattere distintivo dei recettori di C3a è la lunghezza del secondo loop extracellulare, che consiste di circa 170 residui amminoacidici, con sole due eccezioni: una delle due isoforme di C3aR di *Cavia porcellus* più corta di 35 residui e generata da uno splicing alternativo (Fukuoka et al., 1998), e quella di trota che consiste di solo 36 residui (Boshra et al., 2005). La lunghezza del secondo loop extracellulare di *CiC3aR* è paragonabile a quella dei mammiferi e consiste di 162 residui. Questo loop nei mammiferi riveste un importante ruolo nell'interazione con il ligando; è stato proposto un modello di interazione recettore/ligando a due siti e questo loop li includerebbe entrambi (Chao et al., 1999). In *Ciona* la situazione potrebbe essere alquanto diversa. Infatti, sebbene siano presenti molti residui carichi nelle porzioni N- e C-terminale del secondo loop extracellulare, in *Ciona* è assente la carica negativa netta, ritenuta nei mammiferi importante per l'interazione con il ligando. Tuttavia queste differenze non sorprendono dal momento che anche il ligando di *CiC3aR*, e cioè *CiC3a*, differisce dai suoi omologhi dei mammiferi (Pinto et al., 2003); infatti esso non possiede il dominio anafilatossinico canonico né la sequenza consenso C-terminale GLAR. Tali differenze, sia a livello del ligando che del recettore, potrebbero giustificare un differente modello di interazione.

Al fine di chiarire quali regioni della molecola recettoriale di *C. intestinalis* erano responsabili dell'attività funzionale, sono stati condotti

esperimenti di inibizione della chemiotassi; come inibitori sono stati usati tre anticorpi policlonali ottenuti immunizzando dei conigli con peptidi sintetici riproducenti sequenze amminoacidiche localizzate rispettivamente nel primo e nel secondo loop extracellulare, e nel terzo loop intracellulare. Hanno prodotto un'elevata inibizione dell'attività chemiotattica (maggiore del 90%) i primi due anticorpi, cioè quelli con specificità rivolta verso la regione extracellulare del recettore; al contrario, come era da attendersi, l'anticorpo specifico per il terzo loop intracellulare, usato come controllo dell'esperimento, non era capace di inibire; è da tener presente che quest'ultimo anticorpo era paragonabile agli altri due nella rivelazione di *CiC3aR* in Western blot. I risultati ottenuti dagli esperimenti di inibizione di chemiotassi non consentono di distinguere come contribuiscono all'attività funzionale il primo ed il secondo loop extracellulare: infatti, l'attività inibitoria di ciascun anticorpo potrebbe essere dovuta sia ad ingombro sterico a livello del/i sito/i di interazione oppure al suo/loro diretto coinvolgimento.

Un'analisi comparativa tra le sequenze del primo loop extracellulare di *Ciona* e dei mammiferi ha rivelato interessanti differenze: quello di *Ciona* è più lungo, manca di un residuo di cisteina coinvolto presumibilmente in un ponte disolfuro con un'altra cisteina nel secondo loop extracellulare, e mostra una netta carica negativa. Nei mammiferi, come già accennato precedentemente, cariche negative sono concentrate nel secondo loop extracellulare, e precisamente a livello delle porzioni N- e C-terminale. Questi dati potrebbero suggerire in *Ciona* un ruolo specifico del primo loop extracellulare, analogo a quello del secondo loop extracellulare del recettore dei mammiferi.

E' sembrato opportuno affiancare all'analisi molecolare e funzionale di CiC3aR anche un'analisi filogenetica che consentisse di chiarire il suo rapporto evolutivo con i recettori delle anafilattossine dei vertebrati. I risultati, mostrati in figura 25, indicavano chiaramente che la sequenza di CiC3aR non faceva parte di nessuna delle due cladi che includevano rispettivamente i recettori di C3a e di C5a dei vertebrati. Inoltre, la posizione basale del recettore di *Ciona* avvalorava l'ipotesi che se i geni di C3aR e C5aR sono stati originati da una duplicazione genica di un comune antenato, tale evento deve essersi verificato dopo la comparsa degli urocordati. In accordo con questa ipotesi è l'assenza nel genoma di *Ciona* di entrambi, C5a e C5aR (Azumi et al., 2003).

