



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.
Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità
Ind. Biologia Animale e Antropologica - Ciclo XXIX

**“ANALISI DI NUOVI MECCANISMI MOLECOLARI
DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA NEL
RICCIO DI MARE *PARACENTROTUS LIVIDUS*”**

Studente di Dottorato:
Marco Chiaramonte

Tutor universitario:
Prof. Vincenzo Arizza
Co-Tutor:
Dott. ^{ssa} Roberta Russo

CICLO XXIX

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità- Ind. Biologia
Animale e Antropologica -Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche
Chimiche e Farmaceutiche

**“ANALISI DI NUOVI MECCANISMI MOLECOLARI DELLA
RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA NEL RICCIO DI MARE
PARACENTROTUS LIVIDUS”**

DOTT.:

MARCO CHIARAMONTE

COORDINATORE:

PROF. MARCO ARCULEO

TUTOR UNIVERSITARIO:

PROF. VINCENZO ARIZZA

CO-TUTOR:

DOTT.^{SSA} ROBERTA RUSSO

CICLO XXIX

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017

INDICE

1	<u>INTRODUZIONE</u>	6
1.1	ORGANISMO MODELLO: RICCIO DI MARE <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i>	6
1.2	GLI ECHINODERMI	9
1.3	IL SISTEMA IMMUNITARIO NEL REGNO ANIMALE	11
1.4	IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI VERTEBRATI E INVERTEBRATI	13
1.5	IL SISTEMA IMMUNITARIO DEGLI ECHINODERMI	16
1.6	CARATTERISTICHE DELLE PRINCIPALI CELLULE IMMUNITARIE DEGLI ECHINODERMI	18
1.6.1	CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE IMMUNITARIE DI <i>P. LIVIDUS</i>	21
1.7	MECCANISMI CELLULARI NEGLI ECHINODERMI	23
1.8	MECCANISMI UMORALI NEGLI ECHINODERMI	25
1.9	PAMP, DAMP E PRR	29
1.10	STRUTTURA E FAMIGLIE DEI RECETTORI TLR	30
1.11	SOTTOFAMIGLIA TLR3	32
1.12	PATHWAY DI SEGNALAZIONE DEI TLR	33
1.13	CITOCHINE RESPONSABILI DELL'IMMUNITÀ INNATA	39
1.14	RECETTORI TOLL-LIKE NEGLI ECHINODERMI	41
1.15	PROTEINE ADATTATRICI PRESENTI NEL PATHWAY DEI TLR NEGLI ECHINODERMI	43
1.16	CITOCHINE-LIKE PRESENTI NEGLI ECHINODERMI	44
2	<u>OBIETTIVO DELLA RICERCA</u>	46
3	<u>MATERIALI E METODI</u>	47
3.1	CAMPIONAMENTO DEGLI ANIMALI	47
3.2	PRELIEVO DEL FLUIDO CELOMATICO DA <i>P. LIVIDUS</i>	47
3.3	CONTA CELLULARE	47
3.4	COLORAZIONE MAY-GRUNWALD GIEMSA DELLE CELLULE IMMUNITARIE	48
3.5	ESTRAZIONE DI RNA E ISOLAMENTO DI cDNA TRAMITE RT-PCR	49
3.6	PCR E SEQUENZIAMENTO DEI FRAMMENTI PER PRIMER WALKING	49
3.7	ALLINEAMENTO DI SEQUENZA E COSTRUZIONE ALBERI FILOGENETICI	50
3.8	ANALISI DELLA PROTEINA	50
3.9	“REAL TIME” PCR COMPARATIVA ($\Delta\Delta CT$)	50
3.10	TRATTAMENTO DEI RICCI CON LIPOPOLISACCARIDE (LPS) E CON POLYINOSINIC:POLYCYTIDYLIC ACID (POLYI:C).	51
3.11	ESTRAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO DALLE CELLULE IMMUNITARIE	52
3.12	DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA	52
3.13	ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE	52
3.14	WESTERN BLOT	53
3.15	ANALISI STATISTICHE	54
4	<u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	55
4.1	ANALISI DEI CAMPIONI DI RICCIO DI MARE E TRATTAMENTI EFFETTUATI	55
4.2	ANALISI DELLE CELLULE IMMUNITARIE NEL LIQUIDO CELOMATICO TRATTATO CON POLYI:C.	55

4.3	ISOLAMENTO DI GENI TLR DA CELLULE IMMUNITARIE DI RICCIO DI MARE	62
4.4	ANALISI DELLA PROTEINA	63
4.5	ANALISI FILOGENETICA DELLA PROTEINA PL-TLR3	66
4.6	ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI <i>PL-TLR3</i> IN CAMPIONI TRATTATI CON POLYI:C E LPS72	72
4.7	ISOLAMENTO DEL GENE PARZIALE <i>TBK1</i> DA CELLULE IMMUNITARIE DI <i>P.LIVIDUS</i>	74
4.8	ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI <i>PL-TBK1</i> IN CELLULE IMMUNITARIE TRATTATE CON POLYI:C	75
4.9	ISOLAMENTO DEL GENE PARZIALE <i>IRF</i> DA CELLULE IMMUNITARIE DI <i>P. LIVIDUS</i>	77
4.10	ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI <i>PL-IRF</i> IN CELLULE IMMUNITARIE TRATTATE CON POLYI:C	78
4.11	ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE CITOCHINE-LIKE IN CAMPIONI TRATTATI CON POLYI:C	80
4.12	PATHWAY DI REGOLAZIONE RIASSUNTIVO DELLA RISPOSTA IMMUNE IN <i>P.LIVIDUS</i>	82
<u>5</u>	<u>CONCLUSIONI</u>	<u>84</u>
<u>6</u>	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>87</u>

ABSTRACT

La risposta immune contro l'invasione dei patogeni è un meccanismo fisiologico presente in tutti gli organismi viventi. Gli animali possiedono recettori che si legano a elementi estranei riconosciuti come non-self che successivamente attivano una risposta cellulare.

Il meccanismo di trasduzione del segnale inizia una complessa cascata di reazioni cellulari che conduce alla produzione di molecole effettrici quali le citochine. Alla fine si ha l'eliminazione o l'inattivazione del patogeno. A questo complesso meccanismo prendono parte recettori, molecole antimicrobiche, fattori di trascrizione, ecc...

Gli echinodermi rappresentano i più evoluti invertebrati che formano un ponte con i cordati primitivi. Essi possiedono numerosi recettori ed effettori che si adoperano allo scopo di ottenere una veloce risposta immunitaria innata. Al contrario i Vertebrati attivano diversi meccanismi di immunità adattativa (tra cui immunoglobuline, memoria immunologica ecc.). In tal modo, nei Vertebrati l'immunità adattativa si aggiunge alla risposta immune innata, formando un network complesso.

Sebbene i meccanismi di diversificazione dei geni della risposta immune innata non siano ancora chiari, molti studi sugli echinodermi hanno contribuito alla conoscenza del sistema immunitario. Infatti gli echinodermi sono filogeneticamente correlati all'uomo, tanto da condividere molti geni di famiglie di recettori ed effettori coinvolti nella risposta immunitaria. Lo studio degli aspetti dell'immunità innata negli echinodermi può essere utile nella comprensione di nuovi meccanismi che funzionano anche nell'uomo.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro di Dottorato di Ricerca è di contribuire allo studio delle strategie di difesa messe in atto dal riccio di mare *Paracentrotus lividus* con l'auspicio che possano servire nell'ulteriore comprensione dei meccanismi di difesa dei vertebrati superiori.

1 INTRODUZIONE

1.1 Organismo modello: riccio di mare *Paracentrotus lividus*

Il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, conosciuto più comunemente con il nome di “riccio femmina”, è stato utilizzato come organismo modello nel presente lavoro di Dottorato. Di seguito sono riportate brevemente alcune delle sue caratteristiche, che hanno contribuito alla scelta di tale animale come modello per la ricerca.



Phylum: Echinodermata

Subphylum: Eleutherozoa

Classe: Echinoidea

Sottoclasse: Regularia

Ordine: Diadematoida.

Famiglia: Echinidae

Genere: *Paracentrotus*

Specie: *P. lividus*

(Hickman et al. 2003).

Il *P. lividus* è molto comune in tutto il Mediterraneo e nell'Atlantico nord-orientale, dall'Irlanda alla Scozia fino al Marocco, alle Canarie, a Madeira e alle Azzorre (Boudouresque and Verlaque, 2001). È particolarmente diffuso in regioni in cui in inverno la temperatura dell'acqua è compresa tra i 10 e i 15 °C, e in estate tra i 18 e i 25 °C. Si riscontra dalla superficie fino a 80 m di profondità (prevalentemente tra i -10 e i -15 m).

È un animale che predilige i fondali rocciosi o a praterie di *Posidonia Oceanica*. Questa specie si ricopre di alghe o di pezzi di conchiglie per ripararsi dalla luce e si rintana nelle spaccature della roccia. Si muove soprattutto di sera in cerca di cibo, rappresentato da alghe, detriti di *P. Oceanica* o piccoli animali vivi o morti.

Il *P. lividus*, è tra gli Echinoidei cosiddetti regolari, perché possiede una forma globosa o ovoidale, il corpo è ricoperto da spine robuste, che ricoprono un endoscheletro costituito da piastre calcaree (Figura 1). Oltre alle spine si notano sulla superficie esterna cinque doppie file di pedicelli, che si estendono dalla regione orale a quella apicale in perfetta simmetria pentaradiata tipica degli echinodermi. I pedicelli delimitano così cinque aree ambulacrali, fra le

quali si trovano le cinque aree interambulacrali, di solito più ampie di quelle ambulacrali. Sia le spine sia i pedicelli vengono usati dall'animale per la locomozione. Raggiunge generalmente un diametro di 7 cm e presenta un colore violaceo, bruno o verdastro.

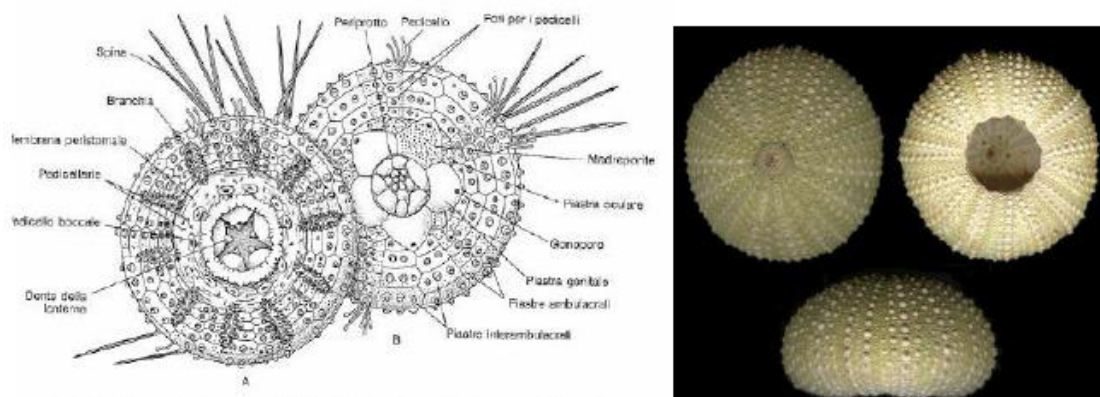


Figura 1: Parte dorsale e ventrale del riccio di mare

Al centro della superficie ventrale si trova la bocca, circondata da un'area membranosa, il peristoma, che porta in prossimità dell'apertura boccale cinque paia di pedicelli corti, di solito privi di ventosa, e disposti a circolo, probabilmente di natura chemio-recettiva, che sono detti pedicelli buccali o tentacoli orali. Anche nella parte dorsale è presente un'area membranosa, il periprocto, in cui vi è l'apertura anale.

L'apparato digerente del riccio di mare è costituito da bocca, faringe, esofago, stomaco, intestino e ano (Figura 2). L'apparato masticatore, detto anche Lanterna di Aristotele (Figura 3), è un insieme di pezzi calcarei e di muscoli che circondano l'esofago. Ha una forma conica, con l'apice formato da cinque denti, sostenuti dalle piramidi. I movimenti della lanterna sono regolati da un complesso sistema di muscoli. I più importanti sono i muscoli protrattori della lanterna.

Un tubo semplice e distinto, costituito da faringe, esofago e intestino inizia alla base della lanterna di Aristotele per terminare poi, dopo essersi ripiegato più volte, a livello dell'ano. Nello stomaco sono presenti cellule esocrine atte alla produzione e alla secrezione di enzimi e inoltre possiede numerosi enterociti, di norma ben sviluppati.

Tutti i ricci di mare ingeriscono il cibo con il muco, formando delle pallottole che rimangono intatte fino alla defecazione (Spirlet et al., 2001).

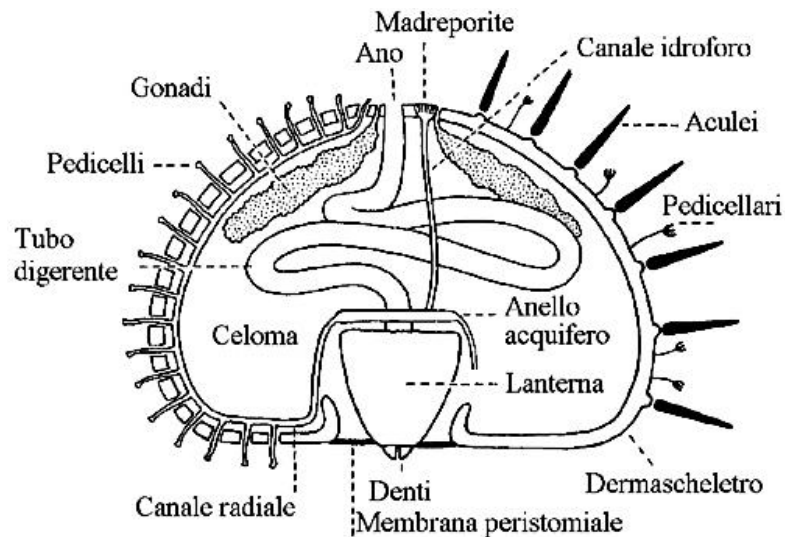


Figura 2: Anatomia del riccio di mare

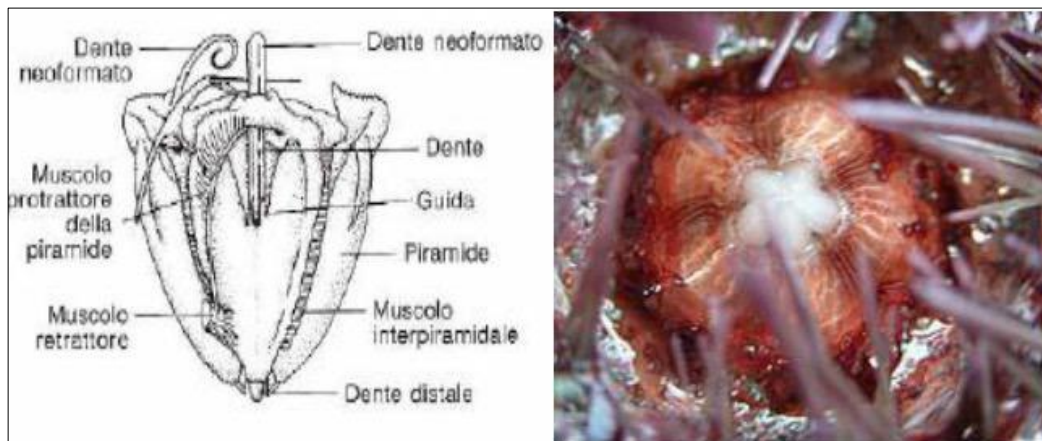


Figura 3: Struttura anatomica della lanterna di Aristotele

L'apparato riproduttore del riccio è formato da cinque strutture identiche, le gonadi, che appaiono voluminose e di colore arancione, più o meno intenso, quando sono mature (Figura 4). Le gonadi si estendono dalla parte aborale, dove comunicano con l'esterno, fino alla parte orale, quasi alla lanterna di Aristotele.

Nel *P. lividus*, così come tutti gli echinodermi, i sessi sono separati e non è presente un dimorfismo sessuale. La riproduzione avviene senza accoppiamento, infatti sia le uova, sia gli spermatozoi, sono emesse all'esterno, nell'ambiente marino.

Dall'uovo fecondato si svilupperà la larva planctonica la cui particolarità è la simmetria bilaterale. Questa attraverso la metamorfosi arriva alla forma adulta a simmetria pentaradiale.



Figura 4: Gonadi mature di *P. lividus*

1.2 Gli Echinodermi

Il *P. lividus* appartiene al phylum Echinodermi. Lo studio di questo phylum è interessante perché possiedono sia caratteristiche tipiche dei protostomi, sia caratteristiche che ritroviamo nei deuterostomi, suggerendo un passaggio chiave nell'evoluzione.

Gli echinodermi sono invertebrati deuterostomi esclusivamente marini. Per le loro caratteristiche essenziali costituiscono uno dei phylum più singolari del regno animale. Sono, infatti, gli unici Celomati Deuterostomi che, da adulti, possiedono una simmetria raggiata generalmente pentamera (Pawson, 2007).

Il considerevole interesse scientifico per gli echinodermi deriva dalla loro posizione filogenetica occupata nel regno animale, non molto lontana da quella dei Cordati. Infatti, similmente a quest'ultimi, sono deuterostomi e hanno un dermascheletro ben sviluppato. Per queste ragioni, gli echinodermi, sono stati a lungo considerati gli organismi più affini ai Cordati, con i quali condividerebbero un progenitore comune. Entrambi i gruppi possiedono le caratteristiche dei deuterostomi, quali:

- Un ano che si forma nella regione del blastoporo;
- Lo sviluppo del celoma che avviene per enterocelia;
- Una segmentazione radiale;
- Uno sviluppo regolativo.

Tale ipotesi evuzionistica ha portato molti autori a utilizzare gli echinodermi per ricercare le origini delle caratteristiche dei Vertebrati (Bang, 1975; Smith et al., 1993). Gli echinodermi rappresentano uno dei gruppi più abbondanti fra gli animali bentonici. A tale phylum appartengono numerose specie, che giocano un ruolo chiave nell'ecosistema marino (Birkeland, 1989; Harrold and Pearse, 1987; Menge et al., 1994).

Il phylum, non considerando le specie fossili, presenta cinque classi principali (Hickman et al., 2003): *Crinoidea*, *Asteroidea*, *Ofiuroidea*, *Echinoidea* e *Oloturoidea* (Figura 5).

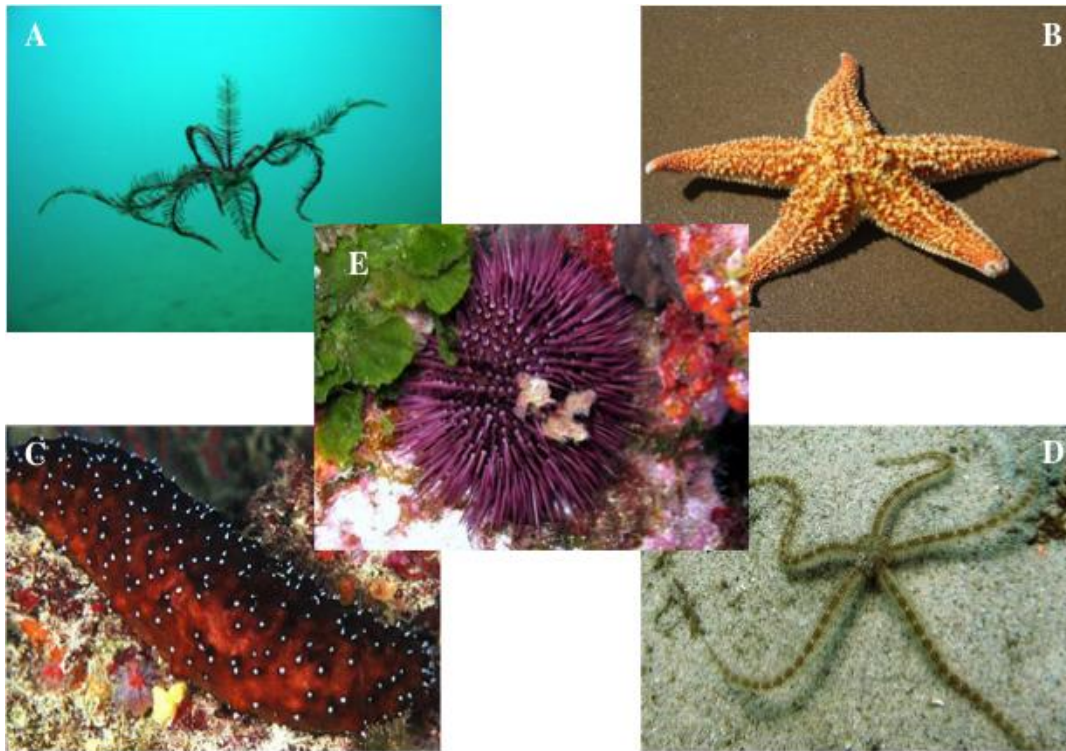


Figura 5: *Crinoidea* (A), *Asteroidea* (B), *Oloturoidea* (C), *Ofiuroidea*(D) e *Echinoidea*(E)

Sebbene gli echinodermi adulti abbiano una simmetria raggiata, probabilmente dovuta a un adattamento secondario per le abitudini sessili, gli zoologi ritengono che essi si siano evoluti da antenati a simmetria bilaterale; ciò è provato dalla presenza di una simmetria bilaterale negli stadi larvali e dal fatto che alcune forme estinte non presentavano simmetria raggiata.

In tutti loro è dunque presente una simmetria pentaradiale anche se in alcuni è mascherata, ma le principali differenze tra le classi riguardano fondamentalmente il tegumento e la distribuzione degli organi respiratori.

I Crinoidei sono visti come i più primitivi e gli Echinoidei e Oloturoidei come i più recenti. Studi nel campo della paleontologia e dell'embriologia comparativa hanno accertato che gli echinodermi costituiscono un gruppo ancestrale adattatosi a diversi cambiamenti ambientali.

In questi organismi il sistema celomatico è ben sviluppato ed è strutturalmente e fisiologicamente specializzato a compiere una serie di funzioni tra cui quelle implicate nella difesa immunitaria. All'interno della cavità celomatica scorre il fluido celomatico il quale contiene acqua di mare con tracce di azoto proteico e non proteico (urea o ammoniaca), un'alta concentrazione di ioni potassio, piccole quantità di lipidi e inoltre contiene popolazioni di

cellule liberamente circolanti, i celomociti (Chia and Xing, 1996), con la funzione di difesa immune.

1.3 Il sistema immunitario nel regno animale

Il sistema immunitario è una complessa organizzazione composta di diversi processi biologici e strutture, che si sono sviluppati nel corso dell'evoluzione per proteggere l'organismo (Jarilin, 1999).

La comparazione, in ambito evuzionistico, delle reazioni immunitarie, che avvengono in differenti gruppi filogenetici, è stato reso possibile grazie allo sviluppo dell'immunobiologia comparata.

I risultati degli studi filogenetici hanno evidenziato la similitudine dell'organizzazione della risposta immunitaria in differenti gruppi e il progressivo aumento della complessità e delle potenzialità immunologiche, che hanno raggiunto l'apice nei Vertebrati (Flajnik & Kasahara, 2010).

Gli studi sul campo dell'immunobiologia comparata hanno subito recentemente un incremento che ha portato a rinnovare l'attenzione verso le "cellule del sangue" degli invertebrati. L'approccio comparativo dell'immunologia nasce dagli studi sulle cause e sui meccanismi dell'infiammazione. Metchnikoff et al. (1893), il principale proponente della teoria cellulare dell'immunità, asseriva che l'infiammazione era il più importante aspetto del processo e proponeva che gli effettori primari della risposta immunitaria fossero cellule circolanti: fagociti ameboidiformi.

Probabilmente, la prima cellula immunocompetente si è evoluta da un progenitore libero, simile a un protozoo, che possedeva già la capacità di distinguere le proprie molecole ("self") dalle molecole estranee ("non self"). (Luporini, 1987).

Nei Metazoi, con l'affermarsi della pluricellularità, le cellule hanno acquisito la capacità di aderire ad altre cellule della stessa specie e l'aderenza è mediata da fattori di riconoscimento stereospecifici, cioè da recettori per determinanti "self" (Boehm, 2006).

L'evoluzione del sistema immunitario dei Metazoi è partita da questi determinanti e recettori "self" che, all'interno della stessa specie, hanno cominciato a variare per mutazione creando un polimorfismo tale che permettesse l'adesione ed eventuale fusione solo con cellule aventi certi alleli. In questo modo sono andati sempre più perfezionandosi il riconoscimento allogenico e le risposte a esso conseguenti nell'ambito dell'istocompatibilità tra individui della stessa specie (Flajnik & Kasahara, 2010).

Nei Metazoi primitivi, come le spugne, i celenterati e i vermi piatti, le cellule immunocompetenti, non hanno solo un ruolo nelle difese dell'individuo, ma sono anche coinvolti nei meccanismi della nutrizione e delle escrezioni (Bilej et al., 2010). Con la formazione del celoma viene raggiunta una nuova tappa nello sviluppo dell'immunocompetenza: all'interno di questa cavità compaiono i primi emociti diversificati in forma e funzione.

Per ovvie ragioni, il campo dell'immunologia si è concentrato principalmente sul sistema immunitario adattativo, che si basa sull'attività delle immunoglobuline e dei recettori delle cellule T (TCR), e che sembra essere limitato ai Vertebrati, in particolare è ascritta ai vertebrati con mandibola (Gnatostomati) (Litman et al., 2005). Tuttavia, nei Vertebrati senza mandibola (Agnati), considerati il gruppo di organismi filogeneticamente più antico dei Vertebrati, sono stati individuati isolotti di tessuto linfoide nell'intestino e nel pronefro (Du Pasquier and Flajnik, 1998). Infatti gli Agnati utilizzano i linfociti in maniera diversa dagli altri Vertebrati, producendo specifiche proteine chiamate VLR, ricche di segmenti LRR (Leucine-Rich Repeats), prodotte da regioni genomiche in grado di effettuare riarrangiamenti per produrre migliaia di proteine diverse. I recettori VLR possono essere visti come gli equivalenti dei recettori degli antigeni presenti negli Gnatostomi. Inoltre recettori di linfociti T, TCR-like, e co-recettori CD4-like sono stati isolati e sembrano essere espressi esclusivamente nei linfociti delle lamprede (Agnati) (Pancer 2004).

A differenza di quella innata, l'immunità adattativa si acquisisce in seguito all'esposizione a uno specifico Antigene (Ag) e include: cellule presentanti l'antigene (APC) quali i macrofagi; proliferazione di linfociti B e T; produzione di anticorpi e citochine.

L'immunità innata invece è un processo di difesa cellulare a bassa specificità che serve a prevenire e combattere gli agenti infettivi che penetrano a livello tissutale, ed è l'unica forma d'immunità presente in invertebrati quali il riccio di mare.

L'interesse per gli approcci, di tipo comparativo, nello studio del sistema immunitario ha ricevuto maggiori attenzioni da quando sono state messe in luce alcune caratteristiche immunologiche comuni di riconoscimento dell'immunità innata, tra la *Drosophila melanogaster* e i mammiferi (Hoffmann, 2003; Janeway and Medzhitov, 2002).

Recenti scoperte suggeriscono che i meccanismi somatici di diversificazione dei recettori negli invertebrati sono molto simili a quelli del sistema acquisito dei Vertebrati (Alder et al., 2005; Pancer et al., 2004).

Dei 30 phyla bilateria che sono riconosciuti, soltanto i cordati, i molluschi, i nematodi, gli artropodi e gli echinodermi, sono stati oggetto di numerose ricerche in campo immunitario (Figura 6).

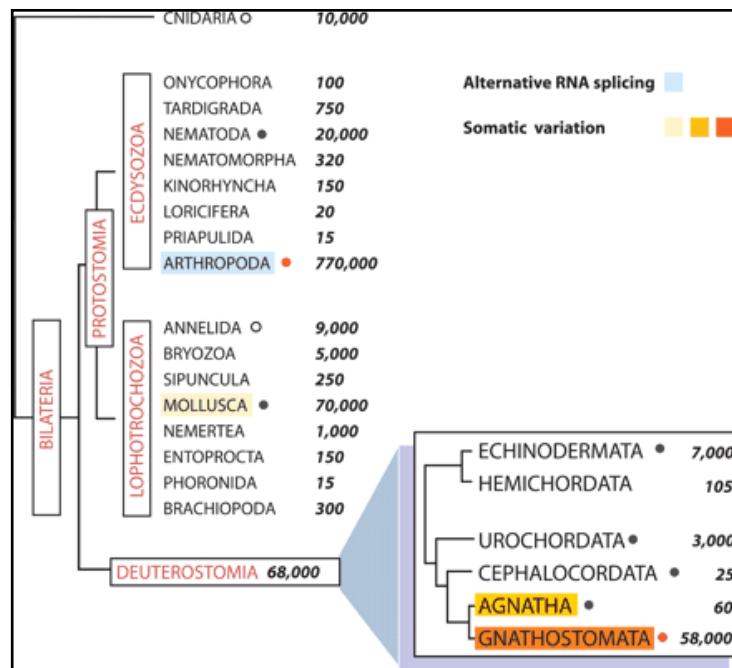


Figura 6: Albero filogenetico semplificato che delinea le relazioni generali dei principali phyla bilateria e subphyla chordate, evidenziando le specie che utilizzano diversi meccanismi somatici di diversificazione dei recettori immunitari.

La maggior parte dei dati funzionali e genetici, riguardanti il sistema immunitario, proviene, però, da solo due phyla animali: i Cordati (principalmente, dai mammiferi) e gli Artropodi (*D. melanogaster*) (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Analisi genomiche complete sull'immunità sono state, inoltre, condotte in altre tre specie d'invertebrati, *Ciona intestinalis* (Azumi et al., 2003), l'*Anopheles gambiae* (Christophides et al., 2002), e il verme nematode *Caenorhabditis elegans* (Millet and Ewbank, 2004).

1.4 Il sistema immunitario dei Vertebrati e Invertebrati

Il sistema immunitario dei Vertebrati rappresenta un prodotto dell'evoluzione specializzato e complesso. La sua principale funzione è di proteggere l'organismo da agenti estranei mediante la sintesi di molecole altamente specializzate, gli anticorpi, e la presenza di elementi cellulari, linfociti e fagociti, che contrastano e distruggono gli agenti infettivi (Jarilin, 1999; Rinkevich, 1999).

A differenza dei Vertebrati che attuano una difesa di tipo adattativo, gli Invertebrati effettuano una difesa immunitaria di tipo innato. Infatti il sistema immunitario degli Invertebrati agisce ad opera di due componenti principali (Chiaramonte and Russo, 2015):

- componenti cellulari (immunità cellulo-mediata) in cui gli effettori delle reazioni di difesa sono rappresentati dalle cellule del sangue (immunociti);
- fattori umorali cioè solubili nel plasma degli organismi, secreti dalle cellule stesse del sangue, quali lectine, agglutinine, lisine, citochine-like, peptidi antimicrobici, fenolossidasi e i metaboliti della cascata profenolossidasi. Tutte queste componenti agiscono in parallelo con le cellule del sangue per la difesa dell'ospite contro i patogeni ed altre sostanze estranee.

Negli Invertebrati, così come nei Vertebrati, sono presenti delle barriere chimico-fisiche che costituiscono una prima linea di difesa alle invasioni da parte di agenti estranei (Beschlin et al., 2000). La Figura 7 propone uno schema comparativo tra la risposta immune degli Invertebrati e dei Vertebrati (Chiaramonte and Russo, 2015). Tra le barriere fisiche ricordiamo l'esoscheletro dei coralli e degli Artropodi, il dermascheletro degli Echinodermi, la tunica dei Tunicati, la conchiglia dei Molluschi (Beschlin et al., 2000). Un esempio di barriera chimica è quella intestinale, determinata dalla presenza di soluzioni acide o basiche ed enzimatiche. In alcuni animali, come Cnidari, Anellidi e Molluschi, sono presenti delle secrezioni mucose che contengono lisozima con azione antibatterica.

