

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali  
Scuola di Dottorato Terra, Ambiente e Biodiversità

***Clava multicornis* (Hydrozoa): un nuovo  
modello sperimentale di cnidario.**



Tutor: Dr.ssa Roberta Pennati

Tesi di dottorato di  
**Alessandro Dell'Anna**  
Matr. N. R08059

*Ai miei Genitori*

# Indice

Ringraziamenti	5
Riassunto	6
<b>1 Introduzione</b>	<b>9</b>
1.1 Importanza degli cnidari negli studi di biologia evoluzionistica	9
1.2 L'asse corporeo degli cnidari	11
1.3 Terzo foglietto	14
1.4 Sistema nervoso	15
1.5 Rigenerazione	17
1.6 Organizzazione del sistema nervoso	18
1.7 Cnidari utilizzati in biologia dello sviluppo	19
1.7.1 <i>Nematostella vectensis</i> (Anthozoa)	20
1.7.2 <i>Acropora millepora</i> (Anthozoa)	20
1.7.3 <i>Hydra</i> (Hydrozoa)	21
1.7.4 <i>Clytia hemisphaerica</i> (Hydrozoa)	21
1.8 <i>Clava multicornis</i> (Hydrozoa)	22
1.9 Bibliografia	23
<b>2 Organizzazione del sistema nervoso della larva planula di</b> <b><i>Clava multicornis</i> (Hydrozoa)</b>	<b>39</b>
2.1 Riassunto	39
2.2 Introduzione	39
2.3 Materiali e metodi	42
2.3.1 Raccolta del materiale	42
2.3.2 Fissazione e conservazione delle planule	43
2.3.3 Immunomarcatura	43
2.3.4 Protocollo per l'immunomarcatura nelle planule	43
2.4 Risultati	45
2.4.1 Sviluppo e locomozione delle larve planule	45
2.4.2 Polarizzazione anteriore del piano corporeo della planula	46
2.4.3 Organizzazione del sistema nervoso della planula	46
2.4.4 Localizzazione e morfologia dei neuroni GLWamide-immunoreattivi	47
2.4.5 Localizzazione e morfologia dei neuroni RFamide-immunoreattivi	48
2.5 Discussione	54
2.5.1 Polarizzazione anteriore del sistema nervoso della larva	55

2.5.2 Considerazioni evoluzionistiche	59
2.6 Bibliografia	61
<b>3 La metamorfosi di <i>Clava multicornis</i>: riarrangiamento del sistema nervoso</b>	<b>70</b>
3.1 Riassunto	70
3.2 Introduzione	70
3.3 Materiali e metodi	75
3.3.1 Animali	75
3.3.2 SEM	75
3.3.3 Immunomarcatura	76
3.3.4 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)	76
3.4 Risultati	77
3.4.1 Morfologia SEM	77
3.4.2 Riarrangiamento dei neuroni GLWamide e RFamide.	78
3.4.3 Apoptosi	79
3.5 Discussione	84
3.5.1 Fasi e morfologia della metamorfosi	84
3.5.2 Distribuzione GLW e RF nella larva e nel polipo	84
3.6 Bibliografia	87
<b>4 Ruolo delle vie di segnale di Wnt e di FGF durante lo sviluppo dell'idrozoo</b>	
<b><i>Clava multicornis</i>: effetti dei trattamenti con LiCl e Su5402</b>	<b>90</b>
4.1 Riassunto	90
4.2 Introduzione	91
4.2.1 Le vie di segnale di WNT	91
4.2.2 WNT negli cnidari	92
4.2.3 Effetti del LiCl sullo sviluppo embrionale	92
4.2.4 La via di segnale di FGF	93
4.2.5 Effetti dell'SU5402	93
4.3 Materiali e metodi	94
4.3.1 Animali	94
4.3.2 Trattamenti con cloruro di litio e SU 5402	94
4.3.3 Misure e analisi statistica	94
4.3.4 Immunolocalizzazione	95
4.4 Risultati	96
4.4.1 Analisi morfologica degli effetti dei trattamenti con LiCl e con Su5402	96

4.4.2 Effetti dei trattamenti sullo sviluppo del sistema nervoso	97
4.5 Discussione	104
4.6 Bibliografia	105
<b>5 Effetti del trattamento con Acido retinoico sullo sviluppo embrionale di</b>	
<b><i>Clava multicornis</i></b>	109
5.1 Riassunto	109
5.2 Introduzione	109
5.3 Materiali e metodi	111
5.3.1 Trattamento di colonie di <i>Clava multicornis</i> con acido retinoico e citrale	111
5.3.2 Immunoistochimica	113
5.4 Risultati	114
5.4.1 Effetti del trattamento con acido retinoico (RA)	114
5.4.2 Effetti del trattamento con citrale	115
5.4.3 Effetti dei trattamenti con RA sul comportamento fototropico	115
5.5 Discussione	123
5.6 Bibliografia	126
<b>6 Influenza dell'acido retinoico nei processi rigenerativi delle colonne gastriche</b>	
<b>di <i>Clava multicornis</i></b>	131
6.1 Riassunto	131
6.2 Introduzione	131
6.3 Materiali e metodi	135
6.3.1 Animali	135
6.3.2 Rimozione di idranti e stoloni	135
6.3.3 Immunolocalizzazione	136
6.4 Risultati	136
6.4.1 Rigenerazione	136
6.5 Discussione	142
6.6 Bibliografia	144
<b>7 Conclusione</b>	149

## ***Ringraziamenti***

*Durante questi tre anni ho avuto il piacere di collaborare con diverse persone che hanno contribuito alla mia crescita umana e professionale, vorrei quindi esprimere a loro tutta la mia gratitudine.*

*Un ringraziamento particolare va alla mia Tutor, la Dr.ssa Roberta Pennati. Sempre presente, la sua guida e i suoi consigli mi hanno permesso di portare a termine questo lavoro.*

*Altrettanto vivamente ringrazio la Prof.ssa Fiorenza De Bernardi, per la disponibilità ed il supporto scientifico fornito alla mia tesi.*

*Un ringraziamento speciale al Prof. Stefano Piraino, la cui collaborazione è stata fondamentale per lo svolgimento di questo lavoro.*

*Infine, ma non ultimo, un grazie immenso alla Dr.ssa Giuliana Zega, che mi ha spronato e aiutato nei momenti di difficoltà.*

## Riassunto

Lo scopo del mio lavoro di dottorato è stato quello di approfondire le conoscenze riguardo una specie di cnidario, *Clava multicornis*, per verificare la possibilità di utilizzare questo animale come modello da laboratorio in studi di biologia dello sviluppo e di biologia evolutiva.

L'organizzazione del sistema nervoso degli cnidari è stata ampiamente studiata nei polipi e nelle meduse, ma poco si sa sul sistema nervoso delle larve planule. In questo lavoro vengono descritte le caratteristiche istologiche e citologiche del sistema nervoso della planula dell'idrozo *Clava multicornis*. Queste planule strisciano sul substrato mediante un movimento ciliare coordinato e direzionato, accoppiato a movimenti di flessione muscolare laterale associati con fototassi positiva. L'analisi istologica evidenzia una pronunciata regionalizzazione antero-posteriore del sistema nervoso della planula, con diversi tipi di cellule neurali altamente concentrati al polo anteriore. Nella metà anteriore della planula, il plesso di neuriti ectodermici basali forma un'ampia rete di fibre che si intersecano ortogonalmente, mentre nella metà posteriore i neuriti si estendono longitudinalmente lungo l'asse corporeo. Ulteriori livelli di complessità del sistema nervoso sono stati scoperti tramite analisi immunocitochimica specifica per i neuropeptidi che ha rilevato distinti sottoinsiemi neurali.

I neuroni possono essere distinti in base alla presenza di neuropeptidi: le cellule GLWamide positive sono disposte nella regione più anteriore organizzate a formare una cupola e sono seguite da una cintura di cellule RFamide positive; entrambi i tipi cellulari sono collegati ad un plesso ectodermico-basale anteriore. Durante la metamorfosi, la larva aderisce al substrato con la parte anteriore che si sviluppa nella regione del disco basale del polipo, mentre la parte posteriore costituisce la regione orale.

Per chiarire il destino delle cellule neurali in *C. multicornis*, abbiamo studiato il modello di distribuzione delle cellule sensoriali GLWamide e RFamide positive nelle diverse fasi della metamorfosi. Abbiamo osservato che l'immunoreattività era ancora presente al polo anteriore della larva durante la fase dell'adesione, ma a poco a poco scompariva durante le fasi successive della metamorfosi. Solo negli stadi tardivi le cellule positive apparivano intorno alla bocca del polipo primario. Mediante test TUNEL sono stati identificati i nuclei apoptotici al polo anteriore della larva adesa, nella stessa regione occupata dalle cellule sensoriali. Questi risultati suggeriscono che almeno una parte dei neuroni della larva degenera, durante la metamorfosi, per apoptosi e che almeno una parte del sistema nervoso adulto è costituito dalla differenziazione "de novo".

Le vie di segnale di WNT e di FGF sono coinvolte nella determinazione degli assi corporei in numerosi animali modello. Inoltre la via di FGF è coinvolta anche nel differenziamento cellulare. Il cloruro di litio agisce attivando la via canonica di segnale di WNT. SU5402 è un antagonista dei recettori di FGF e agisce inibendo la via di segnale di FGF. Per ottenere indicazioni circa la presenza di queste vie negli cnidari sono stati analizzati gli effetti dei trattamenti con cloruro di litio e SU5402 sullo sviluppo embrionale di *Clava multicornis*. I risultati ottenuti mostrano che gli animali trattati mantengono una lunghezza paragonabile agli esemplari di controllo, mentre cambia la forma dei due poli degli animali. Infatti le larve trattate con cloruro di litio assumono una forma a bastoncino invece della tipica forma a clava, mentre le larve trattate con SU5402 sono a forma di cuneo. Successivamente negli animali trattati si sono evidenziate, mediante immunolocalizzazione, le cellule del sistema nervoso contenenti peptidi GLWamidati ed RFamidati. È risultato che ci sono differenze nella posizione delle cellule e nel loro numero sia nelle larve trattate con cloruro di litio che in quelle trattate con SU5402. Questo dimostra che le due sostanze interferiscono con il corretto sviluppo dell'animale. Gli effetti che queste due sostanze hanno avuto su *Clava multicornis* suggeriscono la probabile presenza della via di segnale di WNT e di FGF in questi animali.

L'acido retinoico (RA) è un noto morfogeno che regola la determinazione spaziale delle strutture corporee lungo l'asse antero-posteriore nei vertebrati ed in altri cordati.

È noto che i retinoidi possono influenzare i pattern di specificazione nei polipi dell'idrozoo *Hydractinia echinata*.

Sono stati testati gli effetti dell'RA, e di un suo antagonista, sullo sviluppo di *Clava multicornis* tramite l'analisi dell'organizzazione del sistema nervoso e del comportamento fototattico delle larve esposte all'RA durante l'embriogenesi. Dopo l'esposizione, il sistema nervoso appare completamente disorganizzato e le cellule RFamide immunoreattive sono dislocate.

Inoltre le larve trattate con RA perdono il loro tipico comportamento fototropico riscontrato negli individui di controllo.

La capacità rigenerativa degli cnidari è notevole. Il polipo di acqua dolce, *Hydra*, un membro del phylum Cnidaria, è famoso per la sua capacità rigenerativa.

In questo lavoro sono stati analizzati i processi rigenerativi di colonne gastriche dell'idrozoo *Clava multicornis*, trattando quest'ultime con concentrazioni crescenti di RA al fine di valutarne gli effetti. Concentrazioni di RA  $10^{-7}$  M non hanno un effetto notevole sulla rigenerazione delle porzioni amputate dal polipo, infatti si nota una tipologia di elementi rigenerati simili al controllo. L'RA  $10^{-6}$  M comporta la prevalente rigenerazione degli stoloni.

È di notevole interesse ampliare le conoscenze sui meccanismi che controllano lo sviluppo del sistema nervoso negli cnidari e come il suo sviluppo si relazioni con lo sviluppo del sistema nervoso dei bilateri. Infatti questi risultati aprono importanti prospettive sul significato evolutivo dell'antagonismo tra RA e FGF/WNT nei metazoi basali.

# 1 Introduzione

Lo scopo del mio lavoro di dottorato è stato quello di approfondire le conoscenze riguardo una specie di cnidario, *Clava multicornis*, per verificare la possibilità di utilizzare questo animale come modello da laboratorio in studi di biologia dello sviluppo e di biologia evolutiva.

Ho inizialmente definito una procedura per il mantenimento degli animali in condizioni da laboratorio, in seguito ho analizzato i tempi di sviluppo in laboratorio, l'organizzazione corporea della larva, descritto la metamorfosi e la rigenerazione, con particolare riferimento al sistema nervoso e alle sue modificazioni. In fine ho verificato la possibilità di utilizzare questo organismo in condizioni sperimentali, sottoponendo embrioni a vari stadi di sviluppo o polipi in rigenerazione all'azione di acido retinoico e ad antagonisti della via di segnale Wnt e FGF.

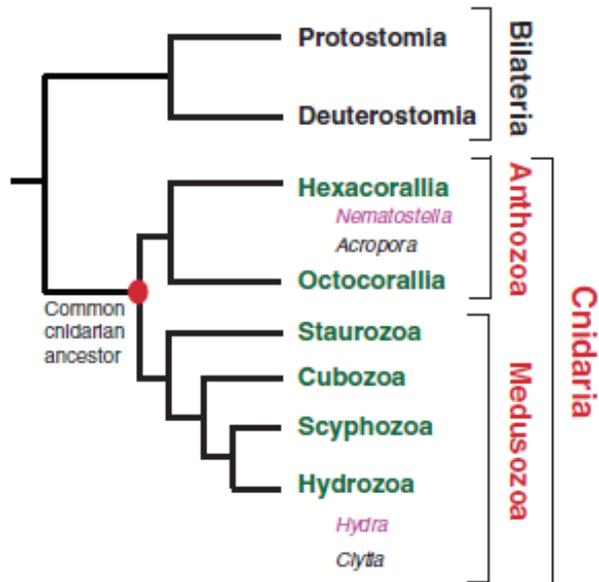
Nel complesso i risultati ottenuti indicano che *Clava multicornis* è una specie che si presta ad essere utilizzata come animale sperimentale, per la facilità di mantenimento in laboratorio, per la possibilità di ottenere diverse centinaia di embrioni e larve e per la maneggevolezza degli stessi.

## 1.1 Importanza degli cnidari negli studi di biologia evolutiva

Il phylum Cnidaria annovera circa 9000 specie di organismi che vivono in ambienti acquatici (prevalentemente marini). La caratteristica peculiare del phylum è la presenza di tipiche cellule urticanti, gli cnidociti, situate soprattutto nei tentacoli. Questi, se stimolati, estroflettono una frusta dentellata che si conficca nella preda iniettando un liquido urticante. Gli cnidociti possono essere utilizzati per la predazione, per la difesa o come organi di adesione (Holstein, 1981; Lengfeld et al., 2009; Tardent e Holstein, 1982).

Gli cnidari sono suddivisi in due gruppi principali: Anthozoa, che presentano solo la forma polipoide, e Medusozoa che presentano anche la forma a medusa benché in alcuni casi sia stata secondariamente persa.

Gli antozoi sono considerati un gruppo basale all'interno degli cnidari (Bridge et al., 1995; Medina et al., 2001; Collins, 2002; Dunn et al., 2008). Una recente analisi filogenetica molecolare basata su più di trecento sequenze proteiche ortologhe suggerisce che gli antozoi hanno conservato gran parte della complessità genetica ancestrale dell'antenato comune di cnidari e bilateri (Chourrout et al., 2006.; Putnam et al., 2007; Ryan et al., 2006; Technau et al., 2005).



**Relazioni filogenetiche nel phylum Cnidaria.** Un albero filogenetico [basato sui risultati di Collins (Collins, 2002) e Collins et al. (Collins et al., 2006)] che mostra le relazioni all'interno del phylum Cnidaria. Le due divisioni principali di Cnidaria (Anthozoa e Medusozoa) sono indicate in rosso. Anthozoa è una classe che contiene due sottoclassi (verdi), mentre Medusozoa è un subphylum composta da quattro classi (verdi). Sono disponibili i genomi sequenziati (rosa) per *Nematostella* e *Hydra* (Chapman et al, 2010;.. Putnam et al, 2007), mentre il genoma di *Acropora* e *Clitya* sono in corso di sequenziamento (nero) (Collins 2006).

Gli cnidari hanno una simmetria esterna radiale, ma molti membri del phylum presentano asimmetrie interne e bilateralità. Per esempio, i polipi di antozoo possiedono una bilateralità interna per l'organizzazione asimmetrica della faringe, la presenza del sifonoglifo ed dei muscoli retrattori del mesentero (Faurot, 1895; Faurot, 1903; Hyman, 1940; Jägersten, 1955; Salvini-Plawen, 1978).

Negli ultimi anni, l'interesse per l'uso di cnidari, ed altri metazoi basali, come organismi modello è cresciuto in particolare con l'obiettivo di comprendere l'evoluzione dei Bilateria.

Il phylum Cnidaria è una ramificazione precoce della linea evolutiva dei metazoi e possibili appartenenti a quattro delle cinque classi di cnidari (Anthozoa, Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Staurozoa) sono stati identificati nei reperti fossili del Cambriano (Cartwright et al. 2007), indicando che la notevole diversificazione degli cnidari avvenne circa 500 milioni di anni fa.

Le principali caratteristiche dell'organizzazione corporea che distinguono uno cnidario da un bilaterio sono la simmetria radiale con presenza di un unico asse corporeo, la presenza di due soli foglietti embrionali (manca il mesoderma) e la presenza di un sistema nervoso centralizzato.

Molte delle ricerche effettuate sugli cnidari negli ultimi anni hanno cercato di chiarire dettagli della loro biologia in relazione a questi aspetti al fine di comprendere l'origine dei bilateri.

Questi studi sono notevolmente aumentati in seguito al sequenziamento del genoma di due specie modello *Hydra magnipapillata* e *Nematostella vectensis* (*Hydra*,

<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra>; *Nematostella*, <http://www.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/Nvectensis>) che ha dato impulso a nuovi studi di tipo molecolare.

Quando sono stati avviati gli studi molecolari sugli cnidari, uno degli obiettivi principali è stato quello di determinare se il toolkit genetico utilizzato per costruire l'embrione bilaterio (rappresentato principalmente negli animali modello *D. melanogaster*, *C. elegans*, anfi, zebrafish e topo) fosse presente nell'antenato comune di cnidari e bilateri.

Nonostante la loro anatomia relativamente semplice, gli cnidari hanno un numero sorprendentemente elevato di geni. La prima prova di questa serie di dati proviene da librerie EST di *Acropora* e *Nematostella* (Ball et al., 2004; Kortschak et al., 2003; Miller et al., 2005; Technau et al., 2005) ed il sequenziamento del genoma di *Nematostella* conferma questo punto di vista (Miller e Ball, 2008; Putnam et al., 2007). Un sorprendente esempio della complessità dell'insieme dei geni degli cnidari deriva dalla constatazione che *Nematostella* dispone di tutti i membri della famiglia Wnt (ad eccezione della sottofamiglia Wnt9) che si trovano nei bilateri (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006). Il confronto delle sequenze genomiche tra *Nematostella* e *Hydra* permette di notare che *Hydra* ha subito una notevole perdita di geni rispetto a *Nematostella* (Chapman et al., 2010). Altri studi recenti hanno rivelato l'evoluzione e l'espansione di geni taxon-specifici degli cnidari, geni cioè che non hanno controparte in altri taxa e che sono quindi coinvolti nell'evoluzione di cellule e tessuti specifici, come le nematociti (Foret et al., 2010; Hwang et al., 2010; Khalturin et al., 2008; Khalturin et al., 2009; Steele and Dana, 2009; Steele et al., 2011).

Negli ultimi anni numerosi dogmi della biologia degli cnidari sono stati riconsiderati criticamente alla luce di nuove evidenze anatomiche, embriologiche, e genetico-molecolari (Boero et al., 2007; Seipel & Schmid, 2005, 2006) che hanno portato a riconsiderare gli Cnidari come un taxon centrale nella evoluzione dei Metazoi, in cui era già presente il corredo genetico di base per la formazione del mesoderma e della bilateralità (Putnam et al., 2007; Ryan et al., 2007).

## **1.2 L'asse corporeo degli cnidari**

Come ricordato, gli cnidari sono tradizionalmente considerati animali a simmetria raggiata con un unico asse corporeo. Una questione che ha suscitato numerose ipotesi e alimentato la ricerca recente riguarda la correlazione tra l'asse oro-aborale dei polipi e delle meduse e i due assi del corpo dei bilateri.

L'asse antero-posteriore (A-P) nei bilateri è specificato dall'azione combinata dei geni *Hox* che sono espressi in modo sfalsato lungo l'asse, coallineati con la loro organizzazione nel genoma. La presenza di un cluster *Hox* ed il relativo modello d'espressione è inteso come un'indicazione di un ruolo conservato dei geni *Hox* nella specificazione dell'asse A-P del corpo. I risultati attuali indicano che la storia evolutiva dei geni *Hox* (e *ParaHox*) negli cnidari è complessa (comprende ad esempio perdite secondarie e modelli di espressione variabile) e che la storia dell'organizzazione nel genoma di questi geni è difficile da ricostruire. Sembra probabile, comunque, che un codice *Hox* non operi negli cnidari sull'asse oro-aborale (Chiori et al., 2009) e che i cambiamenti genetici di oltre 500 milioni di anni di evoluzione indipendente hanno oscurato la relazione tra le funzioni degli *Hox* e *ParaHox* in questo phylum e in quello dei bilateri (Chourrout et al., 2006; Finnerty et al., 2004; Kamm et al., 2006; Thomas-Chollier et al., 2010).

Considerando che gli studi dei geni *Hox* non sono stati così illuminanti quanto sperato per quanto riguarda l'evoluzione degli assi nei metazoi, sono stati effettuati degli studi sulla via di segnale Wnt. In *Hydra*, sono stati clonati i geni che codificano per la maggior parte dei componenti della via di segnale Wnt canonica, e sette dei dieci geni *Wnt* identificati in *Hydra* sono espressi nell'ipostomio (Hobmayer et al., 2000; Lengfeld et al., 2009). Inoltre, tutti i geni *Wnt* indagati mostrano una espressione spazialmente sfalsata lungo l'asse oro-aborale nella larva planula di *Nematostella* e nel polipo di *Hydra*, suggerendo che essi siano coinvolti nella determinazione di questo asse (Guder et al., 2006; Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006). Tuttavia, rimane in dubbio se il ruolo di segnale di Wnt sia di specificare l'asse, secondo le dinamiche dei geni *Hox*, o di controllare la gastrulazione e la formazione dell'endoderma, poiché l'attivazione della via Wnt canonica, tramite il trattamento con LiCl, porta anche ad un ampliamento dell'endoderma durante la gastrulazione (Wikramanayake et al., 2003).

In *Clytia*, sono espressi maternalmente due recettori Frizzled di Wnt e sono localizzati alle estremità opposte dell'uovo, dove agiscono per definire l'asse oro-aborale (Momose e Houlston, 2007). Inoltre, un gene *Wnt* espresso maternalmente è responsabile della formazione dell'asse durante l'embriogenesi precoce in *Clytia* (Momose et al., 2008). La via di segnale Wnt sembra giocare un ruolo importante anche nella determinazione dell'asse corporeo nell'embrione e nel polipo di *Hydractinia echinata* (Duffy et al., 2010; Plickert et al., 2006). Recenti dati suggeriscono l'esistenza in *Hydra* di un collegamento tra le vie di segnale Wnt canoniche e non canoniche durante la formazione della gemma (Philipp et al., 2009). Oltre ai recettori e ligandi Wnt, diversi componenti intracellulari della via di segnale Wnt canonica, tra cui Dishevelled e

$\beta$ -catenina, hanno una funzione nella formazione degli assi e nella gastrulazione degli cnidari (Gee et al., 2010; Lee et al., 2007).

Così, negli cnidari, la via di segnale Wnt sembra giocare un ruolo decisivo nello stabilire il polo orale che si svilupperà successivamente nell'ipostomio del polipo. Questo sembra essere uno dei meccanismi di sviluppo più antichi e conservati nell'evoluzione animale perché nei vertebrati e in altri organismi, la segnale Wnt canonica è coinvolta nella definizione del blastoporo o di un derivato di esso (Weaver e Kimelman, 2004). Dato che la via di segnale Wnt è cruciale nei vertebrati per lo sviluppo dell'estremità posteriore, si è portati a omologare l'asse A-P dei vertebrati con l'asse oro-aborale degli cnidari. Tuttavia, a differenza degli cnidari, gli ampi movimenti morfogenetici dei tessuti che caratterizzano la gastrulazione dei vertebrati possono modificare la posizione assiale delle cellule: mentre la regione del blastoporo diventa il polo posteriore, le prime cellule involute del labbro dorsale hanno un destino dorso-anteriore. Quindi, sembra probabile che l'asse oro-aborale degli cnidari corrisponda all'asse vegetale-animale dei vertebrati.

L'asse dorso-ventrale (D-V) dei bilateri è stabilito attraverso l'azione coordinata del fattore di trascrizione *BMP2/4* (Dpp in *Drosophila*) e del suo antagonista, *Chordin*. Lo studio di questi geni negli cnidari può aiutare a ricostruire la storia evolutiva dell'asse D-V. Durante l'embriogenesi degli antozoi *Nematostella* e *Acropora* sono espressi componenti della via di segnale di BMP (Technau et al., 2005). Sorprendentemente, in *Acropora* l'omologo *Bmp2/4* è espresso asimmetricamente (Hayward et al., 2002). Successivamente, si è constatato che *Bmp2/4*, il suo co-fattore *bmp5-8*, il ligando BMP-simile *gdf5*, gli antagonisti *chordin* e *gremlin1*, così come molti altri geni, sono espressi asimmetricamente rispetto all'asse oro-aborale di *Nematostella* (Finnerty et al., 2004; Hayward et al., 2002; Matus et al., 2006a; Matus et al., 2006b; Rentzsch et al., 2006).

Questi risultati dimostrano l'esistenza di un secondo asse corporeo definito molecularmente, perpendicolare all'asse del corpo oro-aborale, definito asse direttivo. Sorprendentemente, in *Nematostella*, *BMP2 / 4* e *chordin* non formano gradienti di espressione opposti come fanno nei vertebrati o nei moscerini, ma sono espressi sullo stesso lato dopo essere espressi inizialmente a raggiera intorno al blastoporo (Rentzsch et al., 2006). Recenti scoperte suggeriscono che la funzione di BMP e *chordin* in un ciclo di feedback negativo indica che la segnale BMP è necessaria per l'instaurarsi dell'asimmetria (Saina et al., 2009). Non è attualmente chiaro quali siano le conseguenze dell'asimmetria molecolare della segnale di BMP negli antozoi, ma durante la metamorfosi in polipo primario, l'espressione di *Bmp2 / 4* si localizza in tutti gli otto mesenteri, dove potrebbe regolare la differenziazione dei muscoli retrattori (Finnerty et al., 2004;

Saina e Technau, 2009). Al contrario, in *Hydra*, in cui l'asimmetria morfologica non è rilevabile, l'espressione di *chordin* è radiale nel polipo adulto, mentre ha un'espressione dinamica durante la gemmazione e la rigenerazione. Ciò suggerisce che la perdita di simmetria causata dalla segnalazione BMP è stata o persa durante l'evoluzione o ripristinata a raggiera nello stadio di polipo di *Hydra*, portando ad una radializzazione secondaria del piano corporeo (Rentzsch et al., 2007).

Chordin è una componente importante dell'organizzatore di Spemann-Mangold e, quindi, l'espressione di *chordin* e dei geni Wnt nel blastoporo degli cnidari suggerisce che gli organizzatori degli cnidari e dei bilateri siano omologhi.

In accordo con questa osservazione, in esperimenti di divisione di embrioni di *Nematostella*, solo la metà orale è in grado di generare un polipo normale (Fritzenwanker et al., 2007; Lee et al., 2007). Inoltre, il trapianto di parte del labbro del blastoporo di *Nematostella* in una gastrula iniziale in posizione aborale induce la comparsa di un secondo asse oro-aborale (Kraus et al., 2007), indicando che il blastoporo degli cnidari (o parte di esso) è omologo all'organizzatore del blastoporo dei vertebrati. L'attività di organizzatore è presente anche al polo orale del polipo di *Hydra*, nell'ipostomio, che si sviluppa direttamente dal blastoporo embrionale (Browne, 1909). La via di segnale Wnt è cruciale per l'attività organizzativa dell'ipostomio, dato che una sovraregolazione della via canonica di Wnt induce in *Hydra* la formazione di una testa ectopica nel corpo dell'animale (Broun e Bode, 2002; Broun et al., 2005; Gee et al., 2010).

In sintesi, BMP e chordin (o altre molecole leganti BMP) sono componenti di un antico sistema molecolare utilizzato per generare asimmetrie assiali. Poiché le conseguenze morfologiche della diffusione di questo sistema negli cnidari sono drasticamente diverse da quelle dei bilateri, è prematuro omologare l'asse direttivo degli cnidari con l'asse D-V dei bilateri. Tuttavia, è chiaro che l'antenato comune degli cnidari e dei bilateri usava questa via di segnale per la differenziazione dell'asse corporeo.

### **1.3 Terzo foglietto**

Gli cnidari sono stati a lungo ritenuti animali diploblastici, poichè *Hydra* è stato il sistema modello sperimentale maggiormente utilizzato. Recenti studi e una revisione critica di osservazioni da tempo note hanno dato origine alla nuova ipotesi sull'origine della triploblastia che precede la divergenza tra cnidari e bilateri (Boero et al. 1998; Martindale et al. 2004; Boero et al. 2005; Seipel and Schmid 2005, 2006).

Dati di tipo istologico e di tipo sperimentale hanno rinforzato l'ipotesi della presenza del mesoderma in tutte le classi di cnidari. Nei polipi di Anthozoa, Scyphozoa e Staurozoa sono presenti muscoli retrattori subepidermici immersi nella matrice extracellulare che non fanno parte della muscolatura mio-epiteliale e che derivano invece dalla differenziazione di cellule mesenchimali che migrano dall'ectoderma. Le meduse di scifozoi e cubozoi presentano nei tentacoli fasci di muscolatura liscia e di cellule nervose isolati in gran parte dai tessuti ectodermici e endodermici (Seipel e Schmid 2006). In modo ancor più sorprendente, nella gemma della medusa degli idrozoi, l'entocodone (formato da un blastema proliferativo derivato per delaminazione dall'ectoderma) si sviluppa in un mesotelio tridimensionale che delimita una cavità secondaria (il compartimento subombrellare) e che si differenzierà in una muscolatura striata (Boero et al. 1998; Ball et al. 2004).

L'entocodone degli idrozoi risponde così alla definizione di mesoderma anche nella sua accezione più restrittiva (Seipel and Schmid 2006).

La scoperta negli cnidari di orologi di geni del mesoderma dei bilateri e lo studio dei loro pattern d'espressione (Spring et al. 2000; Spring et al. 2002; Seipel and Schmid 2005) ha fornito ulteriore sostegno alla teoria secondo la quale l'ultimo comune antenato di cnidari e bilateri possedeva già il toolkit genico per una organizzazione corporea di tipo triploblastico.

L'organizzazione diploblastica dei polipi di idrozoo può essere interpretata come uno stato derivato o come uno stato "larvale" che precede lo stadio adulto compiutamente triblastico, ossia la medusa.

## **1.4 Sistema nervoso**

La funzione del sistema nervoso è percepire gli stimoli ambientali, integrare le informazioni ed elaborare risposte da trasmettere ai sistemi effettori. La comparsa della cellula nervosa è quindi uno degli eventi di primo piano nell'evoluzione animale.

Gli cnidari sono considerati i più primitivi metazoi dotati di un sistema nervoso (SN), costituito da reti neuronali diffuse nell'ectoderma e nell'endoderma (Mackie, 2004). Ciascuna di queste reti nervose è costituita da un reticolo bidimensionale di neuroni bi- e multipolari che possono condurre l'impulso nervoso in più direzioni (Westfall, 1996).

Le indagini sul sistema nervoso negli Cnidari sono state condotte prevalentemente sui due morfi principali del ciclo vitale, polipo e medusa. Nei polipi e nelle meduse il sistema nervoso è composto da motoneuroni, interneuroni gangliari e cellule sensoriali (Watanabe et al, 2009; Galliot et al, 2009).

I polipi generalmente possiedono una rete nervosa epiteliale "diffusa", con assenza di centri di elaborazione sensoriali o motori, ad eccezione di una concentrazione di elementi neurali localizzati intorno alla bocca. Questa rete nervosa non è comunque omogenea poiché la distribuzione dei neuroni non è uniforme, sia a livello qualitativo sia quantitativo. Per esempio, in *Hydra*, possono essere identificati sottoinsiemi neurali distinti con una distribuzione spaziale specifica (Grimmelikhuijzen et al., 1989; Koizumi et al., 1990), e la densità neurale è almeno sei volte superiore nell'idrante rispetto al corpo colonnare. Le cellule nervose, che rappresentano circa il 3% del numero totale delle cellule (David, 1973), possono essere cellule sensoriali o neuroni gangliari. I corpi cellulari della maggior parte dei neuroni sensoriali si trovano nell'ectoderma, e i loro processi raggiungono la superficie, mentre i neuroni gangliari bipolari e multipolari, che sono il tipo più comune di cellule neuronali, sono diffusi in entrambi i tessuti, lungo la mesoglea, e funzionano come interneuroni. Nelle meduse è presente un sistema nervoso più complesso, organizzato radialmente con uno o due anelli nervosi localizzati al margine dell'ombrella. Questi anelli permettono di connettere diversi tipi di cellule neurali ed includono organi di senso, come statocisti, ocelli e ropali, per formare il circuito neurale necessario a coordinare i movimenti e permettere una visione complessa (Garm et al, 2007a, b.; Parkefelt e Ekström, 2009). Nelle meduse i neuroni sensoriali possono funzionare come motoneuroni sensoriali, stabilendo sinapsi bidirezionali con le loro cellule bersaglio, cioè le cellule mioepiteliali e le nematociti (Anderson, 1985; Garm et al, 2006). L'anello nervoso è considerato come un sistema nervoso centrale, coinvolto nel coordinamento del comportamento (Grimmelikhuijzen and Westfall, 1995; Mackie, 2004; Garm et al., 2007; Koizumi, 2007). Le funzioni di queste strutture neurali possono essere considerate simili a quelle del sistema nervoso centrale degli animali bilaterali (Mackie, 2004; Garm et al, 2006).

In contrasto con una conoscenza dettagliata del sistema nervoso negli cnidari adulti, poco si sa circa l'organizzazione neurale nei primi stadi di sviluppo. La presenza di neuroni nella larva è stata dimostrata nei tre taxa principali di cnidari, cioè *Anthozoa* (Chia e Koss, 1979; Miller e Ball, 2000;. Hayward et al, 2001;. Marlow et al, 2009), *Hydrozoa* (Martin e Thomas, 1980, 1981; Thomas et al, 1987;. Plickert et al, 1988; Martin, 1992, 2000) e *Scyphozoa* (Nakanishi et al, 2008; Yuan et al, 2008).

Le planule natanti di alcuni antozoi e scifozoi possiedono una popolazione di cellule cigliate allungate nell'ectoderma del polo anteriore, con nuclei basali, che formano l'organo apicale, o ciuffo apicale, una struttura sensoriale probabilmente coinvolta nella percezione di segnali chimici nel luogo dove avverrà la metamorfosi (Widersten, 1968; Chia e Bickell, 1978; Chia e

Koss, 1979; Nakanishi et al, 2008;. Yuan et al., 2008, Marlow et al 2009). Generalmente nelle planule degli idrozoi questa struttura non è presente.

## 1.5 Rigenerazione

Una caratteristica sorprendente degli cnidari è la loro capacità di rigenerare parti del corpo.

Ad esempio, un polipo di *Hydra*, quando viene diviso in due, rigenera le strutture mancanti al polo orale e aborale entro 2-4 giorni (Trembley, 1744). In realtà, *Hydra* può essere tagliata in circa 20 frammenti, ognuno dei quali rigenera un polipo completo (Bode e Bode, 1980). Ancora più straordinario: *Hydra* può essere dissociata in una sospensione di cellule che, quando riaggregate, rigenerano polipi “de novo” (Gierer et al., 1972; Technau et al., 2000; Technau e Holstein, 1992).

In *Hydra*, che è il modello più studiato, le nuove cellule epiteliali derivano dalla divisione delle cellule epiteliali esistenti, mentre i neuroni, le nematociti, le cellule ghiandolari e i gameti derivano dalle cellule staminali multipotenti chiamate cellule interstiziali (David e Murphy, 1977; Bode, 1996; Bosch, 2009).

È interessante notare che le cellule staminali interstiziali non sono state finora segnalate al di fuori della classe Hydrozoa e non è chiaro come compaiano i tipi di cellule differenziate durante la propagazione asessuale nelle altre classi di cnidari .

Numerosi studi negli ultimi anni sono stati incentrati nel chiarire i processi rigenerativi in *Hydra* a livello molecolare, esaminando il coinvolgimento delle vie di segnale ed i fattori di trascrizione conservati nei metazoi, come ad esempio la via Wnt e Brachyury (Bielen et al., 2007; Broun e Bode, 2002; Broun et al., 2005; Chera et al., 2009; Galliot, 2000; Galliot et al., 2008; Gee et al., 2010; Hobmayer et al., 2000; Holstein et al., 1991; Holstein et al., 2003; Lengfeld et al., 2009; Technau e Bode, 1999). Negli ultimi anni, si è iniziato ad esplorare le basi molecolari della rigenerazione anche in altri cnidari (Burton e Finnerty, 2009).

Recenti studi comparativi hanno rivelato che molte molecole segnale e fattori di trascrizione sono implicati nello sviluppo neurale e sono altamente conservati tra i bilateri. Tuttavia, è attualmente sconosciuto come i programmi genetici che regolano lo sviluppo del complesso sistema nervoso nei moderni bilateri siano apparsi durante l'evoluzione degli Eumetazoi e come si siano ulteriormente evoluti nei diversi phyla animali. Gli cnidari sono considerati il primo gruppo di organismi nell'evoluzione animale a possedere un sistema nervoso.

In aggiunta alla rete nervosa, diverse specie di cnidari possiedono un notevole grado di regionalizzazione del sistema nervoso. La regionalizzazione neurale è più evidente nei

Medusozoa dove supporta un elaborato sistema visivo e sensoriale come i ropali. Negli cnidari sono stati isolati molti neuropeptidi che funzionano da neurotrasmettitori: in molti casi la localizzazione è stata ben definita ma la funzione biologica a livello sinaptico od ormonale è nota solo in pochi casi (Grimmelikhuijzen et al 1996; Kass-Simon e Pierobon 2007). Anche se non è stato ancora ottenuto un quadro completo del sistema nervoso degli cnidari, gli studi sui neuropeptidi hanno contribuito alla comprensione della complessità strutturale della rete nervosa nelle diverse specie. Gli studi immunohistologici hanno mostrato che alcune specie di cnidari presentano neuriti condensati insieme ai corpi cellulari dei neuroni a formare tratti circolari o lineari.

## 1.6 Organizzazione del sistema nervoso

La trasmissione sinaptica negli cnidari si basa sia su neurotrasmettitori veloci (glutammato, GABA, glicina), sia su quelli lenti (catecolamine, serotonina) e su neuropeptidi (Kass-Simon e Pierobon, 2007).

Due dei più studiati neuropeptidi che svolgono il ruolo di neurotrasmettitori negli cnidari appartengono alle famiglie dei peptidi GLWamidati e RFamidati.

I peptidi della famiglia dei GLWamidati sono caratterizzati dalla sequenza Gly-Leu-Trp-NH<sub>2</sub> al C-terminale. Il primo GLWamide isolato (pEQPGLWamide), chiamato metamorfosina A per la sua capacità di indurre la metamorfosi delle planule dell'idrozoo marino *Hydractinia chinata*, è stato identificato nell'antozoo *Anthopleura elegantissima* (Leitz et al., 1994) e da allora è stato osservato in numerose specie di Cnidari (Kaneot et al. , 2003; Pinelli et al. , 1999; Yano et al. 2003). E' stato ipotizzato che le larve planule di *Hydractinia echinata* regolino gli eventi metamorfici utilizzando peptici GLWamide come segnali di coordinamento interni (Leitz 1997, 1998b). Tuttavia, poiché i neuropeptidi GLWamidati sono stati trovati nei diversi stadi vitali di *H. echinata*, oltre che nelle planule, ed anche in specie senza stadi larvali, si deve concludere che i peptidi GLWamidati hanno ulteriori funzioni, in particolare come neurotrasmettitori (Gajewski et al. 1996).

I peptidi della famiglia degli RFamidati sono invece caratterizzati dalla sequenza Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> al C-terminale. Sono stati descritti per la prima volta in un mollusco (Price & Greenberg, 1997 ) e da allora sono stati trovati in tutte le specie di Cnidari in cui sono stati cercati (Leitz, 2001; Fujisawa, 2008; Kass-Simons & Pierobon, 2007, Grimmelikhuijzen et al 1991; Anderson et al. 2004; Grimmelikhuijzen 1985; Grimmelikhuijzen et al. 1988; Plickert 1989; Koizumi et al. 1992; Moosler et al. 1996; Darmer et al. 1998; Mitgutsch et al. 1999).

Nelle meduse i neuroni RFamide positivi sono localizzati prevalentemente nel manubrio e nei bulbi tentacolari (Grimmelikhuijzen and Spencer, 1984). I tentacoli contengono sempre cellule sensoriali ed un ampio plesso formato da una sottopopolazione neuronale alla base dell'ectoderma (Mackie e Stell 1984; Mackie et al. 1985; Grimmelikhuijzen 1988; Anderson et al. 2004). La rete neurale RFamide-positiva si trova anche nell'ectoderma del manubrio, nelle gonadi e nei muscoli radiali delle meduse, in cui gli strati muscolari epiteliali sono ben sviluppati (Mackie e Stell 1984; Mackie et al. 1985.; Grimmelikhuijzen 1988; Grimmelikhuijzen et al. 1991). Nei polipi i neuroni sensoriali RFamide-positivi si differenziano nell'ectoderma intorno alla apertura della bocca (Grimmelikhuijzen 1985; Plickert 1989; Grimmelikhuijzen et al. 1991; Koizumi et al. 1992). Le cellule gangliari RFamide-positive si trovano nell'ipostomio, nei tentacoli e nel peduncolo (Grimmelikhuijzen 1985; Grimmelikhuijzen et al. 1991; Koizumi et al. 1992).

Negli idrozoi, le cellule staminali endodermiche (interstiziali o I-cells) danno luogo a nematoblasti e neuroblasti, che si differenziano, durante la loro migrazione verso la loro posizione finale nell'ectoderma, rispettivamente in nematociti e cellule gangliari.

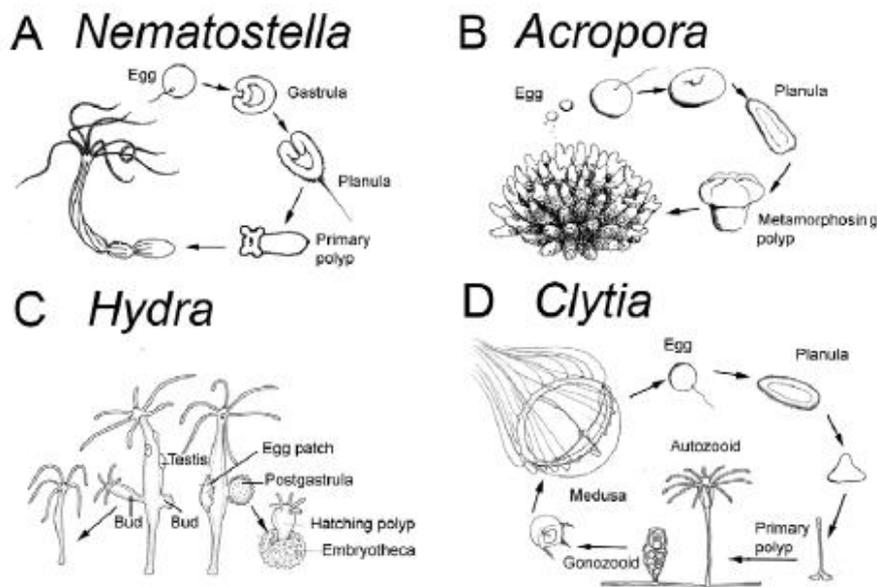
Durante lo sviluppo dell'embrione dell'antozoo *Nematostella vectensis*, una seconda rete di cellule gangliari endodermiche appare negli stadi di sviluppo tardivi (Marlow et al., 2009), legata alla comparsa precoce di strutture specifiche del polipo (faringe, mesenterii, e popolazioni di cellule gastriche).

## **1.7 Cnidari utilizzati in biologia dello sviluppo**

Gli cnidari presentano cicli vitali di tipo diverso. Il confronto tra specie morfologicamente diverse potrebbe fornire molte informazioni utili per la comprensione dei processi alla base dei programmi di sviluppo.

Negli antozoi, il polipo è la forma produttrice di gameti e il ciclo vitale può essere così rappresentato: embrione > larva > polipo. I medusozoi hanno generalmente un ciclo vitale comprendente lo stadio di medusa così schematizzato: embrione > larva > polipo > medusa. Tuttavia, all'interno di questi schemi generali esistono notevoli differenze.

Di seguito sono descritti i cicli vitali e gli habitat dei modelli di cnidari utilizzati in studi di biologia dello sviluppo e con progetti di sequenziamento del genoma completati o in corso.



### 1.7.1 *Nematostella vectensis* (Anthozoa)

Durante l'ultimo decennio, *Nematostella vectensis* è diventato il sistema modello maggiormente studiato tra gli cnidari ed è stato il primo cnidario ad avere l'intero genoma sequenziato (Putnam et al., 2007). Si tratta di un anemone di mare di acqua salmastra che si trova lungo le coste americane atlantiche e pacifiche e sulla costa meridionale dell'Inghilterra (Darling et al., 2004; Darling et al., 2005; Pearson et al., 2002; Sheader et al., 1997). *Nematostella* ha il tipico ciclo vitale di un antozoo. Dopo circa un settimana, la planula si deposita e metamorfosi in un polipo, che raggiunge la maturità sessuale a 3-6 mesi (Fritzenwanker e Technau, 2002; Hand e Uhlinger, 1992). La facilità di coltura e di mantenimento in laboratorio di *Nematostella* (Fritzenwanker e Technau, 2002; Genikhovich e Technau, 2009) ha notevolmente facilitato il suo uso come sistema per lo studio dello sviluppo.

### 1.7.2 *Acropora millepora* (Anthozoa)

I coralli del genere *Acropora* sono tra i principali componenti della Grande Barriera Corallina australiana e di altre barriere coralline del Pacifico. *Acropora millepora* (da qui in poi indicata col termine *Acropora*) è stata utilizzata come modello per lo studio dello sviluppo dei coralli e, come altri antozoi, ha stadi di polipo, embrione e larva planula (Fig. 2B, fig. 3D, E). Come altri coralli, *Acropora* non può attualmente essere mantenuta in laboratorio per la durata di un ciclo vitale completo. In natura, la fase di larva planula può persistere per mesi. Le uova vengono deposte solo per 1-2 giorni in primavera, e ciò limita la disponibilità di materiale e limita gli

studi sperimentali sullo sviluppo e l'espressione genica. Tuttavia, sono state ottenute importanti indicazioni filogenetiche da studi di espressione e dall'analisi delle EST (expressed sequence tag) di *Acropora* (Ball et al, 2002; Galliot e Miller, 2000). Gli studi su *Acropora* sono importanti anche per il confronto con altri antozoi (ad esempio gli anemoni di mare) e per studiare la formazione dello scheletro calcificato che costituisce la barriera corallina. *Acropora* contiene anche dei dinoflagellati intracellulari simbiotici, è quindi un sistema importante per capire come questa simbiosi si sia stabilita e mantenuta, e per capire l'attuale fenomeno di sbiancamento dei coralli.