Infine, è stata condotta un'analisi immunocitochimica per individuare i tipi cellulari dell'emolinfa circolante di *Ciona* che esprimevano costitutivamente il recettore di C3a. Tale analisi, effettuata utilizzando gli anticorpi anti-CiC3aR, indicava una chiara marcatura solo a livello degli amebociti granulari e ialini che, come già dimostrato precedentemente (Pinto et al., 2003), svolgono in *Ciona* un ruolo cruciale nelle reazioni infiammatorie mediate dal sistema complemento. Infatti, questi tipi di emociti sono in grado di sintetizzare sia C3aR che C3, il precursore di C3a. I granulociti univacuolari refrattili, che in esperimenti di chemiotassi si comportavano come gli amebociti, migrando verso il chemioattrattante, non esprimevano C3aR. E' noto che questo tipo cellulare è coinvolto nelle reazioni infiammatorie locali, come dimostrato da esperimenti eseguiti su tunica di *Ciona* trattata con LPS: la concentrazione di tali cellule nel sito dell'infiammazione risultava, infatti, significativamente incrementata (Pinto

et al., 2003). Questo dato, apparentemente contraddittorio, potrebbe essere spiegato ipotizzando un effetto cooperativo nella chemiotassi: gli amebociti, bersagli diretti di C3a, potrebbero rilasciare, a loro volta, un mediatore in grado di attivare i granulociti univacuolari refrattili. Questa situazione ricorda quanto descritto da Daffern et al. (1995) riguardo l'attività di C3aR nei leucociti umani. Tra questi, infatti, gli eosinofili sono direttamente attivati da C3a, mentre i neutrofilo partecipano indirettamente all'attività chemiotattica in quanto stimolati dagli eosinofili attivati.

Presi nel loro insieme questi dati forniscono per la prima volta l'evidenza della presenza di un recettore funzionale di C3a in un invertebrato. L'identificazione in *C. intestinalis* di entrambe le molecole coinvolte nella risposta infiammatoria mediata dal sistema del complemento, rappresenta uno stimolo ad approfondire lo studio dell'interazione C3a-C3aR a livello sia molecolare che cellulare.

In questo contesto, un punto rilevante riguarda la possibilità di chiarire i meccanismi che regolano il "dialogo" tra i vari tipi di emociti durante la progressione del processo infiammatorio. Altri punti d'interesse attengono all'identificazione dei residui amminoacidici coinvolti nel riconoscimento ed interazione recettore-ligando, come anche allo studio della trasduzione del segnale ed internalizzazione. Tutte queste informazioni, in una specie collocata al confine tra vertebrati ed invertebrati (Delsuc et al., 2006), aiuterebbero sicuramente a chiarire l'evoluzione della reazione infiammatoria.

TABELLE

TABELLA 1: Tamponi impiegati nelle corse elettroforetiche per i gel di agarosio e nelle tecniche di Souther e Northern blot

TAE 10x (1 lt)

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

TBE 10x (1 lt)

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

TE

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-HCl pH 8.0 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

SSC 20x (1 lt)

| | |
|---------------|---------|
| NaCl | 175.3 g |
| sodio citrato | 88.2 g |

OLB

| | |
|--------------------------|--------------|
| Tris-HCl 2 M | 250 μ l |
| MgCl ₂ 1 M | 50 μ l |
| β -mercaptoetanolo | 7.2 μ l |
| dGTP 0.1 M | 2 μ l |
| dTTP 0.1 M | 2 μ l |
| HEPES 2 M pH 6.6 | 1028 μ l |
| H ₂ O | 250 μ l |

MOPS 10x (1 lt)

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

TABELLA 2: Tamponi impiegati nelle tecniche di Western blot ed immunocitochimica

“Resolving gel” (7.5%)