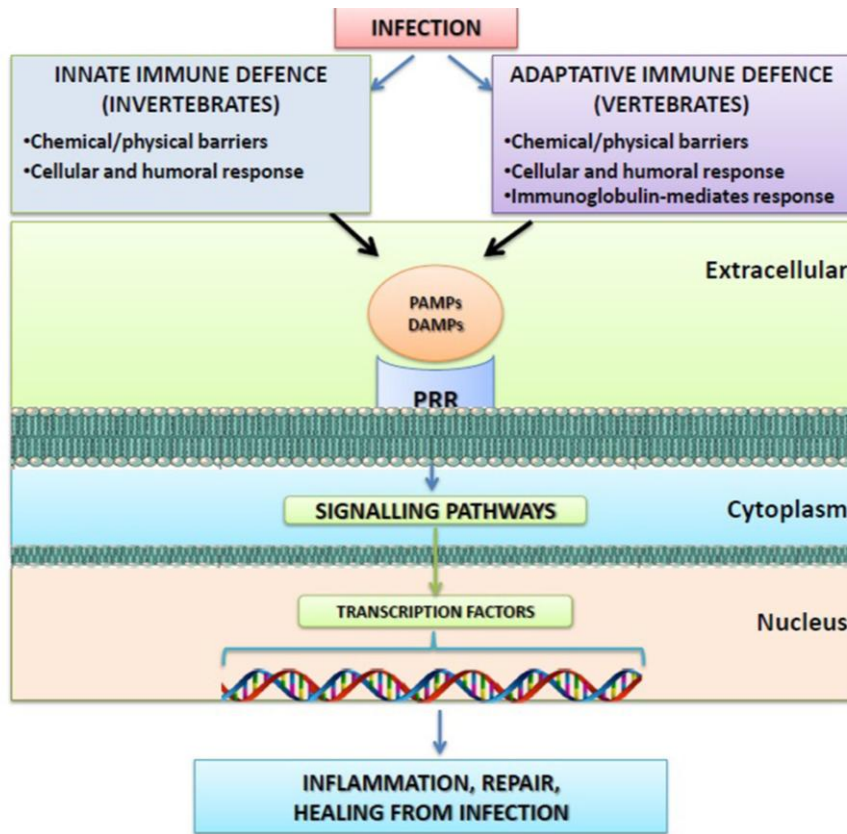


Figura 7: Meccanismi di risposta immunitaria innata e adattativa.

Se queste barriere sono superate, il sistema immunitario mette in atto una serie di meccanismi di risposta, sia aspecifici, come negli Invertebrati, sia specifici, come nei Vertebrati, volti a contrastare la possibile invasione da parte di batteri o virus.

Le due tipologie di risposta degli Invertebrati e dei Vertebrati anche se differenti in tempistica, efficacia e complessità, in quanto la prima è più rapida, meno efficace e più semplice nei passaggi, mentre la seconda è più lenta molto più efficace e più complessa nei passaggi, prevedono alcune fasi:

- 1) Il riconoscimento del patogeno grazie alla presenza di recettori che possono trovarsi sia sulla membrana plasmatica di alcune cellule immunitarie sia all'interno del loro citoplasma o sulla membrana degli endosomi.
- 2) La trasduzione del segnale, attraverso proteine che trasmettono il segnale dall'esterno della cellula, attraverso i recettori di superficie o endosomiali, all'interno della cellula.
- 3) La formazione di proteine che servono a contrastare la possibile l'invasione da parte di patogeni.

1.5 Il sistema immunitario degli Echinodermi

Negli Echinodermi, le cellule immunitarie sono tipi di cellule molto abbondanti e diversificate. Classificare in modo standard i tipi cellulari di tutti gli echinodermi è stato da sempre un compito difficile poiché queste cellule sono eterogenee per morfologia, dimensioni e funzioni.

Pubblicazioni iniziali sulle cellule immunitarie degli echinodermi sono apparse nel tardo 19° secolo (Geddes, 1879) e da allora sono state fatte molte descrizioni riguardanti la morfologia e le funzioni (Gross et al., 1999; Matranga et al., 2000; Smith et al., 2006).

Osservazioni di cellule vive, nel fluido celomatico (CF) dei ricci di mare, suggerivano la presenza di grandi categorie fondamentali di cellule immunitarie: amebociti fagocita, cellule a sferula e cellule vibratili (Smith et al., 1981). All'interno della categoria delle cellule a sferula si distinguevano sferule rosse e sferule incolori. Ulteriori tipi di cellule sono state riscontrate in specie non echinoidee, comprese le cellule cristalloidi e le cellule progenitrici, di cui si conosce molto poco. Boolotian e Giese (1958) identificarono tredici tipi di cellule in quindici specie di echinodermi, mentre Endean (1966) raggruppò ben diciotto popolazioni cellulari riunite in cinque classi.

Questi studi mostrano chiaramente la grande varietà morfologica delle cellule presenti nel liquido celomatico degli echinodermi. Tale varietà di cellule è riassunta nella figura sottostante (Figura 8), insieme alle particolari funzioni che sono state a esse attribuite.

Cell type	Present in class	Role	Reference
Discoidal cell	E, H	Phagocytosis, clotting, encapsulation, chemotaxis, opsonisation, graft rejection	(Coteur <i>et al.</i> , 2002; de Faria and da Silva, 2008; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Matranga <i>et al.</i> 2005; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Smith <i>et al.</i> , 2006)
Polygonal cell	E		
Small phagocyte	E, H		
Amebocytes /Phagocytes	E, H, A, C, O		
Colored spherule	E, H, C	Antibacterial activity	(de Faria and da Silva, 2008; Endean, 1966; Smith <i>et al.</i> , 2006)
Colorless spherule	E, H, A, C, O	Antibacterial, inflammation, Wound healing, ECM remodeling	(Coteur <i>et al.</i> , 2002; de Faria and da Silva, 2008; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Garcia-Arraras <i>et al.</i> , 2006; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Smith <i>et al.</i> , 2006)
Lymphocyte	E, H, A	Progenitor cells	(Coteur <i>et al.</i> , 2002; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Xing <i>et al.</i> , 2008)
Vibratile	E, H, A, O	Celomic fluid movement, clotting	(de Faria and da Silva, 2008; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Matranga <i>et al.</i> , 2005; Pinsino <i>et al.</i> , 2008; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Smith <i>et al.</i> , 2006; Xing <i>et al.</i> , 2008)
Crystal cells	H	Osmoregulation	(Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Xing <i>et al.</i> , 2008)
Hemocytes	H, A, O	Oxygen transport	(Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Pinsino <i>et al.</i> , 2008)

Figura 8: Tipi cellulari degli echinodermi

I profili delle cellule immunitarie possono variare non solo tra le specie, ma anche tra individui della stessa specie in considerazione delle loro dimensioni e condizione fisiologica (Matranga *et al.*, 2000). Le cellule immunitarie degli Echinodermi mediano la risposta immunitaria attraverso la fagocitosi (Bertheussen, 1983; Ito *et al.*, 1992), la citotossicità (Arizza *et al.*, 2007), l'attività antibatterica e anti-biofilm (Majeske *et al.*, 2013; Schillaci *et al.*, 2010), la formazione di capsule e il rigetto dei trapianti (Hildemann *et al.*, 1977; Hildemann and Dix, 1972); inoltre nel fluido celomatico sono stati trovati una varietà di fattori umorali quali batteriolisine, agglutinine (Pagliara and Canicatti, 1993), lectine (Cervello *et al.*, 1996; Parrinello *et al.*, 1979) che quando presenti agiscono insieme alle cellule immunitarie per la difesa dell'ospite contro i patogeni ed altre sostanze estranee, essendo molecole con attività antimicrobica, opsonizzante (attività in grado di potenziare la fagocitosi dei batteri) o litica.

1.6 Caratteristiche delle principali cellule immunitarie degli Echinodermi



Figura 8b: A) Fagocita. B) Amebocita rosso. C) Amebocita bianco D) Cellula vibratile.

Le cellule immunitarie adulte degli Echinodermi derivano da cellule embrionali che sono state ben descritte da Ho et al. (2016) sulla specie americana *S. purpuratus* e riassunte da Hirano (2016). Queste sono state classificate come segue, e alcune immagini relative ad esse sono mostrate in Figura 8b.

Fagociti

I fagociti rappresentano la popolazione cellulare più abbondante (80-85%) e sono le cellule immunitarie più comuni degli echinodermi (Matranga et al., 2005); essi corrispondono ai granulociti e ai macrofagi dei mammiferi ma non possiedono gli stessi marcatori specifici. Presentano un diametro variabile da 14 a 30 μm , con nucleo centrale rotondo (Bertheussen and Seljelid, 1982) e citoplasma ricco di granuli gialli e marroni.

I fagociti presentano, morfologicamente, due forme:

- la forma petaloide, nella quale il citoplasma è espulso in dei lembi simili a vescicole;
- la forma filopodiale, dove il citoplasma si estroflette in lunghi e sottili pseudopodi filiformi.

La maggior parte delle cellule, in vivo, presenta una forma petaloide o forma intermedia e il rapporto fra i due tipi morfologici variano da specie a specie.

Nel riccio di mare, *Strongylocentrotus droebachiensis*, il 20% dei fagociti ha forma petaloide e il resto ha una forma intermedia (Bertheussen and Seljelid, 1982). A differenza

della *Cucumaria miniata* che ha il 35 % a forma petaloide, il 7 % filopodiale e il resto forme intermedie (Fontaine & Lambert, 1977; Edds, 1977a,b).

Le due fasi morfologiche mostrano differenti proprietà funzionali; la forma petaloide è capace di movimenti ameboidi e attività fagocitiche, mentre quella filopodiale sembra che abbia un importante ruolo nell'agglutinazione delle cellule.

Il dimorfismo nei fagociti esiste in tutti i gruppi, eccetto i Crinoidei, dove le cellule immunitarie raramente producono pseudopodi. I fagociti dei Crinoidei sono capaci di una limitata locomozione e sono chiaramente solo fagociti (Cuénot, 1891; Endean, 1966).

Negli Asteroidei ed Echinoidei i fagociti sono tra i più numerosi tra tutte le cellule immunitarie (Johnson, 1969) (Endean, 1966; Vethamany e Fung, 1972) e in *Arbacia punctulata* costituiscono il 50% della popolazione totale (Liebman, 1950). Sono meno abbondanti negli Oloturoide, dove essi sono superati dagli emociti (Fontaine e Lambert, 1977). In *Holoturia leucospilota* solo il 10 % di cellule circolanti sono fagociti con oltre il 10 % di cellule fusiformi (Endean, 1958).

Un'altra funzione dei fagociti è la rimozione di cellule germinali rimaste nelle gonadi dopo che la maggior parte dei gameti sono stati liberati all'esterno. Sono state formulate alcune ipotesi riguardanti la partecipazione dei leucociti nei trasporti del materiale alimentare degli echinodermi. Cuénot (1891) ha supposto che le sostanze provenienti dalle cellule intestinali e finite nelle relative lacune vengono assunte dagli amebociti e trasportate nelle varie parti del corpo.

Altro ruolo svolto dai fagociti attivi degli echinodermi è la formazione di masse plasmodiali nel fluido periviscerale, dovute alla fusione di leucociti attivi. Questi sincizi costituiscono la migliore attività vitale per l'animale, poiché intervengono nella riparazione di ferite e nella sostituzione di parti perdute dell'organismo. Infatti concorrono alla riparazione delle ferite e formano la base per la crescita di altri tessuti (Théel, 1921).

Amebociti

Tra gli amebociti annoveriamo due importanti gruppi (Kindred, 1924):

- Amebociti colorati o Cellule rosse, caratterizzati dalla presenza di sferule con pigmenti rossi nel citoplasma;
- Amebociti non colorati o Cellule bianche, caratterizzati dalla presenza di sferule prive di colore.

La forma delle cellule varia da rotonda a ovoidale, con un diametro compreso tra 8 e 20 μm . In tutti e due i tipi cellulari le inclusioni sferiche (2-5 μm di diametro) riempiono così tanto il citoplasma da spingere il nucleo, piccolo ed irregolare, in un piccolo spazio quasi al centro della cellula.

Nel citoplasma sono presenti microtubuli, apparato del Golgi, reticolo endoplasmatico (liscio e rugoso), che probabilmente sono coinvolti nella sintesi delle sferule. In vitro le cellule con sferule sono abbastanza stabili e possono esibire rapidi movimenti di tipo ameboide (0.5 $\mu\text{m s}^{-1}$) attraverso la formazione di corti pseudopodi (Matranga et al., 2005).

Le cellule immunitarie con sferule rosse sono state osservate negli Echinoidei e in alcuni Oloturoidei mentre quelle non colorate negli Ofiuroidei, Echinoidei ed Oloturoidei.

Negli Echinoidei la pigmentazione rossa è dovuta alla presenza di naftochinone, detto echinocromo (MacMunn, 1886). Un composto simile detto spinocromo è stato individuato nel tegumento e negli aculei del riccio di mare.

Cellule vibratili

Secondo Kindred (1924) sono strane cellule immunitarie che appaiono in *Ophiopholis aculeata*, *S. droebachiensis*, *S. franciscanus*, *Stichopus californicus*. In *O. aculeata* le cellule vibratili sono molto piccole (3 μm di diametro), con un nucleo relativamente grande e un piccolo alone periferico di citoplasma granulare. All'estremità della cellula è presente un singolo lungo flagello.

A causa della loro ridotta distribuzione, le cellule vibratili sono state oggetto di diverse controversie: alcuni ricercatori le hanno considerate come protozoi parassiti, altri come cellule sfuggite dal peritoneo, gameti o artefatti (Hetzel, 1963; Endean, 1966).

Celomociti

I celomociti, propriamente detti, sono cellule sferiche o ellissoidali, con una membrana elastica, ma prive di pseudopodi. Il citoplasma omogeneo ha la colorazione dell'emoglobina e all'interno presenta un piccolo nucleo ovoidale.

Kindred nel 1924 ha riscontrato tali cellule in *Cucumaria* ma non in *Stichopus*. In *C. chronjhelmii* è chiaramente visibile un contenuto granulare nel nucleo.

Osservando allo spettroscopio un estratto di tali cellule si ottiene una banda caratteristica di ossiemoglobina; dopo esposizione all'aria le bande di ossiemoglobina si duplicano. Questi esperimenti, con i relativi risultati ed altri test chimici, hanno indotto Van der Heyde (1922) a concludere che la sostanza in esame è riferibile all'emoglobina.

Kindred si è chiesto come cellule trasportatrici di ossigeno possano essere presenti soltanto in alcuni Oloturoidei. Egli aveva considerato non indispensabile la presenza di tali cellule in Asteroidei, Ofiuroidei ed Echinoidei, dato il relativamente basso fabbisogno di ossigeno, che può essere loro fornito da ossigeno libero del fluido periviscerale.

L'emoglobina delle diverse specie di Oloturoidei mette in evidenza un'ampia gamma di bande nello spettro di assorbimento (Hogben e Van der Lingen, 1928; Kobayaschi, 1932; Crescitelli, 1945); ciò significa che esistono diversi tipi di emoglobina in diversi tipi di animali. Strutturalmente questi pigmenti assomigliano all'emoglobina dei vertebrati ma hanno un basso peso molecolare (Farmanfarmaian, 1966) ed hanno uno spettro leggermente diverso (Crescitelli, 1945).

Cellule cristalloidi

Sono insolite cellule immunitarie presenti negli Oloturoidei (Hetzl, 1963; Fontaine e Lambert, 1977). In genere hanno forma romboidali, lunghezza variabile (2-24 μm), includono da uno a tre cristalli di forma stellata, costituiti da materiale ancora sconosciuto e circondato da un sottile alone di citoplasma (Hetzl, 1963). I cristalli, estremamente instabili, ad ogni stress osmotico si dissolvono rapidamente, cosicché le cellule sono molto difficili da fissare e colorare.

1.6.1 Classificazione delle cellule immunitarie di *P. lividus*

Nel sistema acquifero del *P. lividus* circola il fluido celomatico, il quale contiene una popolazione di cellule coinvolte in una serie di funzioni biologiche, tra cui quelle implicate nei meccanismi di difesa immunitaria

La popolazione di cellule immunitarie di *Paracentrotus lividus* risulta composta principalmente da tre tipi cellulari mostrati in Figura 9 comprendenti diversi morfotipi (Pinsino and Matranga, 2015):

- I fagociti rappresentano la popolazione di cellule immunitarie più abbondante del fluido celomatico circa 80% (Arizza et al., 2007; Smith et al., 2010). Queste cellule immunitarie presentano una forma molto simile che però può subire una transizione morfologica da petaloide a filopodiale. Questa trasformazione avviene grazie alla riorganizzazione dei microfilamenti del citoscheletro (Henson et al., 1992). I due differenti morfotipi possiedono differenze funzionali, infatti la forma petaloide è implicata in processi di fagocitosi mentre la filopodiale induce la formazione del coagulo.

- Gli amebociti (rossi e bianchi) costituiscono il 13% della popolazione totale di cellule immunitarie. Sono in grado di muoversi grazie a rapidi cambiamenti della forma del corpo, con movimenti che ricordano quelli di una ameba. Probabilmente gli amebociti sono coinvolti nella prima fase della risposta immunitaria con immobilizzazione del patogeno (Smith, 1981). Gli amebociti rossi possiedono al loro interno dei pigmenti rossi naturali con proprietà anti-battericida (Service and Wardlaw, 1985)(Smith, 1981). Il rapporto tra le due diverse tipologie, amebociti rossi e bianchi, dipende dallo stato di salute del riccio a cui appartengono.
- Le cellule vibratili costituiscono circa il 7,45% della popolazione cellulare totale (Matranga et al., 2005). Sono cellule di forma rotonda, si muovono in linea retta con movimenti molto rapidi e possiedono un unico lungo flagello. Le cellule vibratili contengono grandi granuli citoplasmatici che partecipano a fenomeni di coagulazione (Smith et al., 2010).

Il rapporto fra questi tipi cellulari varia considerevolmente in conseguenza del periodo dell'anno, temperatura dell'acqua, tempo di stabilizzazione (Matranga et al., 2000).

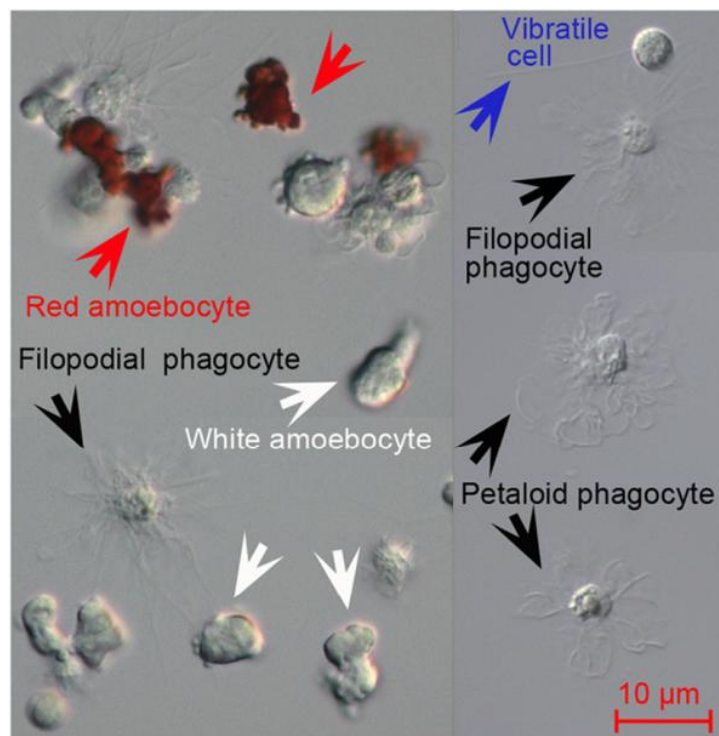


Figura 9: Cellule immunitarie di *P. lividus*

1.7 Meccanismi cellulari negli echinodermi

Una prima linea di difesa cellulare è rappresentata dalla fagocitosi (Figura 10), in cui sono riconosciute le seguenti fasi: chemiotassi, adesione, ingestione (tramite la formazione di pseudopodi avvolgenti), e uccisione, con una sequenza di eventi comparabile a quella presente nei vertebrati. I responsabili dell'attività di fagocitosi sono i fagociti, soprattutto nella forma petaloide (Kindred 1921; Boolotian e Giese 1958; Johnson 1969c) anche se Boolotian e Giese affermano che sia la forma petaloide che filopodiale sono fagocitiche. E' stato osservato un qualche grado di specificità e Johnson ha scoperto che i celomociti di *S. purpuratus* e *S. franciscanus* ingeriscono maggiormente i GRAM positivi rispetto ai GRAM negativi. Reazioni di fagocitosi, *in vitro*, da parte dei fagociti del riccio di mare, *Strongylocentrotus nudus*, verso eritrociti umani e di montone, hanno rivelato che l'assorbimento delle cellule target avviene entro trenta minuti; inoltre eritrociti opsonizzati con il fluido celomatico di animali che sono stati pre-iniettati con eritrociti incrementavano la velocità di fagocitosi rispetto agli eritrociti non opsonizzati (Ito et al., 1992). Anche in *Strongylocentrotus purpuratus* Hilgard e Phillips (1968) riportano che le cellule immunitarie sono capaci di distinguere tra proteine "self" e "non self". Kaplan e Bertheussen (1977) hanno trovato in *S. droebachiensis* una distribuzione dei recettori per il C3 sui fagociti uguale alle cellule di Kupffer del ratto e alle cellule peritoneali di topo.

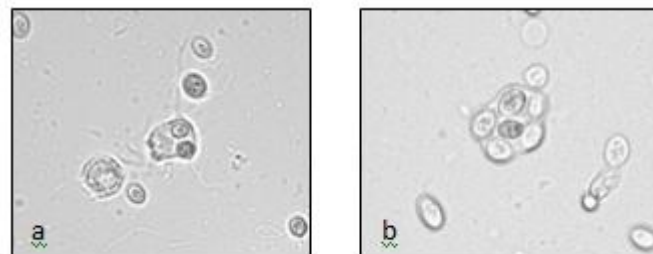


Figura 10:Attività di fagocitosi dei fagociti di *Strongylocentrotus purpuratus* contro lieviti *Saccharomyces cerevisiae* (a - b).

Una reazione alternativa di fronte alla presenza di patogeni invasori nel celoma, qualora siano troppo grandi o troppo numerosi da non poter essere eliminati dalla sola fagocitosi, è la formazione di aggregati multicellulari (clumping), chiamati noduli o capsule, che inglobano le particelle estranee. La formazione di cellule giganti multinucleate è, quindi, interpretata come il comportamento di quei fagociti designati ad avvolgere un grande corpo estraneo (Bertheussen and Seljelid, 1982; Dan-Sohkawa et al., 1993; Thoenes et al., 1982). Questa caratteristica fusogena dei fagociti è stata riportata *in vitro* in tutti gli echinodermi. La configurazione dei sincizi varia da una massa di citoplasma voluminosa, nel caso di oloturia, ad una struttura fine lamellipodiale in riccio di mare (Dan-Sohkawa et al. 1993). E' stato dimostrato di recente che

alcuni meccanismi cellulari, sono dipendenti da una cooperazione tra cellule immunitarie (Arizza et al. 2007). Lo sviluppo delle “masse” è sempre preceduto da un’iniziale adesione di amebociti al materiale estraneo e, come negli altri invertebrati, questo primo stadio di riconoscimento è sempre seguito dall’aderenza di un gran numero di altri amebociti alle cellule o particelle estranee (Johnson 1969). Inoltre gli amebociti rilasciano mucopolisaccaridi acidi o echinocromo che può influenzare, in seguito, l’adesione di cellule o avere effetti killer extracellulari.

Le cellule citotossiche presenti negli echinodermi hanno una buona capacità di distruggere le cellule estranee (Figura 11), tuttavia sul loro meccanismo d’azione non si hanno ancora molte informazioni, anche se si può ipotizzare un’articolazione in più fasi, la prima delle quali consiste nel riconoscimento delle cellule bersaglio mediante l’interazione recettore-ligando.

In *P. lividus*, l’attività citotossica saggiata in vitro contro eritrociti di coniglio e cellule della linea tumorale K-562 si è rivelata Ca^{2+} dipendente (Arizza et al. 2007). Inoltre tale attività sembra essere svolta dagli amebociti non colorati in cooperazione con i fagociti (Arizza et al. 2007). L’attività citotossica in seguito al rilascio di lisine da parte amebociti non colorati risulta essere amplificata da fattori solubili rilasciati dai fagociti.

Precedenti studi riportano un’attività calcio-dipendente citolitica, nei confronti degli eritrociti di coniglio, che sembrerebbe essere attribuita al contenuto dei granuli degli amebociti (Canicattì 1991; Pagliara and Canicattì 1993).

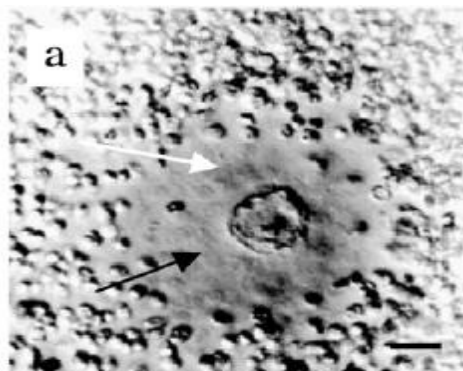


Figura 11: Formazione di placche di lisi in *P. lividus* contro eritrociti di coniglio

Nel riccio di mare *Lytechinus pictus* (Coffaro e Hinegardner, 1977) gli amebociti rossi caratterizzano la prima grossa risposta, agli allotrapianti, migrando dal sottostante tessuto e rimanendo presenti durante il periodo del rigetto. Il rigetto del trapianto è mediato probabilmente dalle cellule immunitarie del tessuto e non da quelle circolanti (Holland et al. 1965; Coffaro 1979).

Tuttavia, l'esatto meccanismo attraverso cui si compie il rigetto dei trapianti negli echinodermi è ancora sconosciuto.

1.8 Meccanismi umorali negli Echinodermi

Lisine

Le lisine sono molecole litiche che sono state osservate in molte specie di echinodermi, come Asteroidea, Echinoidea e Oloturoidea. Queste molecole sono contenute nelle cellule immunitarie e sono rilasciate in seguito a stimolazione con sostanze estranee.

Attraverso l'uso di una vasta gamma di target eritrocitari è stata esaminata la reattività delle lisine che risulta essere variabile e dipende dal numero e dal tipo di eritrociti; inoltre è stata dimostrata la loro natura proteica (Parrinello et al. 1979; Leonard et al. 1990).

Sebbene l'attività emolitica sia aumentata dal calcio, questo ione non è sempre necessario, come avviene, ad esempio, in *Marthasterias glacialis* e *A. forbesi*.

Non si conosce bene il ruolo degli ioni calcio, ma si pensa che questi possano agire come mediatori per le interazioni tra le emolisine e le cellule target, oppure, come agenti stabilizzanti la struttura delle molecole litiche. Una terza ipotesi suggerisce che gli ioni calcio possano essere coinvolti nella polimerizzazione delle emolisine durante il danneggiamento della membrana delle cellule target (Parrinello et al. 1979).

Le lisine non sono solo presenti naturalmente nel fluido celomatico ma possono anche essere indotte. Canicattì (1992) aveva separato due emolisine, prodotte dai fagociti, usando un gradiente a densità discontinua. La prima era un'emolisina termolabile e calcio-dipendente, mentre la seconda era termostabile e calcio-indipendente. Le due componenti sono state isolate e sembrano essere due isoforme avendo in comune una identità sierologica e lo stesso peso molecolare. Entrambe le molecole resistono alla tripsina ma sono sensibili alla pepsina.

L'effetto citolitico consiste nella produzione di buchi transmembrana di diversa misura (5-20 nm). Le membrane degli eritrociti di coniglio, lisati dalle emolisine di *P. lividus*, osservate al microscopio elettronico, presentano dei buchi circolari di 10 nm che somigliano al MAC (membrane attack complex) presente nei vertebrati. Sebbene il meccanismo litico sia stato dimostrato per target eritrocitari, esso può essere usato contro cellule diverse: cellule trasformate, parassiti e batteri. L'attività opsonizzante delle proteine litiche mostra l'evidenza della loro partecipazione nella risposta infiammatoria; questo, ad esempio è stato

dimostrato negli Echinoidei *S. droebachiensis* (Bertheussen 1983) e *S. nudus* (Ito et al. 1992) dove le lisine sembrano essere opsonine.

E' stato notato un certo grado di similitudine funzionale tra le lisine degli echinodermi e le proteine "pore-forming" dei linfociti e della cascata del complemento dei vertebrati. Le relazioni filogenetiche tra le proteine litiche dei vertebrati e degli echinodermi potrebbero implicare un comune antenato evolutivo. Comunque, le similarità funzionali tra i due sistemi litici, potrebbero indicare un caso di evoluzione convergente.

Le cellule autogeniche non vengono né danneggiate né lisate, poiché, probabilmente, mancano i recettori che legano le emolisine o per la presenza nelle loro membrane di componenti protettive (Tschopp et al. 1986).

Agglutinine

Le agglutinine sono contenute nel fluido celomatico di differenti specie di echinodermi (Ey e Jenkin 1982); generalmente sono molecole termo-stabili, calcio-dipendenti e con una spiccata capacità di agglutinare target eritrocitari (Finstad et al. 1972; Parrinello et al. 1976; Bertheussen 1983), inoltre agiscono da opsonine, cioè da molecole che rivestono un microrganismo, aumentando l'efficienza della fagocitosi in quanto esse sono riconosciute dai fagociti.

Parecchi risultati suggeriscono che le agglutinine costituiscono un gruppo di molecole adesive coinvolte in tutti quei processi fisiologici che richiedono interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, quali la coagulazione, la riparazione di ferite e l'incapsulamento. Le agglutinine di *H. polii* (Canicattì e Rizzo 1991) e *P. lividus* (Canicattì et al. 1992) aumentano le proprietà adesive delle proprie cellule circolanti. Si è visto che queste molecole somigliano, sia per quanto riguarda la massa molecolare sia per le proprietà biologiche, a quelle delle cellule libere del fluido celomatico (Canicattì e Parrinello 1983; Canicattì e Rizzo 1991).

Sostanze antibatteriche e antifungine

I peptidi antimicrobici (AMP) sono importanti molecole immunitarie effettrici presenti negli invertebrati, compresi gli echinodermi, i quali non posseggono un sistema immunitario adattativo.

Gli AMP sono proteine di piccola taglia molecolare molto conservate, tipiche della risposta immunitaria innata. Tali peptidi hanno un ampio spettro di attività antimicrobica contro batteri, virus e funghi (Mookherjee and Hancock 2007).

Ad oggi sono stati individuati oltre 1500 AMP; tra essi, le strongilolisine sono una nuova famiglia di AMP ricchi in cisteina, recentemente identificate nei ricci di mare, *Strongylocentrotus droebachiensis* e *S. purpuratus*. Sebbene queste molecole presentino diverse sequenze di amminoacidi, hanno in comune un identico modello di disposizione della cisteina, dissimile da altri AMP noti. Una famiglia di AMP eterodimerica, chiamata centrosine, è anche presente in *S. droebachiensis*. Inoltre lisozimi e frammenti di proteine più grandi, come le beta-timosine, actina, istoni 2A e filamina A, sono stati individuati nelle attività antimicrobiche degli echinodermi.

In particolare nel fluido celomatico di *Paracentrotus lividus* è stata individuata una varietà di peptidi antimicrobici (AMP) con capacità inibitoria e proprietà antibiofilm contro un gruppo di batteri Gram-positivi, Batteri Gram-negativi e funghi (Schillaci et al. 2010).

Gli AMP si caratterizzano come peptidi aventi meno di 100 amminoacidi, e di solito sono cationici. Quasi tutti i peptidi antimicrobici formano strutture anfipatiche. L'idrofobicità consente la solubilità in acqua dei peptidi antimicrobici, in modo da interagire con il doppio strato lipidico idrofobo della membrana microbica. Gli AMP, per via della loro natura cationica, sono suscettibili ad essere attratti e ad attaccarsi alle membrane batteriche con carica negativa.

Il meccanismo con cui gli AMP interagiscono con le strutture della parete cellulare di batteri Gram-negativi e Gram-positivi è ancora poco conosciuto (Brogden 2005). Tuttavia, una volta che i peptidi sono in contatto con il foglietto esterno della membrana cellulare e il rapporto peptide/lipidi aumenta, questi cominciano a formare multimeri o associazioni autonome sulla parte esterna della membrana (Yang et al. 2001).

