

Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

CICLO XXV

Settore disciplinare BIO/09

Sviluppo larvale e metamorfosi nell'ascidia *Ciona intestinalis*: ruolo del monossido di azoto

Dott.ssa Elena Ercolesi



TUTOR

Dott.ssa Anna Palumbo



COORDINATORE

Prof.ssa Maria Carmela Cerra



ANNO ACCADEMICO 2011/ 2012

ABSTRACT

Larval development and metamorphosis in the ascidian *Ciona intestinalis*: role of nitric oxide

Larval development and subsequent metamorphosis in the ascidian *Ciona intestinalis* represent a very complex process by which the non-feeding, swimming larva is transformed into a filter feeding, fixed juvenile through a profound reconstruction of the body plan and a remarkable regression of the tail. At the molecular level, many processes have been reported to occur during *ciona* metamorphosis, such as caspase-3-like and MAPK activation (Chambon et al., 2002, 2007) and nitric oxide (NO) production (Comes et al., 2007). In particular, it was shown that the spatial expression pattern of nitric oxide synthase (NOS) and NO detection is very dynamic during *ciona* development, moving rapidly along the body and involving central nervous system and different tail compartments. Moreover, NO regulates tail regression acting on caspase-3-dependent apoptosis.

In this thesis, the role of NO during larval development and metamorphosis in *ciona* was deeply investigated, providing new insights into the molecular targets of NO action in relation to development and stress response.

A series of experiments examining the course and rate of metamorphosis under different NO levels have revealed that NO endogenous synthesized in *ciona* larva contributes to the phosphorylation of the MAPK ERK, a key event required for metamorphosis to start and proceed. In particular, a decrease of endogenous NO levels by treating hatched larvae with a NOS inhibitor or a NO scavenger resulted in a delay of metamorphosis with a concomitant reduction of ERK phosphorylation. On the contrary, an increase of NO by the use of a NO donor, accelerated the process and was

accompanied by an increase of ERK activation. On this basis, a possible mechanism accounting for ERK phosphorylation by NO was postulated which involved ERK nitration, as suggested by parallel experiments of immunoprecipitation in which the levels of ERK phosphorylation were found to be correlated to ERK nitration.

Another important finding of this thesis is the demonstration that NO also mediated an alternate signaling pathway in *ciona* metamorphosis, based on the formation of nitrated proteins. The nitrating agent peroxynitrite increased the rate of metamorphosis, whereas scavengers of NO-derived nitrating agents caused an opposite effect. A remarkable increased protein nitration was detected at larva stage compared to embryonic phase and both ERK and P-ERK were found to be nitrated by immunochemical methodologies. The finding that increased levels of nitrated proteins occurred under “normal” physiological conditions associated with developmental processes would reinforce the emerging notion of protein nitration as a signaling mechanism *sui generis* mediated by oxidative stress-like conditions and possibly acting both directly and indirectly on other signaling pathways, e.g. via modulation of phosphorylation.

Further experiments were performed to investigate the stress response in *ciona* larvae induced by the diatom produced aldehyde decadienal (DD). This aldehyde delayed *ciona* metamorphosis and the effect was dependent on aldehyde concentration and the larva stage at which the incubation was performed. Interestingly, DD treatment resulted in a reduction of ERK phosphorylation similarly to what observed when endogenous NO levels are lowered. Further studies will be necessary to delineate the mechanism by which DD affected metamorphosis and the involvement of NO in the process.

RIASSUNTO

Sviluppo larvale e metamorfosi nell'ascidia *Ciona intestinalis*: ruolo del monossido di azoto

Lo sviluppo larvale e la metamorfosi dell'ascidia *Ciona intestinalis* rappresentano un processo molto complesso mediante il quale la larva natante si trasforma in un individuo giovane sessile attraverso una profonda ricostruzione del piano corporeo e la regressione della coda. A livello molecolare, avvengono alcuni processi quali l'attivazione della caspasi-3-simile e della MAPK (Chambon et al., 2002, 2007) e la produzione di monossido di azoto (NO) (Comes et al., 2007). In particolare, è stato dimostrato che l'espressione spaziale di ossido nitrico sintasi (NOS) e di NO è molto dinamica durante lo sviluppo di *ciona*. Il segnale si sposta rapidamente lungo tutta la larva coinvolgendo il sistema nervoso centrale e la coda nei suoi diversi compartimenti. Inoltre, l'NO regola la regressione della coda, agendo sulla apoptosi mediata da caspasi-3-simile.

Il progetto di tesi é stato focalizzato ad uno studio approfondito del ruolo dell'NO durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *C. intestinalis*, fornendo nuovi elementi sui bersagli molecolari dell'NO in relazione allo sviluppo ed alla risposta allo stress. Una serie di esperimenti, volti ad esaminare l'andamento e la velocità di metamorfosi in diverse condizioni dei livelli di NO, hanno rivelato che l'NO prodotto nelle larve di *ciona* contribuisce alla fosforilazione della MAP chinasi ERK, un evento chiave e necessario affinché la metamorfosi avvenga. In particolare, diminuendo i livelli endogeni di NO, trattando le larve alla schiusa con un inibitore della NOS o un agente che lega l'NO, si ottiene un rallentamento della metamorfosi ed una concomitante riduzione della fosforilazione di ERK. Al contrario, un aumento di NO mediante l'uso di un donatore di NO, determina una accelerazione del processo accompagnata da un

aumento di attivazione di ERK. Su questa base, è stato ipotizzato un possibile meccanismo per spiegare la fosforilazione di ERK indotta da NO, basato sulla nitratura di ERK, come suggerito da esperimenti paralleli di immunoprecipitazione, che hanno mostrato la correlazione tra il livello di fosforilazione di ERK e la sua nitratura.

Un altro dato importante emerso da questa tesi è la dimostrazione che l'NO media anche una altra via di trasduzione durante la metamorfosi di *ciona* che comporta la nitratura delle proteine. Il trattamento con l'agente nitrante, il perossinitrito, determina una accelerazione della metamorfosi, mentre agenti che legano l'NO provocano un effetto opposto. Un notevole aumento di nitratura è stato rivelato allo stadio larvale rispetto a quello embrionale ed inoltre ERK e P-ERK sono risultate essere ntrate mediante metodologie immunochimiche. La scoperta di elevati livelli di proteine ntrate durante un processo fisiologico, quale lo sviluppo, riveste particolare importanza alla luce di dati sempre più numerosi in letteratura sulla nitratura delle proteine quale una nuova via di trasduzione capace di agire direttamente o indirettamente su altre vie.

Ulteriori esperimenti sono stati condotti per indagare la risposta allo stress in larve di *ciona* indotto dalla aldeide prodotta dalle diatomee, la decadienale (DD). Larve trattate con questa aldeide mostrano un ritardo della metamorfosi dipendente dalla concentrazione dell'aldeide e dallo stadio larvale al quale si fa l'incubazione. È interessante notare che il trattamento con DD determina una riduzione della fosforilazione di ERK analogamente a quanto osservato quando i livelli endogeni di NO vengono diminuiti. Ulteriori studi saranno necessari per delineare il meccanismo con il quale DD influenzi la metamorfosi ed il coinvolgimento dell'NO.

INDICE

| | |
|--|----------------|
| INTRODUZIONE | <i>Pag. 8</i> |
| Monossido di azoto: biosintesi, vie di trasduzione e ruolo biologico | 8 |
| Sistema modello: <i>Ciona intestinalis</i> | 17 |
| Scopo della tesi | 24 |
| | |
| MATERIALI E METODI | <i>Pag. 26</i> |
| Animali | 26 |
| Esperimenti di incubazione | 28 |
| Effetto della 2-trans-4-trans-decadienale (DD) sulla metamorfosi | 29 |
| Estrazione delle proteine | 30 |
| Elettroforesi su gel di poliacrilamide | 30 |
| Immunoprecipitazione | 32 |
| | |
| RISULTATI | <i>Pag. 33</i> |
| Modulazione dei livelli di NO: effetto sulla velocità di metamorfosi | 33 |
| Modulazione dei livelli di NO: effetto sulla fosforilazione della | 40 |
| MAPK ERK | |
| Modulazione dei livelli di RNS: effetto sulla velocità di metamorfosi | 46 |
| e sulla fosforilazione della MAPK ERK | |
| Analisi delle proteine nitrate durante lo sviluppo: identificazione di | 51 |
| ERK e P-ERK nitrati | |
| Effetto della 2-trans-4-trans-decadienale (DD) sullo sviluppo: stadi | 55 |

larvali e metamorfosi

Effetto della DD sullo sviluppo: fosforilazione della MAPK ERK 61

Effetto della DD sullo sviluppo: espressione di hsp-70 63

DISCUSSIONE *Pag. 65*

BIBLIOGRAFIA *Pag. 72*

INTRODUZIONE

Monossido di azoto: biosintesi, vie di trasduzione e ruolo biologico

Il monossido di azoto (NO), impropriamente chiamato ossido nitrico, è un semplice gas diatomico che per la presenza di un elettrone spaiato risulta estremamente reattivo e capace di interagire con vari componenti cellulari, quali il DNA, le proteine e i lipidi, modificandone la loro struttura e funzione. Ad esempio l'NO può modificare il DNA sia direttamente, alterando chimicamente le basi azotate (deaminazione) e rompendo la doppia elica mediante l'attacco di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), e sia indirettamente, inibendo i processi di riparo in seguito alla modifica degli enzimi coinvolti (DNA ligasi e metiltransferasi) (Graziewicz et al.,1996; Phoa and Epe, 2002). All'inizio considerato un semplice inquinante atmosferico, l'NO si è rivelato essere uno dei più potenti mediatori biochimici degli organismi viventi, come attestato dal fatto che nel 1992 è stato denominato "Molecola dell'anno" dalla rivista Science. Inoltre, nel 1998 gli scienziati Robert F Furchgott, Louis J Ignaro e Ferid Murad sono stati insigniti del premio Nobel per i loro studi che hanno portato alla scoperta dell'NO come molecola segnale nel sistema cardiovascolare. L'NO mostra un ampio spettro di effetti durante i processi fisiologici e patologici. Ad esempio, l'NO è coinvolto nella regolazione del tono vascolare, nella protezione delle cellule contro l'apoptosi, nella modulazione della risposta immunitaria e nell'azione contro i patogeni microbici. D'altra parte, l'NO può causare una severa vasodilatazione e una depressione miocardica durante la sepsi o agire come molecola citotossica nelle malattie autoimmuni. In ogni caso, il suo ruolo è dipendente da diversi fattori, come riportato in Choi et al. del 2002, in cui l'NO è descritto avere un'azione pro-apoptotica in alcune

cellule e anti-apoptotica in altre. Questa complessità è una conseguenza dei livelli cellulari dell'NO e della sua interazione con varie molecole biologiche, come gli ioni metallici, i ROS e le proteine, a livello dei residui tiolici e delle tirosine.

L'NO è prodotto dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS), il quale catalizza due reazioni di monossigenazione per convertire una molecola di ossigeno e L-arginina nell'intermedio L-idrossi-arginina che poi successivamente forma citrullina e NO (Figura 1). Le due reazioni di ossigenazione richiedono il NADPH come cofattore e molti co-substrati come il FAD, il FMN, la tetraidrobiopterina, l'eme e la calmodulina.

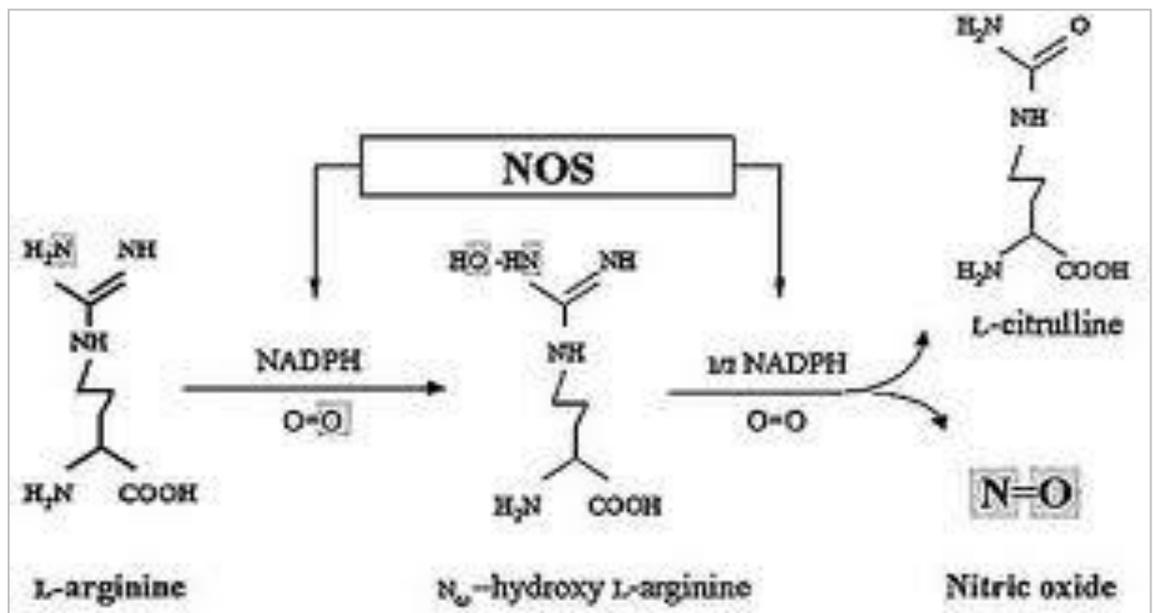


Figura 1. Sintesi dell'NO mediante le due reazioni di monossigenazione catalizzate dalla NOS

Nei mammiferi sono state descritte tre NOS come prodotto di tre geni distinti: la NOS neuronale costitutiva (nNOS, NOS 1, NOS I), la NOS endoteliale costitutiva (eNOS, NOS 3, NOS III) e la NOS macrofagica inducibile (iNOS, NOS 2, NOS II). Le NOS costitutive neuronale ed endoteliale sono regolate dai livelli citoplasmatici di calcio/calmodulina ed i loro trascritti sono costitutivamente espressi nel citoplasma. Differisce molto la regolazione dell'isoforma macrofagica in quanto è trascritta solo in seguito ad un'induzione, ad esempio da parte delle citochine, e la sua attività enzimatica è indipendente dai livelli di calcio intracellulare essendo il complesso calcio/calmodulina costitutivamente legato. Inizialmente, le tre NOS erano indicate come NOS neuronale, endoteliale e macrofagica sulla base dei tessuti dai quali sono state inizialmente isolate. Successivamente questa nomenclatura si è rivelata insufficiente in quanto è stato scoperto che ciascuna NOS è presente in più di un tipo cellulare o tessuto. Inoltre, anche la distinzione tra NOS costitutiva e NOS inducibile sulla base degli aspetti fisiologici può non essere corretta. Infatti, la NOS inducibile può diventare costitutiva in alcune cellule e la NOS costitutiva può essere inducibile sotto l'azione di alcuni stimoli. Su questa base, si preferisce denominare le tre NOS come NOS I, NOS II e NOS III secondo la cronologia della loro identificazione (Andreakis et al., 2011). Ciascuna NOS è formata da un dominio reduttasico e da un dominio ossigenasico uniti da un sito di legame per la calmodulina (Figura 2A). Nei due domini sono presenti i siti di legame per i vari cofattori, eme, BH₄, FMN, FAD e NADPH, comuni alle NOS di tutti i metazoi dai placozoi ai mammiferi. Oltre che per la sequenza aminoacidica, le tre NOS si differenziano per alcune caratteristiche di ciascuna forma, relative alla funzione o alla localizzazione cellulare/subcellulare (Figura 2B). In particolare, la NOS I ha un dominio N-terminale di tipo PDZ necessario per la localizzazione della proteina nelle sinapsi e nel muscolo scheletrico. La NOS III

possiede dei siti di palmitoilazione e miristilazione a livello di specifici residui che permettono la localizzazione nelle caveole delle cellule endoteliali. La NOS II manca di una sequenza, denominata loop inibitorio e situata nel dominio FMN, che permette a questa forma di avere una attività indipendente dal calcio. Questa sequenza è invece presente nelle forme costitutive NOS I e NOS III.

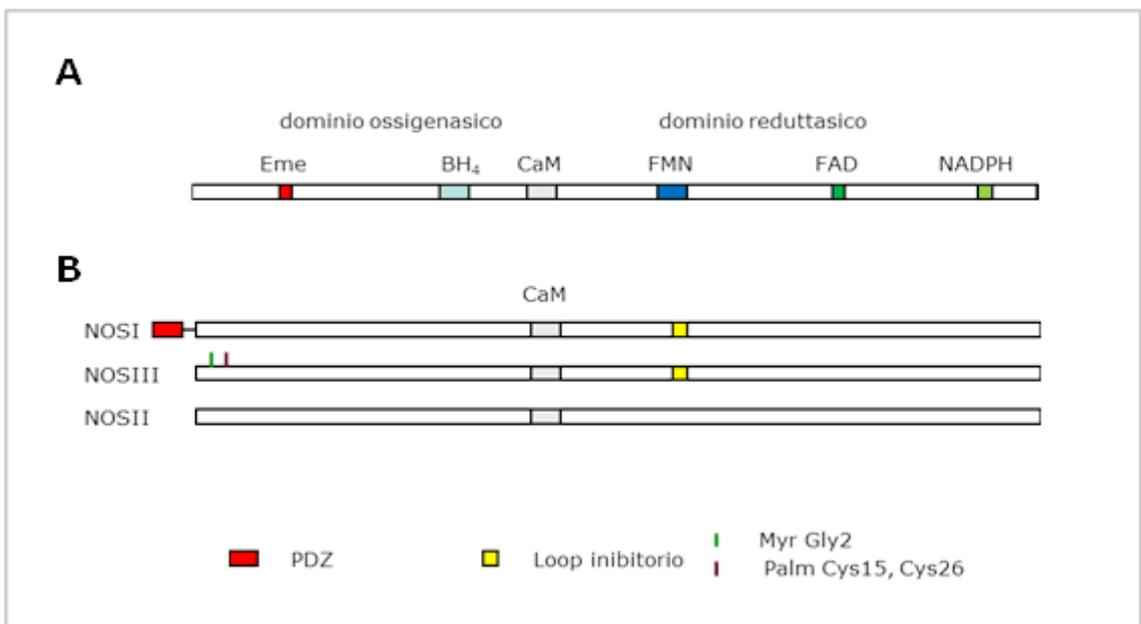


Figura 2. Rappresentazione schematica dei domini dell'enzima NOS (A) e dei tre enzimi NOS (B)

Riguardo alla reazione dell'NO con i metalli di transizione presenti nelle molecole biologiche, un esempio molto studiato è la reazione con il ferro emico presente al sito attivo della guanilato ciclasi (Figura 3). L'NO può reagire con varie molecole biologiche: i metalli di transizione, i residui tiolici e di tirosina delle proteine.

Un esempio molto studiato di reazione dell'NO con i metalli di transizione è quella con il ferro emico presente al sito attivo della guanilato ciclasi (Figura 3). Questa reazione determina la rottura del legame tra lo ione ferroso dell'eme e l'istidina 105 causando una variazione conformazionale con conseguente attivazione dell'enzima e sintesi della guanosina monofosfato ciclico (cGMP), un importante secondo messaggero per neurotrasmettitori ed ormoni.

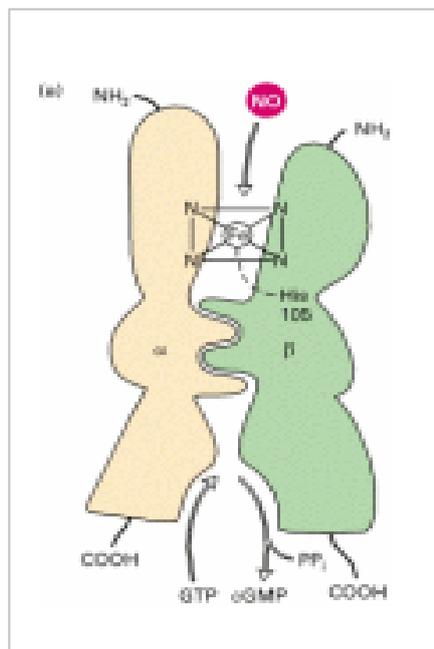


Figura 3. Attivazione dell'enzima Guanilato Ciclasi in seguito alla variazione conformazionale indotta dall'NO

Questa via di trasduzione dell'NO denominata dipendente dal cGMP è stata riportata essere operativa alle basse concentrazioni di NO (Figura 4).

Le molecole target del cGMP possono essere le chinasi, le fosfodiesterasi ed i canali ionici. Le serin/treonin chinasi dipendenti dal cGMP (PKG) sono particolarmente coinvolte nel mediare il rilassamento muscolare. Numerosi farmaci sono stati creati dalle aziende farmaceutiche per trarre vantaggio da questo effetto. Ad esempio la nitroglicerina agisce mediante liberazione, a livello della muscolatura liscia, di NO che induce la produzione di cGMP. Mediante l'azione di PKG su alcune proteine chiave si ha la riduzione del calcio intracellulare ed il mio-rilassamento con conseguente attività vasodilatante. Ed è sulla base di queste proprietà che la nitroglicerina è utilizzata nella profilassi e nella terapia dell'angina pectoris. Per quanto riguarda le fosfodiesterasi dipendenti dal cGMP (PDE), esse catalizzano la conversione del cGMP in 5'GMP. Esistono cinque famiglie di fosfodiesterasi ed in particolare la fosfodiesterasi cGMP-specifica di tipo 5 (PDE-5), presente nei corpi cavernosi dell'uomo, rappresenta il bersaglio dell'azione del noto farmaco, il Viagra. Questo farmaco, infatti, inibisce selettivamente PDE-5, potenziando così l'effetto dell'NO endogeno, rilasciato in seguito alla stimolazione sessuale. Quando l'NO viene liberato, l'inibizione del PDE-5 determina un accumulo dei livelli di cGMP causando un rilassamento della muscolatura liscia e un afflusso di sangue, con conseguente erezione. Infine, i canali ionici sono un ulteriore effettore del cGMP. Particolarmente interessanti sono i canali ionici coinvolti nella trasduzione del segnale nella retina dove l'NO svolge importanti funzioni tra le quali quella di mediare l'adattamento a luce/buio delle cellule.

Accanto alla trasduzione dell'NO mediata dal cGMP esiste anche una via cGMP indipendente operativa ad alte concentrazioni di NO (Figura 4). L'NO reagisce con l'ossigeno o con specie derivanti da esso, i ROS, dando luogo a RNS. Gli RNS

reagiscono con i residui tiolici o di tirosina delle proteine modificando così la loro funzione.