### **1.7.3 *Hydra* (Hydrozoa)**

*Hydra sp* è un idrozoa che presenta solo la forma a polipo. Vive in acqua dolce ed ha una distribuzione cosmopolita. È ritenuto il primo animale modello utilizzato in biologia dello sviluppo (Trembley, 1744). Si riproduce principalmente asexualmente per gemmazione laterale dei polipi, ma ha anche un ciclo sessuale. I polipi sono o ermafroditi o a sessi separati, a seconda del ceppo o della specie. I polipi possono produrre una gemma nuova in 3-4 giorni. Le condizioni che inducono la formazione dei gameti non sono del tutto chiare, ma in alcune specie coinvolgono la temperatura (ad esempio *H. oligactis*) o il digiuno (*H. vulgaris*). In *Hydra* non c'è lo stadio larvale tra embrione e polipo. L'embrione completa lo sviluppo all'interno di una cuticola da cui si sviluppa un polipo completamente formato dopo una fase di dormienza di settimane o mesi (Bottger et al., 2006; Brauer, 1891).

I modelli principali di *Hydra* sono *H. vulgaris* e *H. magnipapillata*. Tuttavia è improbabile che siano specie separate; *H. magnipapillata* probabilmente dovrebbe essere rinominata *H. vulgaris* (Martinez et al., 2010). Il ceppo 105 di *H. magnipapillata* è stato utilizzato per il progetto genoma di *Hydra* (Chapman et al., 2010). Il ceppo AEP di *H. vulgaris*, che è il risultato di un incrocio di due ceppi del Nord America, è ermafrodita e produce continuamente gameti ed embrioni con un periodo dormiente medio di solo 4 settimane in laboratorio (Bottger et al., 2006). Questo ceppo è stato utilizzato per studiare la gametogenesi e l'embriogenesi (Martin et al., 1997; Miller et al., 2000; Technau et al., 2003; Wittlieb et al., 2006) e, soprattutto, è la fonte per ottenere embrioni di *Hydra* transgenici (Wittlieb et al., 2006).

### **1.7.4 *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa)**

*Clytia hemisphaerica* (da qui indicata semplicemente con il termine *Clytia*) è un idrozoa coloniale tecato cosmopolita. A differenza di *Hydra sp*, ha il tipico ciclo vitale degli idrozoi che

comprende la fase di larva planula e quella di medusa. La colonia contiene due tipi di polipi: gonozoidi e autozoidi. *Clytia* è un nuovo importante modello di cnidario che offre molti vantaggi grazie alla sua totale trasparenza, la facilità di riproduzione in laboratorio sia sessuale che asessuale, e la sua trattabilità come sistema sperimentale (Houliston et al., 2010). *Clytia* è stata utilizzata per studiare il ruolo di segnale Wnt nella polarizzazione dell'uovo e nella differenziazione delle nematociti nella medusa (Denker et al., 2008; Momose et al., 2008; Momose e Houliston, 2007). Un ampio set di dati EST di *Clytia* è pubblico ed il sequenziamento del genoma di *Clytia* è in corso (Houliston et al., 2010).

Nonostante il recente sviluppo di metodi per la manipolazione genetica degli cnidari, che hanno facilitato gli studi sulla funzione dei geni, mancano ancora molti degli strumenti disponibili per gli organismi modello più utilizzati.

I primi tentativi in *Hydra* sono stati ostacolati dal basso numero di embrioni che possono essere ottenuti e dalla lunga dormienza embrionale in cui vanno incontro la maggior parte dei ceppi di *Hydra*. Nessuno dei geni responsabili è stato identificato tra i 39 mutanti esistenti di *Hydra* (Sugiyama e Fujisawa, 1978).

Sono in corso manipolazioni di ceppi di *Nematostella* che potrebbero rendere disponibili dei mutanti, ma *Nematostella* ha un tempo di generazione relativamente lungo, di 4-6 mesi. A questo proposito, l'idrozo *Clytia*, che ha un tempo di generazione di 3-4 settimane, è forse un modello più promettente. Nell'idrozo *Hydractinia* è stata fatta la mappatura genica e la clonazione del complesso di istocompatibilità (Nicotra et al., 2009), indicando che negli cnidari sono fattibili approcci genetici.

## **1.8 *Clava multicornis* (Hydrozoa)**

Tra gli cnidari, numerosi Idrozoi hanno uno stadio larvale di planula che striscia sul substrato mediante ondulazione del corpo lungo l'asse antero-posteriore (A-P), ed un lato della superficie corporea sempre a contatto con il substrato. Gli studi su embrioni e larve hanno guadagnato slancio con l'introduzione di *Nematostella* e *Clytia* come animali modello. Il confronto tra specie morfologicamente diverse potrebbe fornire molte informazioni utili per la comprensione dei processi alla base dei programmi di sviluppo. Anche se la maggior parte degli cnidari non potrà mai diventare un animale modello da laboratorio, i loro genomi possono custodire informazioni importanti riguardanti l'evoluzione e la biologia dello sviluppo dei bilateri.

Al fine di ampliare le conoscenze relative allo sviluppo degli cnidari, in questa tesi vengono analizzati diversi aspetti sulla struttura e lo sviluppo del sistema nervoso della larva planula dell'idrozoo *Clava multicornis*.

*Clava multicornis* classe Hydrozoa (Anthothecata Hydractiniidae) è comune lungo le coste atlantiche di Francia ed Inghilterra. Le colonie sono costituite da polipi lunghi fino a 25 mm ed hanno un colore rosato. Si trovano spesso nelle zone intertidali attaccate a alghe quali *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* e *Ascophyllum nodosum*. La specie si trova spesso nelle zone d'estuario ed è particolarmente resistente a variazioni di salinità e temperatura. Gli animali sono in grado di sopravvivere per alcune ore fuori dall'acqua durante i periodi di bassa marea.

*Clava multicornis*, come molti altri idrozoi, non presenta lo stadio a medusa e i polipi sono quindi sessuati. Nella stagione fertile sulla colonia compaiono i gonofori femminili e maschili. Le uova si formano nei gonofori femminili dove vengono fecondate dagli spermatozoi rilasciati dai gonofori maschili. Dopo quattro o cinque giorni dalla fecondazione, le uova si schiudono liberando le larve planule. Le planule misurano circa 600-800 µm, sono a forma di clava; presentano infatti una estremità più larga ed una più affusolata. Hanno una spiccata fototassi positiva che li rende in grado di compiere movimenti orientati rispetto ad una sorgente luminosa. Esse strisciano sul substrato mantenendo in avanti l'estremità più larga che viene considerata il polo anteriore.

Questa abilità viene sfruttata durante la ricerca di un sito adatto a cui aderire con la porzione terminale anteriore. Successivamente iniziano dei processi di metamorfosi e che le porterà a diventare polipi da cui, per gemmazione, si formerà l'intera colonia.

La parte anteriore della larva si sviluppa nel disco basale del polipo, mentre la parte posteriore dà origine alle strutture apicali: bocca e tentacoli.

## 1.9 Bibliografia

Anderson, P.A., 1985. Physiology of a bidirectional, excitatory, chemical synapse. *J. Neurophysiol.* 53, 821–835.

Ball, E. E., Hayward, D. C., Reece-Hoyes, J. S., Hislop, N. R., Samuel, G., Saint, R., Harrison, P. L. and Miller, D. J. 2002. Coral development: from classical embryology to molecular control. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 671-678.

Ball, E. E., Hayward, D. C., Saint, R. & Miller, D. J. 2004. A simple plan – cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 5, 567–577.

Bielen, H., Oberleitner, S., Marcellini, S., Gee, L., Lemaire, P., Bode, H. R., Rupp, R. and Technau, U. 2007. Divergent functions of two ancient Hydra Brachyury paralogues suggest specific roles for their C-terminal domains in tissue fate induction. *Development* 134, 4187-4197.

Bode, H.R., 1996. The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell Sci.* 109, 1155–1164.

Bode, P. M. and Bode, H. R. 1980. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of hydra attenuata. I. Head-body proportion regulation. *Dev. Biol.* 78, 484-496.

Boero F, Gravili C, Pagliara P, Piraino S, Bouillon J, Schmid V. 1998. The cnidarian premises of metazoan evolution: from triploblasty, to coelom formation, to metamery. *Ital J Zool* 65:5-9.

Boero F, Schierwater B, Piraino S. 2007. Cnidarian milestones in metazoan evolution. *Integr Comp Biol* 47:693-700.

Bosch, T.C., 2009. Hydra and the evolution of stem cells. *BioEssays* 31, 478–486.

Bottger, A., Strasser, D., Alexandrova, O., Levin, A., Fischer, S., Lasi, M., Rudd, S. and David, C. N. 2006. Genetic screen for signal peptides in Hydra reveals novel secreted proteins and evidence for non-classical protein secretion. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 1107-1117.

Brauer, A. 1891. Über die Entwicklung von Hydra. *Z. Wiss. Zool.* 52, 169-216.

Bridge, D., Cunningham, C.W., DeSalle, R., Buss, L.W., 1995. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol. Biol. Evol.* 12, 679–689.

Broun, M. and Bode, H. R. 2002. Characterization of the head organizer in hydra. *Development* 129, 875-884.

Broun, M. and Bode, H. R. 2002. Characterization of the head organizer in hydra. *Development* 129, 875-884.

- Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B. and Bode, H. R. 2005. Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132, 2907-2916.
- Browne E. 1909. The production of new hydranths in Hydra by the insertion of small grafts. *J Exp Biol* 8:1–23.
- Burton, P. M. and Finnerty, J. R. 2009. Conserved and novel gene expression between regeneration and asexual fission in *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* 219, 79-87.
- Cartwright, P., Halgedahl, S. L., Hendricks, J. R., Jarrard, R. D., Marques, A. C., Collins, A. G. and Lieberman, B. S. 2007. Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambrian. *PLoS One* 2, e1121.
- Chapman, J. A., Kirkness, E. F., Simakov, O., Hampson, S. E., Mitros, T., Weinmaier, T., Rattei, T., Balasubramanian, P. G., Borman, J., Busam, D. et al. 2010. The dynamic genome of Hydra. *Nature* 464, 592-596.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J. C. and Galliot, B. 2009. Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev. Cell* 17, 279- 289.
- Chia, F. S. & Koss, R. 1979. Fine-structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea-anemone *Anthopleura elegantissima*. *J. Morph.* 160, 275–298.
- Chiori, R., Jager, M., Denker, E., Wincker, P., Da Silva, C., Le Guyader, H., Manuel, M. and Queinnec, E. 2009. Are Hox genes ancestrally involved in axial patterning? Evidence from the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *PLoS One* 4, e4231.
- Chourrout, D., Delsuc, F., Chourrout, P., Edvardsen, R. B., Rentzsch, F., Renfer, E., Jensen, M. F., Zhu, B., de Jong, P., Steele, R. E. et al. 2006. Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements. *Nature* 442, 684-687.

Chourrout, D., Delsuc, F., Chourrout, P., Edvardsen, R.B., Rentzsch, F., Renfer, E., Jensen, M.F., et al., 2006. Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements. *Nature*. 442, 684–687.

Collins A. G. et al. 2006. *Medusozoan* phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assesment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst. Biol.* 55:97-115.

Collins, A. G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J. Evol. Biol.* 15, 418-432.

Collins, A. G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J. Evol. Biol.* 15, 418-432.

Darling, J. A., Reitzel, A. M. and Finnerty, J. R. 2004. Regional population structure of a widely introduced estuarine invertebrate: *Nematostella vectensis* Stephenson in New England. *Mol. Ecol.* 13, 2969-2981.

Darling, J. A., Reitzel, A. R., Burton, P. M., Mazza, M. E., Ryan, J. F., Sullivan, J. C. and Finnerty, J. R. 2005. Rising starlet: the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *BioEssays* 27, 211-221.

Darmer, D., Hauser, F., Nothacker, H. P., Bosch, T. C., Williamson, M. & Grimmelikhuijzen, C. J. 1998. Three different prohormones yield a variety of Hydra-RFamide (Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) neuropeptides in *Hydra magnipapillata*. *Biochem. J.* 332, 403–412.

David, C. N. and Murphy, S. 1977. Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev. Biol.* 58, 372-383.

David, C.N., 1973. A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Roux' Archiv. Dev. Biol.* 171, 259–268.

Denker, E., Bapteste, E., Le Guyader, H., Manuel, M., Rabet, N., 2008a. Horizontal gene transfer and the evolution of cnidarian stinging cells. *Curr. Biol.* 18, R858–859.

Duffy, D. J., Plickert, G., Kuenzel, T., Tilmann, W. and Frank, U. 2010. Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in *Hydractinia* metamorphosis and regeneration. *Development* 137, 3057-3066.

Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen MV, Haddosk SH, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452:745–749

Faurot, L. 1895. L'anatomie, l'histologie, et le développement des Actinies. *Arch. Zool. Exp. Gén. Sér.* 3 3, 43-262.

Faurot, L. 1903. Développement du pharynx des couples et des paires de cloisons chez les Hexactinies. *Arch. Zool. Exp. Gén. Sér.* 3 1, 359-399.

Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D. and Martindale, M. Q. 2004. Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science* 304, 1335-1337.

Foret, S., Knack, B., Houliston, E., Momose, T., Manuel, M., Queinnec, E., Hayward, D. C., Ball, E. E. and Miller, D. J. 2010. New tricks with old genes: the genetic bases of novel cnidarian traits. *Trends Genet.* 26, 154-158.

Fritzenwanker, J. H., Genikhovich, G., Kraus, Y. and Technau, U. 2007. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Dev. Biol.* 310, 264-279.

Fujisawa, T., 2008. Hydra peptide project 1993–2007. *Dev. Growth Differ.* 50 (Suppl. 1), S257–S268.

Gajewski M, Leitz T, Schlossherr J, Plickert G. 1996. LWamides from cnidaria constitute a novel family of neuropeptides with morphogenetic activity. *Roux's Arch Dev Biol* 205:203–242.

Galliot, B. 2000. Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 629-637.

Galliot, B. and Miller, D. 2000. Origin of anterior patterning. How old is our head? *Trends Genet.* 16, 1-5.

Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M. and Chera, S. 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev. Biol.* 332, 2-24.

Galliot, B., Tanaka, E. and Simon, A. 2008. Regeneration and tissue repair: themes and variations. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3-7.

Garm A, O'Connor M, Parkefelt L, Nilsson DE. 2007a. Visually guided obstacle avoidance in the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Chiropsella bronzie*. *J Exp Biol* 210:3616-3623.

Garm A, Poussart Y, Parkefelt L, Ekstrom P, Nilsson DE. 2007b. The ring nerve of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Cell Tissue Res* 329:147-157.

Garm, A., Ekstrom, P., Boudes, M., Nilsson, D.E., 2006. Rhopalia are integrated parts of the central nervous system in box jellyfish. *Cell Tissue Res.* 325, 333–343.

Gee, L., Hartig, J., Law, L., Wittlieb, J., Khalturin, K., Bosch, T. C. G. and Bode, H. R. 2010.  $\beta$ -catenin plays a central role in setting up the head organizer in hydra. *Dev. Biol.* 340, 116-124.

Genikhovich, G. and Technau, U. 2009. The starlet sea anemone *Nematostella vectensis*: an anthozoan model organism for studies in comparative genomics and functional evolutionary developmental biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, pdb emo129.

Gierer, A. and Meinhardt, H. 1972. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12, 30-39.

Grimmelikhuijzen, C. J. 1985. Antisera to the sequence Arg- Phe-amide visualize neuronal centralization in hydroid polyps. *Cell Tissue Res.* 241, 171–182.

Grimmelikhuijzen, C. J., Graff, D., Koizumi, O., Westfall, J. A. & McFarlane, I. D. 1991. Neuropeptides in coelenterates: a review. *Hydrobiologia* 216/217, 555–563.

Grimmelikhuijzen, C. J., Hahn, M., Rinehart, K. L. & Spencer, A. N. 1988. Isolation of pyroGlu-Leu-Leu-Gly-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (Pol-RFamide), a novel neuropeptide from hydromedusae. *Brain Res.* 475, 198–203.

Grimmelikhuijzen, C.J., Leviev, I., Carstensen, K., 1996. Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure, function, and biosynthesis. *Int. Rev. Cytol.* 167, 37–89.

Grimmelikhuijzen, C.J., Spencer, A.N., 1984. FMRFamide immunoreactivity in the nervous system of the medusa *Polyorchis penicillatus*. *J. Comp. Neurol.* 230, 361–371.

Grimmelikhuijzen, C.J.P., Westfall, J.A., 1995. The nervous systems of Cnidarians. In: Breidbach, O., Kutsch, W. (Eds.), *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 7–24.

Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein T. 2006. The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 25:7450-7460.

Hand, C. and Uhlinger, K. R. 1992. The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Biol. Bull.* 182, 169-176.

Hayward DC, Samuel G, Pontynen PC, Catmull J, Saint R, Miller DJ, Ball EE. 2002. Localized expression of a dpp/ BMP2/4 ortholog in a coral embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8106–8111.

Hayward, D.C., Catmull, J., Reece-Hoyes, J.S., Berghammer, H., Dodd, H., Hann, S.J., Miller, D.J., et al., 2001. Gene structure and larval expression of *cnox-2Am* from the coral *Acropora millepora*. *Dev Genes Evol.* 211, 10–19.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbacher, U., et al., 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407, 186–189.

Holstein, T. 1981. The morphogenesis of nematocytes in Hydra and Forskalia: an ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.* 75, 276-290.

Holstein, T. W., Hobmayer, E. and David, C. N. 1991. Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Dev. Biol.* 148, 602-611.

Holstein, T. W., Hobmayer, E. and Technau, U. 2003. Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev. Dyn.* 226, 257- 267.

Houliston, E., Momose, T. and Manuel, M. 2010. Clytia hemisphaerica: a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends Genet.* 26, 159-167.

Hwang, J. S., Takaku, Y., Momose, T., Adamczyk, P., Ozbek, S., Ikeo, K., Khalturin, K., Hemmrich, G., Bosch, T. C., Holstein, T. W. et al. 2010. Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18539-18544.

Hyman, L. H. 1940. *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora*. New York: McGraw-Hill.

Jägersten, G. 1955. On the early phylogeny of the Bilateria. *Zool. Bidrag. Uppsala* 30, 321-354.

Kamm, K., Schierwater, B., Jakob, W., Dellaporta, S. L. and Miller, D. J. 2006. Axial patterning and diversification in the cnidaria predate the Hox system. *Curr. Biol.* 16, 920-926.

Kaneot T et al. 2003. Identification of a novel frog RFamide and its effect on the latency of the tail-flick response of the newt . *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134: 259-266

Kass-Simon, G., Pierobon, P., 2007. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 9–25.

Khalturin, K., Hemmrich, G., Bosch, T. C., Holstein, T. W. et al. 2010. Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18539-18544.

Khalturin, K., Hemmrich, G., Fraune, S., Augustin, R. and Bosch, T. C. 2009. More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? *Trends Genet.* 25, 404-413.

Koizumi, O., Itazawa, M., Mizumoto, H., Minobe, S., Javois, L.C., Grimmelikhuijzen, C.J., Bode, H.R., 1992. Nerve ring of the hypostome in hydra. I. Its structure, development, and maintenance. *J. Comp. Neurol.* 326, 7–21.

Koizumi, O., Mizumoto, H., Sugiyama, T., Bode, H.R., 1990. Nerve net formation in the primitive nervous system of Hydra—an overview. *Neurosci. Res. Suppl.* 13, S165–170.

Kortschak, R. D., Samuel, G., Saint, R. & Miller, D. J. 2003. EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr. Biol.* 13, 2190–2195.

Kraus, Y., Fritzenwanker, J. H., Genikhovich, G. and Technau, U. 2007. The blastoporal organiser of a sea anemone. *Curr. Biol.* 17, R874-R876.

Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW. 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433:156-160.

Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW. 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433:156-160.

Lee, P.N., Pang, K., Matus, D.Q., Martindale, M.Q., 2006. A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 157–167.

Leitz T. 1997. Induction of settlement and metamorphosis of cnidarian larvae: signals and signal transduction. *Inv Reprod Dev* 31:109±122

Leitz T. 1998b. Induction of metamorphosis of the marine hydrozoan *Hydractinia echinata* Fleming, 1828. *Biofouling* 12:173±187

Leitz T. 2001. Endocrinology of the Cnidarian: state of the art. *Zoology* 103: 202-221

Leitz, T., Morand, K., Mann, M., 1994. Metamorphosin A: a novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractinia echinata* (Coelenterata, Hydrozoa). *Dev. Biol.* 163, 440–446.

Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., Law, L., Schmidt, H. A., Ozbek, S., Bode, H. and Holstein, T. W. 2009. Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Dev. Biol.* 330, 186-199.

Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., Law, L., Schmidt, H. A., Ozbek, S., Bode, H. and Holstein, T. W. 2009. Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Dev. Biol.* 330, 186-199.

Mackie GO. 2004. Central neural circuitry in the jellyfish *Aglantha*: a model "simple nervous system". *Neuro-Signals* 13:5–19

Mackie, G. O. & Stell, W. K. 1984. FMRF-amide-like immunoreactivity in the neurons of medusae. *Am. Zool.* 24, 36A.

Mackie, G. O., Singla, C. L. & Stell, W. K. 1985. Distribution of nerve elements showing FMRF-amide-like immunoreactivity in Hydromedusae. *Acta. Zool.* 66, 199 –210.

Marlow, H.Q., Srivastava, M., Matus, D.Q., Rokhsar, D., Martindale, M.Q., 2009. Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev. Neurobiol.* 69, 235–254.

Martin V, Thomas MB. 1981. Elimination of the interstitial cells in the planula larva of the marine hydrozoan *Pennaria tiarella*. *J Exp Zool* 217: 303-323.

- Martin VJ, Thomas MB. 1980. Nerve elements in the planula of the hydrozoan *Pennaria tiarella*. *J Morph* 66:27-36.
- Martin VJ. 1992. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net. *Cell Tissue Res* 269:431-438.
- Martin, V. J., Littlefield, C. L., Archer, W. E. and Bode, H. R. 1997. Embryogenesis in hydra. *Biol. Bull.* 192, 345-363.
- Martin, V.J., 2000. Reorganization of the nervous system during metamorphosis of a hydrozoan planula. *Invertebr. Biol.* 119, 243–253.
- Martindale, M.Q., Pang, K., Finnerty, J.R., 2004. Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development* 131, 2463–2474.
- Martinez, D. E., Iniguez, A. R., Percell, K. M., Willner, J. B., Signorovitch, J. and Campbell, R. D. 2010. Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 403-410.
- Matus, D. Q., Pang, K., Marlow, H., Dunn, C. W., Thomsen, G. H. and Martindale, M. Q. (2006a). Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11195- 11200.
- Matus, D. Q., Thomsen, G. H. and Martindale, M. Q. (2006b). Dorso/ventral genes are asymmetrically expressed and involved in germ-layer demarcation during cnidarian gastrulation. *Curr. Biol.* 16, 499-505.
- Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D. & Sogin, M. L. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 9707–9712.
- Miller DJ, Ball EE. 2000. The coral *Acropora*: what it can contribute to our knowledge of metazoan evolution and the evolution of developmental processes. *Bioessays* 22:291-296.

- Miller, D. J., Ball, E. E. and Technau, U. (2005). Cnidarians and ancestral genetic complexity in the animal kingdom. *Trends Genet.* 21, 536-539.
- Mitgutsch, C., Hauser, F. & Grimmelikhuijzen, C. J. 1999. Expression and developmental regulation of the Hydra-RFamide and Hydra-LWamide preprohormone genes in Hydra: evidence for transient phases of head formation. *Dev. Biol.* 207, 189– 203.
- Momose, T. e Houlston, E. (2007). Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo. *PLoS Biol.* 5, e70.
- Momose, T., Derelle, R. e Houlston, E. (2008). A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development* 135, 2105-2113.
- Moosler, A., Rinehart, K. L. & Grimmelikhuijzen, C. J. 1996. Isolation of four novel neuropeptides, the hydra-Rfamides I–IV, from *Hydra magnipapillata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 596–602.
- Nakanishi, N., Yuan, D., Jacobs, D. K. & Hartenstein, V. 2008. Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in Aurelia (Cnidaria, Scyphozoa). *Dev. Genes Evol.* 218, 511–524.
- Nicotra, M. L., Powell, A. E., Rosengarten, R. D., Moreno, M., Grimwood, J., Lakkis, F. G., Dellaporta, S. L. and Buss, L. W. (2009). A hypervariable invertebrate allodeterminant. *Curr. Biol.* 19, 583-589.
- Parkefelt L, Ekstrom P. 2009. Prominent system of RFamide immunoreactive neurons in the rhopalia of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa). *J Comp Neurol* 516:157-165.
- Pearson, C. V., Rogers, A. D. and Sheader, M. (2002). The genetic structure of the rare lagoonal sea anemone, *Nematostella vectensis* Stephenson (Cnidaria; Anthozoa) in the United Kingdom based on RAPD analysis. *Mol. Ecol.* 11, 2285- 2293.

Philipp, I., Aufschnaiter, R., Ozbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., Watanabe, H., Rentzsch, F., Holstein, T. W. and Hobmayer, B. (2009). Wnt/beta-catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 4290-4295.

Pinelli C et al. (1999). Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the amphibian brain: comparative analysis. *J Comp Neurol* 414: 275-305

Plickert, G. 1989. Proportion-altering factor (PAF) stimulates nerve cell formation in *Hydractinia echinata*. *Cell Differ. Dev.* 26, 19– 27.

Price, D. A. & Greenberg, M. J. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197, 670 –671.

Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I. V., Lucas, S. M., Steele, R. E., Finnerty, J. R., Technau, U., Martindale, M. Q. & Rokhsar, D. S. 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 317, 86 –94.

Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I. V., Lucas, S. M., Steele, R. E., Finnerty, J. R., Technau, U., Martindale, M. Q. & Rokhsar, D. S. 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 317, 86 –94.

Rentzsch, F., Anton, R., Saina, M., Hammerschmidt, M., Holstein, T. W. and Technau, U. (2006). Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning. *Dev. Biol.* 296, 375-387.

Rentzsch, F., Guder, C., Vocke, D., Hobmayer, B., Holstein, T.W., 2007. An ancient chordin-like gene in organizer formation of Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3249–3254.

Ryan JF, Burton PM, Mazza ME, Kwong GK, Mullikin JC, Finnerty JR. 2006. The cnidarian-bilaterian ancestor possessed at least 56 homeoboxes: evidence from the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Genome Biol* 7: R64.

Saina, M. and Technau, U. (2009). Characterization of myostatin/gdf8/11 in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 312, 780-788.

Salvini-Plawen, L. V. (1978). On the origin and evolution of the lower Metazoa. *Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch.* 16, 40-88.

Seipel K, Schmid V. 2005. Evolution of striated muscle: jellyfish and the origin of triploblasty. *Dev Biol* 282:14-26.

Seipel, K., Schmid, V., 2006. Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 589–599.

Shedden, M., Suwailem, A. M. and Rowe, G. A. (1997). The anemone, *Nematostella vectensis*, in Britain: considerations for conservation management. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 7, 13-25.

Spring J, Yanze N, Middel AM, Stierwald M, Groger H, Schmid V. 2000. The mesoderm specification factor twist in the life cycle of jellyfish. *Dev Biol* 228:363– 375.

Spring, J., Yanze, N., Josch, C., Middel, A. M., Winninger, B. and Schmid, V. (2002). Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: a connection to the mesoderm of bilateria. *Dev. Biol.* 244, 372-384.

Steele, R. E. and Dana, C. E. (2009). Evolutionary history of the HAP2/GCS1 gene and sexual reproduction in metazoans. *PLoS One* 4, e7680.

Steele, R. E., David, C. N. and Technau, U. (2011). A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends Genet.* 27, 7-13.

Sugiyama, T., Fujisawa, T., 1978. Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. II. Isolation and characterization of an interstitial cell-deficient strain. *J. Cell Sci.* 29, 35–52.

Tardent, P. and Holstein, T. (1982). Morphology and morphodynamics of the stenotele nematocyst of *Hydra attenuata* Pall. (Hydrozoa, Cnidaria). *Cell Tissue Res.* 224, 269-290.

Technau U, Holstein TW. 1992. Cell sorting during the regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Dev Biol* 151:117– 127.

Technau, U. and Bode, H. R. (1999). HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development* 126, 999-1010.

Technau, U. and Scholz, C. B. (2003). Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 531-539.

Technau, U., Cramer von Laue, C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., Bode, H. R. and Holstein, T. W. (2000). Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12127-12131.

Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P. M., Saina, M., Grasso, L. C., Hayward, D. C., Sensen, C. W., Saint, R., Holstein, T. W., Ball, E. E. & Miller, D. J. 2005. Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends Genet.* 21, 633–639.

Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P. M., Saina, M., Grasso, L. C., Hayward, D. C., Sensen, C. W., Saint, R., Holstein, T. W., Ball, E. E. & Miller, D. J. 2005. Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends Genet.* 21, 633–639.

Thomas-Chollier, M., Ledent, V., Leyns, L. and Vervoort, M. (2010). A nontree- based comprehensive study of metazoan Hox and ParaHox genes prompts new insights into their origin and evolution. *BMC Evol. Biol.* 10, 73.

Trembley, A. (1744). Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce. Leide: Jean and Herman Verbeek.

Watanabe H, Fujisawa T, Holstein T (2009) Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Dev Growth Differ* 51:167–183

Weaver, C. and Kimelman, D. (2004). Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*. *Development* 131, 3491-3499.

Westfall, J.A., 1996. Ultrastructure of synapses in the first-evolved nervous systems. *J. Neurocytol.* 25, 735–746.

Wikramanayake, A.H., Hong, M., Lee, P.N., Pang, K., Byrum, C.A., Bince, J.M., Xu, R., et al., 2003. An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* 426, 446–450.

Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J. U., Anton-Erxleben, F. and Bosch, T. C. (2006). Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6208-6211.

Yano T et al. (2003). Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Res* 982: 156-167

Yuan D, Nakanishi N, Jacobs DK, Hartenstein V. 2008. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia*. *Dev Genes Evol* 218:525-539.

## **2 Organizzazione del sistema nervoso della larva planula di *Clava multicornis* (Hydrozoa)**

### **2.1 Riassunto**

L'organizzazione del sistema nervoso degli cnidari è stata ampiamente studiata nei polipi e nelle meduse, ma poco si sa sul sistema nervoso delle larve planule, che danno luogo alle forme adulte dopo l'adesione e la metamorfosi. In questo lavoro vengono descritte le caratteristiche istologiche e citologiche del sistema nervoso della planula dell'idrozo *Clava multicornis*. Queste planule non nuotano liberamente nella colonna d'acqua, ma piuttosto strisciano sul substrato mediante un movimento ciliare coordinato e direzionato, accoppiato a movimenti di flessione muscolare laterale associati con fototassi positiva. L'analisi istologica evidenzia una pronunciata regionalizzazione antero-posteriore del sistema nervoso della planula, con diversi tipi di cellule neurali altamente concentrati al polo anteriore. Nella metà anteriore della planula, il plesso di neuriti ectodermici basali forma un'ampia rete di fibre che si intersecano ortogonalmente, mentre nella metà posteriore i neuriti si estendono longitudinalmente lungo l'asse corporeo. Ulteriori livelli di complessità del sistema nervoso sono stati scoperti tramite analisi immunocitochimica specifica per i neuropeptidi che ha rilevato distinti sottoinsiemi neurali. Queste osservazioni implicano che il sistema nervoso della planula di *Clava multicornis* manifesta notevoli livelli di organizzazione istologica, citologica e funzionale, le cui caratteristiche possono ricordare quelle presenti nei primi animali bilateri.

### **2.2 Introduzione**

Una caratteristica comune di Cnidari e Bilateri è lo sviluppo di un sistema nervoso composto da cellule neurali interconnesse. In tutti i gruppi animali, il numero di cellule neurali, la complessità delle loro connessioni e la loro organizzazione in regioni è molto variabile. L'origine evolutiva della complessità e diversità anatomica del sistema nervoso degli eumetazoi rappresenta uno dei fondamentali problemi della neurobiologia. Recenti analisi comparative riguardanti lo sviluppo suggeriscono che protostomi e deuterostomi abbiano una comune origine evolutiva (Lichtneckert e Reichert, 2005, 2008; Denes et al., 2007; Arendt et al., 2008) e che il sistema nervoso dell'urbilaterio fosse già una struttura complessa e centralizzata (De Robertis, 2008). Un punto di vista alternativo propone un'origine dei sistemi nervosi centrali e dei tipi neurali multipla ed

indipendente (Holland, 2003; Lowe et al., 2003; Moroz, 2009). Dato che gli cnidari sono il sister group dei bilateri (Collins, 1998; Medina et al., 2001; Ryan et al., 2006; Dunn et al., 2008) una questione chiave riguarda la natura di un prototipo di sistema nervoso dal quale si sia evoluto quello degli cnidari e dei bilateri.

Questo problema è particolarmente interessante tenendo presente recenti dati molecolari sostengono l'ipotesi che l'ancestor degli cnidari possedeva già l'insieme di strumenti molecolari necessari per stabilire un bauplan triploblastico e bilaterale (Boero et al., 1998, 2007; Finnerty, 2003; Spring et al., 2002; Seipel e Schmid, 2005; Matus et al., 2006). Per dare una risposta a questo problema, e quindi chiarire l'origine evolutiva del sistema nervoso centralizzato, sono necessari nuovi studi sul sistema nervoso degli cnidari che integrino gli approcci morfologici e molecolari.

Negli cnidari una grande quantità di informazioni sull'organizzazione strutturale del sistema nervoso è stata ottenuta dagli stadi adulti. Nei polipi e nelle meduse il sistema nervoso si trova sia nell'ectoderma che nell'endoderma ed è formato da motoneuroni, interneuroni gangliari e cellule sensoriali. Quest'ultime sono localizzate prevalentemente nell'ectoderma (Watanabe et al., 2009; Galliot et al., 2009).

I polipi generalmente possiedono una rete nervosa epiteliale "diffusa", che può essere visualizzata con immunocolorazione, con assenza di centri di elaborazione sensoriali o motori, ad eccezione di una concentrazione di elementi neurali localizzati intorno alla bocca.

Nelle meduse è presente un sistema nervoso più complesso, organizzato radialmente con uno o due anelli nervosi localizzati al margine dell'ombrello. Questi anelli permettono di connettere diversi tipi di cellule neurali che si collegano ad organi di senso, come statocisti, ocelli e ropali, per formare il circuito neurale necessario a coordinare i movimenti e permettere una visione complessa (Garm et al, 2007a, b.; Parkefelt e Ekström, 2009). Le funzioni di queste strutture neurali possono essere considerate simili a quelle del sistema nervoso centrale degli animali con simmetria bilaterale (Mackie, 2004; Garm et al, 2006).

In contrasto con una conoscenza dettagliata del sistema nervoso negli cnidari adulti, poco si sa circa l'organizzazione neurale nei primi stadi di sviluppo. il ciclo vitale degli cnidari include di solito una larva planula natante che in risposta a specifici stimoli aderisce al substrato e metamorfosa in un polipo.

Nei medusozoi, la fase di polipo può dar luogo alla fase di medusa. In molti taxa di cnidari possono mancare lo stadio di polipo o quello di medusa, ma solo in pochi casi è presente uno sviluppo embrionale diretto nel polipo con la soppressione dello stadio larvale di planula. La presenza di neuroni nella larva è stata dimostrata nei tre taxa principali di cnidari, cioè Anthozoa

(Chia e Koss, 1979; Miller e Ball, 2000; Hayward et al., 2001; Marlow et al., 2009), Hydrozoa (Martin e Thomas, 1980, 1981; Thomas et al., 1987; Plickert et al., 1988; Martin, 1992, 2000) e Scyphozoa (Korn 1966, Nakanishi et al., 2008; Yuan et al., 2008).

Nelle planule, il sistema nervoso si trova nell'ectoderma e comprende cellule epiteliali sensoriali e cellule gangliari basali, i cui neuriti si proiettano in una rete sovrastante la mesoglea (Martin, 1988a, b). Negli idrozoi, durante lo sviluppo le cellule staminali endodermiche (interstiziali o I-cells) danno luogo a nematoblasti e neuroblasti, che si differenziano, durante la loro migrazione verso la loro posizione finale nell'ectoderma, rispettivamente in nematociti e cellule gangliari. Durante lo sviluppo diretto dell'antozoo *Nematostella vectensis*, una seconda rete di cellule gangliari endodermiche appare negli stadi di sviluppo tardivi (Marlow et al., 2009), legata alla comparsa precoce di strutture specifiche del polipo (faringe, mesenteri e popolazioni di cellule gastriche).

La planule natanti di alcuni antozoi e scifozoi possiedono cellule cigliate allungate nell'ectoderma del polo anteriore, con nuclei basali, che formano l'organo apicale, o ciuffo apicale, una struttura sensoriale probabilmente coinvolta nella percezione di segnali chimici nel luogo dove avverrà la metamorfosi (Widersten, 1968; Chia e Bickell, 1978; Chia e Koss, 1979; Nakanishi et al, 2008;. Yuan et al., 2008, Marlow et al, 2009). Generalmente nelle planule degli idrozoi questa struttura non è presente.

La planula della maggior parte degli cnidari è relativamente semplice, con una planula a simmetria radiale e nuota nella colonna d'acqua ruotando lungo l'asse del corpo principale prima di aderire ad un substrato e metamorfosare . All'interno dei diversi taxa, tuttavia, sono state segnalate planule che presentano una geotassi positiva e strisciano sul substrato (Otto, 1976; Hartnoll, 1977; Gerrodette, 1981; Sommer, 1992; Hellberg, 1995; Orlov, 1996; Heltzel e Babcock, 2002; Bouillon et al., 2006). Sia il “nuoto” che il movimento “strisciante” delle planule si basano su una locomozione di tipo ciliare (Werner, 1984;. Bouillon et al., 2006). Il repertorio comportamentale necessario per la locomozione orientata su un substrato, tuttavia, differisce in modo significativo da quello natatorio con attività rotatoria. Le differenze tra le attività comportamentali coordinate dei due tipi di planula può tradursi in corrispondenti differenze nell'organizzazione del sistema nervoso. Infatti, data la somiglianza comportamentale riscontrata in ogni animale con attività motoria bentonica, è ipotizzabile che l'organizzazione neurobiologica delle planule striscianti degli cnidari possa essere paragonabile a quella dei più semplici bilateri con un comportamento simile.

Per evidenziare le peculiarità morfologiche e funzionali abbiamo studiato il sistema nervoso della planula di *Clava multicornis* (Hydrozoa), una larva con spiccate attività motorie

bentoniche. In questo lavoro sono riportate osservazioni comportamentali, morfologici e neurochimiche caratteristiche del suo sistema nervoso. Gli studi comportamentali documentano che la planula presenta una locomozione direzionale, con il polo anteriore/aborale orientato in avanti, accompagnata da un'alternanza di movimenti di flessione laterale.

Le osservazioni neuroanatomiche indicano una marcata regionalizzazione anteroposteriore del sistema nervoso, che è caratterizzato da un gran numero di cellule sensoriali posizionate al polo anteriore.

Le analisi immunocitochimiche rivelano un'inusuale complessità dei componenti neurali specifici con la presenza di distinte popolazioni cellulari.

Nel complesso questi risultati implicano che il "semplice" sistema nervoso di queste planule possiede un livello sorprendentemente alto di complessità istologica, citologica e biochimica.

Sono necessarie ulteriori indagini per chiarire se le somiglianze nell'architettura neurale tra gli cnidari, tra cui le planule qui riportate, e gli animali bilateri basali siano conservate, ovvero se i caratteri che sono condivisi fossero presenti nel loro ultimo antenato comune o se derivino da una parallela ed indipendente evoluzione del sistema nervoso.

## **2.3 Materiali e metodi**

### **2.3.1 Raccolta del materiale**

Le colonie fertili di *Clava multicornis* (Forskaal, 1775) sono state raccolte durante la bassa marea lungo le coste rocciose a Roscoff (Francia), e trasferite in laboratorio. Gli animali sono stati allevati in acquari con un sistema di circolazione dell'acqua di mare aperto (14 °C). Ogni giorno sono stati isolate alcune colonie femminili ed esposte alla luce per stimolare il rilascio delle planule. Gli stadi pre-schiusa sono stati ottenuti attraverso la dissezione dei gonofori femminili.

L'osservazione diretta dei campioni è stata realizzata attraverso uno stereomicroscopio con un potere di ingrandimento massimo di 100X, provvisto di fibre ottiche che permettono l'osservazione dei campioni senza che questi si surriscaldino.

Le colonie sono state alimentate con giovani naupli di *Artemia salina* che nascono da cisti disidratate e conservate a +4 °C.

### **2.3.2 Fissazione e conservazione delle planule**

Le planule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS (Phosphate Buffered Saline). Questa soluzione è stata preparata con 2 g di paraformaldeide + 50 ml di PBS 1x, è stata riscaldata a 60 °C per un'ora in un "bagnetto termostato" ed in seguito filtrata con filtro a maglie di 0.45 nm.

Il PBS 1x è stato ottenuto a partire da una soluzione stock di PBS 10x diluito 1:10 in acqua distillata.

Il PBS 10x è stato preparato secondo la seguente ricetta :

-80g/L di NaCl

-2,013g/L di KCl

-17,396g/L di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

-2,449g/L di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Il pH della soluzione è stato portato a 7.2 ca. con HCl concentrato.

Dopo la fissazione, sono stati effettuati due lavaggi da 10 minuti in PBS. Successivamente i campioni sono stati disidratati in etanolo 30%, etanolo 50%, etanolo 70% e riposti a -20°C.

### **2.3.3 Immunomarcatura**

Per evidenziare nelle planule i neuropeptidi RFamide, GLWamide e la tubulina acetilata e tirosinata è stata utilizzata la tecnica dell'immunomarcatura indiretta.

### **2.3.4 Protocollo per l'immunomarcatura nelle planule**

Le planule prima di essere sottoposte a immunomarcatura sono state reidratate in una serie decrescente di alcoli e permeabilizzate. I campioni conservati a -20°C sono stati trattati nel seguente modo:

- 2 lavaggi in etanolo al 50% e al 30% da 15 minuti.
- 3 lavaggi in PBT (PBS+0.25% Triton + 0.1 % Tween 10%) da 10 minuti.
- 1 lavaggio in PBT+NGS 10% (Normal Goat Serum , siero di capra) da 2ore.

In seguito, i campioni sono stati incubati overnight a 4°C con il primo anticorpo primario, precedentemente centrifugato per 3 minuti a 12000 rpm.

Il giorno successivo l'eccesso di anticorpo primario è stato rimosso effettuando i seguenti lavaggi:

- 4 lavaggi di PBT da 10 minuti.
- 2 lavaggio di PBT da 30 minuti
- 1 lavaggio di PBT+NGS da 1ora

Quindi i campioni sono stati incubati overnight a 4°C con il secondo anticorpo primario, precedentemente centrifugato per 3 minuti a 12000 rpm.

Il giorno seguente i campioni sono trattati per allontanare l'eccesso di anticorpo primario e saturare altri siti con un diverso siero, nel seguente modo:

- 4 lavaggi di PBT da 10 minuti.
- 1 lavaggio di PBT da 30 minuti.
- 1 lavaggio di 1% BSA (albumina di siero bovino) in PBT da 1ora.
- 1 lavaggio di PBT da 10 minuti.

A questo punto i campioni sono incubati overnight con gli anticorpi secondari fluorescenti, diluiti in PBT+BSA.

- 1) Alexa Fluor 594 (rosso) anti-mouse per rilevare la tubulina acetilata e la tubulina tirosinata.
- 2) Alexa Fluor 488 (verde) anti-rabbit, per rilevare la RFamide e GLWamide.

I campioni sono stati incubati a 4°C overnight.

Il giorno seguente sono stati eseguiti:

- 4 lavaggi in PBT da 10 minuti.
- 1 lavaggio in PBT da 15 minuti.
- 1 lavaggio di PBS da 30 minuti.

I campioni sono stati montati su dei vetrini con 5 µl di DABCO+Mowiol, conservati a 4 °C al buio per non far decadere la fluorescenza. I campioni sono stati esaminati usando un microscopio laser confocale Leica TCS-NT (Leica Microsystem, Heidelberg, Germany).

Primary Antibodies Used in This Study

Antigen	Immunogen	Manufacturer, species, type, catalog No.	Dilution
Tyrosinated tubulin	Synthetic peptide (C-terminal amino acids of $\alpha$ -tubulin from porcine brain plus an additional N terminal lysine and a C-terminal tyrosine; KVEGEGEEEGEEY)	Sigma (Italy), clone TUB-1A2, murine monoclonal, T9028	1:500
Acetylated tubulin	Purified protein from <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Sigma (Italy), clone 6-11B-1, murine monoclonal, T6793	1:500
GLWamide	Synthetic C-terminal-GLWamidated peptide (CAAPPGLW-NH <sub>2</sub> ) coupled via succinimidyl m-maleimido-benzoate (MBS) to heyhole limpet hemocyanin (KHL)	Gift from Prof. Thomas Leitz (Germany), clone 1676IIIp, rabbit polyclonal	1:700
RFamide	RF-NH <sub>2</sub> coupled via carbodiimide to bovine thyroglobulin	Gift from Prof. Thomas Leitz (Germany), clone 1773IIIp, rabbit polyclonal	1:700

## 2.4 Risultati

### 2.4.1 Sviluppo e locomozione delle larve planule

*Clava multicornis* è un idroide progenetico senza fase di medusa. Lo sviluppo embrionale si svolge sui polipi della colonia. La planula è vermiforme, lunga circa 600-800 micron ed ha un polo anteriore facilmente distinguibile rispetto al polo posteriore prendendo in considerazione la diversa forma e dimensioni. In contrasto con la maggior parte delle planule, queste larve non nuotano nella colonna d'acqua. Il grafico sottoriportato riporta i dati ottenuti dallo studio dello sviluppo di *C. multicornis* in condizioni sperimentali (Fig. 1).

Lo stadio di morula è stato raggiunto dopo un giorno, la fine della segmentazione e la formazione della gastrula precoce hanno richiesto altre 24 ore. Il passaggio da gastrula tardiva a planula pre-schiusa richiede tre giorni (Fig. 2).

Le planule di *C. multicornis* mostrano un movimento strisciante sul bentos (alghe, fondo roccioso), durante la ricerca di un sito idoneo per l'insediamento, dove entro pochi giorni si fisseranno con l'estremità anteriore e si svilupperanno in polipi primari.

Per caratterizzare in dettaglio il comportamento motorio, 50 planule sono state poste in Piastre di Petri il cui fondo era caratterizzato da una griglia 0,5mm e i loro movimenti sono stati registrati.

Le planule si spostano sempre con il polo anteriore in avanti in presenza di luce. Quindi le planule presentano una fototassi positiva (Fig. 3). Il movimento orientato anteriormente delle planule è basato su attività ciliare ed è costantemente accompagnato da movimenti alternati di flessione laterale lungo l'asse principale del corpo a causa di contrazioni coordinate mioepiteliali (Fig. 3).

I movimenti di flessione propagato dall'estremità anteriore delle planule dimostra un coerente comportamento esplorativo, strisciando con movimenti alternati a sinistra e a destra. Occasionalmente l'estremità anteriore viene temporaneamente sollevata dal substrato. Le planule sono in grado di superare piccoli ostacoli (ad esempio granuli di gesso) dall'alternanza di movimenti destra-sinistra-flessione di portata sempre più ampia. Durante la scansione del substrato le planule non hanno evidenziato un movimento rotazionale lungo l'asse antero-posteriore del corpo. Per le larve planule diploblastiche, questi movimenti in avanti, accoppiati dall'alternanza di movimenti di flessione laterale, rappresentano un comportamento complesso, che ricorda i modelli di locomozione ondulatoria dei bilateri semplici. Queste osservazioni

comportamentali suggeriscono che il sistema nervoso in larve di *C. multicornis* potrebbe essere più complesso che in altre forme larvali di cnidari.