Alte concentrazioni di peptidi orientati perpendicolarmente e inseriti nel doppio strato lipidico, compromettono l'integrità della membrana.

Nuovi paradigmi, implicano che la formazione di pori non è il solo meccanismo di attività antimicrobica, infatti, alcuni peptidi sono anche in grado di interagire con target intracellulari senza compromettere l'integrità della membrana. I target intracellulari dei peptidi antimicrobici variano dagli acidi nucleici alle proteine enzimatiche (Brogden 2005).

Gli AMP sono espressi in modo costitutivo oppure l'espressione è indotta da esposizione ad agenti patogeni.

Tali peptidi, non solo, inattivano i batteri in vitro ed in vivo, tutelando così l'organismo da un'ampia varietà di infezioni, ma modulano anche la risposta immunitaria (Diamond et al., 2009; Hancock et al., 2006; Zasloff, 2002).

Vale la pena ricordare che qualche AMP svolge un ruolo di anti-endotossine (Scott et al., 2002) e potrebbe anche indurre la produzione di citochine e chemochine (Bals and Wilson, 2003). Queste funzioni immuno-modulatorie non uccidono direttamente i microbi, ma determinano il reclutamento e l'attivazione di cellule immunitarie e di molecole di segnalazione che migliorano il sistema di difesa dell'ospite.

Diverse molecole antimicrobiche sono state isolate da echinodermi, tra cui un echinocromo (Kuwahara et al., 2009; Service and Wardlaw, 1985), glicosidi steroidei (Andersson et al. 1989; Chludil et al. 2002; Levina et al. 2009) e steroli poliossidrilati (Iorizzi et al. 1995). Anche se questi risultati indicano che gli echinodermi presentano una notevole attività contro i microbi, solo alcuni AMP sono stati segnalati come peptidi antimicrobici negli echinodermi.

1.9 PAMP, DAMP e PRR

L'immunità innata permette di riconoscere i patogeni grazie a dei particolari recettori delle cellule, che si legano a delle caratteristiche molecole o porzioni di molecole che sono identificate come “*non self*”.

Questa gamma di molecole riconosciuta dalle cellule dell'immunità innata, nota come Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) è limitata, dal momento che i recettori (Pattern Recognition Receptors, PRR), possiedono una variabilità di gran lunga inferiore rispetto a quelli dell'immunità adattativa, che possono riconoscere diversi milioni di molecole differenti (Gay and Gangloff, 2007). Oltre ai PAMP, espressi esclusivamente da agenti patogeni microbici, i recettori riconoscono anche i Danger-Associated Molecular Patterns (DAMP) che sono proteine intracellulari, quali le proteine da shock termico (Heat-shock protein) (Panayi et al., 2004) e frammenti proteici della matrice extracellulare, rilasciate da cellule necrotiche o morenti.

Tra le molecole più comuni che fanno parte dei PAMP ci sono i vari componenti della parete cellulare batterica come il LipoPoliSaccaride (LPS), peptidoglicano (PGN) e lipopeptidi, nonché la flagellina, il DNA batterico e l'RNA virale a doppio filamento (dsRNA).

I PRR sono presenti in molti tipi di cellule, sono di diversa natura, e sono raggruppati in diverse famiglie (Gay and Gangloff, 2007):

- Le **lectine di tipo C** sono delle proteine transmembrana calcio-dipendenti che riescono a legare alcuni polisaccaridi batterici con strutture diverse rispetto a quelle dei mammiferi. Le vie di trasduzione scatenate dalle lectine di tipo C spesso si congiungono con quelle attivate dai TLR.
- Gli **NLR** (NOD-likereceptors) riconoscono specifiche molecole batteriche e scatenano la trasduzione del segnale che attiva NF- κ B, il quale trascrive geni coinvolti nelle risposte infiammatorie.
- Le protein **CARD** (*Caspase Activation and Recruitment Domain-containing proteins*) riconoscono RNA virale.
- I recettori **SRCR** (*Scavenger receptor cysteine-rich*) hanno anche la capacità di legare particolari strutture presenti sulla superficie di agenti infettivi e di proteggere l'ospite da eventuali endotossine batteriche.
- I **TLR** (*ReceptorToll Like*) che sono la classe principale di recettori dell'immunità innata e riconoscono una vasta gamma di molecole estranee.

1.10 Struttura e famiglie dei recettori TLR

Questi recettori, scoperti per la prima volta in *Drosophila melanogaster*, si trovano sulla superficie delle cellule o all'interno di endosomi (Anderson et al., 1985). Questi ultimi sono dei corpi vescicolari il cui compito è quello di partecipare all'endocitosi, ovvero al meccanismo cellulare che permette il transito attraverso la membrana di macromolecole e corpuscoli, le cui dimensioni non consentono l'ingresso attraverso i meccanismi del trasporto di membrana.

I recettori TLR sono recettori di membrana integrali di tipo I, ciascuno con un dominio di riconoscimento N-terminale che lega l'antigene, una singola elica transmembrana, e un dominio C-terminale per la segnalazione citoplasmatica (Bell et al. 2003).

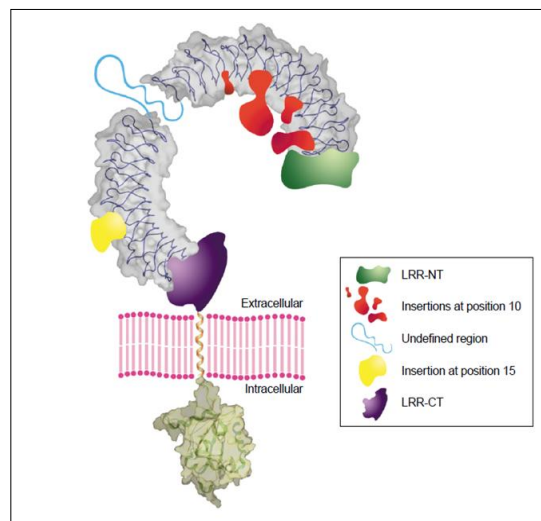


Figura 12: Struttura TLR dimerica.

Una delle caratteristiche dei TLR è che sono costituiti da copie in tandem di un motivo noto come *leucina-rich repeat* (LRR), che è tipicamente di 22-29 residui di lunghezza, contenente residui idrofobici distanziati a intervalli distintivi (Figura 12). Le strutture LRR sono responsabili del legame con il ligando (Jin and Lee, 2008).

La prima proteina descritta contenente strutture LRR è stata l'inibitore della ribonucleasi (RI) (Kobe et al. 1995). Le LRR in questa proteina sono relativamente lunghe, tipicamente 27-29 aminoacidi, hanno 3-4 giri di α -elica sulle loro superfici convesse opposte al β -foglietto. RI contiene 16 LRR che non formano un cerchio completo, ma formano una struttura a "ferro di cavallo".

Questo motivo è stato trovato in molte proteine, negli animali, piante e microrganismi, ed in molte proteine coinvolte nel riconoscimento immunitario (Palsson-McDermott et al. 2007).

La forma tridimensionale di tutte LRR è una struttura ad anello, che inizia con una lunga striscia che contiene tre residui nella configurazione β -strand (Bella et al. 2008).

Una caratteristica dei TLR-ECD, è il frequente verificarsi di LRR che sono sostanzialmente più grandi di 24 residui, specialmente in TLR 7, 8, e 9. Questi residui supplementari spesso producono anse che sporgono dal ferro di cavallo TLR-ECD, di solito su il lato ascendente o convesso della struttura.

I TLR-ECD contengono anche delle strutture nella parte N-terminale e C-terminale note come motivi rispettivamente LRR-NT e LRR-CT, contenenti residui di Cisteina (Matsushima et al., 2007).

Le LRR-NT sono formate da β -forcine disulfide-linked (β -hairpins disolfuro-linked), mentre i LRR-CT sono strutture globulari che contengono due α -eliche e vengono stabilizzati da due legami di disolfuro.

Motivi analoghi sono stati osservati in altre diverse proteine che contengono 24 residui LRR (He et al., 2003).

I domini di segnalazione dei TLR sono conosciuti come domini Toll IL-1 Receptor (TIR) perché condividono un'omologia con i domini di segnalazione dei membri della famiglia delle interleuchine, IL-1R (O'Neill et al. 2007). I domini TIR si trovano anche in molte proteine adattatrici che interagiscono con i domini TIR dei recettori TLR ed eseguono il primo passo nella la cascata di segnalazione.

Sorprendentemente, omologhi dei domini TIR si trovano anche in alcune proteine delle piante che conferiscono resistenza agli agenti patogeni (Burch-Smith et al. 2007), suggerendo che il dominio TIR rappresenta un antichissimo motivo che si è evoluto, con una funzione immunitaria, prima che ci fosse la divergenza di piante e animali.

Nel riccio di mare si prevede possano esserci circa 222 TLR e ben 26 adattatori (Sodergren et al., 2006, Hibino et al., 2006). In *Drosophila*, invece, si conoscono circa 10 TLR con funzioni e strutture molto simili a quelli umani (Jean-Luc Imler & Zheng 2004)

Tali geni sono stati suddivisi in famiglie:

Sulla base di omologie di sequenza, i TLR dei Vertebrati possono essere raggruppati in sei sottofamiglie (Matsushima et al., 2007; Roach et al., 2005) più precisamente:

- *TLR1/2/6/10*
- *TLR3*
- *TLR4*
- *TLR5*
- *TLR7/8/9*
- *TLR11/12/13/21/22/23*

Tutti i TLR assumono la tipica forma a ferro di cavallo (Botos et al., 2011)

I TLR funzionano come dimeri, più precisamente, TLR1 e TLR2 eterodimerizzano tra loro, e il dimero riconosce i lipopeptidi triacetilati batterici. Il TLR2 eterodimerizza anche con TLR6, e riconosce lipopeptididi acetilati batterici. Il TLR4, il recettore per il lipopolisaccaride (LPS), omodimerizza così come il TLR9, il recettore per DNA contenenti motivi CpG non metilati che si trova in DNA batterici e virali. Anche il TLR3, che rileva l'RNA a doppio filamento (dsRNA) e il TLR5 che rileva la flagellina dei batteri, constano di omodimeri (Kumar et al., 2009).

1.11 Sottofamiglia TLR3

La sottofamiglia dei TLR3 è composta da recettori che riconoscono i dsRNA prodotti dalla maggior parte dei virus a un certo punto del loro ciclo vitale. A differenza dei vari recettori citoplasmatici per dsRNA, TLR3 è localizzato negli endosomi.

Alcuni studi su questi recettori (Leonard et al. 2008) hanno dimostrato che TLR3-ECD è monomericamente in soluzione ma si lega come dimero a segmenti di 45bp di dsRNA, lunghezza minima richiesta per l'attivazione di TLR3. I TLR3-ECD sono fortemente glicosilati infatti possiedono ben 15 siti di N-glicosilazione, di cui 11 sono visibili nella struttura cristallina.

Nella struttura del complesso TLR3-ECD-dsRNA, le superfici glycan-libere dei due TLR3-ECD generano con la molecola dsRNA una struttura a forma di "m" (Liu et al.2008) (Figura 13). Nessun cambiamento conformazionale nella struttura TLR3-ECD, si verifica dopo il legame con il ligando, ma il dsRNA interagisce in due siti di ciascun TLR3-ECD, uno vicino all'N-terminale e uno vicino al C-terminale, inoltre, i due ECDs interagiscono tra loro nei motivi LRR-CT. L'interazione simultanea di tutti e tre i siti è necessaria per il legame stabile tra dsRNA e TLR3 (Wang et al. 2010). I siti N e C-terminali del dsRNA sono separati da 55-60 Å mentre i due siti di N-terminali di ogni ECD, del complesso sono separati da 110 Å. Questa particolare distanza si correla con un dsRNA di lunghezza di ~ 45 bp e spiega perché i dsRNA di meno di 40 bp non possono legare o attivare TLR3 (Leonard et al. 2008).

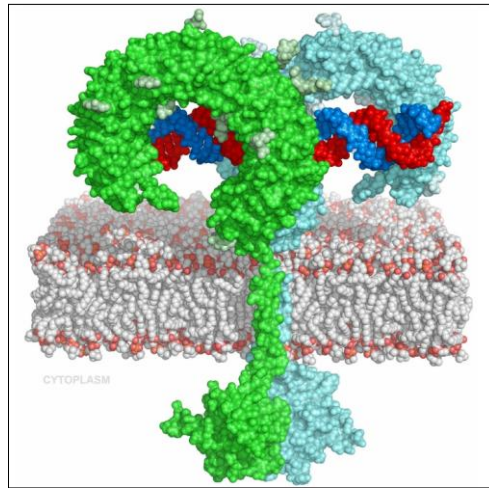


Figura 13: Struttura a forma di “m”.

Poiché le cellule, normalmente, contengono piccole porzioni (25 bp o meno) di dsRNA, per esempio in miRNA e le forcine dei tRNA, l’incapacità dei TLR3 di legare dsRNA con meno di 40 bp probabilmente, fornisce un importante meccanismo per prevenire reazioni auto-reattive contro self dsRNA.

Il sito di dimerizzazione è essenziale per legare il dsRNA (Wang et al. 2010) perché la corretta posizione dei quattro siti di legame dsRNA nel complesso porta, in aggiunta, i due residui C-terminali all’interno ~ 25 Å l’uno dell’altro.

1.12 Pathway di segnalazione dei TLR

La segnalazione dei TLR coinvolge una famiglia di cinque proteine adattatrici (O’Neill & Bowie, 2007) che si sono conservate durante l’evoluzione (Song et al., 2012), accoppiate, a valle, a proteine-chinasi che portano all’attivazione di fattori di trascrizione come il Fattore Nucleare kB (NF-kB), AP-1 e membri della famiglia dei regolatori dell’interferone (IRF).

Questi adattatori sono MyD88, MAL, noto anche come TIRAP (MyD88-adattator-like) (Horng et al., 2001), TRIF; noto anche come TICAM1 (TIR-domain contenente la proteina adattatrice che induce l’interferone-β)(Yamamoto et al., 2003), TRAM; anche noto come TICAM2 (molecola adattatrice correlata a TRIF) e SARM (proteina contenente α- and armadillo-motif sterile) (Sasai et al. 2005) (Figura 14).

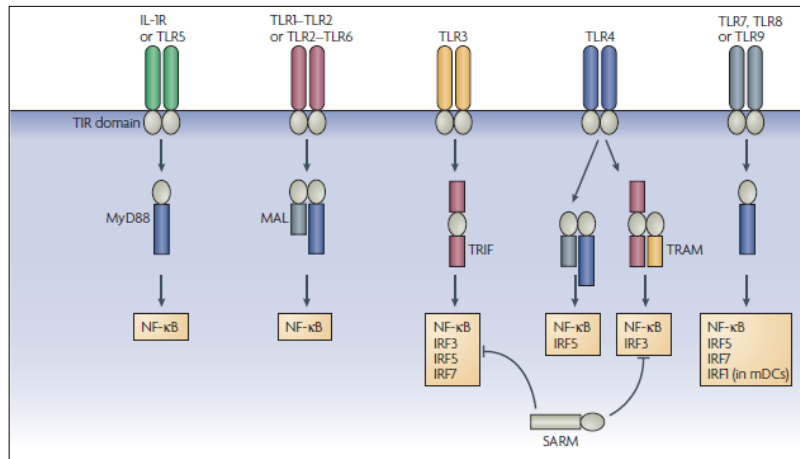


Figura 14: Proteine adattatrici.

Il pathway innescato dal TLR3 è MyD88-indipendente, a differenza degli altri TLR (Yamamoto et al., 2003).

L'attivazione del recettore innesca la produzione di diverse citochine infiammatorie (IFN- β , TNF- α , IL-1, ecc.) in risposta ad uno stimolo attraverso la proteina adattatore TRIF/TICAM-1 (Adachi et al. 1998; Yamamoto et al. 2002) che attiva il fattore di trascrizione IRF3/7 e il fattore di trascrizione NF- κ B (Figura 16).

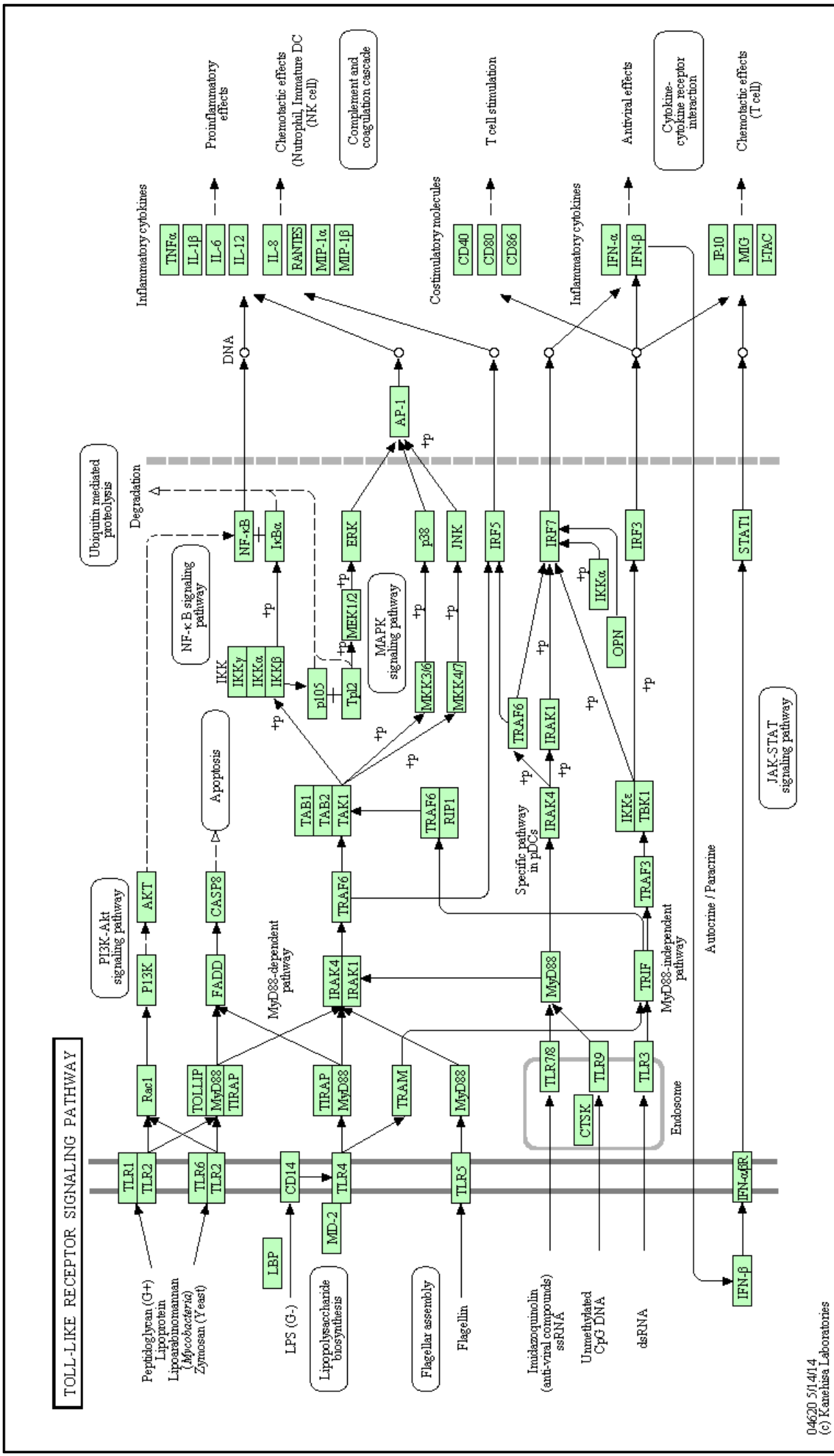


Figura 15: Pathway di segnalazione dei recettori Toll nell'uomo

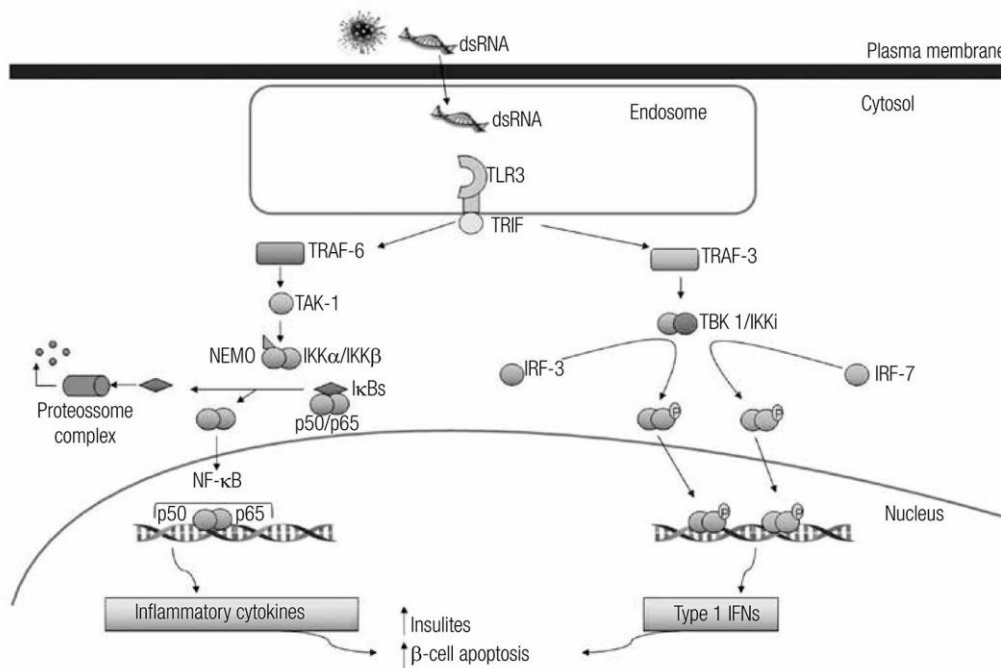


Figura 16: Pathway innescato dal TLR3

Poiché i pathway di segnalazione dei recettori TLR sono numerosi e complessi nei Vertebrati, come si può ben vedere in figura 14, e poco si conosce dei medesimi pathway negli Echinodermi, in questo lavoro si è concentrata l'attenzione sul pathway di segnalazione del recettore TLR3. Questa via prevede una cascata di segnalazione composta da quattro proteine esposte di seguito.

1. TRIF

Il **TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)** è una proteina adattatrice dei recettori Toll-like (Figura 17) (Yamamoto et al., 2003). Essa media la cascata di segnalazione di due pathway associati ai TLR, in particolare il TLR3 e il TLR4, inducendo la trascrizione di diverse citochine infiammatorie d'interferone (Lundberg et al., 2013)

La proteina TRIF possiede dei motivi d'interazione che permettono di reclutare (direttamente o indirettamente) le proteine effettrici quali, per esempio, TRAF3 per indurre l'attivazione di IRF3, ma può reclutare anche TRAF6/RIP1 (proteina recettore interagente 1) per indurre l'attivazione di NF- κ B (Gais et al., 2010)



Figura 17: Struttura proteica di TRIF

2. TRAF3

La proteina fa parte della famiglia dei **TNF receptor associated factor (TRAF)** e possiede un dominio conservato di aminoacidi al carbossi-terminale, “Traf-Domain” caratteristico della famiglia, necessario per il legame di queste proteine ad un'ampia varietà di molecole (Figura 18). Questa famiglia di proteine media la trasduzione del segnale da diverse tipologie di recettore. In particolare TRAF3 partecipa alla trasduzione del segnale del recettore TLR3 attivando una chinasi presente nella cascata, TBK1 (Oganesyan et al., 2006) (Häcker et al., 2006)

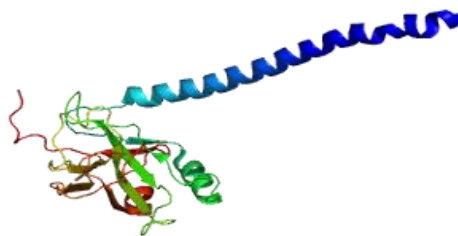


Figura 18: Struttura proteica di TRAF

3. TBK1

TANK-binding kinase 1 (TBK1) svolge un ruolo essenziale nel regolare le risposte infiammatorie contro agenti patogeni. Dopo l'attivazione del recettore TLR3 da parte di componenti virali, essa si associa con TRAF3 e TANK per fosforilare i fattori di regolazione dell'interferone (IRF), IRF3 e IRF7 (Shu et al. 2013).

Questa attività consente la successiva omo-dimerizzazione e traslocazione nucleare da parte di IRF3 che porta all'attivazione trascrizionale di geni pro-infiammatori e antivirali, tra cui IFN α e IFN β .

TBK1, inoltre, può anche formare diversi complessi con altre molecole, tra cui FADD, TRADD, MAVS, AZI2, TANK or TBKBP1/SINTBAD, in cui la composizione dipende molto dal tipo di cellula e dagli stimoli cellulari.

4. IRF

La famiglia dei fattori di regolazione dell'interferone (IRF) svolge un ruolo importante nella risposta del sistema immunitario all'infezione virale.

Le proteine di tale famiglia, IRF1, IRF2, IRF3 ecc. posseggono diversi domini funzionali tra cui un dominio di segnale di esportazione nucleare (NES), diversi siti di fosforilazione, un dominio C-terminale di associazione e una regione N-terminale di circa 120 aminoacidi che si ripiega per potersi legare specificamente alla sequenza *consensus* dell'interferone (ICS), che si trova a monte dei geni di interferone (Lin et al., 1999) (Figura 15).

Ad esempio IRF3 (Figura 19) si trova in una forma citoplasmatica inattiva che dopo la fosforilazione della serina/treonina forma un complesso con CREBBP (Hiscott, 2007). Questo complesso trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione degli interferoni α e β .

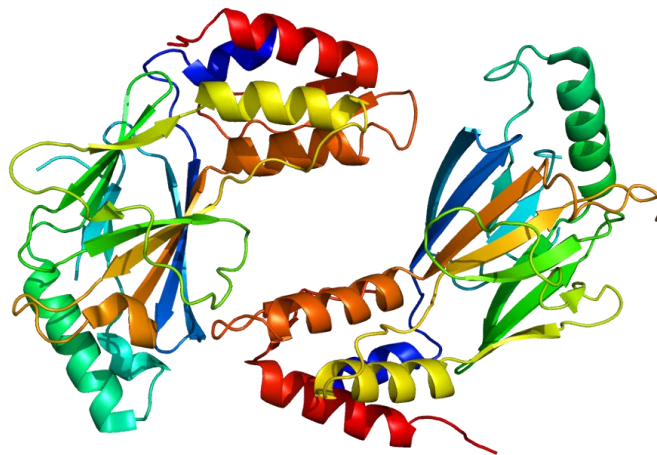


Figura 19: Struttura proteica di IRF3

1.13 Citochine responsabili dell'immunità innata

- TNF (fattore di necrosi tumorale)

Lo stimolo più efficace, per la produzione di questa citochina, è il legame che avviene tra i TLR e le componenti microbiche. Inoltre IFN- γ , prodotto dai linfociti T e dalle cellule Natural killer, fa aumentare la formazione di TNF (Zhang and Jianxiong, 2007). Quest'ultimo, all'origine, è prodotto come proteina non glicosilata associata alla membrana e poi, in seguito a scissione, è secreto sotto forma di proteina attiva. Esistono due recettori per TNF, TNFR1 e TNFR2; il primo è espresso sulla maggior parte delle cellule, mentre il secondo solo sulle cellule del sistema immunitario. Il legame ligando-recettore provoca l'associazione citoplasmatica del recettore con alcune proteine, tra cui NF- κ B e AP-1, che codificano per una serie di proteine coinvolte nella risposta infiammatoria e nell'azione antiapoptotica. Infatti l'interazione di TNF può anche scatenare apoptosi se legata al recettore, poiché è presente a livello citoplasmatico un cosiddetto dominio di morte che porta all'apoptosi. Il ruolo biologico di TNF è quello di indurre il reclutamento di neutrofili e monociti nel sito di infezione. Nell'uomo questa proteina ha un peso di circa 17kDa (Locksley et al., 2001).

- Interleuchina 1(IL-1)

L'attività biologica è quasi identica al TNF, se non che IL-1 non è in grado di indurre apoptosi e non riesce da sola a scatenare shock settico. Il recettore è rappresentato dai recettori di tipo IL-1 ed esistono due forme funzionali, IL- α e β . L'interazione con il recettore fa associare una proteina adattatrice al dominio TIR, che andrà poi ad attivare i fattori di trascrizione AP-1 e NF- κ B (Coprav et al., 2001).

- Interleuchina 6 (IL-6)

L'IL-6 è prodotta dai fagociti mononucleati ed è coinvolta nell'immunità sia specifica sia innata. È generata principalmente in risposta a TNF e IL-1 e stimola la produzione di proteine della fase acuta dal fegato e la differenziazione dei neutrofili. Inoltre è in grado di stimolare la crescita dei linfociti B e la proliferazione delle plasmacellule neoplastiche (Erta et al., 2012).

- Interferoni di tipo 1

Gli IFN 1 (IFN- γ non vi appartiene) sono una grande famiglia che media le fasi precoci della risposta innata a infezioni virali (Samuel, 2001) Il recettore per gli IFN1 appartiene ai recettori di tipo 2 associati a Jack1 e Tyk 2, che attivano STAT1 e STAT 2, i quali attivano IRF9, che causa la trascrizione di geni detti ISRE (Schroder et al., 2004). Esistono tuttavia altre vie di trasduzione. La produzione di IFN è scatenata dal riconoscimento di RNA virale da parte di TLR associate alle membrane endosomiali, che attivano l'IRF che ne induce l'espressione. Gli

IFN vanno a inibire la replicazione virale mediante trascrizione di enzimi che degradano l'RNA virale.

- Interleuchina 12

Svolge un ruolo fondamentale nelle risposte immunitarie cellulo-mediate e rappresenta un punto di collegamento tra immunità innata e specifica, in quanto è prodotta precocemente durante le risposte innate contro i microrganismi intracellulari e stimola nel contempo le risposte immunitarie specifiche dirette verso gli stessi microrganismi (Schoenhaut et al., 1992).

- Interleuchina 10

E' una citochina anti-infiammatoria che è prodotta principalmente da linfociti regolatori e agisce sui macrofagi attivati bloccandone le attività, in modo da riportare il sistema immunitario allo stato di quiescenza. Infatti è in grado di inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α e IL-12 (Iyer et al., 2012).

1.14 Recettori Toll-like negli Echinodermi

Una delle caratteristiche evolutive più sorprendenti del genoma è l'enorme ampliamento che si è compiuto nelle tre classi di proteine di riconoscimento dell'immunità innata. Nella tabella (Hibino et al., 2006) sotto riportata sono infatti evidenziati il numero di geni presenti nei diversi organismi.

Multiplicity of innate immune recognition proteins in representative protostomes and deuterostomes

	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	<i>S. purpuratus</i>	<i>C. intestinalis</i>	<i>H. sapiens</i>
TLR	9	1	222	3	10 (+1 ψ)
NLR	0	0	203	0*	~20
SRCR	14/7	3/1	1095/218	22/8 ^c	81/16
PGRP	15	0	5	0	6
GNBP	4	0	3	3	0

Ognuna di queste classi di recettori (TLR, NACHT, NLR, e SRCR) partecipa al riconoscimento di potenziali agenti patogeni attraverso il legame diretto o indiretto.

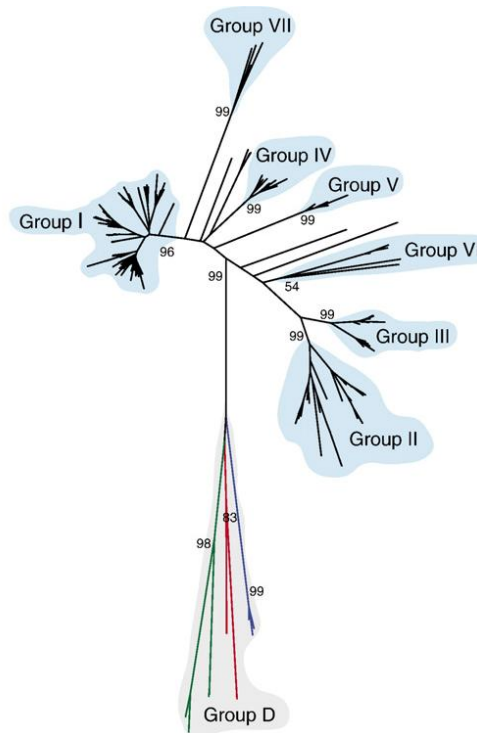
Si pensa che un numero relativamente piccolo di questi recettori sia sufficiente per rilevare una vasta gamma di patogeni. Per tale motivo, l'ampliamento di queste famiglie di geni, nel genoma di riccio di mare, suggerisce che ognuno di esse abbia un ruolo diverso nel meccanismo immunitario (Hibino et al., 2006).