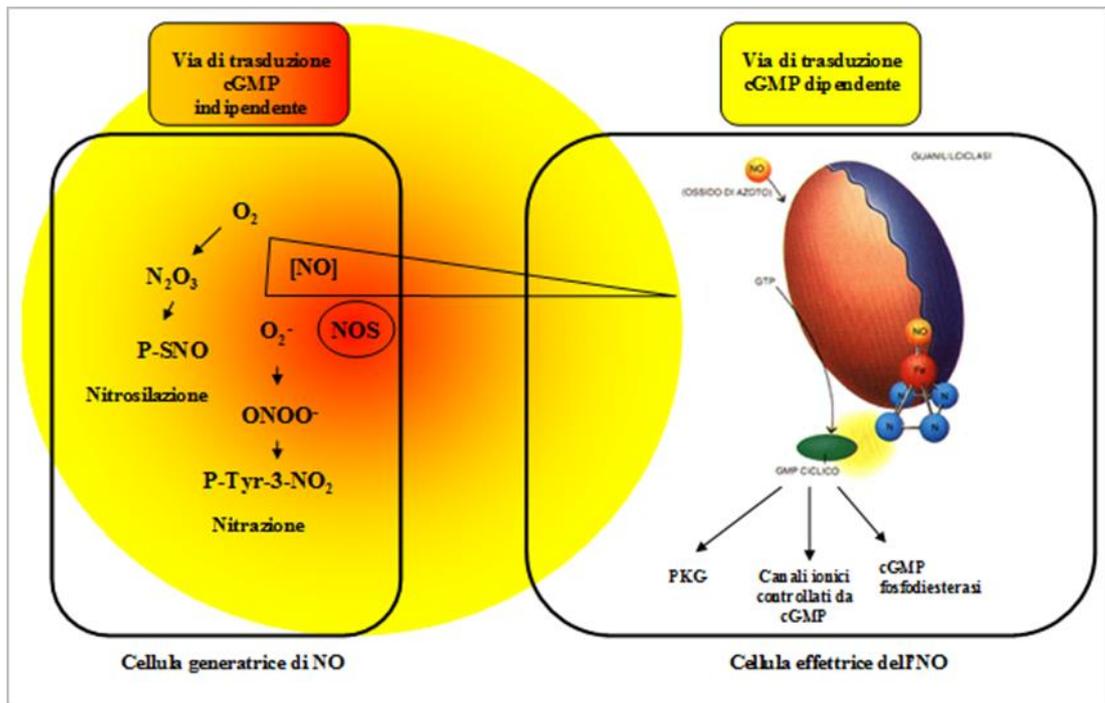
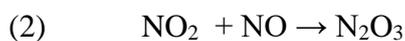


Figura 4. Trasduzione del segnale dell'NO (immagine modificata da Martinez-Ruiz and Lamas, 2008)

La reazione dell'NO con i gruppi tiolici è conosciuta come S-nitrosilazione. Il processo di innesco della S-nitrosilazione è la formazione del biossido di azoto (NO_2) in seguito all'interazione dell'NO con l'ossigeno (reazione 1). Questa reazione è strettamente correlata alla concentrazione di NO: naturalmente una alta concentrazione di NO facilita la formazione di NO_2 e quindi le probabilità di nitrosilazione. Il vero e proprio responsabile della nitrosilazione è lo ione nitrosonio (NO^+) capace di attaccare i

composti elettrofili come i fenoli, le ammine secondarie ed i gruppi tiolici. Questo ione deriva dalla decomposizione del triossido di azoto N_2O_3 formatosi dall'interazione del biossido di azoto con un'altra molecola di NO (reazione 2).



Mediante un approccio proteomico, vari tipi di proteine sono state riportate essere nitrosilate in cervelli di topo, quali enzimi metabolici, canali ionici, proteine segnale, proteine strutturali e fattori di trascrizione (Jaffrey et al., 2001). La nitrosilazione può modificare l'attività enzimatica. Per esempio, nel caso della caspasi 3, la nitrosilazione del residuo di cisteina al sito attivo determina la sua inattivazione. In presenza degli inibitori della NOS, ad esempio N-Nitro-L-arginina metil estere (L-NAME), la caspasi 3 non è più nitrosilata, e di conseguenza l'apoptosi viene innescata. Sembrerebbe che l'induzione dell'apoptosi richieda sia la denitrosilazione della cisteina del sito attivo e sia il clivaggio della pro-caspasi 3 a caspasi 3 (Hanafy et al., 2001).

Un'altra modifica post-traduzionale è la nitratura dei residui di tirosina, dipendente non solo dall'elevata concentrazione di NO ma anche dall'ambiente cellulare. Il vero effettore di questa modifica è il perossinitrito (ONOO^-) che si forma in seguito alla reazione dell'NO con lo ione superossido (O_2^-). In particolare, è il perossinitrito in forma trans che è responsabile, mediante il radicale ossidrilico (OH^\cdot) e NO_2 , della nitratura dei residui di tirosina delle proteine. I livelli dell'NO devono essere nell'ordine del micromolare per poter competere con l'attività riducente della superossido dismutasi (SOD). Questo enzima catalizza la riduzione del radicale superossido a perossido di idrogeno che viene poi ridotto ad acqua dall'enzima catalasi. Inizialmente la nitratura delle proteine era considerata essenzialmente un segnale di danno ossidativo associato a condizioni patologiche (Ischiropoulos, 1998). Negli ultimi

anni, però, una serie di lavori hanno mostrato che questa reazione rappresenta una nuova via di trasduzione che avviene in condizioni fisiologiche ed è in grado di modulare vari processi, quali l'attività delle proteine, il differenziamento cellulare e lo sviluppo embrionale. In particolare, la nitratura può diminuire l'attività di alcune proteine, quali NOS (Huhmer et al., 1996; Huhmer et al., 1997), SOD mitocondriale (Mallery et al., 2004), p53 (Cobbs et al., 2003), tirosina idrossilasi (Kuhn et al., 2002) ed istone deacetilasi 2 (Barnes et al., 2004), Akt (Csibi et al., 2010) ed aumentare l'attività di altre come la ciclossigenasi (Salvemini et al., 1997), ed il recettore glucocorticoide (Paul-Clark et al., 2003). Inoltre, è stato ipotizzato che la nitratura di specifici residui di tirosina della eNOS alteri l'interazione della proteina con HSP90, interazione che è necessaria per una efficiente generazione di NO (Zickus et al., 2008). La nitratura può anche causare un cambio conformazionale della proteina come nel caso descritto della glutammina sintetasi, la cui nitratura mima l'adenilazione che l'attiva (Berlett et al., 1996). Inoltre, la nitratura aumenta la suscettibilità delle proteine alla degradazione mediante il proteasoma (Souza et al., 2000). Per quanto riguarda i processi cellulari nei quali è coinvolta la nitratura delle proteine, di notevole interesse è il differenziamento cellulare ed in particolare quello neuronale. Infatti, specifiche proteine del citoscheletro come l'alfa tubulina e la proteina tau vengono ntrate nel corso del differenziamento delle cellule PC12 indotto da NGF (Cappelletti et al., 2003; Cappelletti et al., 2004; Tedeschi et al., 2005). Inoltre, l'actina e l'alfa tubulina sono state riportate essere differenzialmente ntrate durante lo sviluppo a livello della membrana corioallantoidea del pollo (Giannopoulou et al., 2002).

Per quanto riguarda il ruolo biologico svolto dall'NO, vorrei focalizzare l'attenzione agli organismi marini dove è stato riportato essere coinvolto in molti processi, quali il nuoto, l'apprendimento, la locomozione, la difesa, la simbiosi, la fecondazione, la metamorfosi e la risposta ai fattori di stress ambientale (Palumbo, 2005). L'NO è

coinvolto nella regolazione della neurogenesi e della morfogenesi della via olfattiva nell'astice *Homarus americanus* (Benton et al., 2007). Durante lo sviluppo larvale degli echinodermi, *Paracentrotus lividus* e *Arbacia lixula*, l'NO è implicato nella regolazione delle interazioni intercellulari che sono alla base dei processi morfogenetici dei plutei (Semenova and Ozernyuk, 2004). In un'altra specie di echinoderma, *Arbacia punctulata*, l'NO è responsabile della modulazione dello sviluppo larvale. L'NO è coinvolto nella metamorfosi del riccio di mare *Litechinus pictus* (Bishop and Brandhorst, 2001) e di varie ascidie, quali la *Boltenia villosa*, la *Cnemidocarpa finmarkiensis* e la *Ciona intestinalis* (Bishop et al., 2001; Comes et al., 2007). Durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati l'NO è coinvolto nella somitogenesi e nella formazione delle vescicole ottiche nel pesce *Oryzias latipes* (Yamamoto et al., 2003) e nella mobilità intestinale durante lo sviluppo larvale del pesce *Danio rerio* (Holmberg et al., 2006)

Molto importante è la funzione dell'NO in risposta a diversi tipi di stress. Ad esempio l'NO è coinvolto nella risposta allo stress termico e all'ipossia come dimostrato dal significativo aumento dell'attività NOS nelle cellule neuronali dei molluschi *Grenomytilus grayanus*, *Peronidia venulosa*, *Mizuchopecten yessoensis* (Kotsyuba et al., 2008). L'NO è anche coinvolto nella risposta allo stress chimico. Infatti, un notevole incremento di NO è stato dimostrato in uova fecondate di riccio di mare *Paracentrotus lividus* trattati con l'aldeide tossica la 2-trans-4-trans-decadienale, prodotta dall'alga unicellulare *Skeletonema marinoi* (Romano et al., 2011). Anche la nitrificazione è coinvolta in risposta allo stress come dimostrato dall'incremento dei livelli di 3-nitrotirosina dei mitocondri estratti dal fegato del pesce *Mugil cephalus* provenienti da acque inquinate da alte concentrazioni di metalli pesanti, rispetto ad animali controllo che vivono in acque non contaminate e lontano da fonti industriali (Padrini et al., 2009).

Sistema modello: *Ciona intestinalis*

L'ascidia *Ciona intestinalis* è una delle specie cosmopolite di ascidia maggiormente utilizzata da diversi ricercatori. La *C. intestinalis* ha un piccolo genoma di circa 160 Mbp, un genoma aploide contenente approssimativamente 15500 geni di cui 117 Mbp sono regioni eucromatiche con 15852 geni codificanti per proteine. La grandezza del genoma ed il numero di geni è comparabile a quello di *Drosophila melanogaster*. Inoltre, la disponibilità di una serie di strumenti molecolari, quali il genoma sequenziato, la caratterizzazione di marcatori di diversi tessuti e organi, unitamente alla peculiare posizione nell'albero genealogico alla base dei cordati, hanno reso la *C. intestinalis* un ottimo organismo modello per gli studi sullo sviluppo. La *ciona* presenta un ciclo vitale bifasico caratterizzato da una larva planctonica ed un adulto bentonico (Figura 5). Si assiste ad una prima fase embrionale che porta, dopo circa 18 ore dalla fecondazione, allo sviluppo di una larva che schiude dal corion e diventa larva natante. In questa fase possiamo distinguere differenti stadi di sviluppo. La fase di larva precoce, fino a 2 ore dalla schiusa, (figura 5a) è caratterizzata da un testa triangolare o tonda ed un movimento sinusoidale che serve alla larva per allontanare il corion. La fase di larva intermedia, 2-4 ore dalla schiusa, (figura 5b) presenta una testa allungata e l'abbozzo del lobo preorale e dei palpi. Dopo 6 ore dalla schiusa si ha la larva tardiva (figura 5c) che è morfologicamente completa per la presenza del lobo preorale molto accentuato e la completa formazione dei palpi con cui si andrà ad attaccare sul substrato per metamorfosare in un adulto sessile. Più correttamente la larva tardiva è competente ad andare in metamorfosi in quanto è capace di sentire gli stimoli esterni, come la differenza tra luce / buio, la presenza di ioni e fattori ormonali.

La metamorfosi di *C. intestinalis* è un evento molto complesso a cui prendono parte 10 eventi morfologici dettagliatamente descritti da Cloney, 1982 (Cloney, 1982): 1- secrezione dalle papille; 2- ritrazione delle papille; 3- ritrazione della coda; 4- perdita

della cuticola esterna che ricopre la tunica larvale; 5- migrazione delle cellule del sangue o delle cellule pigmentate; 6- rotazione dell'asse corporeo di 90°, espansione del sacco branchiale ed elongazione dell'oozoide dell'individuo giovane; 7- espansione ed elongazione dell'ampulla, riorientamento della vescicola sensoria ed espansione della tunica; 8- ritrazione della vescicola sensoria; 9- fagocitosi del ganglio viscerale, degli organi sensori e delle cellule del complesso assiale; 10- disgregazione dei rudimenti degli organi. L'ordine con cui si susseguono questi eventi è strettamente stabilito come dimostrato dallo studio dei mutanti di Nakayama-Ishimura et al. del 2009. Da tale studio è stato dimostrato che mutanti generati con il taglio delle papille e quindi non capaci di attaccarsi al substrato, non erano in grado di andare in metamorfosi. Al microscopio la metamorfosi è facilmente seguibile osservando la ritrazione della coda (Figura 5d) e dopo 24 ore dalla schiusa si osserva la formazione di un individuo giovane (Figura 5e).

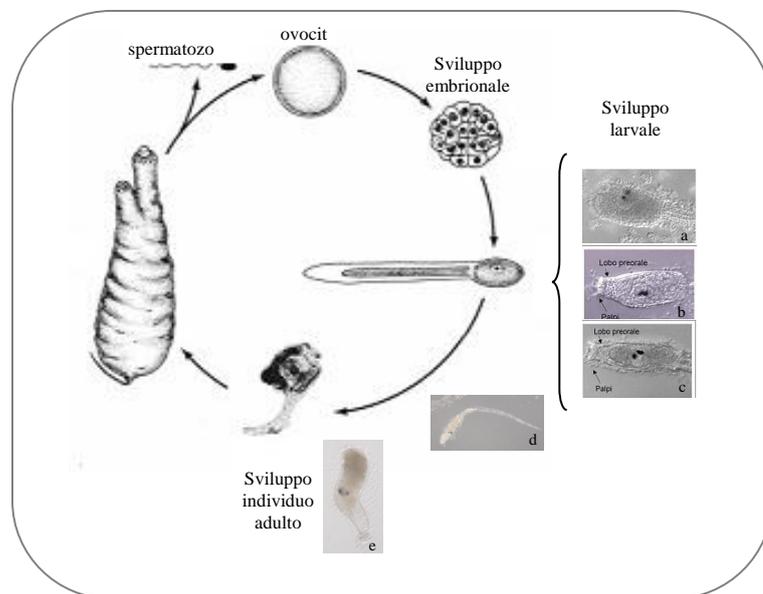


Figura 5. Ciclo vitale dell'ascidia *Ciona intestinalis*. Rappresentazione del ciclo vitale bifasico caratterizzato da una larva planctonica ed un adulto bentonico. Larva precoce (a), larva media (b), larva tardiva e competente ad andare in metamorfosi dopo 8 ore dalla schiusa (c), larva durante la metamorfosi dopo 15 ore dalla schiusa dove si può

vedere la ritrazione della coda (d), individuo giovane formatosi dalla metamorfosi dopo circa 24 ore dalla schiusa (e).

Dal punto di vista molecolare sono stati individuati sinora 3 processi che intervengono nella metamorfosi di *ciona*: l'apoptosi, l'attivazione delle MAP kinasi ERK e JNK e la produzione di NO.

Mediante colorazione dei nuclei apoptotici con il TUNEL è stata evidenziata durante la regressione della coda un'onda apoptotica che parte dalla punta e si propaga per tutta la coda sino alla base, promuovendo l'apoptosi, mediata dalla caspasi 3, delle cellule epidermiche, muscolari e della notocorda (Chambon et al., 2002) (Figura 6).

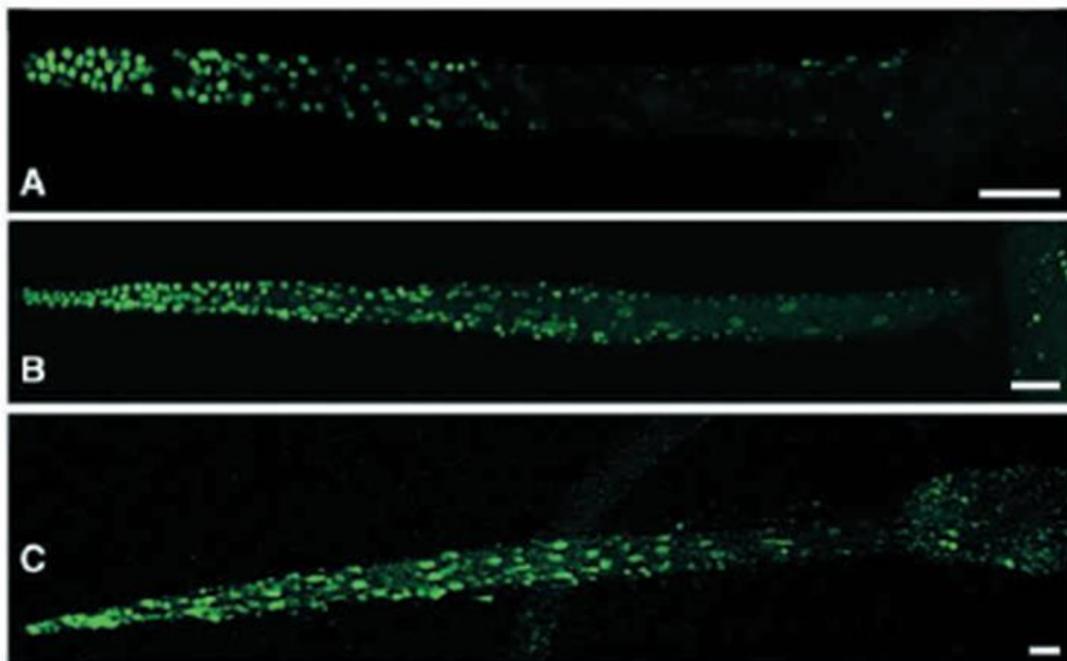


Figura 6. Rivelazione del processo apoptotico in larve di *ciona* a tempi diversi della regressione della coda. I nuclei apoptotici sono rivelati mediante TUNEL ed appaiono in verde. Immagine da Chambon et al., 2002.

Affinché avvengano l'onda apoptotica e la metamorfosi in *ciona* è necessaria l'attivazione delle MAP kinasi ERK e JNK. ERK risulta fosforilata negli stadi iniziali dello sviluppo larvale (2 ore dalla schiusa), a livello delle papille, e successivamente (10 ore dalla schiusa) nelle cellule della coda prima dell'onda apoptotica. L'attivazione di JNK avviene, invece, nel sistema nervoso centrale delle larve competenti, a livello della vescicola sensoria, collo, ganglio viscerale e lungo il nervo della corda. È stato proposto un modello di metamorfosi nel quale un sistema neurale che parte dalle papille trasmette il segnale alla coda attraverso la vescicola sensoria ed il ganglio viscerale (Chambon et al., 2007). Allo scopo di comprendere la sequenza degli eventi legati all'apoptosi e all'attivazione di ERK, larve a 10 ore dalla schiusa sono state sottoposte ad esperimenti di doppia localizzazione per ERK fosforilato e per l'apoptosi con il TUNEL (Chambon et al., 2002). La figura 7 mostra che la maggior parte dei nuclei apoptotici sono negativi per ERK attivato, suggerendo che presumibilmente l'attivazione di ERK preceda l'apoptosi durante la regressione della coda. Pochi nuclei sono positivi per entrambi i processi.

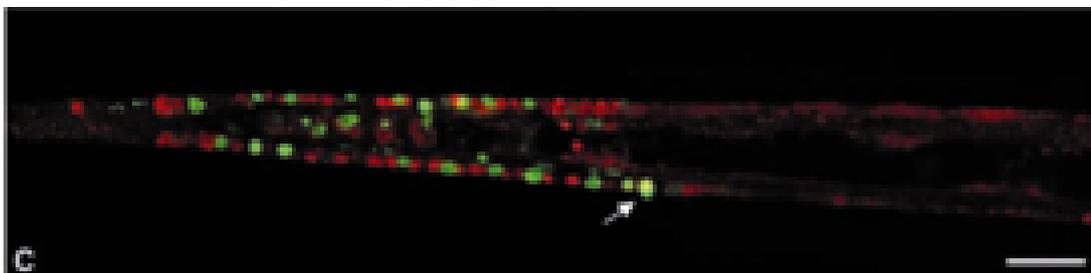


Figura 7. Localizzazione dell'attivazione di ERK e dell'apoptosi. Doppia colorazione, in rosso per le cellule immunopositive a P-ERK ed in verde per le cellule apoptotiche rivelate con il TUNEL. Immagine da Chambon et al., 2002.

Per quanto riguarda l'NO, la presenza del gas è stata dimostrata, mediante l'uso di un indicatore specifico per l'NO, il DAF-FM-DA, durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi (Comes et al., 2007). In particolare, l'NO è stato rivelato nella larva tardiva, a livello della vescicola sensoria nella testa (Figura 8 B), e nella coda, a livello delle cellule dell'epidermide, muscolari e della notocorda (Figura 8 A,C). Inoltre, nelle larve all'inizio della regressione della coda, si osserva un forte e diffuso segnale del gas proprio all'estremità della coda da dove parte il segnale apoptotico (Figura 8 D).

