

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo: Biologia Evoluzionistica
(XX ciclo)

LE CASPASI NEI MOLLUSCHI

Relatore

Ch. ma Prof. Silvana Filosa

Candidato

Dott. Vincenzo Frezza

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1	La morte cellulare programmata: apoptosi	4
1.2	La scoperta dell'apoptosi	7
1.3	Le fasi dell'apoptosi	9
1.3.a:	La fase di innesco	9
1.3.b:	La fase esecutrice	14
1.3.c:	La fase di riconoscimento e fagocitosi	16
1.4	Le caspasi	18
1.5	La caspasi 3.....	21
1.6	I Molluschi.....	23
1.7	I Gasteropodi.....	24
1.8	I Bivalvi.....	26
1.9	I Cefalopodi.....	27

CAPITOLO 2

SCOPI E PROGRAMMA DELLA RICERCA

2.1	Obiettivo della ricerca e scelta del materiale biologico...	30
2.2	Programma	31

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1	Prelievo degli organi	37
3.2	Indagini citologiche	37
3.3	Estrazione di proteine, SDS-PAGE, western blot.....	39
3.4.	Indagini molecolari.....	42

CAPITOLO 4

RISULTATI

4,1	Caratterizzazione morfologica delle gonadi dei bivalvi.....	49
4.2	Caratterizzazione morfologica delle gonadi dei gasteropodi.....	51
4.3	Caratterizzazione morfologica delle gonadi del cefalopode <i>Octopus vulgaris</i>	52
4.4	Presenza e localizzazione della caspasi 3 nelle diverse specie.....	53

4.5 Clonaggio e sequenziamento della caspasi 357

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

5.1 Discussione.....62
5.2 Conclusioni.....69

BIBLIOGRAFIA.....71

CAPITOLO I
INTRODUZIONE

1.1: La morte cellulare programmata (MCP)

Le cellule hanno la capacità intrinseca di riuscire a gestire il delicato equilibrio tra la sopravvivenza e la morte: da una parte l'ingresso in divisione cellulare, dall'altra, la morte cellulare programmata. In entrambi i casi si tratta di un processo geneticamente determinato e morfologicamente ben definito, in cui entrano in gioco numerosi componenti nucleari e citoplasmatici e si intrecciano diversi pathways inter e intracellulari, alcuni noti altri ancora in fase di delucidazione. Alterazioni nel programma di morte programmata, o nei suoi meccanismi regolatori, spostano tale equilibrio verso un'instabilità di solito dannosa per l'organismo, che si può manifestare sotto forma di malattie degenerative e tumorali che talvolta risultano molto gravi, per questo la morte cellulare programmata deve essere considerata una delle tante manifestazioni del funzionamento cellulare. Ad esempio un aumento della morte cellulare programmata è caratteristica dell'AIDS e di numerose malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson, l'ischemia seguita da infarto del miocardio e l'Alzheimer, (Hajimohamadreza e Treherne, 1997; Thompson, 1995; Graeber e Moran, 2002). Analogamente, una riduzione dei processi di morte cellulare nei tessuti contribuisce all'insorgenza di altre malattie importanti come i disordini linfoproliferativi e le neoplasie (Green e Martin, 1995; Steller, 1995; Goldberg et al., 1996).

La morte cellulare programmata si manifesta con una certa varietà di forme, tra queste l'apoptosi e la necrosi sono le più note. In particolare l'apoptosi, termine tradotto da Kerr (1972), che in greco indica la caduta stagionale delle foglie, è un meccanismo cellulare geneticamente controllato e altamente conservato nel corso dell'evoluzione. Esso è presente in tutti gli eucarioti multicellulari (Ellis et al., 1991; Raff, 1992) e si verifica fin dalle prime fasi di vita permettendo il corretto sviluppo nello

stato embrionale e l'omeostasi dei tessuti nell'adulto bilanciando il rapporto vita/morte di cellule danneggiate nell'adulto (Vaux et al., 1994; Granville et al., 1998; Orrenius, 2003). Essa ha un ruolo chiave in particolare nella morfogenesi (Vaux et al., 1994), nel differenziamento sessuale e nella formazione dei dotti di Müller e di Wolff (Jacobson et al., 1997).e nei processi epigenetici di auto-organizzazione che permettono l'emergenza di due dei tipi più complessi organi regolatori del nostro corpo: il sistema immunitario e il sistema nervoso (Ameisen, 2002). L'apoptosi è anche coinvolta in altri eventi fisiologici come l'uccisione del bersaglio nelle reazioni di citotossicità (Taylor et al., 1992), e l'atrofia tissutale endocrino-dipendente (Kyprianou et al, 1988). L'apoptosi, a differenza della necrosi (fig. A), non è un processo silente. E' la cellula stessa che, trascrivendo geni specifici, sintetizzando nuovi enzimi e consumando energia, inizia e porta avanti il processo di morte e, alla fine, morendo, emette segnali che possono modificare il comportamento delle cellule vicine, comprese quelle che ne devono fagocitare i resti (Arnoult al., 2002). In pratica, la cellula apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine perdendo altresì le specializzazioni di membrana ed esponendo componenti normalmente poco espressi o nascosti della membrana plasmatica. Questi sono riconosciuti dalle cellule vicine che operano la fagocitosi della cellula morente. L'organizzazione interna è mantenuta, almeno nelle fasi precoci del processo, mentre a livello nucleare si osserva la disgregazione del nucleolo, il taglio della lamina, la condensazione e il taglio della cromatina. I granuli compatti di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo, formando spesso una caratteristica figura a mezzaluna. I frammenti di materiale nucleare raggiungono la membrana plasmatica, dove sono circondati da evaginazioni della membrana stessa andando a formare i cosiddetti "blebs". Questi si staccano dal corpo cellulare trascinando con sé una parte del citoplasma e del materiale nucleare, dando origine ai

cosiddetti corpi apoptotici che sono fagocitati dalle cellule vicine (Majno et al., 1995; Golstein et al., 1991). La morte per necrosi, invece, avviene in seguito a gravi ed irreversibili danni patologici come ipossia, ipertermia, infezione virale, etc (Israels, 1999). Questi eventi portano ad una perdita dell'integrità delle membrane degli organelli, incluso il nucleo, con conseguente rottura delle cellule e rilascio del loro contenuto. Tale fenomeno, che la cellula subisce passivamente, innesca una risposta infiammatoria con rilascio di citochine da parte dei macrofagi.