Le proteine TLR sono presenti in tutto il regno animale e possono essere classificate in due grandi tipologie strutturali:

- La prima categoria, indicata come “vertebrate-like”, comprende tutti i TLR dei deuterostomi prima descritti e una minoranza di TLR degli insetti. Questi sono caratterizzati dalla presenza di motivi specializzati LRR, N-terminale e C-terminale (LRRNT e LRRCT), sia nelle estremità sia all'interno del solenoide.
- La seconda categoria, denominata “protostome-like”, comprende quasi tutti i geni trovati in insetti (es. Toll) e altri protostomi (es., il singolo gene TLR *Caenorhabditis elegans*, tol-1) caratterizzati da un “ecto-dominio” diviso da una coppia interna di LRRCT-LRRNT (Rock et al. 1998).

Il genoma di riccio di mare, più precisamente *S. purpuratus*, contiene ben 222 geni TLR (Hibino et al., 2006), suddivisi in due grandi categorie a seconda delle loro sequenze di dominio TIR:

- Un piccolo insieme di undici geni divergenti (Gruppo D)
- Un grande gruppo che comprende 211 geni che rientrano all'incirca in sette gruppi (gruppi I-VII).



Tra questi undici geni TRL, tre contengono introni, ma fanno parte dei “vertebrate-like”, mentre, quelli che sorprendono di più, sono i tre geni TLR di riccio di mare che possiedono una struttura “protostome-like” (Figura 20) (Hibino et al., 2006).

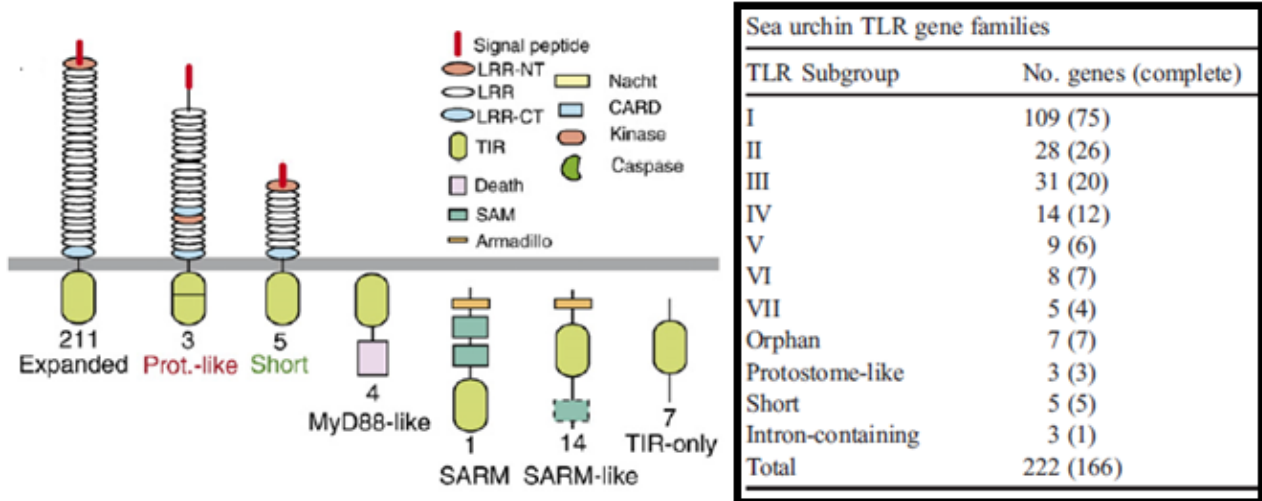


Figura 20: Famiglie geniche TLR in riccio di mare (Hibino et al., 2006).

Le regioni TIR di questi tre geni “protostome-like” mostrano una certa identità, nella sequenza primaria aminoacidica, con i geni dei protostomi, e condividono, con essi, un accorciamento, nella parte C-terminale, del dominio TIR, che non è presente nei TLR dei deuterostomi.

I restanti cinque geni TLR di riccio mare, detti “Short” codificano un insolito “ectodominio” breve (detto "Short") e possiedono affinità con i geni “protostome-like”. Buckley e

Rast (2012) riportano una classificazione diversa da Hibino, e annoverano la presenza di 235 geni TLR in *S. purpuratus*, di cui effettuano uno studio evolutivo comparato con i TLR della specie *L. variegatus*, in cui sono stati identificati 68 geni TLR (Smith et al. 2006).

1.15 Proteine adattatrici presenti nel pathway dei TLR negli Echinodermi

Sono stati identificati 26 geni che codificano per potenziali proteine adattatrici coinvolte nei meccanismi di segnalazione dei recettori TLR.

Queste includono un ortologo di MyD88, tre geni supplementari con un dominio di struttura MyD88-like, un ortologo di SARM, quattordici geni SARM correlati e sette geni che codificano per proteine citoplasmatiche con un dominio TIR di affinità ancora sconosciuta. Il dominio TIR è presente nelle proteine TLR ed è responsabile dell'attivazione della trasduzione del segnale in quanto permette l'avvio della cascata attivando molecole adattatrici.

I numeri elevati di proteine adattatrici evidenziano che, in aggiunta all'espansione dei geni TLR, è avvenuta una modesta espansione anche nelle proteine segnalazione dei TLR.

La presenza di elementi di trasduzione del segnale dei TLR nel genoma di *S. purpuratus*, omologhi agli elementi di segnalazione TLR osservati tra vertebrati e insetti (Akira et al. 2006), suggeriscono che l'impiego di proteine TLR possono portare, in maniera analoga, all'attivazione di geni rel/NFκB nelle cellule di riccio di mare.

Inoltre, l'elevata molteplicità delle proteine adattatrici contenenti domini TIR, potrebbe portare all'attivazione immunitaria di differenti combinazioni di diversi geni TLR.

SARM è un altro adattatore molecolare citoplasmatico che contiene, in aggiunta ad un dominio TIR, anche domini SAM e Armadillo.

Omologhi di questi geni sono stati trovati in *C.elegans*, *D. melanogaster* e vertebrati e, anche se la loro funzione non è ben compresa, si pensa che svolgano un ruolo nella segnalazione immunitaria (Liberati et al. 2004; McGettrick & O'Neill 2004; O'Neill et al. 2003). La presenza di molteplici geni SARM, può rappresentare una famiglia aggiuntiva di geni, dell'immunità innata, che si sono ampliati nel genoma di *S. purpuratus*.

Infine, potrebbero essere ancora identificati, nel genoma riccio di mare altri adattatori con domini TIR di vertebrati (Tirap/MAL, TICAM-1/TRIF e TICAM-2/TRAM) (Figura 21) (Hibino et al 2006).

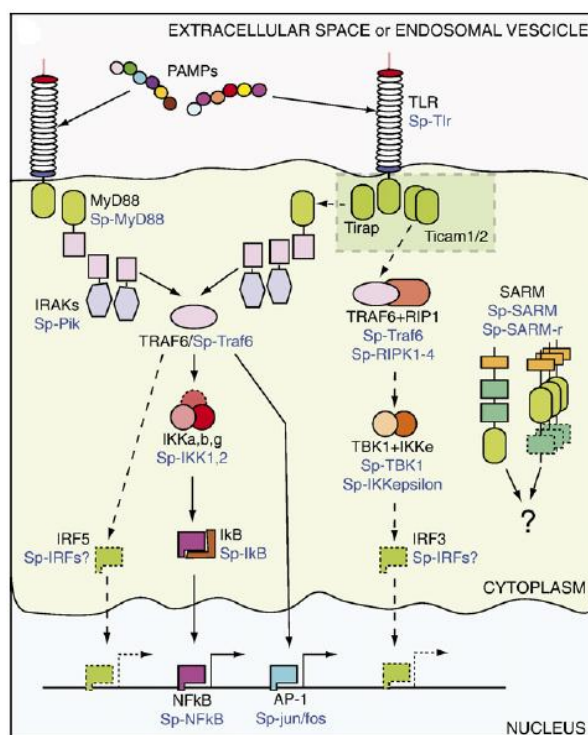


Figura 21: Pathway di segnalazione dei TLR in riccio di mare *S. purpuratus*.

1.16 Citochine-like presenti negli Echinodermi

Le citochine costituiscono una serie importante di proteine messaggere solubili e fanno parte di un sistema extracellulare di segnalazioni (network) che controlla ogni funzione cellulare, oltre che la risposta immunitaria innata e specifica.

La grande importanza di queste molecole, nei sistemi immunitari in vari gruppi filogenetici, suggerisce che le citochine si siano conservate attraverso l'evoluzione (Beck and Habicht, 1991). Anche negli Echinodermi ci sono prove circa la presenza di possibili molecole con attività citochine-simile. Infatti, nelle cellule immunitarie e nel fluido celomatico della stella di mare *Asterias forbesi* è stata isolata e caratterizzata per cromatografia una proteina che mostra attività simile all'IL-1 dei vertebrati; in particolare, nel fluido celomatico è stata identificata una frazione di circa 30 kDa che stimola la proliferazione cellulare, quando testata su cellule di mammifero (fibroblasti e timociti). Inoltre, Beck et al. (2000) hanno accertato la presenza sulle cellule immunitarie di *A. forbesi* di una proteina di membrana di circa 70 kDa in grado di legare specificamente l'IL-1 ed è stata identificata la presenza di una molecola simile all'IL-6 dei mammiferi (Beck and Habicht 1996).

Ulteriori evidenze sulla presenza di molecole citochine-like negli echinodermi sono state ottenute grazie agli studi molecolari, condotti principalmente in *Strongylocentrus purpuratus*. Analisi molecolari, rese possibili grazie alla pubblicazione del genoma intero di *S. purpuratus*

(Sodergren et al., 2006), hanno permesso di identificare una serie di geni omologhi a quelli presenti nel sistema immunitario adattativo dei vertebrati. I membri della maggior parte delle famiglie di citochine e chemochine e i loro recettori non sono stati individuati nel genoma di riccio di mare. Questi includono membri della famiglia delle ematopoietine, la famiglia di IL-10, la famiglia IL-12, interferoni e chemochine.

Sebbene nessun omologo di IL-1 è stato identificato, esistono tre isoforme di geni che codificano per proteine che sono correlate nella sequenza e nel dominio strutturale al recettore IL-1 e alle sue proteine accessorie. Quattro ligandi TNF e otto recettori TNF sono presenti nel genoma *S. purpuratus* (Hibino et al. 2006). È stata individuata una grande famiglia di geni che mostra una sequenza simile e paragonabile all'architettura del dominio della famiglia di interleuchine IL-17, così come due isoforme di recettori-like IL-17.

2 Obiettivo della ricerca

Il progetto di ricerca, intrapreso per il XXIX ciclo di Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità, ha avuto come obiettivo principale lo studio della risposta immunitaria, utilizzando come sistema modello il riccio di mare mediterraneo *Paracentrotus lividus*, in seguito a infezioni virali e/o batteriche, tramite l'utilizzo di diverse tecniche di biologia molecolare, di biochimica, di biologia cellulare e di bio-informatica.

In particolare, la ricerca si è svolta in varie fasi: la prima si è incentrata sull'isolamento, la caratterizzazione, l'evoluzione e la modulazione dell'espressione del gene che codifica per un membro della famiglia di recettori Toll like, responsabili del riconoscimento dell'agente estraneo in caso di infezione, in risposta a un trattamento con polyI:C (che mima un'infezione virale) e con LPS di *E. coli* (infezione batterica); la seconda sullo studio e la conta differenziale dei diversi citotipi di cellule immunitarie presenti nel fluido celomatico dopo infezione; la terza sullo studio del pathway dal punto di vista molecolare (geni e proteine, espressi durante infezione). Come esposto nell'introduzione, i pathway dei recettori TLR sono numerosi e complessi nei Vertebrati, mentre poco si conosce delle vie di segnalazione negli Echinodermi, pertanto in questo lavoro di tesi si è focalizzata l'attenzione sul pathway relativo al recettore TLR3.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento degli animali

Esemplari adulti di *Paracentrotus lividus* sono stati prelevati in prossimità di praterie di *Posidonia oceanica*, a una profondità di circa 10 metri, nel Golfo di Palermo (Mongerbino, Bagheria) e mantenuti, fino al loro uso, a una temperatura di 15°C in acquari marini refrigerati ed equipaggiati con filtri meccanici e biologici.

3.2 Prelievo del fluido celomatico da *P. lividus*

Il fluido celomatico (FC), contenente le cellule immuni, è stato prelevato, praticando un salasso dell'animale, e raccolto in un becher contenente l'anticoagulante ISO-EDTA (NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM, EDTA 30 mM; pH 7.4).

Il fluido celomatico estratto è stato centrifugato a 900 g, per 10 minuti a 4°C, per raccogliere le cellule immuni; questi sono stati quindi lavati due volte nello stesso mezzo e risospesi nel mezzo desiderato, alla concentrazione cellulare richiesta dagli esperimenti, circa 1×10^6 .

3.3 Conta cellulare

Le cellule immunocompetenti sono state contate utilizzando la camera contaglobuli di Neubauer. L'area centrale della camera è di 1 mm x 1 mm ed è separata da linee triple. Vengono contate le cellule di cinque quadrati in diagonale, includendo le cellule che toccano il margine inferiore e il lato destro dei quadrati.

Equazione per la determinazione del numero di cellule/ml:

$$\frac{\text{Numero cellule contati in 5 campi} \times \text{fattore di diluizione} \times 1000}{0,02 \text{ mm}^3 \text{(rappresenta il volume della camera)}}$$

In questo modo ottengo il numero di cellule in 1 ml di ISO-EDTA.

3.4 Colorazione May-Grunwald Giemsa delle cellule immunitarie

Al fine di caratterizzare e differenziare le cellule immuni di *P. lividus* è stata utilizzata la colorazione MAY-GRUNWALD GIEMSA.

Il metodo impiega due coloranti in successione:

- la soluzione May-Grunwald, costituita da eosinato di blu di metilene che colora i nuclei blu ed il citoplasma basofilo in rosso-rosa;
- la soluzione Giemsa, miscela complessa, costituita da blu di metilene cloruro, blu di metilene eosinato, azzurro II eosinato, che aumenta l'intensità della colorazione nucleare e la capacità di evidenziare selettivamente gli elementi cellulari.

La colorazione è stata eseguita nel modo seguente:

1. i vetrini sono stati trattati inizialmente con Poly-L-Lysina in modo da favorire l'adesione cellulare;
2. una goccia di sospensione cellulare (5×10^6) è stata posta e lasciata aderire per 15 min a temperatura ambiente;
3. la sospensione in eccesso è stata allontanata dal vetrino, aggiungere 100 microlitri di metanolo ed attendere per 4 minuti;
4. il vetrino è stato immerso in maniera sequenziale nelle seguenti soluzioni:
 - May-Grunwald per 2 minuti
 - Dw per 1 minuto
 - Giemsa 1:20 5 minuti
 - Passaggi di 2 minuti in etanolo al 30%, 50%, 70%, 100%
 - Xilolo 6 minuti

Il vetrino è stato asciugato in stufa a 37°C per 24 ore.

3.5 Estrazione di RNA e Isolamento di cDNA tramite RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule immuni secondo il metodo di Chomczynsky-Sacchi (1987), seguendo le istruzioni tecniche del manuale Sigma “GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit” e quantificato tramite lettura a 260nm usando un Eppendorfbio-photometer.

Gli RNA totali (1µg), sono stati retrotrascritti con il sistema dell'Applied Biosystems utilizzando i seguenti reagenti:

- 10x buffer 2µl
- MgCl₂ 4,4 µl
- dNTP 4 µl
- Randome Hexamer 1 µl
- RNase inhibitor 0,4 µl
- Multi-Polymerase1,2 µl
- RNA totale1 µl
- H₂O 6 µl

La miscela è stata poi incubata a temperatura ambiente per 10 minuti, a 50°C per 30 minuti e infine a 95° per 5 minuti.

Un'aliquota del cDNA così ottenuto (20ng) è stato utilizzato per la “Real Time” PCR.

3.6 PCR e sequenziamento dei frammenti per Primer Walking

Il metodo del “primer walking” è stato effettuato dividendo la sequenza nucleotidica più lunga in altre sequenze più brevi consecutive. La tecnica di PCR è stata utilizzata per isolare i frammenti sovrappoventesi di cDNA come segue: un ciclo di denaturazione a 95°C della durata di 10 minuti per consentire l'attivazione della polimerasi, 40 cicli melting a 95°C per 15 secondi e annealing a 48°C per 30 secondi, extension a 72°C per 30 secondi. I frammenti ottenuti sono stati sequenziali dal servizio Bio-Fab Research Roma - Servizio di supporto alla ricerca www.biofabresearch.it e dal servizio BMR Genomics www.bmr-genomics.it

3.7 Allineamento di sequenza e costruzione alberi filogenetici

Le sequenze ottenute sono state allineate utilizzando il programma Clustal W2 (Thompson et al. 1994) e gli alberi filogenetici costruiti con il servizio Genebee scegliendo un formato Phylip con valori di bootstrap (Saitou and Nei 1987).

3.8 Analisi della proteina

E' stata svolta utilizzando strumenti Bio-informatici. Il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) ha permesso di identificare le omologie di sequenza nucleotidica e aminoacidica.

Il programma Phyre2 ha permesso di individuare l'organizzazione secondaria della struttura proteica (Kelley e Sternberg, 2009).

3.9 "Real Time" PCR comparativa ($\Delta\Delta CT$)

Seguendo il manuale dell'Applied Biosystem StepOne Plus Real Time PCR si è proceduto a misurare l'espressione genica. Sono stati utilizzati il metodo del "ΔΔCT comparativo" (Livak and Schmittgen, 2001), il colorante SYBR® Green e l'mRNA di PI-Z12-1 come controllo endogeno. La QPCR, nota tecnica di laboratorio, è ormai sempre più utilizzata grazie alla sua sensibilità, riproducibilità e dinamicità.

Nel nostro caso è stata eseguita tenendo presenti i seguenti parametri:

- un ciclo di denaturazione a 95°C della durata di 10 minuti per consentire l'attivazione della polimerasi
- 38 cicli melting a 95°C per 15 secondi
- annealing/extension a 60°C per 60 secondi.

Gli oligonucleotidi utilizzati per amplificare il **TLR 3** sono stati:

5' TTGGTTTCCCTTGTCGTCGTTT 3' il Forward,

5' ATCCGATGGCTGCCAGTCTCACA 3' il Reverse.

L'amplicone risulta avere una lunghezza complessiva di 109 nucleotidi.

Il frammento ottenuto è stato sequenziato per controllare che corrispondesse al gene in oggetto e inserito in banca dati (Accession number: HG515389.1).

Gli oligonucleotidi specifici usati per amplificare il gene per il controllo endogeno PI-Z12-1 (Costa et al., 2012) sono:

- 5' AGCGCCACACCAAAAAGAAGTC 3' il Forward
- 5' GGATGATAGACAGGGCTGTTTGGGA 3' il Reverse

In questo caso la lunghezza complessiva dell'amplicone è stata di 93 nucleotidi.

Gli oligonucleotidi utilizzati per amplificare **IRF** sono stati:

5' TGACAAGGAAAGGCAGATTGTGA 3' il Forward,

5' TCGGTCGCGGGGTCGTATTTCTTT 3' il Reverse.

L'amplicone risulta avere una lunghezza complessiva di 110 nucleotidi.

Gli oligonucleotidi utilizzati per amplificare **TBK** sono stati:

5' ACACAAGGTATTAGAAGCACCAA 3' il Forward,

5' AACTGCAACAACATCTCCAGT 3' il Reverse.

L'amplicone risulta avere una lunghezza complessiva di 94 nucleotidi.

3.10 Trattamento dei ricci con LipoPoliSaccaride (LPS) e con Polyinosinic:polycytidylic acid (PolyI:C).

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi con lo stesso numero d'individui e, seguendo il protocollo utilizzato da Terwillinger et al. (2007), inoculato a ogni singolo riccio del primo gruppo circa 4µg di PolyI:C per ogni ml di fluido celomatico. Mentre a ogni singolo individuo del secondo gruppo, sono stati inoculati 2µg di LPS. Sono stati lasciati per 3h, 9h, 15h, 18h, 24h e 48h in appositi acquari con caratteristiche chimico-fisiche uguali agli acquari dove erano rimasti a stabulare. Sono stati, inoltre, posti nelle stesse condizioni chimiche-fisiche gli animali del terzo gruppo, ai quali è stata iniettata una soluzione senza i due composti e sono stati utilizzati come controllo.

Sono stati prelevati due esemplari trattati, per ogni composto, e due esemplari dei controlli, dopo 3h, 9h, 15h, 18h, 24h e 48h, e è stato estratto il fluido celomatico seguendo lo stesso protocollo sopra descritto. Le cellule immunitarie estratte sono state direttamente congelati per essere in seguito processate allo scopo di estrarre l'RNA e le proteine.

3.11 Estrazione del contenuto proteico dalle cellule immunitarie

Per l'estrazione delle proteine è stato utilizzato il RIPA buffer, una soluzione composta da:

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.4
- 150 mM NaCl
- 1% NP-40
- 0,1% di SDS
- 0,5% Na-deoxycholate
- 2mM di EDTA
- 50mM di NaF

Un cocktail d'inibitori delle proteasi (anti-proteasi, Sigma) sono stati aggiunti nel rapporto di 1:200. Questo cocktail d'inibitori è utilizzato perché in genere la lisi cellulare porta al rilascio di enzimi proteolitici che potrebbero degradare le proteine contenute nell'estratto proteico.

I campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 12300g a 4 °C. Il supernatante è stato prelevato e conservato a – 80°C.

3.12 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica del lisato è stata determinata con il dispositivo Fluorimetro Quibit. Il dispositivo calcola la concentrazione proteica all'interno dei nostri campioni grazie ad una sostanza fluorescente che si lega alle proteine. Lo strumento in base alla relazione con i tre standard usati nella calibrazione costruisce una curva in cui a una determinata fluorescenza corrisponde la concentrazione in µg/ml di proteine.

3.13 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Dopo aver determinato il contenuto proteico totale, i lisati cellulari dei vari campioni presi in esame, sono stati utilizzati per l'elettroforesi e l'immunoblotting.

La tecnica dell'elettroforesi su gel di poliacrilamide è stata condotta secondo Laemmli (1970). L'elettroforesi in presenza di sodiododecilsolfato (SDS) permette di separare le componenti proteiche in base al loro peso molecolare. Le proteine sono denaturate grazie all'SDS e al β-mercaptoetanololo. Quest'ultimo è un agente riducente che taglia i ponti disolfuro delle proteine. Mentre l'SDS conferisce alle proteine una carica netta negativa. In questo modo tutte le proteine migreranno verso il polo positivo e la loro velocità di migrazione dipenderà

unicamente dalla diversa dimensione delle proteine che attraverseranno i pori del gel e sarà quindi inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare.

Preparazione dei campioni

A un volume contenente 10 μ g di proteine è stato aggiunto sample buffer (acqua distillata, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, Glicerolo, SDS 10% (W/v), 0.05% (w/v) blue di bromofenolo) 1X (Laemmli) contenente β -mercaptoetanololo fino a un volume totale di 20 μ l che sono stati denaturati a 100°C per 5 minuti e poi posti in ghiaccio per altri 5 minuti.

3.14 Western blot

Tramite la tecnica dell'immunoblotting (Towbin, 1979), è possibile avere delle informazioni sulla presenza di una determinata proteina in un lisato, sfruttando la specificità di reazione di un anticorpo verso lo specifico antigene. Questa tecnica consiste nel:

- separare le componenti proteiche di una miscela tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide.

- trasferire tali componenti, sotto l'azione di un campo elettrico, su un foglio di nitrocellulosa Hybond-ECL (Hybridization transfer membranes) con l'apparecchio Bio-Rad Trans-BlotSd Semi Dry Transfer Cell.

Il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL-Amersham farmacia biotech) è avvenuto a 15 Volts per 1 ora e 5 minuti. Al termine del trasferimento, le membrane, sono stata colorate con Rosso Ponceau per avere conferma dell'avvenuto trasferimento;

Le membrane di nitrocellulosa sono state lavate per 10min con tampone di lavaggio (TBS/T: Tris-Base 10 mM; NaCl 150 mM, pH 7.4; 0.1% Tween 20) quindi sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con soluzione bloccante (Tris-Base 10 mM; NaCl 150 mM, pH 7.4; 0.1% Tween 20; 5% BSA). Le membrane sono state lavate tre volte con tampone di lavaggio per dieci minuti.

In seguito, le membrane che contenevano le proteine sono state trattate con i seguenti anticorpi primari:

- monoclonale anti-TNF α prodotto in mouse (Sigma Aldrich) 1:1000 in 3% BSA-TBS/T
- monoclonale anti-IL-1 α prodotto in mouse (Sigma Aldrich) 1:1000 in 3% BSA-TBS/T

- monoclonale anti-IL-6 prodotto in mouse (Sigma Aldrich) 1:1000 in 3% BSA-TBS/T

Tutte le membrane sono state poste a incubare overnight a 4°C in camera umida in leggera agitazione, con una soluzione di diluizione dell'anticorpo primario. Dopo altri 3 lavaggi, le membrane sono state incubate per 1 ora a 25°C con soluzione di diluizione dell'anticorpo secondario anti-mouse IgG coniugato con fosfatasi alcalina (1:10000 anti-IgG mouse, in TBS/T) per evidenziare la presenza delle TNF α , IL1 e IL-6. Infine, sono stati effettuati altri 3 lavaggi con tampone di lavaggio ed è stata messa in evidenza la reazione immune mediante una miscela di BCPI/NBT (Sigma). L'analisi dei pesi molecolari è stata condotta con il software Image-J in triplicato.

3.15 Analisi statistiche

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Le significatività sono state determinate con il *test t di Student* e le differenze tra i risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,01$ per quanto riguarda la conta cellulare (** $p < 0.01$; ** $p < 0.05$), mentre per le analisi dell'espressione genica sono stati utilizzati i test ANOVA e TUKEY.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi dei campioni di riccio di mare e trattamenti effettuati

Gli animali stabulati negli acquari hanno mostrato una buona capacità di sopravvivenza e un buon livello di adattamento (considerando un minimo periodo di adeguamento alle nuove vasche che va da pochi giorni a qualche settimana). Anche gli animali trattati erano in ottime condizioni. I campioni di riccio di mare sono stati sottoposti a vari trattamenti sempre con cura facendo attenzione a evitare lo stress.

Allo scopo di studiare la risposta immunitaria alle infezioni di riccio di mare *P. lividus*, sia dal punto di vista cellulare sia molecolare, i trattamenti sono stati di due tipi:

- con LPS, uno dei componenti della parete batterica
- con PolyI:C, agente chimico che mima un'infezione virale.

4.2 Analisi delle cellule immunitarie nel liquido celomatico trattato con PolyI:C.

Le cellule immunitarie presenti nella cavità celomatica dei ricci di mare controllo (C) e quelle dei trattati con PolyI:C, sono state prelevate secondo le modalità descritte nei Materiali e Metodi, a diverse ore dal trattamento (3, 9, 15, 18, 24, 48 ore).

Successivamente, sono state colorate, per evidenziare le differenti tipologie di cellule immuni presenti, e infine sono state contate al microscopio ottico, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Sono state prelevate cellule immunitarie da cinque diversi individui e le conte sono state mediate e sottoposte ad analisi statistica. E' stata riscontrata una variazione statisticamente significativa nel numero relativo delle tipologie cellulari a diversi orari esaminati dopo il trattamento con il polyI:C. In particolare per i fagociti dopo 9h dall'inoculo, si assiste ad un incremento significativo, pari a circa 0,7 volte in più rispetto al controllo. Questo trend si mantiene pressoché tale fino alle 24h per poi tornare a valori comparabili al controllo a cui è stato attribuito il valore unitario (vedi Fig. 22). Nella sottopopolazione degli amebociti bianchi non si assiste a un cambiamento statisticamente significativo dopo l'inoculo del PolyI:C. Soltanto a 24h c'è una diminuzione significativa nel numero rispetto al controllo (Figura 23).

Dopo 3h dall'inoculo, la sottopopolazione degli amebociti rossi, mostra un incremento significativo, pari a circa al doppio del controllo. Questo valore decresce a 9h per poi tornare a 24h a valori simili al controllo (Figura 24). Per quanto riguarda la sottopopolazione delle cellule vibratili non si registra un cambiamento statisticamente significativo dopo l'inoculo del PolyI:C. Soltanto a 24h si ha una diminuzione significativa rispetto al controllo (Figura 25).

Da questi esperimenti si rileva che le sottopopolazioni cellulari che rispondono allo stimolo del trattamento con PolyI:C (che mima un'infezione virale), sono i fagociti (da 9 a 24 ore) gli amebociti rossi (dopo 3 ore). Le prime cellule sono dotate di molte funzioni immunitarie tra cui l'attività fagocitica dei possibili patogeni, mentre le seconde cioè gli amebociti rossi sono cellule che migrano sul sito di infezione per incapsulare particelle invasive e degradarle grazie ai granuli contenenti echinocromo A, presenti al loro interno. Infatti l'echinocromo A possiede proprietà antimicrobiche (Service and Wardlaw, 1984) suggerendo una funzione di protezione cellulare. I fagociti sono implicati non solo nei meccanismi di fagocitosi ma anche di incapsulamento, agglutinazione e rigetto (reviewed in Gross et al., 1999).