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

“Stacking gel” (4%)

| | |
|------------------------|--------|
| 30% Acrilammide/Bis | 3.3 ml |
| Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 | 6.5 ml |
| H ₂ O MQ | 15 ml |
| TEMED | 25 µl |
| Ammonio persolfato 10% | 125 µl |

“Running buffer” 5x (1 lt)

| | |
|---------|------|
| Tris | 15 g |
| Glicina | 72 g |
| SDS | 5 g |

“Blotting buffer” 1x (1 lt)

| | |
|----------|--------|
| Tris | 3.03 g |
| Glicina | 14.4 g |
| Metanolo | 20 % |

PBS 10x (1 lt)

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351-1362.

Boshra H., Wang T., Hove-Madsen L., Hansen J., Li J., Matlapudi A., Secombes C. J., Tort L., Sunyer J. O. 2005. Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and *Xenopus*: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species. *J. Immunol.* **175**, 2427-2437.

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

Chao T. H., Ember J. A., Wang M., Bayon Y., Hugli T. E., Ye R.D. 1999. Role of the second extracellular loop of human C3a receptor in agonist binding and receptor function. *J. Biol. Chem.* **274**, 9721-9728.

Chazin W., Hugli T. E., Wright P. 1988. ^1H NMR studies of human C3a anaphylatoxin in solution: sequential resonance assignments, secondary structure, and global fold. *Biochemistry*. **27**, 9139-9148.

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

Daffern P. J., Pfeifer P. H., Ember J. A., Hugli T. E. 1995. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J. Exp. Med.* **181**, 2119-2127.

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

Dishaw L. J., Smith S. L., Bigger C. H. 2005. Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. *Immunogenetics*. **57**, 535-548.

Dodds A. W., Alex Law S.K. 1998. The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and α 2-macroglobulin. *Immunol. Rev.* **166**, 15-26.

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

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

- Ermak T. H. 1976. The hematogenic tissues of tunicates. In *Phylogeny of Thymus and Bone Marrow-Bursa Cells*. Eds. Wright R. K., Coope E. L. , Elsevier, Amsterdam. 45-55.
- Feinberg A. P., Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fujita T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Immunol. Rev.* **2**, 346-353.
- Fujita T., Matsushita M., Endo Y. 2004. The lectine-complement pathway- its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* **198**, 185-202.
- Fuke M. T. 1979. Studies of coelomic cells of some Japanese ascidians. *Bull. Mar. Biol. Stn Asamushi Tôhoku Univ.* **16**, 142-159.
- Fuke M. T. 1980. "Contact reaction" between xenogeneic or allogeneic celomic cells of solitary ascidians. *Biol. Bull.* **158**, 304-315.
- Fuke M. T. 1990. Self and nonself recognition in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. In *Defence molecules*. Ed. Marchalonis J., Reinisch C. Alan. R. Liss., New York. 107-117.
- Fukuoka Y., Ember J. A., Hugli T. E. 1998. Molecular cloning of two isoforms of the guinea pig C3a anaphylatoxin receptor: alternative splicing in the large extracellular loop. *J. Immunol.* **161**, 2977-2984.
- Gao J., Choe H., Bota D., Wright P. L., Gerard C., Gerard N.P. 2003. Sulfation of tyrosine 174 in the human C3a receptor is essential for binding of C3a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* **278**, 37902-37908.

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

Guindon S., Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**, 696-704.

Hartmann K., Henz B. M., Krüger-Krasagakes S., Köhl J., Burger R., Guhl S., Haase I., Lippert U., Zuberbier T. 1997. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood.* **89**, 2863-2870.

Hollmann T. J., Haviland D. L., Kildsgaard J., Watts K., Wetsel R. A. 1998. Cloning, expression, sequence determination, and chromosome localization of the mouse complement C3a anaphylatoxin receptor gene. *Mol. Immunol.* **35**, 137-148.

Hsu M. H., Ember J. A., Wang M., Prossnitz E. R., Hugli T. E., Ye R. D. 1997. Cloning and functional characterization of the mouse C3a anaphylatoxin receptor gene. *Immunogenetics.* **47**, 64-72.