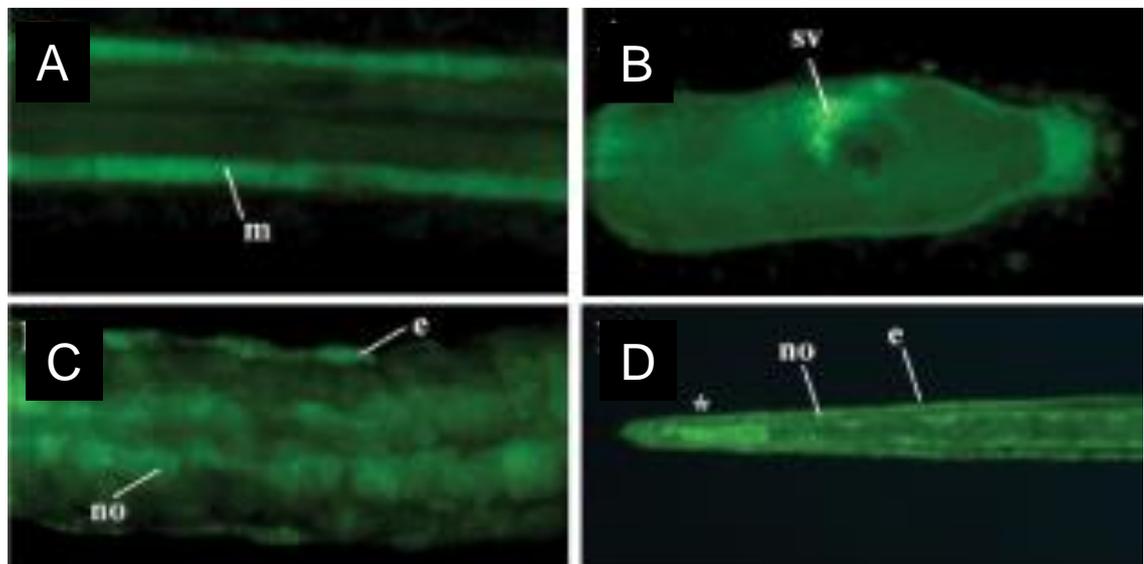


Figura 8. Localizzazione dell'NO mediante il DAF-FM-DA. In verde appaiono le cellule che contengono NO nel muscolo, epidermide e notocorda (A,C,D), nella vescicola sensoria (B). L'asterisco in D indica l'estremità della coda.

m=cellule muscolari; e=cellule dell'epidermide; no=cellule della notocorda; sv=vescicola sensoria. Immagine da Comes et al., 2007.

Inoltre, è stato dimostrato che l'NO inibisce l'attività della caspasi 3 durante la metamorfosi, come rivelato dall'aumento dell'attività nelle condizioni in cui i livelli endogeni di NO vengono ridotti in seguito ad incubazione delle larve appena schiuse con un inibitore della NOS, L-NA (Comes et al., 2007). Questo dato suggerisce una importante relazione tra l'NO e l'apoptosi durante la metamorfosi (Figura 9).

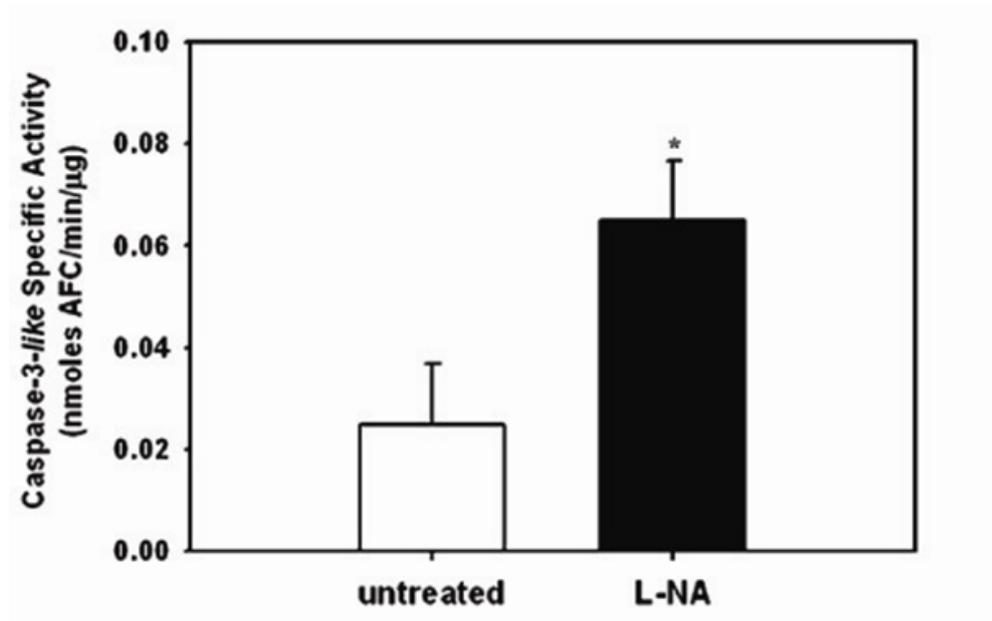


Figura 9. Inibizione dell'attività caspasi da parte dell'NO. Immagine da Comes et al., 2007.

Scopo del progetto di tesi

Lo scopo del progetto di tesi è stato quello di approfondire il ruolo dell'NO in *C.intestinalis* in relazione a due processi: la metamorfosi e la risposta allo stress.

1) Coinvolgimento dell'NO durante la metamorfosi ed identificazione dei bersagli molecolari.

Studi precedenti hanno rivelato che l'NO regola la metamorfosi in *ciona* agendo sulla caspasi, infatti l'attività caspasiica aumenta quando i livelli endogeni dell'NO diminuiscono (Comes et al., 2007). E' stato ipotizzato che durante la metamorfosi ci deve essere una regolazione fine dei livelli di NO: infatti, quando sono bassi, la caspasi è attiva e l'apoptosi e la metamorfosi avvengono, mentre, quando sono alti, la caspasi è inibita, presumibilmente via nitrificazione o nitrosilazione e la metamorfosi non avviene. Su questa base, nella presente tesi l'attenzione è stata rivolta ad approfondire il ruolo dell'NO durante la metamorfosi e ad identificare altri bersagli molecolari, oltre alla caspasi, dell'azione di questo peculiare messaggero fisiologico. Diminuendo i livelli endogeni dell'NO è stato possibile dimostrare che l'NO è responsabile della fosforilazione della MAPK ERK che è un segnale chiave affinché la ritrazione della coda e la conseguente metamorfosi avvengano (Chambon et al., 2002, 2007). Inoltre, esperimenti di immunochimica hanno rivelato che l'NO media durante la metamorfosi un processo di stress ossidativo attraverso la formazione di proteine nitate, alcune delle quali sono state identificate in collaborazione con la Prof. Gabriella Tedeschi dell'Università di Milano.

2) Possibile coinvolgimento dell'NO nella risposta delle larve allo stress.

Le larve di *ciona* sono state sottoposte a stress utilizzando come agente l'aldeide 2-trans-4-trans-decadienale (DD). Questa aldeide è molto studiata nell'ambito della biologia marina per essere rilasciata dall'alga tossica *Skeletonema marinoi* durante i processi di fioritura (Miralto et al., 1999). La DD si forma a partire dagli acidi grassi

della membrana, per attivazione di una cascata enzimatica, in seguito all'ingestione dell'alga da parte di un predatore, quale i copepodi. In letteratura sono state riportate diverse funzioni svolte dalla aldeide DD, prima fra tutte la funzione di difesa contro i predatori (Pohnert and Boland, 2002). L'aldeide DD interferisce con la replicazione del DNA e la mitosi durante lo sviluppo embrionale del riccio di mare *Sphaerechinus granularis* (Hansen et al., 2004). In *P. lividus* alte concentrazioni di DD bloccano la divisione cellulare ed inducono apoptosi, mentre concentrazioni sub-letali di DD alterano lo sviluppo, dando luogo a plutei malformati. Questi plutei sono stati quindi considerati teratogeni perché deviano dallo sviluppo normale (Romano et al., 2010). Anche nei copepodi DD induce apoptosi (Romano et al., 2003). Negli ovociti di ascidia *C. intestinalis*, DD inibisce la corrente di fecondazione che si genera in seguito all'interazione dell'ovocita con lo spermatozoo (Tosti et al., 2003).

Su questa base, lo sviluppo delle larve di *ciona* è stato seguito in presenza dell'aldeide DD e l'effetto sulla metamorfosi è stato esaminato identificando i bersagli molecolari responsabili dell'azione dell'aldeide ed il possibile coinvolgimento dell'NO. Questo studio ha una valenza ecologica considerando che dopo la fioritura dai residui delle diatomee si liberano composti tossici tra cui DD che possono interferire con lo sviluppo larvale e la metamorfosi di organismi bentonici, quali la *ciona*.

MATERIALI E METODI

Animali

Esemplari di *C. intestinalis* sono stati prelevati tra il mese di Marzo-Giugno nel Golfo di Napoli e di Taranto (Puglia). Uno studio effettuato da alcuni colleghi della Stazione Zoologica hanno rivelato che il periodo migliore per lavorare con gli animali è compreso da Marzo a Giugno, sia per quanto riguarda l'abbondanza della specie e sia per la riproducibilità degli esperimenti e la sensibilità degli animali agli stimoli (Figura 10). Infatti, il periodo precedente a Marzo risulta essere molto freddo, ideale per l'inizio della riproduzione ma con numeri troppo bassi di esemplari. Al contrario, tutto il periodo dopo Giugno risulta troppo caldo e gli animali sono stressati dalle alte temperature, risentendone molto soprattutto durante il trasporto. Una volta trasportati in stabulario gli animali sono stati allevati dal servizio di allevamento degli organismi marini della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli, secondo il protocollo di Cirino et al., 2002. Tale protocollo prevede la stabulazione degli animali sotto luce costante in vasche contenenti acqua di mare circolante e con una temperatura di 18°C per tutto il periodo di stabulazione. Dopo questo tempo, sono selezionati gli animali maturi che hanno una grande quantità di uova e sperma. Tale osservazione risulta facile per la trasparenza della tunica che consente di distinguere bene la quantità di uova (colorate giallo-grigio) e sperma (bianco) presenti nei rispettivi gonodotti. Mediante dissezione sono ottenuti gli oociti dal singolo animale e la miscela di sperma da più animali. La fecondazione viene condotta in capsule petri aggiungendo 1×10^6 /ml di miscela di sperma agli oociti in acqua di mare filtrata. Lo sviluppo, monitorato mediante lo stereomicroscopio Stemi 2000 (ZEISS), è stato condotto in incubatore settato ad una temperatura di 18°C e ad un ritmo circadiano di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

L'attenzione è stata focalizzata alla schiusa (18 ore dalla fecondazione) ed ai successivi stadi larvali (secondo Chiba et al., 2004).

Larve a tempi differenti dalla schiusa destinate all'estrazione proteica sono state raccolte per centrifugazione a bassa velocità ed i precipitati, lavati con PBS, sono stati posti in azoto liquido per un veloce congelamento allo scopo di bloccare velocemente l'azione delle fosfatasi e delle proteasi. I campioni sono stati conservati a - 80°C sino all'utilizzo.

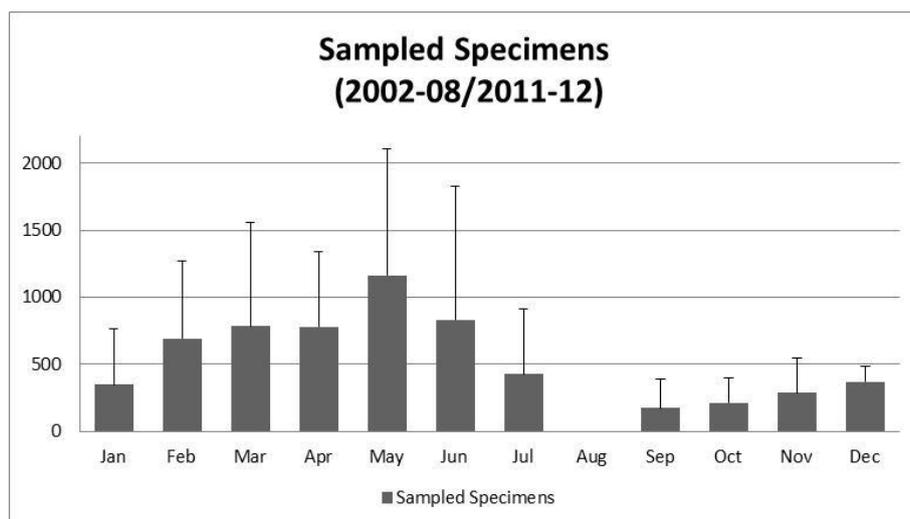


Figura 10. Campionamenti di *Ciona intestinalis* da diversi siti nell'arco di un anno.
Per gentile cortesia del Dr. Luigi Caputi, Stazione Zoologica Anton Dohrn.

Esperimenti di incubazione

Larve alla schiusa sono state trattate per tempi diversi con sostanze capaci di modulare i livelli endogeni di NO e ONOO⁻.

La diminuzione dell'NO è stata ottenuta mediante trattamenti *in vivo* di larve alla schiusa con il bloccante dell'NO, C-PTIO 300 μ M sciolto in acqua di mare e l'inibitore della NOS, TRIM 250 μ M preparato in DMSO.

L'aumento dell'NO è stato realizzato mediante trattamenti *in vivo* di larve alla schiusa con il donatore di NO, spermine NONOate (Sper/NO) 250 μ M ed il rispettivo controllo con spermina, rilasciata durante la reazione di decomposizione dello Sper/NO. Tale donatore è stato preparato in NaOH 60 mM, in quanto lo Sper/NO, appartenendo alla classe dei diazeniumdiolati (NONOati), è stabile in soluzione basica.

La diminuzione dell'ONOO⁻ è stata ottenuta mediante trattamenti *in vivo* di larve alla schiusa con il bloccante dell'ONOO⁻, MnTBAP 50 μ M e con l'antiossidante urato 600 μ M. Il MnTBAP è stato sciolto direttamente in acqua di mare e tenuto in ghiaccio fino all'uso. L'urato è stato preparato in 0.01M NaOH.

L'aumento dell'ONOO⁻ è stato realizzato mediante trattamenti *in vivo* di larve alla schiusa con 500 μ M di ONOO⁻ chimicamente sintetizzato facendo reagire il nitrito con il perossido di idrogeno acidificato, come descritto da Guidarelli and Cantoni, 2002. La sua concentrazione è stata valutata spettrofotometricamente misurando l'assorbimento a 302 nm ed in base al fattore di estinzione molare $\epsilon=1670$. Il radicale così sintetizzato è stato aggiunto al volume noto di acqua di mare contenente le larve appena schiuse.

Per l'analisi fenotipica tutti i trattamenti sono stati protratti fino alle 24 ore, quando è stata eseguita la conta delle larve con la coda lunga e parzialmente ritratta e degli individui giovani. Successivamente i campioni controllo e trattato sono stati osservati anche a tempi successivi alle 24 ore per monitorare l'andamento della metamorfosi, lo sviluppo degli individui giovani e la percentuale di sopravvivenza dei trattati rispetto ai controlli. Per l'analisi delle proteine, i trattamenti sono stati condotti per i tempi indicati

nei risultati. Alla fine dei trattamenti le larve sono state raccolte per centrifugazione 500xg (Centrifuga Eppendorf) a 4°C per favorire la loro sedimentazione. I precipitati ottenuti sono stati posti prima in azoto liquido per bloccare l'azione delle fosfatasi e della proteasi e poi conservati a -80°C.

Effetto della 2-trans-4-trans-decadienale (DD) sulla metamorfosi

Per valutare l'effetto della DD sulla metamorfosi, 0.5µg/ml di aldeide sono stati sciolti in DMSO e la concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente a 282nm sulla base del suo coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 31400$. La DD è stata aggiunta alla concentrazione desiderata a diversi stadi larvali: larva precoce, direttamente alla schiusa; larva intermedia, dopo 4 ore dalla schiusa; larva tardiva, dopo 6 ore dalla schiusa. La concentrazione effettiva di DD nelle piastre è stata ulteriormente verificata leggendo allo spettrofotometro la soluzione finale nella quale sono state messe le larve. Per l'analisi fenotipica i trattamenti con DD sono stati protratti fino alle 24 ore, quando è stata eseguita la conta delle larve con la coda lunga e parzialmente ritratta e degli individui giovani. Successivamente i campioni controllo e trattato sono stati osservati anche a tempi successivi alle 24 ore per monitorare l'andamento della metamorfosi, lo sviluppo degli individui giovani e la percentuale di sopravvivenza dei trattati rispetto ai controlli. Per l'analisi delle proteine, i trattamenti sono stati condotti per i tempi indicati nei risultati. Alla fine dei trattamenti le larve sono state raccolte per centrifugazione 500xg (Centrifuga Eppendorf) a 4°C per favorire la loro sedimentazione. I precipitati ottenuti sono stati posti prima in azoto liquido per bloccare l'azione delle fosfatasi e della proteasi e poi a -80°C.

Estrazione delle proteine

Larve controllo e trattato (TRIM, Sper/NO, MnTBAP, ONOO e DD) raccolte per centrifugazione sono state omogeneizzate meccanicamente in ghiaccio nell'epENDORF, utilizzando un pestello in teflon, in un volume doppio rispetto al peso del singolo campione. Come tampone di lisi è stato utilizzato il RIPA (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% SDS) al quale sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (1 mM PMSF and Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Monza, Italia) e delle fosfatasi (PhosSTOP Cocktail Tables, Roche). I lisati sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 14.000 rpm a 4°C per 20 minuti e la concentrazione delle proteine totali nel supernatante è stata determinata con il Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad, Milan, Italy) utilizzando come proteina di riferimento l'albumina da siero bovino (BSA).

Elettroforesi su gel di poliacrilamide

Prima dell'elettroforesi, i campioni proteici alla concentrazione desiderata vengono diluiti con il tampone di Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerolo, 5% β -mercaptoetanolo, 0.01% blu di bromofenolo) contenente β -mercaptoetanolo. I campioni utilizzati per il blotting con l'anti-actina, anti-ERK e anti-P-ERK vengono bolliti a 85°C per 5 minuti, mentre quelli esaminati per le proteine nitate non sono bolliti per evitare la riduzione dei nitro gruppi ad ammino gruppi in seguito al riscaldamento in condizioni riducenti. Per la corsa elettroforetica sono stati preparati gel al 10% di poliacrilammide in condizione denaturante. Per verificare l'uniformità dei carichi dei vari campioni il gel è stato colorato dopo la corsa elettroforetica con blu di Coomassie.

Dopo la corsa elettroforetica le proteine del gel vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa (BIORAD, Italia) o di PVDF (Immobilon-P, Millipore, commercializzata dalla Sigma). Per la rivelazione di actina, ERK e P-ERK, la membrana di nitrocellulosa viene trattata per un'ora con la soluzione bloccante, 5% latte in tampone fosfato pH 8,8 con 1% Tween (PBS-T) e successivamente incubata con l'anticorpo primario anti-actina (1:250) (Millipore, Prodotti Gianni, Milano, Italia), anti-ERK (1:5000) (Cell Signalling, EuroClone, Pero, Milano, Italia) e anti-P-ERK (1:500) (Cell Signalling) in 5% latte e PBS-T per tutta la notte a 4° C. In seguito a tre lavaggi con PBS-T da 10 minuti ciascuno, la membrana è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano, 1:10.000 anti-mouse (per l'actina) (Sigma) oppure 1:10.000 anti-rabbit (ERK e P-ERK) (Sigma). Dopo tre lavaggi in PBT, le bande di interesse di actina (42kDa), ERK e P-ERK (42kDa), sono state rilevate con i rispettivi sistemi di rivelazione: ECL PLUS (GE Healthcare) per la rivelazione delle bande immunopositive dell'actina e di ERK, mentre per la rivelazione di ERK fosforilato è stato usato il Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, EuroClone).

Per la rivelazione delle proteine nitate e' stata utilizzata la membrana di PVDF saturata con 6% latte in soluzione salina pH 8,4 CON 0.05% Tween (TBS-T) a temperatura ambiente per un'ora. La membrana è stata lavata tre volte in TBS-T e poi incubata con l'anticorpo primario anti-3nitro-Tyrosine (Zymed) diluito 1:500 in 1% BSA in TBS-T per tutta la notte. Dopo i lavaggi con TBS-T, la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano anti-mouse (Sigma) diluito 1:100.000 in 1% BSA in TBS-T per un'ora. Dopo successivi lavaggi in TBS-T, la reazione è stata sviluppata con ECL-PLUS. Come controllo delle bande nitate, la membrana è stata trattata con 10 mM di ditionito di sodio preparato in 50 mM di piridina acetato pH 5,0 per un'ora a temperatura ambiente, sotto agitazione lenta e

lontano da fonti di luce. La membrana è stata poi lavata abbondantemente per allontanare la soluzione di riduzione con TBS-T e incubata con l'anticorpo primario e secondario come riportato sopra.

Immunoprecipitazione

Gli estratti proteici concentrati 1µg/µl di larve controllo e trattato (TRIM, Sper/NO, MnTBAP, ONOO⁻ e DD) sono preincubati con una sospensione 1:1 di Proteina A in PBS per un'ora a 4°C con agitazione energica. Poi, i campioni sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 10 min a 4°C e i surnatanti sono incubati con P-ERK (1:25) o ERK in agitazione continua e gentile. Dopo l'incubazione per l'intera notte a 4°C, per immunoprecipitare P-ERK è stata aggiunta la sospensione 1:1 di Proteina A in PBS per 3 ore a 4°C in agitazione costante e forte. I campioni sono stati centrifugati e gli immunoprecipitati, lavati tre volte in RIPA, dissolti in soluzione di Laemmli senza β-mercaptoetanololo, bolliti a 90°C per 10 min e centrifugati per permettere il distacco con la Proteina A e quindi il recupero di P-ERK precipitato. Il surnatante libero da P-ERK è stato incubato con anti-ERK (1:50) e trattati come sopra.

RISULTATI

Modulazione dei livelli di NO: effetto sulla velocità di metamorfosi

Nella prima fase del lavoro di dottorato l'attenzione è stata rivolta ad approfondire il ruolo dell'NO durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di ciona. In particolare, sono stati condotti una serie di esperimenti volti ad esaminare gli effetti della modulazione dei livelli endogeni di NO sulla metamorfosi, utilizzando differenti approcci.

In particolare, la diminuzione dei livelli di NO è stata effettuata utilizzando sia l'inibitore della NOS, il TRIM, che il bloccante dell'NO, il carbossi-PTIO (C-PTIO). Il TRIM é un composto che inibisce l'attività NOS interferendo sia con il legame del substrato L-arginina che del cofattore BH₄ (Handy et al., 1995, 1996, 1997). Larve alla schiusa incubate con l'inibitore della NOS TRIM (250µM) mostrano dopo 24 ore dal trattamento un notevole rallentamento della metamorfosi, come evidenziato dalla diminuzione di percentuale di individui giovani nel trattato (20%) rispetto al controllo (80%) (Figura 11). L'elevata percentuale di larve con coda lunga permane anche nelle 48 ore successive. La metamorfosi comunque avviene e dopo 72 ore gli individui giovani del trattato appaiono meno sviluppati rispetto al controllo (Figura 12). Questi individui non riescono a portare avanti il processo di accrescimento, come evidenziato dalle osservazioni al microscopio condotte sino a 120 ore dal trattamento. Alla concentrazione di 500µM, il TRIM risulta essere tossico. L'aggiunta dell'inibitore a larva tardiva, dopo 6 ore dalla schiusa, determina analogamente il rallentamento della metamorfosi (Figura 13).