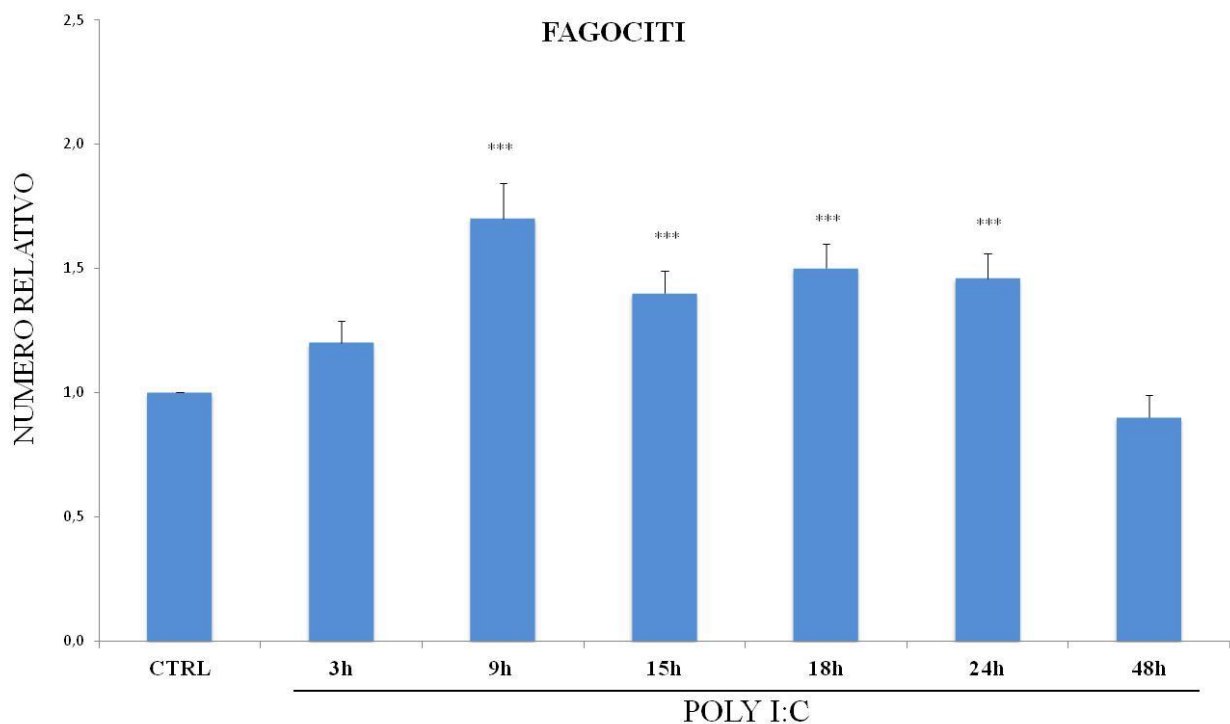


Figura 22: Numero relativo dei fagociti

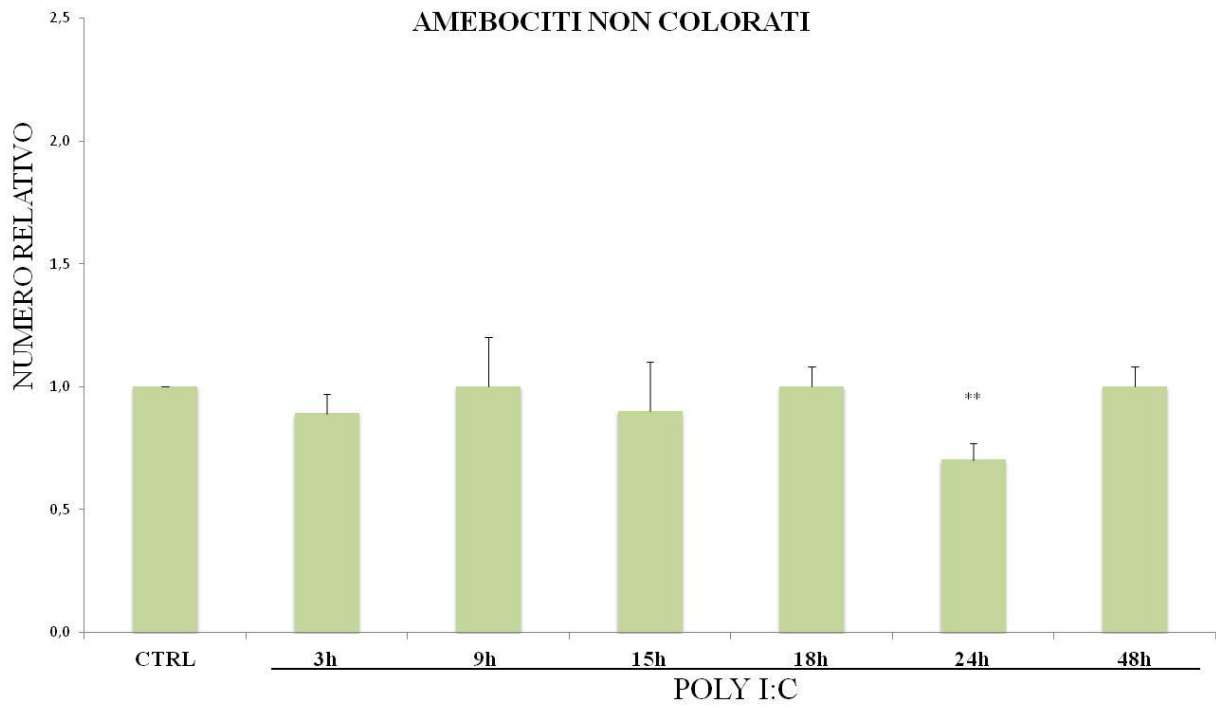


Figura 23: Numero relativo degli amebociti bianchi

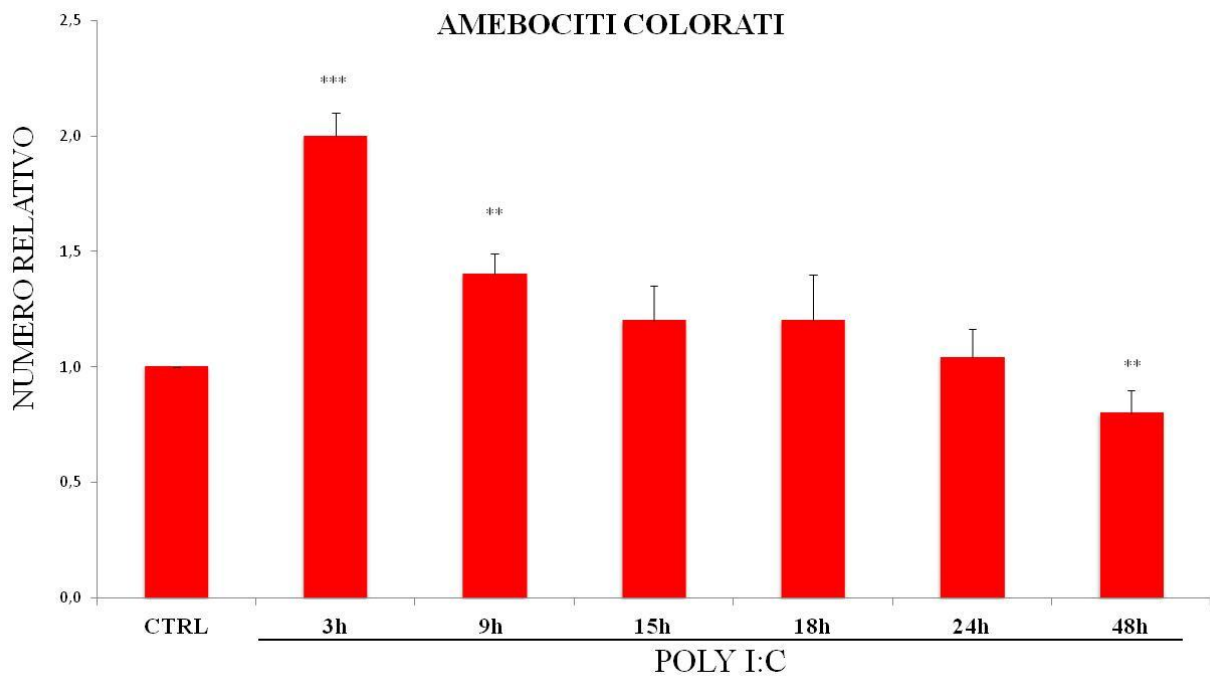


Figura 24: Numero relativo degli Amebociti rossi

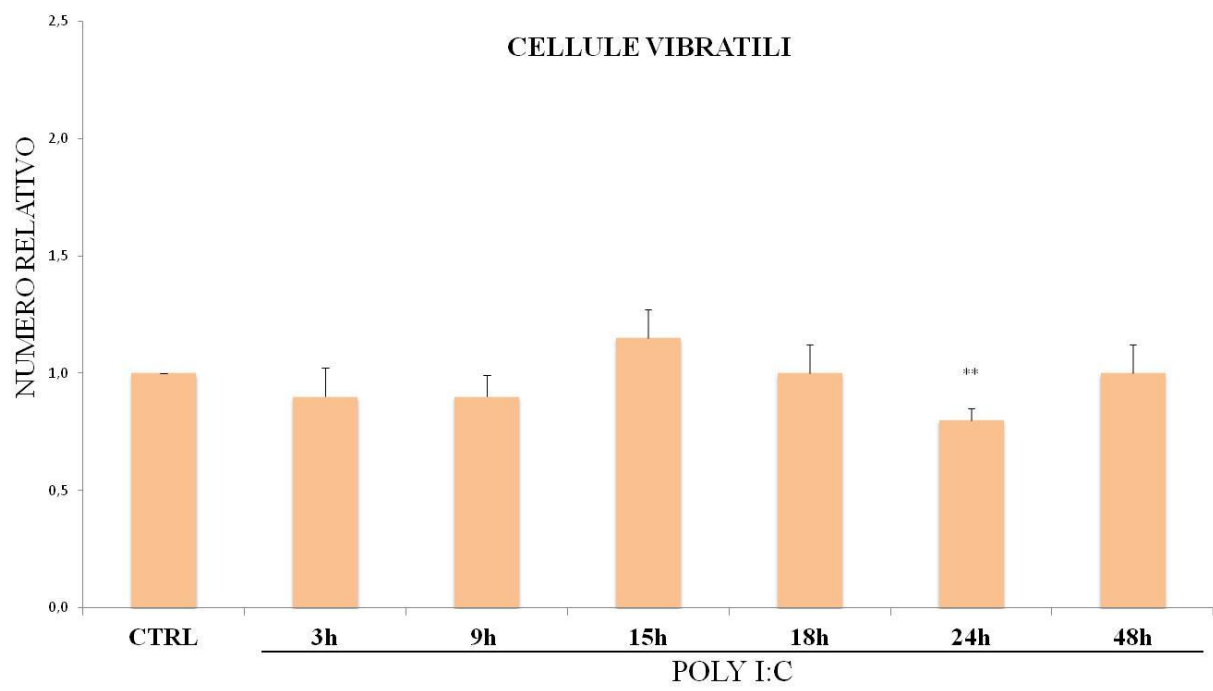


Figura 25: Numero relativo delle cellule vibratili

La conta di cellule immunitarie è stata effettuata anche dopo trattamento con LPS (che mima un'infezione batterica) a 1, 3, 6, 24 ore ed i risultati sono mostrati in figura 26. Le ore di trattamento sono differenti rispetto a quelle relative al PolyI:C, tranne per le 3 e 24 ore. Da questi esperimenti si rileva che le sottopopolazioni cellulari rispondono allo stimolo del trattamento nel seguente modo: gli amebociti bianchi (Figura 26b) subiscono una diminuzione della metà dopo già 1h dal trattamento fino alle 24h; gli amebociti rossi hanno un aumento pari a 3 volte rispetto al controllo da 1 a 6 ore (Figura 26c), le cellule vibratili aumentano di circa 1,8 volte rispetto al controllo dopo 3 ore (Figura 26d).

Si rileva una risposta molto diversa tra i due trattamenti con LPS e PolyI:C. in quanto il primo attiva maggiormente la popolazione di cellule fagocitarie e amebociti rossi, mentre il secondo attiva gli amebociti rossi e un po' le cellule vibratili. In comune si ha una risposta a entrambi i trattamenti da parte degli amebociti rossi dopo 3 ore di trattamento. E' noto che queste cellule migrano sul sito di infezione per incapsulare particelle invasive e degradarle e sono coinvolti soprattutto nella prima fase della risposta immunitaria, causando l'immobilizzazione del patogeno (Smith, 1981).

Aumento nel numero di cellule immunitarie è stato riscontrato in altri invertebrati marini in risposta a stimoli diversi. Come esempio, un aumento nella proliferazione di cellule emocitiche è stato visto nel mollusco marino *Ruditapes philippinarum* dopo trattamento con nano particelle (Marisa et al., 2016). Dopo trattamento con LPS del riccio di mare artico *S. neumayeri*, è stato riscontrato l'aumento della popolazione di amebociti rossi (red cells). Il trattamento con LPS è quindi in grado di attivare il sistema immunitario (Gonzales-Aravena et al 2015).

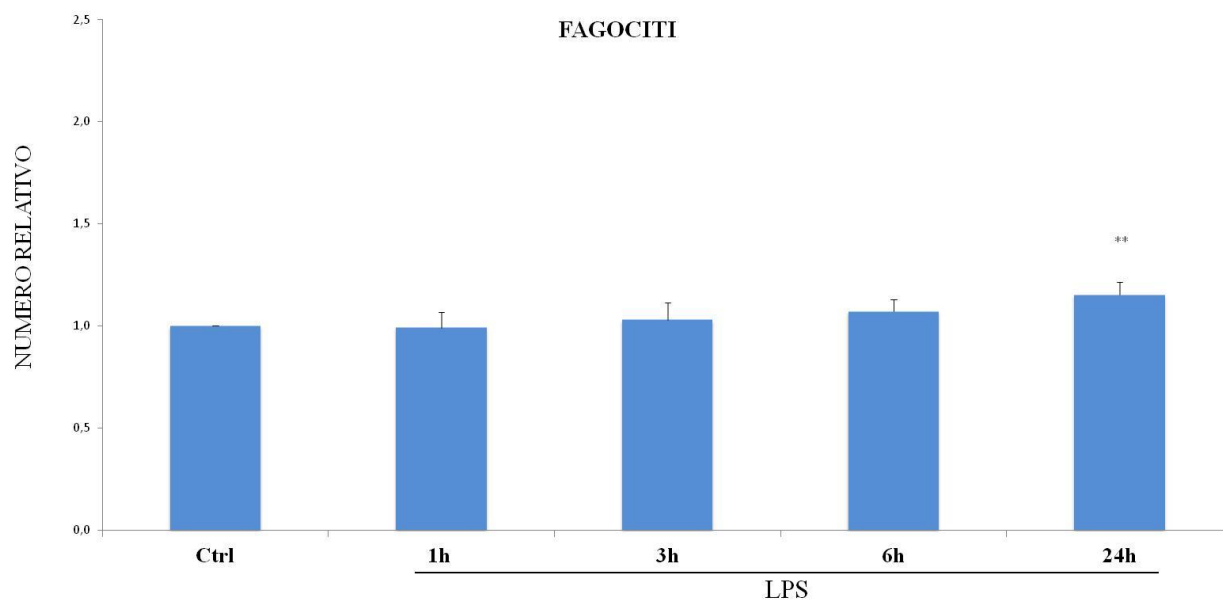


Figura 26a: Numero relativo dei fagociti

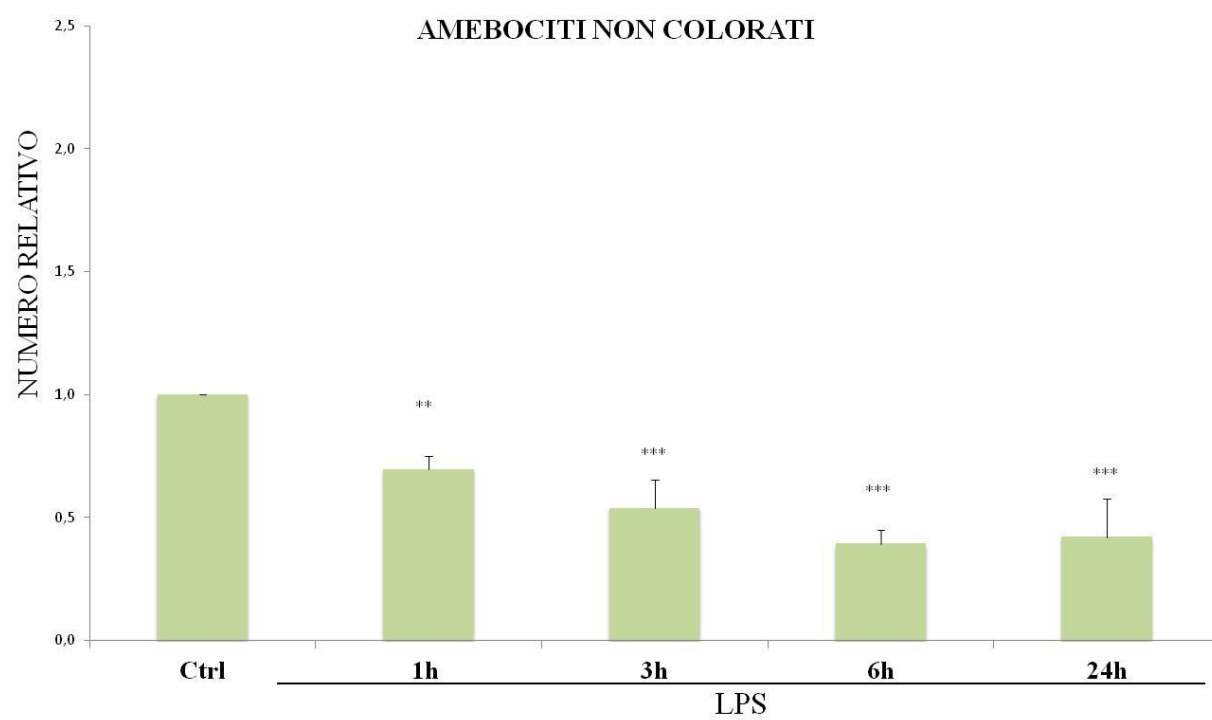


Figura26b: Numero relativo degli amebociti bianchi

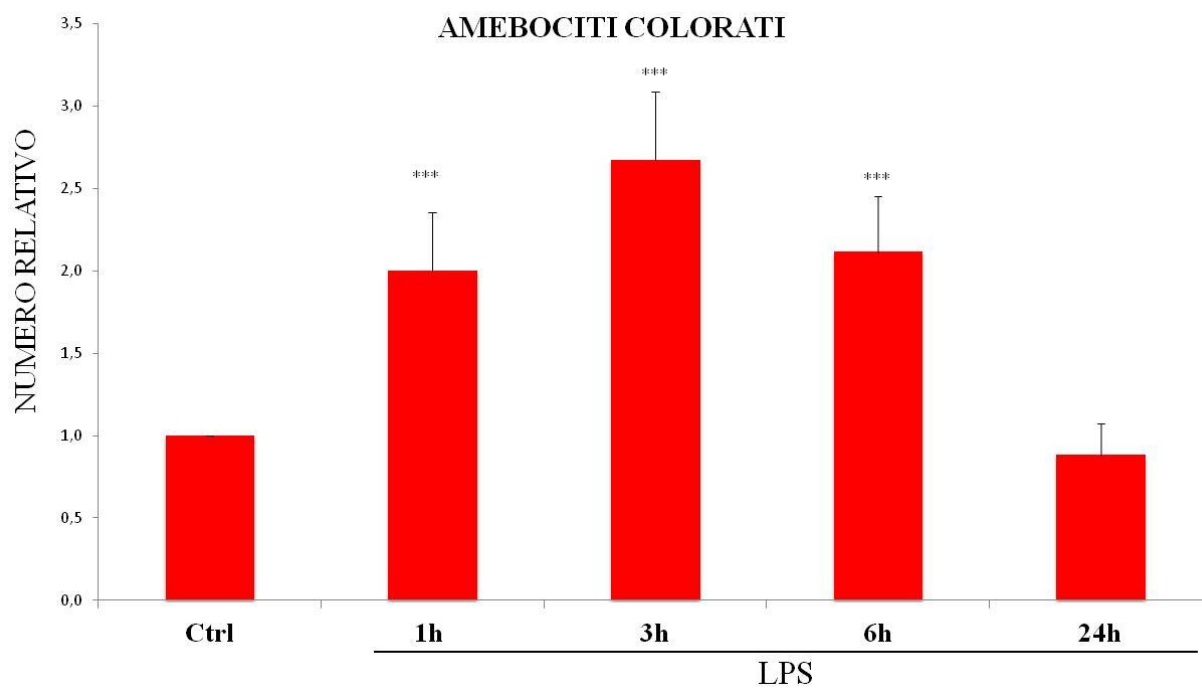


Figura 26c: Numero relativo degli amebociti rossi

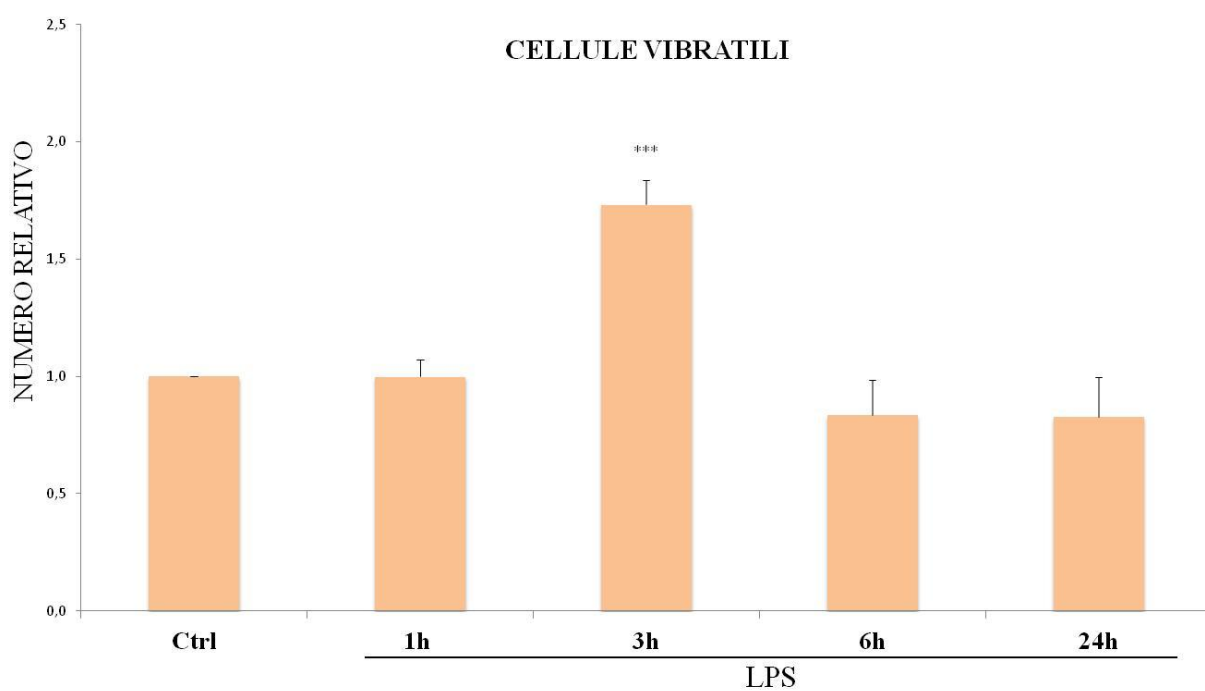


Figura 26d: Numero relativo delle cellule vibratili

4.3 Isolamento di geni TLR da cellule immunitarie di riccio di mare

Considerata l'enorme variabilità e l'elevato numero di geni appartenenti alla famiglia Toll-like in riccio di mare, si è cercato di isolare alcuni geni TLR. Pertanto sono stati disegnati inizialmente degli oligonucleotidi sulla base delle sequenze note di *S. purpuratus*, in regioni conservate che potessero amplificare diversi geni TLR.

Il primo frammento ottenuto è stato analizzato con il programma BLAST e si è visto che apparteneva alla sottofamiglia TLR3. In seguito sono stati disegnati gli oligonucleotidi sulla base della sequenza specifica TLR3 di *S. purpuratus* e *P. lividus* da noi isolata, con il metodo del "primer walking". Con questo procedimento si è ottenuto un cDNA parziale del gene TLR3 di *P. lividus*, chiamato ***Pl-tlr3***, della lunghezza di 708nt, mancante di 114nt al 3'.

L'omologia con geni isolati in altri organismi è stata determinata paragonandolo il gene ***Pl-tlr3***, attraverso il programma BLAST. In tal modo si è visto che il gene isolato era omologo (per l'81%) a TLR3 di *S. purpuratus* inserito in banca dati con accession number XM_789993.2, lungo 822nt.

Inoltre il paragone di sequenze nucleotidiche ha permesso di determinare la percentuale di omologia tra ***Pl-tlr3*** e i geni di altri organismi. Per esempio si è scoperto che ***Pl-tlr3*** è omologo anche a TLR4 (XM_786645.2) di *S. purpuratus*, con un'omologia del 78%, alla proteina slithomolog3 di *S. purpuratus* (XM_003723705.1), con l'80% di omologia.

Dalla sequenza nucleotidica è stata poi dedotta la sequenza aminoacidica parziale, di 236 aminoacidi, (mancano 37 aminoacidi all'estremità COOH-terminale) mostrata in Figura 27.

```
MNPIDCNCDI MGYDWLSGSL HLVNENQTIC SSASLKPLRD
KHLLEFNTNE FCSVNITLIC LVSLVVVCLI LVTALGYHNR
WQLRYRLFLV RLAAIGYKEM REAREHNDYE FDLNIIFYDE
DEEWIRDHLR PAMDERLPQF QRNVFGDEDL VLRMHYLDV
DYVVVSHSYKT VVLSRASVS DRWFMLKFRT AMDHVS DTGT
EFVVVVVFLED IPDEEIPFLA RLYLSDGRPY VYWTGR
```

Idrofobico
Idrofobico aromatico
Idrofilo
Idrofilo aromatico
Acido
Basico

Figura 27: Sequenza AA di *Pl-tlr3*.

Dal paragone di sequenze aminoacidiche, effettuato con BLAST, è stato possibile stabilire che ***Pl-tlr3*** codifica per una proteina della famiglia TLR3, ed in particolare ha elevata omologia (pari al 75%) con il TLR3 di *S. purpuratus* inserito in banca dati con accession number

XP_795086.2, lunga 273 aminoacidi, esattamente corrispondente al gene con number XM_789993.2.

4.4 Analisi della proteina

Nella proteina mostrata in figura 30 sono evidenziati gli aminoacidi idrofobici in rosso, idrofobici aromatici in arancione, quelli idrofilici in verde, idrofilici aromatici in grigio, azzurri quelli acidi e in rosa quelli basici. Si nota la prevalenza di aminoacidi idrofobici.

Secondo la predizione ottenuta dal programma Phyre2 la proteina PI-tlr3 risulta costituita da tre diversi domini funzionali (Figura 28): un dominio all’NH2-terminale ricco in leucine (di colore blu, da 1 a 56), un dominio centrale transmembrana (compreso tra gli aminoacidi 57 e 78, di colore verde) e un dominio COOH- terminale TIR (compreso tra gli aminoacidi 125 e 236, di colore arancione).

Il dominio TIR (Toll/interleukin-1 receptor) è stato trovato in proteine quali MyD88, nel recettore per l’interleukina2, e nei recettori Toll. Esso contiene 3 regioni conservate che servono a mediare le interazioni proteina-proteina con le proteine responsabili della trasduzione del segnale (Armant and Fenton, 2002;).

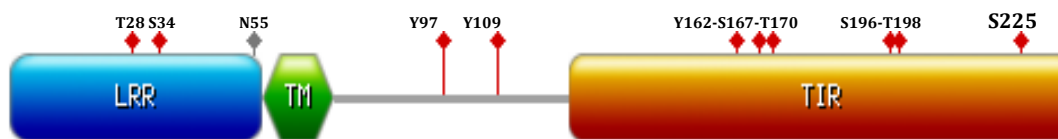


Figura 28: Domini funzionale PI-tlr3

Nella proteina parziale mostrata in figura27, sono presenti diversi domini “leucine rich repeats” (LRR) all’estremità NH2-terminale e nelle parte centrale, ed inoltre sono stati riscontrate delle Cisteine (Cys) concentrate nella regione N-terminale (in grassetto nella figura 29) in accordo con il fatto che le regioni LRR sono fiancheggiate da Cisteine sia a monte che a valle (Peters et al. 1996).

```

6                                     57
MNPIDCNCNDIMGYDWLSGSLHIVNENQTCSSASLKPLRDKHLLEFNTNEFCSVNIT
      67                               87
LICLVSLVVVCLILVTALGYHNRWQLRYRLFLVRLAAIGYKEMREAREHNDYEFDLN
IIFYDEDEEWIRDHLRPAMDERLPQFQRNVFGDEDLVLRMHYLDSVDYVVSHSYKTV
VVLSRASVSDRWFMLKFRTAMDHVSDTGTEFVVVFLEDIPDEEIPFLARLYLSDGR
PYVYWTGR

```

Figura 29: Domini LRR evidenziati a colori, presenti nella proteina PI-tlr3.

Nella proteina **PI-tlr3** la sequenza consensus con cui si presentano gli aminoacidi Cys è la seguente: CxCx21Cx21Cx7Cx7C, iniziando dal residuo Cys6 fino al Cys67 per cui si deduce che la regione LRR di **PI-tlr3** sarà compresa tra gli aminoacidi 1 e 67.

Nonostante la predizione del programma Phyre², riteniamo quindi che il dominio transmembrana possa essere compreso tra gli aminoacidi 68 e 87, cioè subito dopo l'ultimo residuo Cys. **PI-tlr3** presenta quindi solo tre regioni LRR evidenziate a colori in figura 27, analogamente alle proteine TLR definite "short" (Buckley e Rast, 2012).

Nella proteina **PI-tlr3** sono stati trovati alcuni possibili siti di fosforilazione (S20, 54, 66,139, e T61, 130) e due siti di miristoilazione (G39, G142) (Figura 30); questi ultimi servono alla proteina per un migliore ancoraggio alla membrana.

```
Similarity percentage 100
-----
Protein kinase C phosphorylation site.
Prosite access number: PS00005
Prosite documentation access number: PDOC00005
[ST]-x-[RK].
Randomized probability: 1.423e-02 .

Site : 66 to 68 SYK. Identity.
Site : 139 to 141 SKR. Identity.
-----
Casein kinase II phosphorylation site.
Prosite access number: PS00006
Prosite documentation access number: PDOC00006
[ST]-x(2)-[DE].
Randomized probability: 1.482e-02 .

Site : 20 to 23 SGHD. Identity.
Site : 54 to 57 SIVE. Identity.
Site : 61 to 64 TCIE. Identity.
Site : 130 to 133 TYLE. Identity.
-----
N-myristoylation site.
Prosite access number: PS00008
Prosite documentation access number: PDOC00008
G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}.
Randomized probability: 1.397e-02 .

Site : 39 to 44 GMQICL. Identity.
Site : 142 to 147 GLFWAN. Identity.
```

Figura 30: Predizione dei siti di fosforilazione e miristoilazione.

Il programma Phyre² ci ha permesso di evidenziare in maniera più dettagliata le strutture secondarie (alfa eliche e beta sheet) e i domini funzionali di questa proteina, anche se parziale (Figura 31).

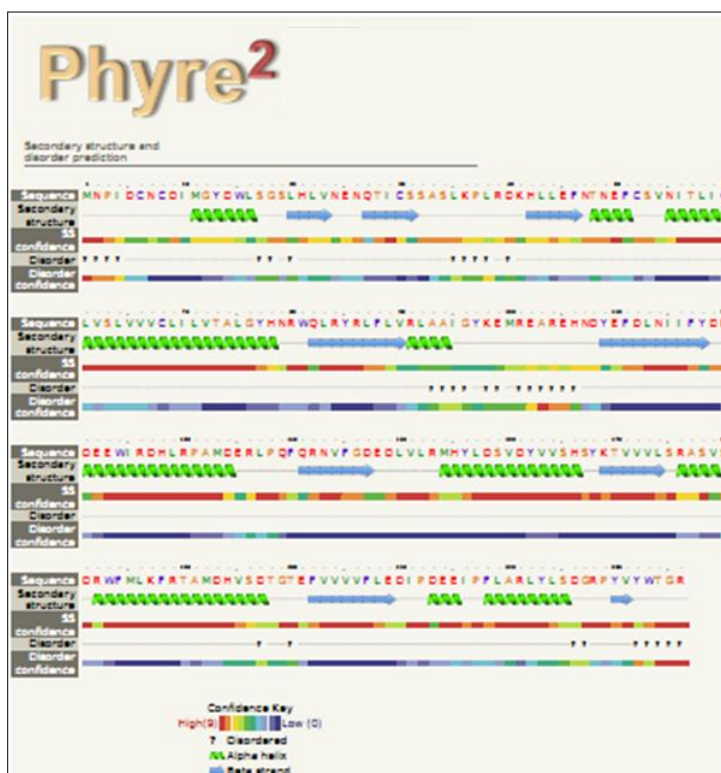


Figura 31: Struttura secondaria della proteina PI-tlr3 dedotta da Phyre².

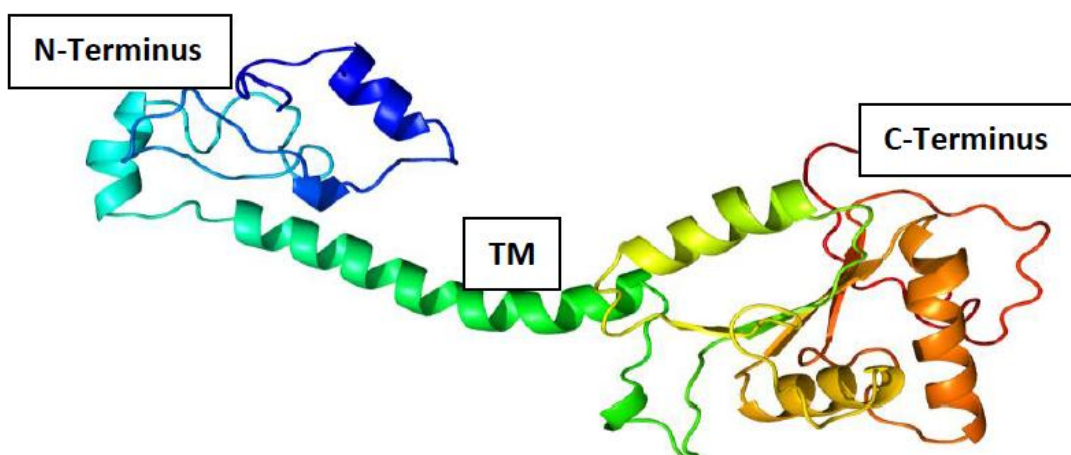


Figura 32: Struttura terziaria parziale di PI-Tlr con due alfa-eliche nella parte N-terminale, nel mezzo la lunga elica idrofobica che corrisponde al dominio TM e le tre alfa eliche nella parte C-terminale.