#### **2.4.2 Polarizzazione anteriore del piano corporeo della planula**

L'analisi istologica delle planule ha rivelato la tipica anatomia a due strati, costituita da un ectoderma esterno pseudo-stratificato ed un endoderma interno vacuolato separati da una sottile mesoglea acellulare (Fig. 4A). Una caratteristica dell'ectoderma è stato il suo spessore diverso ai poli anteriore e posteriore, da 55 micron anteriore a 22 micron posteriore (Fig. 4A). Inoltre, sezioni trasversali della parte più anteriore della planula rivelano differenze di spessore ectodermica lungo la circonferenza del corpo, la cui media di valori variano da  $41,0 \pm 1,2$  micron a  $52,5 \pm 2,5$   $\mu\text{m}$  (Fig. 4B, C). Questa asimmetria dell'ectoderma non è più presente a livello in cui il polo anteriore raggiunge la sua larghezza massima (Fig. 4D, E).

#### **2.4.3 Organizzazione del sistema nervoso della planula**

Per studiare l'organizzazione delle cellule nervose e dei processi sensoriali della planula più in dettaglio, è stato adottato un approccio immunocitochimico. Sono stati utilizzati in questo studio marcatori pan-neuronali e marcatori specifici per diversi tipi neurali. L'architettura del sistema nervoso della planula è stata studiata tramite l'utilizzo di anticorpi contro l' $\alpha$ -tubulina tirosinata (TT) e la  $\alpha$ -tubulina acetilata (TA), due marcatori pan-neurali. Con entrambi i marcatori, l'analisi ha rivelato una notevole polarizzazione del sistema nervoso in cui la posizione delle cellule sensoriali e delle fibre nervose è quasi esclusivamente limitata alla metà anteriore della planula (Fig. 5A, B). Cellule fusiformi sensoriali si trovano in una posizione spazialmente ristretta al polo anteriore (fig. 5A) con i processi apicali che raggiungono la superficie esterna della planula e neuriti proiettati verso l'ampio plesso neurale basale (Fig. 5B, C). La parte più anteriore di questo plesso è costituito da fasci di fibre ortogonali rispetto all'asse del corpo, mentre nella parte posteriore del plesso questi fasci hanno una disposizione obliqua (Fig. 5A, C). Il plesso neurale termina circa a metà della lunghezza della planula lungo l'asse antero-posteriore. Nella metà posteriore sono state osservate solo poche fibre longitudinali TT-immunoreattive. Nella metà posteriore le uniche altre cellule TT-immunoreattive sono gli cnidociti non-neuronali, più concentrati al polo posteriore della planula (fig. 5A), dove si sviluppa la bocca del polipo primario tramite i processi della metamorfosi. L'analisi di sezioni ottiche di planule marcate con anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilata ha rivelato

la presenza di cellule sensoriali limitata al polo anteriore e di processi neurali che si proiettano nel plesso neurale (Fig. 5B-C). La disposizione delle cellule sensoriali e l'organizzazione del plesso neurale associato sono regolari e altamente ordinati con due eccezioni di rilievo. In primo luogo ammassi più densi di cellule TA-immunoreattive sono state rilevate nell'ectoderma anteriore, dove queste cellule sembrano essere più concentrate che altrove (Fig. 5B, cerchi tratteggiati). Questi raggruppamenti sembrano non essere marcati dall'anticorpo anti TT. In secondo luogo, il plesso neurale ha un'organizzazione reticolare alla sua estremità più anteriore, che è interrotta in una zona ristretta in cui è stata rilevata una discontinuità nella mesoglea (Fig. 5B, C). Questa caratteristica è stata rivelata soltanto da marcatura con anticorpo anti-TA. Cellule sensoriali e fibre nervose immunoreattive sono state raramente osservate nelle ragioni posteriori della planula (Fig. 5B), confermando i risultati ottenuti utilizzando anticorpi anti-TT. L' $\alpha$ -tubulina acetilata è una componente importante degli assonemi. Ciglia marcate sono state osservate nello strato di cellule dell'ectoderma o nel lume all'interno dell'endoderma (Fig. 5B). Cellule TA-immunoreattive sono state rilevate nel sistema nervoso dell'embrione subito dopo la formazione dell'asse corporeo (18-24 ore dopo la fecondazione) (Fig. 5D).

#### **2.4.4 Localizzazione e morfologia dei neuroni GLWamide-immunoreattivi**

Negli cnidari l'uso di anticorpi specifici per i neuropeptidi ha dimostrato che esistono sottopopolazioni discrete di neuroni. Un primo esperimento di immunolocalizzazione è stato eseguito utilizzando un anticorpo policlonale diretto verso neuropeptidi della famiglia GLWamide, che si caratterizzano per la sequenza C-terminale di aminoacidi-Gly-Leu-Trp-NH<sub>2</sub> (Leitz et al., 1994). Questi peptidi svolgono un importante ruolo come neurotrasmettitori negli cnidari, ma sono presenti anche nei mammiferi, dove hanno un ruolo nei meccanismi sensoriali (Hamaguchi-Hamada et al., 2009). Due tipi distinti di cellule GLWamide positive sono state trovate nelle planule di *C. multicornis* (Fig. 6A-E).

Il primo gruppo comprende fino a 80 cellule GLWamide immunoreattive localizzate al polo anteriore della planula (Fig. 6A). Nella parte più anteriore dell'ectoderma, si ha colocalizzazione del segnale di GLWamide con quello di TT e TA (Fig. 5A-C). Tramite l'utilizzo di un microscopio confocale è possibile ottenere una ricostruzione della porzione anteriore della planula in cui le cellule GLWamide positive risultano disposte regolarmente a formare una cupola (Fig. 6A). Le cellule di forma allungata mostrano caratteristiche tipiche delle cellule sensoriali: si estendono verso la superficie apicale esterna e proiettano un lungo neurite basale

nel plesso neurale anteriore (Fig. 6C-D). All'estremità anteriore le cellule GLWamide-immunoreattive sono assenti in prossimità dell'interruzione della mesoglea (fig.6D).

Un secondo tipo di neuroni GLWamide positivi è stato osservato nella parte centrale e posteriore della planula, posteriormente al plesso neurale anteriore (Fig. 6B, E). Queste cellule sono meno abbondanti di quelle anteriori e la loro distribuzione all'interno dell'ectoderma è piuttosto irregolare. Esse diventano rare verso il polo posteriore della planula e sono difficilmente rilevabili all'estremità posteriore (Fig. 6B). In contrasto con la popolazione di cellule GLWamide anteriori, questi neuroni hanno un soma piccolo, e sono bipolari, ossia sono associati a due neuriti longitudinali, proiettati anteriormente al plesso neurale e posteriormente verso la parte terminale (Fig. 6E). Queste cellule sono anche rilevate da anticorpi anti TT e anti TA. In base al numero, la posizione nell'ectoderma, la morfologia dei neuriti e i modelli di proiezione, questo secondo tipo di cellule GLWamide-immunoreattive molto probabilmente corrisponde alle cellule "gangliari" basali descritte in precedenza in planule di altri Idrozoi (Martin,1988).

Le cellule neurali GLWamide-positive della planula vengono rilevate precocemente nell'ectoderma embrionale quando la polarizzazione antero-posteriore dell'embrione è già chiaramente stabilita (Fig. 6F, G). Il sistema neurale GLWamide è già completamente organizzato quando le planule si staccano dal polipo madre e iniziano la loro attività motoria.

#### **2.4.5 Localizzazione e morfologia dei neuroni RFamide-immunoreattivi**

RFamide (Arg-Phe-amide) è un comune neuropeptide presente negli cnidari, e i neuroni che esprimono questo peptide costituiscono un sottoinsieme dell'intera rete nervosa (Grimmelikhuijzen 1984).

L'immunomarcatura con anticorpo policlonale anti-RFamide è stata dimostrata in diverse specie di cnidari (Plickert, 1989; Plickert and Schneider, 2004).

Nella planula di *Clava multicornis* l'immunomarcatura RFamide rivela morfologicamente due tipi di cellule neurali distinti nell'ectoderma della planula: neuroni sensoriali presuntivi e neuroni con processi di fibre orientate longitudinalmente. Tuttavia, il numero e il modello di distribuzione di queste cellule RFamide-positive sono nettamente differenti da quelli di cellule GLWamide-positive (Fig. 6A). In primo luogo, i neuroni RFamide-positivi sono in numero marcatamente minore (20-25) rispetto alle cellule GLWamide-positive (Fig. 7 A, B). In secondo luogo, la maggior parte delle cellule RFamide-positive è localizzata in una stretta fascia localizzata nella metà anteriore del corpo della planula (Fig. 7A, B). Alcuni neuroni sensoriali RFamide positivi sono situati nell'ectoderma più anteriore. Le cellule RFamide-positive anteriori

mostrano caratteristiche tipiche dei neuroni sensoriali. Sono a forma di clava, con un breve processo apicale che si estende sino alla superficie dell'ectoderma della planula in contatto con l'ambiente esterno e un neurite basale proiettato verso il plesso anteriore (Fig. 7C). Le cellule RFamide-positivo del secondo tipo (Fig. 7D) hanno piccoli soma e sono sparse lungo l'asse principale del corpo con due neuriti basali opposti che decorrono sopra la mesoglea diretti verso i poli anteriore e posteriore. Mostrano uno schema ordinato di distribuzione lungo l'asse antero-posteriore (Fig. 7A). Come la popolazione cellulare GLWamide-positiva, le cellule del sistema neurale RFamide-positivo sono già rilevabili nell'ectoderma embrionale (Fig. 7E) dal momento in cui l'asse principale del corpo planula è stabilito. Al momento del rilascio dal polipo madre il sistema neurale RFamide-positivo è completamente differenziato nella planula.

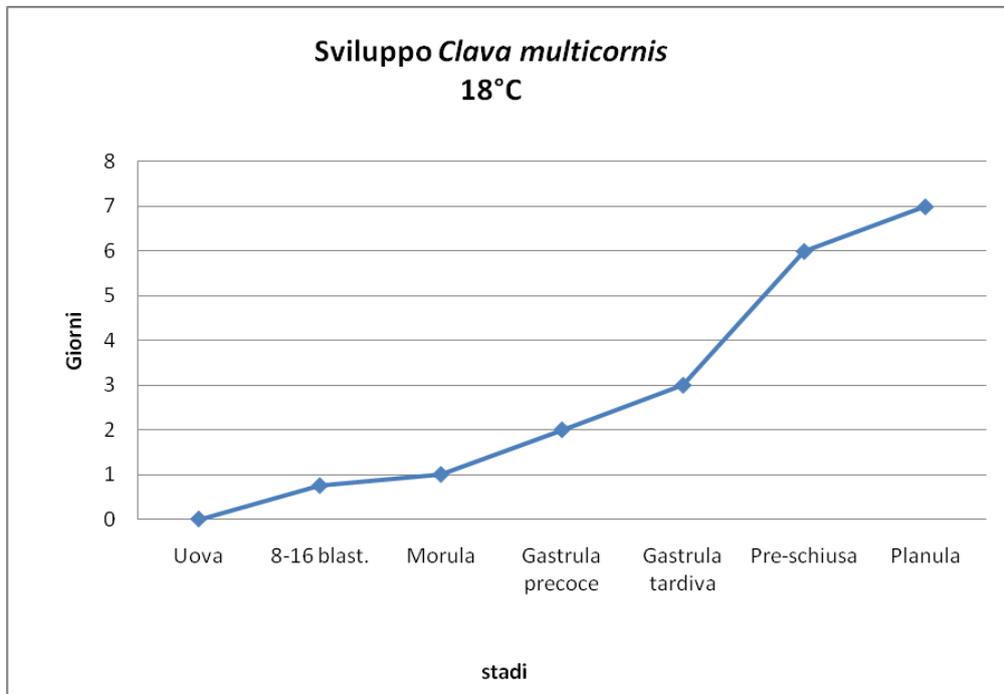
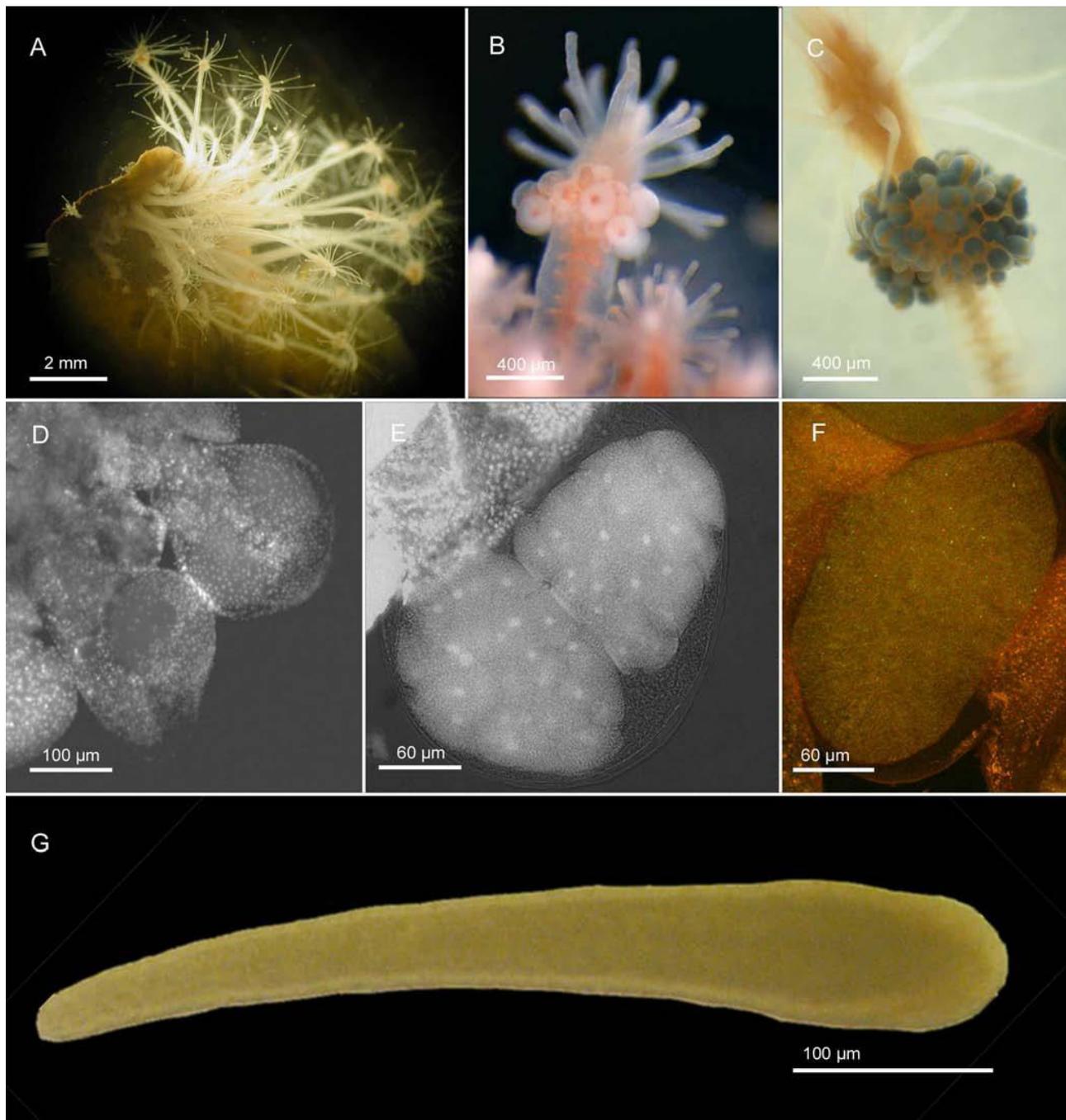


Fig. 1: Tempi di sviluppo di embrioni di *Clava multicornis*.



**Fig. 2. Ciclo vitale di *C. multicornis*.** A: Colonia di idroidi sull'alga *Ascophyllum nodosum* (alghe marroni). B: Primo piano di polipo maschile: gonofori biancastri a diversi stadi di sviluppo circondano l'idrante, appena sotto i tentacoli. C: polipi femminili con gonofori bluastrici (embrioni a diversi stadi di sviluppo). D-E: Gonofori femminili ed embrioni a diversi stadi di sviluppo. D: All'interno di ogni gonoforo femminile sono contenute da uno a due uova; nel gonoforo si svolgono fecondazione e sviluppo dell'embrione. E: Embrioni a 16-32 cellule (colorazione DAPI). F: Giovane larva, 24ore dopo la fecondazione. L'asse antero-posteriore è già stabilito. G: Planula schiusa. 176x186mm (300 x 300 DPI)



**Fig. 3. Comportamento fototropico e locomozione della planula.** La larva presenta un comportamento fototropico mentre striscia sul substrato tramite l'alternanza di flessioni a destra e a sinistra lungo l'asse corporeo A/P. Scale bar = 150 µm.

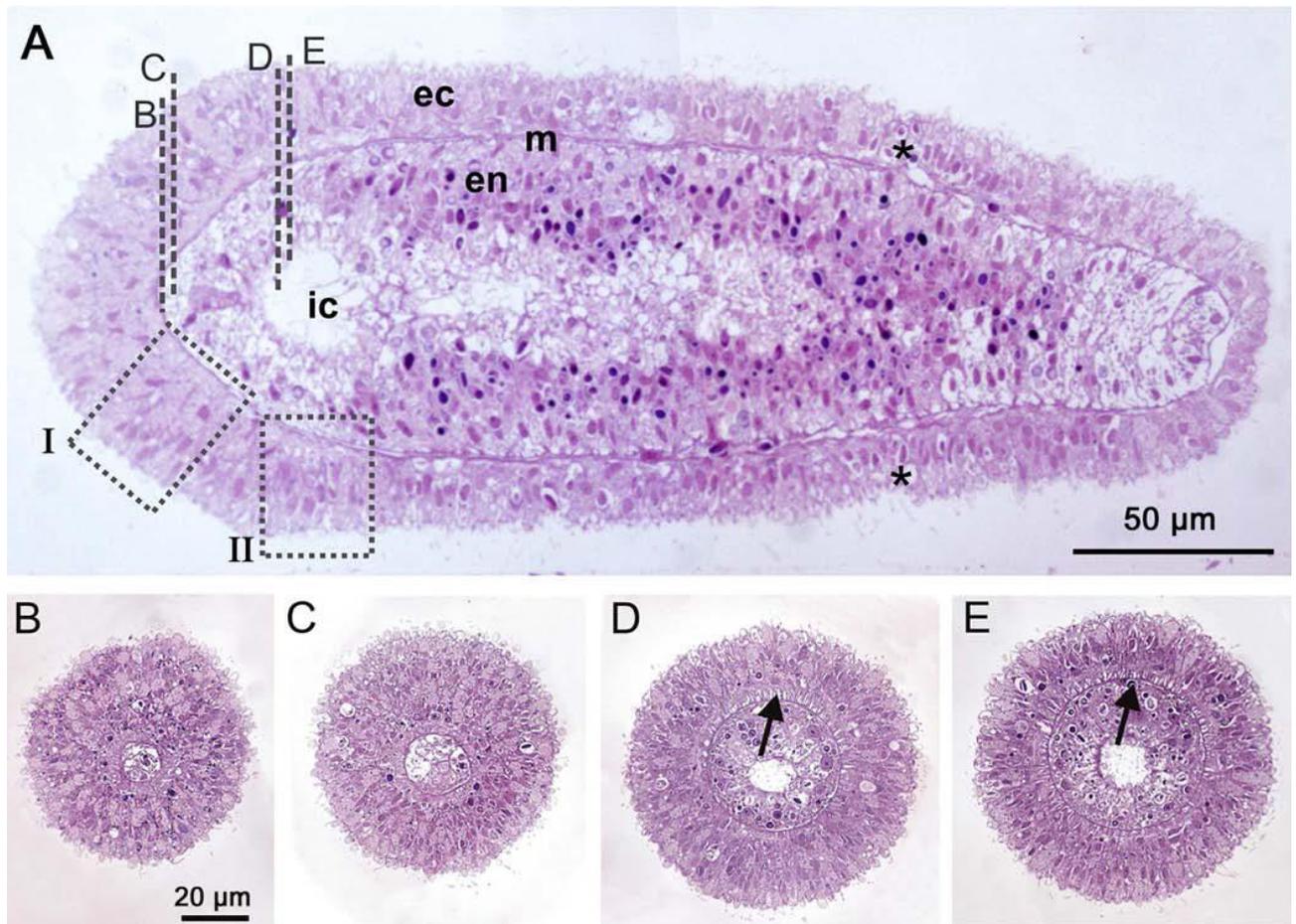


Fig. 4. Anatomia microscopica della planula di *C. multicorni*. A-E: Sezioni semifini (4 µm) A: Sezione longitudinale a livello della cavità endodermica che evidenzia un'organizzazione diploblastica della larva planula con ectoderma (CE) e endoderma (it) separati da una sottile mesoglea (m). Gli cnidociti sono visibili nell'ectoderma e sono più numerosi nella regione posteriore / polo aborale (asterischi). Polo anteriore a sinistra (IC: cavità interna). I quadrati tratteggiati I e II corrispondono alle sezioni TEM della Figura 4, rispettivamente A e B. B-C, D-E: Coppie di sezioni trasversali corrispondenti ai livelli indicati dalle linee tratteggiate. In ogni coppia, le sezioni trasversali sono separate da 5 µm, mentre la distanza tra le coppie è di circa 30 µm. B, C: Le sezioni anteriori indicano l'inizio del lume interno, a questo livello l'ectoderma presenta uno spessore leggermente variabile. D, E: A livello della massima circonferenza larvale, il lume si allarga e lo spessore dell'ectoderma appare uniforme. Al contrario, le lacune dell'ectoderma basale associate al plesso neurale sulla mesoglea non sono distribuite uniformemente (freccie, confrontare anche con la figura 5 D).  
172x124mm (300 x 300 DPI)

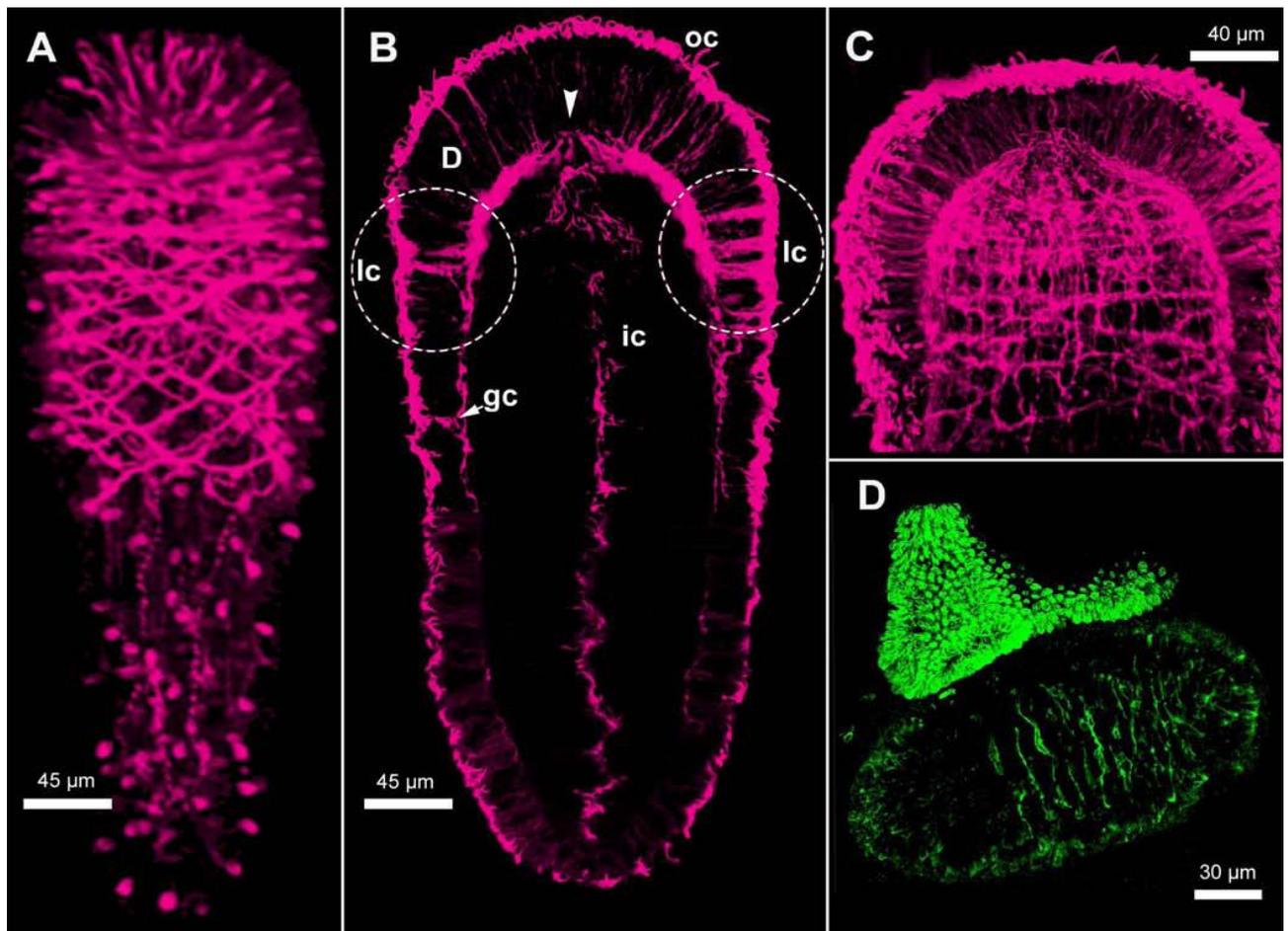


Fig. 5. Analisi immunocistochimica del sistema nervoso della planula con anticorpi anti-tubulina firosinata-(TT) e anti- $\alpha$ -tubulina acetilata (AT).

A: La somma di 12 sezioni ottiche di una planula marcata contro TT rivela la presenza di una rete neurale altamente sviluppata al polo anteriore. Il sistema TT-immunoreattivo evidenzia elementi sensoriali ectodermici altamente concentrati nel primo quarto anteriore della larva insieme a commissure ortogonali che attraversano obliquamente l'asse principale AP con un angolo di 45°. Ulteriori elementi TT-immunoreattivi sono situati nella parte posteriore della larva sono individuabili mediante microscopia ottica come gli cnidociti. B-C: Planule marcate contro da anticorpi anti-AT. La marcatura è diretta contro le ciglia esterne (oc), localizzate su tutta la superficie dell'ectoderma della planula, ed all'interno del lume dell'endoderma (ic). B: Somma di 5 sezioni ottiche orizzontali a livello del lume interno. Diverse cellule allungate sono marcate nell'ectoderma anteriore, in parte raggruppate in gruppi laterali (cerchi tratteggiati, lc: cellule laterali). Le cellule gangliari sono sparse nella regione mediana e posteriore (gc). Un plesso nervoso ectodermico basale fiancheggia la mesoglea e appare più spesso al polo anteriore (primo quarto della planula). Si nota la discontinuità anteriore della mesoglea (freccia). C: Somma di 5 sezioni ottiche orizzontali alla base dell'ectoderma. Numerose cellule fusiformi marcate nell'ectoderma anteriore si connettono al plesso nervoso, le cui fibre sono organizzate in una rete ortogonale. L'interruzione anteriore nella mesoglea si accompagna ad una organizzazione più flessibile del plesso nervoso. D: AT-immunoreattività in un planula pre-schiusa (36 h pf; somma ottica 5 di sezioni longitudinali) evidenzia la comparsa di elementi sensoriali precoci ed elementi commisurali ortogonali all'asse del corporeo principale. Il peduncolo del gonoforo (in alto e come 8E) possiede un gran numero di cnidociti di protezione e cellule ciliate.

176x129mm (300 x 300 DPI)

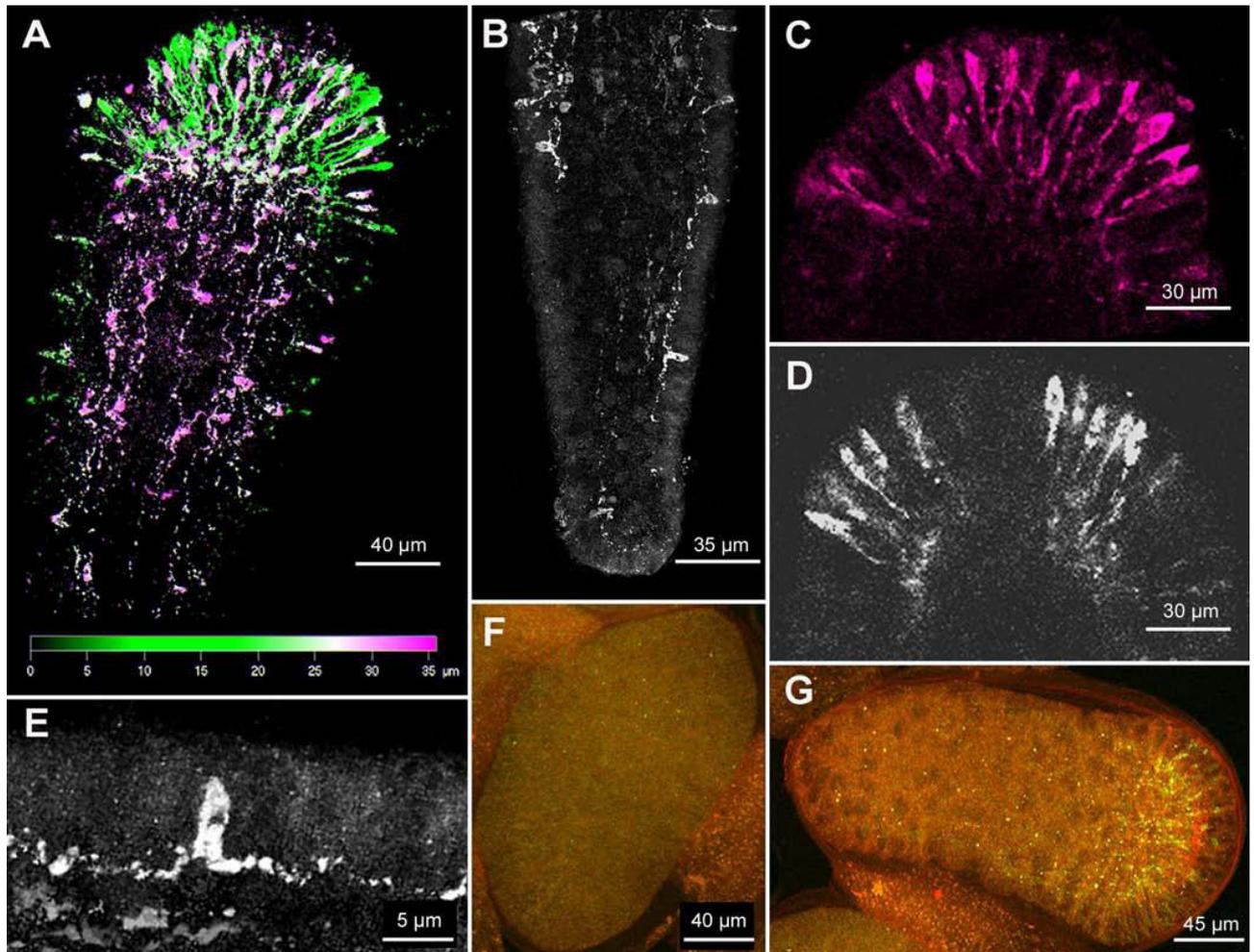


Fig. 6. Sistema nervoso delle planarie GLWamide-immunoreattivo. Localizzazione di peptidi GLWamide nella planula intera. A: Localizzazione di cellule GLWamide-immunoreattive (somma di 12 sezioni ottiche longitudinali). Una fitta rete tridimensionale di cellule ectodermiche sensoriali caratterizza il polo anteriore della planula. Da ogni cellula periferica si estende un processo sottile citoplasmatico prossimalmente. B: Nella parte posteriore della planula i neuroni GLWamide-immunoreattivi decorrono longitudinalmente lungo il confine tra ectoderma e endoderma. Questi interneuroni presumibilmente gangliari potrebbero anche avere una funzione sensoriale, dal momento che i loro corpi cellulari possono estendersi sino alla superficie. C, D. regione anteriore della planula. C. Singola sezione ottica vicino alla superficie superiore della planula. D. Come campione C. Una singola sezione ottica della testa della planula (vista dall'alto) nel punto mediano lungo l'asse Z mostra che le cellule GLW-ammidie sono assenti nella zona più centrale del ectoderma, vale a dire a livello dell'interruzione della mesoglea evidente nelle figure. 5 - 6. E. Ingrandimento di una cellula gangliare bipolare della regione posteriore della planula. Immunomarcatura punteggiata. F. Embrione 24h post fecondazione con segnale di immunoreattività GLWamide basso o nullo (cifra invariata rispetto 1F). G. Embrione 36h post fecondazione. Dopo l'istituzione dell'asse corpo AP, la differenziazione delle cellule GLWamide-immunoreattive è presente al polo anteriore della futura planula.

176x136mm (300 x 300 DPI)

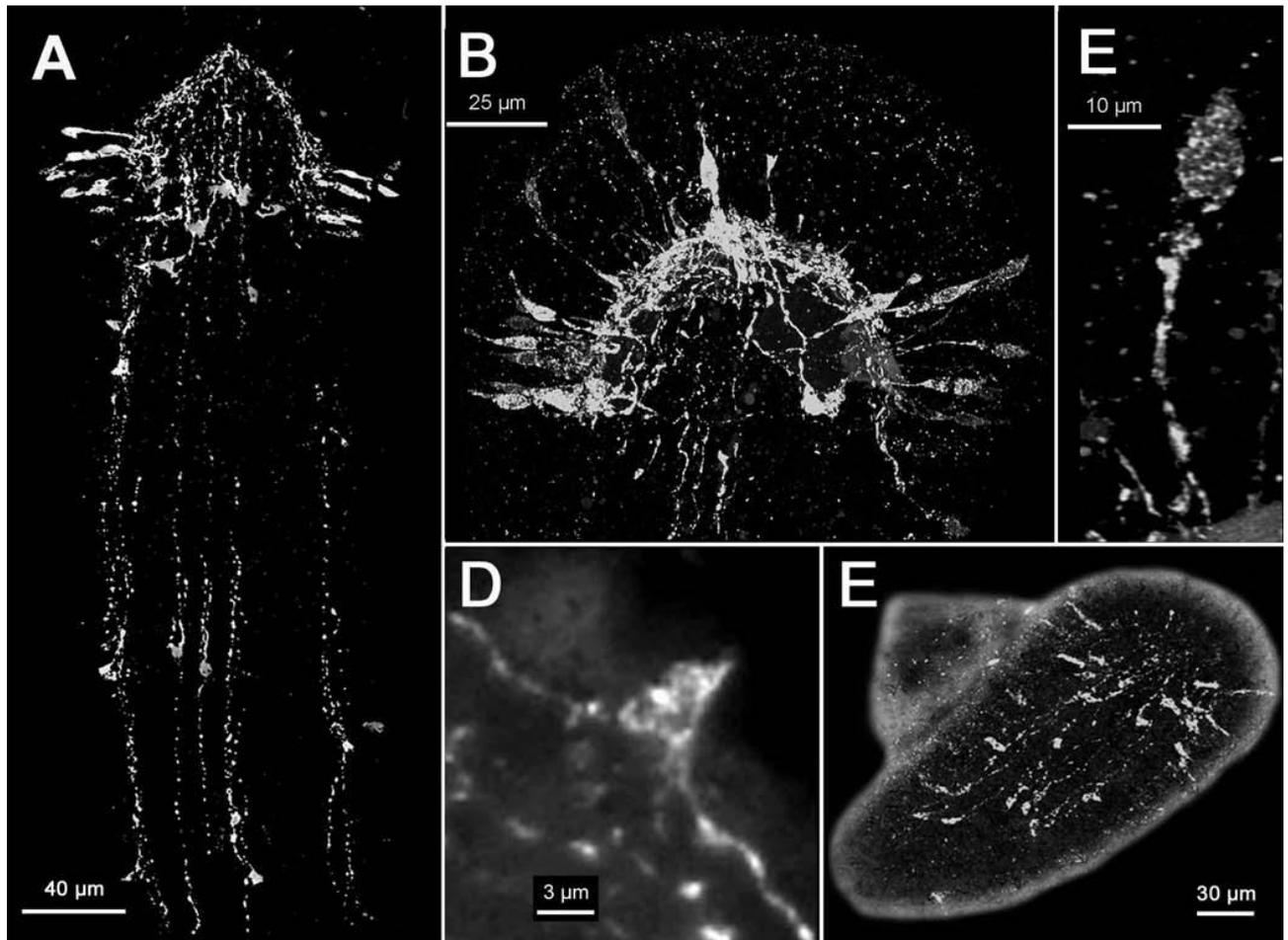


Fig. 7. Sistema nervoso RFamide-immunoreattivo delle planule.

A. Localizzazione whole-mount del sistema nervoso RFamide-immunoreattivo (somma di 12 sezioni ottiche orizzontali) rivela la presenza di neuroni sensoriali situati nella zona antero-mediana della planula, e cellule gangliari bipolari con neuriti orientati longitudinalmente che presentano immunomarcatura punteggiata. B. Ingrandimento della parte anteriore della planula. Cellule sensoriali RF-immunoreattive appaiono in una stretta cintura, principalmente due gruppi contrapposti (freccette) e con alcuni elementi situati al polo anteriore (freccette). I corpi cellulari sono situati basalmente o entro l'ectoderma ed hanno processi citoplasmatici di estensione prossimale e distale. Un plesso di fasci di neuriti RFamide positivi si trova tra l'ectoderma e la matrice extracellulare, e collega i due gruppi laterali di cellule sensoriali trasversalmente. C. Ingrandimento di cellule sensoriali RFamide-immunoreattive, con tipica forma a clava, con brevi processi apicali e neuriti basali. D. Ingrandimento di una cellula gangliare bipolare del polo posteriore. E. La differenziazione di cellule embrionali RFamide-immunoreattive (36 ore dopo la fecondazione) quando la polarità A-P è già stabilita. Posteriormente le cellule gangliari proiettano anteriormente un singolo neurite. 176x130mm (300 x 300 DPI)

## 2.5 DISCUSSIONE

A differenza delle planule planctoniche di molti cnidari, che nuotano grazie ad un semplice movimento ciliare (Werner, 1984; Bouillon et al, 2006), le planule di *Clava multicornis* hanno un comportamento relativamente complesso, strisciando attivamente sul substrato.

Questo tipo di comportamento si caratterizza per l'orientamento della planula in avanti con l'estremità anteriore, di solito accompagnato da flessioni laterali che aiutano l'animale a progredire sul substrato. Tali attività motorie coordinate richiedono un sistema nervoso

relativamente complesso. Il polo anteriore della larva è particolarmente importante per rilevare la struttura e l'idoneità del substrato. L'estremità anteriore presenta densi aggregati di particolari tipi di cellule neurali. Queste caratteristiche morfologiche possono rappresentare i prerequisiti per il comportamento locomotorio della planula. La concentrazione al polo anteriore di cellule ghiandolari mucose offre una specializzazione utile per la temporanea adesione della larva al substrato durante la locomozione e nella fase successiva in cui l'adesione corrisponde al momento della metamorfosi (Bouillon, 1995). Dato che le cellule ghiandolari alla base sono in contatto con il plesso neurale o incorporate tra elementi sensoriali, l'entità della secrezione mucosa potrebbe essere regolata dal controllo neurale.

### **2.5.1 Polarizzazione anteriore del sistema nervoso della larva**

Un grado di concentrazione neurale paragonabile non è ancora stato osservato in nessuna planula di altri cnidari.

In termini di complessità anatomica, il sistema nervoso delle planule della maggior parte degli cnidari è costituito da una rete diffusa distribuita radialmente in tutta la larva natante (Galliot et al., 2009).

In questa rete sono sparsi gruppi di cellule sensoriali (soprattutto al polo anteriore) e nematociti (soprattutto al polo posteriore o "orale", dove si formerà la bocca polipo con la metamorfosi). Nelle planule di *Aurelia* è presente una rete neurale RFamide regionalizzata lungo l'asse A-P con neuroni regolarmente distanziati nella regione anteriore e neuriti che si estendono longitudinalmente verso il polo aborale (fino al 60% della lunghezza del corpo), mentre le cellule TT-immunoreattive appaiono distribuite omogeneamente (Nakanishi et al., 2008; Galliot et al., 2009).

Nelle planule di *Acropora*, le cellule RFamide-immunoreattive sono distribuite prevalentemente nella metà anteriore del corpo della planula ma non presentano un'organizzazione in gruppi distinguibili (Hayward et al., 2001). Nei giovani di *N. vectensis* le cellule RFamide-immunoreattive sembrano essere sparse nell'ectoderma, con un'alta concentrazione localizzata vicino al ciuffo ciliare apicale, e dopo la metamorfosi sono localizzate alla base dei tentacoli del polipo primario (Marlow et al., 2009; Galliot et al., 2009).

Nell'idrozoo *Podocoryne carnea*, le cellule nervose iniziano a differenziarsi 24 ore dopo la fecondazione formando delle unità modulari ad anello, partendo dal polo anteriore verso quello posteriore, che costituiscono così una rete diffusa (Gröger and Schmid, 2001).

Le planule di *Pennaria disticha* posseggono una sottopopolazione di cellule ganglioniche FMRFamide-immunoreattive (Martin, 1988a,b), il cui corpo cellulare ed i neuriti formano un plesso basale nell'ectoderma, confinato nella metà anteriore della planula (Martin, 1988b).

Cellule nervose LWamide neurosecretorie e RFamide-immunoreattive sono state osservate nella parte anteriore delle larve in sviluppo e mature di *Hydractinia echinata* (Plickert, 1989; Leitz and Lay, 1995; Gajewski et al., 1996). Il modello di distribuzione spaziale del sistema GLWamide-immunoreattivo, tuttavia, per ora è stato documentato solo in larve e polipi di *Hydractinia echinata* (Schmich et al., 1998a,b). In questa specie le cellule sensoriali GLWamide-immunoreattive sono sparse radialmente nell'ectoderma; nella parte anteriore della planula esse sono localizzate subapicalmente in una fascia larga 150 µm (vedi Gajewski et al., 1996: Fig. 3A,B; e Schmich et al., 1998b: Fig. 2C).

Questo arrangiamento è in contrasto con la maggior parte delle cellule GLWamide-immunoreattive presenti nella planula di *C. multicornis*, che sono marcatamente polarizzate in un dominio ristretto nella parte più anteriore della planula.

Così, mentre un modesto grado di regionalizzazione è stato segnalato per il sistema nervoso di altre planule, in nessuna di queste l'architettura neurale è paragonabile all'organizzazione riscontrata *C. multicornis*.

Inoltre, nessuna planula di cnidari analizzata finora presenta una distribuzione circonferenziale delle cellule sensoriali nella porzione anteriore dell'ectoderma. Anche se nella maggior parte delle planule c'è un percentuale maggiore di cellule sensoriali e gangliari nella porzione anteriore, i tipi e il numero di cellule sensoriali e il loro grado di raggruppamento nelle planule di *C. multicornis* sono senza pari.

Mentre l'immunoreattività GLWamide rivela una grande cupola apicale di cellule sensoriali, l'immunoreattività per il peptide RFamide è visibile solo in una fascia ristretta di neuroni sensoriali che per lo più forma due gruppi laterali di cellule al polo anteriore della planula. Data la forma cilindrica della planula e la concezione corrente di simmetria radiale negli cnidari, questa osservazione è notevole. Un confronto tra le due serie di cellule GLWamide-immunoreattive ed RFamide-immunoreattive con il totale della popolazione di cellule evidenziate da marcatori pan-neurali indica inoltre l'esistenza di ulteriori sottopopolazioni di tipi neurali non ancora identificati. Per esempio, gli elementi neurali che sono responsabili della fitta rete di fibre commissurali (TT-immunoreattiva) nella parte anteriore della planula devono essere ancora identificati.

Le cellule sensoriali sono probabilmente chemio o fotorecettori coinvolti in eventi chiave quali l'adesione al substrato e la metamorfosi. Si pensa che neuropeptidi secreti dalle cellule sensoriali

rappresentino importanti segnali interni per il coordinamento del processo metamorfico (Schwoerer-Böhning et al., 1990; Leitz, 1993; Schmich et al., 1998a, b; Plickert et al., 2003) come per la trasmissione sinaptica dell'attività neuronale (Watanabe et al., 2009).

Nell'idrozoo *Hydractinia echinata*, si ritiene che piccoli gruppi neurali, in posizione anteriore, immunoreattivi per GLWamide e/o RFamide, siano coinvolti nella rilevazione di segnali chimici, nel controllo del comportamento motorio e fototropico, e per l'inizio della metamorfosi (Plickert, 1989; Leitz e Lay, 1995; Schmich et al., 1998a, b; Muller e Leitz, 2002; Katsukura et al., 2004). Dopo la scoperta della metamorfosina A, vari peptidi GLWamidati sono stati isolati da idrozoi adulti e antozoi (vedi Leitz, 1998), e la comparsa di popolazioni di cellule GLWamide-immunoreattive è stata documentata nel sistema neurale di diversi cnidari, compresi gli antozoi, scifozoi e idrozoi (Leitz et al., 1994; Leitz e Lay, 1995). La loro presunta funzione è la ricezione chimica e l'attivazione del segnale per il processo metamorfico.

È stata recentemente documentata l'esistenza di un nuovo neuropeptide di mammifero appartenente alla famiglia GLWamide, forse coinvolto nei meccanismi sensoriali (Hamaguchi-Hamada et al., 2009). Diversi dati sperimentali indicano la capacità dei peptidi GLWamide di indurre la metamorfosi nelle planule appartenenti a diversi taxa, dai coralli agli idrozoi (Leitz e Lay, 1995; Iwao et al., 2002; Muller e Leitz, 2002; Plickert et al., 2003). Alla luce di questi risultati, è ipotizzabile che le cellule GLWamide-immunoreattive di *C. multicornis* possano essere direttamente coinvolte nell'inizio e/o nella regolazione del segnale di questo processo.

Dato il pronunciato comportamento fototattico positivo delle planule di *C. multicornis*, almeno alcune delle cellule sensoriali anteriori possono essere fotorecettori, in particolare, le cellule RFamide-immunoreattive. Anche se resta da chiarire la modalità di funzionamento della famiglia dei peptidi RFamide negli cnidari (Watanabe et al., 2009), i dati sulle larve di *Hydractinia echinata* e su giovani meduse di *Tripedalia cystophora* suggeriscono un ruolo nella trasmissione degli stimoli luminosi (Katsukura et al., 2004; Plickert e Schneider, 2004). Martin (2004) ha suggerito un'interazione tra opsine e peptidi RFamide nei fotorecettori dei cubozoa. Quest'ultima osservazione sembra essere confermata dalla colocalizzazione di peptidi RFamide nelle cellule che esprimono l'opsina CropJ nelle meduse di *Cladonema radiatum* (Suga et al., 2008).

Le cellule sensoriali RFamide-immunoreattive ed i loro neuriti sono distribuiti diffusamente nella metà anteriore delle planule di antozoo che nuotano con movimento rotazionale (Hayward et al., 2001; Marlow et al., 2009). Inoltre le planule mature dello scifozoo *Aurelia aurita*, che non nuotano attivamente, possiedono un sistema nervoso ectodermico, concentrato anteriormente, con una distribuzione apicale di cellule RF-immunopositive ed un plesso apicale che si estende verso il polo posteriore (Nakanishi et al., 2008). Rispetto al sistema nervoso

FMRFamide-immunoreattivo della planula di *Aurelia*, tuttavia, il numero apicale delle cellule sensoriali nella planula di *C. multicornis* sembra essere maggiore, e quest'ultime sono localizzate in una stretta cintura e sono raggruppate per lo più in due domini laterali. Un comportamento fototropico paragonabile a quello delle planule di *C. multicornis* è stata riscontrato nella planula di *H. echinata*, che, pur strisciando in avanti, piega l'estremità anteriore perpendicolarmente all'asse di direzione della luce, esponendo il lato precedentemente in ombra verso la sorgente luminosa e stimolando la flessione del lato opposto. In questo contesto, i due gruppi laterali di cellule RFamide immunoreattive delle planule di *C. multicornis* potrebbero essere coinvolti nella fotorecezione e/o nella trasmissione degli stimoli luminosi alle cellule mioepiteliali che mediano la flessione del corpo. Ulteriori esperimenti faranno luce sulle possibili funzioni sensoriali di queste cellule e sulle basi molecolari per la fotorecezione nelle planule di *C. multicornis*.