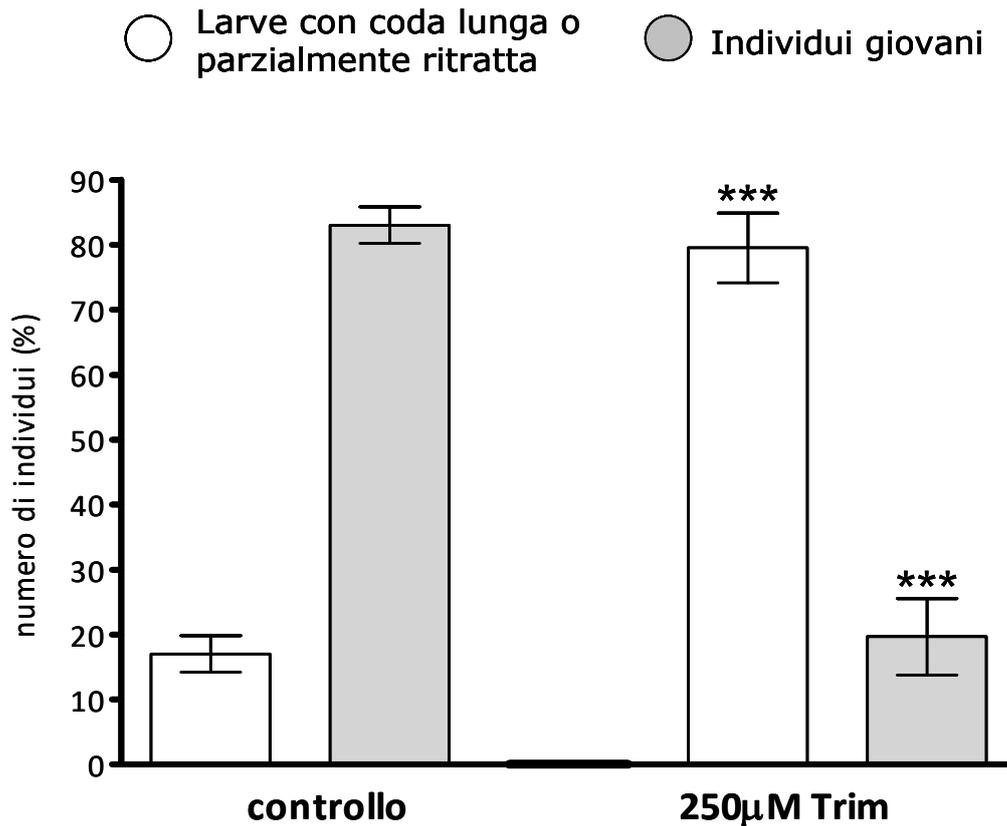


Figura 11 . Effetto della diminuzione dei livelli di NO mediante l'inibizione della NOS in larve alla schiusa sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco (***) indica la significatività dei trattamenti con 250µM di TRIM aggiunto alla schiusa rispetto al controllo ($p < 0.0001$) N= 10.

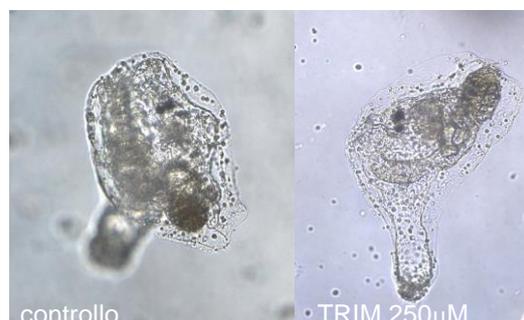


Figura 12 . Effetto fenotipico della diminuzione dei livelli di NO mediante l'inibizione della NOS in larve alla schiusa sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. Le immagini sono state registrate dopo 72 ore dal trattamento. Come evidenziano le immagini, nel trattato l'individuo giovane è più piccolo rispetto al controllo.

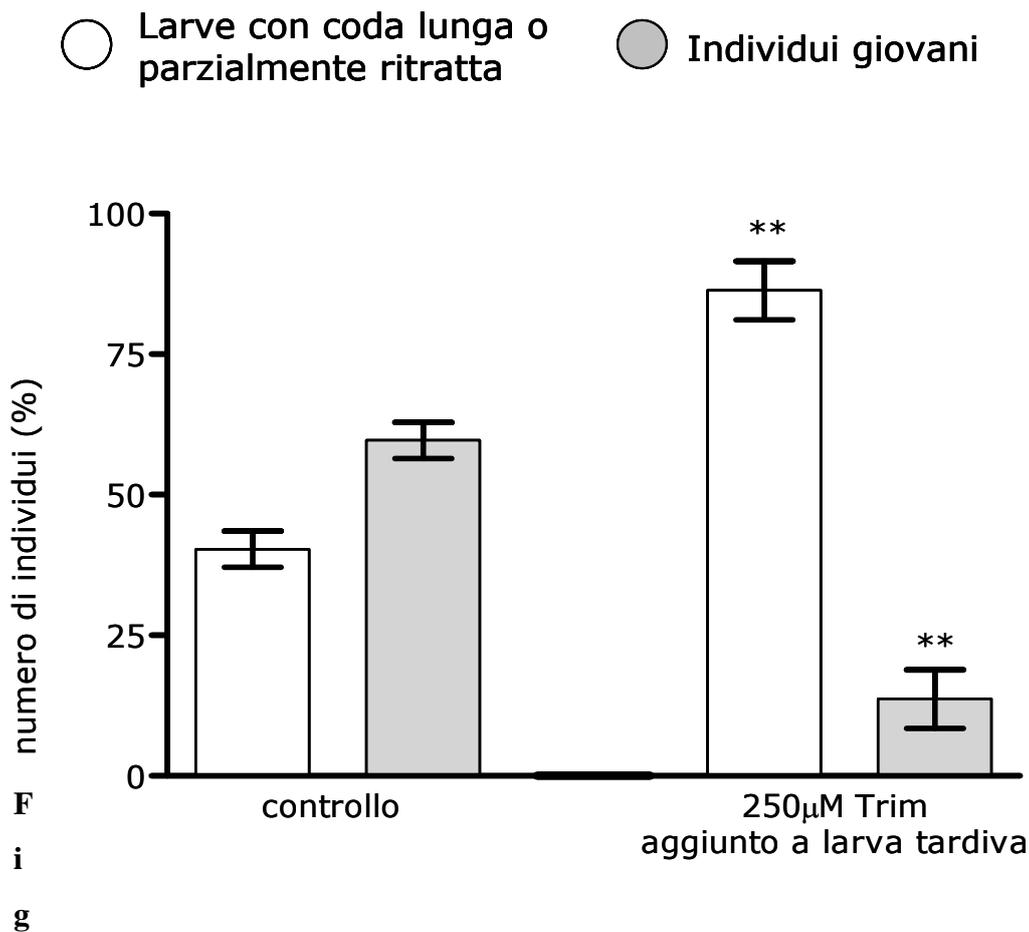


Figura 13 . Effetto dell'aggiunta dell'inibitore della NOS allo stadio di larva tardiva sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco (**) indica la significatività dei trattamenti con 250µM di TRIM aggiunto a larva tardiva rispetto al controllo ($p < 0.001$) $N = 3$.

Il rallentamento della metamorfosi è ben visibile anche quando i livelli endogeni dell'NO in larve alla schiusa vengono diminuiti con il bloccante dell'NO, il C-PTIO. Questo bloccante è un derivato dei tetrametilimidazoli che reagisce stechiometricamente con una molecola di NO liberando NO_2^- (Goldstein et al., 2003) Dopo 24 ore dalla schiusa il controllo presenta il 33% di larve a coda lunga o parzialmente ritratta ed il 67% di individui giovani, mentre con il trattamento di 300µM di bloccante la situazione è ribaltata mostrando il 73% di larve con la coda lunga o parzialmente ritratte ed il 25% di

individui giovani (Figura 14). In questo caso lo sviluppo delle larve trattate prosegue normalmente e dopo 48 e 72 ore non c'è differenza tra controllo e trattato.

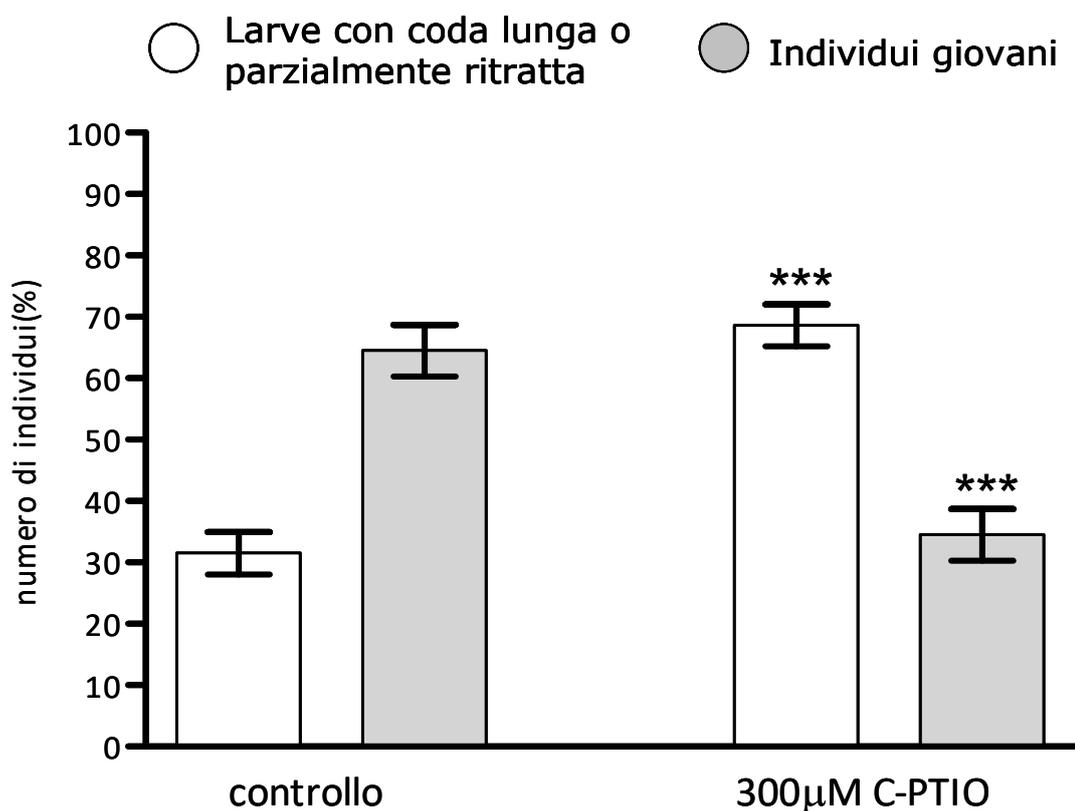


Figura 14. Effetto della diminuzione dei livelli di NO mediante l'uso del bloccante C-PTIO in larve alla schiusa sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco (***) indica la significatività dei trattamenti con 300µM di C-PTIO rispetto al controllo ($p < 0.0001$) N= 10.

Per aumentare i livelli endogeni dell'NO è stato utilizzato il donatore di NO, Sper/NO. Esso appartiene alla classe dei diazeniumdiolati (NONOati), prodotti stabili in soluzione basica che liberano NO in seguito all'abbassamento del pH. Ogni mole di Sper/NO

rilascia due moli di NO insieme ad una mole dell'ammina controparte, la spermina, con una velocità che dipende, oltre che dal pH, da vari fattori, quali la temperatura, il mezzo.

SPER/NO → Spermina + 2NO

Nell'ambito dei NONOati, lo Sper/NO è un donatore a rilascio lento. Lo Sper/NO ha un tempo di dimezzamento di 39 min a 37 °C e di 230 min a 22-25 °C (Keefer et al., 1996). Poiché non ci sono dati sulla velocità di rilascio dell'NO in acqua di mare, la decomposizione dello Sper/NO, e quindi indirettamente la formazione dell'NO, è stata seguita spettrofotometricamente registrando nel tempo il massimo di assorbimento a 248 nm di una soluzione 250µM di Sper/NO nelle stesse condizioni sperimentali nelle quali le larve sono incubate cioè in acqua di mare ed a 18°C. La figura 15 mostra una graduale diminuzione dell'assorbimento nel tempo risultando dopo 24 ore in una diminuzione del 16% corrispondente ad una concentrazione di NO di 80 µM nell'acqua di mare dove sono presenti le larve.

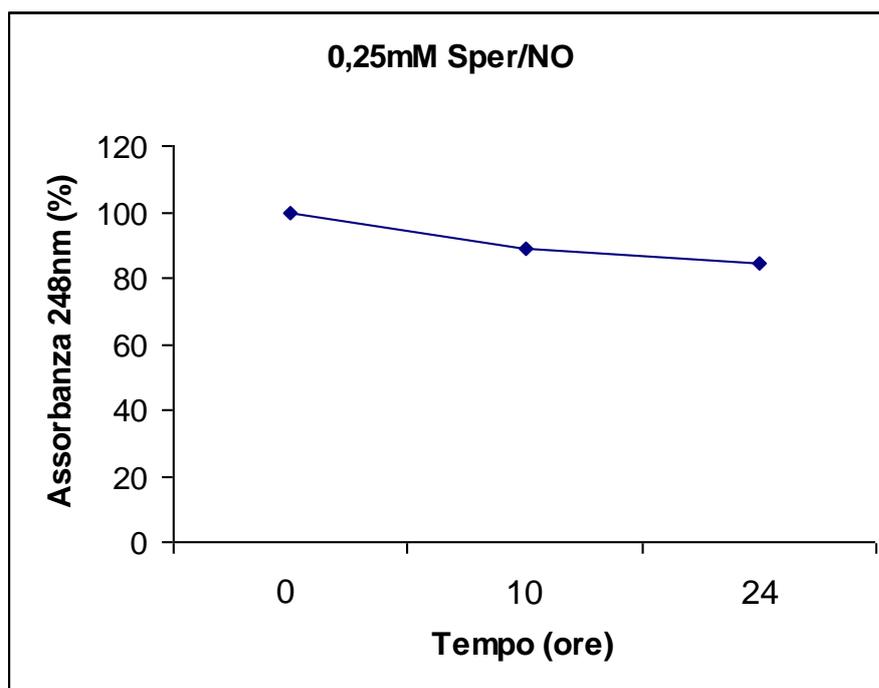
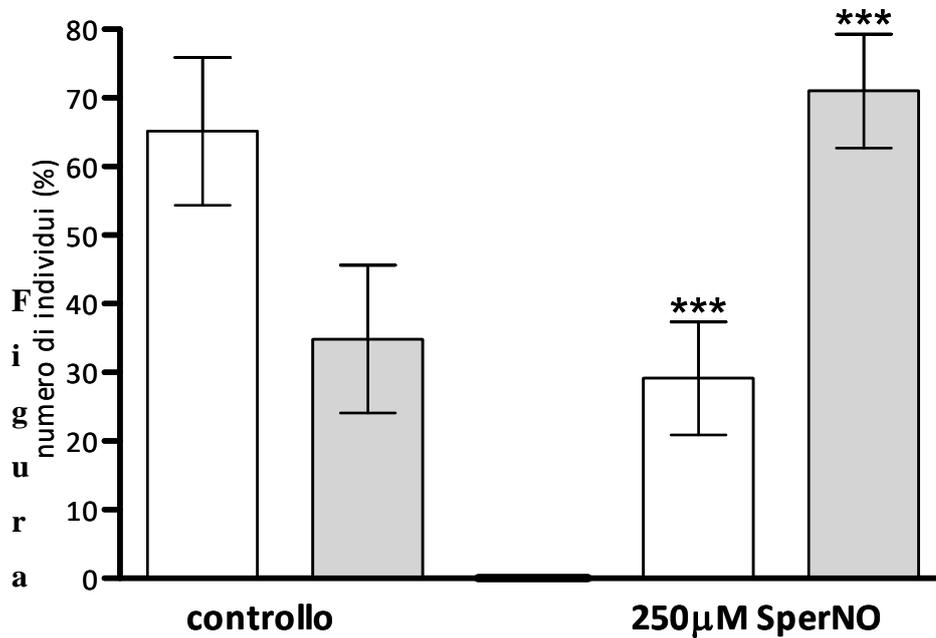


Figura 15. Decomposizione dello Sper/NO. In grafico viene riportata la percentuale dell'assorbanza a 248nm di una soluzione 250 μ M di Sper/NO in acqua di mare a 18°C

Non ci sono differenze quando la decomposizione dello Sper/NO viene seguita in presenza degli animali. Larve alla schiusa trattate con 250 μ M di Sper/NO mostrano dopo 24 ore una accelerazione della metamorfosi. Infatti, si ottengono 70% di individui completamente metamorfosati e solo il 30% di larve a coda lunga o parzialmente ritratta rispetto al 35% di individui giovani ed il 65% di larve del controllo (Figura 16). Gli individui giovani derivanti dal trattamento con Sper/NO non riescono a proseguire nello sviluppo, come evidenziato dall'osservazione a 72 ore (figura 17). Diminuendo la concentrazione di Sper/NO a 100 μ M si ha un effetto contrario, cioè il rallentamento del processo (dati non mostrati). Alte concentrazioni (500 μ M) hanno invece un effetto tossico (dati non mostrati).

○ Larve con coda lunga o parzialmente ritratta ● Individui giovani



1

Figura 16. Effetto dell'aumento di NO mediante l'uso del donatore in larve alla schiusa sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco (***) indica la significatività dei trattamenti con 250µM di sper/NO rispetto al controllo ($p < 0.0001$) $N = 7$.

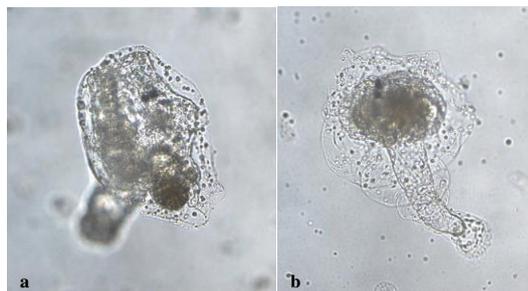


Figura 17. Effetto fenotipico dell'aumento di NO mediante l'uso del donatore sulla metamorfosi di *Ciona intestinalis*. Le immagini sono state registrate dopo 72 ore dal trattamento. Come evidenziano le immagini, nel trattato (b) l'individuo giovane è bloccato nello sviluppo rispetto al controllo (a).

Modulazione dei livelli di NO: effetto sulla fosforilazione della MAPK ERK

Le MAPK sono delle serin-treonin-chinasi che mediano importanti segnali regolatori nelle cellule e che dopo stimolazione fosforilano specifici substrati su residui di serina e/o treonina; tale fosforilazione può regolare positivamente o negativamente il substrato e quindi l'attività dell'intera cascata di eventi. Esistono tre famiglie di MAPK: le chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK), le chinasi JNK (c-jun NH₂-terminal chinasi), e le p38-MAP chinasi (Wada and Penninger, 2004).

In questo lavoro di tesi particolare attenzione è stata rivolta allo studio dell'azione dell'NO sull'attivazione delle MAPK, ed in particolare di ERK, che gioca un ruolo chiave nell'innescare la metamorfosi in larve di *ciona* (Chambon et al., 2007).

Dapprima sono stati condotti esperimenti preliminari per monitorare l'andamento della fosforilazione di ERK in larve di controllo. A tale scopo, larve appena schiuse sono state prelevate a tempi diversi e lavorate per l'estrazione delle proteine, come riportato in materiali e metodi. Successivamente, dopo aver verificato l'uniformità del carico mediante colorazione del gel con blu di Coomassie e l'analisi delle bande immunopositive ad anti-actina, gli estratti proteici sono stati analizzati per western blot con l'anticorpo specifico anti-P-ERK (Figura 18-A). L'analisi densitometrica delle bande immunopositive di P-ERK rispetto all'intensità dell'immunopositività con l'actina ha permesso di valutare l'andamento di attivazione della MAPK (Figura 18-B). A 2 ore dalla schiusa c'è un certo valore di fosforilazione che aumenta a 4 ore. Poi diminuisce raggiungendo il valore basale a 6-8 ore. A 10 ore dalla schiusa c'è un significativo aumento di fosforilazione che diminuisce a 12 ore. Questo andamento concorda con i risultati riportati da Chambon (2007) che osserva due massimi di attivazione di ERK, anche se c'è una differenza nel primo massimo di attivazione. Infatti, Chambon mostra che l'immunopositività di P-ERK aumenta a 2 ore invece che a 4 ore come da noi

osservato. Questa piccola differenza è da imputare a possibili variazioni nelle condizioni di sviluppo delle larve di *ciona*.

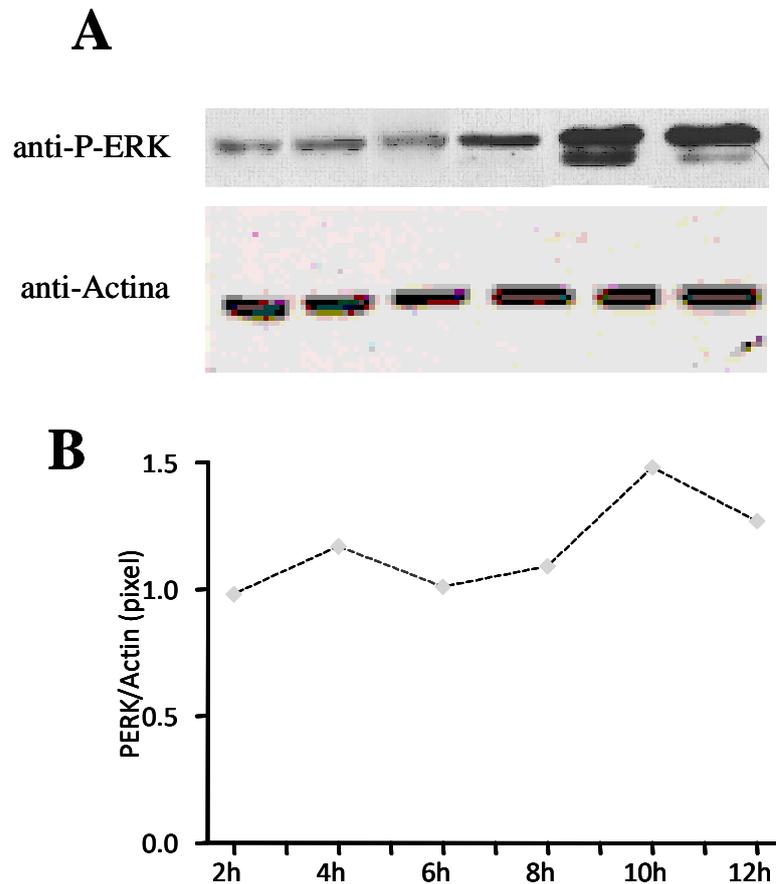


Figura 18. Andamento dell'attivazione di ERK durante lo sviluppo di *C. intestinalis*. Western blot sviluppato con anti-P-ERK e anti-actina a diversi tempi dalla schiusa (A). Analisi densitometrica della banda immunopositiva di P-ERK rispetto a quella dell'actina (B).