Caratteristiche	Necrosi	Apoptosi
Stimoli	Tossine, grave ipossia, danno esteso, deplezione di ATP	Sia fisiologici sia patologici esclusa la deplezione di ATP
Richiesta energetica	Nessuna	ATP-dipendente
Istologia	Rigonfiamento cellulare, distruzione degli organelli, morte tissutale	Condensazione della cromatina, corpi apoptotici, morte di cellule isolate
Tipo di frammentazione del DNA	Frammenti di dimensioni randomizzate	Scala di frammenti in multipli di 185 paia di basi
Membrana plasmatica	Lisata	Intatta, vescicolata e con alterazioni molecolari
Fagocitosi delle cellule morte	Da parte di fagociti circolanti	Da parte di cellule adiacenti
Reazione tissutale	Infiammazione	Assenza di infiammazione

Figura A: differenze morfo-fisiologiche tra apoptosi e necrosi (modificata da SW Hetts, 1998).

1.2. La scoperta dell'apoptosi

La prima evidenza dell'esistenza di un'informazione genetica specifica per il controllo della morte cellulare è stata fornita da esperimenti sul nematode *Caenorabditis. elegans* (Ellis et al., 1986), un metazoo la cui divergenza filogenetica precede quella umana di centinaia di milioni di anni. Gli scienziati, studiando il suo sviluppo, si resero conto che il passaggio dalla forma embrionale a quella adulta implicava la perdita di 131 cellule: tale processo doveva prevedere un meccanismo di controllo altamente regolato. In seguito, grazie all'uso di mutanti genetici, è stato rivelato che la sopravvivenza o la morte delle cellule, durante il suo sviluppo, dipende dai prodotti di pochi geni. I principali sono: ced-3, ced-4, ced-9 (ced, dall'inglese cell death) ed egl-1 (Meier et al., 2000). Ced-3, in particolare, è una proteasi capace di tagliare le proteine tra i residui di cisteina e aspartato. La sua attività è indispensabile per l'apoptosi in quanto va ad inattivare alcune proteine necessarie per la sopravvivenza cellulare, come, ad esempio, gli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA, e ne va ad attivare altre necessarie per la morte, come le endonucleasi che degradano il DNA.

Ced-4 agisce a monte di ced-3 e quando riceve un segnale di innesco, agisce sulla forma immatura di quest'ultima, presente nel citoplasma, trasformandola nella forma attiva. Ced-9, invece, agisce su ced-4 legandola e tenendola intrappolata nel citoplasma (Chinnaiyan et al., 1997) (Wu et al., 1997). In tal modo essa non può agire su ced-3 e l'apoptosi risulta bloccata. Le proteine codificate da ced-3 e ced-4 sono necessarie alla fase esecutiva del processo apoptotico (Hengartner et al., 1992).

Da allora, l'apoptosi in *C. elegans* è divenuta modello di base per lo studio dello stesso fenomeno in altri sistemi cellulari. Nell'uomo e nel topo sono stati identificati circa venti prodotti di geni che sono omologhi del

repressore Ced-9 di morte cellulare e del suo antagonista Egl-1 (la famiglia Bcl-2), come anche quattordici omologhi dell'esecutore Ced-3 (la famiglia delle caspasi) ed almeno un omologo di Ced-4 (Apaf-1, ovvero fattore apoptotico attivante le proteasi-1). Grazie a questa ridondanza di fattori, nelle cellule dei vertebrati più evoluti, nei mammiferi, per esempio, l'apoptosi può procedere lungo molteplici vie intracellulari molecolari.

1.3. Le fasi dell'apoptosi

L'apoptosi, sebbene diversa da organismo ad organismo e anche da cellula a cellula nel medesimo organismo, può essere suddivisa in quattro fasi principali:

- induzione,
- esecuzione,
- riconoscimento
- fagocitosi

Questi passaggi, e i geni che li governano, sono ampiamente conservati lungo la scala evolutiva, dal *Caenorabditis elegans* fino all'uomo.

1.3.a: La fase di innesco.

Nei vertebrati l'apoptosi è attivata dalla presenza o all'assenza di precisi stimoli fisici e/o chimici e/o a molecole segnale. Queste molecole, che possono essere di natura endogena o esogena, innescano percorsi biochimici diversi che attivano la fase centrale d'esecuzione del programma di morte.

L'innesco dell'apoptosi può essere avviato dal legame di specifiche molecole-segnale con i propri recettori posti sulla membrana plasmatica (Fesus, 1993; Nagata, 1997; Huppertz et al., 1999). Fas è una proteina trans-membrana (**Figura B-2**) detta anche APO-1 o CD95, appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF-NGF. che presenta uno specifico dominio citoplasmatico di circa 80 aminoacidi, detto dominio di morte (Death Domain, DD), la cui attivazione innesca la cascata di morte (Nagata, 1997; Yuan, 1997). Il ligando FasL (o CD95-L) interagisce col recettore determinandone la trimerizzazione e la sua conseguente attivazione, con inizio della trasduzione del segnale (Nagata, 1997).

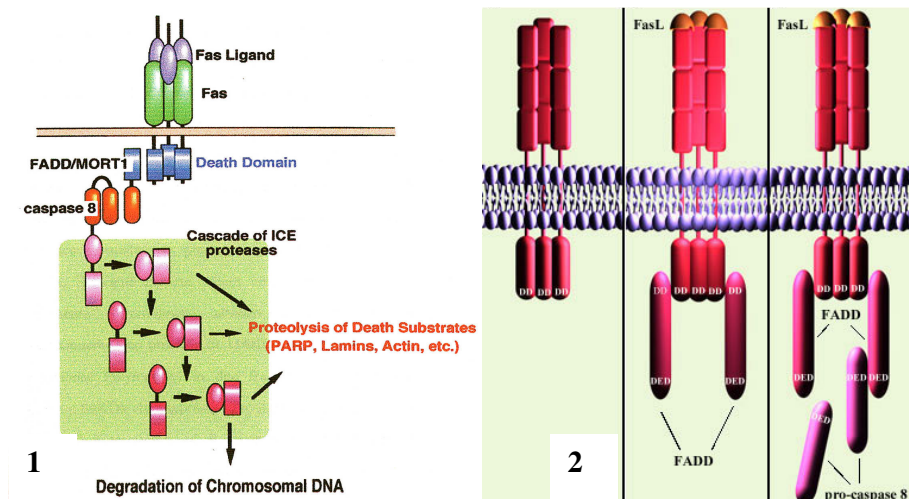


Figura B-1. Interazione Fas-FasL e successiva via di segnalazione intracellulare. **Figura B-2.** Dettaglio del recettore intracellulare Fas e della sua interazione con FADD.

L'attivazione di Fas permette ad una molecola citoplasmatica di 23,3 kDa, il FADD (Fas-Associated Death Domain protein, o MORT-1), di fungere da intermediario nella trasduzione del segnale a valle: FADD presenta, infatti, sia il dominio DD, tramite il quale lega l'omologo dominio sul recettore Fas (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995), sia un dominio effettore di morte (Death Effector Domain, DED), attraverso cui può reclutare la caspasi 8, che è la prima vera molecola coinvolta nella cascata di morte (Alnemri et al., 1996; Nagata, 1997). Questa molecola è provvista di due domini DED a livello della sua regione N-terminale, attraverso i quali lega il FADD (Nagata, 1997); a ciò segue l'autoproteolisi della caspasi 8 con produzione di un frammento di circa 26 kDa che induce l'attivazione delle caspasi effettrici poste a valle del processo di morte (Nagata, 1997; Huppertz et al., 1999).