Considerando che il ruolo dei peptidi RFamidati è stato associato con specifiche funzioni sensoriali come la fotorecezione e con comportamenti specifici come la fototassi, il segnale neurale relativo al comportamento fototattico e il ruolo della metamorfosina A nelle planule di *C. multicornis*, e generalmente negli cnidari, non sono ancora chiari. Le marcate differenze nella distribuzione spaziale e nel numero di cellule GLWamide immunoreattive contro quelle RFamide immunoreattive nelle planule di *C. multicornis* sostiene l'ipotesi che il sistema nervoso di queste planule è notevolmente sviluppato, che comprende popolazioni diverse di cellule neuronali con differenti proprietà morfologiche e biochimiche. Se la coespressione di GLWamide e RFamide avviene in un sottoinsieme limitato di queste cellule non è ancora stato determinato e resta ancora da esplorare, ma il modello di distribuzione di queste due popolazioni di cellule neurali suggerisce una localizzazione diversa per ogni peptide.

Un plesso neurale insolitamente complesso si trova nella parte anteriore di questa planula. Esso comprende un grande complesso ordinato di fasci di fibre di fibre neurali circonferenziali, obliqui e longitudinali. I neuriti delle cellule sensoriali si proiettano in questa rete di fasci, e possono quindi trasmettere le informazioni sensoriali. Anche i neuriti che derivano dalle cellule gangliari sparse nella parte posteriore della planula si proiettano nel plesso anteriore. Ciò implica che il plesso anteriore può essere coinvolto nel processo di integrazione delle informazioni neurali provenienti da diverse parti del planula. Nelle planule di altri idrozoi è già stato descritto un plesso neurale ectodermico diffuso che si estende per tutta la lunghezza della planula (Martin, 1988a, b; Leitz, 1993; Gröger e Schmid, 2001), ma, in termini di numero di neuriti, la diversità, la polarizzazione, il modello di distribuzione e il livello di complessità strutturale e organizzativa del plesso neurale delle larve di *C. multicornis* sembrano essere senza pari.

## 2.5.2 Considerazioni evoluzionistiche

Complessivamente la disposizione regolare e l'alta concentrazione di diverse cellule sensoriali al polo anteriore della planula ricorda la struttura del sistema nervoso sensoriale dei più semplici bilateri (Raikova et al, 1998.; Gaerber et al., 2007; Kotikova e Raikova, 2008; Schmidt-Rhaesa, 2009). Inoltre, la disposizione ordinata dei processi neurali in questo plesso ha caratteristiche morfologiche che si trovano anche nei neuropili centrali dei gangli dei bilateri (Meinertzhagen, 2010). Per esempio, la presenza nel polo anteriore di molteplici fasci di fibre longitudinali intersecati ortogonalmente da fasci di fibre commissurali è una caratteristica del sistema nervoso centrale di alcuni protostomi semplici (Nielsen, 1994).

Dato il suo alto livello di complessità morfologica, la restrizione anatomica ad un lato della planula del plesso neurale anteriore, lungo un asse corporeo secondario (ortogonale all'asse principale A-P), in teoria sarebbe sufficiente a dare origine alla formazione di una struttura con la maggior parte delle caratteristiche di un sistema nervoso centrale di un semplice organismo bilaterio.

Al momento non è noto se questo tipo di ipotetiche "restrizioni" dorsoventrali del plesso anteriore siano presenti in tutte le planule degli cnidari, ma l'asimmetria nello spessore dell'ectoderma nella regione anteriore della planula di *C. multicornis* potrebbe sostenere l'ipotesi di una precoce istituzione di un meccanismo primordiale di determinazione dell'asse dorso-ventrale.

Un'ulteriore caratteristica del plesso neurale anteriore delle planule di *C. multicornis* ricorda le proprietà del ganglio anteriore dei protostomi.

Nel loro insieme, tutte queste caratteristiche organizzative implicano che il sistema nervoso della planula di *C. multicornis* è caratterizzato da un notevole livello di complessità le cui caratteristiche ricordano quelle che si trovano nei semplici organismi bilateri. Quale potrebbe essere l'origine evolutiva di questa complessità? In primo luogo, la relativa complessità del sistema nervoso delle planule potrebbe essersi evoluta come un adattamento ad uno stile di vita bentonico, in risposta ad un nuovo comportamento locomotorio. In questo caso, il sistema nervoso delle planule di *C. multicornis* rivelerebbe la capacità potenziale di sviluppare un sistema nervoso complesso specifico di un bauplan radiale. In secondo luogo, la relativa complessità del sistema nervoso delle planule di *C. multicornis* potrebbe indicare che l'antenato comune degli cnidari e bilateri aveva già raggiunto un discreto grado di "cefalizzazione" del sistema nervoso. In questo caso, il sistema nervoso delle planule di *C. multicornis* potrebbe testimoniare la presenza di caratteristiche organizzative e di sviluppo che nei bilateri attuali guidano la formazione di un sistema nervoso centralizzato. Le due ipotesi non si escludono:

l'adattamento del sistema nervoso ad uno stile di vita bentonico potrebbe aver attivato in seguito dei meccanismi genetici preesistenti per polarizzare e concentrare il sistema nervoso anteriormente.

Data la limitata conoscenza dell'ecologia e della neuroanatomia degli stadi larvali nella maggior parte degli cnidari, sono necessarie ulteriori indagini sulle larve di cnidari che presentano un comportamento locomotorio bentonico comparabile a quello delle planule di *C. multicornis* per verificare se la presenza di un sistema nervoso concentrato anteriormente è un carattere plesiomorfico o apomorfico.

Anche se l'ipotesi che gli cnidari derivino da un antenato bilaterale è controversa, ci sono prove indiscusse che cnidari e bilateri condividono una vasta serie di strumenti genetici di sviluppo che portano alla determinazione assiale alla specificazione neurale ed alla triploblastia nei protostomi e deuterostomi (Kusserow et al., 2005; Boero et al., 2007; Jacobs et al., 2007).

Rimane in dubbio se questi strumenti di sviluppo in comune vengano utilizzati in modo specifico dagli cnidari per formare il sistema nervoso o sono stati utilizzati dall'ipotetico ur-eumetazoo per generare il sistema nervoso di tutti gli animali. C'è stato un dibattito considerevole in letteratura circa l'origine negli cnidari dell'asse oro-aborale e come si relazioni con l'asse anteroposteriore dorsoventrale dei bilateri (Martindale, 2005; De Jong et al., 2006; Rentzsch et al., 2006; Ball et al., 2007). La difficoltà maggiore sussiste nell'incerta equivalenza dei modelli di espressione genica di *Hox/Parahox* nei diversi cnidari (Yanze et al., 2001; Finnerty et al., 2003). Comunque, la constatazione di un ruolo conservato della via di segnale *Wnt* nella formazione degli assi sostiene l'idea che la determinazione dell'asse oro-aborale abbia una origine comune tra cnidari e bilateri (Guder et al., 2006; Momose et al., 2008).

Le planule dell'idrozoo *C. multicornis* possiedono diverse specializzazioni morfologiche che differiscono da quelle degli stadi larvali dei tradizionali modelli di cnidari. Tra questi ci sono l'apertura anteriore, una locomozione tipica da bilaterio ed una primitiva "cefalizzazione". La sua morfologia complessiva presenta caratteristiche che sono indicate come requisiti plesiomorfici di un antenato planuloide di cnidari e bilateri (Hyman, 1951; Holland, 2003). La controversia corrente "oro-aborale" è probabilmente legata ad una terminologia anatomica legata allo stadio di polipo, che dovrebbe probabilmente essere abbandonata. Si è già notato che l'ectoderma e l'endoderma delle planule non si possono essere evoluti equivalentemente nelle diverse specie di cnidari e, inoltre, che i modelli di espressione genica nelle planule dei diversi taxa di cnidari devono essere confrontati con cautela (Yuan et al., 2008). Inoltre, le modalità di gastrulazione ed i tempi di sviluppo sono così diversificati negli embrioni e nelle larve degli cnidari (Bouillon,

1995) che le generalizzazioni a livello di classe o phylum non devono essere basate su osservazioni su un singolo modello.

Analogamente il sistema nervoso anteriore delle planule di *C. multicornis* non deve essere interpretato di per sé come una struttura equivalente ad un “Protocervello”. Tuttavia, non si dovrebbe escludere la possibilità che, per anticipazione della maturità sessuale (progenesi) in una larva ancestrale di un prototipo di cnidario, ulteriori adattamenti anatomici per la locomozione strisciante (tra cui un sistema nervoso centralizzato), come in *C. multicornis*, potrebbero essersi conservati e ulteriormente specializzati, abbattendo in tal modo i vincoli evolutivi legati alle anatomie di polipi e meduse. Sono richiesti ulteriori studi comparativi con nuovi modelli di relazioni cnidari/bilateri per affrontare questi problemi e per verificare l'ipotesi che la condizione neuroanatomica di un antenato comune, da cui derivano i sistemi nervosi degli cnidari e bilateri odierni, avesse già raggiunto un alto livello di complessità organizzativa.

## 2.6 BIBLIOGRAFIA

Arendt D, Denes AS, Jekely G, Tessmar-Raible K. 2008. The evolution of nervous system centralization. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:1523–1528.

Boero F, Gravili C, Pagliara P, Piraino S, Bouillon J, Schmid V. 1998. The cnidarian premises of metazoan evolution: from triploblasty, to coelom formation, to metamery. *Ital J Zool* 65:5–9.

Boero F, Schierwater B, Piraino S. 2007. Cnidarian milestones in metazoan evolution. *Integr Comp Biol* 47:693–700.

Bouillon J. 1995. Classe des Hydrozoaires. In: Grasse´ PP, Doumenc D, editors. *Traite´ de zoologie*, vol 3. Paris: Masson. p 29–416.

Bouillon J, Gravili C, Page`s F, Gili JM, Boero F. 2006. An introduction to Hydrozoa. *Mem Mus Nat Hist Natur Paris* 194: 1–591

Chia FS, Bickell L. 1978. Mechanisms of larval settlement and the induction of settlement and metamorphosis: a review. In: Chia FS, Rice ME, editors. *Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae*. New York: Elsevier. p 1–12.

Chia FS, Koss R. 1979. Fine-structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea-anemone *Anthopleura elegantissima*. *J Morphol* 160: 275–298.

Collins AG. 1998. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: an analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15458–15463.

De Robertis EM. 2008. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* 132:185–195.

Denes AS, Jekely G, Steinmetz PR, Raible F, Snyman H, Prud'homme B, Ferrier DE, Balavoine G, Arendt D. 2007. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in Bilateria. *Cell* 129:277–288.

Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen MV, Haddock SH, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452:745–749.

Finnerty JR. 2003. The origins of axial patterning in the Metazoa: how old is bilateral symmetry? *Int J Dev Biol* 47:523–529.

Finnerty JR, Paulson D, Burton P, Pang K, Martindale MQ. 2003. Early evolution of a homeobox gene: the parahox gene *Gsx* in the Cnidaria and the Bilateria. *Evol Dev* 5: 331–345.

Gaerber CW, Salvenmoser W, Rieger RM, Gschwentner R. 2007. The nervous system of *Convolutiloba* (Acoela) and its patterning during regeneration after asexual reproduction. *Zoomorphology* 126:73–87.

Gajewski M, Leitz T, Schloscherr J, Plickert G. 1996. LWamides from cnidaria constitute a novel family of neuropeptides with morphogenetic activity. *Roux Arch Dev Biol* 205: 203–242.

Galliot B, Quiquand M, Ghila L, De Rosa R, Miljkovic-Licina M, Chera S. 2009. Origin of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev Biol* 332:2–24.

- Garm A, Ekström P, Boudes M, Nilsson DE. 2006. Rhopalia are integrated part of the central nervous system in box jellyfish. *Cell Tissue Res* 325:333–343.
- Garm A, O'Connor M, Parkefelt L, Nilsson DE. 2007a. Visually guided obstacle avoidance in the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Chiropsella bronzie*. *J Exp Biol* 210: 3616–3623.
- Garm A, Poussart Y, Parkefelt L, Ekström P, Nilsson DE. 2007b. The ring nerve of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Cell Tissue Res* 329:147–157.
- Gerrodette T. 1981. Dispersal of the solitary coral *Balanophyllia elegans* by demersal planula larvae. *Ecology* 62:611–619.
- Grimmelikhuijzen CJP. 1985. Antisera to the sequence Arg-Phe-amide visualize neuronal centralization in hydroid polyps. *Cell Tissue Res* 241:171–182.
- Großer H, Schmid V. 2001. Larval development in Cnidaria: a connection to Bilateria? *Genesis* 29:110–114.
- Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein T. 2006. The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 25:7450–7460.
- Hamaguchi-Hamada K, Fujisawa Y, Koizumi O, Muneoka Y, Okado N, Hamada S. 2009. Immunohistochemical evidence for the existence of novel mammalian neuropeptides related to the Hydra GLW-amide neuropeptide family. *Cell Tissue Res* 337:15–25.
- Hartnoll RG. 1977. Reproductive strategy in two British species of Alcyonium. In: Ceidigh PO, Boaden PJS, editors. *Biology of benthic organisms*. New York: Pergamon Press. p 321–328.
- Hayward DC, Catmull J, Reece-Hoyes JS, Berghammer H, Dodd H, Hann SJ, Miller DJ, Ball EE. 2001. Gene structure and larval expression of *cnox-2Am* from the coral *Acropora millepora*. *Dev Genes Evol* 211:10–19.
- Hellberg ME. 1995. Stepping-stone gene flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: equilibrium and nonequilibrium at different spatial scales. *Mar Biol* 123:573–581.

- Heltzel PS, Babcock RC. 2002. Sexual reproduction, larval development and benthic planulae of the solitary coral *Monomyces rubrum* (Scleractinia: Anthozoa). *Mar Biol* 140: 659–667.
- Holland ND. 2003. Early central nervous system evolution: an era of skin brains? *Nat Rev Neurosci* 4:617–627.
- Hyman LH. 1951. *The invertebrates, vol 2. Platyhelminthes and Rhynchocoela: the acoelomate bilateria*. New York: McGraw-Hill. p 1–572.
- Iwao K, Fujisawa T, Hatta M. 2002. A cnidarian neuropeptide of the GLWamide family induces metamorphosis of reef-building corals in the genus *Acropora*. *Coral Reefs* 21:127–129.
- Jacobs DK, Nakanishi N, Yuan D, Camara A, Nichols SA, Hartenstein V. 2007. Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integr Comp Biol* 47:712–723.
- Katsukura Y, Ando H, David CN, Grimmelikhuijzen CJP, Sugiyama T. 2004. Control of planula migration by LWamide and RFamide neuropeptides in *Hydractinia echinata*. *J Exp Biol* 207:1803–1810.
- Korn H. 1966. Zur ontogenetischen Differenzierung der Coelenteratengewebe (Polyp-Stadium) unter besonderer Berücksichtigung des Nervensystems. *Z Morphol O'kol Tiere* 57:1–118.
- Kotikova EA, Raikova OI. 2008. Architectonics of the central nervous system of Acoela, Platyhelminthes, and Rotifera. *J Evol Biochem Physiol* 44:95–108.
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hrouda M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW. 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433:156–160.
- Leitz T. 1993. Biochemical and cytological bases of metamorphosis in *Hydractinia echinata*. *Mar Biol* 116:559–564.

- Leitz T. 1998. Metamorphosin A and related compounds: a novel family of neuropeptides with morphogenic activity. *Ann N Y Acad Sci* 839:105–110.
- Leitz T, Lay M. 1995. Metamorphosin-A is a neuropeptide. *Roux Arch Dev Biol* 204:276–279.
- Leitz T, Morand K, Mann M. 1994. Metamorphosin-A: a novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractinia echinata* (Coelenterata, Hydrozoa). *Dev Biol* 163:440–446.
- Lichtneckert R, Reichert H. 2005. Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* 94:465–477.
- Lichtneckert R, Reichert H. 2008. Anteroposterior regionalization of the brain: genetic and comparative aspects. *Adv Exp Med Biol* 628:32–41.
- Lowe CJ, Wu M, Salic A, Evans L, Lander E, Stange-Thomann N, Gruber CE, Gerhart J. 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113:853–865.
- Mackie GO. 2004. Central neural circuitry in the jellyfish *Aequorea victoria*: a model “simple nervous system.” *Neurosignals* 13:5–19.
- Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D, Martingale MQ. 2009. Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev Neurobiol* 69:235–254.
- Martin V. 1988a. Development of nerve cells in hydrozoan planulae. I. Differentiation of ganglionic cells. *Biol Bull* 174: 319–329.
- Martin V. 1988b. Development of nerve cells in hydrozoan planulae: II. Examination of sensory cell differentiation using electron microscopy and immunocytochemistry. *Biol Bull* 175:319–329.
- Martin VJ. 1992. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net. *Cell Tissue Res* 269:431–438.

Martin VJ. 2000. Reorganization of the nervous system during metamorphosis of a hydrozoan planula. *Invertebr Biol* 119: 243–253.

Martin VJ, Thomas MB. 1980. Nerve elements in the planula of the hydrozoan *Pennaria tiarella*. *J Morphol* 66:27–36.

Martin V, Thomas MB. 1981. Elimination of the interstitial cells in the planula larva of the marine hydrozoan *Pennaria tiarella*. *J Exp Zool* 217:303–323.

Matus DQ, Pang K, Marlow H, Dunn CW, Thomsen GH, Martindale MQ. 2006. Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11195–11200.

Medina M, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9707–9712.

Meinertzhagen I. 2010. The organisation of invertebrate brains: cells, synapses and circuits. *Acta Zool* 91:64–71.

Miller DJ, Ball EE. 2000. The coral *Acropora*: what it can contribute to our knowledge of metazoan evolution and the evolution of developmental processes. *Bioessays* 22: 291–296.

Momose T, Derelle R, Houliston E. 2008. A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development* 135:2105–2113.

Moroz LL. 2009. On the independent origins of complex brains and neurons. *Brain Behav Evol* 74:177–190.

Muller WA, Leitz T. 2002. Metamorphosis in the Cnidaria. *Can J Zool* 80:1755–1771.

Nakanishi N, Yuan D, Jacobs DK, Hartenstein V. 2008. Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in Aurelia (Cnidaria, Scyphozoa). *Dev Genes Evol* 218:511–524.

Nakanishi N, Yuan D, Hartenstein V, Jacobs DK. 2010. Evolutionary origin of rhopalia: insights from cellular-level analyses of Otx and POU expression patterns in the developing rhopalian nervous system. *Evol Dev* 12:404–415.

Nielsen C. 1994. Larval and adult characters in animal phylogeny. *Am Zool* 34:492–501.

Orlov DV. 1996. The role of larval settling behavior in determination of the specific habitat of the hydrozoan *Dynamena pumila* (L). Larval settlement in *Dynamena pumila* (L). *J Exp Mar Biol Ecol* 208:73–85.

Otto JJ. 1976. Early development and planula movement in *Haliclystus* (Scyphozoa: Stauromedusae). In: Mackie GO, editor. *Coelenterate ecology and behavior*. New York: Plenum Press. p 319–329.

Parkefelt L, Ekström P. 2009. Prominent system of RFamide immunoreactive neurons in the rhopalia of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa). *J Comp Neurol* 516:157–165.

Plickert G. 1989. Proportion-altering factor (PAF) stimulates nerve-cell formation in *Hydractinia echinata*. *Cell Differ Dev* 26:19–27.

Plickert G, Schneider B. 2004. Neuropeptides and photic behavior in Cnidaria. *Hydrobiologia* 530:49–57.

Plickert G, Krohmer M, Munck A. 1988. Cell-proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Development* 103:795–803.

Plickert G, Schetter E, Verhey-Van-Wijk N, Schlossherr J, Steinbuchel M, Gajewski M. 2003. The role of alpha-amidated neuropeptides in hydroid development – LWamides and metamorphosis in *Hydractinia echinata*. *Int J Dev Biol* 47:439–450.

Raikova OI, Reuter M, Kotikova EA, Gustafsson MKS. 1998. A commissural brain! The pattern of 5-HT immunoreactivity in Acoela (Plathelminthes). *Zoomorphology* 118:69–77.

Ryan JF, Burton PM, Mazza ME, Kwong GK, Mullikin JC, Finnerty JR. 2006. The cnidarian-bilaterian ancestor possessed at least 56 homeoboxes: evidence from the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Genome Biol* 7:R64.

Schmich J, Rudolf R, Trepel S, Leitz T. 1998a. Immunohistochemical studies of GLWamides in Cnidaria. *Cell Tissue Res* 294:169–177.

Schmich J, Trepel S, Leitz T. 1998b. The role of GLWamides in metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Dev Genes Evol* 208:267–273.

Schmidt-Rhaesa A. 2009. Morphology and deep metazoan phylogeny. *Zoomorphology* 128:199–200.

Schwoerer-Bohning B, Kroiher M, Muller WA. 1990. Signal transmission and covert prepattern in the metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Dev Genes Evol* 198:245–251.

Seipel K, Schmid V. 2005. Evolution of striated muscle: jellyfish and the origin of triploblasty. *Dev Biol* 282:14–26.

Sommer C. 1992. Larval biology and dispersal of *Eudendrium racemosum* (Hydrozoa, Eudendridee). *Sci Mar* 56:205–211.

Spring J, Yanze N, Jošch C, Middel AM, Winninger B, Schmid V. 2002. Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: a connection to the mesoderm of Bilateria. *Dev Biol* 244:372–384.

Thomas MB, Freeman G, Martin VJ. 1987. The embryonic origin of neurosensory cells and the role of nerve cells in metamorphosis of *Phialidium gregarium*. *Invert Reprod Dev* 11:265–287.

Watanabe H, Fujisawa T, Holstein TW. 2009. Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Dev Growth Differ* 51:167–183.

Werner B. 1984. Stamm Cnidaria, Nesseltiere. In: Gruner HE, editor. *Wirbellose Tiere*. Stuttgart: Gustav Fischer. p 10–305.

Widersten B. 1968. On the morphology and development in some cnidarian larvae. *Zool Bidr Upps* 37:139–182.

Yanze N, Spring J, Schmidli C, Schmid V. 2001. Conservation of Hox/ParaHox-related genes in the early development of a cnidarian. *Dev Biol* 236:89–98.

Yuan D, Nakanishi N, Jacobs DK, Hartenstein V. 2008. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia*. *Dev Genes Evol* 218:525–539.

## **3 La metamorfosi di *Clava multicornis*: riarrangiamento del sistema nervoso**

### **3.1 Riassunto**

La larva planula dell'idroide *Clava multicornis* ha un sistema nervoso complesso, caratterizzato dalla presenza di popolazioni distinte di neuroni concentrati all'estremità anteriore che rappresenta il polo sensoriale di questo stadio del ciclo vitale. I neuroni possono essere distinti in base alla presenza di neuropeptidi: le cellule GLWamide positive sono disposte nella regione più anteriore organizzate a formare una cupola e sono seguite da una cintura di cellule RFamide positive; entrambi i tipi cellulari sono collegati ad un plesso ectodermico-basale anteriore. Durante la metamorfosi, la larva aderisce al substrato con la parte anteriore che si sviluppa nella regione del disco basale del polipo, mentre la parte posteriore costituisce la regione orale.

Per chiarire il destino delle cellule neurali in *C. multicornis*, abbiamo studiato il modello di distribuzione delle cellule sensoriali GLWamide e RFamide positive nelle diverse fasi della metamorfosi. Abbiamo osservato che l'immunoreattività era ancora presente al polo anteriore della larva durante la fase dell'adesione, ma a poco a poco scompariva durante le fasi successive della metamorfosi. Solo negli stadi tardivi le cellule positive apparivano intorno alla bocca del polipo primario. Mediante test TUNEL sono stati identificati i nuclei apoptotici al polo anteriore della larva adesa, nella stessa regione occupata dalle cellule sensoriali. Questi risultati suggeriscono che almeno una parte dei neuroni della larva degenera, durante la metamorfosi, per apoptosi e che almeno una parte del sistema nervoso adulto è costituito dalla differenziazione "de novo". La comprensione di come il sistema nervoso viene riarrangiato durante la metamorfosi dei metazoi basali può aiutare a chiarire i meccanismi della plasticità neurale nei metazoi superiori.

### **3.2 Introduzione**

La metamorfosi è un peculiare stadio del ciclo biologico a sviluppo indiretto durante il quale in un animale avviene un rapido e cospicuo cambiamento di forma e/o di strutture corporee attraverso la proliferazione ed il differenziamento cellulare. La metamorfosi generalmente determina, nei cosiddetti cicli vitali complessi, un cambiamento di habitat e di adattamenti corporei conseguenti, per esempio dalla planula al polipo sessile (Seipp et al., 2001).

La riproduzione sessuale negli idrozoi dà origine ad una larva planula mobile, che deve sottoporsi ad una complessa metamorfosi per diventare un polipo sessile. Il processo di metamorfosi si compone di due fasi distinte: una prima fase di ricerca ed adesione, durante la quale la planula utilizza segnali chimici per individuare il sito idoneo, e la metamorfosi che prevede il rimodellamento tissutale (Clode e Marshall, 2003, Hirose et al., 2008).

I polipi hanno generalmente un corpo cilindrico che consiste di una porzione basale, l'idroriza, uno stelo verticale, l'idrocaule e un'estremità libera, su cui si trovano la bocca e i tentacoli, detta idrante. L'idroriza solitamente forma dei tubi ramificati detti stoloni che permettono l'adesione al substrato. L'idrante è costituito dalla cavità gastrica e da una sovrastante regione allungata detta ipostomio, alla sommità del quale si trova la bocca, e che è circondato dai tentacoli. Nelle specie coloniali i polipi mantengono una comunicazione diretta con la cavità gastrovascolare di ogni singolo zooide, ciò consente il trasporto di materiale nutritivo e dei gas respiratori a tutti i componenti della colonia. È inoltre possibile notare una differenziazione nei ruoli dei singoli zooidi, che porta al polimorfismo della colonia; possono ad esempio essere presenti gastrozoidi che si occupano della nutrizione della colonia, gonozoidi riproduttivi da cui gemmano le meduse e dattilozoidi responsabili della difesa della colonia. I polipi hanno simmetria raggiata con organizzazione della parete del corpo in due foglietti (diblastica) : l'ectoderma esternamente e l'endoderma a rivestire la cavità interna del corpo, separati dalla mesoglea. Le gemme polipoidi si formano per accrescimento della parete didermica con due modalità: a partire dagli stoloni nelle colonie aderenti al substrato o a partire dalle porzioni in crescita e prive di involucro chitinoso dell'idrocaule nelle colonie a portamento eretto. Il polipo in via di sviluppo si allunga progressivamente in senso prossimale-distale. In ultimo si differenzia all'estremità distale la bocca che si apre al centro dell'ipostomio, una struttura conica o a fiasco, alla cui base si sviluppano i tentacoli, in numero variabile, taxon specifico (Boero et al., 2002) (Fig. 1).

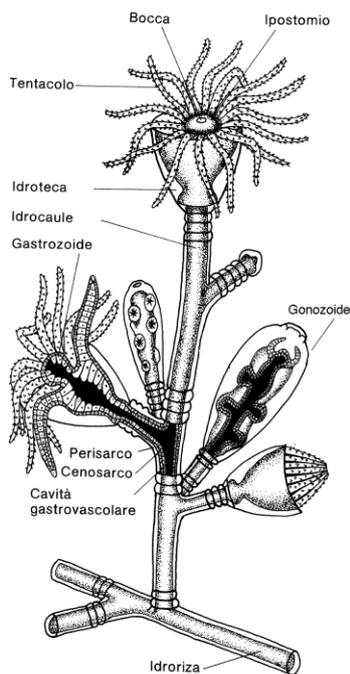


Fig.1: Schema di organizzazione coloniale di idropolipi

Questi cambiamenti morfologici e strutturali possono essere attivati da segnali endogeni o esogeni. In molti invertebrati marini la metamorfosi è indotta da segnali esogeni. In natura i segnali esogeni sono in molti casi sostanze che sono rilasciate da batteri. La natura chimica di queste sostanze comunque non è stata definitivamente identificata. È stato ipotizzato che questo stimolo possa essere riconosciuto da cellule sensoriali delle planule dotate di specifici recettori per tali molecole (Müller, W. A., & Leitz, T. 2002). Con il legame a queste cellule sensoriali è indotta quindi la metamorfosi.

Un'induzione della metamorfosi da parte di batteri è descritta in *H. echinata*. Uno dei batteri responsabili di questa induzione è *Pseudoalteromonas (Alteromonas) espejiana* (Leitz, T. & Wagner, T. 1992). Induttori artificiali della metamorfosi sono cationi monovalenti come  $Cs^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$  (Müller, W. A. 1973; Spindler KD, Müller WA 1972), cationi bivalenti come  $Ba^+$ ,  $Sr^+$  (Berking, 1988) e lo shock termico (Kroiher et al., 1992).

*Clava multicornis* è un idroide progenetico senza una fase di medusa. All'interno di ogni gonoforo femminile sono contenute una o due uova, in cui hanno luogo la fecondazione e lo sviluppo embrionale. Le planule mature si adagiano sul substrato e, a differenza delle larve di altri cnidari, le planule di *C. multicornis* strisciano per alcuni giorni sul substrato. Quando riconosce un sito adatto, la larva inizia ad insediarsi e si attacca al substrato con la parte anteriore, corrispondente al polo sensoriale. La parte anteriore della larva si sviluppa come disco basale del polipo, mentre la parte ex-posteriore dà origine alle strutture apicali: bocca e tentacoli.

Così il polo sensoriale della larva scompare, e le nuove cellule sensoriali si differenziano nella nuova "testa".

La larva planula di *C. multicornis* ha dimostrato di possedere un sistema nervoso piuttosto differenziato (Watanabe et al., 2009, Piraino et al., 2011). All'estremità anteriore della larva è stato osservato un plesso nervoso complesso alla base dell'ectoderma. Sono stati riconosciuti diversi tipi di neuroni tramite analisi al TEM e immunolocalizzazione: a) le cellule sensoriali fornite di un cilium sulla superficie esterna; b) neuroni di grandi dimensioni situati vicino alla mesoglea anteriore, c) le cellule gangliari sparse lungo il corpo (Piraino et al. 2011).

Sono state caratterizzate distinte popolazioni di neuroni tramite la localizzazione di neuropeptidi, utilizzati dagli cnidari come neuromodulatori o neurotrasmettitori.

I neuropeptidi sono molecole segnale che regolano numerosi processi fisiologici negli cnidari, tra cui la metamorfosi, e sono stati isolati negli idrozoi, scifozoi ed antozoi (Grimmelikhuijzen et al., 2002). Tutti questi neuropeptidi hanno un gruppo ammidico C-terminale, importante per il riconoscimento del recettore (Grimmelikhuijzen et al., 2002).

Un peptide con Gly-Leu-Trp-NH<sub>2</sub> terminale è stato isolato nel antozoo *Anthopleura elegantissima*, e chiamato metamorphosin A (MMA) per la sua capacità di indurre metamorfosi (Leitz et al., 1994). Successivamente si è scoperto che la MMA era un membro di una nuova famiglia di neuropeptidi, i GLWamide (Leitz, 1998).

I peptidi GLWamidati non sono un'esclusiva degli cnidari, in realtà sono stati trovati tramite analisi immunoistochimiche anche nel cervello di ratto e in *C. elegans*, in cui la loro funzione è ancora sconosciuta (Hamaguchi-Hamada et al, 2009;. Husson et al 2005).

Nelle larve dell'idrozoo *Hydractinia echinata*, GLWamide è sintetizzato nelle cellule sensoriali ectodermiche che formano una cintura nella parte anteriore del corpo (Leitz e Lay, 1995), ed è stato dimostrato che agisce come un segnale interno, essenziale per il coordinamento della metamorfosi (Schmich et al., 1998).

Un'altra importante famiglia di neuropeptidi ampiamente distribuita negli cnidari è costituita da molecole con un gruppo Arg-Phe-NH<sub>2</sub> carbossi-terminale (RFamidi). Gli RFamidi sono stati descritti anche nei molluschi (Price e Greenberg, 1977). L'immunomarcatura evidenzia la presenza di RFamidi in aree localizzate o in tutta la rete nervosa di idrozoi, antozoi e scifozoi (Grimmelikhuijzen 2002). I neuroni RFamide positivi formano un anello circolare nell'ipostomio di *Hydra ssp* (Koizumi, 2002). Plessi RF-amide immunoreattivi sono stati descritti in diverse specie di cnidari alla base di gruppi di cnidociti e di cnidociti isolati (Anderson et al., 2004). A causa della loro distribuzione, è stato suggerito che i neuroni RFamide positivi sono coinvolti nella regolazione chemiosensoriale per lo scarico delle cnidocisti.

Nell'antozoo *Renilla koelleri* i neuroni immunomarcati anti-RFamide sono stati osservati in diversi comparti dell'ectoderma, in particolare sul lato orale dei tentacoli e vicino alla bocca dei polipi (Pernet et al., 2004). Questo suggerirebbe un coinvolgimento del neuropeptide nell'attività contrattile associata ai movimenti dei tentacoli durante la cattura delle prede.

I neuroni RFamide positivi sono stati trovati anche nelle larve planule. Nella planula di *Pennaria tiarella* l'RFamide è stata rilevata nelle regioni anteriori in cellule gangliari bipolari e multipolari, nelle cellule sensoriali e nelle cellule epitelio-muscolari (Martin, 2002). Plickert e Schneider (2004) trovarono immunoreattività per RFamide nelle larve di *Hydractinia echinata* e *Tripedalia cystophora* nei nervi associati agli organi fotosensibili.

Nella planula di *Clava multicornis* sono state descritte due distinte popolazioni di cellule GLWamide e RFamide positive (Piraino et al., 2011). I neuroni GLWamide immunoreattivi con una forma fusiforme sono disposti in una cupola nella regione più anteriore della larva. Cellule gangliari bipolari sono presenti lungo le fibre longitudinali positive che corrono longitudinalmente. I neuroni RFamide positivi formano una cintura appena posteriormente alle cellule GLWpositive. Entrambi i tipi di cellule sono collegati al plesso basale nell'ectoderma anteriore.

La morte cellulare programmata per apoptosi è una caratteristica comune durante gli eventi della metamorfosi in tutti i phyla di metazoi, dai nematodi agli echinodermi (Horvitz, 1999; Roccheri et al, 2002). Nell'idrozo *Hydractinia echinata* è stato dimostrato che durante una parte specifica della metamorfosi, le reti neurali nella larva sono soggette alla neurodegenerazione per apoptosi (Seipp et al., 2010).

In *Hydra* non ci sono evidenze di apoptosi durante la metamorfosi (Brumwell e Martin, 2002).

Nell'antozoo *Nematostella vectensis* il passaggio da larva a polipo è diretto. Il polipo raggiunge la maturità sessuale in un periodo compreso tra tre e sei mesi (Fritzenwanker and Technau, 2002; Hand and Uhlinger, 1992).

In questo lavoro, abbiamo monitorato il destino dei neuroni GLWamide e RFamide durante la metamorfosi dell'idrozo *C. multicornis* al fine di descrivere i cambiamenti che avvengono nel sistema nervoso durante la transizione dalla fase di mobilità a quella sessile.

Questi risultati sono stati combinati con quelli ottenuti mediante test TUNEL, al fine di valutare la rilevanza dell'apoptosi durante il riarrangiamento del sistema nervoso in questo nuovo animale modello.

## 3.3 Materiali e metodi

### 3.3.1 Animali

Le colonie fertili di *Clava multicornis* (Forskaal, 1775) sono state raccolte durante la bassa marea lungo le coste rocciose a Roscoff (Francia), e trasferite in laboratorio. Gli animali sono stati allevati in acquari con un sistema di circolazione dell'acqua di mare aperto (14 °C). Ogni giorno sono stati isolate alcune colonie femminili ed esposte alla luce per stimolare il rilascio delle planule.

Come è stato dimostrato (vedi Seipp et al., 2007) l'induzione della metamorfosi con Cs<sup>+</sup> è uno strumento utile in quanto mima l'induzione naturale negli idrozoi. A causa del lungo tempo necessario per la metamorfosi di *C. multicornis* rende molto utile questo tipo d'induzione anche per normalizzare il tasso di metamorfosi.

### 3.3.2 SEM

Per la microscopia elettronica a scansione (SEM), i campioni sono stati fissati con una miscela di paraformaldeide e glutaraldeide in acido picrico (SPAFG: Ermak, T., e Eakin RM 1976); una volta trasferiti su vetrini rivestiti con poli-L-lisina, sono stati lavati in tampone cacodilato 0,1 M (pH = 7,4).

Tampone Cacodilato 0.2 M stock solution:

250 ml dH<sub>2</sub>O

20.15 g sodium cacodylate trihydrate (MW = 214)

0.1 ml HCl

pH = 7.4.

0.1 M buffer solution, con saccarosio 3% e CaCl 0.1%

30 g saccarosio RNAase-free

0.05 g CaCl

250 ml 0.2 M tampone cacodilato stock solution

250 ml dH<sub>2</sub>O

L'adesione dei campioni ai vetrini permette di lavare e gestire i vetrini senza perdita di materiale. È stata effettuata un disidratazione graduata con etanolo seguita da una sostituzione con esametildisilazano (HDSM). Infine è stato rimosso quanto più HDSM possibile e i campioni

sono stati lasciati asciugare in stufa per una notte. I campioni così trattati sono stati rivestiti d'oro e osservati con un microscopio elettronico a 1430 Leo a scansione.

### **3.3.3 Immunomarcatura**

I campioni fissati sono stati reidratati e poi incubati con 0,1% di Tween-20, 0,25% Triton X-100 in PBS (PBT) per 30 minuti. Dopo tre lavaggi di 10 minuti ciascuno con PBS, i campioni sono stati bloccati con 10% di siero normale di capra in PBT (PBT-NGS) per 2 ore ed infine incubati una notte a 4 ° C con agitazione, immersi nel primo anticorpo primario diluito in PBT -NGS. Gli anticorpi primari e le diluizioni utilizzate sono state: anticorpo monoclonale di topo anti-tubulina acetilata (clone 6-11B-1, SIGMA Italia) diluito 1:500; anticorpo policlonale di coniglio anti-GLW-amide; anticorpo policlonale di coniglio anti-RF-amide (donati dal Prof. Thomas Leitz, Germania), entrambi diluiti 1:700. Dopo l'incubazione con il primo anticorpo primario e dopo tre lavaggi in PBS-NGS, i campioni sono stati incubati 12-14 ore con il secondo anticorpo primario e poi per una notte con un mix dei due anticorpi secondari. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati: anticorpo anti- IgG di coniglio Alexa Fluor 488 prodotto in capra diluito 1:200; anti- IgG di topo Alexa Fluor 594 prodotto in capra diluito 1:400 (Invitrogen, Italia). Infine, i campioni sono stati lavati quattro volte in PBS per 1 ora e montati in 1,4-diazabicciclo [2,2,2] ottano (DABCO, Sigma, Italia) su vetrini da microscopio. I campioni così processati sono stati osservati al microscopio confocale (Leica TCS-NT, ZEISS LSM 510, ZEISS LSM 5 PASCAL). Più sezioni ottiche (1 micron) sono state proiettate in un'unica immagine con una maggiore profondità focale. La specificità degli anticorpi è stata testata in esperimenti di controllo eseguiti omettendo in alcuni gli anticorpi primari, in altri i secondari. In tutti i casi non è stato rilevato alcun segnale aspecifico.

### **3.3.4 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)**

Un parametro importante per la valutazione della modalità di morte cellulare è la degradazione del DNA.

Durante l'apoptosi, la frammentazione del DNA ha permesso di mettere a punto una tecnologia basata sul principio che le terminazioni libere 3'-OH che si vengono a formare in seguito alla frammentazione del DNA possano servire come substrato per la terminal deossinucleotidil transferasi (TdT). Utilizzando come substrato dUTP marcato è possibile distinguere in un tessuto le cellule apoptotiche. Questo metodo è detto TUNEL.

Il kit utilizzato per il TUNEL è stato: *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche Cat. No. 11 684 795 001 50 tests).

Il protocollo prevede

Fissaggio degli animali o/n con PFA 4% a 4°C in contenitori di vetro con coperchio;

Lavaggio 3x in 1ml di PBS in agitazione e trasferimento nei tubi di reazione;

Rimozione totale del PBS e aggiunta di 100µl di PBS;

Aggiunta di 50µl di tampone di permeabilizzazione e incubazione in ghiaccio per 2min;

3x lavaggi in PBS;

rimozione totale del PBS ed aggiunta di TUNEL (27µl soluzione di marcatura (labelling solution) + 3µl soluzione enzimatica per saggio);

incubazione a 37°C per 60min, in agitazione lenta, al buio;

3x lavaggi in PBS;

Montaggio su vetrino ricoprendo il campione con Mowiol/DABCO (Mowiol/1,4-diazabicyclo-(2,2,2) ottano) ed analisi al microscopio a fluorescenza con filtri appropriati per FITC.

## 3.4 Risultati

### 3.4.1 Morfologia SEM

Durante la metamorfosi, la morfologia della planula cambia attraverso fasi distinte. Per similitudine con le tappe della metamorfosi descritte nell'idroide *Hidractinia echinata* (Seipp et al, 2007), è stata utilizzata la stessa terminologia per indicare le cinque fasi individuate: larva strisciante; larva adesa; stadio a "lama di sega"; stadio a "barile"; polipo in via di sviluppo; polipo primario.

La larva di *C. multicornis* appena schiusa è lunga 600-800 µm, con un polo anteriore prominente, a forma di clava (Fig. 2A). Il corpo larvale è interamente coperto da un epitelio ciliato (Fig. 2B). Come già detto, l'attività delle ciglia supporta il movimento della larva.

In condizioni sperimentali, dopo 6 ore dall'induzione con cesio, le planule si fermano ed iniziano ad aderire al substrato con il polo anteriore. Entro 24 ore dall'induzione (odi), le planule sono completamente attaccate e la lunghezza del corpo si è ridotta a circa la metà di quella iniziale. L'estremità posteriore della planula si arrotonda e l'ectoderma presenta numerose pieghe assumendo un aspetto a "lama di sega" (Fig. 2C). Le ciglia epidermiche scompaiono (Fig. 2D).

A 48 odi, tutto il corpo appare completamente riorganizzato e mostra una struttura a forma di barile. Le pieghe ectodermiche scompaiono e si possono distinguere un disco basale ed una colonna gastrica. All'estremità orale sono evidenziabili alcune protuberanze riconoscibili come abbozzi di tentacoli (Fig. 2E).

A 72 odi, le protuberanze si allungano a formare tentacoli di varia lunghezza, l'ipostomio è chiaramente visibile al centro dei tentacoli (Fig. 2F).

Cinque giorni dopo l'induzione, i nuovi tentacoli sono completamente sviluppati e la bocca si apre all'apice dell'ipostomio. La forma del polipo primario è completamente riconoscibile (Fig. 2G). Gli cnidociti, presenti sui tentacoli e sull'ipostomio, sono riconoscibili dallo cnidociglio che emerge dall'epidermide (Fig. 2H).

### **3.4.2 Riarrangiamento dei neuroni GLWamide e RFamide.**

Al fine di indagare sulla sorte della rete nervosa durante la metamorfosi, le larve sono state indotte con cloruro di cesio, raccolte dopo un periodo di tempo variabile e trattate per l'immunolocalizzazione di neuropeptidi specifici: GLWamide ed RFamide.

Nelle larve non indotte, numerose cellule GLWamide positive sono organizzate a forma di cupola nell'estremità anteriore (Fig. 3A). Queste cellule fusiformi sono disposte perpendicolarmente alla mesoglea e si estendono verso la superficie esterna. La loro parte basale si estende nei processi nervosi del plesso neurale anteriore situato sulla mesoglea. Interneuroni gangliari, con una forma triangolare, sono localizzati nella parte centrale e posteriore lungo le fibre positive che decorrono longitudinalmente lungo il corpo della planula (Fig. 3A).

A 24 ore dall'induzione (odi), le planule adese al substrato tramite il polo anteriore mostrano una drastica riduzione della rete neuronale. Anteriormente le cellule GLWamide immunoreattive non possiedono la tipica forma allungata né l'estensione verso la superficie esterna, tipiche della planula non indotta. I neuriti basali che si proiettano nel plesso neurale anteriore non sono più rilevabili. Inoltre, gli interneuroni gangliari osservati nella parte centrale e posteriore della planule e le loro fibre immunoreattive scompaiono (Fig. 3B).

A 48 odi, le cellule GLWamide positive sono appena rilevabili alla base del nuovo disco basale (Fig. 3C). Un giorno più tardi (72 odi), quando i tentacoli iniziano a svilupparsi, compaiono poche cellule positive alla base della regione dell'ipostomio (Fig. 3D). Infine, cinque giorni dopo l'induzione, le cellule positive sono chiaramente rilevabili nella parte basale dell'ipostoma, e lungo la colonna gastrica. Non è mai stato rilevato un segnale positivo per GLWamide nei tentacoli (Fig. 3 E, F).

Nella larva non indotta i neuroni sensoriali RFamide positivi sono disposti a formare una cintura nella regione medio-anteriore della larva (Fig. 4A). Queste cellule sono allungate con le estremità distali che raggiungono la superficie esterna (Fig. 4C). Diverse fibre positive decorrono lungo l'asse principale del corpo larvale, collegandosi al plesso neurale anteriore. Lungo queste fibre sono presenti poche cellule gangliari positive (Fig. 4A). A 24 ore dall'induzione, un segnale diffuso è presente nella zona un tempo anteriore, dove si differenzierà il disco basale (Fig. 4B), ma i corpi cellulari non sono irriconoscibili (Fig. 4D). Inoltre, le fibre RFamide positive scompaiono (Fig. 4B). A 48 ore dall'induzione, nei giovani metamorfosati a forma di “barile” sono assenti cellule RFamide positive (Fig. 4E). A 72 ore dall'induzione, alcune cellule positive appaiono alla base dei tentacoli e nell'ipostomio (Fig. 4F, G). Cinque giorni dopo l'induzione numerose cellule e numerose fibre positive sono presenti nei tentacoli (Fig. 4E, F) e sono particolarmente abbondanti nella regione superiore dell'ipostomio, intorno alla bocca (Fig. 4H).

### **3.4.3 Apoptosi**

L'analisi TUNEL è stata utilizzata per identificare le cellule apoptotiche nelle planule striscianti e nelle larve in metamorfosi. (Fig. 5). La reazione tunnel risulta completamente negativa nelle planule, ma nei giovani adesi, 24 ore dopo l'induzione, il segnale TUNEL è stato rilevato in una popolazione di cellule, la maggior parte delle quali era posizionata al polo anteriore della larva adesa al substrato. La reazione sembra corrispondere alla posizione delle cellule neurali dove viene persa immunoreattività GLWamide ed RFamide. Ciò indica un'attiva degenerazione e disintegrazione delle cellule sensoriali e ganglioniche.