Al fine di valutare l'andamento della fosforilazione di ERK al variare dei livelli di NO sono stati esaminati campioni di larve controllo e trattate sia con l'inibitore della NOS, il TRIM, o il bloccante dell'NO, il C-PTIO, per ridurre i livelli di NO, e sia con il donatore di NO, Sper/NO, per aumentare i livelli di NO.

L'analisi degli estratti proteici ha rivelato che modulando i livelli di NO si osserva una perturbazione dei livelli di fosforilazione della MAPK ERK.

In particolare, nel caso dell'inibitore, l'analisi densitometrica della immunopositività anti-P-ERK rispetto a quella dell'actina ha rivelato che dopo 2 e 4 ore dall'aggiunta di TRIM c'è un lieve aumento della fosforilazione. A partire dalle 6 ore, l'andamento cambia e si osserva sino alle 12 ore una drastica riduzione del valore di fosforilazione rispetto al controllo (Figura 19).

Con il bloccante dell'NO, C-PTIO l'analisi densitometrica delle bande immunopositive all'anti-P-ERK rispetto a quella dell'actina ha rivelato anche in questo caso una perturbazione dei livelli di fosforilazione di ERK (Figura 20). Dopo 2 e 4 ore dal trattamento si registra un lieve aumento di fosforilazione del trattato rispetto al controllo. Poi dopo 8 ore il livello di fosforilazione del trattato diminuisce drasticamente per poi uniformarsi al controllo dopo 10 ore.

Nel caso del trattamento con il donatore di NO, l'analisi densitometrica delle bande immunopositive all'anticorpo anti-P-ERK rispetto all'anti-actina ha rivelato che a 4, 6 e 8 ore la fosforilazione dei campioni trattati diminuisce leggermente rispetto ai controlli. Solo dopo 10 ore, nel trattato la fosforilazione aumenta notevolmente rispetto al controllo, probabilmente dovuto al rilascio di NO con il tempo (Figura 21).

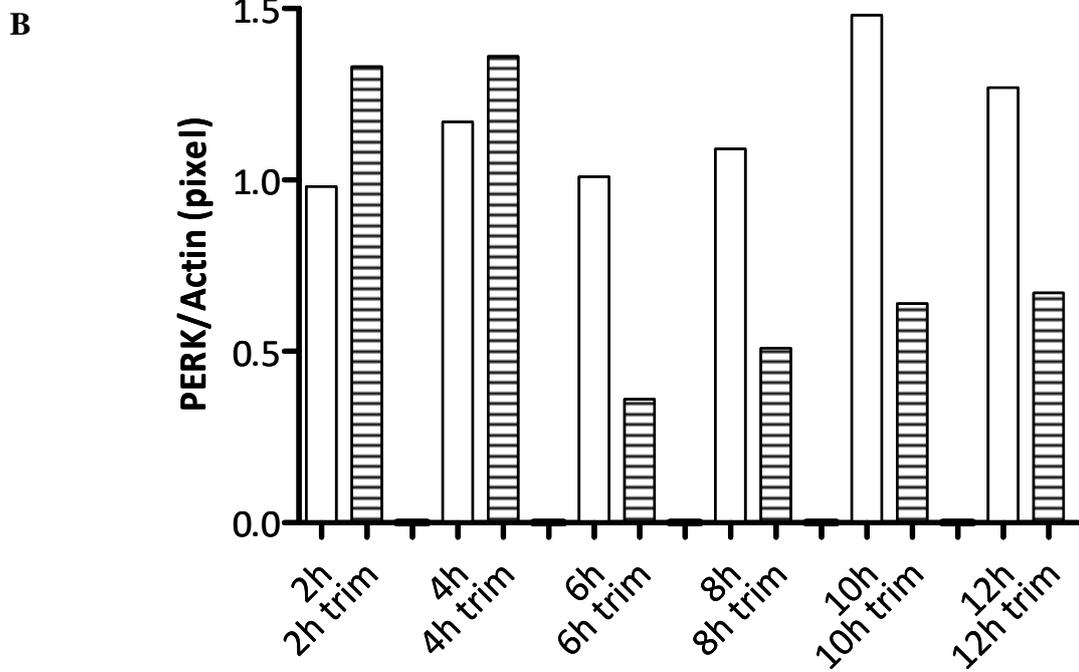
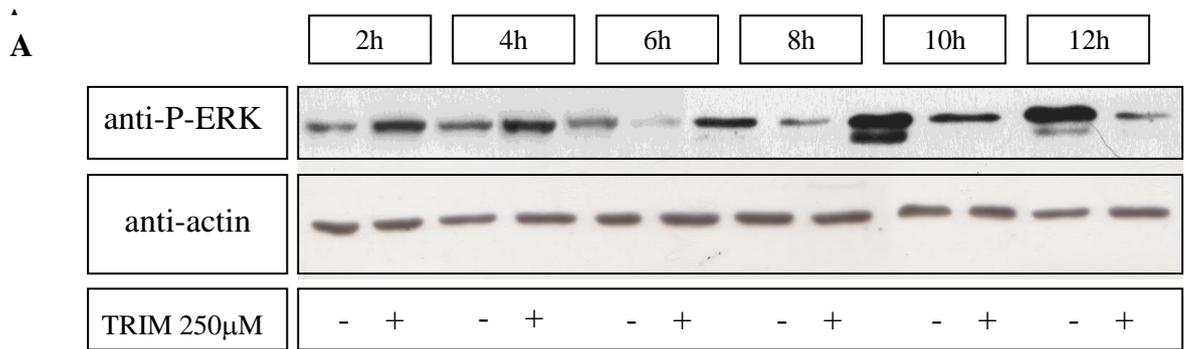


Figura 19. Effetto della diminuzione dei livelli di NO con l'inibitore della NOS sull'attivazione di ERK. Esperimento rappresentativo che mostra il Western blot sviluppato con l'anticorpo anti-P-ERK e anti-actina (A). L'istogramma riporta i valori dell'analisi densitometrica delle bande immunopositive per l'anti-P-ERK rispetto all'anti-actina (B).

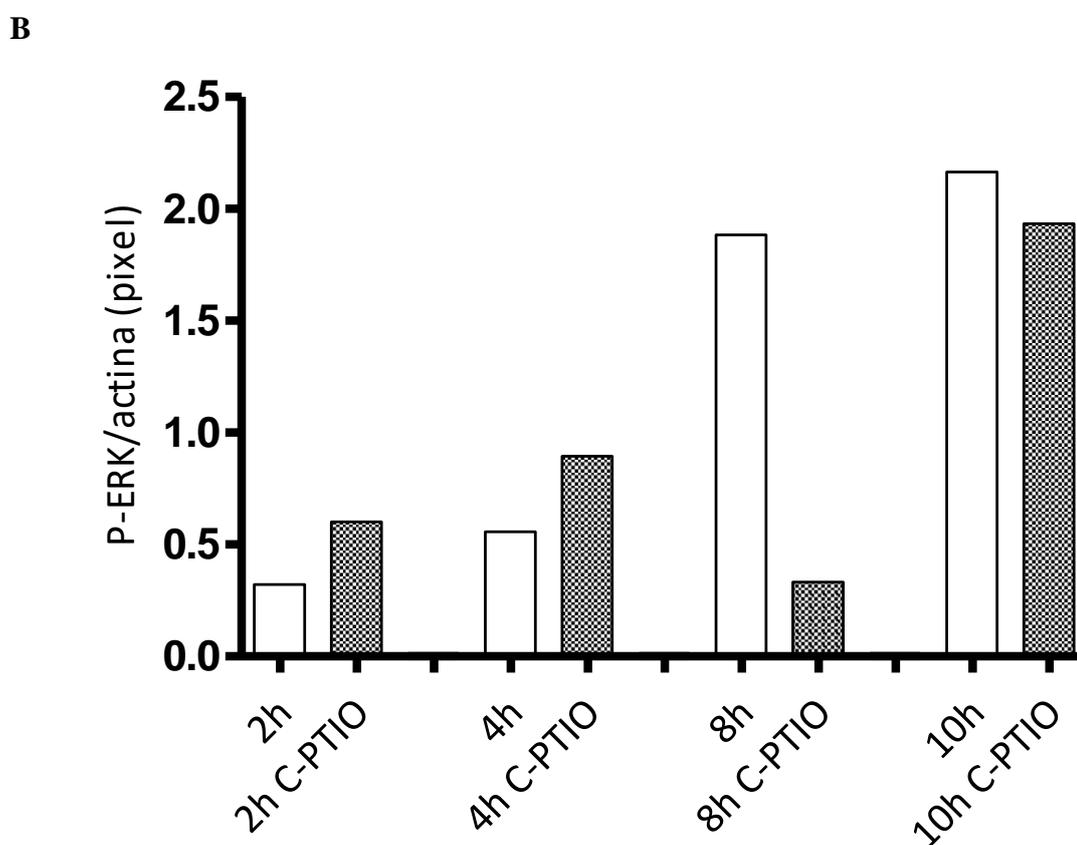
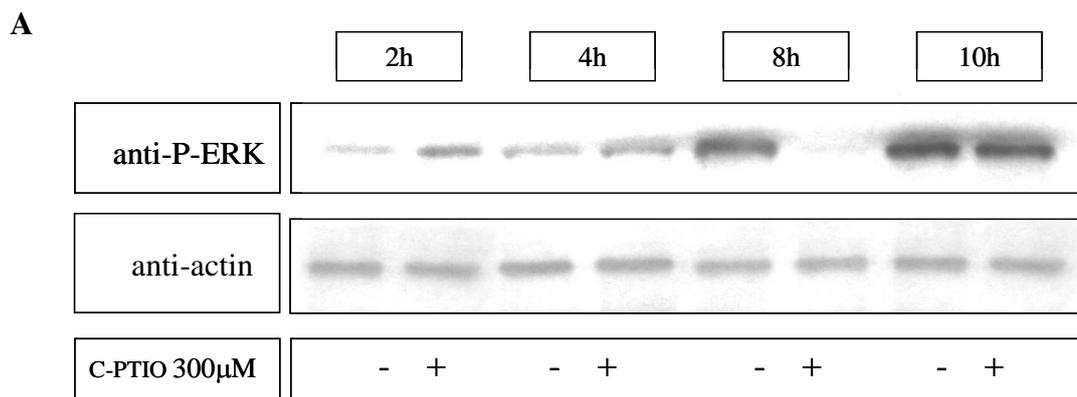
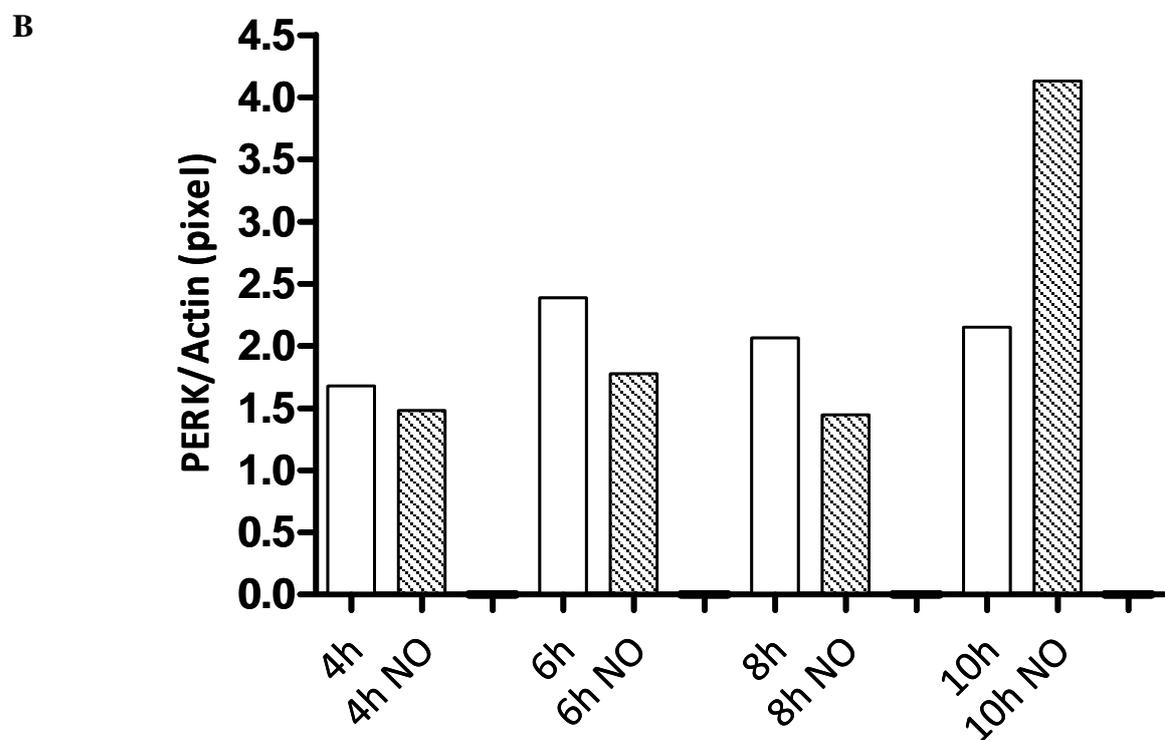
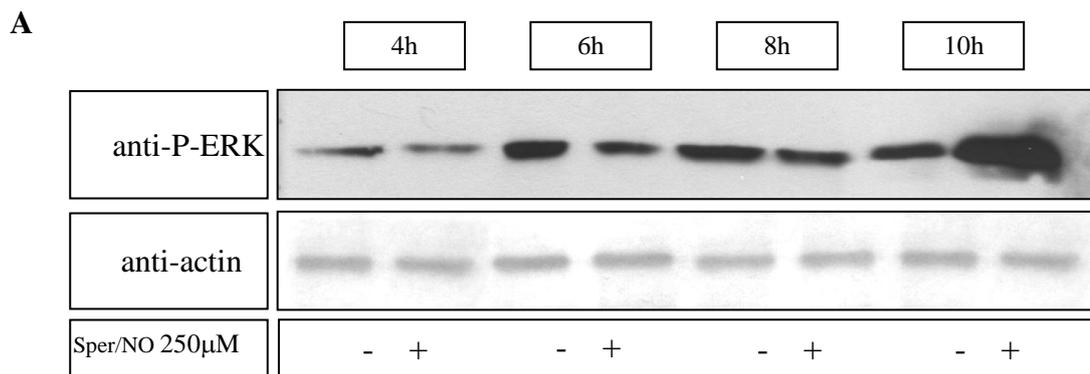


Figura 20. Effetto della diminuzione dei livelli di NO con il bloccante dell'NO sull'attivazione di ERK. Esperimento rappresentativo che mostra il Western blot sviluppato con l'anticorpo anti-P-ERK e anti-actina (A). L'istogramma riporta i valori dell'analisi densitometrica delle bande immunopositive per l'anti-P-ERK rispetto all'anti-actina (B)



f

Figura 21. Effetto dell'aumento di NO con il donatore sull'attivazione di ERK. Esperimento rappresentativo che mostra il Western blot con l'anticorpo anti-P-ERK e anti-actina (A) L'istogramma riporta i valori dell'analisi densitometrica delle bande immunopositive per l'anti-P-ERK rispetto all'anti-actina (B).

Modulazione dei livelli di RNS: effetto sulla velocità di metamorfosi e sulla fosforilazione della MAPK ERK

L'NO è sensibile allo stato redox cellulare, infatti può reagire con lo ione superossido e con l'ossigeno per formare specie RNS, quali rispettivamente il perossinitrito (ONOO^-) ed il biossido di azoto (NO_2), entrambi specie nitranti. Su questa base è stato studiato l'effetto della modulazione dei livelli di RNS sulla metamorfosi. In particolare, sono stati utilizzati il perossinitrito come tale, un suo bloccante il MnTBAP ed un antiossidante endogeno quale l'urato che converte NO_2 a NO_2^- .

Il perossinitrito, sintetizzato chimicamente in laboratorio come riportato da Guidarelli and Cantoni, 2002, è stato aggiunto a larve alla schiusa. Le larve trattate con $250\mu\text{M}$ di ONOO^- dopo 24 ore mostrano una forte accelerazione della metamorfosi. Il controllo mostra l'85% di larve con coda lunga o parzialmente ritratta ed il 15% di individui giovani. Invece, il trattato mostra una considerevole accelerazione del processo di ritrazione della coda con un valore pari solo al 32% di larve con coda lunga o parzialmente ritratta ed una percentuale del 68% di individui giovani (Figura 22). La stessa accelerazione del processo è stata ottenuta con $500\mu\text{M}$ di perossinitrito, mentre nessun effetto è stato osservato alla concentrazione di $100\mu\text{M}$.

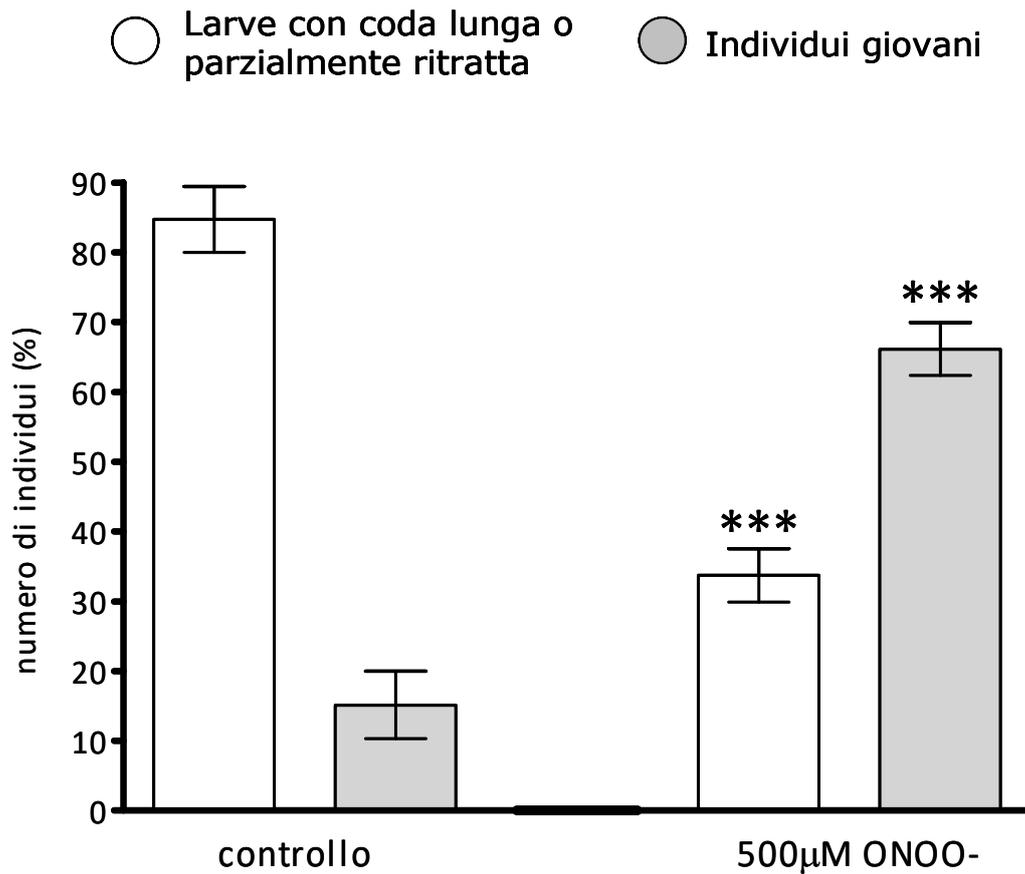


Figura 22. Effetto dell'aggiunta del perossinitrito sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco indica la significatività dei trattamenti con 500µM di ONOO⁻ ($p < 0.0001$) N=10.

Per diminuire i livelli di RNS è stato utilizzato il bloccante del perossinitrito, il MnTBAP. Tale agente mima l'azione dell'enzima SOD e blocca il ONOO⁻ nell'anello porfirinico. Come riportato in figura 23, dopo 24 ore dalla schiusa, il controllo mostra il 67% di larve a coda lunga o parzialmente ritratta ed il 33% di individui giovani. Invece, il trattato mostra un considerevole rallentamento nella ritrazione della coda con un valore pari al 90% di larve a coda lunga o parzialmente ritratta ed una percentuale del solo 10% di individui giovani. Le larve trattate con il bloccante mantengono un movimento tipico di

una larva giovane anche dopo 24 ore. Solo dopo 48 ore le larve fermano il ritmo frenetico della coda senza portare a termine il processo di metamorfosi.

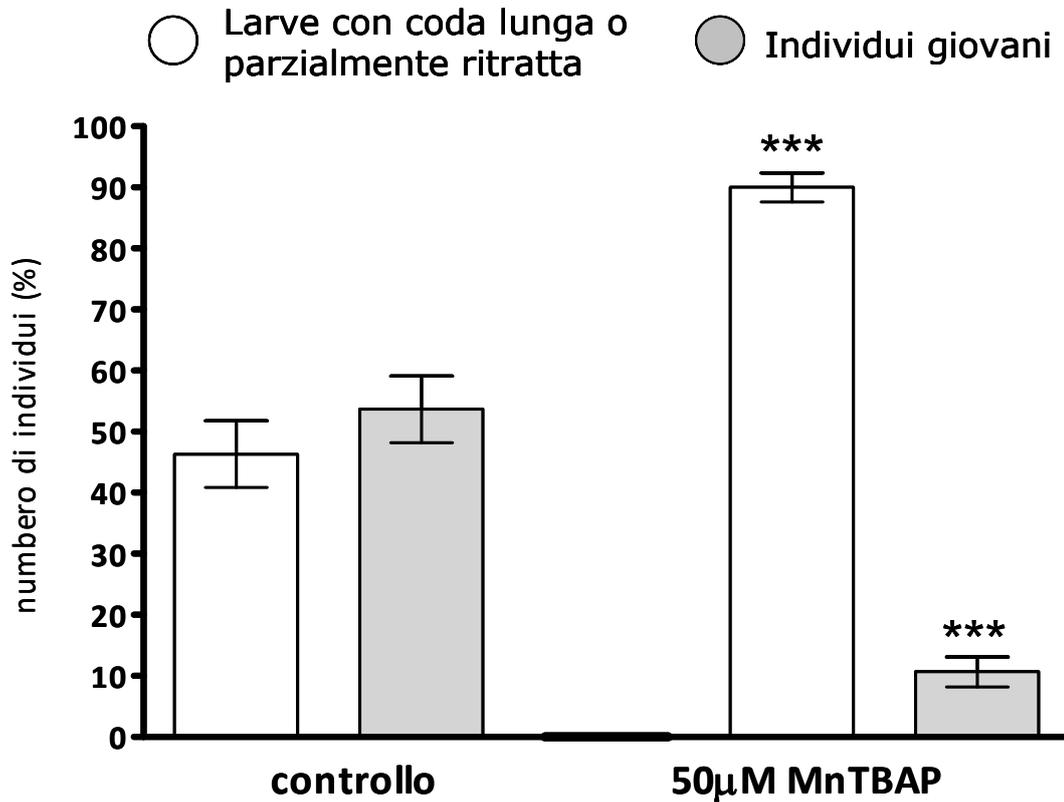


Figura 23. Effetto dell'aggiunta del bloccante del perossinitrito, MnTBAP, sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco indica la significatività dei trattamenti con 50µM di MnTBAP (p<0.0001) N=9.