Un altro esempio di innesco della morte cellulare programmata è l'interazione che avviene tra il ligando TNF α e il suo recettore TNF-R1 (Fesus, 1993; Nagata, 1997; Huppertz et al., 1999). Anche questo recettore è provvisto di un dominio DD che gli permette di interagire con TRADD, un'altra proteina citoplasmatica coinvolta nella trasduzione del segnale di morte (Hsu et al., 1995). A differenza di FADD, TRADD manca del

dominio DED, per cui non può attivare direttamente la caspasi 8, ma può farlo solo indirettamente, mediante l'interazione del DD con quello del FADD (Hsu et al., 1996b).

Il TNF-R1 può innescare la morte cellulare anche attraverso una via alternativa: TRADD, infatti, può legare RIP (Receptor Interacting Protein), una serin/treonin chinasi che contiene un DD (Hsu et al., 1996a; Nagata, 1997). A differenza di Fas, il legame di TNF-R1 a TRADD è seguito, in particolari condizioni, dal legame ad altre proteine adattatrici, e porta all'attivazione di un importante fattore di trascrizione, l'NF-kB (Nagata, 1997) il quale stimola la proliferazione cellulare.

Oltre alla via di segnalazione recettoriale, appena descritta, anche altri stimoli possono innescare vie specifiche di trasduzione del segnale di morte. Ne è un importante esempio la via di segnalazione mitocondriale, che porta alla formazione di un complesso analogo a quello che si costituisce a livello del dominio intracellulare dei recettori di membrana attivati. Anche il complesso di origine mitocondriale comprende un adattatore, APAF-1 (analogo a ced-4) e una pro-caspasi iniziatrice, la pro-caspasi 9. Tali molecole interagiscono grazie ad un dominio CARD, che entrambe possiedono. Il complesso d'origine mitocondriale (denominato *apoptosoma*) comprende anche una molecola di citocromo C e una di ATP o di dATP. Come si vedrà in seguito, APAF-1 e il citocromo C fuoriescono dal mitocondrio quando i fattori che ne modulano l'integrità di membrana favoriscono il formarsi di pori a livello della membrana esterna. I complessi che si formano a livello dei domini recettoriali e gli apoptosomi operano tagli nelle pro-caspasi iniziatrici, che in tal modo si attivano.

Prima però che le caspasi effettrici entrino in azione, rendendo irreversibile il cammino verso la morte cellulare, deve essere completata la fase di induzione, durante la quale vengono soppesati tutti i segnali che giungono alla cellula. Infatti, una cellula che riceve segnali di morte nel

frattempo può ricevere anche segnali di sopravvivenza, veicolati da fattori di crescita, da citochine o da integrine e molecole di adesione. A questo punto entrano in gioco un altro gruppo di molecole proprie dell'apoptosi: i cosiddetti modulatori, i quali possono essere pro o anti-apoptotici, pur appartenendo tutti alla stessa famiglia di molecole.

In *C. elegans* il prototipo di gene modulatore, anti-apoptotico, è *ced-9* che, come abbiamo visto, corrisponde nei mammiferi a Bcl-2. Questa molecola è il più noto rappresentante di una famiglia numerosa di fattori, tutti caratterizzati dal possedere alcuni domini (BH1, BH2, BH3, BH4) che ne consentono l'interazione reciproca. Le proteine della famiglia Bcl-2 si trovano localizzate sulla membrana nucleare, su quella mitocondriale esterna e su quelle del reticolo endoplasmatico. Bcl-2 può interagire con diverse proteine suggerendo un suo possibile ruolo modulatorio su una via di trasduzione del segnale che controlla la morte cellulare. Principalmente, Bcl-2 si lega ad altri membri della sua famiglia per formare omodimeri o eterodimeri, il cui significato funzionale varia da proapoptotico (Bax-Bax; Bcl-xs/Bcl-xs) ad antiapoptotico (Bcl-2/Bcl-2; Bcl-xl/Bcl-xl) (Cory et al., 1995)

Semplificando, i dimeri costituiti da fattori pro o anti-apoptotici esercitano un effetto rafforzato, mentre i dimeri misti, formati da fattori pro e anti-apoptotici, perdono di effetto. La preponderanza di modulatori anti-apoptotici manterrà integra la cellula, mentre la preponderanza di modulatori pro-apoptotici avvierà la cellula verso la morte. Tuttavia, non è ancora del tutto chiaro quale sia il ruolo esatto dei modulatori e le modalità con cui molecole anti-apoptotiche come Bcl-2 o Bcl-X_L proteggono l'integrità della membrana mitocondriale e molecole pro-apoptotiche come Bax, Bak o Bid inducono l'apertura di megacanalini. Da quando è stata definita la localizzazione di Bcl-2 nei mitocondri (Monaghan et al., 1992) e la necessità di citocromo C (Liu et al., 1996) per l'innescamento delle caspasi, è

stato ipotizzato per questi organelli un ruolo cardine nella fase di esecuzione (Susin et al., 1997). In effetti nei mitocondri Bcl-2 pare essere legato a complessi sopramolecolari, formati da un dimero di porine mitocondriali VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) e da due molecole del trasportatore di nucleotidi adeninici (AdNT) (Zoratti et al., 1995). Questi complessi localizzati nei punti di contatto tra la membrana mitocondriale interna e quella esterna (Hockenbery et al., 1990), danno origine ai cosiddetti pori mitocondriali, la cui apertura è regolata da Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , ADP, voltaggio, ma anche dalle proteine della famiglia delle Bcl-2 (Zamzami et al., 1996). L'apertura di questi pori provoca fenomeni di transizione di permeabilità (PT) della membrana mitocondriale, con conseguente abbassamento della differenza di potenziale elettrico ($\Delta\Psi$) e, quindi, fuoriuscita di fattori pro-apoptotici quali i già nominati adattatore APAF-1 (una ATPasi) e il citocromo C, che contribuiranno alla formazione dell'apoptosoma, e due endonucleasi, ENDO G e AIF. Fuoriescono dal mitocondrio anche alcune molecole, come Smac/Diablo, che inattivano gli inibitori delle caspasi, e inoltre ioni calcio, radicali liberi e glutatione. Per motivi diversi, la fuoriuscita di ciascuna di queste molecole è in grado di amplificare il segnale.