La Figura 32 mostra il probabile avvolgimento della proteina intera, del dominio TIR e di una ripetizione Leucine Rich, secondo il sito di predizione di struttura proteiche Phyre².

L'analisi delle omologie di sequenza aminoacidica, condotta attraverso l'uso di BLAST, ha messo in evidenza che la proteina PI-tlr3 mostra le seguenti omologie: 75% con TLR3 di *S. purpuratus* (XP_795086.2), 71% con TLR4 di *S. purpuratus* (XP_003729458.1), 70% con

slithomolog 2 protein-like di *S. purpuratus* (XP_001184211.1), 70% con TLR 1.2 di *S. intermedius* (ADP08783.1).

4.5 Analisi filogenetica della proteina Pl-Tlr3

Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando la sequenza Pl-Tlr3 da noi isolata e paragonandola con altre sequenze omologhe di diverse specie. Gli allineamenti sono stati prima trovati con il programma Clustal W2, a colori che distinguono le caratteristiche degli aminoacidi (Figure 33e 34).

Per costruire l'albero filogenetico mostrato in figura 35 abbiamo scelto di utilizzare le proteine TLR3 degli invertebrati e vertebrati, più precisamente quattro mammiferi, un rettile, un anfibio, un uccello, un pesce, indicati in Tabella 1 con i rispettivi numeri di accesso alla banca dati.

Da questa analisi si evidenzia l'elevata divergenza tra le sequenze di vertebrato e di invertebrato. I Vertebrati formano un cluster che si origina da un organismo ancestrale comune agli Invertebrati. Tra questi ultimi il *C. elegans* e la *D. melanogaster* si comportano diversamente, come outgroup. Da questi dati si vede come il *P. lividus* rappresenta l'anello di congiunzione tra Invertebrati e Vertebrati (Figura 35).

Per costruire l'albero filogenetico mostrato in figura 36 abbiamo scelto di utilizzare le proteine TLR3 degli Echinodermi indicati in Tabelle 2 con i rispettivi numeri di accesso alla banca dati.

```

Hs      LKSLNLQKNLITSVEKKVFGPA-----FRNLTELDLDRFNPFDCT 650
Pt      LKSLNLQKNLITSIEKKVFGPA-----FRNLTELDLDRFNPFDCT 650
Ss      LKSLSLQKNLITSVKKTVFGPA-----FQKLSNLDLDRFNPFDCT 651
Mm      LRSNLQKNLITSVEKDVFGPP-----FQNLNSLDLDRFNPFDCT 651
Ac      LSFSLSEKKNLITSVDEQVFSKV-----FTHLKEVNIIGLNPFDCT 628
Gg      LNTLNLQKNLITSVEENVFGPA-----FKSLRTELDLDRFNPFDCT 641
Xt      LTLDDLHKNLITSVEQDLFKNV-----FSSLKYLMLGGNPFYDCT 641
Dr      LKYLHLQKNLITSVQRATFGVP-----LSKLLKELNMDHNPFDCT 650
Pl      -----MNPIDCN 7
Dm      HLDISWNHLQMLNATVIGFLNR-----TMKWRVSVKLSGNPVMCD 756
Ce      VSQFLFLNGNRFSTLSRGI FEKFLPNLKYLTLLINSLEDIPQVLHSTALSKI SLSSNPLRCD 893
          ** *

Hs      CE-----SIAWVFNWINETHNTNIPELSSHY 675
Pt      CE-----SIAWVFNWINETNTNIPELSSHY 675
Ss      CE-----SIAWVSWINETHNTNISELSSHY 676
Mm      CE-----SISWVFNWINQTHNTNISELSTHY 676
Ac      CD-----SIAWVHWNLSKVVYVPLGNS-Y 652
Gg      CE-----SIAWFASWLNLTQAYIPGLQSQY 666
Xt      CE-----SIAWFASWLNNTNTSVPLAHSQY 666
Dr      CE-----SILWFSEWLNSTNTSVPGFPQSY 675
Pl      CD-----IMGY--DWLSGSLHLVNNQITC 30
Dm      CT-----AKPLLLFTQDN-FERIGDRNEMM 780
Ce      CSGGSQQHLHHRDPKAHPFWEHNAAEWFSLHRHLVDFPKVCEWENVTKAFLTNDTTVL 953
          *

Hs      LCNTPPHYHGFPVRLFDTSACK-----DSAPFELFFMINTSILLIFI 717
Pt      LCNTPPHYHGFPVRLFDTSACK-----DSAPFELFFMINTSILLIFI 717
Ss      LCNTPPQYHGLPVILFDTSACK-----DSAPFELFFMITASMLLIFI 718
Mm      LCNTPPHYHYGFPVRLFDTSACK-----DSAPFELFFIISTMMLVFI 718
Ac      RCNTPPKYHGKMAEFDISPC-----DSAPFLFFTVSISILLIFI 693
Gg      ICNTPPKYHGTLVLHFDTSACK-----DSAPFKLLFLITTTVVMQFM 708
Xt      ICNTPPARYHGPNVDFDSSPCK-----ELAPFR-LFVSTFSLMLVFI 707
Dr      ICNTPNAYFNHSMNFDPLSCK-----DMTPFKALYILSSSTAVMLL 717
Pl      SSASLKLPLRDKHLEFNTNEF-----CSVNITLICVLSLVVCLI 70
Dm      CVNAEMPTRMVELSTNDICPAE-----KGVFIALAVIALTGLLAGF 822
Ce      SAYPPMGNVDVFMPIEFEPARLQLNLCILWFFGQDPQNSILFVIITISIAVLLCVL 1013
          *

Hs      FIVLLIHFEGWRI SFYWNVSVHRVLG-FKEIDRQTEQ--FEYAAYIIHAYKDKDWWEH 773
Pt      FIVLLIHFEGWRI SFYWNVSVHRVLG-FKEIDRQTEQ--FEYAAYIIHAYKDKDWWEH 773
Ss      FIVLLIHFEGWRI SFYWNVSVHRVLG-FKEIDKQPEQ--FEYAAYIIHAYKDRDWWEH 774
Mm      LVVLLIHIEGWRI SFYWNVSVHRILG-FKEIDTQAEQ--FEYTAYIIHAHKDRDWWEH 774
Ac      SVVLLIHFEGWRIKFFWSVTVNRVLG-QREIDRPQQW--FDYDAYIIHRSRDKDNVWVSKN 749
Gg      FIVLLIHFEGWRIAFYWNISINRILG-FKELDRLPGV--FDYDAYVIHARKDINWVLTN 764
Xt      LSVLLIQFQGWRI FNYWTVSINRILG-FKEIDPRKRN--FDYDAYIIHAQNDVSWVENH 763
Dr      FISFLVHFQGWRIQFYWNIMVNRMLGSLKDAKVTEGR--FQFDAYIIHAGEDKSWVERS 774
Pl      LVTALGYHNRWQLRYRFLVRLAAIG-YKEMREAREHN-DYEFDLNIIIFYDEDEEWIRDH 128
Dm      TAALYYKFQ--TEIKIWLVAHNLWVFTTEDLDKDK--KFDAFISYSHKQDSFIEDY 876
Ce      VILAISFIRKSHDAINQRRYKASSLNCSTAGSSPLPVPLLSYHAFVSYSKKDEKVIDQ 1073
          *

Hs      FSS-MEKEDQ-SLKFCLEERDFEAGVFLEAIVNSIKRSRKII FVITHHLLKDP LCKRKF 831
Pt      FSS-MEKEDQ-SLKFCLEERDFEAGVFLEAIVNSIKRSRKII FVITHHLLKDPVCKRKF 831
Ss      FAP-MEEKDE-TLRFCEERDFEAGALELEAIVNSIKRSRKII FVITQHLLKDP LCKRKF 832
Mm      FSP-MEEQDQ-SLKFCLEERDFEAGVGLLEAIVNSIKRSRKII FVITHHLLKDP LCRKF 832
Ac      FIP-LEENEPVIRFCLEERDFEAGISEFEAIVDSIKRSRKII FVVTEHLLKDPWCRKF 808
Gg      FTS-LEENEQFQVFCLEERDFEAGISEFEAIIINCIRRSRKII FIVTEHLLQDPWCRKF 823
Xt      LIP-LEKNAGSKLQFCFEERDLEAGTSTLSAFVDCINRSRKII FVVTRNLLNDSWCRKF 822
Dr      LLS-LEDKDL---NFFYEQRDSTPGHSRLETIVDNMVYSRKII FVITEMLLKDPWCRQFK 830
Pl      LRPAMDERLPQFQRNVFGDEDLVRMHYLDSDYVVSYSYKTVVVLRSASVDRWF-MLK 187
Dm      LVPQLEHGPPQ-KFQLCVHERDVLVGGHIPENIMRSVADSRRTIIVLSQNFIKSEWA-RLE 934
Ce      LCRPLEDEDYQLCLLHRDGPYCSNLHAISDELIAQMDSSQCLILVLT KHFLENEWKTLQ 1133
          *

Hs      VHHAVQQAIEQNLD SIILVFLEEIPDYKLNHALCLRRGMFK-SHCILN--WPVQKERIGA 888
Pt      VHHAVQQAIEQNLD SIILVFLEEIPDYKLNHALCLRRGMFK-SHCILN--WPVQKERIGA 888
Ss      VHHAVQQAIEQNLD SIILIFLEEIPDYKLNHALCLRRGMFK-SHCILN--WPVQKERINA 889
Mm      VHHAVQQAIEQNLD SIILIFLQNIIPDYKLNHALCLRRGMFK-SHCILN--WPVQKERINA 889
Ac      VHHAIQQAI EQSRDSIIVLFRDDIPDYKLNHALCLRRAMFK-SCCILE--WPVQKDHVNA 865
Gg      VHHALQQAIEQSRDSIILIFLHNIQDYKLNHALCLRRGMFR-SCCILN--WPVQKERINA 880
Xt      VQHAFQQAIEQN RDSIILIFLEDIPDYKLYHTIHLRRGMFK-SRCILD--WPDQMERIKT 879
Dr      AHHALHHVMEDNRDSIILIFLEDVTDYLNLSLHLRRGMLK-PKCVLY--WPLHKERIPA 887
Pl      FRTAMDHVSDTGT E FVVVFLIEDIPDEEIP--FLARLYLSD-GRPVY--WTGR----- 236
Dm      FRAAHR SALNEGRSRIIVIIYSIDIGDVEKLEDEELKAYLKMN-TYLKWGD PWFWDKLRFAL 993
Ce      IKTSHQLFAKNRAKRVI AVLDGVDANLLDDELGQILRKHTR IEMRSHLFWTILLHSSLPS 1193
          *

```

Figura 33: Allineamento a colori che evidenzia la natura dei vari AA; in rosso quelli idrofobici, in verde quelli idrofili, in blu quelli acidi e in viola quelli basici.

```

Plt1r3      -----MNPIDCNCDIMGY-DWLSGSLHL-----V NENQ TICSSASLKPLRDKHLL E 45
Spt1r3      -----MNPIDCNCDSLWFLDNLNGPLRLTFLEDDFDDDK TICSSASLEPLRGKHLID 52
Spslit      SLSSIDL SNNPINCNDLKWLLDWLSGPIHL-----LNEDETICSLASLDSVGEKPLLD 620
Spt1r4like  -----ALKVLTITDNQWLI DWLNGPIRLK-----KRDK TICSSASLEPLRKKPLMD 244
Sit1r1.2    SLLSFDLSLNPIDCNCDLRWF RDWMSGHIDI-----IDENRTVCSLASLEPLREKPLLD 714

Plt1r3      FNTNEFC SVNITL ICLVSLV VVCLILVTALGYHNRWQLRYRFLVRLAAIGYKEMREARE 105
Spt1r3      FDPREFCSINITLVCLPTLAIICLI FIVALVYHYRWPLRYRFLVKLAAVGYEEMRDARD 112
Spslit      FDPNELCGLNIVLICVLSLAAICFVVVVGFVYHNRWQLRFKLYLLKLAVLGYNELRDARD 680
Spt1r4like  FDPNELCKINNSLYSLIPLISISLVVVISVLLYHYRWQLRYKLFLLRLAACGYKEMRDARD 304
Sit1r1.2    FDPNKL CGLNIILVCLTPLAGIFLVVIVAVLYHNRWLLRYKLFLLKLMVIGYKEMRDARD 774

Plt1r3      HNDYEFDLNIIFYDEDEEWIRDLR PAMDERLPQFQRNVFGDEDLVLRMHYLDSVDYVVS 165
Spt1r3      HNDYQYDLNVIFYDEDEEWIREHLR PALAERLPQFQRNVFGDEDLVLGMHYLESVDYVVS 172
Spslit      HNDYEFDLNIIFYDDDEHWIREQLRPAFEQRLPQFERNVFGDDDLVLGMHYLDSVDYVVS 740
Spt1r4like  HNDYEFDVNIIFYDDDEEWIREQLRPALEERLPQFQRNVVFGDEDLVLGMHYLDSVDYVVS 364
Sit1r1.2    HNDYEFDLNIIFYDDDEEWVRQQ LQPALEERLPQFQRNVFGDKLILGMHYLDAVDYVVS 834

Plt1r3      HSYKTIVVLSRASVSDRWFMLKFR TAMDHVSDTGTEFVVVVFLEDIPDEEIPFLARLYLS 225
Spt1r3      HSYKTIVVLSAAVLD RWFILKFR TAMDHVSDTLTEFVVVVFLEDIPDDEMPFLARLYLS 232
Spslit      RSYKTIVIVLSRAAVRDRWFMLKLR IAMDHVSDTQTEFVVVVFLEDIPDDEIPFLARLYLS 800
Spt1r4like  HSYKTIVILLSRAAVHDHWFILKFR TAMDHVSDTLTEFVVVVFLEDIPDDEMPFLARLYLS 424
Sit1r1.2    HSYKTLILLSRAAVHDRWFMLKLR TAMDRVSDTQTEFVVVVFLEDIPDEDIPFLARLYLS 894

Plt1r3      DGRPYVYWTGR----- 236
Spt1r3      DGRPYIHWTE DQT-EDDVIHPAKKGWAHESDIAIFGNLQQV 273
Spslit      DGRPFLHWPNDERGQYEFWNELVKSL SINLR TNDLIPNE--- 839
Spt1r4like  DGRPYIHWTE DVREQDYFWEELTKNLTINLR TNDLIPNE--- 463
Sit1r1.2    DGRPYQHWTE DVEGHVFFWNALVKNLTINLR TNDLIPNE--- 933

```

Figura 34: Allineamento a colori che evidenzia la natura dei vari AA; in rosso quelli idrofobici, in verde quelli idrofili, in blu quelli acidi e in viola quelli basici.

SPECIE	ACCESSION NUMBER	NOME PROTEINA
Anolis carolinensis	XM_003221602.1	Tlr3
Caenorhabditis elegans	AF_348166.1	Toll-like receptors
Danio rerio	NM_001013269.3	Tlr3
Drosophila melanogaster	NM_170287.2	Toll-like receptors
Gallus gallus	NM_001011691.1	Tlr3
Homo sapiens sapiens	NM_003265.2	Tlr3
Mus musculus	NM_126166.4	Tlr3
Pantoglydotes	NM_001130470.1	Tlr3
Paracentrotus lividus	HG515389.1	Tlr3
Strongylocentrotus purpuratus	XP_795086.2	Tlr3
Strongylocentrotus purpuratus	XP_001184211.1	Tlr slit
Sus scrofa	NM_001097444.1	Tlr3
Xenopus tropicalis	XM_002934402.2	Tlr3

Tabella 1

SPECIE	ACCESSION NUMBER	NOME PROTEINA	% OMOLOGIA BLAST
<i>Paracentrotus lividus</i>	HG515389.1	Tlr3	----
<i>Strongylocentrotus Purpuratus</i>	XP_001184211.1	Tlr slit	70%
<i>Strongylocentrotus Purpuratus</i>	XP_001185026.2	Tlr4 like	71%
<i>Strongylocentrotus Intermedius</i>	ADP08783.1	Tlr1.2	70%
<i>Strongylocentrotus Purpuratus</i>	XP_795086.2	Tlr3	75%

Tabella 2

L'albero in figura 36 mostra la filogenesi di PI-Tlr3 rispetto alle proteine appartenenti solo al riccio di mare *S. purpuratus* TLR3, TLR4 e slit, e rende evidente, come la proteina, da noi trovata, clusterizza con la TLR3 di *S. purpuratus*. La matrice di distanza genetica mostrata in figura 37 mette in evidenza la maggiore omologia, o meglio la minore distanza evolutiva, della proteina PI-Tlr3 con TLR3 di *S. purpuratus* con TLR4 e slit.

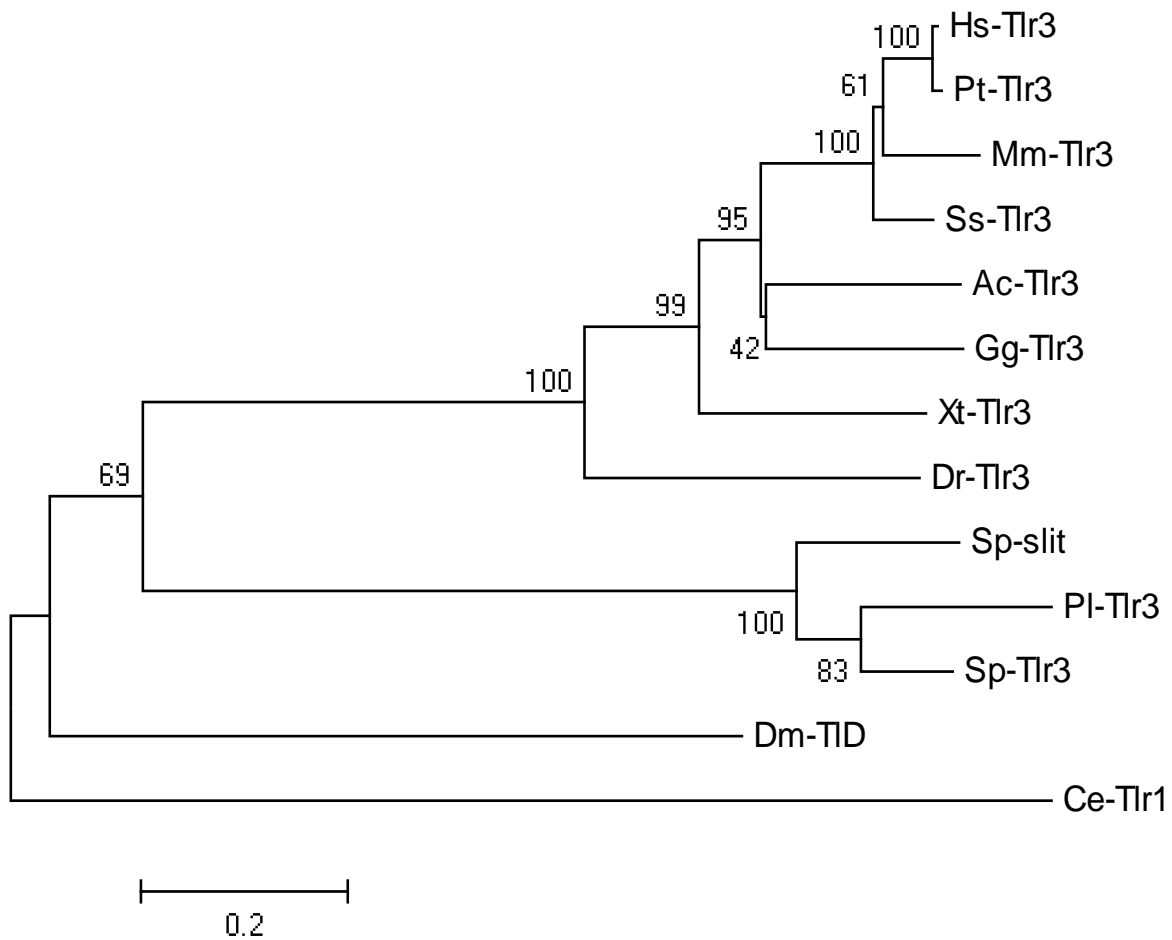


Figura 35: Albero filogenetico costruito con il PI-Tlr3 e i TLR3 di diversi animali.

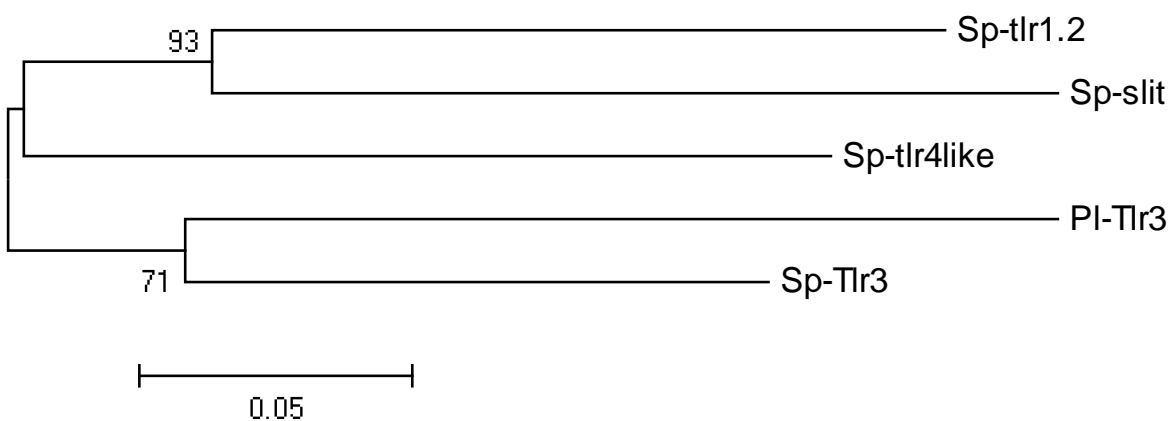


Figura 36: Albero filogenetico costruito paragonando PI-tlr3 e i TLR di altri Echinoidei.

Distance Matrix					
	1	2	3	4	5
1 Plt1r3	0.000	0.310	0.356	0.365	0.349
2 Spt1r3	0.310	0.000	0.329	0.299	0.330
3 Sps1it	0.356	0.329	0.000	0.256	0.178
4 Spt1r4like	0.365	0.299	0.256	0.000	0.250
5 Sit1r1.2	0.349	0.330	0.178	0.250	0.000

Figura 37: Matrice.

In realtà i geni TLR sono molto conservati soprattutto nella regione TIR e meno nella parte N-terminale contenente il dominio LRR e in accordo con quanto riportato in letteratura sul riccio di mare *S. purpuratus* (Buckley e Rast, 2012).

Questa divergenza nelle regioni LRR, può essere spiegata perché la selezione positiva gioca un ruolo nella diversificazione di quelle regioni ristrette che entrano in contatto con un ligando sconosciuto, che viene riconosciuto come “non self”, piuttosto che nei domini TIR. Negli Invertebrati, in assenza d’immunità adattativa mediata dalle Immunoglobuline, molto probabilmente il numero di recettori è così elevato per ampliare il range di riconoscimento di molecole “non self”.

Pertanto i TLR rappresentano un esempio di conservazione evolutiva di un sistema biologico a diversi livelli: genico e proteico.

La presenza di numerosi geni TLR nel riccio di mare (Hibino et al 2006; Buckley e Rast 2012), a differenza del ridotto numero in altri Invertebrati e Vertebrati, ha suggerito che un’espansione dei geni TLR sia avvenuta all’interno del phylum degli Echinodermi, come mostrato in figura 38, che riporta l’evoluzione dei recettori TLR nel regno animale.

I recettori TLR sia in Invertebrati che in Vertebrati scatenano una risposta immunitaria cellulare che può coinvolgere diverse vie di segnalazione. Queste potrebbero essere comuni o differenti nei diversi phylum e quindi potrebbero coinvolgere o meno le stesse proteine con diversa sequenzialità.

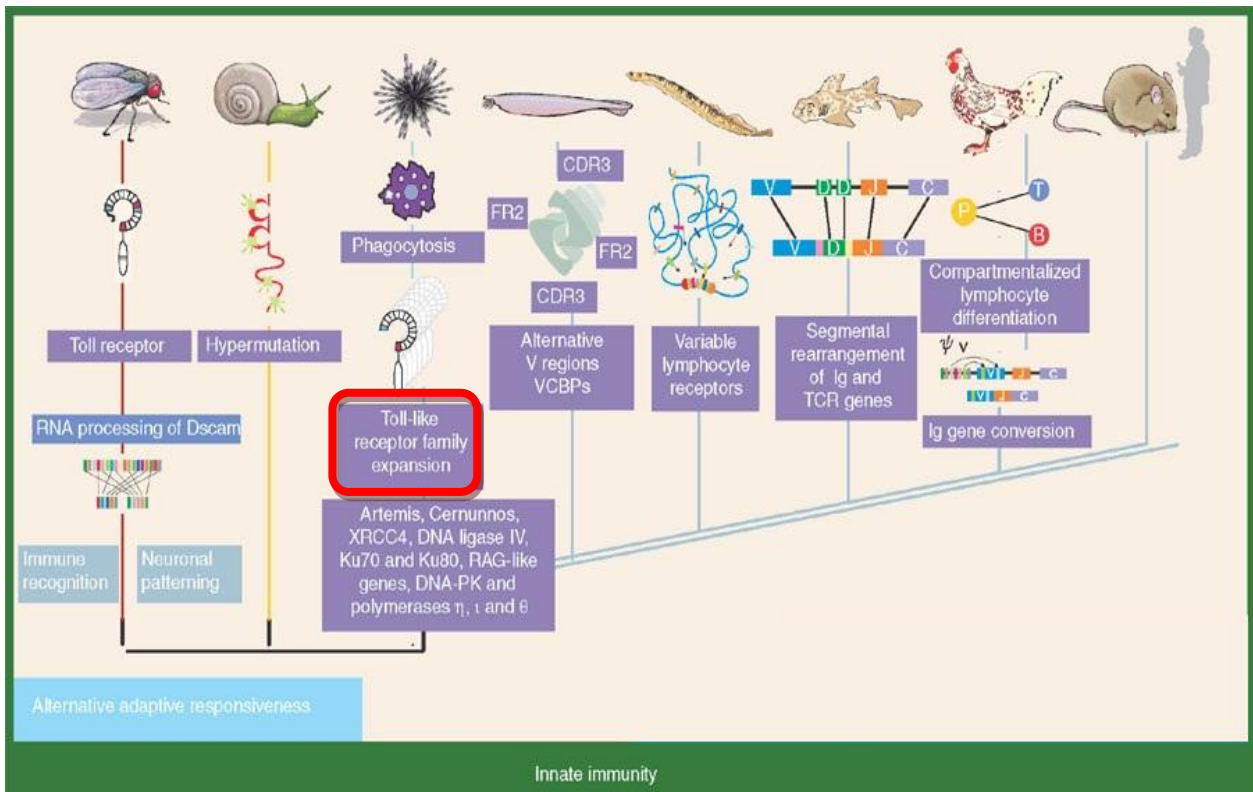


Figura 38: Evoluzione dei recettori TLR nel regno animale.

4.6 Analisi dell'espressione di *Pl-tlr3* in campioni trattati con PolyI:C e LPS

Il gene TLR isolato dal riccio *P. lividus* appartiene alla sottofamiglia TLR3 che, dalla letteratura, è attivato principalmente da RNA a doppio filamento. Il PolyI:C, alla concentrazione di 4 μ g per ml di fluido celomatico è stato iniettato nel celoma di riccio di mare, come descritto in dettaglio nella sezione Materiali e metodi. I ricci sono stati poi lasciati per un certo tempo in acquario allo scopo di innescare una reazione immunitaria.

Successivamente, dopo 3h, 9h, 24h e 48h, le cellule immuni sono state prelevate dai ricci trattati e non trattati (controllo), l'RNA è stato estratto, e l'espressione del gene *Pl-tlr3* analizzata tramite la tecnica della QPCR, tecnica sensibile e veloce.

Gli effetti d'infezioni batteriche sull'espressione di questo gene in *P. lividus* è stato analizzato utilizzando le LPS di *E. coli*, sostanze PAMP, capaci di mimare un'infezione batterica ed evocare una risposta immunitaria. Pertanto LPS sono state iniettate nel celoma di riccio di mare, alla concentrazione di 2 μ g per ml di fluido celomatico, come descritto in dettaglio nella sezione Materiali e metodi.

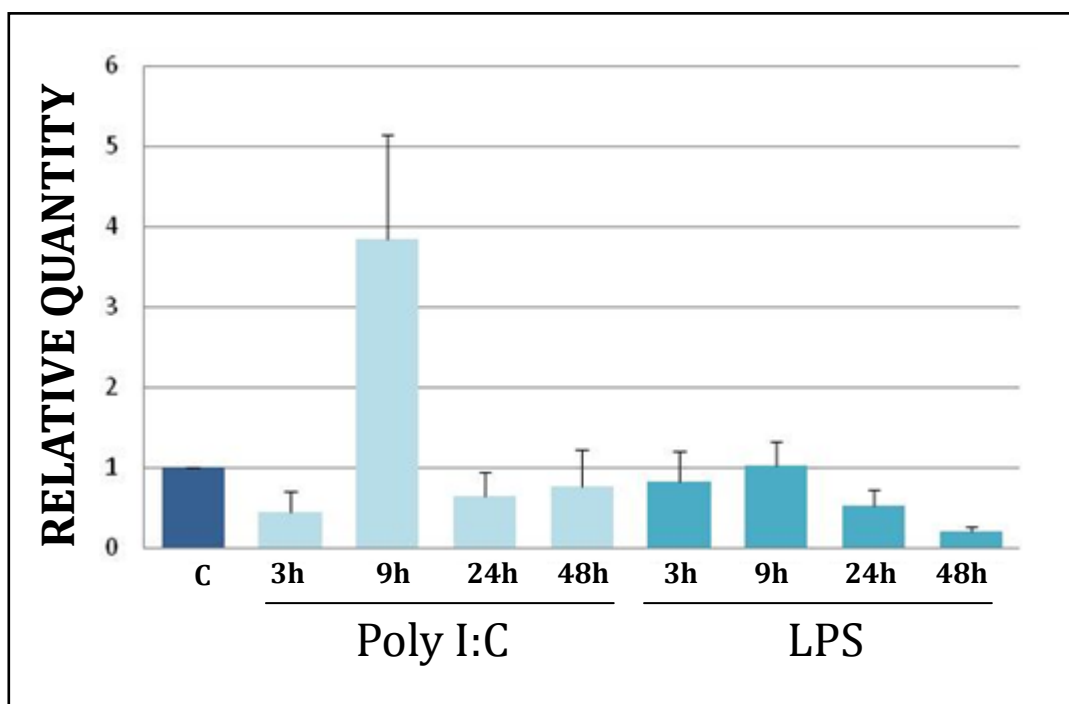


Figura 39: Analisi quantitativa dell'espressione genica del PI-tlr in campioni trattati con PolyI:C e LPS di *E.coli*

L'espressione genica di questi trattati ha evidenziato come gli animali esposti al PolyI:C abbiano un'evidente aumento dell'espressione genica del Toll-like receptors 3, dopo 9 ore (l'espressione si quadruplica rispetto al controllo), mentre a 3, 24 e 48 ore diminuisce di poco rispetto al controllo, come evidenziato nell'istogramma (Figura 39). Mentre gli animali esposti al LPS di *E. coli*, mostrano un'evidente diminuzione dell'espressione genica del Toll-like receptors 3. Infatti dopo 24 ore l'espressione si riduce della metà (valore 0,5) rispetto al controllo, e a 48 ore diventa un quinto (0,2), come evidenziato nello stesso istogramma. Al controllo viene attribuito il valore di riferimento 1 e nell'asse delle ordinate viene indicato la "quantità relativa" dell'mRNA oggetto di studio.

Dall'analisi dei risultati ottenuti si può concludere che l'espressione del gene *Pl-tlr3* è up-regolata dal trattamento con Poly I:C, in particolar modo, si ha un aumento dell'espressione dell'mRNA a 9 ore dal trattamento, mentre la stimolazione con LPS induce down-regolazione dell'espressione genica(Russo et al., 2015).