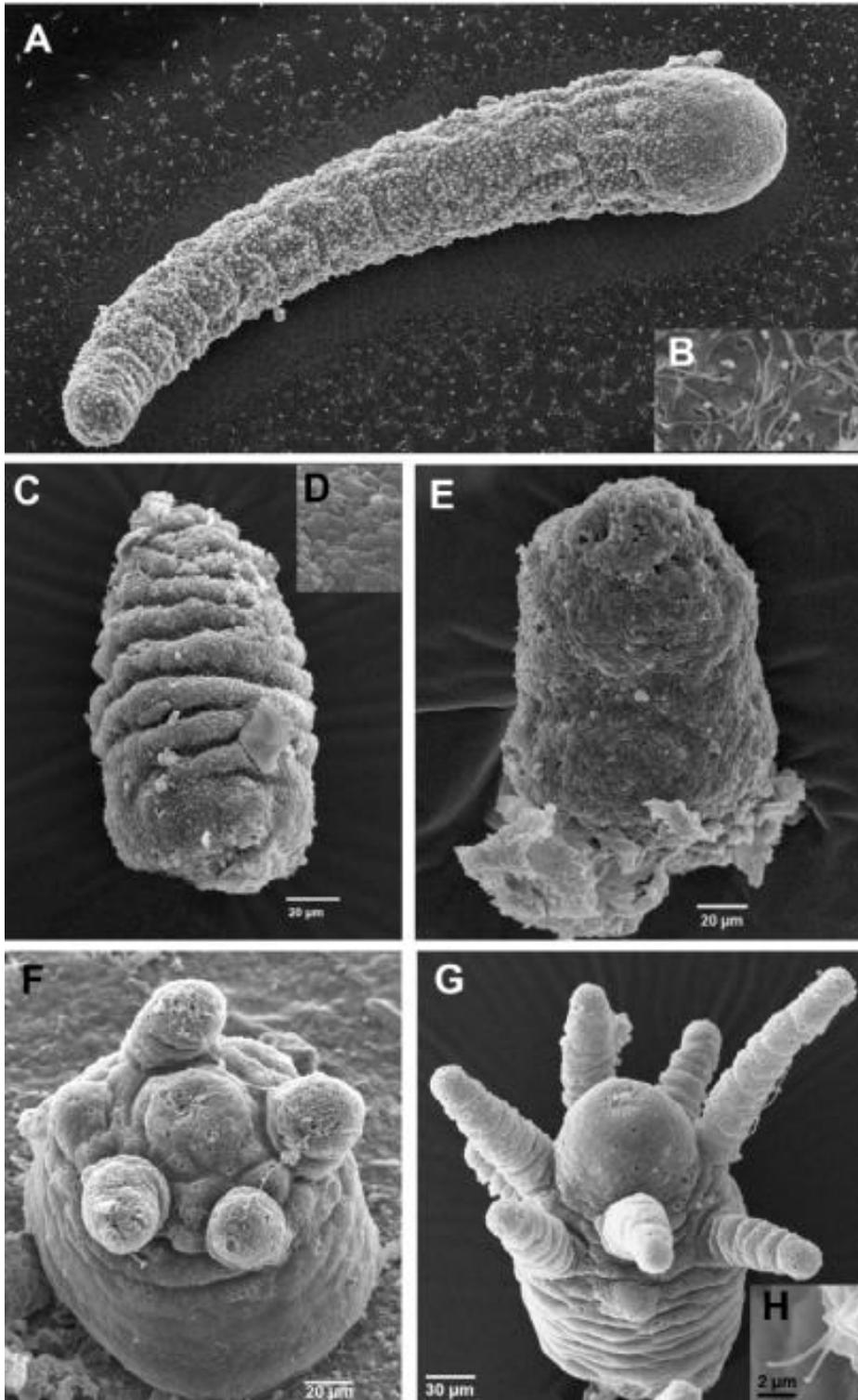


Fig. 2: **Immagini SEM delle fasi della metamorfosi in *Clava multicornis*.** A, B: Larva strisciante. A: Il polo aborale si trova sulla destra. B: ingrandimento dell'epidermide con numerose lunghe ciglia. C, D: Stadio a lama di sega. C: Il campione presenta numerose pieghe caratteristiche della superficie esterna. Il polo aborale è verso il basso. D: Dettaglio dell'epidermide che mostra l'assenza di ciglia. E: stadio a barile. Il campione è orientato con il polo aborale verso il basso. Sotto il disco basale, è presente un pezzo di alga a cui era attaccato il polipo. F: Sviluppo del polipo. L'ipostomio è rivolto verso l'osservatore. Sono presenti cinque tentacoli in sviluppo. G, H: Polipo primario. G: Campione con 8 tentacoli allungati. H: Dettaglio delle ciglia presenti sui tentacoli.

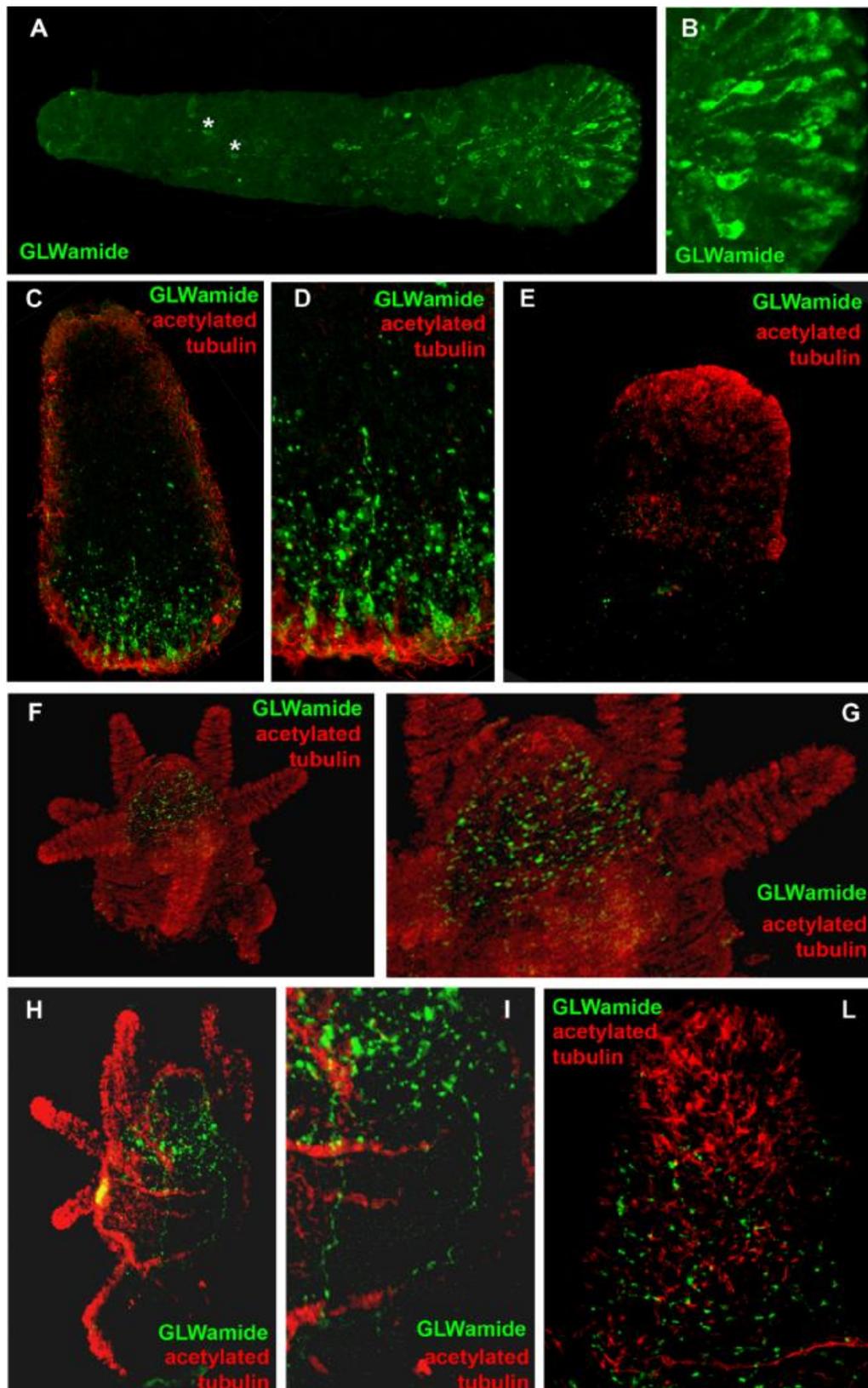


Fig.3. Immunolocalizzazione di GLWamide durante la metamorfosi di *C. multicornis*.

A, B: Larva strisciante. A: larva con il polo anteriore aborale sulla destra. B: Ingrandimento dell'estremità anteriore della larva in A, in cui sono presenti le cellule GLWamide positive allungate. C,D. Stadio a "lama di sega". E. Stadio a "barile". F. Polipo Primario. G. Particolare dell'ipostomio. H. Polipo primario. I, L. particolare dell'ipostomio.

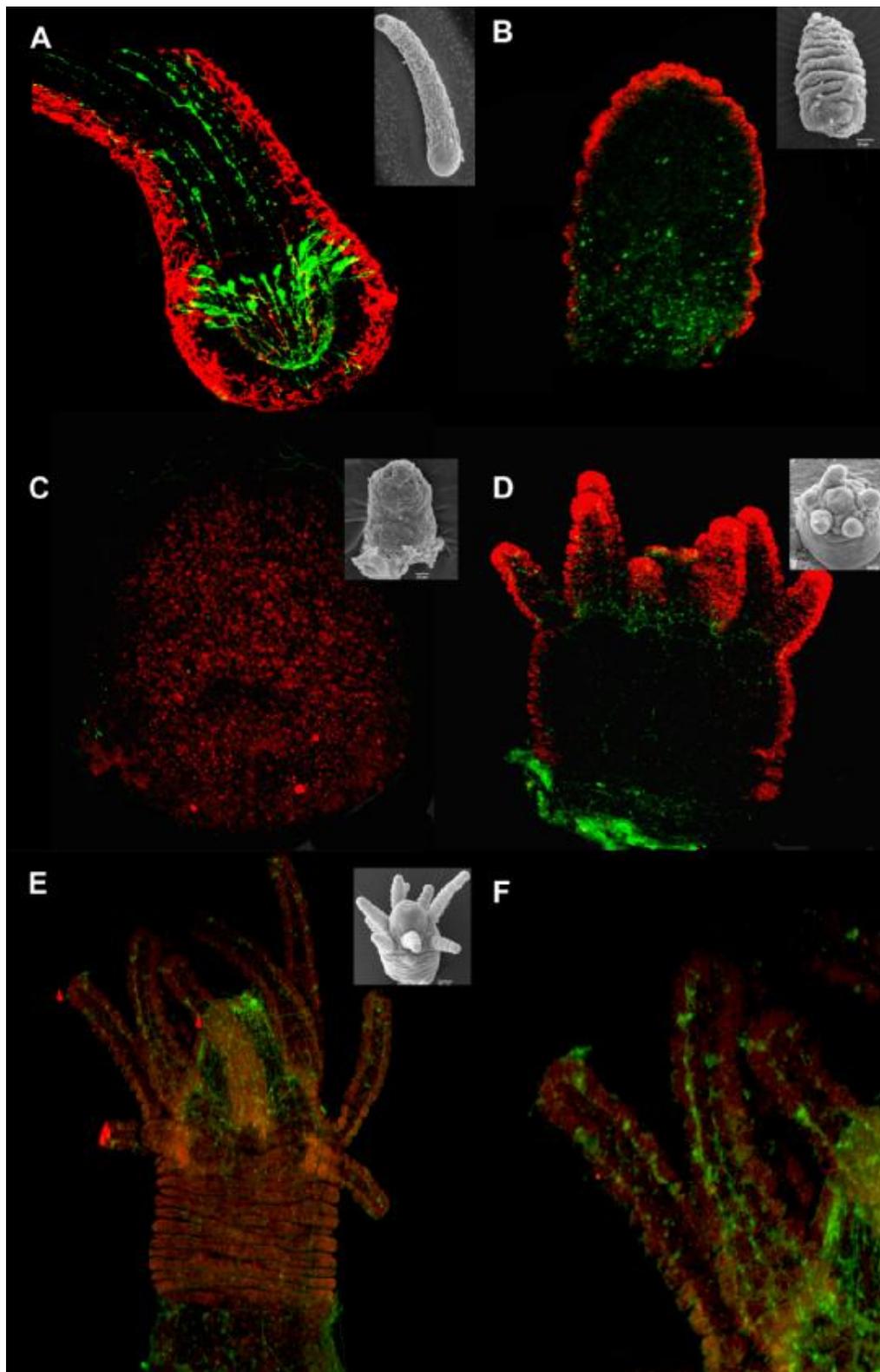


Fig. 4. Immunolocalizzazione di RFamide durante la metamorfosi di *C. multicornis*. A. Larva strisciante. B. Stadio a "lama di sega". C. Stadio a "barile". D. Polipo primario. E, F. Polipo primario e particolare dei tentacoli.

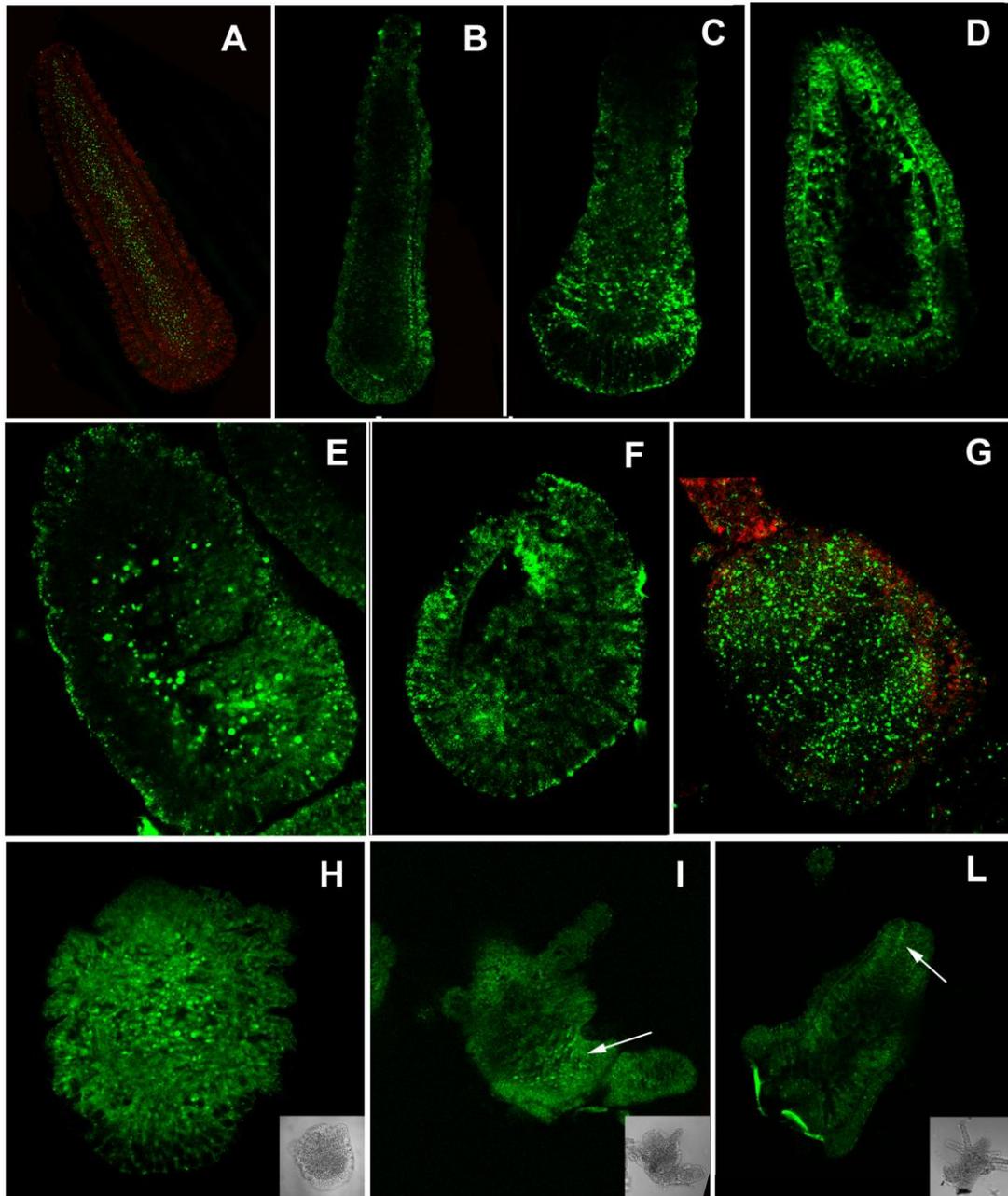


Fig. 5: Localizzazione delle cellule apoptotiche durante le fasi della metamorfosi della larva planula di *Clava multicornis*. A, B. Larva strisciante. C, D. Larva adesa. E, F. Stadio a "lama di sega". G, H. Stadio a "barile". I, L. Polipo primario.

## 3.5 Discussione

### 3.5.1 Fasi e morfologia della metamorfosi

In base ai cambiamenti morfologici osservati al SEM è stato possibile classificare le diverse fasi della metamorfosi di *Clava multicornis*. L'osservazione più evidente durante la prima fase di insediamento è la scomparsa delle ciglia dell'ectoderma che assume l'aspetto a "lama di sega". Come è stato osservato, in una fase paragonabile, durante la metamorfosi della larva di *H. echinata* (Seipp et al. 2007), questo potrebbe riflettere una riduzione funzionale dovuta alla contrazione delle cellule mioepiteliali, interpretabile come un primo segnale della plasticità dello sviluppo dell'ectoderma.

Nella fase successiva prosegue l'accorciamento; l'estremità posteriore appare arrotondata e l'ectoderma perde le pieghe presenti nella fase precedente. L'intensa apoptosi rilevata in questi stadi può non essere limitata alla distruzione e riorganizzazione del sistema nervoso, ma potrebbe interessare molti tipi di cellule che sono responsabili della riorganizzazione di tutto il corpo.

Nei nostri esperimenti, nel giovanile a "barile", 48 ore dopo l'insediamento, la positività GLWamide-immunoreattiva ed RF amide-immunoreattiva è completamente svanita, anche nelle parti posteriori della larva, dove un elevato numero di neuroni ha continuato ad essere positivo 24 ore dopo l'insediamento. I nostri risultati sono paragonabili a quelli descritte per *H. echinata* (Seipp et al., 2010) e in questa fase può essere considerata come quella in cui sono presenti i maggiori eventi di riprogrammazione.

### 3.5.2 Distribuzione GLW e RF nella larva e nel polipo

I risultati presentati in questo lavoro mostrano una distribuzione GLWamide e di RFamide-positiva sostanzialmente diversa nelle planule rispetto ai polipi. Nelle planule le cellule GLWamide-positive sono organizzate a formare una cupola nella regione più anteriore, mentre i neuroni RFamide-positivi sono disposti a formare una cintura, in posizione posteriore rispetto alla cupola apicale. Entrambi i tipi di cellule sono collegati al plesso anteriore. I nostri risultati mostrano che tre giorni dopo l'insediamento, quando i primi tentacoli e l'ipostomio iniziano a differenziarsi, le cellule GLWamide-positive sono concentrate nella regione inferiore dell'ipostomio e dopo due giorni delle fibre positive si estendono lungo la colonna gastrica in formazione (Fig. . 2 C, D). Al contrario, le cellule RFamide-positive si concentrano nei tentacoli

in sviluppo, sia tre giorni dopo l'insediamento, che nel polipo primario completamente sviluppato (fig. 3 C, D). Questo modello di distribuzione dei due neuropeptidi suggerisce l'esistenza di due popolazioni neurali con diverse caratteristiche morfologiche e biochimiche. Diversi lavori attribuiscono alle GLWamide la capacità di indurre la metamorfosi nelle planule di molte specie di cnidari (Leitz e Lay, 1995; Iwao et al., 2002; Muller e Leitz, 2002; Plickert et al., 2003). È ipotizzabile che le cellule neurosensoriali GLWamide-positivo dell'ectodermica nella parte anteriore della planula siano le cellule ricettive dell'induttore ambientale esterno, e GLWamide è il segnale di coordinamento interno del processo metamorfico. Infatti è stato dimostrato che i peptidi GLWamidati inducono specificatamente la metamorfosi di planule in modo dose-dipendente (Schmich et al., 1998).

Tuttavia, le cellule contenenti un peptide che induce la metamorfosi non sono più necessarie nel polipo adulto.

La scomparsa dei neuroni durante la metamorfosi è stata evidenziata tramite studi di microscopia elettronica in *Hydractinia echinata* (Weis e Buss, 1987), immunolocalizzazione di GLWamide (Schmich et al. 1998) e dall'ibridazione in situ (Plickert et al. 2003). I dati di questi studi corrispondono molto bene alla scomparsa osservata nei nostri esperimenti con *C. multicornis*.

I neuropeptidi RFamidati sono stati scoperti nel sistema nervoso di molluschi, ma furono subito riconosciuti e ritrovati in tutti gli invertebrati: cnidari, nematodi, insetti ed anche nei vertebrati. Questo sembrerebbe essere un notevole esempio di conservazione della struttura chimica e biologico-funzionale nell'evoluzione del sistema nervoso (Dockray, 2004). Da recenti ricerche emergono molteplici ruoli per questo peptide, dalla trasmissione neuromuscolare al controllo del comportamento alimentare sia in invertebrati che nei vertebrati.

Nelle planule di *C. multicornis* i peptidi RFamidati potrebbero essere coinvolti nella fotorecezione e/o nella trasmissione del segnale alle cellule mioepiteliali che mediano la flessione del corpo, come ipotizzato per le planule di *H. echinata* (Plickert et al., 2003). Quindi potrebbero avere un ruolo generale nella regolazione del movimento nelle planule.

I neuroni RFamide-immunoreattivi sono stati individuati nei polipi di molte specie di cnidari e sono state formulate diverse ipotesi per quanto riguarda la loro funzione. Anderson e colleghi (2004) riportarono la localizzazione di plessi nervosi RFamide-immunoreattivi alla base degli aggregati di nematociti del tentacolo in tutte le specie di cnidari ed ha suggerito che i neuroni RFamide-positivi siano coinvolti nella regolazione chemiosensoriale per lo scarico delle nematocisti. Nel sistema nervoso dell'antozoo pennatulide coloniale *Renilla koelleri*, i neuroni RFamide-positivi sono stati osservati in diversi compartimenti dell'ectoderma, in particolare sul lato orale dei tentacoli e vicino alla bocca del polipo (Pernet et al., 2004). Questo suggerirebbe un

coinvolgimento di questo neuropeptide nelle attività contrattili associate ai movimenti dei tentacoli durante la cattura delle prede.

La distribuzione delle cellule RFamide-positivo nei tentacoli dei polipi in via di sviluppo di *C. multicornis* è simile alla distribuzione osservata nelle altre specie di cnidari. Sono necessarie ulteriori osservazioni al fine di affermare se queste cellule svolgano un ruolo nell'alimentazione o nello scarico delle nematocisti o entrambi.

L'apoptosi è il modo canonico di eliminazione delle cellule neuronali nei vertebrati. Negli invertebrati basali, le informazioni riguardanti il destino delle cellule neuronali della fase embrionale e larvale sono scarse. Recentemente, Seipp et al. (2010) hanno dimostrato che in *Hydractinia echinata* un gran numero di neuroni larvali RFamide-positivi e GLWamide-positivi è eliminato per apoptosi durante le prime fasi della metamorfosi. Essi hanno anche osservato che i due tipi di cellule differiscono apparentemente tra loro per la loro cinetica di transizione durante la metamorfosi, prendendo in considerazione i diversi ruoli delle loro molecole segnale durante la metamorfosi. Hanno osservato l'apoptosi nelle cellule GLWamide-positivo neurosensoriali e gangliari. Inoltre, alcune cellule GLWamide-positivo che presentavano processi apoptotici contenevano ancora quantità significative di neuropeptide. Queste due osservazioni possono essere in linea con i risultati che indicano che il neuropeptide GLWamide viene rilasciato e funziona come neurotrasmettitore durante l'induzione della metamorfosi (Muller e Leitz, 2002).

Tuttavia, la scomparsa dei segnali immunopositivi non necessariamente significa la rimozione delle cellule corrispondenti per morte cellulare, ma può essere dovuto al ricambio naturale dell'antigene RFamide (Seipp, 2007). Questo potrebbe sollevare la questione dell'enorme plasticità nello sviluppo delle cellule degli cnidari.

Le planule ed i vari stadi della metamorfosi di *C. multicornis* presentano una specializzazione morfologica (come una primitiva cefalizzazione, una metamorfosi che si svolge in tempi relativamente lunghi, la presenza di due diverse popolazioni di neuroni neuropeptidergici) che differiscono dai tradizionali sistemi modello di cnidari ed è di grande aiuto nel definire l'evoluzione degli idrozoi e il loro rapporto con i bilateri. I risultati qui presentati suggeriscono che almeno una parte dei neuroni della larva degenera durante la metamorfosi per apoptosi e che almeno una parte del sistema nervoso adulto è costituito dalla differenziazione e la costruzione "de novo" di una rete nervosa con le caratteristiche di una rete nervosa di polipo. Ulteriori ricerche dovrebbero chiarire il ruolo relativo delle nuove cellule prodotte da questo meccanismo di ricostruzione e delle cellule larvali pre-esistenti per la formazione della rete nervosa degli adulti. La metamorfosi negli idrozoi è un evento plastico che riguarda una vasta gamma di tipi cellulari. Per motivi sopra riportati, la comprensione di come viene riarrangiato il sistema

nervoso di questo metazoo basale durante la metamorfosi può aiutare a chiarire i meccanismi della plasticità neurale nei metazoi superiori.

### 3.6 Bibliografia

Anderson, P. A., Thompson, L. F. & Money Penny, C. G. 2004. Evidence for a common pattern of peptidergic innervation of cnidocytes. *Biol. Bull.* 207, 141–146.

Berking S (1988) Ammonia, tetraethylammonium, barium and amiloride induce metamorphosis in the marine hydroid *Hydractinia*. *Roux's Arch Dev Biol* 197:1-9

Boero F, Bouillon J, Piraino S, Schmid V (2002) Asexual reproduction in the Hydrozoa (Cnidaria). In: Hughes RN (ed) *Reproductive biology of invertebrates XI: progress in asexual reproduction*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, p 141–158

Brumwell, G. B. & Martin, V. J. 2002. Immunocytochemically defined populations of neurons progressively increase in size through embryogenesis of *Hydra vulgaris*. *Biol. Bull.* 203, 70– 79.

Clode PL, Marshall AT(2003). Calcium associated with a fibrillar organic matrix in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Protoplasma*, 220:153-161.

Dockray GJ (2004) Gut endocrine secretions and their relevance to satiety. *Curr Opin Pharmacol* 4:557–560.

Fritzenwanker, J. H. and Technau, U. (2002). Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis*(Anthozoa). *Dev. Genes Evol.* 212, 99- 103.

Grimmelikhuijzen, C.J., Williamson, M., Hansen, G.N., (2002). Neuropeptides in cnidarians. *Can. J. Zool.* 80, 1690–1702.

Hand, C. and Uhlinger, K. R. (1992). The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Biol. Bull.* 182, 169-176.

Hirose M, Yamamoto H, Nonaka M (2008) Metamorphosis and acquisition of symbiotic algae in planula larvae and primary polyps of *Acropora* spp. *Coral Reefs* 27: 247-254

Horvitz, 1999. Horvitz H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999;59:1701s–1706s.

Iwao, K., Fujisawa, T. & Hatta, M. 2002. A cnidarian neuropeptide of the GLWamide family induces metamorphosis of reefbuilding corals in the genus *Acropora*. *Coral Reefs* 21, 127– 129.

Koizumi, O., 2002. Developmental neurobiology of hydra, a model animal of cnidarians. *Can. J. Zool.* 80, 1678–1689.

Kroiher M, Walther M, Berking S.(1992). Heat shock as inducer of metamorphosis in marine invertebrates. *Roux's Archive of developmental Biology* 201:169-172.

Leitz T, Lay M. 1995. Metamorphosin-A is a neuropeptide. *Roux's Arch Dev Biol* 204:276-27

Leitz, T. & Wagner, T. (1992). The marine bacterium *Alteromonas espejiana* induces metamorphosis of the hydroid *Hydractinia echinata*. *Mar. Biol.* 115, 173–178.

Martin V.J., 2002. Photoreceptors of cnidarians. *Can. J. Zool.* 80: 1703–1722

Müller WA (1973) Metamorphoseinduktion bei Planularlarven: I. Der bakterielle Induktor. *Rouxs Arch Dev Biol* 173:107-12

Müller, W.A. & Leitz, T. (2002). Metamorphosis in the Cnidaria. *Can. J. Zool* 80, 1755-1771.

Piraino S., Zega G., Di Benedetto C., Leone A., Dell'Anna A., Pennati R., Candia Carnevali D., Schmid V. & H. Reichert, (2011). Complex Neural Architecture in the Diploblastic Larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Comp. Neurol.* 519:1931–1951

Pernet, V., Anctil, M., Grimmelikhuijzen, C.J., 2004. Antho-RFamide-containing neurons in the primitive nervous system of the anthozoan *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* 472, 208–220.

Plickert G. and Schneider B., (2004). Neuropeptides and photic behavior in Cnidaria. *Hydrobiologia* 530/531: 49-57

Roccheri M.C., Tipa C., Bonaventura R., Matranga V., 2002 — Physiological and induced apoptosis in sea urchin larvae undergoing metamorphosis. *Int. J. Dev. Biol.*, 46: 801-6.

Schmich, J., Trepel, S. and Leitz, T. (1998b). The role of GLWamides in metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Dev. Genes Evol.* 208, 267-273.

Seipp S., Schmich J. Kehrwald T. , Leitz T(2007). Metamorphosis of *Hydractinia echinata* natural versus artificial induction and developmental plasticity. *Dev Genes Evol* 217:385–394

Seipp S., Schmich J., Will B., Schetter E., Plickert G. & Leitz T. (2010) Neuronal cell death during metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa). *Invert Neuroscience* (2010) 10: 77-91

Spindler KD, Müller WA (1972) Induction of metamorphosis by bacteria and by a lithium-pulse in the larvae of *Hydractinia echinata*. *Wilhelm Roux' Arch* 169:271–280

Watanabe H, Fujisawa T, Holstein T (2009) Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Dev Growth Differ* 51:167–183

Weis, V. M. and Buss, L. W. (1987). Ultrastructure of metamorphosis in *Hydractinia echinata*. *Postilla* 199, 1-20.

## **4 Ruolo delle vie di segnale di Wnt e di FGF durante lo sviluppo dell'idrozoo *Clava multicornis*: effetti dei trattamenti con LiCl e Su5402**

### **4.1 Riassunto**

Le vie di segnale di WNT e di FGF sono coinvolte nella determinazione degli assi corporei in numerosi animali modello. Inoltre la via di FGF è coinvolta anche nel differenziamento cellulare. Il cloruro di litio agisce facendo aumentare i livelli di  $\beta$ -catenina nucleare e quindi attivando la via canonica di segnale di WNT. SU5402 è un antagonista dei recettori di FGF e agisce inibendo la via di segnale di FGF. Per ottenere indicazioni circa la presenza di queste vie negli cnidari sono stati analizzati gli effetti dei trattamenti con cloruro di litio e SU5402 sullo sviluppo embrionale dell'idrozoo *Clava multicornis*. I risultati ottenuti mostrano che gli animali trattati mantengono una lunghezza paragonabile agli esemplari di controllo, mentre cambia la forma dei due poli degli animali. Infatti le larve trattate con cloruro di litio assumono una forma a bastoncino invece della tipica forma a clava, mentre le larve trattate con SU5402 sono a forma di cuneo. Successivamente negli animali trattati si sono evidenziate, mediante immunolocalizzazione, le cellule del sistema nervoso contenenti peptidi GLWamidati ed RFamidati. E' risultato che ci sono differenze nella posizione delle cellule e nel loro numero sia nelle larve trattate con cloruro di litio che in quelle trattate con SU5402. Questo dimostra che le due sostanze interferiscono con il corretto sviluppo dell'animale. Gli effetti che queste due sostanze hanno avuto su *Clava multicornis* suggeriscono la probabile presenza della via di segnale di WNT e di FGF in questi animali, anche se sono necessari ulteriori analisi per capire il ruolo di queste vie di segnale durante la morfogenesi degli cnidari.

## 4.2 Introduzione

### 4.2.1 Le vie di segnale di WNT

Nei metazoi, esistono numerose vie di segnale che contribuiscono a determinare la formazione degli assi corporei. Due di queste sono la via di segnale di WNT e quella di FGF (fattori di crescita dei fibroblasti).

La via di segnale di WNT è stata studiata in particolar modo nei ricci di mare, in cui determina l'asse che va dal polo orale a quello aborale, e negli anfibi in cui determina l'asse dorso-ventrale (Croce, McClay, 2006). Esistono diverse vie di segnale regolate da geni WNT, ma una sola è coinvolta nella determinazione degli assi, la via canonica dipendente da  $\beta$ -catenina. Questa via di segnale si attiva quando un ligando WNT si lega a un recettore Frizzled, una proteina costituita da sette domini trans-membrana. È inoltre necessaria la presenza di un corecettore appartenente alla famiglia degli LRP. Quando non è presente un ligando WNT, nella cellula si forma un complesso citoplasmatico formato da APC, Axina e GSK-3 $\beta$ . Questo complesso fosforila la  $\beta$ -catenina che viene poi degradata. In presenza del ligando WNT, viene attivata la proteina Dishvelled (Dsh). Questa proteina inibisce GSK-3 $\beta$  impedendogli di fosforilare la  $\beta$ -catenina. Quest'ultima può quindi entrare nel nucleo dove insieme ai fattori di trascrizione TCF/LEF regola la trascrizione dei geni target di WNT. Questo processo si verifica solitamente nelle cellule che si troveranno poi al polo vegetativo dell'animale.

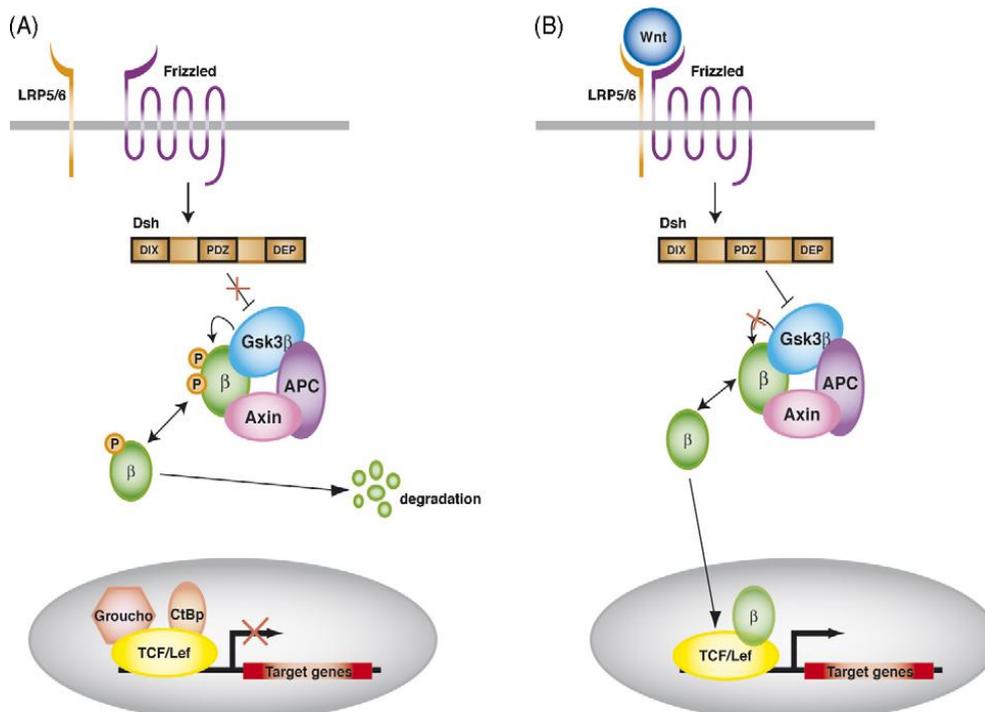


Fig. Croce & McClay,

### 4.2.2 WNT negli cnidari

Si pensa che negli Cnidari la via di segnale canonica di WNT sia coinvolta nella determinazione dell'asse antero-posteriore (Amiel and Houliston, 2009; Broun et al., 2005; Hobmayer et al., 2000; Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2007; Müller et al., 2004b; Plickert et al., 2006). Gli studi sopra citati, ed altri ancora, hanno dimostrato che molti geni WNT sono espressi in modo asimmetrico negli adulti, i polipi, con un livello massimo d'espressione nella zona intorno alla bocca (o polo orale). È stato inoltre dimostrato che negli embrioni di *Hydractinia* e di *Clytia* i trascritti di molti geni di origine materna sono accumulati nel polo dell'oocita che successivamente corrisponderà al polo posteriore nella larva e al polo orale nell'adulto (Momose and Houliston, 2007; Plickert et al., 2006). Inoltre allo stesso polo è stata rilevata  $\beta$ -catenina nucleare negli embrioni di *Nematostella* (Wikramanayake et al. 2003). Infine modifiche nell'espressione di WNT3 e di  $\beta$ -catenina (Momose et al. 2008; Momose et al. 2007; Gee et al. 2010) così come l'inibizione di GSK-3 $\beta$  (Hassel et al. 1993; Muller et al. 2004) interferiscono con la formazione dell'asse antero-posteriore, suggerendo che la via di segnale WNT sia coinvolta nella determinazione della posizione dell'estremità anteriore negli Cnidari (Broun et al. 2005). Non ci sono dati in letteratura sull'effetto dell'inibizione della via di segnale WNT sulle strutture al polo aborale (Tanaka e Weidinger 2008).

### 4.2.3 Effetti del LiCl sullo sviluppo embrionale

Il cloruro di litio agisce sulla via di segnale Wnt che influenza la formazione degli assi corporei. Il LiCl infatti inibisce la GSK-3 $\beta$  facendo aumentare i livelli citoplasmatici di  $\beta$ -catenina (Klein e Melton, 1996).

Negli anfibi il cloruro di litio causa un'espansione delle strutture dorsoanteriori o la formazione di embrioni completamente dorsalizzati (Kao et al., 1986). Nei ricci di mare il LiCl causa una vegetalizzazione dell'embrione (Lallier, 1964).

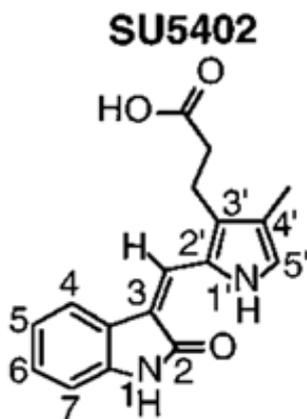
Un effetto sull'asse antero-posteriore è noto anche nelle ascidie. Infatti lo studio condotto da Shoko et al. nel 1998 ha dimostrato che nelle larve dell'ascidia *Ciona savignyi* trattate con cloruro di litio la coda aveva dimensioni minori rispetto alle larve non trattate. Inoltre nelle larve trattate alcune cellule che dovevano trovarsi nella regione posteriore dell'animale si formavano invece in quella anteriore e che cellule che dovevano originare la notocorda diventavano invece cellule endodermiche. Lo stesso risultato si otteneva nelle larve in cui veniva causata una sovraespressione del gene della  $\beta$ -catenina.

#### 4.2.4 La via di segnale di FGF

Le FGF sono proteine che appartengono al gruppo dei fattori di crescita, cioè proteine in grado di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare. Tra i ruoli svolti dalle proteine della famiglia FGF rientra anche la determinazione dell'asse antero-posteriore. Queste proteine si legano a specifici recettori chiamati FGFR posti nella membrana cellulare. Questi recettori sono costituiti da tre domini extracellulari, un dominio trans-membrana e un dominio intracellulare. Quando avviene il legame tra la proteina e il recettore, vengono attivate una serie di reazioni a cascata all'interno della cellula che inducono poi la trascrizione di determinati geni all'interno del nucleo. Il primo fattore di crescita fu trovato nel 1973 nell'ipofisi e successivamente fu localizzato anche nel cervello di mucca (Gospodarowicz, et al., 1974).

#### 4.2.5 Effetti dell'SU5402

L'SU5402 è un composto la cui struttura è mostrata in fig.3 (Mohammadi et al. 1997).



Struttura della molecola di SU 5402

Questa sostanza è un inibitore dell'FGFR1, cioè di un recettore per le proteine FGF. Quindi i trattamenti con questo composto influenzano la via di segnale di FGF e possono avere effetti sullo sviluppo degli assi corporei e il differenziamento cellulare. È stato provato che nel pesce *Danio rerio*, la somministrazione di SU5402 nelle prime ore dopo la fecondazione dell'uovo porta a una riduzione del numero di neuroblasti che si differenziano nell'animale (Alex Nechiporuk e David W. Raible, 2008).

## 4.3 Materiali e metodi

### 4.3.1 Animali

Le colonie di *Clava multicornis* sono state raccolte durante il periodo di bassa marea vicino a Roscoff (Francia) e sono state allevate in acquario, con un apporto costante di acqua di mare fresca e filtrata (FSW) a 14-18°C. I gonofori femminili che portavano gli embrioni a differenti stadi di sviluppo sono stati selezionati usando uno stereo microscopio. Gli embrioni sono stati prelevati dai gonofori usando delle piccole forbici e separati in base al loro stadio di sviluppo. Per i trattamenti sono stati scegli embrioni allo stadio più precoce, riconoscibili dalla forma tondeggiante e dalla naturale colorazione blu.

### 4.3.2 Trattamenti con cloruro di litio e SU 5402

Il cloruro di litio e l'SU5402 sono stati diluiti rispettivamente in ddH<sub>2</sub>O e in DMSO per ottenere soluzioni stock 1M.

Gli embrioni ai primi stadi di segmentazione sono stati trattati in capsule Petri (3 cm di diametro) contenenti 3 ml di LiCl o Su5402 alle concentrazioni finali rispettivamente di 40 mM e 20 µM sciolti in acqua di mare filtrata. Queste concentrazioni sono state scelte durante esperimenti preliminare e si tratta delle più alte concentrazioni testate che non mostravano effetti letali. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte in date diverse e con diversi gruppi di larve. Le capsule Petri sono state tenute in un incubatore a 16°C al buio e le soluzioni venivano cambiate ogni giorno.

Gli embrioni hanno iniziato a sgusciare il sesto giorno dopo i trattamenti. Ogni giorno le larve sgusciate venivano raccolte e fissate per un'ora in paraformaldeide sciolta in 0,1M di PBS, a pH 7,2. In seguito sono state disidratate in una serie crescente di alcoli e conservate in etanolo al 70%.

### 4.3.3 Misure e analisi statistica

I controlli e le larve trattate con cloruro di litio ed SU5402 sono state osservate al microscopio a trasmissione (Leica) e sono state misurate mediante un obiettivo graduato. Di ogni animale si è presa la misura della lunghezza totale, della larghezza massima al polo anteriore e della larghezza a 5 µm dall'estremità posteriore dell'animale. Le analisi statistiche dei dati sono state fatte mediante il programma SPSS versione 10.0. E' stata eseguita un'analisi della varianza per confrontare tra loro tutti e tre i trattamenti e un test di Tukey's.

#### 4.3.4 Immunolocalizzazione

Lo scopo dell'esperimento è osservare l'effetto di inibitori specifici delle vie di segnalazione Wnt e FGF sulla morfogenesi delle larve di *Clava multicornis*. Per farlo si è evidenziata mediante immunolocalizzazione la posizione delle cellule del sistema nervoso nelle larve di *C. multicornis* trattate. In particolare si è voluta osservare la localizzazione delle cellule contenenti peptidi delle famiglie di GLWamidi e RFamidi.

Prima di poter lavorare sulle larve è stato necessario reidratarle tramite passaggi in soluzioni alcoliche in concentrazione decrescente.

Sono stati fatti due lavaggi in PBS. Il PBS è una soluzione salina contenente cloruro di sodio e fosfato di sodio. E' stata usata una soluzione contenente 8 g/L di NaCl, 0,2 g/L di KCl, 1,44 g/L di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 0,24 g/L di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

In seguito le larve sono state poste in una soluzione di PBTT, ottenuta diluendo in PBS due detergenti, Tween-20 e Triton-x 100 (Sigma, Italia) in concentrazioni rispettivamente di 0,1% e 0,25%. Sono stati fatti due passaggi in PBTT da 15 minuti ciascuno. Poi si sono immerse le larve in una soluzione costituita da 50% PBTT e da 50% NGS. L'NGS è siero di capra ricco di proteine che si legano ai siti aspecifici degli anticorpi. In questo modo gli anticorpi primari che si aggiungeranno dopo si legheranno solo ai loro siti specifici. L'NGS viene disattivato per trenta minuti a 55°C prima di essere usato. Dopo essere state un'ora in questa soluzione, le planule sono state messe in una soluzione con NGS al 10% , PBTT e l'anticorpo primario che si vuole usare. Le planule sono state poi incubate a 4°C per tutta la notte.

Il giorno successivo si sono eseguiti tre risciacqui di 10 minuti in PBTT e poi si le larve sono state lasciate un'ora in PBTT 50% e NGS 50%. Infine si sono aggiunti gli anticorpi secondari diluiti in PBTT/NGS e si è incubato al buio a 4°C per una notte.

L'ultimo giorno si sono fatti ancora 6 lavaggi da 15 minuti in PBTT e infine si sono preparati i vetrini.

Nel nostro esperimento gli anticorpi usati sono stati anti-RF e anti-GLW prodotti in coniglio (omaggio del Prof. Thomas Leitz, Germania), diluiti rispettivamente 1:250 e 1:300. Come secondario è stato utilizzato un anticorpo anti Igg di coniglio coniugato a FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Sigma, Italia) diluito 1:400. Questo anticorpo si lega agli anticorpi di coniglio ed è visibile al microscopio a fluorescenza.

## 4.4 Risultati

### 4.4.1 Analisi morfologica degli effetti dei trattamenti con LiCl e con Su5402

Le larve di *Clava multicornis* sono solitamente lunghe 600-800  $\mu\text{m}$  ed hanno una forma a clava con il polo anteriore più largo e arrotondato e il polo posteriore più stretto e appuntito (Fig. 1A). La lunghezza media degli esemplari non trattati è di 670  $\mu\text{m}$ , mentre la larghezza massima e minima medie sono rispettivamente 132  $\mu\text{m}$  e 58  $\mu\text{m}$  (Tabella 1, Grafico 1). Le larve trattate con cloruro di litio presentano una lunghezza media di 684  $\mu\text{m}$  (Tabella 1, Grafico 1). Tale misura non è però significativamente diversa rispetto a quella dei controlli (ANOVA:  $F_{2, 15} = 1,028$ ;  $P=0,381$  Tukey's:  $P= 0,983$ ). La forma dell'animale tuttavia appare diversa. Infatti, la differenza tra il polo anteriore e quello posteriore non è più netta come nei controlli, poiché entrambe le estremità sono arrotondate (Fig.1B). Per valutare queste differenze sono state misurate la larghezza massima nella regione anteriore e la larghezza minima a 5  $\mu\text{m}$  di distanza dall'estremità posteriore. La larghezza massima media è risultata di 144  $\mu\text{m}$  e quella minima di 100  $\mu\text{m}$  (Tabella 1, Grafico 1). L'analisi statistica indica che la larghezza massima non è significativamente diversa rispetto a quella dei controlli (Tukey's:  $P= 0,704$ ), mentre lo è quella minima (Tukey's:  $P<0.0005$ ). Inoltre negli esemplari trattati con LiCl il rapporto medio tra le larghezze ai due poli è di 1,45, mentre negli esemplari non trattati è 2,30 (Tabella 1, grafico 2). I due valori sono significativamente diversi (ANOVA:  $F_{2, 15} = 37,442$ ;  $P<0,0005$ ; Tukey's:  $P=0,002$ ) e ciò conferma che le forme delle larve trattate sono effettivamente diverse rispetto a quelle dei controlli.