Analogamente, il trattamento delle larve precoci con l'urato, un antiossidante endogeno (Becker, 1993) determina dopo 24 ore un rallentamento della metamorfosi, come è evidente dalla minore percentuale di individui giovani (30%) ed il concomitante aumento

delle larve con coda lunga o parzialmente ritratta (70%) rispetto ai valori del controllo di 53% e 47%, rispettivamente (Figura 24).

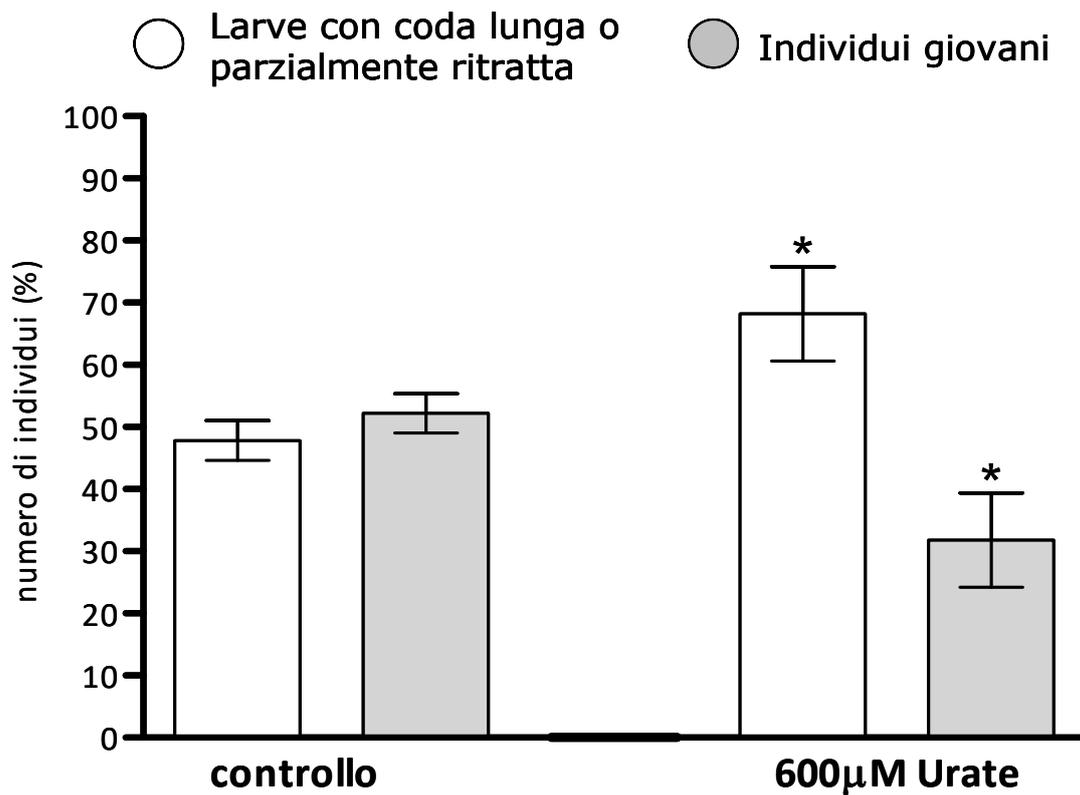


Figura 24. Effetto dell'aggiunta dell'urato sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco indica la significatività dei trattamenti con 600 μM di urato ($p < 0.01$) $N=5$.

Successivamente, le larve trattate con il perossinitrito o con il suo bloccante sono state esaminate per la fosforilazione di ERK e per la possibile correlazione tra nitratura e fosforilazione. Estratti proteici di larva tardiva controllo, trattata con MnTBAP e con ONOO⁻ sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-P-ERK e l'immunocomplesso

esaminato con anticorpi anti-NT e anti-P-ERK (Figura 25). L'analisi densitometrica della nitratura di P-ERK indica che quando la nitratura diminuisce con il MnTBAP c'è anche una concomitante diminuzione di fosforilazione rispetto al controllo. Al contrario, quando i livelli di nitratura aumentano con l'aggiunta di ONOO⁻ la fosforilazione di ERK aumenta rispetto al controllo più del doppio (Figura 25). Tali risultati dimostrano che c'è una correlazione tra fosforilazione e nitratura di ERK secondo la quale quando ERK è nitrata è fosforilata.

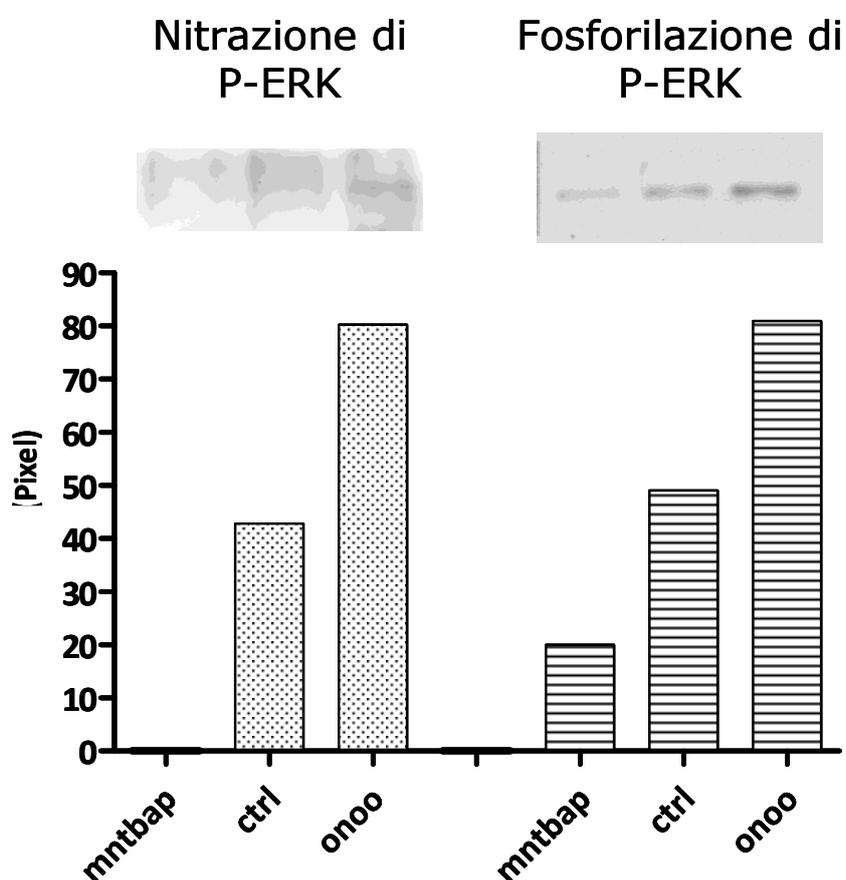


Figura 25. Interazione tra la fosforilazione di ERK e la sua nitratura. Analisi mediante western blot del livello di nitratura e fosforilazione dell'IP-P-ERK di controllo e trattato per 6 ore con 250µM di ONOO⁻ e 50µM MnTBAP. Analisi densitometrica delle bande immunopositive all'anti-NT (puntini) e ad anti-P-ERK (righe).

Analisi delle proteine ntrate durante lo sviluppo: identificazione di ERK e P-ERK ntrati

La scoperta che aumenti di RNS, ed in particolare di agenti ntranti, determini un'accelerazione del processo di metamorfosi in *ciona* (Figura 22), unitamente a dati di letteratura sul coinvolgimento dello stress ossidativo durante lo sviluppo di alcuni animali, tra cui molluschi, crostacei e pesci (Rudneva, 2004), hanno spinto ad investigare la formazione delle proteine ntrate ed il loro significato biologico durante lo sviluppo di *ciona*.

Utilizzando un anticorpo commerciale monoclonale, specifico nel riconoscimento dei residui ntrati di tirosina, il western blot ha rivelato che negli stadi embrionali, gastrula e bottone caudale, ci sono pochissime bande ntrate (Figura 26-A). Al contrario, durante gli stadi di larva precoce e tardiva, c'è un notevole incremento di ntrazione ed una serie di bande ntrate appaiono nell'intervallo di peso molecolare 105-30 kDa. Come prevedibile, la ntrazione scompare quando le larve tardive sono trattate con MnTBAP. Nessuna alterazione della ntrazione si verifica negli estratti delle larve tardive incubate con l'inibitore della NOS, TRIM. Tutte le bande immunopositive spariscono dopo il trattamento del filtro di PVDF con 10mM di ditionito che riduce le tirosine ntrate ad ammine. L'uniformità del carico è confermato dall'analisi del gel colorato con blu di coomassie e le bande immunopositive all'anti-actina (Figura 26-B).

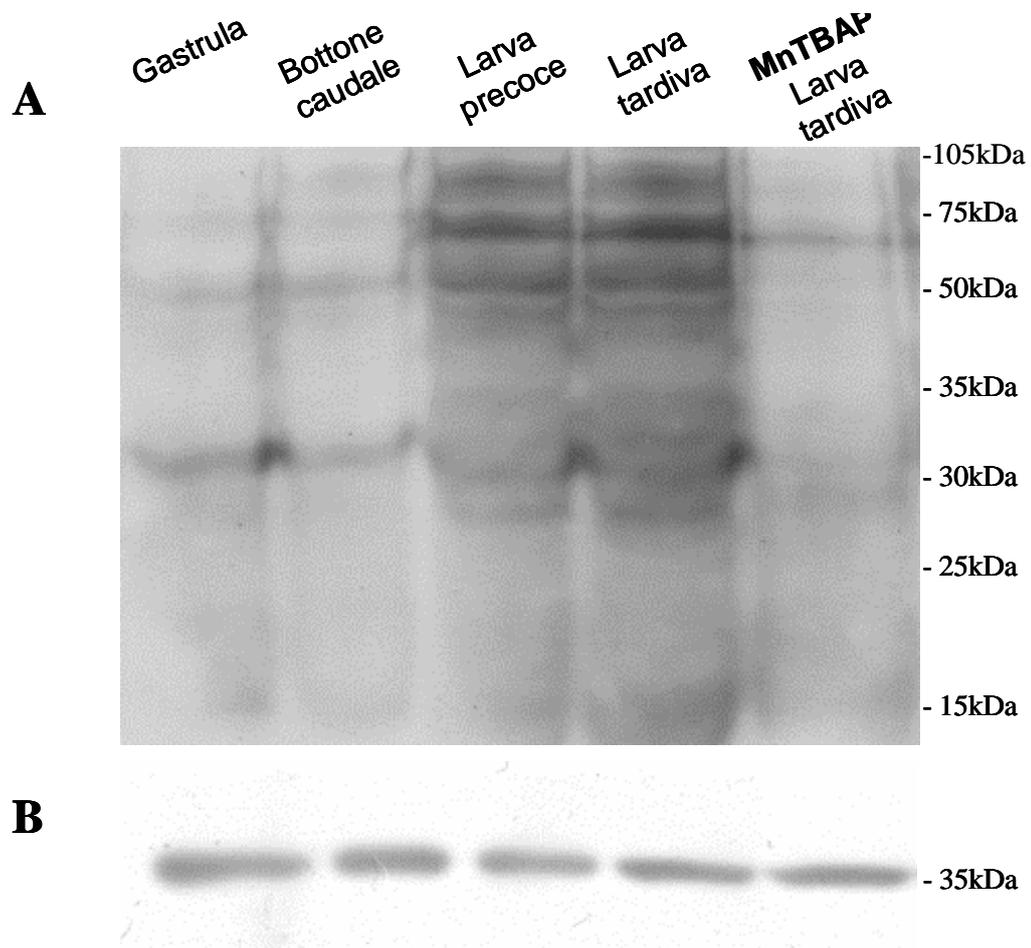


Figura 26. Nitrazione delle proteine durante lo sviluppo larvale di *C. intestinalis*. Analisi delle proteine ntrate mediante western blot degli stadi embrionali, gastrula e bottone caudale, e degli stadi larvali, larva precoce e larva tardiva. Come controllo è riportata l'analisi delle proteine ntrate di larve tardive trattate con MnTBAP (A); western blot con anti-actina per verificare l'uguaglianza dei carichi (B).

Successivamente l'attenzione è stata rivolta ad identificare alcune proteine che risultano nitrate durante lo sviluppo larvale di *ciona*. In particolare, la presenza di bande nitrate nella zona di peso molecolare della MAPK ERK (42 kDa), unitamente al ruolo chiave svolto da questa chinasi nel processo di metamorfosi (Chambon et al., 2007), hanno spinto ad investigare la possibilità che ERK, sia come tale che nella forma fosforilata, potesse essere nitrata. A tal fine è stato seguito un protocollo sequenziale di immunoprecipitazione sull'estratto proteico di larva tardiva. L'estratto è stato immunoprecipitato con anticorpi anti-P-ERK e l'immunocomplesso positivo a P-ERK (Figura 27-A,1) è risultato essere nitrato (Figura 27-A,2). Dal surnatante privo di P-ERK è stato immunoprecipitato ERK e l'immunocomplesso positivo ad ERK (Figura 27-A,3) ha mostrato positività all'anticorpo anti-nitrotirosina (Figura 27-A,4). Questi dati indicano che entrambi ERK e P-ERK sono nitrati. Questo risultato è stato confermato dagli esperimenti di 2-DE svolti in collaborazione con la prof.ssa Tedeschi Gabriella dell'Università di Milano. Infatti, le proteine ERK e P-ERK risultano essere nitrate in una analisi 2-DE dell'estratto proteico di larva tardiva (Figura 27-B). Inoltre, si evidenziano più bande immunopositive che hanno lo stesso peso molecolare ma differiscono per il punto isoelettrico, probabilmente attribuibile al diverso grado di nitratura/fosforilazione di ERK.

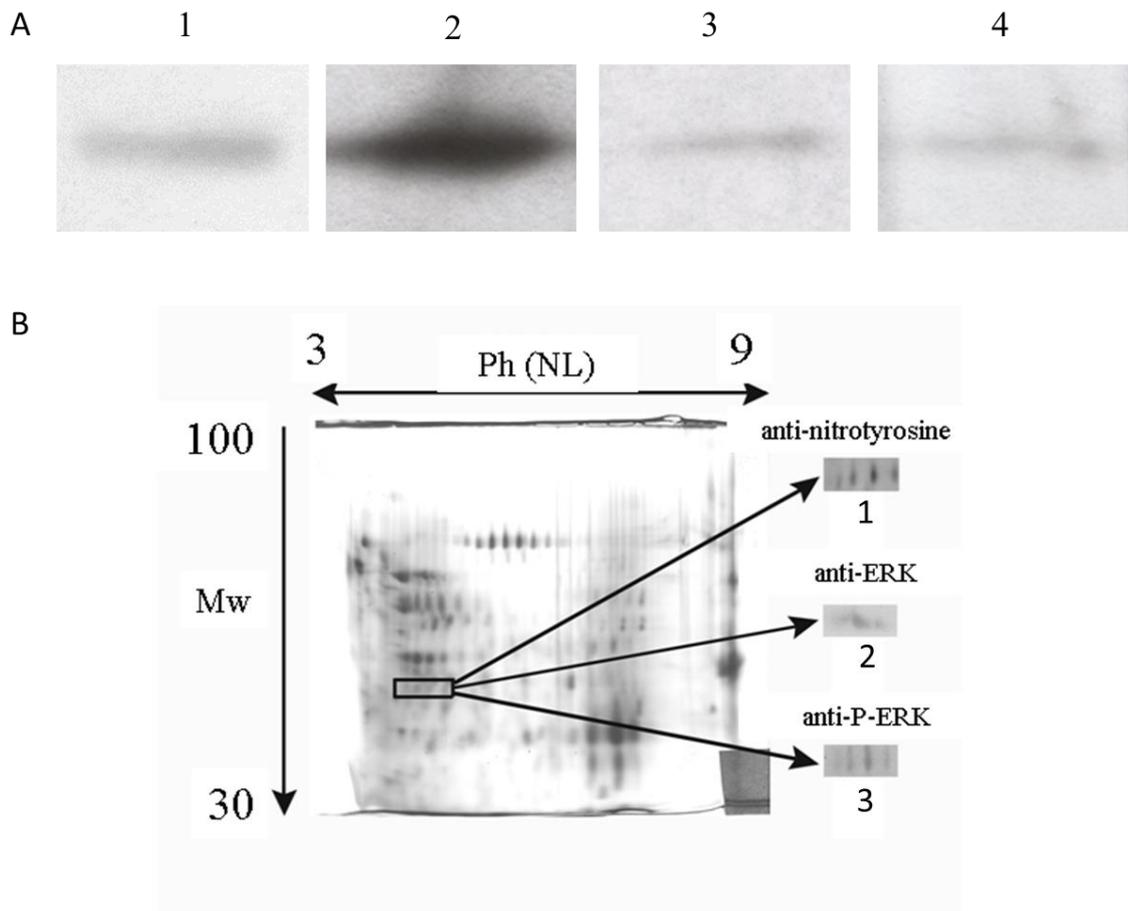


Figura 27. Identificazione di ERK e P-ERK nitrato. L'estratto proteico da larva tardiva è stato esaminato mediante esperimenti di immunoprecipitazione (A) e 2-DE (B). (A) Immunoprecipitato con P-ERK analizzato per western blot con anticorpi anti-P-ERK (1) e anti-3-NT (2). Western blot dell'immunoprecipitato di ERK dal surnatante privo di P-ERK rivelato con anticorpi anti-ERK (3) e anti-3NT (4). (B) Gel 2-DE dell'estratto proteico da larva tardiva sviluppato con argento. Western blots sviluppati con anticorpi anti-3-NT (1), anti-ERK (2) e anti-P-ERK (3).

Effetto della 2-trans-4-trans-decadienal (DD) sullo sviluppo: stadi larvali e metamorfosi

Allo scopo di comprendere la risposta larvale alla 2-trans-4-trans-decadienale (DD), differenti stadi di larve di *ciona*, precoce (alla schiusa), intermedia e tardiva, sono stati trattati con DD (0.5 µg/ml) e dopo 24 ore è stata esaminata la metamorfosi. In particolare, la larva precoce e quella intermedia non sono capaci di sentire gli stimoli esterni a differenza di quella tardiva che è definita competente. Il trattamento delle larve precoci con DD non mostra alcun effetto significativo sulla metamorfosi. Già allo stadio di larva intermedia, però, si osserva il rallentamento del processo che diventa ancora più evidente a larva tardiva. Infatti, a questo stadio, dopo il trattamento le larve ammontano per un valore di 72 % rispetto al controllo di 28% e la percentuale degli individui giovani segue un andamento opposto rispetto al controllo (Figura 28).