In effetti, questo risultato è in accordo con quanto esposto in letteratura, secondo cui i TLR3, presenti nell'endosoma, sono responsabili specificamente della risposta immunitaria a RNA a doppio filamento (Wang et al. 2010) sebbene Pan et al. (2011) riportano che l'iniezione di LPS induce l'espressione genica di TLR3 in monociti di sangue periferico umano.

Tra gli echinodermi non ci sono stati studi sul riccio di mare che riportano l'attivazione a livello di trascrizione di TLR. Mentre risulta noto che cellule immunitarie di *S. purpuratus*

rispondono, a livello trascrizionale, all'iniezione di LPS, che attiva l'espressione del gene della profilina nelle cellule immunitarie (Smith et al., 1991).

4.7 Isolamento del gene parziale TBK1 da cellule immunitarie di *P. lividus*

Durante il lavoro di tesi, si è tentato di isolare anche alcune delle proteine del pathway attivate dopo la stimolazione del TLR3, per determinare se fossero presenti e per analizzare la loro espressione temporale, tramite la tecnica della QPCR, in risposta a infezioni simulate. A tale scopo, è stata isolata una regione parziale (94bp) del gene TBK di *P. lividus*, chiamato *Pl-Tbk1*. L'omologia con geni isolati in altri organismi è stata determinata paragonando questa sequenza parziale, attraverso il programma BLAST. In tal modo è stato determinato che il gene isolato era omologo (per il 83%) a due probabili trascritti alternativi di un gene TBK-like di *S. purpuratus*.

L'analisi della sequenza proteica (Fig. 40) è stata svolta utilizzando strumenti Bioinformatici.

A I S W S Q V S W T G A T S S V Y L G R H K K T G D V V A V

Figura 40: Sequenza proteica del cDNA parziale di TBK1

Il software BLAST ha permesso d'identificare l'omologia aminoacidica con una porzione di proteina che codifica per la superfamiglia delle Serine/Treonine/ chinasi, TANK Binding Kinasi1 (Figura 41).

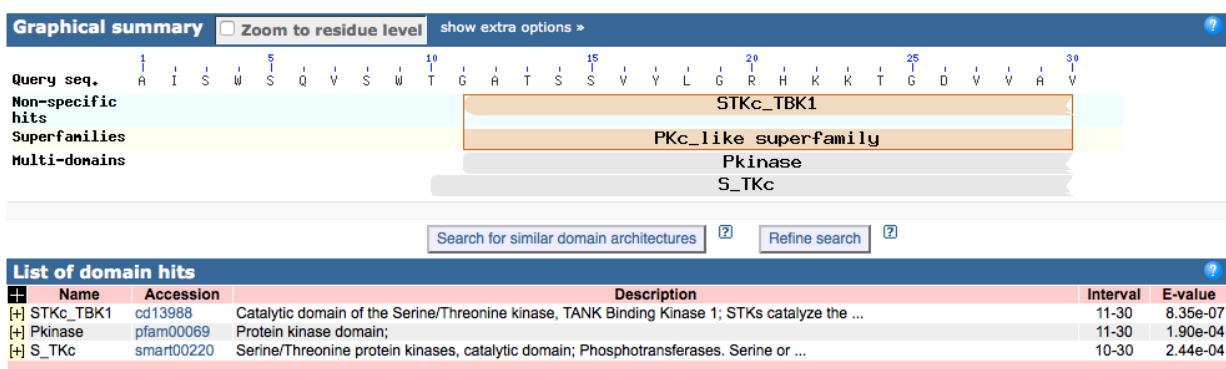


Figura 41: Identificazione della regione amplificata di *Pl-Tbk1*

L'analisi delle omologie di sequenza aminoacidica, condotta attraverso l'uso di BLAST, ha evidenziato l'omologia della *Pl-Tbk1* con le seguenti proteine presenti in banca dati: 95% con due isoforme proteiche della Serine/Treonine/ chinasi, TANK Binding Kinasi 1 (TBK1) di *S. purpuratus* (XP_784300.3 e XP_011670140.1), 80% con una isoforma proteiche della

serine/threonine-protein kinase TBK1-like di *Aplysia californica* (XP_005093119.1), 75% con altri TBK1 di altre specie presenti nella Tabella 3.

SPECIE	ACCESSION NUMBER	NOME PROTEINA	% OMOLOGIA SU BLAST
<i>Paracentrotus lividus</i>			
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_011670140.1	TBK1 isoform X1	95%
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_784300.3	TBK1 isoform X2	95%
<i>Aplysia californica</i>	XP_005093119.1	TBK1-like	80%
<i>Scleropages formosus</i>	KPP60062.1	TBK1-like	75%
<i>Oryzias latipes</i>	XP_004084071.1	TBK1-like	75%
<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018945925.1	TBK1-like	75%
<i>Larimichthys crocea</i>	KKF09326.1	TBK1-like	75%
<i>Stegastes partitus</i>	XP_008292000.1	TBK1-like	75%
<i>Biomphalaria glabrata</i>	XP_013083625.1	TBK1-like	70%

Tabella 3: Omologia del Pl-Tbk1 con altre specie.

4.8 Analisi dell'espressione genica di *Pl-Tbk1* in cellule immunitarie trattate con PolyI:C

Dopo iniezione di PolyI:C nel celoma di riccio di mare, come precedentemente descritto, le cellule immunitarie sono state prelevate a 3h, 9h, 15h, 18h, 24h e 48h, dal trattamento; l'RNA è stato estratto dai campioni ed analizzata l'espressione del gene *Pl-Tbk1* tramite la tecnica della QPCR.

Gli animali esposti al PolyI:C mostrano un'evidente aumento dell'espressione genica di *Pl-TBK1*. In particolare dopo 9 ore l'espressione aumenta del 50% rispetto al controllo, raggiungendo il picco massimo dopo 15 ore (con un incremento di 2 volte) mentre a 3, 9, 15 e 48 non si rilevano differenze statisticamente significative, come evidenziato nell'istogramma (Figura 42). Al controllo è attribuito il valore di riferimento 1 e nell'asse delle ordinate viene indicato la "quantità relativa" dell'mRNA oggetto di studio.

Dall'analisi dei risultati ottenuti con la tecnica della QPCR si può concludere che l'espressione del gene *Pl-tbk1* è indotta dal PolyI:C, con un aumento significativo

dell'espressione del messaggero già a 9 ore dal trattamento, ed un picco pari a 2 volte raggiunto a 15 ore dopo il trattamento.

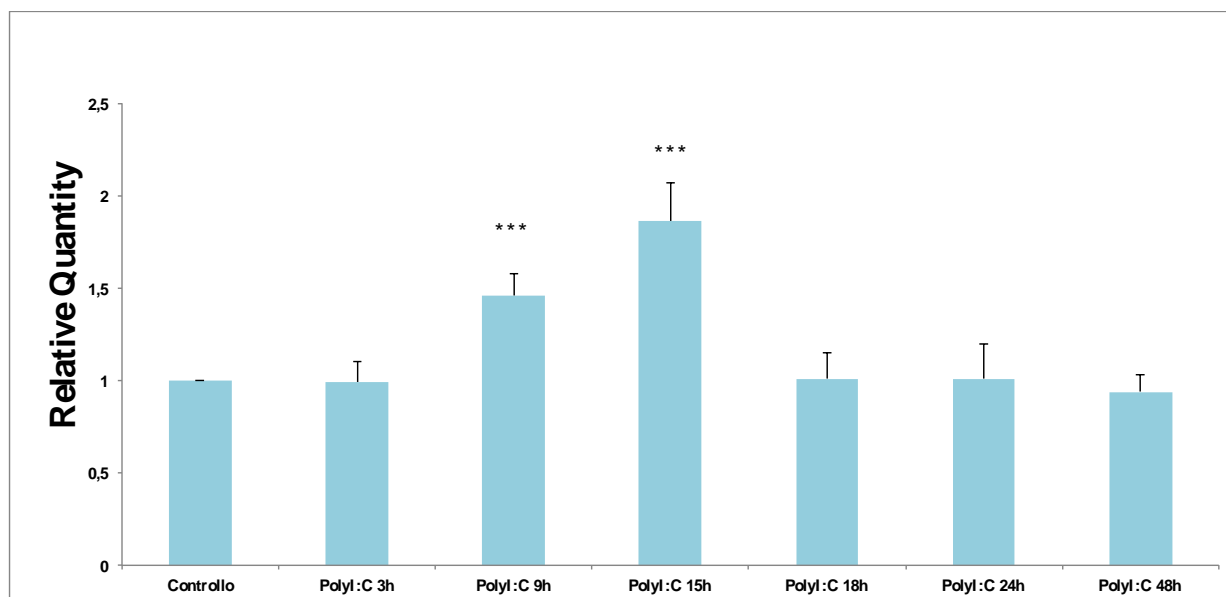


Figura 42: Analisi quantitativa dell'espressione genica del PI-Tbk1 in animali trattati con PolyI:C

La presenza della proteina chinasi TBK1 è di fondamentale importanza per l'espressione del fattore di trascrizione IRF3. Infatti TBK1 attivata, in seguito a autofosforilazione nella Ser-172, fosforila il fattore di trascrizione IRF3, che porta alla traslocazione di IRF-3 dal citoplasma al nucleo (Fitzgerald et al., 2003).

È stato scoperto di recente (Wu et al., 2014) che alcuni virus sono in grado di sequestrare il complesso TBK1-IRF3, attraverso interazioni di proteine virus-ospite, e portare alla mancata espressione dell'IFN- β . Quindi, sequestrando TBK1, i virus riescono a eludere le difese immunitarie. Ciò dimostra un ruolo chiave della proteina TBK1 nel pathway di segnalazione della risposta immunitaria, relativa soprattutto alle infezioni virali. La presenza di proteine TBK1 anche in organismi marini come il riccio di mare, esalta ancora di più l'importanza di TBK, che si è conservato durante l'evoluzione dagli Invertebrati ai Vertebrati.

4.9 Isolamento del gene parziale *IRF* da cellule immunitarie di *P. lividus*

È stata isolata una regione parziale (110bp) del gene IRF di *P. lividus*, chiamato *Pl-Irf*. L'omologia con geni isolati in altri organismi è stata determinata paragonando questa sequenza attraverso il programma BLAST. In tal modo si è visto che il gene isolato era omologo (per il 98%) a tre probabili trascritti alternativi di *S. purpuratus* (Tabella 4).

L'analisi della sequenza proteica (Figura 43) è stata svolta utilizzando strumenti Bioinformatici.

S G K D A C L F R A W A I H T K K Y D P A T E

Figura 43: Sequenza proteica del cDNA parziale di IRF

Il software ha permesso d'identificare l'omologia aminoacidica con una porzione di proteina che codifica per la superfamiglia IRF (Figura 44).

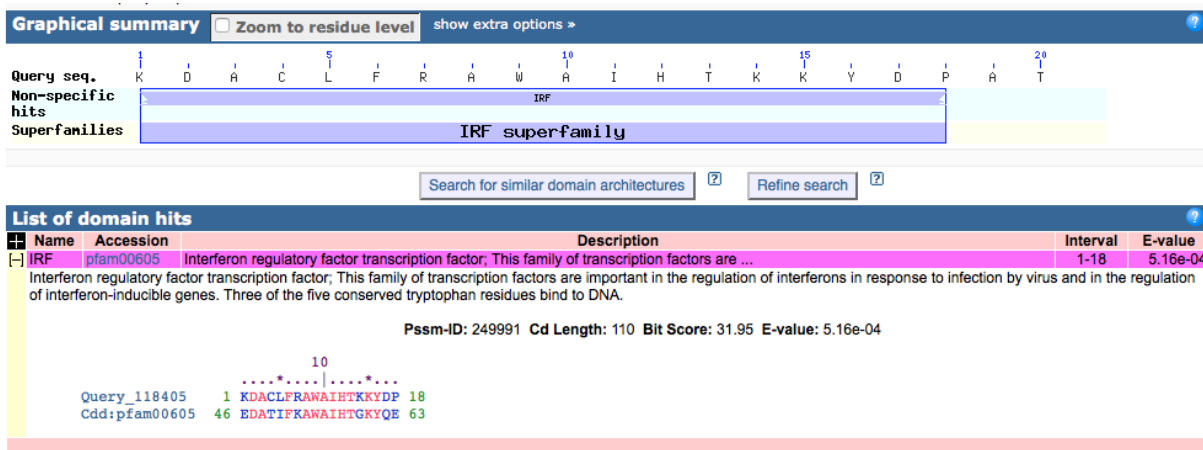


Figura 44: Identificazione della regione amplificata di *Pl-Irf*

L'analisi delle omologie di sequenza aminoacidica, ha messo in evidenza che la proteina *Pl-Irf* risulta avere un' alta percentuale di similarità con le seguenti proteine presenti in banca dati :95% con tre isoforme del fattore di regolazione dell'interferone (IRF) di *S. purpuratus* (XP_011666057.1, XP_003723620.1 e XP_780964.3), 78% con due isoforme proteiche del fattore di regolazione dell'interferone di un pesce *Austrofundulus limnaeus* (XP_013881639.1 e XP_013881638.1), 65% con altri IRF di altre specie presenti nella Tabella 4 tra cui molti Vertebrati (Uccelli).

SPECIE	ACCESSION NUMBER	NOME PROTEINA	% OMOLOGIA SU BLAST
<i>Paracentrotus lividus</i>			
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_011666057.1	Interferon regulatory factor - isoform X1	95%
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_003723620.1	Interferon regulatory factor - isoform X2	95%
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_780964.3	Interferon regulatory factor - isoform X3	95%
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	XP_013881639.1	interferon regulatory factor -like isoform X2	78%
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	XP_013881638.1	interferon regulatory factor -like isoform X1	78%
<i>Cathartes aura</i>	KFP48710.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Anas platyrhynchos</i>	EOA93465.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Opisthocomus hoazin</i>	KFR08176.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Mesitornis unicolor</i>	XP_010190429.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Gallus gallus</i>	NP_990746.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Charadrius vociferus</i>	KGL86969.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Coturnix japonica</i>	CAB91630.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Caprimulgus carolinensis</i>	XP_010166554.1	Interferon regulatory factor	65%
<i>Caprimulgus carolinensis</i>	KFZ58540.1	Interferon regulatory factor	65%

Tabella 4:Omologia di *Pl-Irf*

4.10 Analisi dell'espressione genica di *Pl-Irf* in cellule immunitarie trattate con PolyI:C

L'analisi dell'espressione genica, nel riccio di mare, ha evidenziato come gli animali esposti al PolyI:C mostrano un aumento dell'espressione di *Pl-Irf*. Dopo 18 ore l'mRNA di tale gene aumenta di più di 2 volte rispetto al controllo (avente valore 1), raggiungendo il picco massimo dopo 24 ore (la quantità di messaggero è infatti quasi sei volte superiore al controllo) mentre a 3, 9, 15 e 48 non ci sono differenze statisticamente significative, come evidenziato nell'istogramma in Figura 45.

Questa famiglia di fattori di trascrizione sono attivati per fosforilazione in Ser/Thr da proteine chinasi come TBK1 e IKK. Una volta attivati dimerizzano per attivare a loro volta specificamente citochine infiammatorie della famiglia di Interferoni IFN-alfa e beta. Quindi si trovano quasi alla fine del pathway di segnalazione della famiglia TLR. Nonostante siano

attivati per fosforilazione, ci si potrebbe aspettare che il messaggero e la proteina Irf siano già presenti nelle cellule immunitarie. Tuttavia i nostri risultati dimostrano che c'è anche un'attivazione trascrizionale di IRF. Tale attivazione è temporalmente a valle dell'attivazione trascrizionale di TBK1 (9-15 ore dal trattamento con PolyI:C).

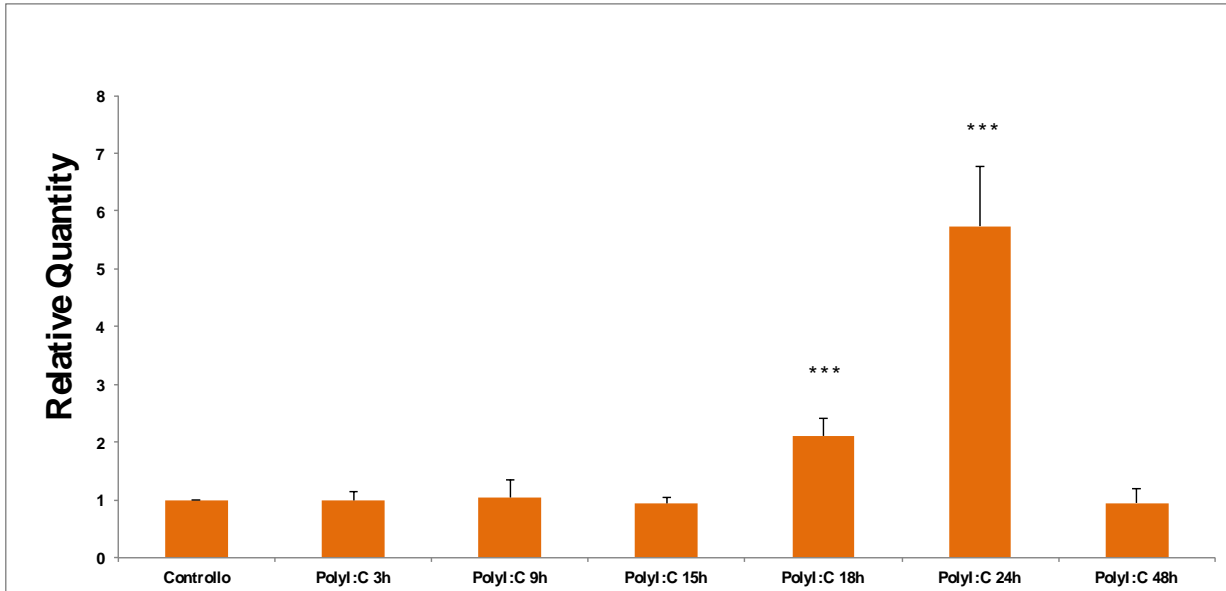


Figura 45: Analisi quantitativa dell'espressione genica del PI-Irf in campioni trattati con PolyI:C

4.11 Analisi dell'espressione di proteine citochine-like in campioni trattati con PolyI:C

➤ INTERLEUCHINE

Dalle cellule immunitarie del riccio di mare controllo e trattati con PolyI:C sono state estratte le proteine totali per la valutazione dell'espressione proteica dopo 9h, 15h, 18h, 24h e 48h dal trattamento. La presenza della proteina è stata rilevata mediante l'anticorpo monoclonale anti-human IL-1.

Il Western Blot degli estratti proteici provenienti da animali trattati ha evidenziato una banda proteica avente un peso molecolare di circa 17/18kDa, non presente nei campioni Controllo (Figura 46). Inoltre l'andamento temporale dell'espressione ha mostrato che essa è visibile solo dopo 48h dal trattamento mentre non è presente nei campioni a 9h (non mostrato in figura), 15h, 18h e 24h (Figura 46).

Contrariamente ai recettori per le interleuchine, presenti nel riccio di mare *S. purpuratus* (Hibino et al 2006) e isolati nella stella di mare *Asteria forbesi* (Beck et al 2000), le interleuchine non sono state finora né isolate né caratterizzate in Echinodermi. Tuttavia in banca dati Genbank è presente una interleuchina IL-17 di *S. purpuratus* (Accession number XM_003728782.1) di 159 aa, il cui peso molecolare è pari a 17,5 kDa, che corrisponde perfettamente al peso della banda ottenuta per WB nel nostro laboratorio, utilizzando un anticorpo IL-1 umano. Inoltre Hibino et al (2006) riportano la presenza, in *S. purpuratus*, di ben 25 isoforme di IL-17, un Sp-IL17 receptor-like e un recettore IL-1R/CD121 (SPU_005871). Pertanto la banda trovata in questo lavoro e mostrata in figura potrebbe corrispondere a una di queste isoforme presenti.

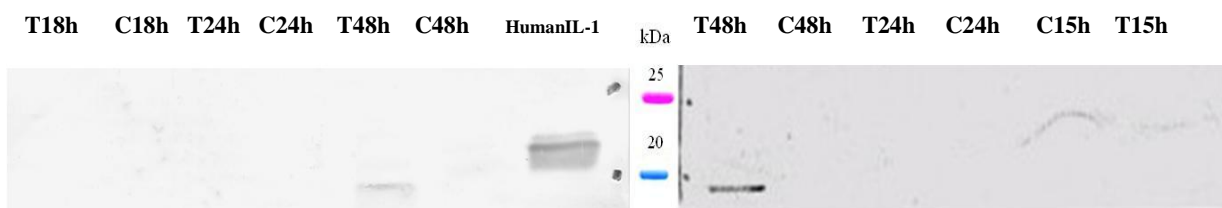


Figura 46: Western Blot con anti-human IL-1 degli estratti proteici di animali inoculati con polyI:C da 15h a 48h

La famiglia IL-17, nei Vertebrati ha sei membri (IL-17A-F), e rappresenta un distinto sistema di segnalazione con una ben documentata funzione pro-infiammatoria, soprattutto attraverso il reclutamento di neutrofili, e una funzione nella maturazione delle cellule progenitrici ematopoietiche (Huang et al. 2004; Kawaguchi et al. 2004; Kolls and Linden 2004).

Il Western Blot degli estratti proteici da animali trattati con PolyI:C con l'anticorpo monoclonale anti-human IL-6 che identifica una parte della proteina, non ha evidenziato una banda proteica netta e visibile nel gel. Questo potrebbe significare il mancato riconoscimento della proteina da parte dell'anticorpo usato in questo caso. Quest'ultima possibilità è verosimile, dato che spesso gli anticorpi di origine umana o murina non riconoscono le proteine estratte da cellule di riccio di mare.

➤ **TNF- α**

Dalle cellule immunitarie estratte dai ricci trattati (9h, 15h, 18h, 24h e 48h) e dei ricci non trattati sono state estratte le proteine totali per la valutazione dell'espressione proteica. La presenza della proteina è stata rilevata mediante l'anticorpo monoclonale anti-human TNF- α che identifica una parte della proteina.

Il Western Blot degli estratti proteici da animali trattati con PolyI:C ha evidenziato una componente avente un peso molecolare di circa 17/20kDa (Figura 47). Inoltre l'andamento temporale dell'espressione ha mostrato che anch'essa è visibile solo dopo 48h dallo stimolo mentre non è presente nei campioni a 9h, 15h, 24h (non mostrati in figura), 18h (mostrati in figura 47, in doppio).

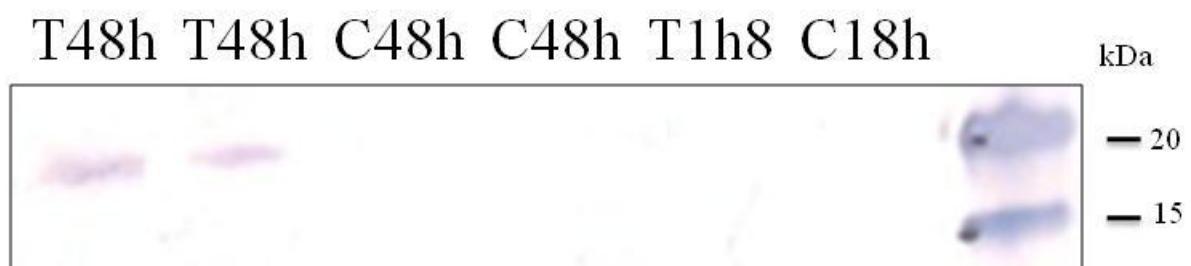


Figura 47: Western Blotting con anti-human TNF- α degli estratti proteici di animali inoculati Con polyI:C a 18h e 48h

In banca dati è possibile trovare una sequenza di TNF-alfa di *S. purpuratus* (Accession number XP_001191550.1) di 219aa, il cui peso molecolare è pari a 24kDa, che non corrisponde al peso della banda ottenuta per WB nel nostro laboratorio, utilizzando un anticorpo TNF-alfa umano. Questa discrepanza di peso probabilmente è dovuta a un taglio enzimatico della

proteina, in quanto, è noto, che nell'uomo è prodotta, prima una forma di proteina inizialmente associata alla membrana composta da 233 aa e dal peso 25,6 kDa, che in seguito a rimozione enzimatica di 76 amminoacidi N-terminali, genera una molecola solubile di TNF-alfa dal peso di 17kDa.

Inoltre, Hibino et al (2006) riportano che in *S. purpuratus* sono presenti 4 isoforme di TNF-alfa -like e 8 isoforme di recettori per il TNF-alfa.

4.12 Pathway di regolazione riassuntivo della risposta immune in *P.lividus*

Dai risultati ottenuti in questo lavoro è stato possibile disegnare il pathway di regolazione spaziale e temporale riassunto nella figura 45. Infatti gli esperimenti hanno mostrato che il trattamento delle cellule immunitarie di riccio di mare *P. lividus* con PolyI:C, che mima una infezione virale, induce un aumento dell'espressione del gene *Pl-tlr3*, a 9 ore dal trattamento, mentre la stimolazione con LPS induce una sua diminuzione. Non sono stati rilevati in questo studio l'espressione dei geni/proteine adattatori molecolari TRIF e TRAF6, né tutte le MAP-chinasi. Mentre è stato isolato il gene per la chinasi TBK1, il cui messaggero risulta essere incrementato da 9 a 15 ore dal trattamento. Il messaggero di un membro della famiglia di fattori di trascrizione IRF, isolato parzialmente durante il periodo di tesi di dottorato, aumenta dopo circa 18-24 ore dal trattamento con PolyI:C. Infine le proteine citochine-like, TNF-alfa e IL risultano attive a 48 ore dal trattamento con PolyI:C.

Paragonando il pathway del riccio di mare *P. lividus* (Figura 48) e quello molto complesso dell'uomo, mostrato in figura 15, si deduce che molto probabilmente in riccio di mare i meccanismi di segnalazione sono semplificati e differenti, anche se non tutti sono ancora noti.

Tuttavia è interessante notare che nel riccio di mare, e in generale negli Echinodermi, siano presenti proteine simili, omologhe a quelle di Vertebrato, coinvolte nei pathway di regolazione del sistema immunitario. Infatti, nel pathway di segnalazione del riccio di mare *S. purpuratus* mostrato in Figura 21, riportato da Hibino et al (2006), sono mostrati alcuni geni a valle dei recettori TLR (come TRAF6, TBK1) e in Genbank sono pubblicati molti dei geni di *S. purpuratus* coinvolti nella risposta immunitaria. Questi dati sembrano evidenziare delle omologie evolutive molecolari e funzionali in alcuni pathway presenti in Invertebrati e Vertebrati.

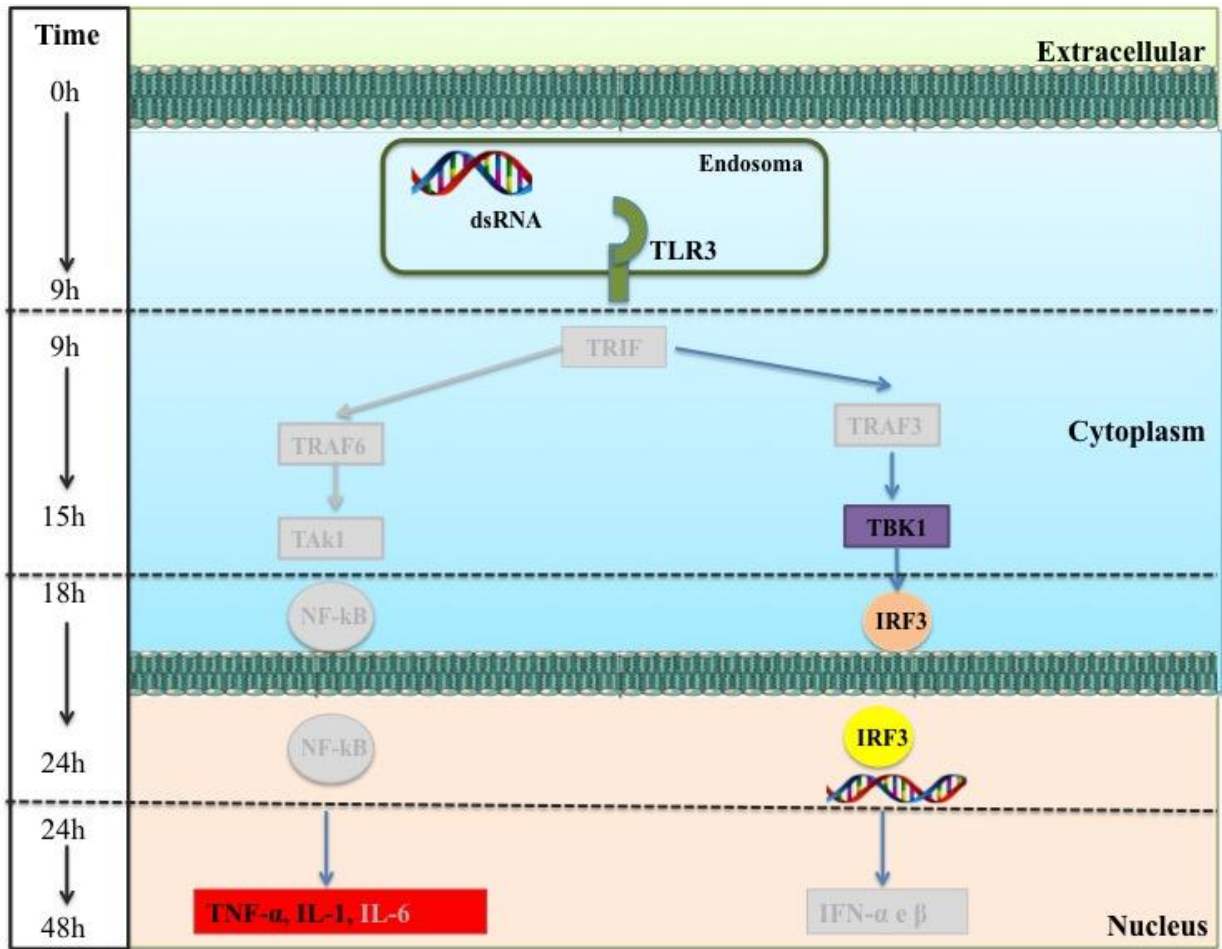


Figura 48: Pathway di regolazione riassuntivo della risposta immune in *P. lividus*. (in grigio i geni non identificati)

5 CONCLUSIONI

Fin dalla comparsa sulla Terra delle prime cellule eucariotiche, una serie di meccanismi di difesa si sono evoluti al fine di garantire l'integrità cellulare, l'omeostasi e la sopravvivenza degli organismi.

Ad esempio, gli Invertebrati, dai protozoi ai metazoi, hanno potenziato il numero di recettori cellulari in grado di legarsi alle molecole non-self. Questa capacità, negli animali multicellulari tra cui spugne, vermi, cnidari, molluschi, crostacei, chelicerati, insetti, ed echinodermi, è associata alla presenza di cellule immunitarie fagocitiche quali gli amebociti, gli emociti, i fagociti. Queste cellule hanno aspetto e funzioni simili a quelle dei macrofagi dei Vertebrati (Dzik, 2010)

Lo studio degli Echinodermi è particolarmente interessante perché essi possiedono caratteristiche tipiche dei protostomi e dei deuterostomi, suggerendo un passaggio chiave nell'evoluzione fino ai Vertebrati superiori. Il sistema immunitario di questo phylum è costituito da un insieme di meccanismi apparentemente semplici, sorti nel corso di milioni di anni, allo scopo di proteggere l'ospite dai microbi e dai loro prodotti invasivi.

Il riccio di mare *P. lividus* (Echinoderma), oggetto di questa tesi di Dottorato è considerato un ottimo organismo modello, valido per studi di tossicologia, risposta allo stress, embriologia, biochimica, biologia molecolare, effettuati sia sull'embrione sia su cellule adulte dalla fine del 1800 (Horstadius 1900) ad oggi (Peter and Davidson, 2016). Le ragioni dell'utilizzo di questo organismo sono le seguenti: vive nel Mar Mediterraneo ed è facilmente reperibile presso le nostre coste, ha embriogenesi rapida e in 48 ore è possibile ottenere lo stadio larvale di pluteo, nell'embrione allo stadio di morula inizia la specificazione dei territori embrionali, l'embrione è resistente a diversi stress, e oltretutto il genoma della specie americana *Strongylocentrotus purpuratus* è stato sequenziato e pubblicato (Sodergren et al. 2006).