Al contrario le larve trattate con SU5402 appaiono più corte delle larve di controllo, con una lunghezza media di 599  $\mu\text{m}$ . Come nel caso dei trattati con LiCl, questa misura non si discosta significativamente da quella delle larve di controllo (ANOVA:  $F_{2, 15} = 1,028$ ;  $P=0,381$ ; Tukey's:  $P=0,584$ ). L'osservazione al microscopio mostra che la forma assunta dalle larve trattate con SU5402 è più simile ad un cuneo che ad una clava con una forte differenza tra i due poli (Fig. 1C). I trattati con SU5402 hanno una larghezza massima media di 168  $\mu\text{m}$  ed una larghezza minima media di 59  $\mu\text{m}$  (Tabella 1, Grafico 1). La larghezza massima è significativamente diversa rispetto a quella dei controlli (Tukey's:  $P=0,036$ ), mentre non lo è la larghezza minima (Tukey's:  $P=0.955$ ). Infine il rapporto tra queste due larghezze è di 2,87 nei trattati e di 2,30 negli animali di controllo. Anche in questo caso i valori sono significativamente diversi (ANOVA:  $F_{2, 15} = 37,442$ ;  $P<0,0005$ ; Tukey's:  $P=0,015$ ).

#### **4.4.2 Effetti dei trattamenti sullo sviluppo del sistema nervoso**

Le larve di controllo marcate con un anticorpo anti-GLWamide mostrano cellule GLWamide positive ben organizzate nella parte anteriore dell'animale a formare la tipica struttura a cupola (Fig. 2A,B). Si può notare bene che le cellule hanno una forma allungata e attraversano tutto l'ectoderma fino ad entrare in contatto con l'ambiente esterno. Infatti è importante che queste cellule colgano gli stimoli ambientali, in particolare quelli che inducono la metamorfosi, perché sono proprio i peptidi GLWamidati contenuti in queste cellule che trasmettono a tutte le altre cellule dell'animale il segnale per iniziare la metamorfosi.

In larve sviluppatesi da embrioni trattati con cloruro di litio la cupola di cellule GLWamide positive non è rinvenibile. Le cellule positive sono piccole e non allungate. Inoltre presentano una disposizione anomala, infatti queste cellule mancano quasi totalmente nella parte anteriore dell'animale (Fig. 2C,D), dove negli individui di controllo sono particolarmente numerose (Fig. 2A,B). Cellule GLWamide positive sono invece presenti nella parte posteriore delle larve trattate (Fig. 2C,D), dove negli animali di controllo non sono presenti (Fig. 2A,B)

Le larve non trattate in cui sono state marcate le cellule contenenti peptici RFamidati mostrano che queste cellule sono ben localizzate posteriormente alla cupola di cellule GLWamide positive e formano un anello che circonda tutto l'animale (Fig. 3A,B). Anche queste cellule sono ben allungate e sono in contatto con l'ambiente esterno. Sono visibili anche le fibre nervose che percorrono tutta la mesoglea fino alla parte più posteriore dell'animale (Fig. 3A,B).

Le larve trattate con LiCl in cui sono state marcate cellule RFamide positive mostrano un'estrema riduzione del numero di queste cellule in tutto l'animale. In particolare, la parte anteriore dell'animale è completamente priva di cellule RF amidi-positive mentre tali cellule sono presenti solo nella parte posteriore anche se in numero molto ridotto rispetto ai controlli (Fig. 3C,D).

Le larve trattate con Su5402 presentano cellule GLW positive che si trovano nella posizione corretta, sono infatti principalmente localizzate nella parte anteriore dell'animale (Fig. 4C,D). Tuttavia non è ben riconoscibile la forma a cupola che dovrebbe avere questa popolazione di cellule. Infatti il loro numero è molto ridotto rispetto al controllo e anche la loro forma è molto meno allungata. Sono ancora presenti anche le fibre che percorrono tutto l'animale (Fig. 4C,D).

Nelle larve in cui sono state marcate le cellule RF positive si scorgono solo pochissime cellule di questo tipo nella parte anteriore dell'animale, mentre sono presenti le fibre nervose longitudinali che attraversano tutta la mesoglea (Fig. 5C,D).

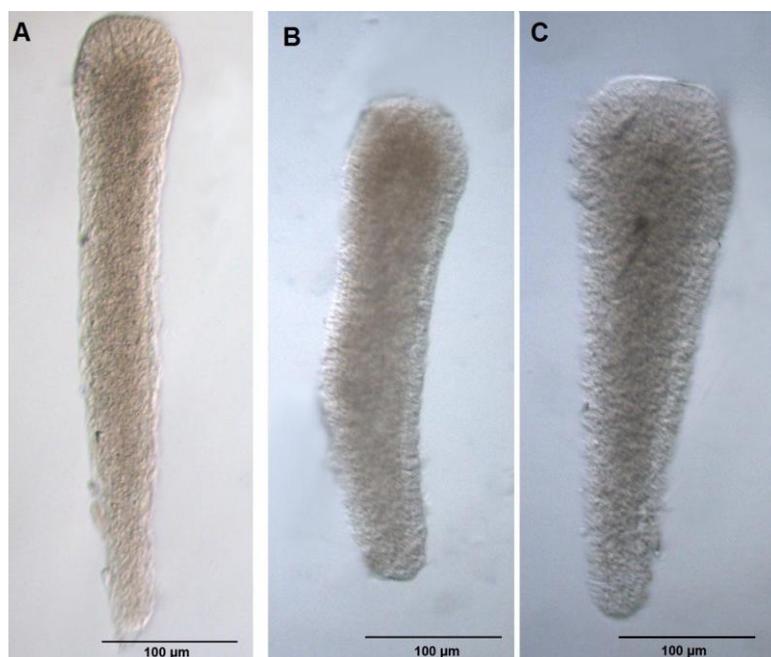


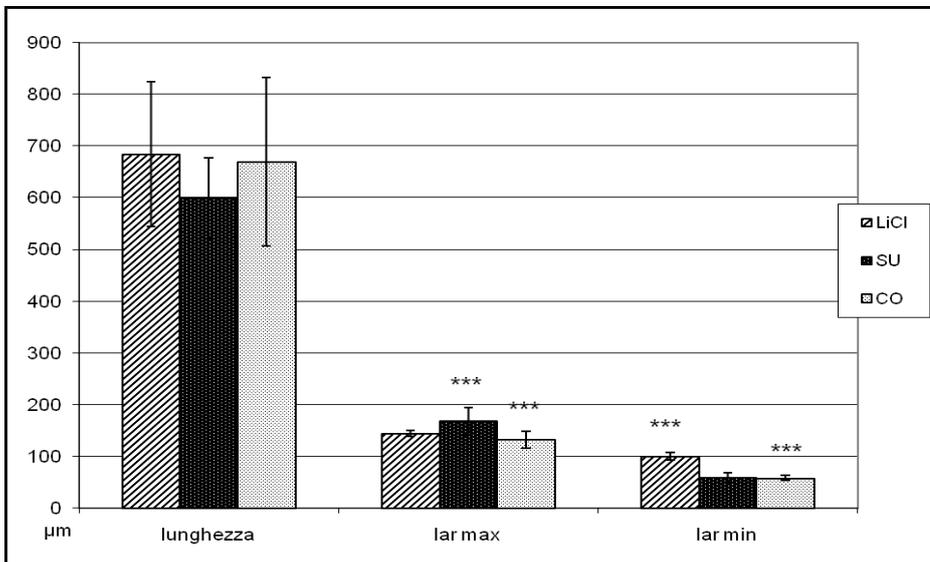
Fig.1: Immagini al microscopio di larve di *Clava multicornis*. A: Esemplare di controllo. B: Larva sviluppata in seguito a trattamento con LiCl. C: Larva sviluppata da embrione trattato con SU5402.

	lunghezza	Larghezza massima	Larghezza minima	Rapporto larghezze
LiCl	684	144	100	1,45
SU	599	168	59	2,87
CO	670	132	58	2,3

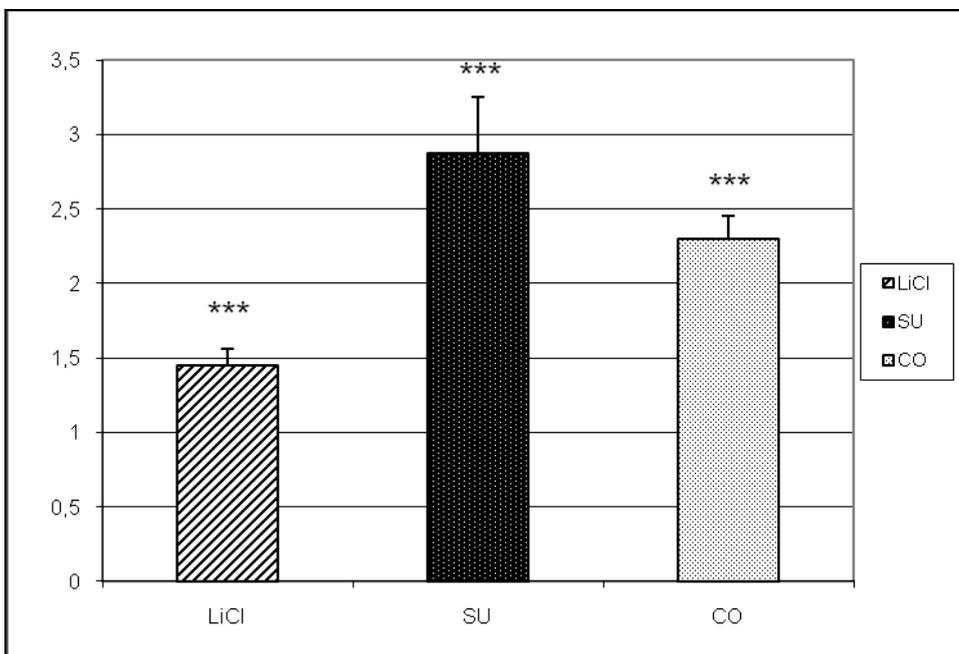
Tabella 1: valori medi di lunghezza, larghezza massima, larghezza minima e rapporto larghezza massima/larghezza minima espressi in µm in larve trattate con cloruro di litio (LiCl), SU 5402(SU) e nelle larve di controllo (CO).

	Lunghezza	Larghezza massima	Larghezza minima	Rapporto larghezze
LiCl	139,75	5,48	7,07	0,11
SU	78,65	26,82	9,28	0,39
CO	163,10	17,08	5,00	0,15

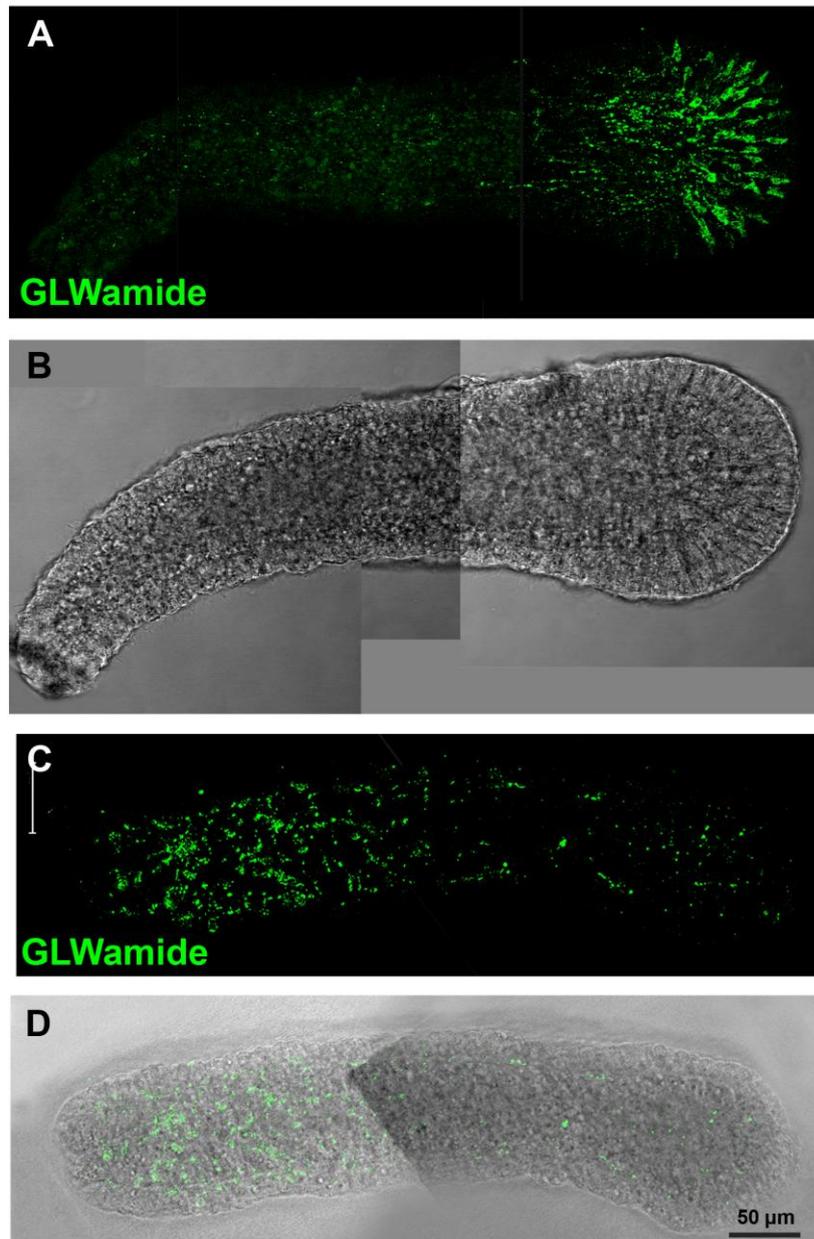
Tabella 2: deviazione standard di lunghezza, larghezza massima, larghezza minima e rapporto larghezza massima/larghezza minima in larve trattate con cloruro di litio (LiCl), SU 5402(SU) e nelle larve di controllo (CO).



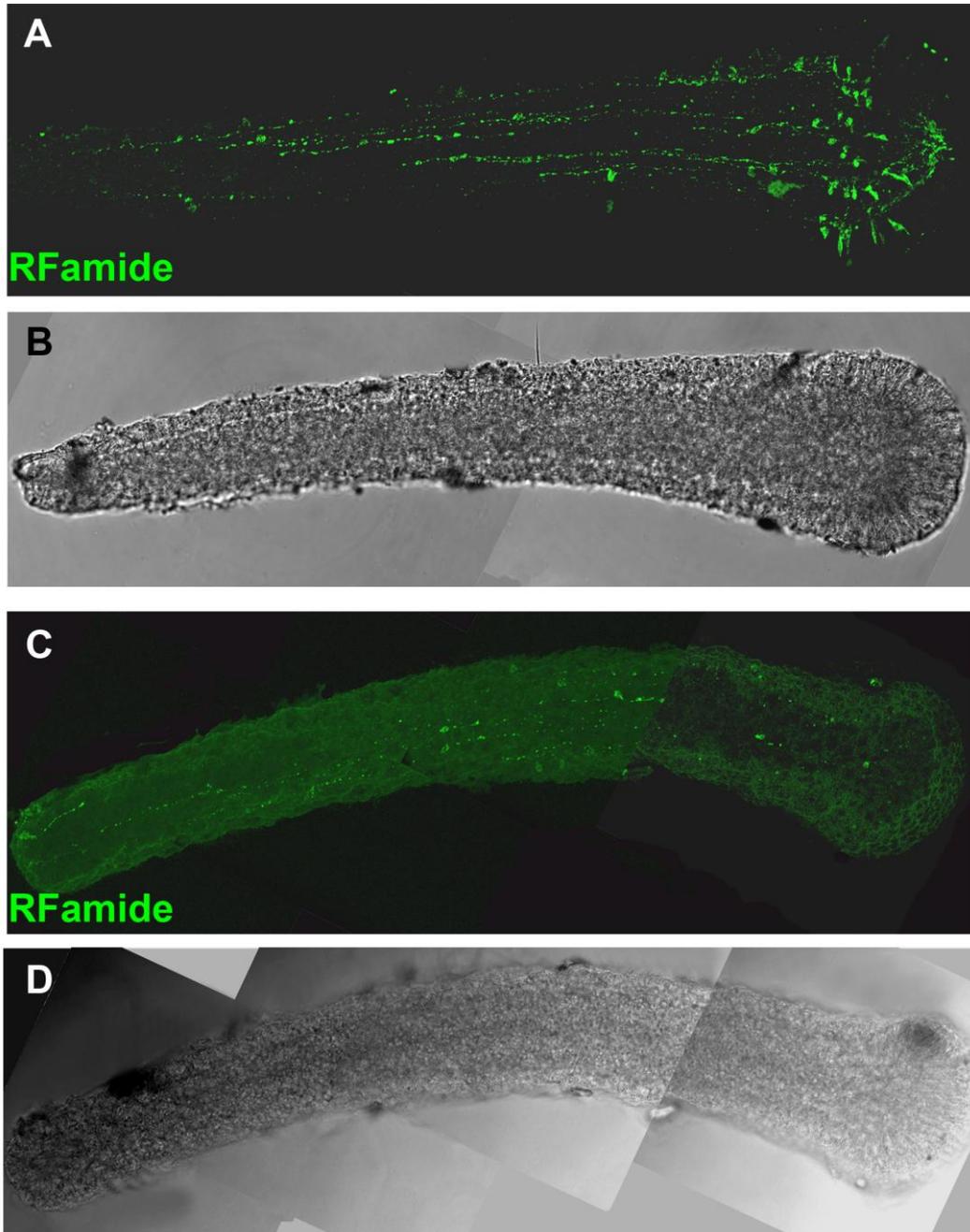
**Grafico 1:** rappresentazione grafica della lunghezza media, larghezza massima media e larghezza minima media delle larve trattate con cloruro di litio (LiCl), con SU5402 (SU) e dei controlli (CO).



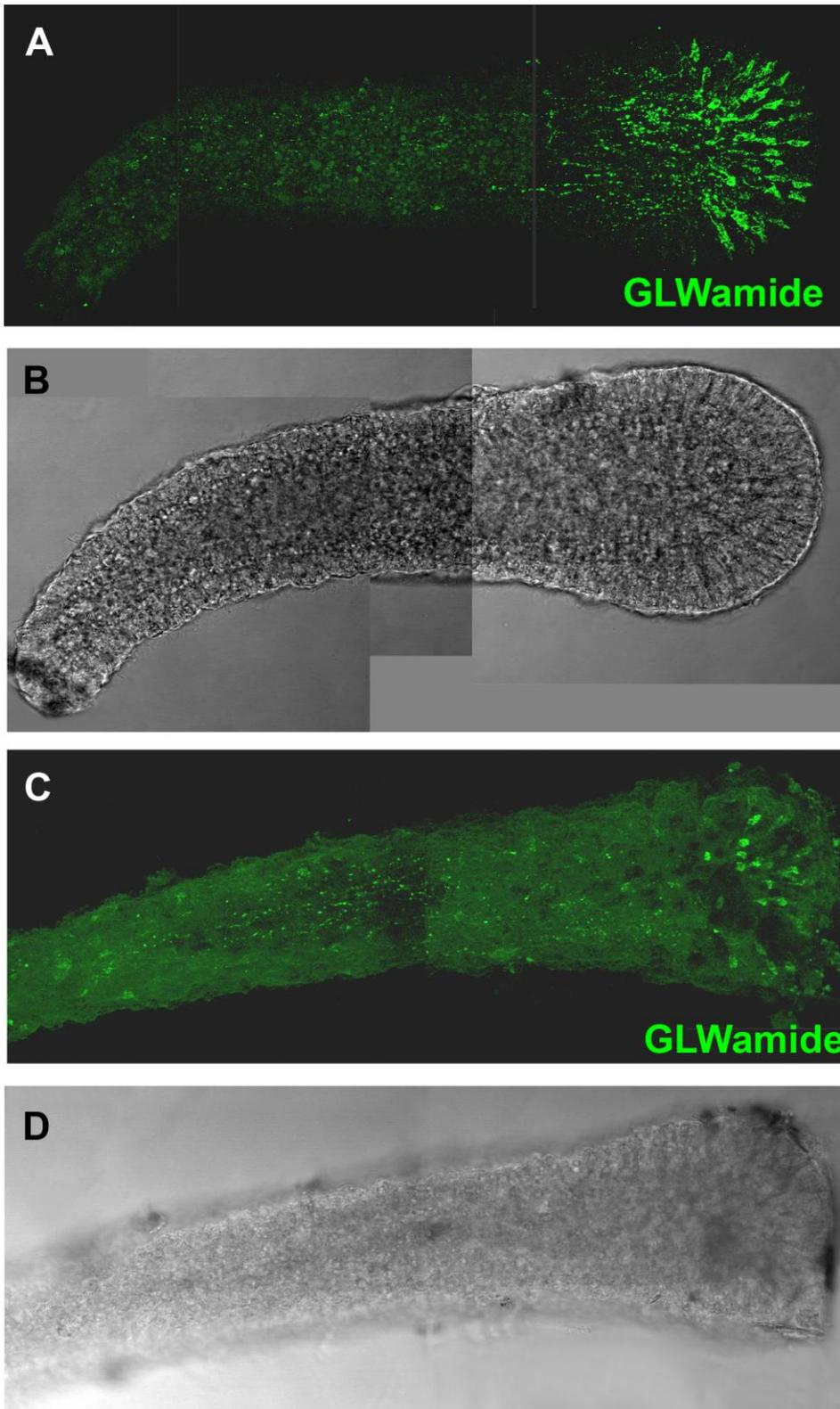
**Grafico 2:** rapporto larghezza massima/larghezza minima medie delle larve trattate con cloruro di litio (LiCl), con SU5402 (SU) e dei controlli (CO).



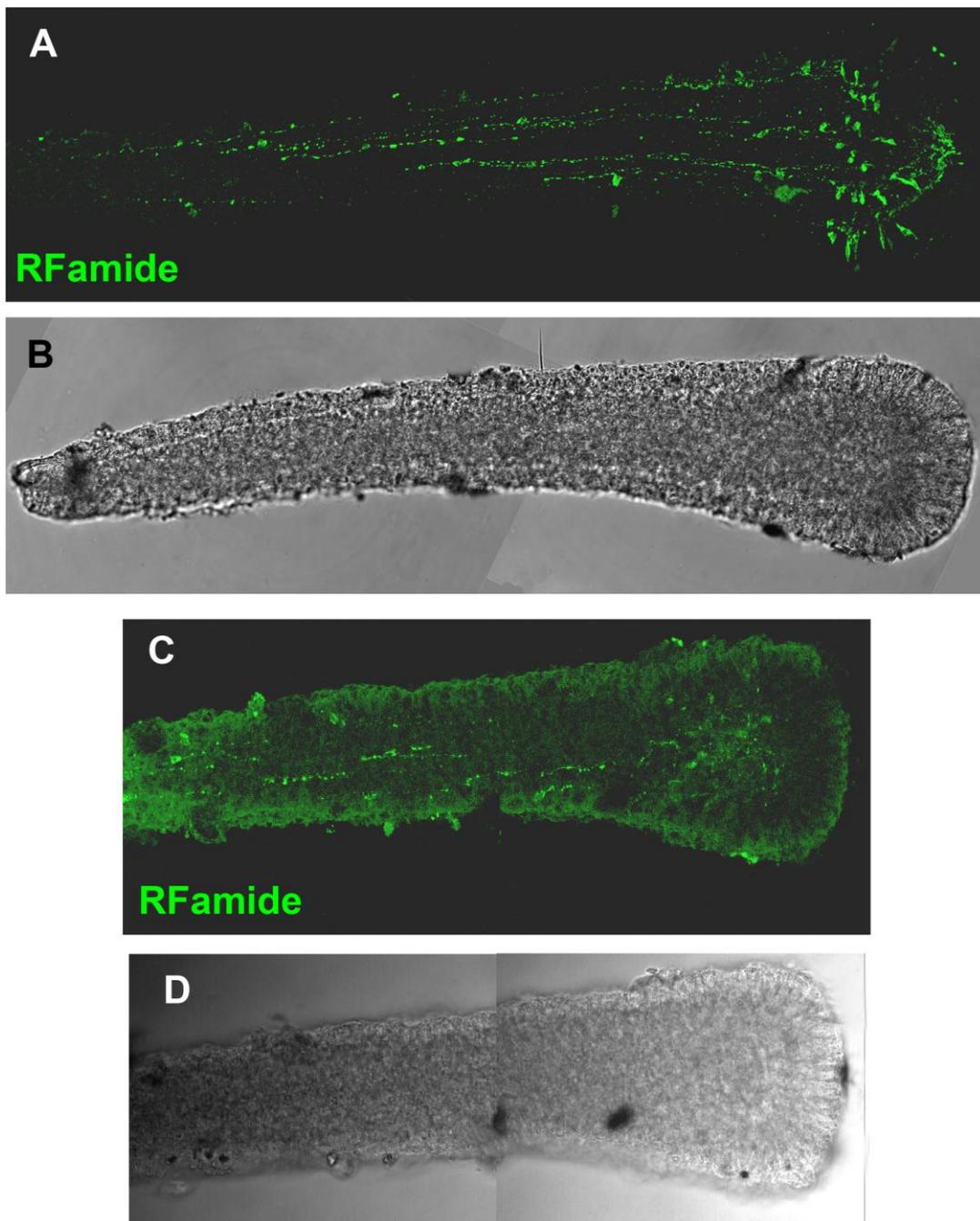
**Fig. 2:** Immunolocalizzazione di GLWamide in larve di *C. multicornis*. A,B: larve di controllo. C,D larve sviluppate da embrioni trattate con LiCl. A,C: immagini ottenute al microscopio confocale. B: immagine a trasmissione della larva in A. D: immagine a trasmissione della larva in C sovrapposta all'immagine al microscopio confocale.



**Fig.3:** Immunolocalizzazione di RFamide in larve di *C. multicornis*. A,B: larve di controllo. C,D larve sviluppate da embrioni trattate con LiCl. A,C: immagini ottenute al microscopio confocale. B,D: immagini al microscopio a trasmissione della larva in A e C rispettivamente.



**Fig.4:** Immunolocalizzazione di GLWamide in larve di *C. multicornis*. A,B: larve di controllo. C,D larve sviluppate da embrioni trattati con SU5402. A,C: immagini ottenute al microscopio confocale. B,D: immagini al microscopio a trasmissione della larva in A e C rispettivamente.



**Fig.5:** Immunolocalizzazione di RFamide in larve di *C. multicornis*. A,B: larve di controllo. C,D larve sviluppate da embrioni trattate con SU5402. A,C: immagini ottenute al microscopio confocale. B,D: immagini al microscopio a trasmissione della larva in A e C rispettivamente.

## 4.5 Discussione

In letteratura esistono dati riguardo la presenza della via canonica di segnale di WNT e del suo coinvolgimento nella rigenerazione dei polipi. Trattamenti con un inibitore di GSK-3 $\beta$  causa una riduzione del numero di tentacoli al polo orale del polipo dell'idrozoo *Hydractinia echinata* (Muller, 2004). Pochi e scarsi sono i dati riguardanti gli effetti della perturbazione della via di WNT durante lo sviluppo embrionale. Abbiamo quindi deciso di trattare embrioni di *C. multicornis* con cloruro di litio e di valutare gli effetti morfologici provocati nella larva. Il cloruro di litio è noto per interagire con la via di segnale WNT inibendo GSK-3 $\beta$  e aumentando di conseguenza i livelli di  $\beta$ -catenina. La morfologia molto semplice di questi organismi rende difficile osservare alterazioni fenotipiche. Infatti, le larve planule degli cnidari sono costituite da due soli tessuti, l'ectoderma e l'endoderma, e non presentano strutture anatomiche complesse lungo l'asse antero-posteriore. Per questo motivo l'uso di *C. multicornis* come animale sperimentale si è rivelato molto utile, in quanto le planule di questa specie presentano una netta distinzione morfologica tra i due poli. Inoltre anche il sistema nervoso è polarizzato lungo l'asse antero-posteriore con popolazioni di neuroni distinte in posizioni definite. Le larve trattate con cloruro di litio presentano una forma alterata rispetto alle larve di controllo. Infatti entrambi i poli degli animali trattati sono molto arrotondati e non è quindi visibile la netta differenza tra il polo anteriore e quello posteriore. In particolare il polo anteriore non risulta significativamente diverso rispetto a quello dei controlli, mentre il polo posteriore dei trattati è mediamente più largo rispetto ai controlli. Inoltre, le cellule del sistema nervoso presentano una disposizione anomala lungo l'asse antero-posteriore. Infatti sia i neuroni GLWamide positivi sia quelli contenenti peptidi RFamide non risultano ben localizzati nel polo anteriore dell'animale, ma sono presenti in numero ridotto e dislocati lungo tutto il corpo degli esemplari osservati. I risultati ottenuti mostrano che i trattamenti con cloruro di litio alterano la corretta disposizione delle strutture anatomiche lungo l'asse antero-posteriore nelle larve di *Clava multicornis*. Ciò suggerisce che durante lo sviluppo embrionale sia attiva la via di segnale di WNT e che prenda parte nella determinazione dell'asse antero-posteriore.

L'SU5402 invece agisce come inibitore della via FGF anch'essa coinvolta nella determinazione degli assi corporei oltre che nella differenziazione cellulare in diversi animali modello. Il trattamento con SU5402 induce un fenotipo altamente riproducibile, caratterizzato da una forma del corpo a cuneo. Infatti nelle larve trattate la larghezza massima della parte anteriore del corpo risulta significativamente maggiore rispetto a quella dei controlli, così

come il rapporto tra larghezza massima e larghezza minima. Questa costante e riproducibile alterazione della forma del corpo ottenuta trattando con un inibitore di FGF, suggerisce la partecipazione di questa via di segnale al processo di morfogenesi della planula. Tuttavia ulteriori indagini sono necessarie per capire il ruolo di FGF nella determinazione dell'asse antero-posteriore nelle larve degli cnidari. In seguito a trattamento con l'inibitore i neuroni GLWamide e RFamide positivi risultano correttamente localizzati al polo anteriore della planula. Tuttavia entrambi i tipi neurali risultano essere estremamente ridotti di numero. Ciò suggerisce che FGF gioca un ruolo importante nel differenziamento dei neuroni durante l'embriogenesi di *C. multicornis*.

I dati mostrati suggeriscono l'attività delle vie di segnale di WNT e FGF durante lo sviluppo di *C. multicornis*. Ulteriori esperimenti sono necessari per comprendere il ruolo di queste due vie di segnale durante lo sviluppo embrionale degli Cnidari.

#### **4.6 Bibliografia**

Amiel, A. e Houliston, E. (2009). Three distinct RNA localization mechanisms contribute to oocyte polarity establishment in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Dev. Biol.* 327, 191-203.

Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B. e Bode, H. R. (2005). Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132, 2907-2916.

Collins A. G. et al. (2006). *Medusozoan* phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assesment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst. Biol.* 55:97-115.

Croce JC., McClay D R.(2006). The canonical Wnt pathway in embryonic axis polarity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17:168-174

Fujisawa T (2008). *Hydra* peptide project 1993-2007. *Dev Growth Differ* 50(Suppl 1): 257-268

Gee, L., Hartig, J., Law, L., Wittlieb, J., Khalturin, K., Bosch, T. C. G. and Bode, H. R. (2010).  $\beta$ -catenin plays a central role in setting up the head organizer in hydra. *Dev. Biol.* 340, 116-124.

Gospodarowicz D (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249 (453): 123–127

Hassel, M., Albert, K. e Hofheinz, S. (1993). Pattern formation in *Hydra vulgaris* is controlled by lithium-sensitive processes. *Dev. Biol.* 156, 362-371.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. e Holstein, T. W. (2000). WNT signaling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407, 186-189.

Kaneot T et al. (2003). Identification of a novel frog RFamide and its effect on the latency of the tail-flick response of the newt . *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134: 259-266

Kao, K. R., Masui, Y., and Elinson, R. P. (1986). Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. *Nature* 322: 371–373

Kass-Simon G, Pierobon P (2007). Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp Biochem Physiol Part A* 146:9-25

Katsukura Y. *et al.* (2004). Control of planula migration by LWamide and Rfamide neuropeptides in *Hydractinia echinata* . *The journal of Experimental Biology* 207:1803-1810.

Klein P. S., and Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8455–8459.

Lallier, R. (1964). Biochemical aspects of animalization and vegetalization in the sea urchin embryo. *Adv. Morphogen.* 3: 147– 196.

Lee JH et al. (1996). KiSS-1, a novel malignant melanoma metastasis suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88: 1731-1737

Lee, P. N., Kumburegama, S., Marlow, H. Q., Martindale, M. Q. e Wikramanayake, A. H. (2007). Asymmetric developmental potential along the animal-vegetal axis in the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled. *Dev. Biol.* 310, 169-186.

Leitz T, Morand K, Mann M(1994). Metamorphosin A, a novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractinia echinata*. *Dev Biol* 163:440-446

Leitz T (2001). Endocrinology of the Cnidarian: state of the art. *Zoology* 103: 202-221

Mohammadi M et al., Structures of the Tyrosine Kinase Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor in Complex with Inhibitors. *Science* Vol. 276 no. 5314: 955-960

Momose, T. e Houliston, E. (2007). Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo. *PLoS Biol.* 5, e70.

Momose, T., Derelle, R. e Houliston, E. (2008). A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development* 135, 2105-2113.

Müller, W. A., Teo, R. e Möhrlein, F. (2004b). Patterning a multi-headed mutant in *Hydractinia*: enhancement of head formation and its phenotypic normalization. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 9-15.

Nechiporuk A. † e Raible D. W. † (2008). FGF-Dependent Mechanosensory Organ Patterning in Zebrafish. *Science*, 320:1774-1777

Pinelli C et al. (1999). Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the amphibian brain: comparative analysis. *J Comp Neurol* 414: 275-305

Piraino S, Zega G, Di Benedetto C, Leone A, Dell'Anna A, Pennati R, Carnevali DC, Schmid V, Reichert H (2011). Complex neural architecture in the diploblastic larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria) *J Comp Neurol.* 519:1931-51

Plickert G. and Schneider B., (2004). Neuropeptides and photic behavior in *Cnidaria*. *Hydrobiologia* 530/531: 49-57

Plickert, G., Jacoby, V., Frank, U., Müller, W. A. e Mokady, O. (2006). Wnt signaling in hydroid development: formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning. *Dev. Biol.* 298, 368-378.

Price DA, Greenberg MJ (1997). Structure of a molluscan cardioexcitatory peptide. *Science* 197: 670-671

Schmich J, Trepel S e Leitz T,(1998). The role of GLWamides in metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Dev Genes Evol* 208:267-273

Shoko Y. ,Yusuke M. e Noriyuki S.(1998). Regulation of the Trunk–Tail Patterning in the Ascidian Embryo: A Possible Interaction of Cascades between Lithium/b-Catenin and Localized Maternal Factor pem. *Developmental Biology* 202:264-279

Tanaka, E. M. e Weidinger, G. (2008). Heads or tails: can Wnt tell which one is up? *Nat. Cell Biol.* 10, 122-124

Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., Bince, J. M., Xu, R. e Martindale, M. Q. (2003). An ancient role for nuclear betacatenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* 426, 446-450.

Yano T et al. (2003). Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Res* 982: 156-167

Zhao X, Duester G (2009). Effect of retinoic acid signaling on Wnt/b-catenin and FGF signaling during body axis extension. *Gene Expression Patterns* 9: 430-435

## **5 Effetti del trattamento con Acido retinoico sullo sviluppo embrionale di *Clava multicornis***

### **5.1 Riassunto**

L'acido retinoico (RA) è un noto morfogeno che regola la determinazione spaziale delle strutture corporee lungo l'asse antero-posteriore nei vertebrati ed in altri cordati.

I componenti della via di segnale dell'RA, come gli enzimi di sintesi e catabolici ed i recettori, sono stati isolati in diversi organismi, dai nematodi agli echinodermi, suggerendo che il suo ruolo morfogenetico di questa molecola non è esclusivo dei cordati.

Tuttavia è noto che i retinoidi possono influenzare i pattern di specificazione nei polipi dell'idrozoo *Hydractinia echinata*. La larva planula dell'idrozoo *Clava multicornis* è caratterizzata dalla presenza di un sistema nervoso complesso formato da un plesso neurale anteriore composto da due distinte popolazioni di cellule peptidergiche con un'organizzazione antero-posteriore: una prima, più anteriore, popolazione di cellule GLWamide immunoreattive ed una posteriore, adiacente alla prima, a formare una fascia di cellule RFamide immunoreattive.

A differenza delle planule natanti, le larve di *Clava multicornis* presentano una locomozione di tipo strisciante sul substrato, caratterizzato dalla flessione laterale del polo anteriore.

Sono stati testati gli effetti dell'RA, e di un suo antagonista, sullo sviluppo di *Clava multicornis* tramite l'analisi dell'organizzazione del sistema nervoso e del comportamento fototattico delle larve esposte all'RA durante l'embriogenesi. Dopo l'esposizione, il sistema nervoso appare completamente disorganizzato e le cellule RFamide immunoreattive sono dislocate.

Inoltre le larve trattate con RA perdono il loro tipico comportamento fototropico riscontrato negli individui di controllo. I risultati suggeriscono che l'RA può alterare il normale sviluppo degli elementi nervosi in questa specie di idrozoo, supportando l'ipotesi che l'attività morfogenetica dell'RA si sia evoluta prima della divergenza dei cordati.

### **5.2 Introduzione**

L'acido retinoico (RA) è un derivato della vitamina A di cui è nota la capacità di regolare una vasta gamma di processi fisiologici. La sua funzione è stata ampiamente studiata nei vertebrati,

in particolare nei mammiferi, nei quali svolge un ruolo chiave durante l'embriogenesi nella regolazione della regionalizzazione del corpo, nell'organogenesi, nella formazione degli arti e nella neurogenesi (Maden, 2007).

L'RA esercita le sue diverse funzioni biologiche attivando gli eterodimeri formati da un recettore dell'acido retinoico e da un recettore dei retinoidi (RAR / RXR), che si legano a elementi RA-sensibili (RARE) nella regione regolatrice dei geni target.

In questo modo RA può regolare l'espressione di enzimi, proteine strutturali, neurotrasmettitori, neuropeptidi e fattori di crescita (Albalat, 2009).

RA è un morfogeno che agisce secondo un gradiente i cui livelli spazio-temporali richiesti sono mantenuti dai componenti della macchina metabolica di RA. Tra questi è compreso l'enzima di sintesi retinaldehyde dehydrogenase (Aldh1, in precedenza noto come Raldh) e l'enzima catabolico Cyp26 facente parte del citocromo P450 (Reijntjes et al., 2005). Tutti i componenti della via di segnalazione di RA sono stati descritti originariamente nei cordati ed è stato ipotizzato che l'invenzione del segnale di RA abbia segnato una tappa evolutiva fondamentale nella differenziazione del piano corporeo dei cordati (Fujiwara, 2006).

L'identificazione degli orologi dei maggiori componenti della via di segnale RA, come Aldh1a, CYP26 e RAR, in deuterostomi non cordati ha mostrato la possibilità che l'origine del meccanismo di sviluppo dipendente da RA non sia legata alla comparsa del piano corporeo dei cordati (Campo-Paysaa et al, 2008;. Canestro et al, 2006, Shubert et. al., 2006).

Inoltre, una ricerca su undici genomi di organismi non deuterostomi effettuata da Abalat e Cañestro (2009) ha rilevato la presenza di componenti chiave della via di segnale dell'RA nei protostomi, sia tra i Lofotrocozoa che tra gli Ecdisozoa.

Il genoma dell'antozoo *Nematostella vectensis* è stato analizzato per individuare gli elementi della via di segnale di RA, e ha rivelato la presenza di sequenze di tre presunti orologi di *Aldh1a/Aldh2* ma non di *CYP26* o di *RAR*.

Tuttavia, il campionamento è stato troppo ristretto per affermare che gli elementi genetici della via segnale RA non siano presenti negli cnidari.

Infatti, la presenza di elementi RXR in altri cnidari è ben documentata. Un recettore RXR simile che presenta una notevole somiglianza con il recettore RXR alfa di uomo ed è stato individuato nella cubomedusa *Tripedalia cystophora* (Kostrouch et al., 1998).

Presunti neuroni sensoriali e ganglionici sono stati rilevati tramite immunomarcatura con anticorpo anti-RXR, rispettivamente nelle colonie di polipi di *Renilla koellikeri* e nel corallo *Acropora millepora* (Bouzaïene et al., 2007).

Nei cordati, RA è noto per essere coinvolto nella determinazione degli assi e nella differenziazione neuronale. Nell'uomo e negli altri vertebrati, livelli alterati di RA durante lo sviluppo embrionale causano malformazioni congenite, difetti della vista e disturbi neurologici (Niederreither e Dolle, 2008; Summerbell e Harvey, 1983).

RA contribuisce a stabilire un codice di posizione morfogenetico tramite la regolazione dei geni *Hox* lungo l'asse antero-posteriore (AP), che coinvolge diverse strutture del corpo, tra cui il sistema nervoso centrale.

Inoltre, RA influenza la durata della vita dei neuroni nel midollo spinale e promuove la plasticità neurale (Misner et al., 2001). È stato proposto che la funzione antica di RA potrebbe essere legata alla differenziazione neurale e alla sopravvivenza cellulare (Dmetrichuk et al., 2006).

RA regola l'espressione di *Hox1* nell'epidermide degli embrioni di tunicato (Kanda et al., 2009) e stabilisce l'identità posizionale lungo l'asse AP negli embrioni di cefalocordato, regolando la trascrizione dei geni *Hox* (Koop et al 2010).

Tra i protostomi, nel mollusco *Lymnaea stagnalis*, basse concentrazioni di RA esogeno applicate durante la gastrulazione influenzano le divisioni cellulari (Créton et al., 1994).

In colture di neuroni isolati dalla stessa specie, il trattamento con RA induce la crescita dei neuriti, dimostrando un ruolo di RA nel regolare la differenziazione delle cellule neurali (Dmetrichuk et al., 2006).

In letteratura sono disponibili minori informazioni riguardo al ruolo dell'RA nei metazoi basali. Nelle spugne, che precedono l'emergenza del sistema nervoso, ma che hanno elementi pro-neurali nel loro genoma (Richards et al 2008), i trattamenti con RA causano la regressione dei tessuti (Wiens et al., 2003) e influenzano l'adesione cellulare modificando la matrice extracellulare (Imiecke et al., 1996).

Diversi studi hanno suggerito che l'RA ha un ruolo nello sviluppo neurale e nella rigenerazione degli cnidari. RA promuove la proliferazione cellulare e induce la differenziazione neurale in colture primarie di *Renilla koellikeri* (Estephane e Anctil, 2010).

I trattamenti con RA influenzano il processo di rigenerazione nei polipi dell'idrozoo *Hydractinia echinata*.

Per indagare ulteriormente il ruolo dell'RA come molecola segnale negli cnidari, abbiamo esposto embrioni di *Clava multicornis* (Cnidaria, Hydrozoa) a RA e a citrale, uno specifico inibitore del metabolismo dei retinoidi.

Il citrale,(3,7-dimetil-2 ,6-octadienal, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O),è un'aldeide altamente reattiva che può ridurre il livello endogeno di RA inibendo Aldh1 (Kikonyogo et al., 1999).

*Clava multicornis* è una specie progenetica, con colonie di polipi gonocorici. La larva planula rilasciata direttamente dalla colonia madre è caratterizzata da un'organizzazione neuroanatomica complessa (Piraino et al., 2011 e questa tesi).

Diversi neuropeptidi sono espressi in distinte sottopopolazioni di neuroni, distribuiti in determinati settori lungo l'asse antero-posteriore. I neuroni GLWamide-positivi formano una cupola anteriore, seguiti da una cintura ectodermica di cellule sensoriali RFamide positive (Piraino et al., 2011 e questa tesi).

Inoltre, le larve di *C. multicornis* hanno un sorprendente comportamento fototropico.

A differenza di molte larve planctoniche di cnidari, queste planule non nuotano, ma strisciano sul substrato attraverso una locomozione di tipo ciliare, abbinata alla flessione laterale alternata del polo anteriore.

Così, *C. multicornis* rappresenta un sistema utile per esplorare gli effetti dell'esposizione a RA sia sul sviluppo neurale sia sul comportamento fototropico.

## 5.3 Materiali e metodi

### 5.3.1 Trattamento di colonie di *Clava multicornis* con acido retinoico e citrale

Acido all-trans-retinoico (Sigma, Italy) e citrale (Sigma, Italy) sono stati diluiti in DMSO freschi per ottenere soluzioni stock di 0,1 mM e 1 mM. Dal momento che RA e citrale sono sensibili alla luce, tutte le soluzioni contenenti RA e citrale venivano tenute al buio, avvolte in fogli di alluminio.

Gli embrioni selezionati sono stati collocati in piccole piastre Petri di plastica (3 cm di diametro) contenente 3 ml di RA o citrale appena diluiti per le concentrazioni finali di 0,1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M in acqua di mare filtrata. Tali concentrazioni sono state utilizzate in esperimenti preliminari senza avere effetti letali. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte a date differenti e con differenti lotti. Gli animali sono stati tenuti in un incubatore a 16 °C al buio e le soluzioni venivano cambiate giornalmente. Gli embrioni hanno iniziato a schiudersi il 6° giorno seguente all'inizio del trattamento. Ogni giorno, larve si sono schiuse sono stati accuratamente raccolti, fissata per 1 ora a temperatura ambiente temperatura in paraformaldeide 4% in tampone fosfato salino (PBS) 0.1M, pH 7,2, disidratati tramite passaggi in soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo e conservati a 20 ° C in etanolo 70%. Alcune larve trattate per 6 giorni sono state utilizzate per prove di comportamento fototropico.

### 5.3.2 Immunoistochimica

La tecnica dell'immunomarcatura è stata utilizzata per evidenziare nelle planule i neuropeptidi RF-amide e GLWamide e per evidenziare la  $\beta$ Tubulina.

Gli animali prima di essere sottoposti a immunomarcatura hanno subito la fase di reidratazione e di permeabilizzazione. I campioni conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  sono stati trattati nel seguente modo:

- 2 lavaggi in etanolo al 50% e al 30% da 15 minuti.
- 3 lavaggi in PBT (PBS+0.25% Triton + 0.1 % Tween 10%) da 10 minuti.
- 1 lavaggio in PBT+NGS 10% (Normal Goat Serum , siero di capra) da 2h.

In seguito, i campioni sono stati incubati overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  con il primo anticorpo primario, precedentemente centrifugato per 3 minuti a 12000 giri al minuto.

Il giorno successivo l'eccesso di anticorpo primario è stato rimosso effettuando i seguenti lavaggi:

- 4 lavaggi di PBT da 10 minuti.
- 2 lavaggio di PBT da 30 minuti
- 1 lavaggio di PBT+NGS da 1ora

Quindi i campioni sono stati incubati overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  con il secondo anticorpo primario, precedentemente centrifugato per 3 minuti a 12000 giri al minuto.

Il giorno seguente i campioni sono trattati per allontanare l'eccesso di anticorpo primario e saturare altri siti con un diverso siero, nel seguente modo:

- 4 lavaggi di PBT da 10 minuti.
- 1 lavaggio di PBT da 30 minuti.
- 1 lavaggio di 1% BSA (albumina di siero bovino) in PBT da 1ora.
- 1 lavaggio di PBT da 10 minuti.

A questo punto i campioni sono incubati overnight con gli anticorpi secondari fluorescenti, diluiti in PBT+BSA.

- 1) Alexa Fluor 594 (rosso) anti-mouse per rilevare la tubulina acetilata.
- 2) Alexa Fluor 488 (verde) anti-rabbit, per rilevare la RFamide e Glwamide.

I campioni sono incubati a  $4^{\circ}\text{C}$  overnight.

Il giorno seguente sono stati eseguiti:

- 4 lavaggi in PBT da 10 minuti.
- 1 lavaggio in PBT+DAPI (per evidenziare i nuclei delle cellule) da 15 minuti.
- 1 lavaggio di PBS da 30 minuti.