Hugli T. E. 1975. Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure. *J. Biol. Chem.* **250**, 8293-8301.

Hugli T. E. 1989. Chemotaxis. *Curr. Opin. Immunol.* **2**, 19-27.

Hugli T. E. 1990. Structure and function of C3a anaphylatoxin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **153**, 181-208.

Janeway C. A., Travers P., Walport M., Capra D. 1999. The complement system in humoral immunity. In *Immunobiology*. Ed. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Capra D. Garland Publishing. New York, NY, USA.

- Jensen J. A., Festa E., Smith D. S., Cayer M. 1981. The complement system of the nurse shark: hemolytic and comparative characteristics. *Science* **214**, 566-569.
- Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**, 275-282.
- Kennelly P. J., Krebs E. G. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555-15558.
- Kustin K., Levine D. S., McLeod G. C., Curby W. A. 1976. The blood of *Ascidia nigra*: blood cell frequency, distribution, morphology, and the distribution and valence of vanadium in living blood cells. *Biol. Bull.* **150**, 426-441.
- Lambris J. D. 1989. *The Third Component of Complement: Chemistry and Biology*. Springer Verlag. Berlin.
- Langkabel P., Zwirner J., Oppermann M. 1999. Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3035-3046.
- Litman G. W., Cannon J. P., Dishaw L.J. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 866-879.
- Marino R., Kimura Y., De Santis R., Lambris J. D., Pinto M. R. 2002. Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Immunogenetics.* **53**, 1055-1064.
- Mastellos D., Lambris J. D. 2002. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends Immunol.* **23**, 485-491.

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

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

Naik N., Giannini E., Brouchon L., Boulay F. 1997. Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J. Cell. Sci.* **110**, 2381-2390.

Nilsson G., Johnell M., Hammer C. H., Tiffany H. L., Nilsson K., Metcalfe D. D., Siegbahn A., Murphy P. M. 1996. C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J. Immunol.* **157**, 1693-1697.

Nonaka M., Fujii T., Kaidoh T., Natsuume-Sakai S., Yamaguchi N., Takahashi M. 1984. Purification of a lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system. *J. Immunol.* **133**, 3242-3249.

Nonaka M., Kimura A. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics.* **58**, 701-713.

Overton J. 1966. The fine structure of blood cells in the ascidian *Perophora viridis*. *J. Morph.* **119**, 305-326.

Pancer Z., Cooper M. D. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 497-518.

Parrinello N., Arizza V., Cammarata M., Parrinello D.M. 1993. Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the in vitro reaction against erythrocyte targets. *Dev. Comp. Immunol.* **17**, 19-27.

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

Parrinello N., Patricolo E. 1984. Inflammatory-like reaction in the tunic of *Ciona intestinalis* (Tunicata). II. Capsule components. *Biol. Bull.* **167**, 238-250.

Pinto M. R., Chinnici C. M., Kimura Y., Melillo D., Marino R., Spruce L. A., De Santis R., Parrinello N., Lambris J. D. C3b-mediated chemotaxis in the deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* (Urochordata). *J. Immunol.* **171**, 5521-5528.

Prodinger W.M., Würzner R., Erdei R., Dierich M. P. 1999. Complement. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul W. E. Lippincott-Raven. Philadelphia, PA, USA. 967-995.

Raftos D. A., Robbins J., Newton R. A., Nair S. V. 2003. A complement component C3a-like peptide stimulates chemotaxis by hemocytes from an invertebrate chordate-the tunicate, *Pyura stolonifera*. *Comp. Biochem. Physiol. Parte A.* **134**, 377-386.

Raftos D. A., Stillman D. L., Cooper E. L. 1998. Chemotactic responses of tunicate (Urochordata, Ascidiacea) hemocytes in vitro. *J. Invertebr. Pathol.* **72**, 44-49.

Raftos D. A., Tait N. N., Briscoe D. A. 1987. Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata*. *Dev Comp. Immunol.* **11**, 713-725.

Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., Rhodes, C. P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol* **97**, 183-350.