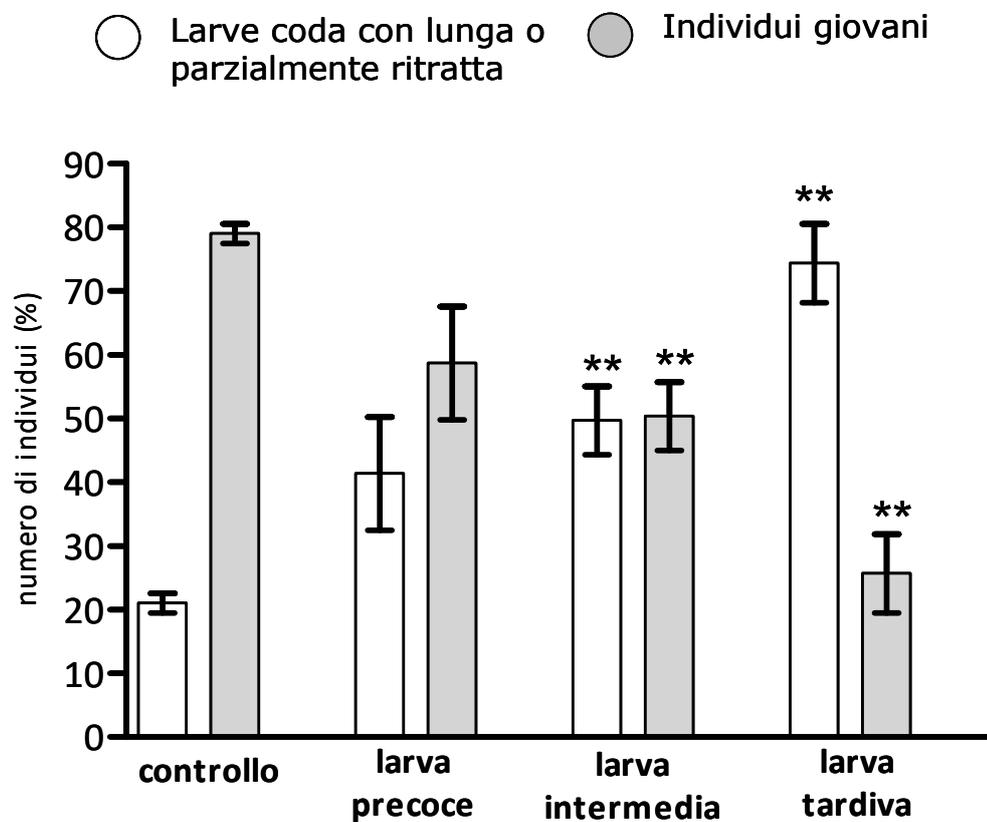


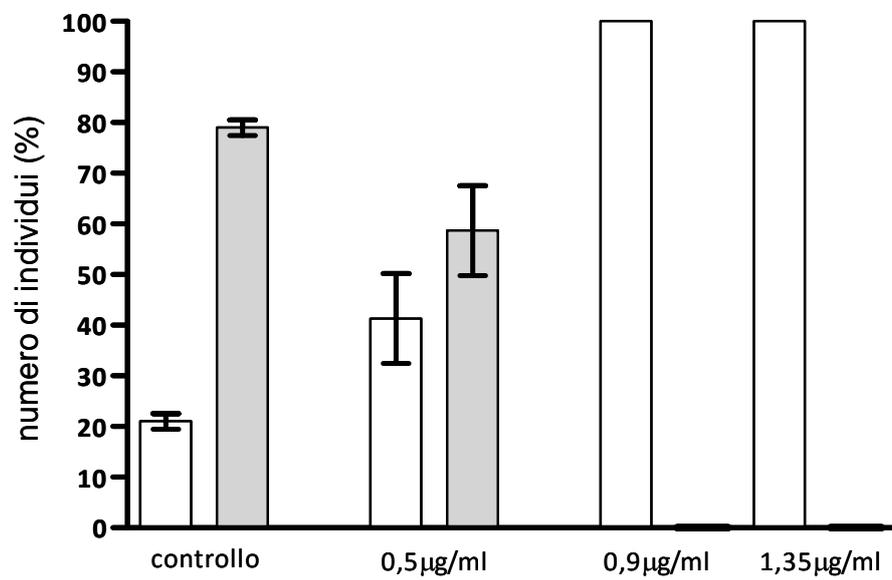
Figura 28. Effetto dell'aggiunta della DD a diversi stadi larvali sulla ritrazione della coda: precoce, intermedia e tardiva. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco indica la significatività dei trattamenti (** $p < 0.01$) rispetto al controllo) N= 7

Esperimenti successivi sono stati rivolti ad investigare l'effetto della concentrazione di DD sulla metamorfosi sia di larve precoci che tardive. In particolare, poiché DD 0,5 $\mu\text{g/ml}$ non dava alcun effetto se aggiunta alle larve precoci, si è voluto esaminare se concentrazioni maggiori influenzassero il processo. Larve precoci trattate con concentrazioni crescenti di DD mostrano dopo 24 ore dal trattamento un blocco della metamorfosi con il 100% di larve a coda lunga, a valori di 0,9 e 1,35 $\mu\text{g/ml}$ di DD (Figura 29A). L'esame microscopico delle larve trattate con alte concentrazioni di DD mostra l'influenza dell'aldeide sullo sviluppo della testa e degli organi buccali (lobo preorale, papille e palpi), responsabili dell'adesione al substrato (Figura 29B). Infatti, larve alla schiusa incubate con 0.9 $\mu\text{g/ml}$ di DD mostrano dopo 24 ore dal trattamento l'elongazione del lobo preorale e la mancanza di sviluppo dei palpi e delle papille. A concentrazioni maggiori (1.35 $\mu\text{g/ml}$), DD impedisce lo sviluppo della larva che resta allo stadio di larva precoce con la testa tonda ed accenno dei palpi.

A

○ Larve con coda lunga e parzialmente ritratte

● Individui giovani



B



Figura 29. Effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di DD a larve precoci. (A)

I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'istogramma riporta la percentuale di larve con coda lunga o parzialmente ritratta ed individui giovani del controllo e dei rispettivi trattamenti N=3; (B) Immagini di larve precoci trattate per 24 ore con 0,9 e 1,35 $\mu\text{g/ml}$ di DD/ml.

Larve tardive trattate con concentrazioni crescenti di DD mostrano dopo 24 ore un rallentamento nella metamorfosi dipendente dalla concentrazione dell'aldeide. A concentrazioni minori di 0.5 $\mu\text{g/ml}$, cioè 0.125 $\mu\text{g/ml}$ e 0.250 $\mu\text{g/ml}$, la DD non influenza in maniera significativa il processo di metamorfosi. Alla concentrazione di 0.5 $\mu\text{g/ml}$ si osserva il notevole rallentamento della metamorfosi con una percentuale elevata di larve a coda lunga. A concentrazioni maggiori, invece, l'aldeide rallenta notevolmente il processo sino ad arrivare al 100% di larve a coda lunga alle concentrazioni di 0,9 $\mu\text{g/ml}$ e 1,35 $\mu\text{g/ml}$. Il marcato rallentamento è anche evidenziato dal moto frenetico delle larve trattate che impedisce loro di attaccarsi al substrato pur avendo un apparato boccale ben formato ed adatto all'adesione. Dopo 48 ore, le larve tardive trattate con basse concentrazioni di DD iniziano e riescono a portare a termine l'intero processo di metamorfosi. A 0,5 $\mu\text{g/ml}$ le larve non sono in grado di metamorfosare completamente. Dopo 48 ore le larve hanno appena iniziato la ritrazione della coda che però non riescono a completare. Infatti, dopo 72 ore gli individui trattati non hanno ritratto completamente la coda, anche se il processo di metamorfosi sembra essere andato avanti nella testa (Figura 30). Un elemento importante emerso durante le osservazioni è che a 72 ore le larve non aderiscono saldamente al substrato. Infatti, semplicemente capovolgendo la piastra i trattati con DD si staccano, mentre nel controllo rimangono fermamente adesi. Ad alte concentrazioni le larve non sono in grado di iniziare il processo e muoiono.

○ Larve con coda lunga e parzialmente ritratte

● Individui giovani

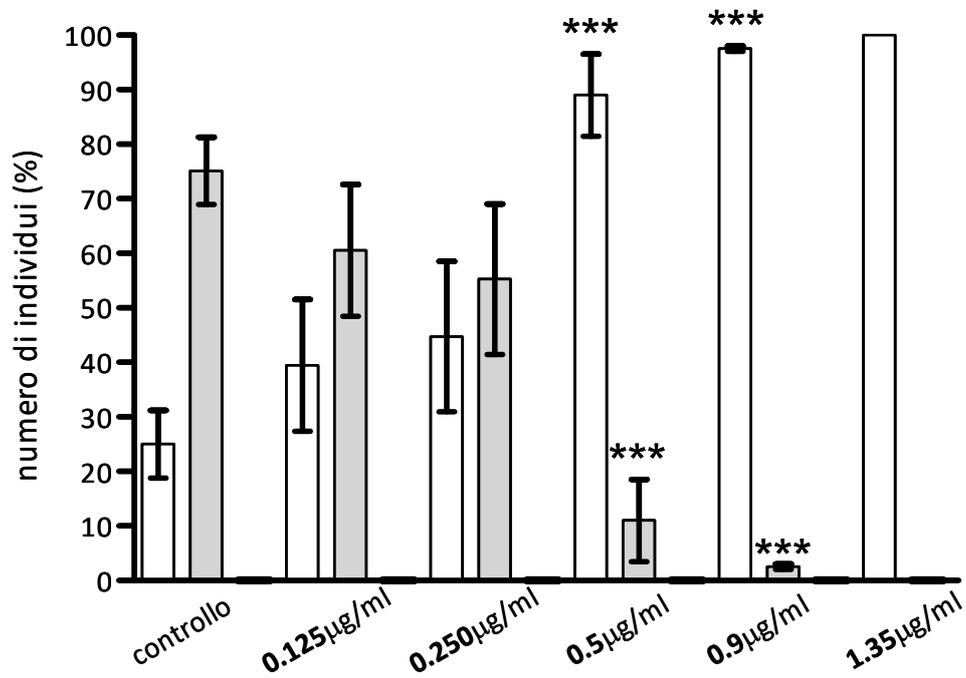


Figura 30. Effetto di concentrazioni crescenti di DD sullo sviluppo della larva tardiva. I dati sono espressi come media \pm s.e.m (unpaired t-test). L'asterisco indica la significatività dei trattamenti (***) rispetto al controllo N= 10.



Figura 31. Effetto fenotipico del trattamento con DD di larve tardive sulla metamorfosi di *C. intestinalis*. Le immagini sono state registrate dopo 72 ore dal trattamento. (a) controllo, (b) 0,5µg/ml DD.

Effetto della DD sullo sviluppo: fosforilazione della MAPK ERK

Per comprendere il rallentamento indotto dal trattamento con DD sulla metamorfosi delle larve di *Ciona* è stato studiato il livello di fosforilazione di ERK. Larve tardive trattate con 0.5 µg/ml di DD sono state raccolte a diverse ore dal trattamento ed analizzate per western blot (Figura 32-A). L'analisi densitometrica della fosforilazione di ERK mostra una netta diminuzione di P-ERK dopo 2 e 4 ore dal trattamento, mentre a tempi più lunghi non si apprezza una sostanziale differenza (Figura 32-B). Il quadro dell'attività di ERK rispecchia chiaramente l'andamento fenotipico osservato al prelievo: dopo 2 e 4 ore dal trattamento gli animali rimangono immobili, come se stessero affrontando una fase di stasi; dopo 10 ore il movimento e la reazione a luce/ombra è la stessa tra controllo e trattato.

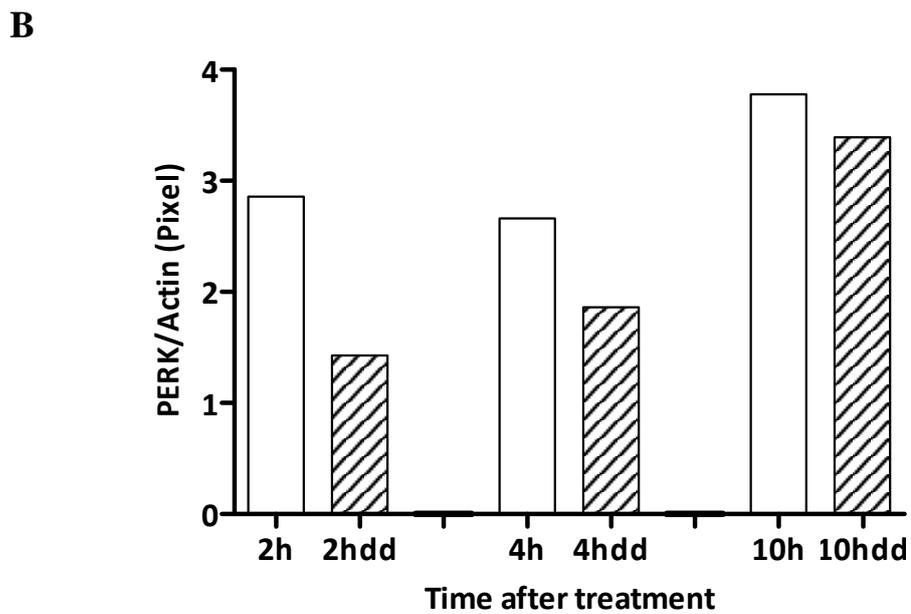
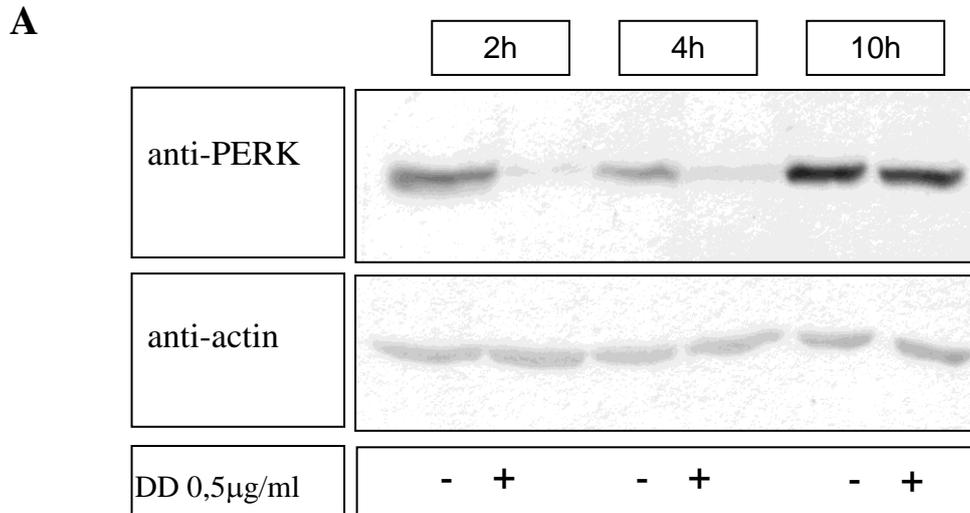


Figura 32. Variazione dei livelli di P-ERK nelle larve tardive trattate con 0.5 µg/ml di DD. Esperimento rappresentativo che mostra il Western blot sviluppato con l'anticorpo anti-P-ERK e anti-actina (A). L'istogramma riporta i valori dell'analisi densitometrica delle bande immunopositive per l'anti-P-ERK rispetto all'anti-actina (B).

Effetto della DD sullo sviluppo: espressione di hsp70

Allo scopo di comprendere la risposta alla DD delle larve di *ciona*, è stato investigato il possibile coinvolgimento delle hsp-70. Come dimostrato in letteratura, le hsp70 hanno un ruolo chiave nella risposta agli stress esterni. In particolare in risposta alle aldeidi è stato recentemente pubblicato che c'è un'incremento di espressione del gene *hsp70* inseguito al trattamento con la DD delle larve di riccio di mare *P. lividus* (Romano et al., 2011).

Dall'analisi densitometrica delle bande immunopositive all'anti-hsp70 risulta che non c'è variazione tra controllo e trattato dopo trattamento con DD sia dopo poche ore dal trattamento, 2 e 4 ore, che dopo 10 ore (Figura 33). E'interessante notare l'aumento della concentrazione di hsp70 durante la metamorfosi di *ciona*.

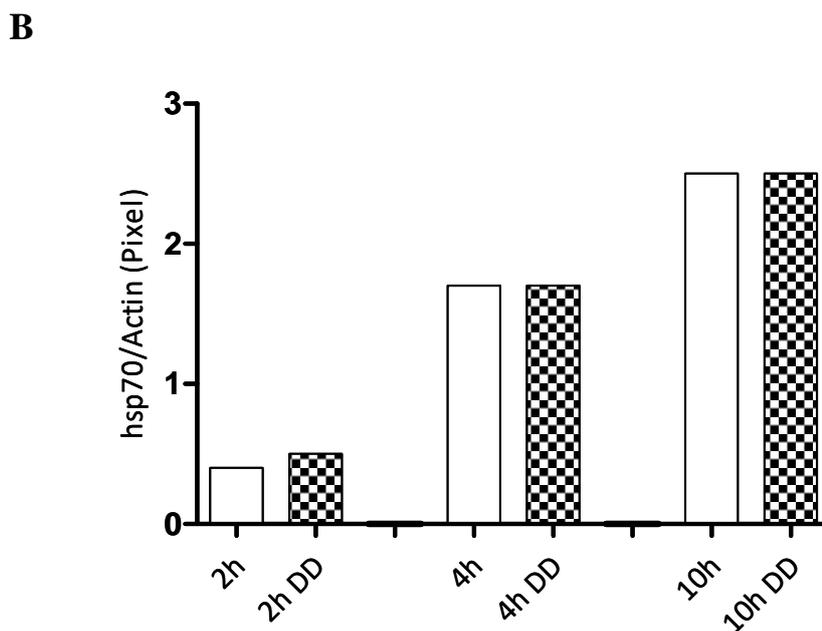
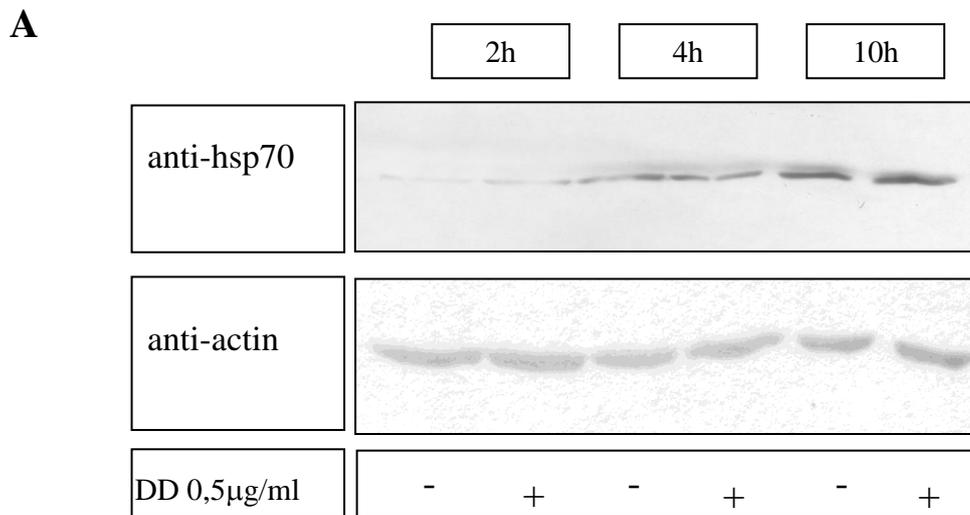


Figura 33. Andamento dell'hsp70 nelle larve tardive trattate con 0.5 µg/ml di DD.

Esperimento rappresentativo che mostra il Western blot sviluppato con l'anticorpo anti-hsp70 e anti-actina (A). L'istogramma riporta i valori dell'analisi densitometrica delle bande immunopositive per l'anti-hsp70 rispetto all'anti-actina (B).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio aggiungono un nuovo tassello al ruolo svolto dall'NO durante la metamorfosi in *ciona*, identificando altri bersagli molecolari della sua azione oltre alla caspasi-3 precedentemente individuata (Comes et al., 2007). In particolare, è stato possibile dimostrare che diminuendo i livelli endogeni di NO con l'inibitore della NOS, il TRIM, oppure con il bloccante dell'NO, il C-PTIO, si ha il rallentamento della metamorfosi, mentre aumentando la sua formazione con il donatore lento di NO, Sper/NO, si ha invece una accelerazione del processo. Questo andamento della metamorfosi è in accordo con gli esperimenti che hanno evidenziato un'azione opposta del TRIM e del C-PTIO rispetto allo Sper/NO sulla attivazione di ERK, un evento chiave che innesca la metamorfosi (Chambon et al., 2002, 2007). In particolare, il trattamento con il TRIM ed il C-PTIO determina una diminuzione della fosforilazione di ERK già dopo 4 ore. Con il TRIM la diminuzione risulta permanere anche nelle ore successive, portando inevitabilmente ad un forte rallentamento della metamorfosi anche dopo 48 ore. L'elemento interessante è che la metamorfosi avviene con il tempo ma gli individui giovani mostrano uno sviluppo ridotto rispetto al controllo. Questo fenomeno può essere attribuito sia ad alterazioni del metabolismo per cui le energie vengono utilizzate non per l'accrescimento ma per far fronte allo stress indotto dal trattamento e sia al fatto che la ridotta produzione di NO può influenzare lo sviluppo degli organi. Infatti, l'NO è stato rivelato essere presente in individui giovani di *ciona* sia negli organi digestivi in formazione e sia in quelli già formati (Comes et al., 2007). Invece, con il C-PTIO i livelli di fosforilazione di ERK tra controllo e trattato dopo 10 ore si eguagliano, portando ad un lieve rallentamento della metamorfosi e dopo 48 ore non c'è differenza tra controllo e trattato. Il recupero della fosforilazione è presumibilmente

dovuto all'esaurimento delle molecole di C-PTIO che non sono quindi più in grado di bloccare l'NO. Al contrario, il trattamento con Sper/NO dà luogo all'aumento della fosforilazione di ERK a tempi più lunghi a causa del lento rilascio dell'NO, conducendo alla fine all'accelerazione della metamorfosi. Sulla base di questi risultati, è possibile proporre che l'NO sintetizzato nella larva di *ciona* contribuisca alla fosforilazione della MAPK ERK, un evento indispensabile affinché la ritrazione della coda e la conseguente metamorfosi avvengano. Infatti, inibendo in larve appena schiuse la via di ERK con l'inibitore di MEK U0126 la metamorfosi non avviene (Chambon et al., 2007). Sulla base delle nostre conoscenze, un possibile meccanismo di attivazione di ERK da parte dell'NO potrebbe essere legato alla sua nitratura. Evidenze della relazione tra nitratura e fosforilazione di ERK in *ciona* sono fornite indirettamente dall'esame dei livelli di fosforilazione in larve la cui nitratura è stata variata mediante trattamenti con il perossinitrito o con il suo bloccante, il MnTBAP. All'aumentare della nitratura di P-ERK, aumenta anche la sua fosforilazione e viceversa, rivelando quindi una correlazione diretta tra le due modifiche post-traduzionali in *ciona*, in analogia con quanto riportato nelle cellule muscolari lisce vascolari dove la nitratura di ERK1/2 è stata mostrata indurre la sua fosforilazione (Pinzar et al., 2005). Al contrario, nei macrofagi peritoneali murini (Narang et al., 2007) o in stati patologici, come la gastropatia ipertensiva (Kinjo et al., 2008), la nitratura di ERK è stata descritta portare all'inibizione della sua via di trasduzione. Per la *ciona*, tentativi di dimostrare, mediante esperimenti di immunoprecipitazione di ERK totale, variazioni di nitratura e fosforilazione di ERK nei campioni trattati con TRIM e Sper/NO non ha dato risultati convincenti a causa della esiguità del materiale. Saranno, quindi, necessari altri approcci per investigare questo aspetto, come per esempio la spettrometria di massa. Inoltre, sarà importante verificare l'esistenza di altri meccanismi di attivazione di ERK da parte dell'NO, oltre alla nitratura di P-ERK. A tale scopo sono in corso esperimenti rivolti

ad esaminare l'espressione di geni, per esempio di fosfatasi, potenzialmente regolati da NO.

Un elemento importante emerso da questo studio è l'aver dimostrato, sia influenzando l'ambiente redox delle larve in sviluppo e sia mediante western blot, l'esistenza, durante lo sviluppo larvale di *ciona*, di un processo di stress ossidativo, mediato dall'NO, che comporta la nitratura delle proteine. Le proteine nitate, al contrario, sono poco abbondanti durante il periodo embrionale quando l'embrione è protetto dal corion. La scoperta di livelli elevati di proteine nitate durante un processo fisiologico, quale lo sviluppo, rinforza il concetto che la nitratura delle proteine sia una nuova via di trasduzione capace di agire direttamente o indirettamente su altre vie.