I campioni sono stati montati su dei vetrini con 5 µl di DABCO+Mowiol, conservati a 4 °C al buio per non far decadere la fluorescenza. I campioni sono stati esaminati usando un microscopio laser confocale Leica TCS-NT (Leica Microsystem, Heidelberg, Germany).

## 5.4 Risultati

### 5.4.1 Effetti del trattamento con acido retinoico (RA)

Embrioni precoci di *Clava multicornis* (Fig. 1A), riconoscibili dalla forma rotonda e dalla naturale pigmentazione blu (Fig. 1B), sono stati trattati con RA  $10^{-7}$  M allo stadio di segmentazione. Le larve sviluppate da embrioni trattati presentano una normale morfologia esterna. La lunghezza e la forma del corpo delle larve trattate sono simili a quelle delle larve di controllo (Fig. 1 C, D). Tuttavia, come dimostrato dall'immunolocalizzazione di tubulina acetilata, l'esposizione ad RA colpisce in modo specifico lo sviluppo degli elementi nervosi delle larve. Le larve di controllo possiedono una concentrazione di fibre nervose all'estremità anteriore, che forma un plesso nervoso. Il plesso ha una struttura organizzata formata da fibre longitudinali e trasversali che si intersecano quasi ortogonalmente (Fig. 2 A, B). L'ectoderma anteriore è formato da cellule allungate, la cui lunghezza è circa il doppio di quella delle cellule laterali (Fig. 2 C). Le larve sviluppate da embrioni trattati con RA mostrano un sistema nervoso anomalo. Le fibre del plesso nervoso anteriore sono meno numerose rispetto a quelle delle larve di controllo e risultano disorganizzate (fig. 2 D). Sebbene le fibre longitudinali siano ancora riconoscibili, quelle trasversali anteriori sono fortemente ridotte o assenti (Fig. 2E). Inoltre lo spessore dell'ectoderma anteriore delle larve trattate è ridotto a livello di quello laterale, infatti le cellule che lo compongono non sono allungate come quelle delle larve di controllo (Fig. 2 F).

Anche la disposizione e il numero delle cellule contenenti neuropeptidi sono alterati in seguito all'esposizione a RA. Nelle larve di controllo, le cellule GLWamide positive sono concentrate all'estremità anteriore, dove formano una cupola (fig. 3 A). Queste cellule possiedono una forma fusiforme allungata (Fig. 3 B). Inoltre cellule GLWamide positive sono associate a fibre che corrono lungo l'asse principale della planula (Fig. 3 A). Nelle larve sviluppate da embrioni esposti all'azione di RA, la cupola di cellule GLW-positivo appare ridotta, le fibre trasversali del plesso neurale sono meno abbondanti, mentre le fibre longitudinali sembrano presentare uno sviluppo normale (fig. 3 C, D). Abbiamo valutato il numero di neuroni GLWamide positivi nelle larve controllo e nelle larve trattate. Dopo

l'esposizione a RA, il numero di cellule che mostrano un segnale positivo per GLWamide è risultato significativamente ridotto rispetto ai controlli (Tukey's post-hoc test =  $P < 0.0001$ ) (Fig. 4).

Le larve di controllo possiedono una popolazione distinta di cellule RF-positive per lo più disposte a formare una cintura appena posteriore alle cellule GLW-positive, con pochi neuroni sensoriali situati nell'ectoderma più anteriore (Fig. 5 A, E). Numerose fibre trasversali RF-positive contribuiscono a formare il plesso nervoso anteriore e alcune fibre decorrono lungo l'intera lunghezza della larva (fig. 5 A, E). Dopo l'esposizione degli embrioni a RA, i corpi cellulari RF-positivi non sono confinati in una stretta fascia, ma sono diffusi posteriormente in una regione più ampia, fino a metà del corpo larvale (Fig. 5 B, C, E, F). Quindi il trattamento con RA ha alterato l'organizzazione spaziale dei neuroni RFamide positivi. Inoltre, anche il numero di cellule RFamide positive è risultato significativamente ridotto nelle larve trattate con RA (Tukey post-hoc test =  $P < 0,0001$ ) (Fig. 4).

#### **5.4.2 Effetti del trattamento con citrale**

Embrioni di *C. multicornis* sono stati trattati con citrale al fine di prevenire la sintesi di RA e di osservare gli effetti di una carenza di RA endogeno sullo sviluppo di questo cnidario. Le larve trattate con citrale sono meno allungate rispetto a quelle di controllo (Fig. 1 E) e risultano quasi incapaci di muoversi. Non possiamo escludere effetti aspecifici del citrale sulle cellule mioepiteliali della larva come possibile causa della incapacità dei campioni trattati di muoversi. Nonostante la loro mancanza di motilità, le larve sono rimaste vitali per diversi giorni. Le analisi immunostochimiche hanno mostrato che le larve trattate con citrale hanno una riduzione delle cellule GLWamide-positive (Fig. 6 B, C) e RFamide positive (Fig. 6 E, F) rispetto alle larve di controllo (Fig. 6 A, D). Il numero di cellule GLWamide e RFamide positive è significativamente diverso da quello delle larve controllo (post-hoc di Tukey test =  $P < 0,0001$  in entrambi i casi) (Fig. 4). Inoltre, tutte le cellule GLWamide e RFamide positive sono morfologicamente diverse dai controlli. La loro lunghezza è minore, la forma è arrotondata o piramidale, simile alle cellule nervose gangliari che popolano la metà posteriore della planula controllo. Inoltre, le fibre longitudinali sono quasi assenti nelle larve trattate.

#### **5.4.3 Effetti dei trattamenti con RA sul comportamento fototropico**

In contrasto con la maggior parte delle planule queste larve non nuotano nella colonna d'acqua. Le planule di *C. multicornis* dimostrano invece un perfetto movimento strisciante sul benthos

(alghe, fondo roccioso), durante la ricerca di un sito idoneo per l'insediamento, dove entro pochi giorni fisseranno l'estremità anteriore e svilupperanno polipi primari. Per caratterizzare in dettaglio questo comportamento motorio, sono stati registrati i movimenti di 50 planule poste in piastre Petri il cui fondo era ricoperto da una griglia 0,5 mm. Le planule presentano una marcata fototassi positiva (Fig. 7). Il movimento orientato anteriormente delle planule è basato su attività ciliare ed è costantemente accompagnato da movimenti alternati di flessione laterale lungo l'asse principale del corpo a causa di contrazioni coordinate delle cellule mioepiteliali (Fig. 7).

Larve di controllo posizionate nella cella per il test possiedono una marcata fototassi positiva. Infatti le planule si spostano in avanti in direzione della luce, come è chiaramente dimostrato dalle posizioni delle larve registrate ogni 30 secondi dall'inizio della prova (Fig. 8 AC). Le larve si muovono ad una velocità di  $1,24 \pm 0,31$  mm/30 sec, scivolando sopra il substrato con un movimento ciliare e piegando l'estremità anteriore lateralmente con un tipico comportamento esplorativo.

Le larve sviluppate da embrioni trattati con RA non presentavano il tipico fototropismo; quando sono posizionate nella cella per il test, tutte le larve trattate si muovono a caso, spesso con percorsi circolari (Fig. 8 DF). Esse sono in grado di muoversi e progredire alla stessa velocità delle larve di controllo. In effetti la distanza media coperta da animali trattati con RA in 30 secondi era di  $1,16 \pm 0,39$  mm e non era significativamente diversa da quella delle larve di controllo (ANOVA:  $F_{47, 1} = 0,663$ ,  $p = 0,420$ ). È stata anche misurata la distanza tra il punto più lontano e quello più vicino alla fonte di luce in cui è giunta la larva durante un periodo di osservazione di 4 minuti. Il valore medio di questa distanza è stato  $8,54 \pm 1,31$  millimetri per le larve di controllo e  $3,15 \pm 0,75$  mm per le larve trattate con RA. I valori sono significativamente differenti (ANOVA:  $F_{5, 1} = 38,082$   $P = 0,004$ ). Questi dati indicano che le larve trattate con RA seguono percorsi circolari, ciò suggerisce che hanno perso la percezione di stimoli luminosi o, almeno, la possibilità di coordinare i movimenti necessari allo spostamento in avanti.

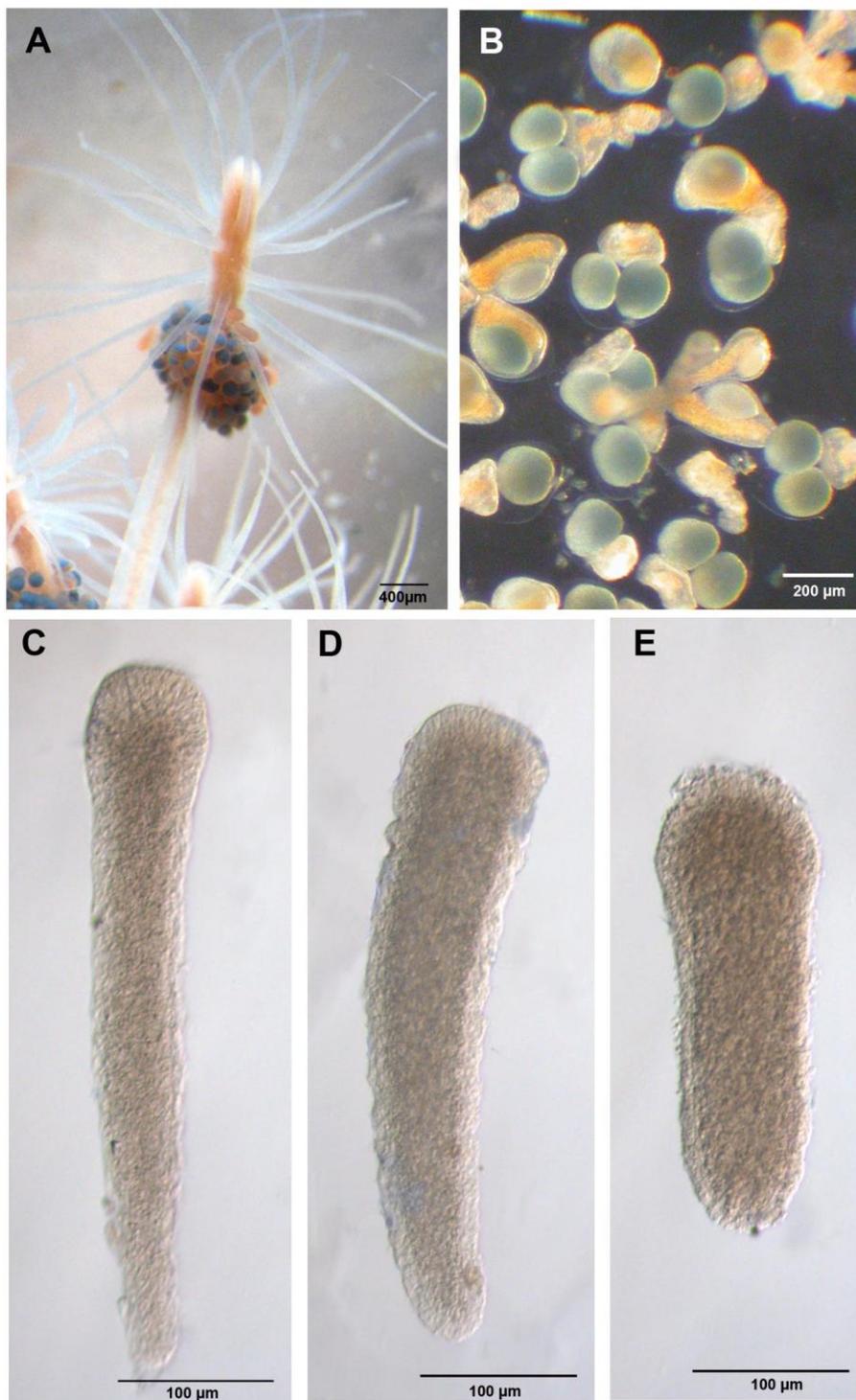


Fig. 1. A: Polipo femmina di *Clava multicornis* con embrioni a differenti stadi di sviluppo. B: gli embrioni staccati dal gonoforo, chiaramente distinguibili dalla loro forma arrotondata e colore blu. C: larva di controllo che mostra la tipica forma del corpo, caratterizzata da un polo anteriore allungato e arrotondato ed un polo posteriore più sottile. D: Larva sviluppata da un embrione trattato con RA 0,1 mM. La morfologia è paragonabile a quella della larva di controllo. E: Larva sviluppata da un embrione trattato con citrale 10µM. La larva appare accorciata lungo la A-P asse. Tutte le larve sono orientati con l'estremità anteriore verso l'alto.

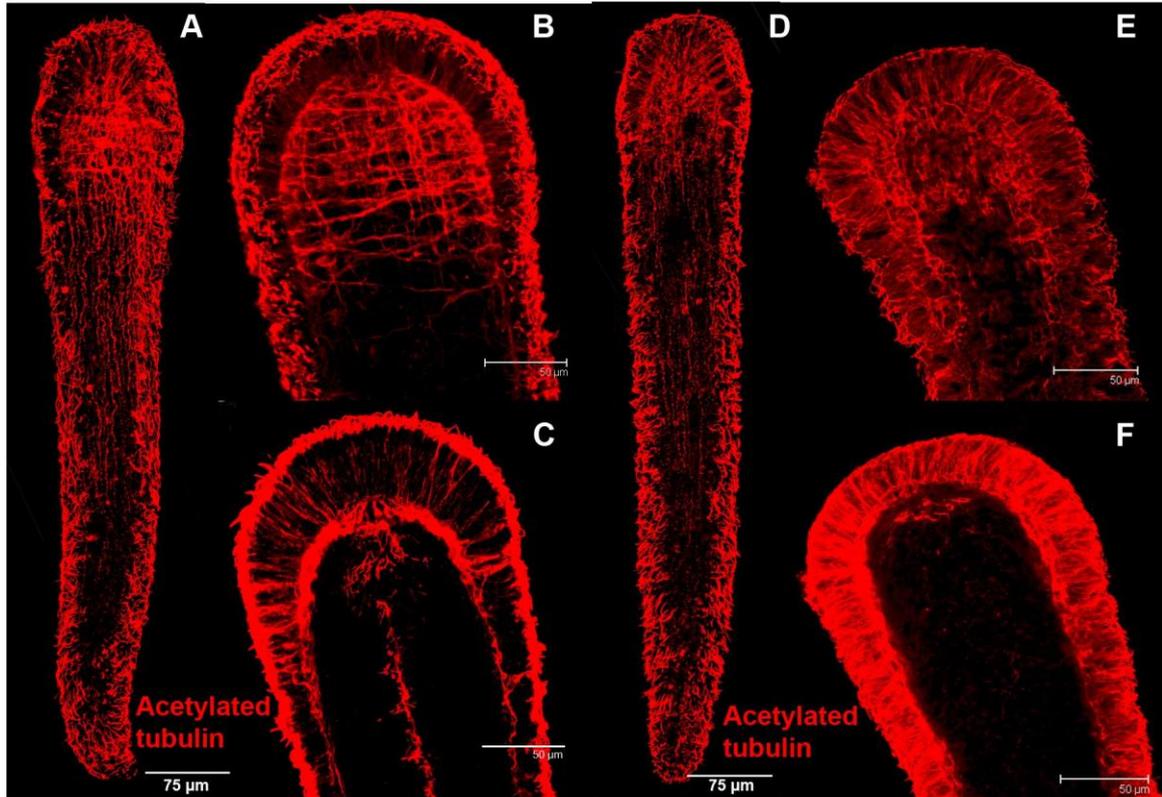


Fig. 2. Immunolocalizzazione di tubulina acetilata in larve controllo (A, B, C) e larve trattate con RA (D, E, F). A: Campione in cui è evidente la maggiore concentrazione di fibre nervose al polo anteriore (plesso nervoso) e fibre longitudinali. B: Ingrandimento dell'estremità anteriore che descrive la disposizione regolare delle fibre nervose longitudinalmente e trasversalmente. C: Somma di 6 sezioni ottiche della regione centrale della larva centrale, in cui le cellule allungate dell'ectoderma anteriori sono chiaramente visibili. D: Larva trattata con RA con una riduzione del plesso nervoso anteriore. E: ingrandimento dell'estremità anteriore di una larva trattata in cui la disorganizzazione delle fibre del plesso nervoso è evidente. F: Somma di 6 sezioni ottiche centrali in cui è evidente l'uniforme distribuzione delle cellule ectodermiche anteriori. Tutte le larve sono orientate con l'estremità anteriore verso l'alto.

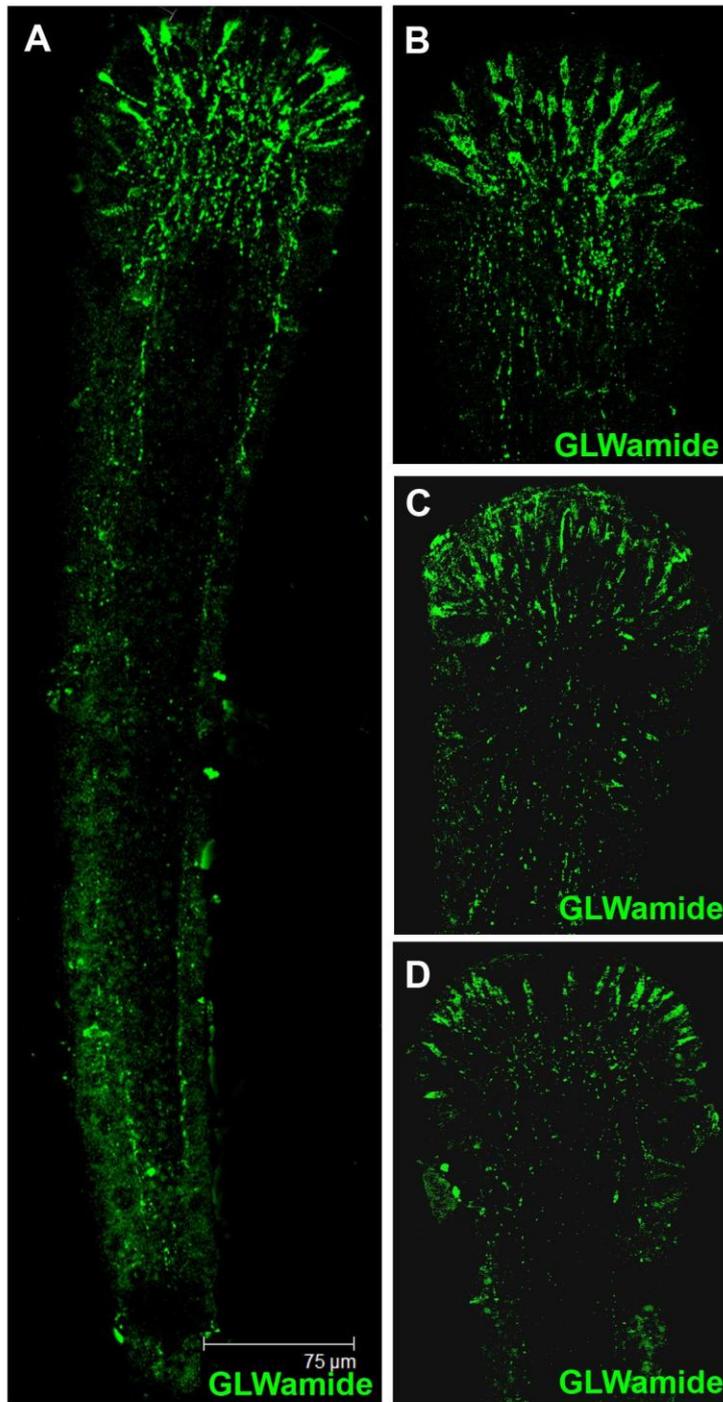


Fig. 3. Immunolocalizzazione GLWamide nelle larve controllo (A, B) e trattate con RA (C, D). A: Larva in cui sono presenti fibre GLWamide-IR che decorrono lungo tutto il corpo ed una concentrazione di elementi nervosi immunoreattivi al polo anteriore. B,D : Estremità anteriore della larva. Tutte le larve sono orientate con l'estremità anteriore verso l'alto.

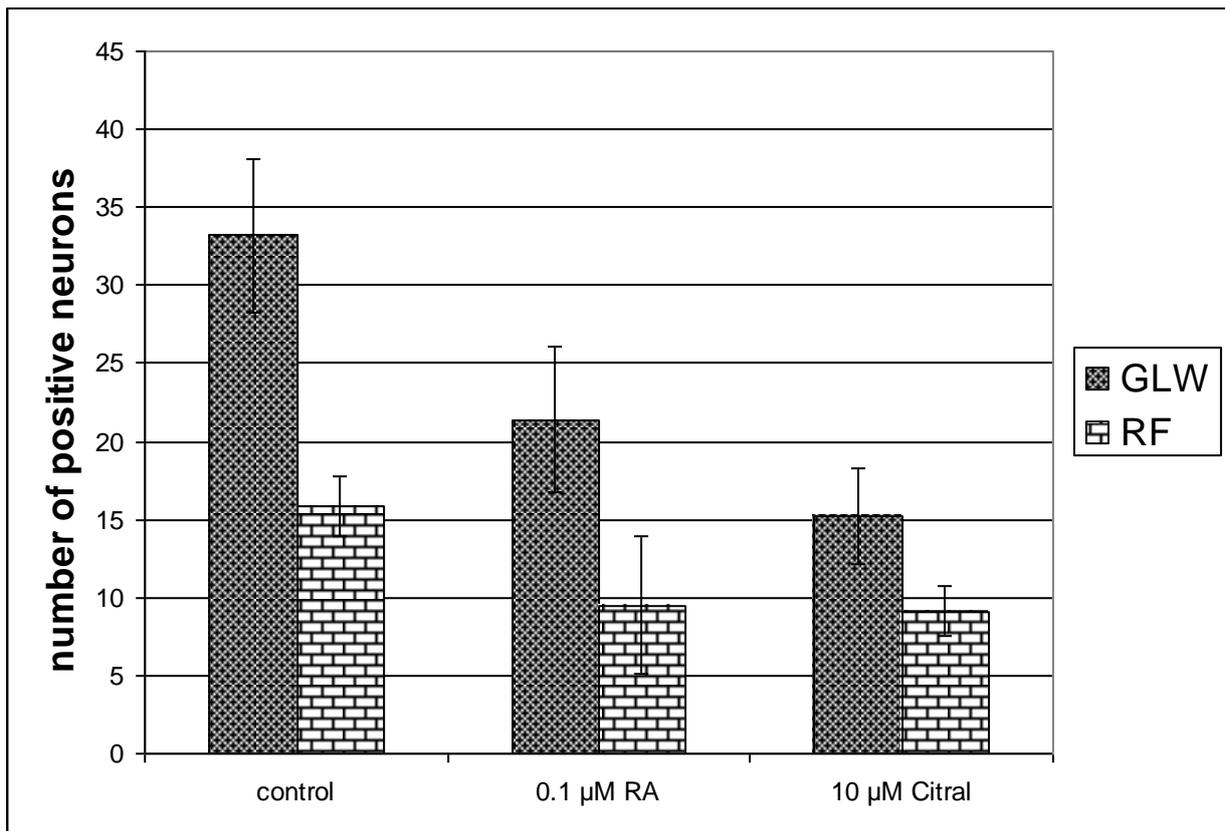


Fig. 4. Il grafico riporta il numero di neuroni positivi GLWamide (GLW) e RFamide (RF) in larve controllo e trattate con RA e citrale. I dati sono significativamente diversi.

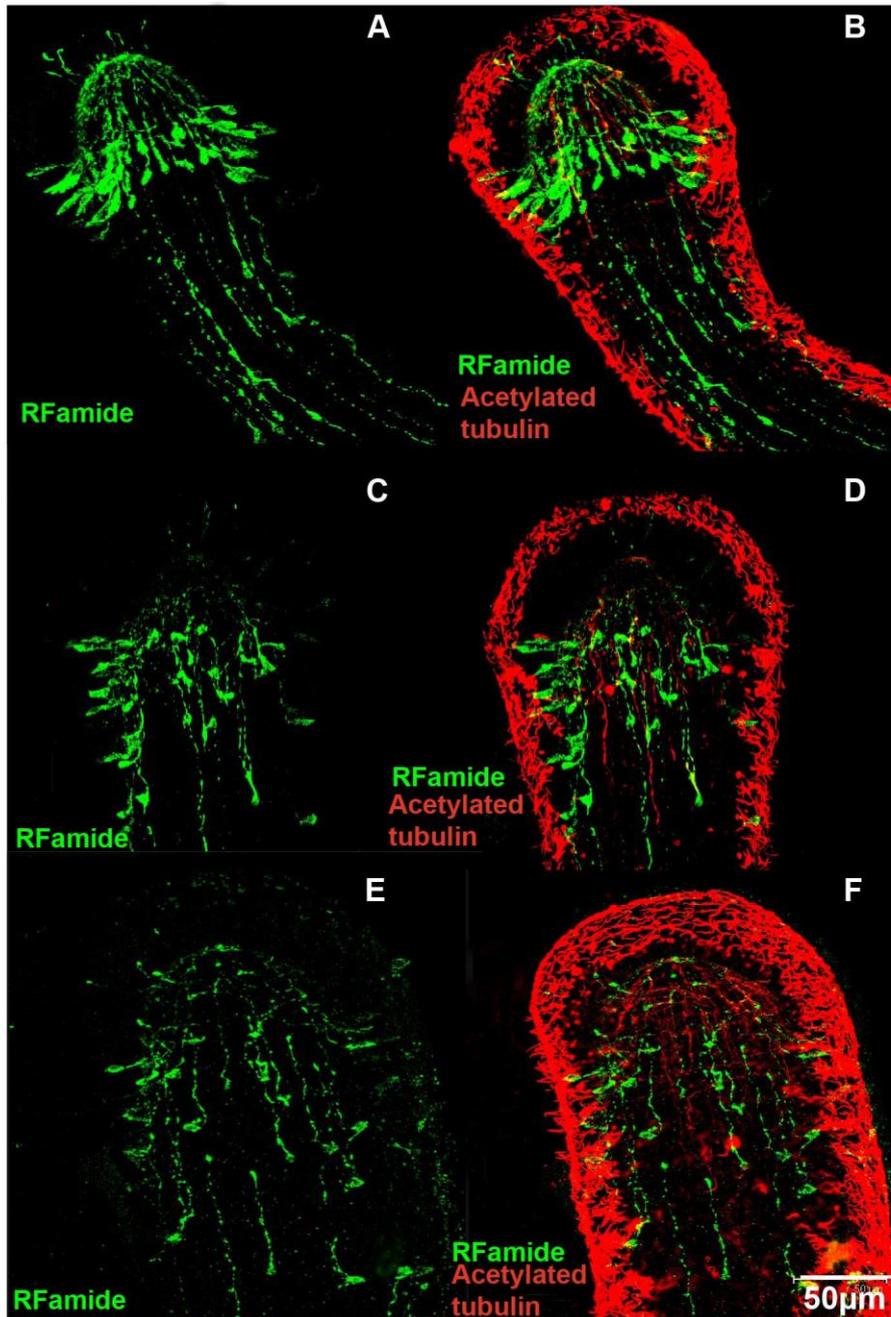


Fig. 5. Immunolocalizzazione RFamide. A, B: larva di controllo: Gli elementi RFamide-IR sono concentrati in una cintura circolare. Alcuni elementi sono inoltre proiettati anteriormente. B-E: Larve sviluppate da embrioni esposti a RA. In tutte le larve trattate, la cintura RFamide-IR scompare ed i neuroni sono spostati posteriormente lungo l'asse AP. B, D, F: L'immunolocalizzazione di tubulina acetilata è sovrapposta al segnale FITC dell'RFamide al fine di comprendere meglio la localizzazione di RFamide. Tutte le larve sono orientate verso con l'estremità anteriore l'alto.

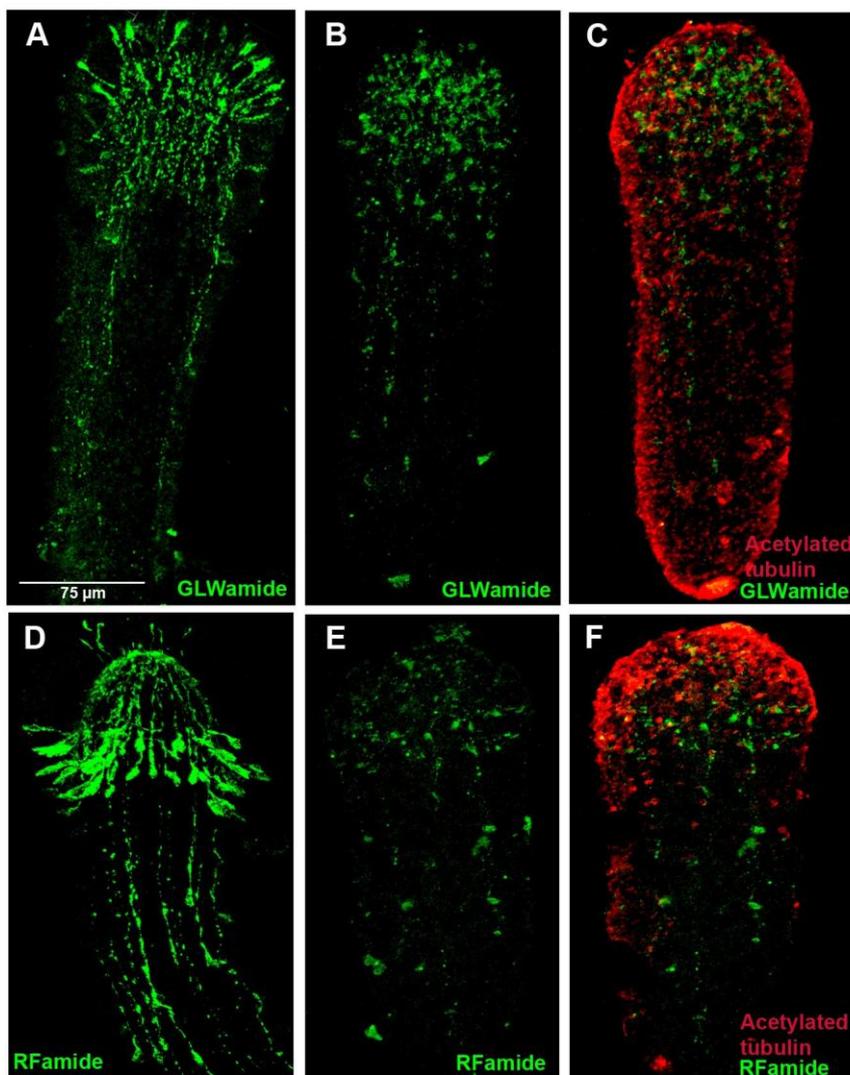


Fig. 6. Immunolocalizzazione GLWamide (AC) e RFamide (DF) in controllo (A, D) e larve trattate con citrale(B, C, E, F). C, F: L'immunolocalizzazione della tubulina acetilata TRITC si sovrappone al segnale FITC dei neuropeptidi al fine di comprendere meglio la morfologia larvale.



Fig. 7. Comportamento fototropico e locomotorio di un planula. La larva dimostra una fototassi positiva mentre striscia sul substrato alternando piegamenti a destra e a sinistra lungo l'asse corporeo principale AP 172x12mm

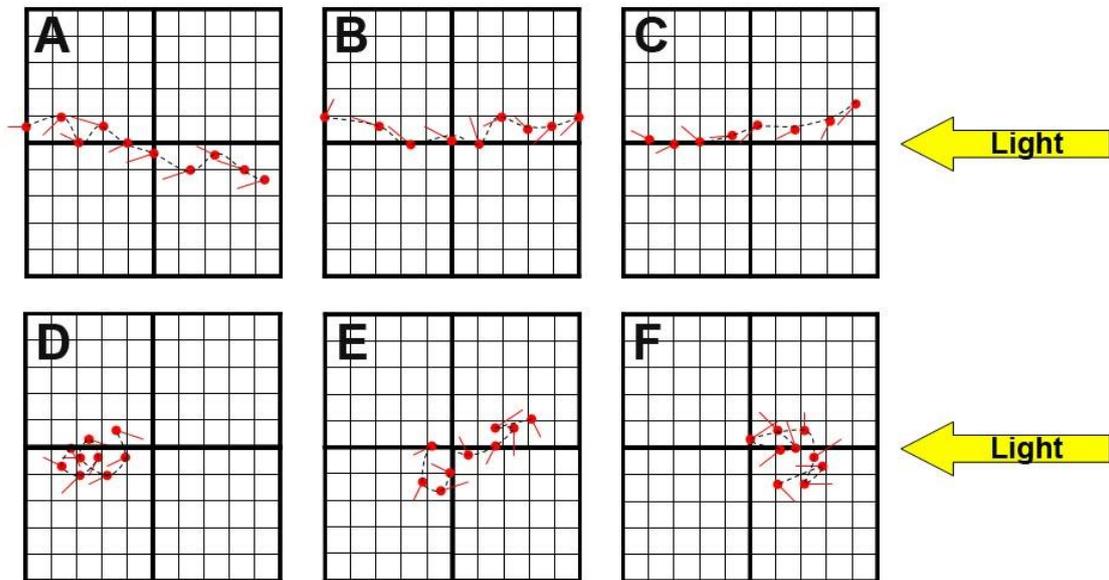


Fig. 8. Griglie che indicano le posizioni delle larve ogni 30 secondi all'interno della camera per testare il comportamento fototropico. AC: La larva di controllo presenta un comportamento locomotorio di tipo fototropico. DE: larve trattate con RA si spostano a caso seguendo percorsi circolari. La posizione relativa della coda è indicata da una barra.

## 5.5 Discussione

L'acido retinoico (RA) è un morfogeno noto per essere coinvolto nella regolazione di molti processi durante lo sviluppo dei cordati. Recentemente, prove sperimentali anche in invertebrati, deuterostomi e prolostomi, indicano in maniera convincente che l'origine evolutiva della via di segnale di RA nello sviluppo, con un ruolo chiave nella differenziazione neuronale, sia molto antica e che si sia conservata nei principali gruppi di metazoi.

Gli cnidari sono considerati il più basale gruppo di eumetazoi con un sistema nervoso riconoscibile.

È stato interessante quindi valutare il ruolo dell'RA nello sviluppo degli cnidari utilizzando come modello sperimentale *Clava multicornis*. I risultati dimostrano chiaramente che le perturbazioni della via di segnale di RA con trattamenti con RA e citrale alterano lo sviluppo del sistema nervoso delle larve planule.

I trattamenti con RA alterano il differenziamento e la posizione dei neuroni GLWamide e RFamide positivi lungo l'asse antero-posteriore. I neuroni GLWamide-positivi diminuiscono in numero. Inoltre i neuroni RFamide positivi, disposti in una stretta fascia nella porzione anteriore della planula, vengono ridotti in numero e dislocati in una regione più vasta nelle larve trattate.

Così, l'esposizione prolungata a RA da un lato sembra prevenire il completo differenziamento in neuroni GLWamide-positivi delle cellule sensoriali più anteriori, dall'altro il differenziamento delle cellule RFamide-positive si verifica con una disposizione disordinata, non clusterizzata, determinando una dislocazione spaziale delle cellule stesse. Si può ipotizzare che RA abbia causato una modificazione della informazione posizionale durante il processo di differenziazione delle cellule nervose.

Infatti, gli effetti dell'RA sullo sviluppo del sistema nervoso delle larve di *C. multicornis* ricorda molto gli effetti causati nei vertebrati e nei protocordati. Nei vertebrati, il segnale mediato dai retinoidi è necessario per la corretta attivazione dei geni marker di posizione e per la corretta differenziazione cellulare lungo l'asse AP, limitando l'espressione dei geni posteriori, come il gene neurale *Hoxb 1b* in zebrafish (Kudoh et al., 2002), o influenzando la polarità rostro-caudale delle strutture sensoriali (Bok et al., 2011).

È noto che l'acido retinoico influenza la differenziazione dipendente dalla posizione dei neuroni sensoriali epidermici durante lo sviluppo dei protocordati, attraverso la regolazione di specifici fattori di trascrizione, come i geni *Hox* e *Pax* (Holland e Holland, 1996; Schubert et al., 2004; Schubert et al., 2006). Per verificare l'ipotesi che RA alteri l'informazione posizionale negli cnidari, sono necessari ulteriori analisi sul pattern d'espressione di geni regolatori e ulteriori studi sul cambiamento del destino cellulare lungo l'asse A-P.

E' stato proposto che la funzione ancestrale della via di segnale di RA fosse collegata al differenziamento neurale ed alla sopravvivenza cellulare (Dmetrichuk et al 2006).

Negli cnidari è ancora da chiarire il meccanismo che controlla la determinazione della posizione degli elementi del sistema nervoso lungo l'asse anteroposteriore (oro-aborale).

In *Hydra* una concentrazione soglia di "head activator", un peptide diffusibile con funzione di morfogeno, crea l'ambiente molecolare adatto a stabilire la posizione dei neuroni FMRFamide-positivi (Bode, 1992).

La differenziazione della "testa" richiede un segnale prodotto e secreto dalle cellule dell'ectoderma anteriore, che si diffonde lungo la colonna formando un gradiente di concentrazione. L'azione dell'RA si basa su un gradiente di concentrazione. Sarebbe interessante indagare se "head activator" è presente anche in *C. multicornis* e se può essere influenzato da RA. Recentemente, Estephane e Anctil (2010) hanno fornito prove dell'influenza di RA sulla

proliferazione cellulare e la differenziazione dei neuriti in colture cellulari primarie dello cnidario *Renilla koellikeri*. I dati presentati in questo lavoro confermano questi risultati, riportando per la prima volta gli effetti di RA sui processi di sviluppo embrionale e sull'organizzazione neuroanatomica degli cnidari.

In ogni caso, negli cnidari deve essere ancora dimostrata la presenza dei componenti principali della via di segnale classica di RA (recettori RAR e ALDH1A). Quindi, non possiamo escludere la possibilità che l'azione di RA possa alterare lo sviluppo degli cnidari tramite una modalità alternativa indipendente da RAR. In realtà, è stato dimostrato che un'alterazione dovuta a RA, indipendente dalla via classica, può verificarsi anche nei cordati come negli urocordati larvacei (Canestro et al., 2007). Inoltre, nei vertebrati RA può esercitare diversi effetti fisiologici indipendentemente da RAR tramite il legame diretto ad altre proteine, come la proteina chinasi C alpha (PRKCA), un enzima coinvolto nella crescita cellulare, nella differenziazione e nell'apoptosi (Ochoa et al., 2003).

I nostri risultati suggeriscono una origine evolutiva precoce della via di segnale di RA nei metazoi, sottolineando uno antico ruolo morfogenetico di RA attraverso diversi meccanismi chiave dello sviluppo.

Le larve sviluppate da embrioni trattati con citrale sono più corte di quelle controllo; sono vitali, ma incapaci di muoversi. Queste larve presentano una popolazione ridotta di cellule GLWamide- e RFamide positive. Tutte le cellule peptidergiche sono ridotte in lunghezza e in numero. Non sono osservabili effetti sulla determinazione della posizione ma non si può escludere la possibilità che la dose di citrale utilizzata sia insufficiente per causare un effetto. E' possibile che il livello di RA si sia stato solo leggermente abbassato. In ogni caso, questi risultati suggeriscono che il livello corretto di RA è necessario a completare la differenziazione e la crescita dei neuriti durante lo sviluppo di *C. multicornis*.

Infine, le larve sviluppate da embrioni trattati con RA hanno perso la capacità di rispondere agli stimoli luminosi. Infatti le larve trattate si spostano casualmente nella cella di test, spesso con percorsi circolari, mentre le larve di controllo hanno un sorprendente comportamento fototropico positivo (Piraino et al., 2011).

Si può ipotizzare che i trattamenti con RA abbiano causato un ritardo nello sviluppo, come già riportato in altri animali modello e che il comportamento fototropico non fosse ancora del tutto acquisito quando è stato eseguito il test. Tuttavia, è più probabile che il comportamento anomalo osservato nelle larve trattate abbia un'origine neurologica, a causa delle gravi modificazioni neuroanatomiche osservate nelle larve trattate con RA. È necessario verificare se i movimenti casuali siano dovuti ad un alterato coordinamento dell'attività locomotoria o a difetti negli

elementi fotorecettori. Infatti, è noto che l'RA può influenzare lo sviluppo degli occhi, sia nei mammiferi (Matt et al 2005; Maden et al., 2007; Cvekl e Wang, 2009; Duester, 2008, 2009) che negli invertebrati (Albalat et al., 2009).

Il pronunciato comportamento fototattico positivo delle planule di *C. multicornis*, suggerisce che almeno alcune delle cellule sensoriali presenti nel polo anteriore possano essere dei fotorecettori (Piraino et al., 2011). In particolare, le cellule RFamide-immunoreattive potrebbero essere coinvolte nel rilevamento della luce (Plickert e Schneider, 2004). Martin (2002) ha suggerito un'interazione tra opsine ed i peptidi RFamide nei fotorecettori dei Cubozoa, e questo è confermato nelle meduse dell'idrozoa *Cladonema radiatum* dove i peptidi RFamide si colocalizzano nelle cellule ectodermiche che esprimono l'opsina CropJ (Suga et al., 2008). Negli ultimi anni sono state effettuate delle indagini sulle opsine degli cnidari per confermare l'ipotesi della monofilia dello sviluppo dell'occhio, per trovare il meccanismo del comportamento fototropico negli cnidari, e infine per far luce sull'evoluzione dei due tipi di fotorecettori animali (fotorecettori ciliari e rbdomerici). E' stato individuato un gran numero di geni codificanti per l'opsina tramite il sequenziamento del genoma dei tre principali modelli di cnidari, *Nematostella vectensis* (Putnam et al. 2007), *Hydra magnipapillata* (Chapman et al., 2010), e recentemente in *Acropora digitifera* (Shinzato et al., 2011). Ulteriori informazioni derivano da un'approccio molecolare su *C. radiatum* (Suga et al. 2008). La filogenesi molecolare ha rivelato che 20 opsine di idrozoi, le opsine di *Hydra* ed alcune di *Nematostella*, sono maggiormente correlate alle c-opsine rispetto a qualunque altra principale sottofamiglia di opsine, indicando che la divergenza tra c- ed r-opsine sia precedente alla separazione Cnidaria- Bilateria (Suga et al., 2008).

Tuttavia, mentre le planule di *C. multicornis* possono chiaramente percepire la luce, devono ancora essere identificati i loro elementi fotosensibili. Pertanto, sono necessarie ulteriori indagini per accertare se l'RA alteri selettivamente le cellule visive o meno. Ad oggi, il comportamento fototropico alterato può essere molto probabilmente attribuito ad un difetto neurologico generale del sistema nervoso causato dal trattamento della planula con RA esogeno.

## 5.6 Bibliografia

Albalat, R., 2009. The retinoic acid machinery in invertebrates: Ancestral elements and vertebrate innovations. *Mol. Cell. Endocrin.* 313: 23-35.

Abalat, R. & Cañestro, C. 2009. Identification of Aldh1a, Cyp26 and RAR orthologs in protostomes pushes back the retinoic acid genetic machinery in evolutionary time to the bilaterian ancestor. *Chem. Biol. Interact.* 178: 188-196.

Bodenmüller H. & Schaller H.C. 1981. Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. *Nature.* 293: 579–580.

Bok, J. Raft S., Kong, K. Kyung Koo S., Dräger U.C. & D. K. Wu. Transient retinoic acid signaling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. *PNAS* 108: 161-166.

Bouzaiene M., Angers A. & M. Anctil, 2007. Immunohistochemical localization of a retinoic acidlike receptor in nerve cells of two colonial anthozoans (Cnidaria), *Tissue Cell* 39: 123–130.

Cañestro C. & J. H. Postlethwait, 2007. Development of a chordate anterior–posterior axis without classical retinoic acid signaling. *Dev. Biol.* 305: 522–538.

Campo-Paysaa et al., 2008 F. Campo-Paysaa, F. Marlétaz, V. Laudet and M. Schubert. Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. *Genesis* 46: 640–656.

Chapman J.A. et al., 2010. The dynamic genome of Hydra. *Nature* 464: 592-596.

Creton, R., Zwaan G. & R. Dohmen, 1993. Specific developmental defects in molluscs treated with retinoic acid during gastrulation. *Dev. Growth & Differ* 25: 357-364.

R., Zwaan G. & R. Dohmen, 1994. Retinoic acid modulates the pattern of cell division in embryos of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca). *Dev. Genes Evol.* 204 : 70-74.

Cvekland A. & W. Wang, 2009. Retinoic acid signaling in mammalian eye development. *Exp. Eye Res.* 89: 280-291.

Dmetrichuk J.M., Carlone R.L. & G.E. Spencer, 2006. Retinoic acid induces neurite outgrowth and growth cone turning in invertebrate neurons. *Dev. Biol.* 294: 39–49.

Duester G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134(6): 921–931.

Duester G., 2009. Keeping an eye on retinoic acid signaling during eye development. *Chem. Biol. Interact.* 178:178-81.

Escriva, H., Delaunay, F. & V. Laudet, 2000. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22: 717-727.

Estephane D. and M. Anctil, 2010. Retinoic acid and nitric oxide promote cell proliferation and differentially induce neuronal differentiation *in vitro* in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *Dev. Neurobiol.* 70: 842–852.

Fujiwara, S., 2006. Retinoids and nonvertebrate chordate development. *J. Neurobiol* 66: 645-652.

Holland, L.Z. & N.D. Holland, 1996. Expression of *AmphiHox-1* and *AmphiPax-1* in amphioxus embryos treated with retinoic acid: Insights into evolution and patterning of the chordate nerve cord and pharynx. *Development* 122 : 1829-1838.

Imiecke, G. Borojevic, R. Custodio, M, Muller, W.E.G., 1996. Retinoic acid acts as morphogen in freshwater sponges. *Invert. Reprod. Dev.* 26: 89-98.

- Kanda M, Wada H. & S.Fujiwara, 2009. Epidermal expression of Hox1 is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev Biol.* 335: 454-63.
- Kikonyogo A., Abriola D. P., Dryjanski M. & R.Pietruszko , 1999. Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist. *Eur. J. Biochem.* 262: 704-712.
- Koop D., Holland N.D., Sémon M., Alvarez S., de Lera A.R., Laudet V., Holland L.Z. & M. Schubert, 2010. Retinoic acid signaling targets Hox genes during the amphioxus gastrula stage: insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan. *Dev. Biol.* 338: 98-106.
- Kostrouch, Z., Kostrouchova M., Love W., Jannini E., Piatigorsky J. & J. E. Rall, 1998. Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13442-13447.
- Maden M., 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 755–765.
- Maden M., Blentic A., Reijntjes S., Seguin S., Gale E. & A.Graham, 2007. Retinoic acid is required for specification of the ventral eye field and for Rathke's pouch in the avian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 51: 191-200.
- Martin V.J., 2002. Photoreceptors of cnidarians. *Can. J. Zool.* 80: 1703–1722
- Matt N., Dupé V., Garnier J.M., Dennefeld C., Chambon P., Mark M. & N.B. Ghyselinck, 2005. Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 132: 4789-4800.
- Misner D.L., Jacobs S., Shimizu Y., de Urquiza A.M., Solomin L., Perlman T., De Luca L.M., Stevens C.F. & R.M. Evans, 2001. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:11714–11719.

Molotkov A., Molotkova N. & G.Duester, 2006. Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Development* 133: 1901-1910.

Müller WA, 1984. Retinoids and pattern formation in a hydroid. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 81: 253–271.

Niederreither K. & P. Dollé, 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat. Rev. Genet.* 9: 541-553.

Plickert G, Schneider B. 2004. Neuropeptides and photic behavior in Cnidaria. *Hydrobiologia* 530:49–57.

Piraino S., Zega G., Di Benedetto C., Leone A., Dell’Anna A., Pennati R., Candia Carnevali D., Schmid V. & H. Reichert, 2011. Complex Neural Architecture in the Diploblastic Larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Comp. Neurol.* 519:1931–1951

Putnam, N. H. et al, 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 317, 86–94.