Il mitocondrio è coinvolto in fenomeni di apoptosi anche nel caso in cui il segnale parte dai recettori di membrana o dal reticolo endoplasmatico. Nel primo caso, la caspasi 8 iniziatrice attiva un modulatore pro-apoptotico, *bid*, che si localizza sul mitocondrio. Nel secondo caso, il calcio normalmente trattenuto nelle cisterne del reticolo viene rilasciato nel citosol e, raggiungendo i mitocondri, provoca una variazione della permeabilità dei canali ionici di membrana e, quindi, il rilascio del citocromo C e l'attivazione della caspasi 9. E' interessante notare che il rilascio del calcio da parte del reticolo a sua volta è sotto il controllo anche di Bcl-2 (McConkey et al., 1997; Foyouzi-Youssefi et al., 2000; Pinton et al., 2000).

Il destino della cellula è anche sotto il controllo dell'ATP: infatti esisterebbe un rapporto di concentrazione (1:5) tra forma difosfata e trifosfata al di sotto della quale la cellula andrebbe incontro a morte (Richter et al., 1996). La via di morte seguita dalla cellula dipende, però, anche dai livelli assoluti di ATP. L'apoptosi, essendo un processo attivo richiederebbe sempre alti livelli di energia mentre la necrosi sarebbe legata alla presenza di basse concentrazioni di ATP (Tatsumi et al., 2003). La morte cellulare programmata può essere indotta anche dall'elevata tossicità dell'ossigeno molecolare (Fiers et al., 1999; Ueda et al., 2002). La cellula normalmente produce specie ossigeno reattive (ROS) principalmente come sottoprodotti della reazione della catena di trasporto degli elettroni nella membrana interna dei mitocondri, ma anche durante la deaminazione ossidativa delle amine biogene che si verifica nella membrana esterna dei mitocondri. Questi due processi ossidativi sono la causa principale della produzione di anioni superossido (O_2^-) che vengono trasformati rapidamente in perossido di idrogeno (H_2O_2) e, quindi in radicali ossidrilici (OH^-). La concentrazione di queste specie reattive, nella cellula, viene fisiologicamente mantenuta stazionaria da una serie di enzimi quali catalasi o superossido dismutasi (SOD).

1.3.b: La fase esecutrice

La fase esecutrice sembra essere comune a tutte le vie d'innescò ed è costituita da una serie di reazioni enzimatiche a cascata che permettono l'amplificazione del processo e che culminano con il taglio di specifici substrati. I principali enzimi coinvolti nella fase di esecuzione sono principalmente le caspasi e le DNAsi. La loro azione combinata causa la progressiva degradazione di tutti i substrati cellulari. Per quanto riguarda le nucleasi, la più importante è la CAD (Caspase Activated DNase), un eterodimero costituito da due subunità, una piccola di 40 kDa, detta CAD e

una grande detta ICAD di 45 kDa che inibisce CAD (Samejima et al., 1998). L'attività di questo enzima è chiaramente caspasi-dipendente. È stato dimostrato che la CAD, oltre all'attività endonucleasica, ha un ruolo anche nella condensazione della cromatina che favorisce legandosi alla topoisomerasi II α incrementandone l'attività (Durrieu et al., 2000). Con l'apoptosi la caspasi 3 opererebbe il taglio di ICAD a livello dei residui di Asp 117 e Asp 224 (Tang e Kidd, 1998; Sakahira et al., 1998) e il rilascio della nucleasi che, una volta attiva, trasloca nel nucleo grazie ad un segnale di localizzazione nucleare andando ad operare la frammentazione del DNA genomico (Liu et al., 1997; Nagata, 2000).

Il DNA viene quindi tagliato in frammenti di 180-200 bp (Peitsch et al., 1994), che costituiscono la tipica "ladder" internucleosomica. La frammentazione del DNA è un evento solitamente tardivo della morte cellulare programmata che è stato ampiamente utilizzato per discriminare le cellule in apoptosi da quelle in necrosi. Durante la necrosi, infatti, la degradazione del DNA avviene in modo casuale (Robbins et al., 1997), così che nei gels di agarosio è evidenziabile uno smear continuo dovuto ai frammenti di DNA di lunghezza variabile.

Il taglio proteolitico effettuato dalle caspasi attiva alcune molecole e ne inattiva altre: il fine è quello di portare alla soppressione della cellula mantenendone integra la membrana plasmatica. A livello nucleare le caspasi esecutrici tagliano un gran numero di substrati tra i quali le lamine A e B (Rao et al., 1996), che sono proteine strutturali nucleari, tra le prime ad essere identificate come substrato delle caspasi. Le caspasi sono anche responsabili dell'inattivazione di una proteina PARP, poli-ADP-ribosio-polimerasi (Nicholson et al., 1995), coinvolta nella sintesi e nel riparo del DNA. L'inattivazione della PARP è operata dalla caspasi 3 che taglia l'enzima formando un frammento di 89 kDa inattivo, considerato un buon marcatore biochimico dell'apoptosi. Anche durante la necrosi la PARP

subisce un taglio proteolitico da parte di una proteasi, che non essendo però una caspasi, ne determina la formazione di frammenti di lunghezza diversa (Shah et al., 1996).

A livello citoplasmatico le caspasi agiscono su molte proteine citoscheletriche come l'actina (Mashima et al., 1997), la gelsolina (Kamada et al., 1998), alfa-fodrina (Janicke et al., 1998), la cheratina (Caulin et al., 1997). Inoltre, le caspasi effettuano anche tagli su proteine componenti le giunzioni aderenti come le placoglobine e le β -catenine (Herren et al., 1998) e ciò spiega perché le cellule in apoptosi perdono il contatto con le cellule adiacenti. Infine, le caspasi operano tagli sui fattori di sopravvivenza Bcl-2 (Hsu et al., 1997), Bcl-XL (Clem et al., 1998), Bax (Grandgirand et al., 1998) e operano il flip della fosfatidilserina che, traslocando dallo strato interno a quello esterno della membrana plasmatica (Huppertz et al., 1999) funge da marcatore per il riconoscimento da parte dei fagociti che presentano lo specifico recettore (Savill et al., 1993).

1.3.c: La fase di riconoscimento e fagocitosi

Nei tessuti i corpi apoptotici vengono subito fagocitati dalle cellule circostanti o dai macrofagi e degradati all'interno dei lisosomi. Finora sono stati identificati tre sistemi mediante i quali i fagociti riconoscono i corpi apoptotici (**figura C**). In un primo tipo sono utilizzati i recettori delle asialoglicoproteine. Sulle membrane di alcuni tipi cellulari, (per esempio gli epatociti), durante il processo apoptotico vengono esposti alti livelli di glicoproteine desialilate che vengono riconosciute dalle cellule circostanti mediante il recettore delle asialoglicoproteine. Nel secondo tipo viene utilizzato il recettore più complesso e meglio caratterizzato della vitronectina (VnR)/CD36, dai macrofagi derivati dai monociti. Al sistema di riconoscimento partecipano tre molecole: i) la trombospondina (TSP) molecola trimerica, adesiva, prodotta e secreta dal macrofago, che funziona

da ponte molecolare tra corpo apoptotico e complesso VnR/CD36; ii) VnR: presente sulle membrane del macrofago, è un eterodimero che appartiene alla famiglia delle integrine, molecole di membrana implicate nelle funzioni di adesione e ancoraggio cellulare; iii) CD36: molecola di superficie, tipicamente espressa dai monociti, dai macrofagi e dalle piastrine, la cui funzione fisiologica non è ancora ben determinata. Infine, abbiamo un terzo meccanismo che coinvolge il recettore della fosfatidilserina (PS). Normalmente i residui di PS sono situati sulla faccia citoplasmatica della membrana; nelle cellule apoptotiche l'asimmetria del foglietto lipidico viene persa in seguito all'attivazione di un enzima specifico (scramblase) che trasloca i residui di PS sulla faccia esterna della membrana (Savill et al., 2000).