Sebbene molto sia noto sull'embriogenesi di riccio di mare, la ridotta conoscenza delle reali capacità del suo sistema immunitario (e di quello degli Echinodermi in generale) ha rinnovato l'interesse per l'immunità innata e per le sue potenzialità. Il gruppo americano del Dr. Davidson in effetti ha dato un forte contributo allo studio del Gene Regulatory Network a livello embrionale di *S. purpuratus* (Peter and Davidson, 2016), ma ad oggi poco è noto sui pathway delle cellule adulte immunitarie.

Nel riccio di mare una gran quantità di PAMP sono riconosciute grazie all'elevato numero di geni che codificano per recettori TLR, che in *S. purpuratus* sono più di 200, classificati in maniera diversa rispetto ai vertebrati (Hibino et al. 2006). Questi recettori, tipici degli organismi con immunità innata, contengono regioni LRR ricche di leucine, che rappresentano la regione variabile di tali recettori, in grado di riconoscere e legare i diversi antigeni. La variabilità nel dominio contenente LRR, può essere spiegato, negli Invertebrati come il riccio di mare, dall'azione della pressione selettiva sulle regioni proteiche coinvolte nel riconoscimento di PAMP (Rast et al., 2006; Smith et al., 2003). Questo spiega il perché il riccio di mare possiede numerosi geni TLR-like (Hibino et al., 2006). In tal modo la variabilità assicura il riconoscimento di migliaia di antigeni estranei. Una simile espansione dei geni è stata osservata nel cordato anfiosso *Branchiostoma floridae* (Huang et al., 2008). Prese insieme queste considerazioni, sono consistenti con la presenza della sola immunità innata e la mancanza di memoria cellulare specifica negli Invertebrati. Anche se Rowley and Powell (2007) criticano questa teoria, e ipotizzano che gli Invertebrati sono capaci di mostrare una sorta di "memoria", come nel caso degli insetti che riesposti alla seconda infezione, rispondono più velocemente, secondo un meccanismo denominato "immune priming" (Pham et al., 2007).

Inoltre, in bibliografia esistono studi su Invertebrati, in particolare, *Macrocyclus albidus* e *Daphnia magna*, in grado d'aumentare la propria resistenza a un parassita a cui sono stati precedenti esposti nel corso della loro vita (Little et al 2003, Kurtz and Franz 2003).

Nel riccio di mare *S. purpuratus* sono stati scoperti geni Ig-like e geni RAG che attivano la ricombinazione (recombination activating genes) (Hibino et al 2006) che accendono la discussione sulla presenza di una primitiva risposta adattativa in Invertebrati.

In effetti negli Agnati, in particolare nelle lamprede, è stata rilevata la presenza sia di proteine recettore VLR, ricche di motivi LRR (Velikovskiy et al 2009), strutturalmente molto simili ai recettori Toll like di riccio di mare, sia di recettori TCR-like e CD4-like (Pancer 2004). Pancer ha studiato gli Agnati per comprendere un meccanismo immunitario probabilmente evolutosi distintamente da quello prettamente adattativo degli Gnatostomi, e che possiede delle similarità con quello di Invertebrati più evoluti come gli Echinodermi.

In questo studio si è tentato di dare un contributo all'analisi dei meccanismi di risposta immunitaria innata che avvengono nel riccio di mare mediterraneo *P. lividus*, in seguito a una possibile infezione virale e/o batterica.

Infatti è stato isolato e caratterizzato il gene, *Pl-tlr3*, uno dei membri della numerosa famiglia di recettori TLR, il Toll like Receptor 3, responsabile del riconoscimento dell'agente estraneo in caso d'infezione virale.

Dopo un'infezione, la risposta immunitaria umorale e cellulare, determina un network in cui i protagonisti principali sono i recettori di membrana ed endosomiali. Il riconoscimento delle molecole non-self da parte di specifici recettori di membrana, innesca la risposta immune, stimolando eventi consecutivi intracellulari.

La scoperta delle funzioni dei recettori della famiglia TLR e dei pathway da essi attivati, fornisce nuove prospettive di conoscenza della risposta immunitaria negli Invertebrati e Vertebrati. Lo studio evolutivo, a partire dagli Invertebrati marini come il sistema modello riccio di mare *P. lividus*, potrà fornire indicazioni interessanti per la comprensione di sistemi più complessi, presenti nei Vertebrati superiori.

In conclusione, risulta evidente che ci sia stata una co-evoluzione tra ospiti e parassiti, che ha portato a una stretta interazione tra gli elementi dell'immunità innata e adattativa dell'ospite e i meccanismi di evasione del parassita (Buchmann, 2014). Infatti i batteri e i virus hanno evoluto particolari meccanismi per eludere gli intricati sistemi di difesa immunitari dell'ospite. Di conseguenza gli animali possono solo sopravvivere, evolvendo nuove molecole del sistema immunitario, sempre più efficienti, in grado di contrastare l'invasione patogena.

Dunque non c'è dubbio che tutte le specie, uomo compreso, partecipano alla gara della "Regina Rossa" con i loro agenti patogeni. Così come la Regina suggerisce ad Alice (*Attraverso lo specchio e quel che Alice vi trovò*), in maniera metaforica, di correre due volte più veloce per poter andare da qualche parte, allo stesso modo gli esseri viventi, cercano di adattare le loro difese immunitarie molto più rapidamente rispetto a quanto facciano gli agenti patogeni, allo scopo di "vincere" la corsa verso il successo evolutivo.

6 BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Alder, M.N., Rogozin, I.B., Iyer, L.M., Glazko, G. V., Cooper, M.D., Pancer, Z., 2005. Diversity and Function of Adaptive Immune Receptors in a Jawless Vertebrate. *Science* (80-.). 310.
- Altschul S. F., Madden T. L., A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Anderson K.V., Bokla L., Nusslein-Volhard C., 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, vol 42, United States, pp 791-798
- Andersson L., Bohlin L., Iorizzi M., Riccio R., Minale L., Moreno-López W, 1989. Biological activity of some saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. *Toxicon* 27: 179-188.
- Arizza, V., Giaramita, F.T., Parrinello, D., Cammarata, M., Parrinello, N., 2007. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147, 389–394. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.022
- Armant M.A., Fenton M.J., 2002 Jul 29. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.*; 3(8):REVIEWS3011
- Azumi, K., De Santis, R., De Tomaso, A., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M.R., Marino, R., Shida, K., Ikeda, M., Ikeda, M., Arai, M., Inoue, Y., Shimizu, T., Satoh, N., Rokhsar, D.S., Du Pasquier, L., Kasahara, M., Satake, M., Nonaka, M., 2003. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: ``waiting for Godot''. *Immunogenetics* 55, 570–581. doi:10.1007/s00251-003-0606-5
- Akira S., Uematsu S., 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med*, 84:712-725.
- Bals, R., Wilson, J.M., 2003. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 711—720. doi:10.1007/s00018-003-2186-9
- Bang, F.B., 1975. A search in *Asterias* and *Ascidia* for the beginnings of vertebrate immune responses. *Ann. NY Acad Sci* 2665, 334–342.
- Beck, G., Habicht, G.S., 1991. Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense. *Immunol. Today* 12, 180–183. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(91)90049-Y
- Beck G. and Habicht G. S. (1996). Characterization of an Il-6-like molecule from an echinoderm (*Asterias Forbesi*) *CYTOKINE*, Vol. 8, No. 7: pp 507–512. 88
- Beck G., Ellis T. W. and Truong N. (2000). Characterization of an IL-1 receptor from *Asterias forbesi* coelomocytes. *Cellular Immunology* 203, 66–73.
- Bell J.K., Mullen G.E., Leifer C.A., Mazzoni A., Davies D.R., Segal D.M., 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.*; 24:528–533. [PubMed:14552836]
- Bella J., Hindle K.L., McEwan P.A., Lovell S.C., 2008. The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol. Life Sci.*; 65:2307–2333. [PubMed: 18408889]
- Bertheussen, K., 1983. Complement-like activity in sea urchin coelomic fluid. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 21–31. doi:10.1016/0145-305X(83)90051-4
- Bertheussen, K., Seljelid, R., 1982. Receptors for complement on echinoid phagocytes. I. The opsonic effect of vertebrate sera on echinoid phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 6, 423–31.
- Beschin, A., Bilej, M., Torreale, E., De Baetselier, P., (2000). Review On the existence of cytokines in invertebrates, *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 801-814.
- Bilej M., Procházková P., Silerová M., Jusková R. 2010. Earthworm immunity. *Adv Exp Med Biol*, 708:66-79.
- Birkeland, C., 1989. The influence of echinoderms on coral-reef communities. *Echinoderm Stud.* 1–79.
- Boehm, T. 2006. Quality control in self/nonself discrimination. *Cell* 125, 845–858
- Booolootian R. A., Giese A. C., 1958. *Biol. Bull.*, 115: 53-63.
- Boudouresque, C.F., Verlaque, M., 2001. Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Dev. Aquac. Fish. Sci.* 32, 177–216. doi:10.1016/S0167-9309(01)80013-2
- Botos, I., Segal, D.M., Davies, D.R. 2011. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. *Structure.* 19(4): 447–459. doi: 10.1016/j.str.2011.02.004.
- Brogden K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.

- Buchmann, K., 2014. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front. Immunol.* 5, 459. doi:10.3389/fimmu.2014.00459
- Buckley, K., Rast, J., 2012. Dynamic Evolution of Toll-Like Receptor Multigene Families in Echinoderms. *Front. Immunol.* 3, 136. doi:10.3389/fimmu.2012.00136
- Burch-Smith T.M., Nesh-Kumar S.P., 2007. The functions of plant TIR domains. *Sci. STKE.*; 2007:e46.
- Canicatti C., 1991. Binding properties of Paracentrotus lividus (Echinoidea) hemolysin: *Comp Biochem Physiol A*, v. 98, p. 463-8.
- Canicatti C. e Rizzo A., 1991. A 220 kDa coelomocyte aggregating factor involved in Holothuria polii cellular clotting. *Eur J Cell Biol.* 56(1):79-83.
- Canicatti, C., 1992. The echinoderm lytic system. *Boll. Zool*, 59, pp.159–166
- Cervello, M., Arizza, V., Cammarata, M., Matranga, V., Parrinello, N., 1996. Italian Journal of Zoology Properties of sea urchin coelomocyte agglutinins. *Ital. J. Zool. Ital. J. Zool* 634, 353–356. doi:10.1080/11250009609356158
- Chia, F.S., Xing, J., 1996. Echinoderm coelomocytes. *Zool. Stud.* doi:10.1056/NEJMr1313875
- Chiaramonte, M., Russo, R., 2015. The echinoderm innate humoral immune response. *Ital. J. Zool.* 82, 300–308.
- Chludil H.D., Seldes A.M., Maier M.S., 2002. Antifungal steroidal glycosides from the Patagonian starfish *Anasterias minuta*: Structure-activity correlations. *J. Nat. Prod.* 65: 153-157.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.-M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.-M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C., 2002. Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles gambiae*. *Science* (80-.). 298.
- Chomczynsky P. and Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analit Biochem* 162:156-159
- Coffaro K. A., 1979 - Ph. D. Thesis, University of California, Santa Cruz.
- Coffaro K. and Hinegardner R., 1977. Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*: *Science*, v. 197, p. 1389-90.
- Copray J.C., Mantingh I., Brouwer N., Biber K, Küst BM, Liem RS, Huitinga I, Tilders FJ, Van Dam AM, Boddeke HW. 2001. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol.*;118:203–211
- Costa C., Karakostis K., Zito F., Matranga V., 2012. Phylogenetic analysis and expression patterns of p16 and p19 in *P.lividus* embryos. *Dev. Genes. Evol.* 222, 245–251.
- Crescitelli F., 1945 - *Biol. Bull.* , Woods Hole 88: 30-36.
- Cuénot L., 1891 - *Archs Zool. Exp. gén.* ser. 2, 9:593-670.
- Dan-Sohkawa, M., Suzuki, J., Towa, S., Kaneko, H., 1993. A comparative study on the fusogenic nature of echinoderm and nonechinoderm phagocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 267, 67–75. doi:10.1002/jez.1402670110
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., Kisich, K.O., 2009. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2377–2392.
- Du Pasquier L. and Flajnik M. 1998. Origin and evolution of the vertebrate immune system. *Fundamental Immunology*. Paul W.E. Edition, Philadelphia – N-Y: Lippincott-Raven, 4th Ed. 605-650
- Dzik, J.M., 2010. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim. Pol.* 57, 443–466. doi:20101980 [pii]
- Edds K. T., 1977a - *Exp. Cell Res.* 108: 452-456.
- Edds K. T., 1977b - *J. Cell Biol.* 73: 479-491.
- Endean R., 1966. The coelomocytes and the coelomic fluids. In: R. A. Boolootian (ed.), *Physiology of Echinodermata*. J. Wiley, London and New York, pp. 301-328.
- Endean R., 1958 - *Quart. Jl. Microsc. Sci.* 99: 47-60.
- Ey P. L., Jenkin C. R., 1982. Molecular basis of self non-self discrimination in invertebrates. In: N. Cohen & M. M. Sigel (eds), *The reticulo-endothelial system*. Plenum Press, New York, London, pp. 321-391.
- Erta M, Quintana A, Hidalgo J. 2012. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *International Journal of Biological Sciences.* 8(9):1254-1266. doi:10.7150/ijbs.4679.
- Farmanfarmian A., 1966 - In: *Physiology of Echinodermata* (R. A. Boolootian, Ed.), pp. 245-265. J.

- Wiley (Interscience), London and New York.
- Finstad C. L., Litman G. W., Finstad J., Good R. A., 1972. J. The evolution of the immune response. 13. The characterization of purified erythrocyte agglutinins from two invertebrate species. 108: 1704.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., Maniatis, T., 2003. IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–496. doi:10.1038/ni921
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 47–59. <http://doi.org/10.1038/nrg2703>
- Fontaine A. R., Lambert P., 1977. *Can. J. Zool.*, 55: 1530- 1544.
- Gais, P., Tiedje, C., Altmayr, F., Gaestel, M., Weighardt, H., Holzmann, B., 2010. TRIF signaling stimulates translation of TNF-alpha mRNA via prolonged activation of MK2. *J. Immunol.* 184, 5842–8. doi:10.4049/jimmunol.0902456
- Gay, N.J., Gangloff, M., 2007. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 141–165. doi:10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318
- Geddes, P., 1879. On the Coalescence of Amoeboid Cells into Plasmodia, and on the So-Called Coagulation of Invertebrate Fluids. *Proc. R. Soc. London* 30, 252–255. doi:10.1098/rspl.1879.0114
- Gonzalez-Aravena, M., Perez-Troncoso, C., Urtubia, R., Branco, P., Machado Cunha da Silva J.R., Mercado, R., Julien De Lorgeri, J Bethke & Paschke. 2015. Immune response of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*: cellular, molecular and physiological approach. *Revista de biologia tropical* 63(2):309-320.
- Gross, P.S., Al-Sharif, W.Z., Clow, L.A., Smith, L.C., 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 429–442. doi:10.1016/S0145-305X(99)00022-1
- Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.-C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., Mann, M., Karin, M., 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204–207. doi:10.1038/nature04369
- Hancock, R.E.W., Brown, K.L., Mookherjee, N., 2006. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211, 315–322. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.017>
- Harrold, C., Pearse, J.S., 1987. The ecological role of echinoderms in kelp forests, in: *Echinoderm Studies*. pp. 137–233.
- He X.L., Bazan J.F., McDermott G., Park J.B., Wang K., Tessier-Lavigne M., He Z., Garcia K.C., 2003. Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron.*; 38:177–185. [PubMed: 12718853]
- Henson, J.H., Nesbitt, D., Wright, B.D., Scholey, J.M., 1992. Immunolocalization of kinesin in sea urchin coelomocytes: Association of kinesin with intracellular organelles. *J. Cell Sci.* 103, 309–320.
- Hetzl H. R., 1963 - *Biol. Bull., Woods Hole* 125: 289-301.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., Buckley, K.M., Brockton, V., Nair, S. V, Berney, K., Fugmann, S.D., Anderson, M.K., Pancer, Z., Cameron, R.A., Smith, L.C., Rast, J.P., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* 300, 349–365. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.065>
- Hickman, A.C.P., Roberts, L.S., Larson, A., 2003. *Animal Diversity, Zoology*.
- Hildemann, W.H., Dix, T.G., 1972. Transplantation reactions of tropical Australian echinoderms. *Transplantation* 14, 624–33.
- Hildemann, W.H., Raison, R.L., Cheung, G., Hull, C.J., Akaka, L., Okamoto, J., 1977. Immunological specificity and memory in a scleractinian coral. *Nature* 270, 219–223. doi:10.1038/270219a0
- Hilgard H. R., Phillips J. R., 1968 - *Science* 161:1243-1245.
- Hirano, M., 2016. Echinoderm immunity: is the larval immune system immature? *Immunol. Cell Biol.* 94, 809–811. doi:10.1038/icb.2016.67
- Hiscott, J., 2007. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 282, 15325–15329. doi:10.1074/jbc.R700002200
- Ho Ch, Buckley E., K.M., Schrankel, C.S., Schuh, N.W., Hibino, T., Solek, C.M., Bae, K., Wang, G., Rast, J.P., 2016. Perturbation of gut bacteria induces a coordinated cellular immune response in the

- purple sea urchin larva. *Immunol. Cell Biol.* 94, 861–874. doi:10.1038/icb.2016.51
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33–38. doi:10.1038/nature02021
- Hogben L., Van der Lingen J., 1928 -*J. exp. Biol.* 5: 292-294.
- Holland N. D., Phillips J. H., Giese A. C., 1965. *Biol. Bull.*, 128: 259-270
- Hornig, T., Barton, G.M., Medzhitov, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2:835–41.
- Huang, S.H., Frydas, S., Kempuraj, D., Barbacane, R.C., Grilli, A., Boucher, W., Letourneau, R., Madhappan, B., Papadopoulou, N., Verna, N., De Lutiis, M.A., Iezzi, T., Riccioni, G., Theoharides, T.C., Conti, P., 2004. Interleukin-17 and the interleukin-17 family member network. *Allergy Asthma Proc.* 25, 17–21.
- Iorizzi M., Bryan P., McClintock J., Minale L., Palagiano E., Maurelli S., et al., 1995. Chemical and biological investigation of the polar constituents of the starfish *Luidia clathrata*, collected in the Gulf of Mexico. *J. Nat. Prod.* 58: 653-671.
- Ito, T., Matsutani, T., Mori, K., Nomura, T., 1992. Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 287–294. doi:10.1016/0145-305X(92)90003-U
- Iyer, S. S., & Cheng, G. 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23–63.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Jarilin A.A. 1999. *Osnovy immunologii (Bases of Immunology)*. Moscow
- Jean-Luc Imler, Liangbiao Zheng, 2004. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *Journal of Leukocyte Biology* vol.75 no. 1 18-26.
- Jin, M.S., Lee, J.-O., 2008. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity* 29, 182–191. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.007
- Johnson, P.T., 1969. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*). *Histochemie* 17, 213–231. doi:10.1007/BF00309866
- Kaplan G., Bertheussen K., 1977. The morphology of echinoid phagocytes and mouse peritoneal macrophages during phagocytosis in vitro. *Scand. J. Immunol.* 6:1289-1296.
- Kawaguchi, M., Adachi, M., Oda, N., Kokubu, F., Huang, S.K., 2004. IL-17 cytokine family. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1265–1273.
- Kelley L.A. and Sternberg M.J.E., 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server *Nature Protocols* 4, 363 - 371
- Kindred J. E., 1924 - *Biol. Bull.*, Woods Hole 46: 228-251.
- Kindred J. E., 1926 - *Biol. Bull.*, Woods Hole 50: 147-154.
- Kobayashi, S., 1932 - *Sci. Rep. Tōhoku. Imp. Univ. Biol.* 7: 211-227.
- Kobe B., Deisenhofer J., 1995. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature.*; 374:183–186. [PubMed: 7877692]
- Kolls, J.K., Linden, A., 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467–476.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. 2009. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J.* 420(1):1-16.
- Kuwahara, R., Hatate, H., Yuki, T., Murata, H., Tanaka, R., Hama, Y., 2009. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 1296–1300. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.020
- Lemaitre and Hoffmann. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743).
- Leonard J.N., Ghirlando R., Askins J., Bell J.K., Margulies D.H., Davies D.R., Segal D.M., 2008. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 105:258–263. [PubMed: 18172197]
- Leonard L., Strandeberg J. D., Winkelstein J. A., 1990. Complement-like activity in the sea star *Asterias forbesi*. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 19-30.
- Levina E.V., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.V., 2009. Steroid compounds from two Pacific starfish of the genus *Evasterias*. *Russian J. Bioorg. Chem.* 35: 123-130.
- Liberati N.T., Fitzgerald K.A., Kim D.H., Feinbaum R., Golenbock D.T., Ausubel F.M., 2004. Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis*

- C. elegans* immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6593–6598.
- Liebman E., 1950 - *Biol. Bull., Woods Hole* 98: 46-59.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P.M., Hiscott, J., 1999. Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 959–966. doi:10.1128/MCB.19.2.959
- Litman, G.W., Cannon, J.P., Dishaw, L.J., 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 866–879. doi:10.1038/nri1712
- Liu L., Botos I., Wang Y., Leonard J.N., Shiloach J., Segal D.M., Davies D.R., 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*; 320:379–381. [PubMed:18420935]
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT. *Methods* 25, 402–408.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell.* 104 (4): 487–501. doi:10.1016/S0092-
- Lundberg, A.M., Ketelhuth, D.F., Johansson, M.E., Gerdes, N., Liu, S., Yamamoto, M., Akira, S., Hansson, G.K. 2013. Toll-like receptor 3 and 4 signalling through the TRIF and TRAM adaptors in haematopoietic cells promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2013 Jul 15;99(2):364-73. doi: 10.1093/cvr/cvt033
- Luporini (1987). In: Greenberg AH (ed): *Invertebrate Models: Cell Receptors and Cell Communication.* Basel, Karger, 1987 (DOI:10.1159/000413054)
- MacMunn, C.A., 1886. Note on a method of obtaining uric acid crystals from the malpighian tubes of insects, and from the nephridium of pulmonate mollusca. *J. Physiol.* 7, ????. doi:10.1113/jphysiol.1886.sp000212
- Majeske, A.J., Bayne, C.J., Smith, L.C., 2013. Aggregation of Sea Urchin Phagocytes Is Augmented In Vitro by Lipopolysaccharide. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0061419
- Marisa, I., Matozzo, V., Munari, M., Binelli, A., Parolini, M., Martucci, A., Franceschinis, E., Brianese, N., Marin, M.G., 2016. In vivo exposure of the marine clam *Ruditapes philippinarum* to zinc oxide nanoparticles: responses in gills, digestive gland and haemolymph. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 15275–15293. doi:10.1007/s11356-016-6690-5
- Matranga, V., Pinsino, a, Celi, M., Natoli, a, Bonaventura, R., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., 2005. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 39, 85–110. doi:10.1007/3-540-27683-1
- Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., Muller, W.E.G., 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress Chaperones* 5, 113–120.
- Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y, 2007. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC. Genomics*; 8:124. [PubMed: 17517123]
- McGettrick A.F., O'Neill L.A., 2004. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol. Immunol.* 41,577–582.
- Menge, B.A., Berlow, E.L., Blanchette, C.A., Navarrete, S.A., Yamada, S.B., 1994. The keystone species concept: Variation in interaction strength in a Rocky Intertidal Habitat. *Ecol. Monogr.* 64, 249–286. doi:10.2307/2937163
- Metchnikoff E., 1893. *Lectures on the comparative pathology of inflammation: delivered at the Pasteur Institute in 1891.* (Starling FA, Starling EH, MD., Trans.)Kegan Paul, Trench, Trubner & Co., Ltd., London.
- Millet, A.C., Ewbank, J.J., 2004. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 4–9. doi:10.1016/j.coi.2003.11.005
- Mookherjee N., Hancock R.E., 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 922-933.
- O'Neill L.A., Bowie A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptors signalling. *Nat. Rev. Immunol*; 7:353–364. [PubMed: 17457343]
- O'Neill L.A., Fitzgerald K.A., Bowie A.G., 2003. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* 24, 286–290.
- Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., Cheng, G., 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208–211. doi:10.1038/nature04374

- Pagliari, P., Canicatti, C., 1993. Isolation of cytolytic granules from sea urchin amoebocytes. *Eur J Cell Biol* 60, 179–184.
- Palsson-McDermott E.M., O'Neill L.A., 2007. Building an immune system from nine domains. *Biochem. Soc. Trans*; 35:1437–1444. [PubMed: 18031241]
- Pan Z.K., Fisher, J-D Li, Y. Jiang, S. Huang and Ling-Yu Chen, 2011. Bacterial LPS up-regulated TLR3 expression is critical for antiviral response in human monocytes: evidence for negative regulation by CYLD. *International Immunology* 23, 357–364.
- Panayi, G.S., Corrigan, V.M., Henderson, B., 2004. Stress cytokines: Pivotal proteins in immune regulatory networks. *Opinion. Curr. Opin. Immunol.* doi:10.1016/j.coi.2004.05.017
- Pancer, Z., Amemiya, C.T., Ehrhardt, G.R. a, Ceitlin, J., Gartland, G.L., Cooper, M.D., 2004. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* 430, 174–180. doi:10.1038/nature02740
- Pancer, Z., Mayer, W.E., Klein, J., Cooper, M.D. Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 7;101(36):13273-8.
- Parrinello N., Canicatti C., Rindone D., 1976. Naturally-occurring hemagglutinins in the coelomic fluid of the echinoderm *Holothuria polii* Delle Chiaje and *Holothuria tubulosa* Gmelin. *Boll. Zool.*, 43: 259-271.
- Parrinello, N., Rindone, D., Canicatti, C., 1979. Naturally occurring hemolysins in the coelomic fluid of *Holothuria polii* delle chiaie (Echinodermata). *Dev. Comp. Immunol.* 3, 45–54.
- Pawson, D.L., 2007. Phylum Echinodermata. *Zootaxa*.
- Peter, I.S., Davidson, E.H., 2016. Chapter Thirteen - Implications of Developmental Gene Regulatory Networks Inside and Outside Developmental Biology, in: *Biology, P.M.W.B.T.-C.T. in D. (Ed.), Essays on Developmental Biology, Part B.* Academic Press, pp. 237–251. doi:http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.12.014
- Peters J.W., Stowell M.H., Rees D.C., December 1996. "A leucine-rich repeat variant with a novel repetitive protein structural motif". *Nat. Struct. Biol.* 3 (12): 991–4.
- Pham L.N., Dionne M.S., Shirasu-Hiza, D.S. Schneider. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes *PLoS Pathog*, 3p. e26
- Pinsino, A., Matranga, V., 2015. Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Dev. Comp. Immunol.* 49, 198–205. doi:10.1016/j.dci.2014.11.013
- Rinkevich B. 1999. Invertebrates versus vertebrates innate immunity: in the light of evolution. *Scand. J. Immunol.*, 50: 456-460
- Roach J.C., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell M.K., Smith K.D., Hood L.E., Aderem A., 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9577–9582.
- Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F., 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 588–593.
- A.F. Rowley, A. Powell. 2007. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *J. Immunol.* 179 (2007), pp. 7209–7214
- Russo, R., Chiamonte, M., Matranga, V., Arizza, V., 2015. A member of the Tlr family is involved in dsRNA innate immune response in *Paracentrotus lividus* sea urchin. *Dev. Comp. Immunol.* 51, 271–277.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
- Samuel, C.E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4): 778-809.
- Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol.* 2004;24:1–37. [PubMed]
- Sasai M. et al., 2005. NF- κ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J. Immunol.* 174, 27–30
- Schillaci, D., Arizza, V., Parrinello, N., Di Stefano, V., Fanara, S., Muccilli, V., Cunsolo, V., Haagenen, J.J.A., Molin, S., 2010. Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Appl. Microbiol.* 108, 17–24. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04394.x
- Schoenhaut D S , Chua A O , Wolitzky A G , Quinn P M , Dwyer C M , McComas W , Familletti P C , Gately M K , Gubler U. 1992. Cloning and expression of murine IL-12. *The Journal of*

- Immunology, 148 (11) 3433-3440;
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukocyte Biol.* 75: 163-189).
- Scott, M.G., Davidson, D.J., Gold, M.R., Bowdish, D., Hancock, R.E.W., 2002. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* 169, 3883–3891. doi:10.4049/jimmunol.169.7.3883
- Service, M., Wardlaw, A.C., 1985. Bactericidal Activity of Coelomic Fluid of the Sea Urchin, *Echinus Esculentus*, on Different Marine Bacteria. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 65, 133–139. doi:10.1017/S0025315400060859
- Service, M. & Wardlaw, A.C. 1984. Echinochrome-a as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 161-165, 1984.
- Shu, C., Sankaran, B., Chaton, C.T., Herr, A.B., Mishra, A., Peng, J., Li, P. 2013. Structural insights into the functions of TBK1 in innate antimicrobial immunity. *Structure*. 21(7):1137-48. doi: 10.1016/j.str.2013.04.025.
- Smith, L., Rast, J., Brockton, V., Terwilliger, D., Nair, S., Buckley, K., Majeske, A., 2006. The sea urchin immune system. *ISJ* 3, 25–39.
- Smith, L.C., Ghosh, J., Buckley, K.M., Clow, L.A., Dheilly, N.M., Haug, T., Henson, J.H., Li, C., Lun, C.M., Majeske, A.J., Matranga, V., Nair, S. V, Rast, J.P., Raftos, D.A., Roth, M., Sacchi, S., Schrankel, C.S., Stensvåg, K., 2010. Echinoderm Immunity, in: Söderhäll, K. (Ed.), *Invertebrate Immunity*. Springer US, Boston, MA, pp. 260–301. doi:10.1007/978-1-4419-8059-5_14
- Smith, M.J., Arndt, A., Gorski, S., Fajber, E., 1993. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J. Mol. Evol.* 36, 545–554. doi:10.1007/BF00556359
- Smith V. J., 1981. The echinoderm. In: N. A. Ratcliffe e A. F. Rowley (eds). *Invertebrate blood cells*. Academic Press London Vol 2 pp 513-562.
- Smith V. J., Soderhall K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 251-262.
- Sodergren E. et al., 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941–952.
- Song, X., Jin, P., Qin, S., Chen, L., Ma, F. 2012. The Evolution and Origin of Animal Toll-Like Receptor Signaling Pathway Revealed by Network-Level Molecular Evolutionary Analyses. *PLOS ONE* 7(12): e51657. doi: 10.1371/journal.pone.0051657.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M., 2001. Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquac. Nutr.* 7, 91–99. doi:10.1046/j.1365-2095.2001.00155.x
- Théel H., 1921 - *Arch. für Zool.* 25: 1-40.
- Thoenes, W., Sonntag, W., Heine, W.D., Langer, K.H., 1982. Cell fusion as a mechanism for the formation of giant cells (Langhans' type). *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 41, 45–50. doi:10.1007/BF02890270
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680.
- Tschopp J., Masson D., Schafer S., 1986. Inhibition of the lytic activity of perforin by lipoproteins. *J. Immunol.* 137: 1950-1953.
- Van der Heyde H. C., 1992 - *Biol. Bull., Woods Hole* 42: 95-98.
- Vethamany V. G., Fung, M., 1972 - *Can. J. Zool.* 50: 77-81.
- Wang Y., Liu L., Davies D.R., Segal D.M., 2010. Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *J. Biol. Chem.*; 285:36836–36841. [PubMed: 20861016]
- Wu, X., Qi, X., Qu, B., Zhang, Z., Liang, M., Li, C., Cardona, C.J., Li, D., Xing, Z., 2014. Evasion of antiviral immunity through sequestering of TBK1/IKK ϵ /IRF3 into viral inclusion bodies. *J. Virol.* 88, 3067–76. doi:10.1128/JVI.03510-13
- Yamamoto M. et al., 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 169(12):6668-72.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003 Aug 1;301(5633):640-3. Epub 2003 Jul 10.
- Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W., 2001. Barrel-stave model or toroidal model?

- A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81: 1475-1485.
- Zhang J-M, An J. 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics.* 45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. doi:10.1038/415389