Ochoa W.F., Torrecillas A., Fita I., Verdaguer N., Corbalan-Garcia S., Gomez-Fernandez J.C., 2003. Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C (alpha). *Biochemistry* 42, 8774–8779.

Onai T., Lin H.C., Schubert M., Koop D., Osborne P.W., Alvarez S., Alvarez R., Holland N.D. & L.Z. Holland, 2009. Retinoic acid and Wnt/beta-catenin have complementary roles in anterior/posterior patterning embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev. Biol.* 332: 223-33.

Reijntjes S., Blentic A., Gale E. & M. Maden., 2005. The control of morphogen signaling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev. Biol.* 285: 224-237.

Richards G.S., Simionato E., Perron M., Adamska M., Vervoort M. & B.M. Degnan, 2008.  
Sponge

Genes Provide New Insight into the Evolutionary Origin of the Neurogenic Circuit. *Curr Biol* 18:  
1156-1161.

Schubert M., Holland N.D., Laudet V. & L.Z. Holland, 2006. A retinoic acid-*Hox* hierarchy  
controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central  
nervous system of the cephalochordate amphioxus. *Dev. Biol.* 296: 190–202.

Shinzato C., et al. 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to  
environmental change. *Nature* 476: 320–323

Suga H., Schmid V., Gehring W.J., 2008. Evolution and functional diversity of jellyfish opsins.  
*Curr. Biol.* 18:51-5

Summerbell, D. & F. Harvey, 1983. Vitamin A and the control of pattern in developing limbs.  
*Prog.*

*Clin. Biol. Res.* 110: 109 -118

## **6 Influenza dell'acido retinoico nei processi rigenerativi delle colonne gastriche di *Clava multicornis***

### **6.1 Riassunto**

Gli cnidari sono tra le più semplici forme di vita tra i metazoi e si sono evoluti circa 700 milioni di anni fa. La capacità rigenerativa degli cnidari è notevole. Il polipo di acqua dolce, *Hydra*, un membro del phylum Cnidaria, è famoso per la sua capacità rigenerativa.

L'acido retinoico (RA) gioca un ruolo importante durante lo sviluppo dei cordati, in particolare nella formazione degli arti e dell'asse antero-posteriore. L'effetto del trattamento con RA esogeno è stato studiato durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati. Inoltre, studi recenti hanno rivelato la presenza dei maggiori componenti della via di segnale di RA nei genomi di alcuni invertebrati. In *Hydra magnipapillata* basse dosi di RA aumentano il potere rigenerante della testa, mentre dosi medie aumentano il numero di tentacoli.

In questo lavoro invece sono stati analizzati i processi rigenerativi di colonne gastriche dell'idrozoo *Clava multicornis*, trattando quest'ultime con concentrazioni crescenti di RA al fine di valutarne gli effetti. Concentrazioni di RA  $10^{-7}$  M non hanno un effetto notevole sulla rigenerazione delle porzioni amputate dal polipo, infatti si nota una tipologia di elementi rigenerati simili al controllo. L'RA  $10^{-6}$  M comporta la prevalente rigenerazione degli stoloni.

### **6.2 Introduzione**

Gli cnidari sono tra le più semplici forme di vita tra i metazoi e si sono evoluti circa 700 milioni di anni fa (Bridge et al., 1995; Conway Morris, 2000; Nielsen, 2001; Petersen e Eernisse, 2001). Sono costituiti da due strati, l'ectoderma esterno e uno interno, l'endoderma, separati da una matrice extracellulare (mesoglea), e rappresentano i primi animali con un asse corporeo definito e un sistema nervoso. La capacità rigenerativa degli cnidari è notevole. Il polipo di acqua dolce, *Hydra*, un membro del phylum Cnidaria, è famoso per la sua capacità rigenerativa. In *Hydra* i polipi possono essere dissociati in singole cellule in grado di rigenerarsi come riaggregati in un animale intero nell'arco di pochi giorni. La rigenerazione degli cnidari avviene per morfallassi, ossia un processo di rimodellamento dei tessuti senza la necessità di ricorrere alla proliferazione cellulare. Questo tipo di rigenerazione è fondamentalmente diversa dalla rigenerazione che può aver luogo nei vertebrati, in cui la chiusura di una ferita è dovuta alla formazione di un blastema

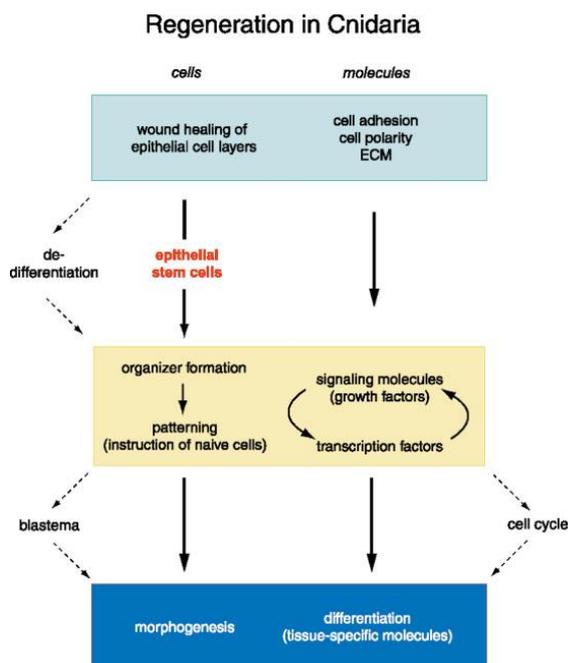
in cui le cellule dell'epidermide dedifferentiate, iniziano a dividersi, e transdifferenziarsi (Lo et al, 1993;. Brockes, 1997).

Attualmente, non è del tutto se negli adulti nel processo di rigenerazione siano coinvolti eventi di epimorfosi. Le cellule staminali sono state trovate anche in alcuni tessuti di mammiferi, e hanno una capacità di sviluppo in un numero limitato di tipi di cellulari (Stocum, 2001). Negli cnidari le cellule staminali possono mediare la plasticità morfogenetica dei tessuti. Ci sono due popolazioni di cellule staminali, ectodermiche ed endodermiche, che si differenziano nei tessuti specifici, anteriori o posteriori, all'estremità dell'asse corporeo (Campbell, 1967a, b; David e Campbell, 1972). Un terzo tipo di cellule staminali, che è presente in *Hydra* e in alcuni altri idrozoi, si differenziano soprattutto in cellule nervose, nematociti, e le cellule ghiandolari, ma non sono necessarie per la rigenerazione (David e Gierer, 1974).

Un importante questione è la comprensione di cosa istruisca le cellule coinvolte nei processi rigenerativi in tutti i tessuti rigeneranti e quali prodotti genici siano responsabili dell'induzione della rigenerazione.

L'applicazione di tecniche genetiche e molecolari ha dimostrato che diversi geni cruciali dell'embriogenesi precoce dei vertebrati e degli insetti sono evolutivamente conservati.

Poco è noto invece dell'embriogenesi degli cnidari a livello molecolare, anche se nuovi dati indicano che alcuni omologhi di geni coinvolti durante l'embriogenesi dei bilateri sono attivi nei processi rigenerativi degli cnidari. Pertanto esiste la possibilità che un insieme di geni potrebbe controllare le fasi iniziali del processo di rigenerazione negli cnidari e nei bilateri (Holstein et al., 2003).



**Processi più importanti, a livello cellulare e molecolare, durante la rigenerazione degli cnidari.** Le operazioni minime necessarie per la rigenerazione degli cnidari (frecce), coinvolte (1) nella chiusura della ferita degli epiteli seguite da (2) l'istituzione di un'organizzazione ed

istruzione delle cellule staminali epiteliali, e (3) successivamente la morfogenesi. Negli cnidari ci sono anche dei passaggi non obbligati nella rigenerazione (freccie tratteggiate), ad esempio, la de-differenziazione nei tessuti differenziati di meduse (Schmid, 1992) e la proliferazione cellulare nei polipi di *Hydra ssp* (Holstein et al., 1991), che potrebbe essere connessa alla formazione del blastema nei vertebrati.

Molti di questi geni sono chiaramente espressi nel luogo dove avvengono processi di sviluppo. Per esempio, la differenziazione apicale negli idrozoi da un lato ed il quella anteriore dei cordati dall'altro, utilizzano geni strutturalmente affini come *forkhead* (Martinez et al., 1997), *emx* (Mokady et al., 1998), *paired-like* (Gauchat et al., 1998; Broun et al., 1999). Ciò suggerisce la conservazione di alcuni meccanismi ancestrali di base coinvolti nell'organizzazione dello sviluppo delle strutture apicali (Galliot e Miller, 2000). Tuttavia, la formazione dell'asse da un pool di cellule che si differenziano, sia in posizione apicale che al polo basale, come si verifica durante la gemmazione, rigenerazione e riaggregazione, richiede probabilmente anche l'attività di geni di tipo *Hox* (Schummer et al., 1992; Gauchat et al., 2000) così come *brachyury* (Technau e Bode, 1999) e la via di segnale *Wnt* (Hobmayer et al., 2000; Technau et al., 2000). Tuttavia, l'asse apico-basale del polipo di cnidario non può essere considerato come un primitivo asse antero-posteriore o dorso-ventrale dei bilateri (Gauchat et al., 2000; Galliot, 2000). La formazione dell'asse è una questione difficile negli cnidari. Inoltre, l'asse della larva planula e del polipo sono spesso considerati come invertiti: il polo anteriore larvale aderisce al substrato, mentre il polo posteriore larvale diventerà la bocca del polipo con i tentacoli.

Le proteine WNT sono delle importanti molecole segnale nei metazoi. Queste proteine controllano diversi processi durante lo sviluppo embrionale, come la specificazione degli assi corporei e la regolazione della differenziazione cellulare. L'acido retinoico (RA) gioca un ruolo importante durante lo sviluppo dei cordati, in particolare nella formazione degli arti e dell'asse antero-posteriore. L'RA diffonde attraverso le membrane cellulari per diffusione semplice, e quindi lega recettori intracellulari. L'effetto del trattamento con RA esogeno è stato studiato durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati. Durante la gastrulazione, l'eccesso di RA perturba il corretto sviluppo del cervello di *Xenopus laevis* (Durston et al., 1989; Papalopulu et al., 1991), zebrafish (Holder and Hill, 1991), topo (Marshall et al., 1992) e pollo (Sundin and Eichele, 1992). Inoltre, studi recenti hanno rivelato la presenza dei maggiori componenti della via di segnale di RA nei genomi di alcuni invertebrati (Campo-Paysaa et al., 2008).

In *Hydra magnipapillata* basse dosi di RA aumentano il potere rigenerante della testa, mentre dosi medie aumentano il numero di tentacoli (Müller, 1984). Il numero di tentacoli sembra essere regolato da un segnale di origine neuronale, forse un peptide attivatore della rigenerazione della "testa", che stimola la formazione dei tentacoli (Bodenmüller e Schaller, 1981).

Le vie di segnale WNT ed RA hanno un ruolo complementare nella determinazione dell'asse antero-posteriore dell'embrione, suggerendo che le loro interazioni sono cruciali nella determinazione del piano corporeo e, più generalmente, nella morfogenesi dei cordati (Onai et al., 2009). Sono scarse invece le informazioni relative al ruolo di queste vie di segnale nei metazoi basali.

## **6.3 Materiali e metodi**

### **6.3.1 Animali**

Per questo studio sulla rigenerazione sono state utilizzate colonie di *Clava multicornis*, prelevate nella località di Roscoff, sulla costa nord della Bretagna, in Francia.

Le colonie sono state nutrite con larve di *Artemia salina*.

### **6.3.2 Rimozione di idranti e stoloni**

I singolizoidi sono stati staccati dal substrato con un taglio trasversale in prossimità dello stolone. Con un secondo taglio trasversale in prossimità dell'idrante è stata rimossa la parte distale. I segmenti di colonna gastrica così ottenuti, di lunghezza approssimativamente simile, sono stati trasferiti in multiwell da 24 pozzetti, ciascuno contenente un segmento di colonna gastrica. Tali operazioni sono state eseguite a 19°C.

Sono state poi preparate le soluzioni di acido retinoico in acqua di mare utilizzate per il trattamento: RA  $10^{-7}$  M, RA  $5 \times 10^{-7}$  M e RA  $10^{-6}$  M a partire da uno stock di RA  $10^{-4}$  M.

Un controllo è stato effettuato con sola acqua marina filtrata (FSW).

I campioni, mantenuti al buio per tutta la durata del trattamento con acido retinoico, sono stati incubati a 16°C.

Le soluzioni sono state cambiate giornalmente, in modo da prevenire il proliferare di organismi estranei o dannosi e per ovviare la degradazione di RA. L'esperimento è stato condotto per 10 giorni.

A partire dal terzo giorno di trattamento sono state registrate per ogni campione la vitalità e le condizioni di rigenerazione. I dati relativi al decimo giorno sono stati riportati in un grafico e analizzati statisticamente per evidenziare la significatività degli effetti osservati (programma SPSS, analisi ANOVA e test di Tuckey)

### **6.3.3 Immunolocalizzazione**

Si è evidenziata, mediante immunolocalizzazione, la posizione delle cellule GLWamide positive del sistema nervoso dei polipi di *C. multicornis* rigenerati.

Prima di poter lavorare sui polipi è stato necessario reidratarli tramite passaggi in soluzioni alcoliche in concentrazione decrescente.

Sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Il PBS è una soluzione salina contenente cloruro di sodio e fosfato di sodio. E' stata usata una soluzione contenente 8 g/L di NaCl, 0,2 g/L di KCl, 1,44 g/L di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 0,24 g/L di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

In seguito i polipi sono stati posti in una soluzione di PBTT, ottenuta diluendo in PBS due detergenti, Tween-20 e Triton-x 100 (Sigma, Italia) in concentrazioni rispettivamente di 0,1% e 0,25%. Sono stati fatti due passaggi in PBTT da 15 minuti ciascuno. Poi si sono immersi i polipi in una soluzione costituita da 50% PBTT e da 50% NGS. L'NGS è siero di capra ricco di proteine che si legano ai siti aspecifici degli anticorpi. In questo modo gli anticorpi primari che si aggiungeranno dopo si legheranno solo ai loro siti specifici. L'NGS viene disattivato per trenta minuti a 55°C prima di essere usato. Successivamente i polipi sono stati trattati in una soluzione con NGS al 10% , PBTT e l'anticorpo primario. I polipi sono stati poi incubati a 4°C per tutta la notte.

Il giorno successivo si sono eseguiti tre lavaggi di 10 minuti in PBTT e quindi a seguire un'incubazione di un'ora in PBTT 50% e NGS 50%. Infine si sono aggiunti gli anticorpi secondari diluiti in PBTT/NGS e si è incubato al buio a 4°C per una notte.

L'ultimo giorno si sono fatti ancora 6 lavaggi da 15 minuti in PBTT e infine si sono preparati i vetrini.

Nel nostro esperimento gli anticorpi usati sono stati anti-GLW prodotti in coniglio (omaggio del Prof. Thomas Leitz, Germania), diluiti rispettivamente 1:400, e come anticorpo secondario è stato utilizzato un anti Igg di coniglio coniugato a FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Sigma, Italia) diluito 1:400. Questo anticorpo si lega agli anticorpi di coniglio ed è visibile al microscopio a fluorescenza.

## **6.4 Risultati**

### **6.4.1 Rigenerazione**

Molti studi di biologia dello sviluppo riguardanti gli cnidari sono incentrati sulla comprensione dei processi rigenerativi. Per il presente studio sono state isolate colonne gastriche di *Clava*

*multicornis* effettuando due tagli trasversali in prossimità dell'idrante e dello stolone. Le colonne gastriche isolate sono state trattate con concentrazioni crescenti di acido retinoico (RA).

Dopo pochi giorni dall'amputazione, le colonne gastriche hanno rimarginato le zone in cui era stata effettuata l'asportazione dello stolone e dell'idrante sia negli individui di controllo che in quelli trattati con RA.

Nei campioni non trattati, a 7 giorni dall'amputazione, era già possibile riscontrare, alle estremità della colonna gastrica, la comparsa di strutture differenziate.

Le osservazioni finali sono state condotte su dati raccolti dopo 10 giorni di trattamento. Le parti rigenerate sono state considerate "teste", ossia idranti, nel caso in cui fossero ben visibili i tentacoli, anche abbozzati, mentre sono state considerate stoloni se mostravano proprietà adesive quando sondate con un ago (Fig. 1A,B). Inoltre sezioni istologiche hanno permesso di notare la presenza di strutture differenziate come l'ipostomio negli idranti (Fig. 1C,E) e l'assenza di cnidociti negli stoloni rigenerati (Fig. 1D,F) confermando la corretta formazione delle strutture.

	solo teste	1tes+1stol	solo stol	no rigen
co	58,63	13,67	7,35	20,34
ra 10-7	44,58	12,42	24,72	18,39
ra 5x10-7	25,50	12,70	29,76	29,84
ra 10-6	7,78	2,47	66,03	24,34

**Tabella 1:** dati raccolti 10 giorni dopo l'inizio del trattamento, i valori espressi in percentuale, sono la media di tre distinti esperimenti.

Sia nei campioni di controllo che nei trattati a varie concentrazioni di RA è stata osservata una percentuale di individui che non avevano rigenerato (Tab. 1). I campioni di controllo presentavano un'alta percentuale di rigenerazione della testa a una o a entrambe le estremità della colonna gastrica (58,6%), solo il 13,7% dei campioni aveva rigenerato una testa e uno stolone, mentre un numero molto esiguo di campioni (7,3%) aveva rigenerato il solo stolone. Nei trattati con dosi crescenti di RA si è assistito ad una progressiva diminuzione dei rigeneranti "testa" e ad un parallelo aumento dei rigeneranti stoloni. Nel trattamento con la dose più alta, RA x 10-6M, ben il 66 % dei campioni ha rigenerato solo stoloni (Grafico 1 e tabella 1).

L'analisi statistica ha mostrato che è significativo l'effetto dei trattamenti sull'incidenza della rigenerazione della testa (Anova  $F_{3,8} = 9,526$   $P = 0,005$ ). La differenza tra l'incidenza del fenomeno nei controlli e nei trattati con la dose più bassa di RA ( $10^{-7}$ M) non è significativa (Tuckey's test  $P = 0,5$ ) mentre lo è tra i controlli e le dosi più alte di RA (Tuckey's test  $P = 0,04$  e  $P = 0,005$  rispettivamente). I trattamenti non causano un effetto significativo sull'incidenza dei campioni che rigenerano una testa e uno stolone (Anova  $F_{3,8} = 2,766$   $P = 0,111$ ) mentre è

significativo l'effetto sull'incidenza dei campioni che rigenerano solo stoloni (Anova  $F_{3,8} = 7,926$   $P = 0,009$ ). In particolare la percentuale di colonne gastriche trattate con la dose più alta di RA ( $10^{-6}M$ ) che rigenerano solo stoloni è significativamente maggiore rispetto ai controlli (Tuckey's test  $P = 0,006$ ).

Al fine di indagare il grado di differenziazione della rete nervosa durante i processi rigenerativi, i campioni sono stati trattati per l'immunolocalizzazione di neuropeptidi specifici GLWamide.

Negli individui controllo che avevano rigenerato l'idrante, numerose fibre GLWamide positive erano presenti a livello dell'ipostomio. Queste fibre decorrevano parallelamente in senso longitudinale, dall'estremità anteriore fino alla base dell'ipostomio. Nei tentacoli erano presenti poche fibre GLWamide positive.

Nei campioni trattati con RA  $10^{-6}$ , che hanno rigenerato lo stolone, erano comunque individuabili fibre GLWamide positive, ma tali fibre erano presenti solo nella colonna gastrica e si estendevano fino al punto in cui è stata effettuata l'amputazione. Nello stolone era assente il segnale GLWamide (Fig. 2).

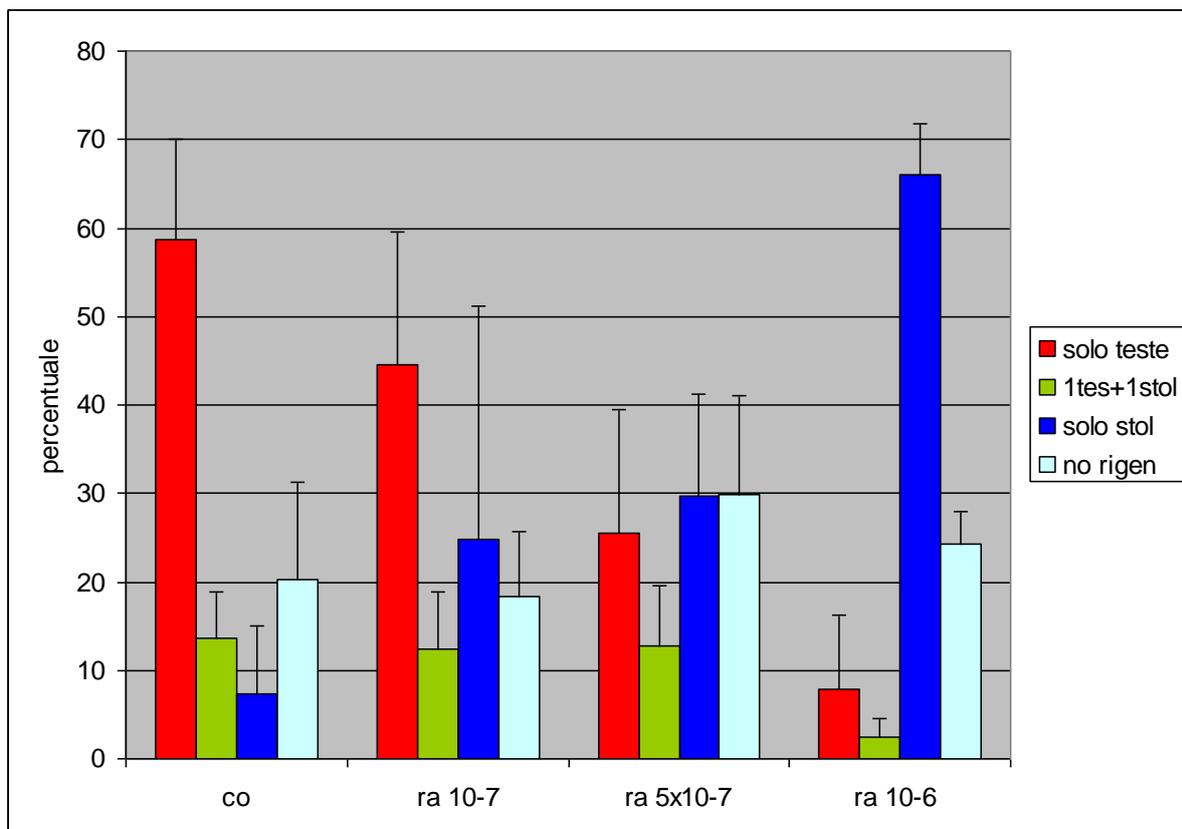


Grafico 1. Il grafico riporta la percentuale di rigenerazione delle teste e degli stoloni in larve controllo e trattate con diverse concentrazioni di RA. I dati sono significativamente diversi.

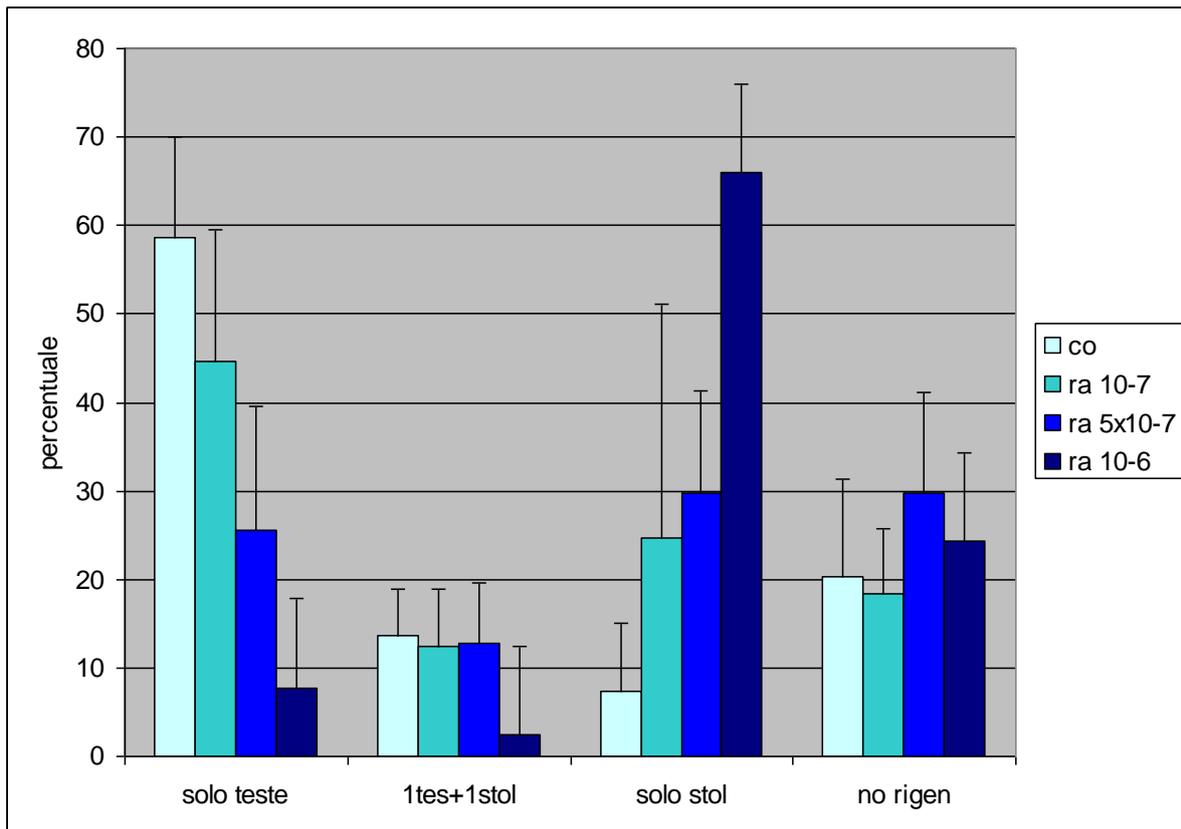


Grafico 2 Il grafico riporta la percentuale di individui controllo e trattati con diverse concentrazioni di RA che hanno rigenerato le teste e/o gli stoloni. I dati sono significativamente diversi.



Fig 1 . Sezioni istologiche delle porzioni rigenerate dei polipi di *Clava multicornis*.

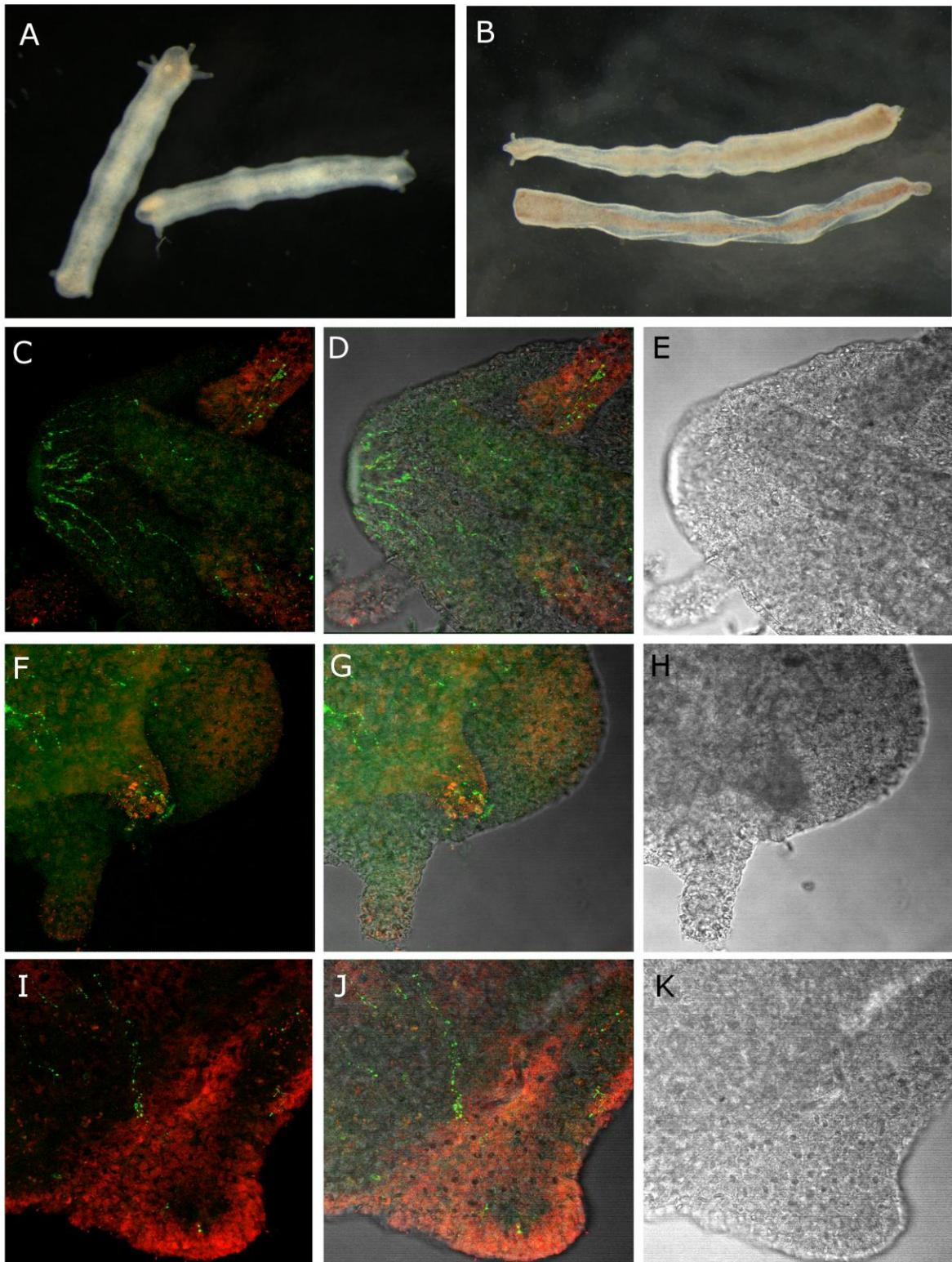


Fig. 2: Immunolocalizzazione di GLWamide in polipi rigenerati di *C. multicornis*. A: polipi di controllo. B polipi trattati con RA C,D,E: Ipostomio di un individuo di controllo. F,G,H:Tentacoli di un individuo di controllo. I, J,K : Stolone di un individui trattato con RA  $10^{-6}$  M. C,F,I: Immunolocalizzazione del peptide GLWamide.

## 6.5 Discussione

I risultati presentati rafforzano le idee sul rapporto tra sviluppo e rigenerazione. La rigenerazione non si evolve come un fenomeno separato nell'evoluzione, coinvolgendo nuovi set di geni, ma invece è un processo associato allo sviluppo che utilizza gli stessi meccanismi utilizzati durante lo sviluppo di uno specifico tessuto (Muneoka e Bryant, 1982; Bryant e Gardiner, 1992; Imokawa e Yoshizato, 1997). Naturalmente, questa convinzione non aiuta a capire perché alcuni organi come gli arti di anfibio siano in grado di rigenerarsi perfettamente, mentre ciò non sia possibile per l'arto umano, ma comunque restringe le possibilità di ricerca dei meccanismi coinvolti nella rigenerazione. L'RA è un buon esempio. Si tratta di una molecola fondamentale necessaria per lo sviluppo dell'arto, per la crescita dei neuriti durante lo sviluppo, e lo sviluppo del polmone, ed i componenti della via di segnale di RA, gli enzimi di sintesi ed i recettori, sono presenti durante lo sviluppo di questi sistemi. Inoltre, una ricerca su undici genomi di organismi non deuterostomi (Abalat e Cañestro, 2009) ha rilevato la presenza dei componenti chiave della via di segnale dell'RA nei protostomi, sia tra i Lofotrocozoa che tra gli Ecdisozoa.

Il genoma dell'antozoo *Nematostella vectensis* è stato analizzato per individuare gli elementi della via di segnale di RA, e ha rivelato la presenza di sequenze di tre presunti ortologhe di *Aldh1a/Aldh2* ma non di *CYP26* o di *RAR*.

La presenza di elementi RXR in altri cnidari è ben documentata. Un recettore RXR simile che presenta una notevole somiglianza con il recettore RXR alfa di uomo ed è stato individuato nella cubomedusa *Tripedalia cystophora* (Kostrouch et al., 1998).

Ci si aspetta dunque che l'RA ed i suoi componenti siano coinvolti nella rigenerazione di diversi organismi o che il fallimento della rigenerazione sia la causa del fallimento di uno dei componenti di questa via di segnale.

Un perfetto esempio di organo in rigenerazione nel regno animale deve essere sicuramente quello degli arti e della coda negli anfibi urodeli.

I tritoni e molte specie di salamandre possono rigenerare perfettamente i loro arti e la coda dopo l'amputazione. Nelle rane questa capacità si perde dopo la metamorfosi, ma i girini rigenerano gli arti e la coda in maniera altrettanto efficiente. In questi animali che già hanno una notevole capacità di rigenerarsi l'RA in realtà provoca una "super-rigenerazione", cioè la rigenerazione di tessuto extra. Questa super-rigenerazione è stata descritta nel 1978 da Niazi e Saxena utilizzando girini di *Bufo andersonii* dimostrando che, quando al girino venivano amputati gli arti posteriori e trattati con retinile palmitato, una forma della vitamina A, invece di rigenerare ciò che è stato

rimosso, il rigenerato sembrava contenere elementi in più nella asse prossimo-distale (Niazi e Saxena, 1978).

Sono state utilizzate anche altre specie di anfibii, come *Notophthalmus*, *Pleurodeles*, *Triturus* e *Xenopus* per studiare questo fenomeno (Thoms e Socum, 1984; Niazi et al., 1985; Scadding e Maden, 1986; Lheureux et al., 1986). Questo effetto di RA è stato interpretato come una rispecificazione di informazione posizionale in direzione prossimale lungo l'asse dell'arto. Negli cnidari l'avvio dei processi morfogenetici, come la formazione dei tentacoli e degli idranti, può essere attribuita sia alla azione stimolante di un attivatore, o alla rimozione di un effetto inibitorio. È stato proposto che le fonti predominanti sono le cellule nervose, le quali producono, ad esempio, un neuropeptide chiamato "l'attivatore della testa" (Schaller e Gierer, 1973; Schaller et al., 1979; Schaller e Bodenmüller, 1981). Inoltre sono stati anche estratti da diversi cnidari morfogeni inibitori (Schaller et al., 1979; Berking, 1977, 1983). Trattamenti con basse concentrazioni di acido retinoico non sembrano avere un effetto notevole sui processi rigenerativi delle colonne gastriche di *Clava multicornis*.

L'effetto di basse dosi di acido retinoico sul tasso di rigenerazione di strutture differenziate, quali l'ipostomio ed i tentacoli può essere interpretato come conseguenza di un rilascio di morfogeno transitorio in un primo momento ed un rafforzamento del segnale successivo grazie alla fonte neorigenerata. Infatti tramite l'immunolocalizzazione dei neuropeptidi GLWamidati è stato possibile evidenziare una corretta rigenerazione del sistema nervoso, il quale potrebbe essere la fonte del segnale necessario per la formazione di determinate strutture differenziate.

Il trattamento prolungato con alte dosi invece riduce la gamma di segnalazione, magari distruggendo l'intero sistema di trasmissione. Il valore posizionale diminuisce ovunque, comportando la formazione di stoloni ad entrambi i poli della colonna gastrica. In *Clava multicornis*, non è stato possibile notare un'accelerazione dei processi rigenerativi.

La mia conclusione è, quindi, che i retinoidi siano dei morfogeni che possono influenzare le vie di segnale di posizione emessi dall'ipostomio (Wolpert, Hornbruch & Clarke, 1974; Meinhardt, 1983; Mac Williams, 1983). Quando l'intensità del segnale scende sotto una soglia critica, le cellule migrano per formare gli stoloni. Gli stoloni si formano quindi a spese dell'idrante.

L'RA è quindi un morfogeno importante negli cnidari come nei vertebrati. L'implicazione è che questo morfogeno era funzionalmente integrato nella segnalazione morfogenetica nelle prime fasi dell'emergenza evolutiva del sistema nervoso.

## 6.6 Bibliografia

Abalat, R. & Cañestro, C. (2009). Identification of Aldh1a, Cyp26 and RAR orthologs in protostomes pushes back the retinoic acid genetic machinery in evolutionary time to the bilaterian ancestor. *Chem. Biol. Interact.* 178: 188-196.

Berking, S. (1977). Bud formation in *Hydra*: Inhibition by an endogenous morphogen. *Wilhelm Roux Arch, devl Biol.* 181, 215-225.

Berking, S. (1983). The fractionation of a *Hydra*-derived inhibitor into head and foot inhibitors may be an artefact. *Wilhelm Roux Arch, devl Biol.* 192, 327-332.

Bodenmüller H. & Schaller H.C. (1981). Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. *Nature.* 293: 579–580.

Bridge D, Cunningham CW, DeSalle R, Buss LW. 1995. Class-level relationship in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol* 12:679–689.

Brockes JP. 1997. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* 276:81–87.

Broun, M., Sokol, S., Bode, H.R., 1999. Cngsc, a homologue of goosecoid, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra*. *Development* 126, 5245–5254.

Bryant SV, Gardiner DM. (1992). Retinoic acid, local cell-cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. *Dev Biol* 152:1–25.

Campbell RD. 1967a. Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. I. Patterns of cell division. *Dev Biol* 15:487–502.

Campbell RD. 1967b. Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J Morphol* 121:19–28.

Campo-Paysaa F, Marlétaz F, Laudet V, Schubert M (2008) Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. *Genesis* 46:640–656.

Conway Morris S. 2000. The Cambrian “explosion”: slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4426–4429.

David CN, Campbell RD. 1972. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *J Cell Sci* 11: 557–568.

David CN, Gierer A. 1974. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *J Cell Sci* 16:359–375.

Galliot, B., Miller, D., 2000. Origin of anterior patterning. How old is our head. *Trends Genet.* 16, 1–5.

Gauchat, D., Kreger, S., Holstein, T., Galliot, B., 1998. *prdl-a*, a gene marker for hydra apical differentiation related to triploblastic paired-like head-specific genes. *Development* 125, 1637–1645.

Gauchat, D., Mazet, F., Berney, C., Schummer, M., Kreger, S., Pawlowski, J., Galliot, B., 2000. Evolution of Antp-class genes and differential expression of *Hydra Hox/ paraHox* genes in anterior patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4493–4498.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbacher, U., et al., 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407, 186–189.

Holder N, Hill J (1991) Retinoic acid modifies development of the midbrain-hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos. *Development* 113:1159-1170.

Holstein, T. W., Hobmayer, E. and Technau, U. (2003). Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev. Dyn.* 226, 257- 267.

- Imokawa Y, Yoshizato K. (1997). Expression of Sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9159–9164.
- Kostrouch, Z., M. Kostrouchova, W. Love, E. Jannini, J. Piatigorsky & J.E. Rall. (1998). Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 13442-13447.
- Lheureux E, Thoms SD, Carey F. (1986). The effects of two retinoids on limb regeneration in *Pleurodteles waltil* and *Triturus vulgaris*. *J Embryol Exp Morphol* 92:165– 182.
- Lo DC, Allen F, Brockes JP. 1993. Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7230–7234.
- Mac Williams, H. K. (1983). *Hydra* transplantation phenomena and the mechanism of *Hydra* head regeneration. II. Properties of the head activation. *Dev. Biol.* 96, 239-257.
- Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M.-H., Muchamore, I., Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1992). Retinoic acid alters the hindbrain Hox code and induces the transformation of rhombomeres 2/3 into a rhombomere 4/5 identity. *Nature* 360, 737-741.
- Martinez, D.E., Dirksen, M.L., Bode, P.M., Jamrich, M., Steele, R.E., Bode, H.R., 1997. Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Dev. Biol.* 192, 523–536.
- Meinhardt, H. (1982). *Models of Biological Pattern Formation*. London, New York: Academic Press.
- Mokady, O., Dick, M.H., Lackschewitz, D., Schierwater, B., Buss, L.W., (1998). Over one-half 22 B. Galliot et al. / *Developmental Biology* 332 (2009) 2–24
- Müller WA (1984) Retinoids and pattern formation in a hydroid. *J Embryol Exp Morphol* 81: 253–271

Muneoka K, Bryant SV. (1982). Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature* 298:369–371.

Niazi I A and Saxena S (1978). Abnormal hindlimb regeneration in tadpoles of the toad, *Bufo andersoni*, exposed to excess vitamin A; *Folio Biol (Krakow)* 26 3-11

Niazi IA, Pescitelli MJ, Stocum DL. (1985). Stage-dependent effects of retinoic acid on regenerating urodele limbs. *Roux Arch Dev Biol* 194:355–363.

Nielsen C. 2001. *Animal evolution: interrelationships of the living phyla*. New York: Oxford University Press. 480 p.

Onai T., Lin H.C., Schubert M., Koop D., Osborne P.W., Alvarez S., Alvarez R., Holland N.D. &

L.Z. Holland, (2009). Retinoic acid and Wnt/beta-catenin have complementary roles in anterior/posterior patterning embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev. Biol.* 332: 223-33.

Pecorino L, Entwistle A, Brockes JP. (1996). Activation of a single retinoic acid receptor isoforms mediates proximodistal respecification. *Curr Biol* 6:563–569.

Petersen KW, Eernisse DJ. 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol Dev* 3:170–205.

Scadding SR, Maden M. (1986). Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in *Xenopus laevis* tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 91:35–53.

Schaller, H. C. (1973). Isolation and characterization of a low-molecular weight substance activating head and bud formation in hydra. /. *Embryol. exp. Morph.* 29, 27-38.

Schaller, H. C , Schmidt, T. & Grimmelikhuijzen, C. J. P. (1979). Separation and specificity of action of four morphogens from *Hydra*. *Wilhelm Roux Arch, devl Biol.* 186,139-149

Schaller, H. C. & Bodenmuller, H. (1981). Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A.* 78, 7000-7004.

Schummer, M., Scheurlen, I., Schaller, C., Galliot, B., (1992). HOM/HOX homeobox genes are present in hydra (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration. *EMBO J.* 11, 1815–1823.

Stocum DL. 2001. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen* 9:429–442.

Sun, H., Dickinson, D.P., Costello, J., Li, W.H., (2001). Isolation of *cladonema* pax-b genes and studies of the DNA-binding properties of cnidarian pax paired domains. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1905–1918.

Sullivan, J.C., Sher, D., Eisenstein, M., Shigesada, K., Reitzel, A.M., Marlow, H., Levanon, D. et al., (2008). The evolutionary origin of the Runx/CBFBeta transcription factors studies of the most basal metazoans. *BMC Evol. Biol.* 8, 228.

Sundin, O. and Eichele. G. (1992). An early marker of axial pattern in the chick embryo and its respecification by retinoic acid. *Development* 114: 841–852.

Thoms SD, Socum DL. (1984). Retinoic acidinduced pattern duplication in regenerating urodele limbs. *Dev Biol* 103: 319–328.

Wolpert, L., Hornbruch, A. e Clarke, M. R. B. (1974). Positional information and positional signalling in *Hydra*. *Amer. Zool.* 14, 647-663.

## 7 Conclusione

Al fine di ampliare le conoscenze relative allo sviluppo degli cnidari, in questa tesi sono stati analizzati diversi aspetti sulla struttura e lo sviluppo del sistema nervoso della larva planula dell'idrozoo *Clava multicornis*. In contrasto con una conoscenza dettagliata del sistema nervoso negli cnidari adulti, poco si sa circa l'organizzazione neurale nei primi stadi di sviluppo. In particolare le indagini sono state volte ad individuare i diversi tipi neurali presenti, e la loro disposizione, in questo animale. La larva planula di *C. multicornis* possiede un inaspettato concentrazione di elementi neurali al polo anteriore. Tramite tecniche di immunolocalizzazione è stato possibile individuare diversi tipi neurali disposti in regioni ristrette dell'estremità anteriore andando a formare degli aggregati di specifiche cellule. Ciò implica che il plesso anteriore può essere coinvolto nel processo di integrazione delle informazioni neurali provenienti da diverse parti del planula. La complessità e la struttura del sistema nervoso di questo animale potrebbero essere dovute al particolare comportamento locomotorio di tipo bentonico. Tale organizzazione non è mai stata riscontrata nelle larve di altri cnidari.

È stato analizzato anche il destino del sistema nervoso durante la metamorfosi.

Una parte dei neuroni della larva degenera durante la metamorfosi per apoptosi e una parte del sistema nervoso adulto è probabilmente costituito dalla differenziazione e la costruzione "de novo" di una rete nervosa con le caratteristiche di una rete nervosa di polipo. Le planule ed i vari stadi della metamorfosi di *C. multicornis* presentano una specializzazione morfologica che differiscono dai tradizionali sistemi modello di cnidari ed è di grande aiuto nel definire l'evoluzione degli idrozoi e il loro rapporto con i bilateri. Ulteriori ricerche dovrebbero chiarire il ruolo relativo delle nuove cellule prodotte da questo meccanismo di ricostruzione e delle cellule larvali pre-esistenti per la formazione della rete nervosa degli adulti. La metamorfosi negli idrozoi è un evento plastico che riguarda una vasta gamma di tipi cellulari. La comprensione di come viene riarrangiato il sistema nervoso di questo metazoo basale durante la metamorfosi può aiutare a chiarire i meccanismi della plasticità neurale nei metazoi superiori.

Inoltre sono state perturbate le vie di segnale volte a determinare gli assi corporei durante lo sviluppo e la rigenerazione, analizzando successivamente le conseguenti anomalie nello sviluppo del sistema nervoso e nel comportamento.

Sono stati analizzati i meccanismi che controllano la formazione del sistema nervoso controllati dalle vie di segnale WNT, FGF e RA.

E' stato indagato se le vie di segnale WNT, FGF e RA hanno effettivamente un ruolo nello sviluppo del SN come nei vertebrati. Per verificare il coinvolgimento delle vie di segnale WNT e FGF durante lo sviluppo, le planule sono state trattate rispettivamente con LiCl e SU5402. Le anomalie riscontrate nello sviluppo del sistema nervoso e complessivamente sulla morfologia delle planule trattate suggeriscono la presenza e l'azione di queste vie di segnale durante lo sviluppo delle larve di questi metazoi basali.

Anche i trattamenti con RA e con citrale, che può ridurre la quantità di RA endogeno, hanno sortito degli effetti evidenti in quanto si sono potute riscontrare delle alterazioni durante lo sviluppo del sistema nervoso.

I trattamenti con RA hanno prodotto delle alterazioni sulla capacità delle planule di percepire gli stimoli luminosi e di coordinare i movimenti.

Anche i processi rigenerativi sono stati influenzati a causa del trattamento con alte concentrazioni di RA esogeno. Infatti le colonne gastriche trattate con RA hanno rigenerato in prevalenza gli stoloni.

Gli studi su embrioni e larve hanno guadagnato slancio con l'introduzione di *Nematostella vectensis* e *Clytia hemispherica* come animali modello. Il confronto tra specie morfologicamente diverse potrebbe fornire molte informazioni utili per la comprensione dei processi alla base dei programmi di sviluppo. Anche se fino ad oggi gli studi di sviluppo sugli cnidari si sono incentrati sulla formazione degli assi e sulla rigenerazione, i modelli cnidari offrono entusiasmanti opportunità per indagare altri aspetti dello sviluppo. I loro genomi possono custodire informazioni importanti riguardanti l'evoluzione e la biologia dello sviluppo dei bilateri.

Per esempio è di notevole interesse ampliare le conoscenze sui meccanismi che controllano lo sviluppo del sistema nervoso negli cnidari e come il suo sviluppo si relazioni con lo sviluppo del sistema nervoso dei bilateri. Infatti questi risultati aprono importanti prospettive sul significato evolutivo dell'antagonismo tra RA e FGF/WNT nei metazoi basali.