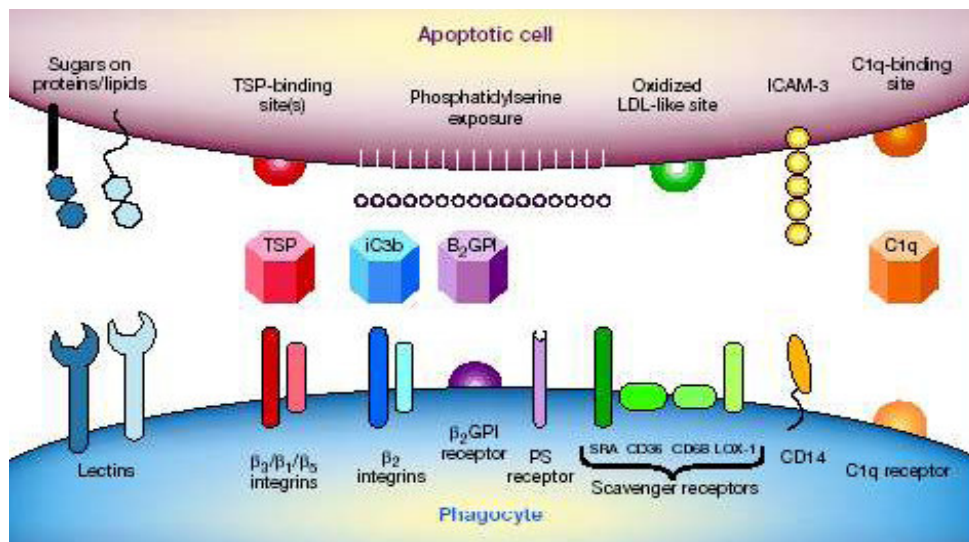


Figura C: Riconoscimento di una cellula apoptotica da parte dei macrofagi.

1.4 Le caspasi

Le caspasi sono una famiglia di cistein-proteasi evolutivamente molto conservate come dimostra la loro presenza in molti metazoi, anche primitivi come poriferi (*Geodia cydonium*, Wiens et al., 2003), cnidari idrozoi (*Hydra vulgaris*, Cikala et al., 1999) e Antozoi (*Aiptasia pallidum*, Dunn et al., 2004; Mire e Venable, 1999), insetti (*Drosophyla melanogaster*, Forsyth et al., 2004), ascidie (Bates, 2004) e molluschi gasteropodi (*Helix lucorum*, Bravarenko et al., 2006).

Le caspasi sono enzimi proteolitici con sito attivo caratterizzato dalla presenza di una cisteina. Esse tagliano i loro bersagli a valle di una breve sequenza di quattro aminoacidi, l'ultimo dei quali è un residuo di acido aspartico (Alnemri et al., 1996; Mancini et al., 1998). Sono quindi Cistein ASPartico proteASI.

Sono attualmente note circa 14 caspasi (Hu et al., 1998) ma non tutte sono coinvolte nell'apoptosi. È stato infatti dimostrato che alcune svolgono altri compiti come, per esempio, la caspasi 1 che regola l'attività dell'interleuchina 1 β durante i processi infiammatori (Raupach et al., 2006).

Le caspasi vengono suddivise in 3 grandi gruppi. Il primo è costituito da caspasi che sono coinvolte nei processi infiammatori e sono caratterizzate dalla presenza, in genere, di un lungo prodominio. Questo gruppo è stato ulteriormente diviso in due sottogruppi. Al primo sottogruppo appartengono le caspasi di *C. elegans*, incluso CED 3, il primo gene individuato; al secondo sottogruppo, oltre alla caspasi 1 (prototipo), appartengono anche le caspasi 2, 4, 5, 11, 12 e 14 finora trovate solo nei vertebrati. Al secondo gruppo appartengono le caspasi esecutrici 3, 6 e 7 che presentano un corto dominio (Cohen, 1997; Bratton et al., 2000). Il terzo gruppo comprende le caspasi a funzione iniziatrice (Lamkanfi et al., 2002) (**figura D**).