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

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

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

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

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

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

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

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

Sahu A., Soulika A. M., Morikis D., Spruce L., Moore W. T., Lambris J. D. 2000. Binding kinetics, structure-activity relationship, and biotransformation of the complement inhibitor compstatin. *J. Immunol.* **165**, 2491-2499.

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

Satou Y., Yamada L., Mochizuki Y., Takatori N., Kawashima T., Sasaki A., Hamaguchi M., Awazu S., Yagi K., Sasakura Y., et al. 2002. A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*. *Genesis* **33**, 153-154.

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

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

Strimmer K., von Haeseler A. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 964-969.

Sunyer J.O., Boshra H., Li J. 2005. Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: insights from the study of fish complement. *Vet. Immunol. Mmunopathol.* **108**, 77-89.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.

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

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

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

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

Wright R. K. 1981. Urochordates. In *Invertebrates Blood Cells*. Ed. Ratcliffe N. A., Rowley A. F. Academic Press. New York. **2**, 565-626.

Zhu Y., Thangamani S., Ho B., Ding J. L. 2005. The ancient origin of the complement system. *EMBO J.* **24**, 382-394.

Pubblicazioni:

Pinto M. R., Chinnici C. M., Kimura Y., **Melillo D.**, Marino R., Spruce L. A., De Santis R., Parrinello N., Lambris J. D. 2003. CiC3-1a-mediated chemotaxis in the deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* (Urochordata). *J. Immunol.* **171**, 5521-5528.

Melillo D., Sfyroera G., De Santis R., Graziano R., Marino R., Lambris J. D., Pinto M. R. 2006. First identification of a chemotactic receptor in an invertebrate species: structural and functional characterization of *Ciona intestinalis* C3a Receptor. *J. Immunol.* **177**, 4132-4140.

Pinto M. R., **Melillo D.**, Giacomelli S., Sfyroera G., Lambris J. D. 2007. Ancient origin of the complement system: emerging invertebrate models. In "Innate Immunity". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, series, John D. Lambris Ed., Springer New York (In corso di stampa).

Partecipazione a congressi:

Pinto M. R., Yoshizaki F., Kimura Y., Marino R., **Melillo D.**, De Santis R., Nonaka M., Lambris J. D. The ascidian *Ciona intestinalis* (Urochordata) as a model to study expression patterns of complement genes during embryo development. XIX International Complement Workshop, 22-26 Settembre, 2002. Palermo, Italia. *International Immunopharmacology*, 2:1294.

Pinto M. R., Chinnici C. M., Kimura Y., Marino R., **Melillo D.**, De Santis R., Parrinello N., Lambris J. D. Complement mediated chemotaxis in the deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis*. 9th International Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. 29 Giugno–4 Luglio, 2003. St. Andrews, Scozia. *Abstracts*, pag. 79.

Pinto M. R., Chinnici C. M., Kimura Y., **Melillo D.**, Marino R., Spruce L. A., De Santis R., Parrinello N., Lambris J. D. The ascidian *Ciona intestinalis* as experimental model for the study of the complement system inflammatory pathway in deuterostome invertebrates. VI Incontro della Società di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo. 12-13 Febbraio, 2004. Padova, Italia. *Invertebrate Survival Journal*, 1:54-55.

Melillo D., Sfyroera G., De Santis R., Graziano R., Marino R., Lambris J. D., Pinto M. R. The complement system in ascidians: featuring the molecular events of the inflammatory pathway. I Incontro degli Ascidiologi Italiani. Prospettive della ricerca sulle ascidie in Italia: un incontro informale. 3-4 Aprile, 2006. Napoli, Italia. *Abstracts*, pag. 15.

Pinto M. R., **Melillo D.**, Sfyroera G., De Santis R., Graziano R., Marino R., Lambris J. D. First identification of a chemotactic receptor in an invertebrate species: structural and functional characterization of *Ciona intestinalis* C3a receptor. 4th International Conference on Innate Immunity. 4-9 Giugno, 2006. Corfù, Grecia. *Abstracts*, pag. 41.