Fenomeni di stress ossidativo, essenzialmente a carico dei ROS, sono stati già descritti durante lo sviluppo di alcuni invertebrati (Rudneva, 1999). In particolare, l'attività di molti enzimi antiossidanti (lipossigenasi, superossido dismutasi, catalasi, perossidasi e glutatione reduttasi) aumenta durante la fase larvale del mollusco *Mytilus galloprovincialis*, del crostaceo *Artemia salina* e dei pesci *Neogobius melanostomus*, *Proterorhinus marmoratus* e *Blennius sanguinolentus*. Il grande incremento nell'attività dei più importanti enzimi antiossidanti nella fase dei nauplii e delle larve è correlata alla crescita dei livelli di radicali liberi, specie i ROS, dell'ambiente acquatico in cui l'animale si viene a trovare subito dopo la schiusa. L'aumento dell'attività antiossidante è stata anche rivelata durante le prime fasi di sviluppo di altri animali come la mosca della frutta *Ceratitidis capitata* (Fernandez-Souza and Michelson, 1976), l'insetto *Helicoverpa zea* (Chien and Dauterman, 1991), l'anfibio *Xenopus laevis* (Montesano et al., 1989) ed il mammifero *Guinea pig* (Mishra and Delivoria-Papadopoulos, 1988). In questi casi l'aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti riflette l'espressione genica durante lo sviluppo e la sintesi di queste proteine.

La rilevanza della nitrificazione delle proteine durante lo sviluppo larvale di *ciona* ha permesso di identificare che entrambi ERK e P-ERK siano nitrati. Anzi, analisi elettroforetiche bidimensionali hanno rivelato l'esistenza di diverse forme di ERK che probabilmente si differenziano per i livelli di nitrificazione e fosforilazione. Questa scoperta avvalorerebbe la relazione tra nitrificazione e fosforilazione di ERK precedentemente discussa. Oltre ad ERK e P-ERK, anche la proteina snail è stata rinvenuta nitrata durante lo sviluppo di *ciona* (Ercolesi et al., 2012). Mediante spettrometria di massa sono stati identificati i 4 residui di tirosina che risultano essere nitrati. Sulla base della posizione dei residui nitrati nella proteina è stato suggerito che la nitrificazione possa influenzare sia l'interazione di snail con gli acidi nucleici che la sua fosforilazione, modifica necessaria per regolare la sua attività di fattore di trascrizione.

Inoltre, i risultati riportati nella tesi contribuiscono ad ampliare quelli già esistenti sul ruolo dell'NO sulla metamorfosi di vari invertebrati con il ciclo vitale bifasico, quali il riccio di mare *Lytechinus pictus*, le ascidie *Boltenia villosa* e *Cnemidocarpa finmarkiensis*, le chioccioline *Ilyanassa obsoleta* e *Crepidula fornicata*, l'anellide *Capitella teleta*. In questi invertebrati, gli inibitori della NOS, tipo L-NAME, aminoguanidina emiosolfato, S-metilisotiourea solfato, sono mostrati accelerare la metamorfosi, ipotizzando che l'NO agisca da inibitore endogeno della metamorfosi durante lo stadio larvale (Bishop and Brandhorst, 2001; Bishop et al., 2001; Leise et al., 2001; Pechenik et al., 2007; Biggers et al., 2011). Quando la larva diventa competente e viene a contatto con uno stimolo appropriato, la sintesi dell'NO diminuisce e la metamorfosi può procedere. Nel mollusco *Ilyanassa obsoleta* è stato riportato che l'espressione della NOS, costante durante lo sviluppo larvale, diminuisce quando la metamorfosi viene indotta dalla serotonina (Hens et al., 2006). La situazione però non è sempre così semplice. Infatti, nel nudibranco *Phestilla sibogae* (Bishop et al., 2008) l'effetto dell'inibizione della NOS sulla metamorfosi varia secondo l'inibitore utilizzato.

Il trattamento con L-NAME fa aumentare la percentuale delle larve metamorfosate in risposta ad un induttore isolato da un corallo, mentre l'uso dell'inibitore 7-nitroindazolo ha un effetto opposto. Anche nel caso della *ciona* la situazione è analoga: L-NA determina una accelerazione della metamorfosi (Comes et al., 2007) contrariamente al TRIM che abbiamo riportato in questo lavoro di tesi avere un effetto opposto. La differenza tra i due tipi di inibitori risiede nel loro meccanismo di azione. Il TRIM è un derivato imidazolico che interferisce con il legame sia del substrato L-arginina che del cofattore BH₄ (Handy et al., 1995, 1996, 1997), risultando quindi più potente degli inibitori competitivi che agiscono solo a livello del substrato, tipo L-NA, L-NAME, normalmente utilizzati. Il TRIM, infatti, è molto attivo in embrioni di pesce zebra *Danio rerio* nel diminuire il battito cardiaco, a differenza dell'L-NAME che mostra un effetto quasi trascurabile sul processo (Holmqvist et al., 2007). Nel caso della *ciona*, è ragionevole ipotizzare che utilizzando l'inibitore competitivo L-NA la fosforilazione di ERK avvenga e che l'azione dell'NO sia rivelabile a livello della caspasi. Invece, in presenza dell'inibitore più efficace della NOS, il TRIM, l'effetto dell'NO è identificabile già a livello della fosforilazione di ERK.

Un altro aspetto rilevante che è stato indagato nel progetto di tesi riguarda la risposta delle larve di *ciona* allo stress utilizzando come agente l'aldeide polinsatura DD prodotta dalle diatomee. Trattando differenti stadi di larve a tempi diversi dalla schiusa è stato possibile dimostrare che solo trattando le larve tardive con DD si osserva il rallentamento della metamorfosi, indicando quindi che le larve devono essere competenti per rispondere all'azione dell'aldeide, probabilmente attraverso lo sviluppo di strutture sensoriali capaci di sentire l'aldeide.

Analogamente a quanto osservato riducendo i livelli di NO, anche il trattamento con DD determina una riduzione della fosforilazione di ERK. Allo scopo di delineare il meccanismo di azione della DD saranno necessari ulteriori esperimenti volti sia ad

esaminare l'espressione di geni coinvolti nel processo che evidenziano una relazione tra nitrificazione e fosforilazione di ERK in seguito al trattamento con DD. A tale riguardo, esperimenti condotti su immunoprecipitati di ERK totale non hanno rivelato tale relazione a causa della esiguità del materiale. Particolare attenzione sarà rivolta ad investigare il possibile coinvolgimento dell'NO nel mediare l'azione della DD in *ciona*, analogamente a quanto riportato avvenire in altri sistemi, quali la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* ed il riccio di mare *P. lividus*. Nella diatomea il trattamento con DD innesca un sistema di sorveglianza dello stress basato sulla produzione di NO (Vardi et al., 2006). Inoltre, la produzione dell'NO aumenta in embrioni di riccio di mare in sviluppo trattati con DD all'aumentare della concentrazione dell'aldeide (Romano et al., 2011). Ad alte concentrazioni di DD, l'NO media gli eventi apoptotici iniziali che portano alla perdita della funzionalità mitocondriale, mentre a basse concentrazioni l'NO attiva il gene *hsp70* proteggendo così l'embrione dall'effetto teratogeno dell'aldeide. Infatti, quando i livelli di NO vengono ridotti in presenza dell'inibitore della NOS, TRIM, l'espressione di *hsp70* diminuisce e la proporzione di plutei anormali aumenta. Quando invece i livelli di NO vengono aumentati con il donatore Sper/NO si ha un aumento dell'espressione del gene. Nel caso della *ciona*, invece, gli esperimenti riportati in questa tesi non hanno evidenziato alcuna differenza nella espressione di *hsp70* tra controllo e trattato con DD, suggerendo l'esistenza di vie alternative di trasduzione. Un elemento interessante emerso dai risultati qui riportati è l'aumento della proteina *hsp70* durante lo sviluppo di *ciona*. Questo dato è in accordo con quanto descritto in letteratura sull'innalzamento dell'espressione genica di *hsp70* durante lo sviluppo di *Xenopus laevis* (Helkkila et al., 1997), *Drosophila melanogaster* (Lakhotia and Prasanth, 2002) e *Danio rerio* (Blechinger et al., 2002; Krone et al., 2003). Infatti le *hsp*, inizialmente identificate solo come proteine attivate dallo stress

termico, si comportano come modulatori della struttura proteica anche durante il normale sviluppo embrionale e larvale

BIBLIOGRAFIA

Andreakis N, D'Aniello S, Albalat R, Patti FP, Garcia-Fernàndez J, Procaccini G., Sordino P, Palumbo A. Evolution of the nitric oxide synthase family in metazoans, *Mol Biol Evol.* 28 (2011) 163-79.

Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase, *Lancet.* 363 (2004) 731-3.

Becker BF. Towards the physiological function of uric acid, *Free Radic Biol Med.* 14 (1993) 615-31.

Benton JL, Sandeman DC, Beltz BS. Nitric oxide in the crustacean brain: regulation of neurogenesis and morphogenesis in the developing olfactory pathway, *Dev Dyn.* 236 (2007) 3047-60.

Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylation: Relevance to signal transduction, *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 1776–1780.

Biggers WJ, Pires A, Pechenik A, Johns E, Patel P, Polson T, Polson J. Inhibitors of nitric oxide synthase induce larval settlement and metamorphosis of the polychaete annelid *Capitella teleta*, *Inv. Repr. Dev.* DOI 10 (1080/07924259) (2011) 588006.

Bishop CD, Bates WR, Brandhorst BP. Regulation of metamorphosis in ascidians involves NO/cGMP signaling and HSP90, *J Exp Zool.* 289 (2001) 374-84.

Bishop CD and Brandhorst BP. NO/cGMP signalling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urching *Lytechinus pictus*, *Biol Bull.* 3 (2011) 394-40.

Blechinger SR, Evans TG, Tang PT, Kuwada JY, Warren JT Jr, Krone PH. Heat-inducible zebrafish hsp70 gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions, *Mech. Dev.* 112 (2002) 213-215.

Cappelletti G, Maggioni MG, Tedeschi G, Maci R. Protein tyrosine nitration is triggered by nerve growth factor during neuronal differentiation of PC12 cells, *Exp Cell Res.* 288 (2003) 9-20.

Cappelletti G, Tedeschi G, Maggioni MG, Negri A, Nonnis S, Maci R. The nitration of tau protein in neurone-like PC12 cells, *FEBS Lett.* 562 (2004) 35-9.

Chambon J-P., Nakayama A, Takamura K, McDougall A, Satoh N. ERK- and JNK-signalling regulate gene networks that stimulate metamorphosis and apoptosis in tail tissues of ascidian tadpoles, *Development* 134 (2007) 1203-1219.

Chambon J-P, Soule J, Pomies P, Fort P, Sahuquet A, Alexandre D, Mangeat P-H, Baghdiguian S. Tail regression in *Ciona intestinalis* (Prochordate) involves a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation, *Development* 129 (2002) 3105-3114.

Chiba S, Sasaki A, Nakayama A, Takamura K, Satoh N. Development of *Ciona intestinalis* juveniles (through 2nd ascidian stage), *Zoolog Sci.* 21 (2004) 285-98.

Chien, C.; Dauterman, W.C. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea*, *Insect Biochemistry* 21 (1991) 857-864.

Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric Oxide as a Pro-apoptotic as well as Anti-apoptotic Modulator, *J Biochem Mol Biol.* 35 (2002) 116-126.

Cirino P, Toscano A, Caramello D, Macina A, Miraglia V, Monte A. Laboratory culture of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.): a model system for molecular developmental biology research, *Mar. Mod. Elec. Rec.* [serial online].

Cloney R.A. Ascidian Larvae and Events of Metamorphosis, *American Zoology* 22 (1982) 817-826.

Cobbs CS, Whisenhunt TR, Wesemann DR, Harkins LE, Van Meir EG, Samanta M. Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells, *Cancer Res.* 63 (2003) 8670-8673.

Comes S, Locascio A, Silvestre F, d'Ischia M, Russo GL, Tosti E, Branno M, Palumbo A. Regulatory roles of nitric oxide during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis*, *Dev Bio.* 306 (2007) 772-84.

Csibi A, Communi D, Muller N, Bottari SP. Angiotensin II inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation and Akt activation through tyrosine nitration-dependent mechanisms, *Plos one* 5 (2010) 1-13.

Ercolesi E, Tedeschi G, Fiore G, Negri A, Maffioli E, d'Ischia M, Palumbo A. Protein nitration as footprint of oxidative stress-related nitric oxide signaling pathways in developing *Ciona intestinalis*, *Nitric Oxide* 27 (2012) 18-24.

Fernandez-Sousa JM, Michelson AM. Variation of superoxide dismutases during the development of the fruit fly *Ceratitis capitata* L., *Biochem Biophys Res Commun.* 73 (1976) 217-23.

Giannopoulou E, Katsoris P, Polytarchou C, Papadimitriou E. Nitration of cytoskeletal proteins in the chicken embryo chorioallantoic membrane, *Arch Biochem Biophys* 400 (2002) 188-98

Giovine M, Pozzolini M, Favre A, Bavestrello G, Cerrano C. Heat stress-activated, calcium-dependent nitric oxide synthase in sponges, *Nitric Oxide* 5 (2001) 427-431.

Goldstein S, Russo A, Samuni A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂ and O₂, *J. Biol Chem.* 278 (2003) 50949 – 50955.

Graziewicz M, Wink DA, Laval F. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms of NO-mediated DNA damage, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2501-2505.

Griffiths C, Wykes V, Bellamy TC, Garthwaite J. A new and simple method for delivering clamped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors, *Mol Pharm.* 64 (2003) 1349-1356.

Handy RL, Wallace P, Gaffen ZA, Whitehead KJ, Moore PK. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the mouse, *Br J Pharmacol.* 116 (1995) 2349-50.

Handy RL, Harb HL, Wallace P, Gaffen Z, Whitehead KJ, Moore PK. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects, *Br J Pharmacol.* 119 (1996) 423-31.

Handy RL, Moore PK. Mechanism of the inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), *Life Sci.* 60 (1997) PL389-94.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction, *Med Sci Monit.* 7 (2001) 801-819.

Hansen E, Even Y, Genevière AM. The alfa, beta, gamma, delta-unsaturated aldehyde 2-trans-4-trans-decadienal disturbs DNA replication and mitotic events in early sea urching embryos, *Toxicol Sci.* 81(2004) 190-197.

Heikkila JJ, Ohan N, Tam Y, Ali A. Heat shock protein gene expression during *Xenopus* development, *CMLS* (1997) 114–121.

Hens MD, Fowler KA, Leise EM. Induction of metamorphosis decreases nitric oxide synthase gene expression in larvae of the marine mollusc *Ilyanassa obsoleta* (say), *Biol Bull.* 211 (2006) 208-211.

Holmberg A, Olsson C, Holmgren S. The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae, *J Exp Biol.* 13 (2006) 2472-2479.

Holmqvist B, Ebbesson L, Alm P. Nitric oxide and the zebrafish (*Danio rerio*): Developmental neurobiology and brain neurogenesis, *Nitric Oxide* 1 (2007) 229–273, 459–464.

Huhmer AF, Gerber NC, de Montellano PR, Schoneich C. Peroxynitrite reduction of calmodulin stimulation of neuronal nitric oxide synthase, *Chem Res Toxicol.* 9 (1996) 484-491.

Huhmer AF, Nishida CR, Ortiz de Montellano PR, Schoneich C. Inactivation of the inducible nitric oxide synthase by peroxynitrite, *Chem Res Toxicol.* 10 (1997) 618-626.

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Hiramoto K, Kashiwagi A, Utsumi K. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis, *Redox Report* 9 (2004) 237-247.

Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species, *Arch Biochem Biophys.*356 (1998) 1-11.

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

Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA. NONOates' (1-substituted diazen-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms, *Methods Enzymol.* 268 (1996) 281–293.

Kinjo N, Kawanaka H, Akahoshi T, Yamaguchi S, Yoshida D, Anegawa G, Konishi K, Tomikawa M, Tanoue K, Tarnawski A, Hashizume M, Maehara Y. Significance of ERK nitration in portal hypertensive gastropathy and its therapeutic implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295 (2008) G1016-24.

Kotsyuba E.P. Effect of Elevated Temperature and of Hypoxia on NO Activity in the Central Nervous System of Bivalve Molluscs, *J Evo Bioch Physiol.* 44 (2008) 237-246.

Krone PH, Evans TG, Blechinger SR. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis, *Seminars in Cell and Dev Biol.* 14 (2003) 267-274.

Kuhn DM, Sadidi M, Liu X, Kreipke C, Geddes T, Borges C, Watson JT. Peroxynitrite-induced nitration of tyrosine hydroxylase: identification of tyrosines 423, 428, and 432 as sites of modification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight

mass spectrometry and tyrosine-scanning mutagenesis, *J Biol Chem.* 277 (2002) 14336-14342.

Lakhotia SC and Prasanth KV. Tissue and development-specific induction and turnover of hsp70 transcripts from loci 87A and 87C after heat shock and during recovery in *Drosophila melanogaster*, *J Exp Biol.* 205 (2002) 345-358.

Leise E, Thavaradhara K, Durham N, Turner B. Serotonin and nitric oxide regulate metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsolete*, *American Zoologist* 41 (2001) 122–131.

Mallery SR, Pei P, Landwehr DJ, Clark CM, Bradburn JE, Ness GM, Robertson FM. Implications for oxidative and nitrative stress in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi's sarcoma, *Carcinogenesis* 25 (2004) 597-603.

Martinez-Ruiz A and Lamas S. Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: from the discovery of a gas messenger to the mediation of nonenzymatic posttranslational modifications, *IUBMB Life* 61 (2009) 91-8.

Melanine E.M.Kelly and Steven Barnes. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in the retina, *The Neuroscientist* 3 (1997) 357-360.

Miralto A, Barone G., Romano G, Poulet SA, Ianora A, Russo GL, Buttino I, Mazzarella G., Laabir M, Cabrinik M, Giacobbe MG. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction, *Nature* 402 (1999) 173-176.

Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Anti-oxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and the effect of maternal hypoxia. *Brain Res.* 470 (1988) 173-9.

Montesano L, Carri MT, Mariottini P, Amaldi F, Rotilio G. "Developmental expression of Cu,Zn superoxide dismutase in *Xenopus*: Constant level of the enzyme in oogenesis and embryogenesis. *Eur J Biochem.* 186 (1989) 421-426.

Nakayama-Ishimura A, Chambon JP, Horie T, Satoh N, Sasakura Y. Delineate metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Dev Biol.* 326 (2009) 357-367.

Narang H, Dhariwala FA, Krishna M. Effect of nitric oxide donor and gamma irradiation on modifications of ERK and JNK in murine peritoneal macrophages, *J Cell Commun Signal.* 1 (2007) 219-226.

Padrini E, Vijaya Geetha B, Usha Rani M. Pollution induced nitrate stress and heat shock protein 70 overexpression in fish liver mitochondria, *Sci Total Environ.* 407 (2009) 1307-17.

Palumbo Anna Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* A142 (2005) 241-248.

Paul-Clark MJ, Roviezzo F, Flower R J, Cirino G, Soldato PD, Adcock IM, Perretti M. Glucocorticoid receptor nitration leads to enhanced anti-inflammatory effects of novel steroid ligands, *J Immunol.* 171 (2003) 3245-3252.

Pechenik JA, Cochrane DE, Li W, West ET, Pires A, Leppo M. Nitric oxide inhibits metamorphosis in larvae of *Crepidula fornicata*, the slipper shell snail, *Biol Bull.* 213 (2007) 160-71.

Phnert G and Boland W. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms, *Natural products rep.* 19 (2002) 108-12.

- Phoa N and Epe B. Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells, *Carcinogenesis* 23 (2002) 469-475.
- Pinzar E, Wang T, Garrido MR, Xu W, Levy P, Bottari SP. Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5100-5104.
- Romano G, Costantini M, Buttino I, Ianora A, Palumbo A. Nitric Oxide Mediates the Stress Response Induced by Diatom Aldehydes in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*, *PlosOne* 6 (2011) e25980.
- Romano G, Russo GL, Buttino I, Ianora A, Miralto A. A marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos, *J Exp Biol.* 206 (2003) 3487-3494.
- Romano G, Miralto A, Ianora A. Teratogenic effects of diatom metabolites on sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos, *Marine Drugs* 8 (2010) 950-967
- Rudneva II. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 122 (1999) 265-271.
- Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci.* 53 (1997) 576-582.
- Schindler H and Bpgdan C. NO as a signalling molecule: effects on kinases, *International Immunopharm.* 1 (2001) 1443-1455.
- Semenova MN and Ozernyuk ND. Effects of NO-synthase inhibitors on embryonal development of sea urchins, *Zh Evol Biokhim Fiziol.* 40 (2004) 229-234.

Souza JM, Choi I, Chen Q, Weisse M, Daikhin E, Yudkoff M, Obin M, Ara J, Horwitz J, Ischiropoulos H. Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins, *Arch Biochem Biophys.* 380 (2000) 360-366.

Tedeschi G, Cappelletti G, Negri A, Pagliato L, Maggioni MG, Maci R, Ronchi S. Characterization of nitroproteome in neuron-like PC12 cells differentiated with nerve growth factor: identification of two nitration sites in alpha-tubulin, *Proteomics* 5 (2005) 2422-2432.

Tosti E, Romano G, Buttino I, Cuomo A, Ianora A, Miralto A. Bioactive Aldehydes from diatoms block the fertilization current in ascidian oocytes, *Mol Reprod Dev* 66 (2003) 72-80.

Upmacis RK, Deeb RS, Resnick MJ, Lindenbaum R, Gamss C, Mittar D, Hajjar DP. Involvement of mitogen-activated protein kinase in peroxynitrite-mediated arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Cell Physiol.* 286 (2004) C1271-1280.

Vardi A, Formiggini F, Casotti R, De Martino A, Ribalet F, Miralto A, Bowler C. A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms, *PLoS Biol.* 4 (2006) e60.

Yamamoto T, Yao Y, Harumi T, Suzuki N. Localization of thenitric oxide/cGMP signaling pathway-related genes and influences of morpholino knock-down of soluble guanylyl cyclase on medaka fish embryogenesis, *Zoolog Sci.* 20 (2003) 181-191.

Zhang ZB, Liu CY, Wu ZZ, Xing L, Li PF. Detection of nitric oxide in culture media and studies on nitric oxide formation by marine microalgae, *Med Sci Monit.* 12 (2006) 75-85.

Zickus MA, Fonseca FV, Tummala M, Black SM, Ryzhov V. Identification of the tyrosine nitration sites in human endothelial nitric oxide synthase by liquid chromatography-mass spectrometry, *Eur J Mass Spectrom.* 14 (2008) 239-47.

Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 23 (2004) 2838-2849.