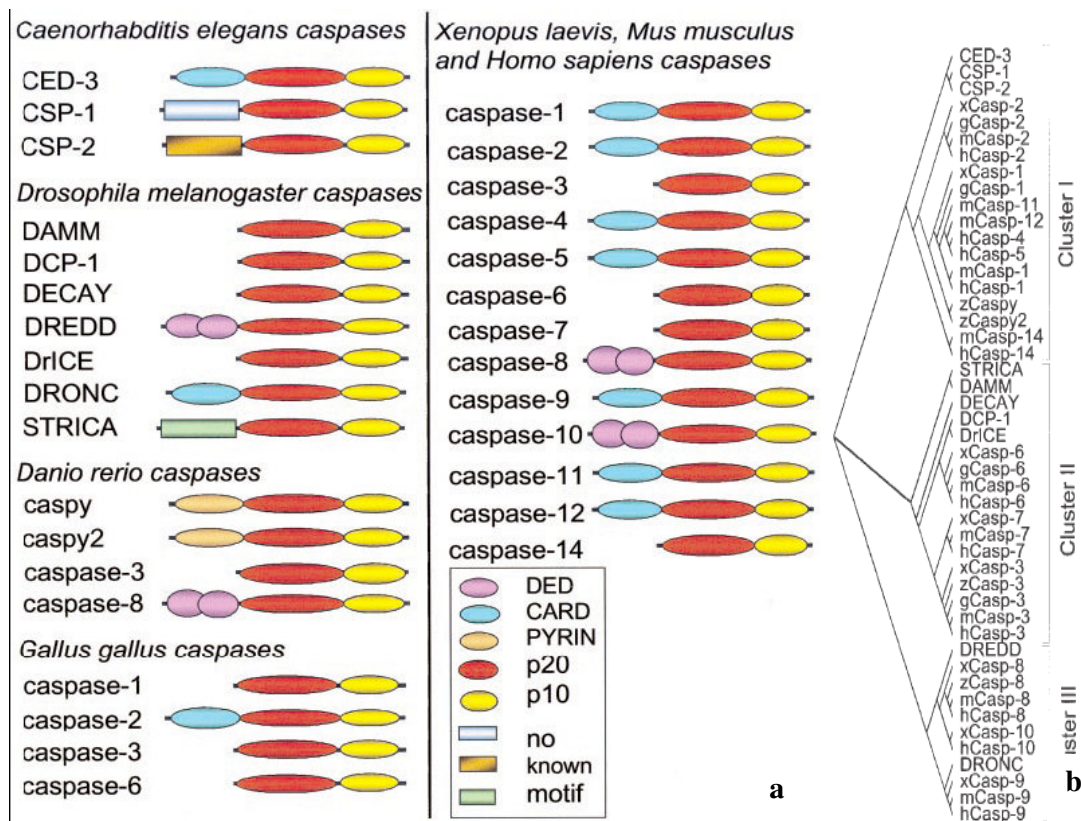


Figura D: (a) Architettura dei domini delle caspasi in mammiferi, pollo, Xenopus, zebrafish, Drosophila e C. elegans. (b) Relazione filogenetica delle caspasi basata sui domini p20 e p10: le caspasi infiammatorie (cluster I), le caspasi esecutrici (cluster II) e le caspasi iniziatrici (cluster III) che si sono evolute come gruppi separati

Nel prodominio delle caspasi iniziatrici, sono stati identificati due domini essenziali: il primo è DED (dominio effettore di morte), presente nelle caspasi 8 e 10; il secondo è CARD (dominio di reclutamento caspatico), presente nelle caspasi 1, 2, 4 e 9 e in altre proteine coinvolte nell'apoptosi come Apaf-1. Questi domini consentono il reclutamento delle caspasi iniziatrici grazie all'assemblaggio di una piattaforma molecolare costituita dai recettori di morte presenti sulla membrana plasmatica (Fas, TNF-R1, etc.) e dalle molecole adattatrici (FADD, RIP, etc.) (Martins et al., 1998; Yamascita et al., 1998) (vedi paragrafo 1.3:a).

Le caspasi esecutrici che mancano di prodominio sono, invece, attivate dall'interazione con le caspasi iniziatrici: la caspasi 8 taglia le proforma delle caspasi 3, 4, 7 e 9 (Srinivasula et al., 1996), la caspasi 9 attiva le caspasi 3 (Srinivasula et al., 1998) e 7 (Srinivasula et al., 1998), mentre la caspasi 10 attiva le caspasi 3, 7 e 8 (Alnemri et al., 1996).

Tipicamente, le caspasi iniziatrici attivano le caspasi effettrici, ma non mancano i casi in cui possono essere attivate da queste ultime per un meccanismo di amplificazione del segnale.

Nella cellula le caspasi si trovano normalmente in forma di zimogeno o pro-caspasi, con peso variabile tra i 30 kDa e i 50 kDa. Questo è costituito da tre domini: il prodominio N-terminale, una subunità grande, di circa 20 kDa, e una subunità piccola, di circa 10 kDa (Thornberry et al., 1998).

L'attivazione inizia con due tagli proteolitici: il primo separa la subunità grande da quella piccola e il secondo elimina il predominio. Le due subunità si uniscono poi a formare un dimero, attivo o, nel caso delle caspasi iniziatrici, un tetramero con due molecole di caspasi, ciascuna costituita dalle due subunità (**figura E**).

Tutte le caspasi presentano nel loro dominio C-terminale la caratteristica sequenza altamente conservata QACxG (glutammina, alanina, cisteina, x e glicina) (Cohen, 1997).

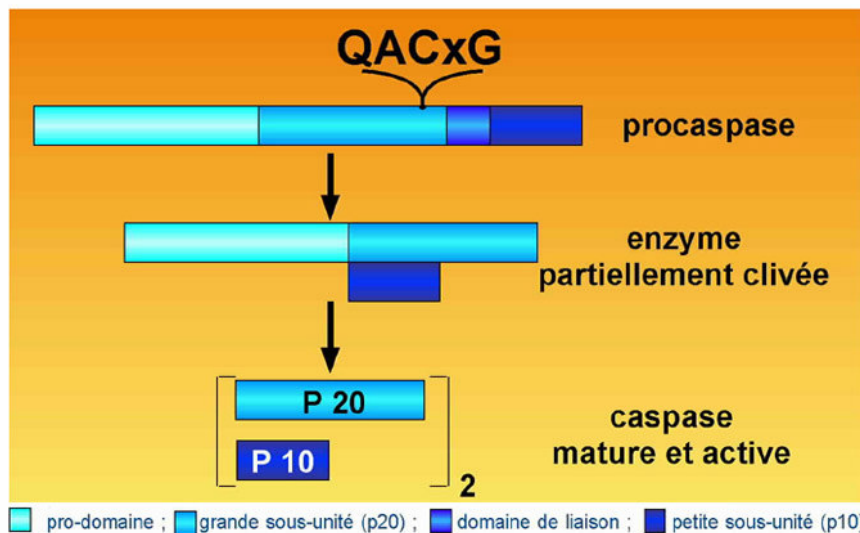


Figura E: Caratteristica sequenza QACxG e attivazione delle caspase mediante due tagli proteolitici.

1.5 La caspasi 3

Per quanto riguarda la caspasi 3, in particolare sappiamo che nell'uomo è composta da 277 amminoacidi, ed è stata originariamente denominata CPP32, Yama, Apopain ed è un membro della subfamiglia di caspasi CED-3, l'analogo a quello individuato nel nematode *C. elegans*.

L'analisi della sequenza N-terminale e la tecnica dell'elettrospray-MS hanno dimostrato che la caspasi 3 nella sua forma attiva è un tetramero $(p17/p12)_2$ ed ha una struttura compatta con dimensioni di circa 50 x 60 x 30 Å. Ogni tetramero è costituito da due subunità eterodimeriche, ciascuna contenente una catena grande di 17 kDa ed una piccola di 12 kDa (Nagata, 1997; Mancini et al., 1998; Earnshaw et al., 1999).

La proteina si presenta in due forme: una forma inattiva e una attiva. La forma inattiva è un proenzima, è localizzata per lo più nel citoplasma, ma anche nel nucleo, e presenta un corto peptide o prodominio, (PRO) all'estremità N-terminale. Per passare alla forma attiva, la proteina viene tagliata sui residui di aspartato tra PRO e p17 e tra p17 e p12 (**figura F**).

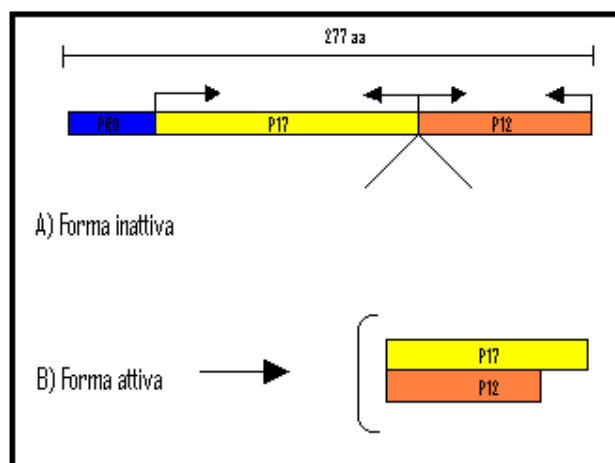


Figura F: La caspasi 3 è una proteina che nella forma inattiva è composta da 277 amminoacidi ed è costituita da un prodominio (PRO), da una subunità maggiore di 17 kDa (p17), da una subunità minore di 12 kDa (p12) e un sito di taglio tra le due subunità per mezzo del quale la caspasi 3 diventa attiva.

Durante l'apoptosi la caspasi 3 è responsabile dell'attività proteolitica a carico di un gran numero di substrati ognuno dei quali contiene una determinata sequenza. In particolare la caspasi 3 predilige quei substrati che presentano una sequenza di tipo DXXD (Nicholson et al., 1995), dove x può essere un amminoacido come Valina e Aspartato (Cohen, 1997). Negli ultimi anni vari studi hanno dimostrato che la caspasi 3 è coinvolta anche in funzioni non- apoptotiche nel tessuto nervoso (Gulyaeva, 2003) nella secrezione pancreatica e nell'immagazzinamento del calcio nelle cellule pancreatiche (Rosado et al. 2006) nell'esposizione della fosfatidilserina durante la reazione acrosomiale (Martin et al, 2005, Kurz et al., 2005).

1.6 I Molluschi

...Il *phylum* dei molluschi è il secondo per dimensioni, dopo quello degli artropodi, con circa 100.000 specie tra varietà fossili (40.000) e viventi (60.000). Questo *phylum* è suddiviso in sette classi distinte molto diverse tra loro per aspetto ed anatomia, ossia gli Aplacofori, i Polioplacofori, i Monoplacofori, gli Scafopodi, i Bivalvi, i Cefalopodi e i Gasteropodi (**figura G**). Sono diffusi praticamente in tutto il mondo.

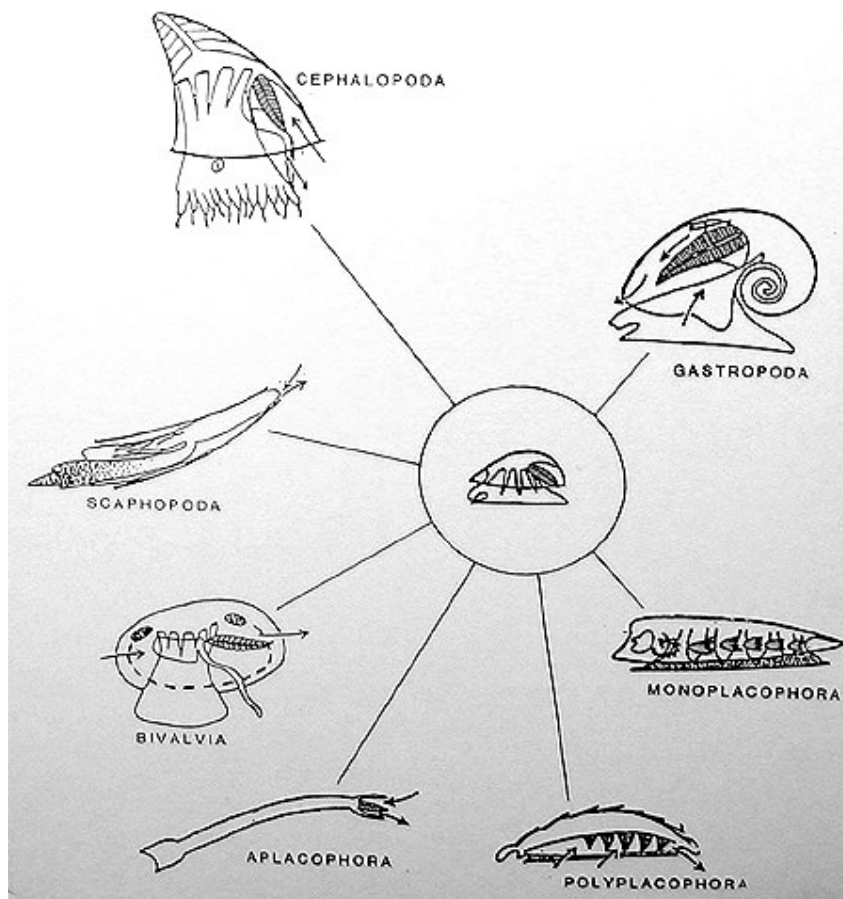


Figura G: suddivisione dei molluschi.

I molluschi hanno avuto un notevole successo ecologico ed evolutivo, come dimostra il fatto che sono rappresentati in tutti gli habitat, sebbene raggiungano il massimo della diversità biologica nell'ambiente marino. Comprendono alcune forme particolarmente evolute, come i polpi e i

calamari, e il più grande invertebrato esistente, il calamaro gigante, che può raggiungere i 18 m di lunghezza. La maggior parte dei molluschi, tuttavia, ha una lunghezza compresa fra 1 e 20 cm e alcuni di essi sono appena visibili. Sono note numerose classi e parecchie migliaia di specie fossili, le più antiche delle quali risalgono al periodo Cambriano, cioè a circa 600 milioni di anni fa.

Generalmente hanno un corpo molle appiattito ed allungato, con un capo munito di occhi e tentacoli sensori come nei Cefalopodi, tutti hanno un piede ventrale, una massa dorsale che contiene i visceri e una plica del tegumento, il mantello, che dorsalmente delimita una cavità palleale che comunica con l'esterno anteriormente o posteriormente. La superficie dorsale del mantello secerne una conchiglia per lo più calcarea. Nella cavità della bocca dei Gasteropodi si trova la radula, simile a una lingua, con file di dentelli trasversali: essa viene estroflessa e usata originariamente per raschiare le particelle alimentari del substrato. L'ano si apre nella cavità palleale; in essa trovano posto anche le branchie, a forma di pettine (ctenidi) come nei Bivalvi. Il sistema circolatorio è formato per lo più da lacune aperte, con un cuore contrattile da cui partono vasi che raggiungono le branchie. Di solito vi è una sola coppia di reni e gonadi, con dotti comuni o separati che sboccano nella cavità palleale. Il sistema nervoso è formato da un anello intorno all'esofago e due paia di cordoni con gangli, in molti casi concentrati, e organi di senso spesso ben sviluppati. I vari gruppi di Molluschi sono diversificati per l'organizzazione degli organi interni, della conchiglia e della superficie del corpo.

1.7 Gasteropodi

Sono caratterizzati da una conchiglia unica a forma di spirale e da una struttura corporea generalmente asimmetrica. Hanno colonizzato numerosi

habitat infatti comprendono forme marine, d'acqua dolce e terrestri. Delle prime che sono le più numerose ne esistono sia forme bentoniche che planctoniche. Quest'ultime capaci di movimento sia passivo che attivo; fra i Gasteropodi bentonici alcuni vivono sepolti nei fondali sabbiosi-argillosi altri si fissano alle rocce. Nel corso dell'evoluzione, tuttavia, una torsione di 180° della massa viscerale, avvenuta per proteggere gli organi cefalici, rendendo possibile la ritrazione del capo all'interno della conchiglia in caso di pericolo, ha variato l'organizzazione interna dei visceri nella maggioranza dei gasteropodi. In particolare, i quattro cordoni neurali che si dipartono dal cingolo periesofageo sono incrociati e il tubo digerente forma un'ansa e sbocca al di sopra della zona cefalica, dove sono localizzate anche le branchie. Questo non vale per i gasteropodi opistobranchi, che nel corso dell'evoluzione hanno messo in atto la detorsione della massa viscerale. I comportamenti alimentari dei Gasteropodi sono tanto vari quanto le loro forme ed i loro habitat, sono per la maggior parte erbivori però ve ne sono anche con dieta carnivora capaci di perforare meccanicamente e chimicamente le conchiglie di altri Molluschi. I gasteropodi acquatici meno evoluti hanno sessi separati e si riproducono spargendo le uova in acqua, dove vengono fecondate dagli spermatozoi e si sviluppano in larve di tipo "veliger". Queste ultime dapprima nuotano liberamente, quindi si posano sul fondale e maturano. Nei gasteropodi più evoluti la fecondazione è interna; le uova e le forme giovanili sono protette da appositi involucri e a volte vengono custodite dalla femmina, che in questo senso presta una sorta di cure parentali. In alcuni casi l'intero processo di sviluppo avviene internamente.

Nelle sottoclassi degli opistobranchi e dei polmonati l'ermafroditismo è quasi la regola (ogni individuo contiene sia organi sessuali maschili sia organi sessuali femminili); questa caratteristica è da interpretare come un adattamento messo in atto per aumentare la capacità riproduttiva di questi

animali, dal momento che consente loro di accoppiarsi con qualunque altro individuo della stessa specie. In gran parte dei polmonati lo stadio larvale è assente; in questa sottoclasse è comune l'autofecondazione e alcune specie di chioccioline possono riprodursi anche senza che le uova vengano fecondate.

Sono generalmente classificati in tre sottoclassi, sulla base della posizione o della tipologia degli organi respiratori: i prosobranchi (di cui la varietà più nota è la patella), che sono dotati di branchie posizionate anteriormente, nella cavità del mantello; gli opistobranchi (tra cui vanno annoverati i nudibranchi, privi di conchiglia), che hanno branchie ridotte e posizionate posteriormente, o del tutto assenti; infine i polmonati (comprendenti tutte le specie terrestri, tra cui limacce, chioccioline e lumache), che non hanno branchie, ma una struttura polmonare ricavata dalla cavità del mantello. I gasteropodi più piccoli sono quasi invisibili, mentre il più grande, una limaccia marina, arriva a pesare 13 kg.

1.8 Bivalvi

La classe Bivalva dei molluschi comprende cozze, ostriche, pettini e gruppi simili, ed è caratterizzata da una conchiglia esterna costituita da due pezzi (valve) in cui è contenuto un corpo molle compresso lateralmente, un piede particolarmente modificato il quale è largo, a forma d'ascia (pelecipode) ed è in molte forme adoperato per scavare ed un paio di branchie. Manca una testa funzionale (acefali). Le valve sono tenute insieme da un legamento elastico, posto sul margine dorsale della conchiglia, e sono collegate da uno o due muscoli adduttori. Due tubi formati da tessuto mantellare, chiamati sifoni, risucchiano (sifone inalante) ed emettono (sifone esalante) l'acqua nella cavità palleale, una cavità delimitata dal tessuto del mantello e contenente le branchie. Queste, conformate a lamelle sottili e ricche di vasi sanguigni, svolgono la doppia funzione alimentare e

respiratoria: infatti, quando vengono lambite dall'acqua, trattengono le particelle nutritive in essa sospese e assorbono l'ossigeno necessario alla respirazione. Nella cavità palleale sboccano inoltre gli organi escretori (nefridi) e gli organi riproduttivi.

Solitamente i bivalvi hanno sessi separati, ma non mancano casi di ermafroditismo. Gli spermatozoi e le uova vengono liberati nell'acqua, dove hanno luogo la fecondazione e lo sviluppo. La forma giovanile (larva trocofora) nuota finché non trova un habitat appropriato in cui stabilirsi. Le numerose classificazioni esistenti sono tutte controverse; di queste, quella più accreditata propone una suddivisione della classe in quattro ordini, in base a differenze nella struttura delle branchie. All'ordine dei protobranchi appartengono bivalvi piccoli e primitivi, dotati di branchie semplici. I settibranchi sono bivalvi che attraverso una modificazione delle branchie catturano e aspirano piccoli animali. I filibranchi hanno un'unica grande branchia con filamenti non fusi e comprendono le ostriche, i mitili e i pettini. Gli eulamellibranchi, infine, hanno filamenti branchiali fusi che formano una lamina continua; comprendono i mitili d'acqua dolce, le tridacne, la maggior parte delle vongole e le teredini.

1.9 Cefalopodi

Rappresentano la classe più evoluta del *phylum* in quanto hanno un capo sviluppato con occhi grandi ed efficienti. Comprendono specie marine predatrici liberamente natanti come il nautilus, il calamaro, la seppia e il polpo. In alcuni di essi la conchiglia è ridotta a una piastra sottile inclusa nello spessore del mantello, come nella seppia; nel polpo è assente e nel nautilo ha una forma a spirale internamente suddivisa in camere, utili per il galleggiamento. Il piede è profondamente modificato rispetto a quello del mollusco ancestrale, in quanto trasformato in tentacoli e braccia distribuiti intorno alla bocca che terminano con ventose o uncini e sono utilizzati per

la cattura delle prede (calamari) o il movimento (polpi). In generale, nelle forme viventi le braccia sono di solito otto (per questo sono detti ottopodi, polpo), ai quali si aggiungono due tentacoli nei decapodi (calamari). Il nuoto avviene con un meccanismo a reazione che sfrutta la cavità palliale e una struttura specificatamente differenziata, l'imbuto. Nella cavità palliale l'acqua viene forzata e successivamente espulsa dall'imbuto che, essendo orientabile, permette di indirizzare il movimento. Nei cefalopodi i sessi sono separati e alcune specie presentano complessi rituali di corteggiamento. Durante l'accoppiamento il maschio trasferisce gli spermatozoi, contenuti in capsule dette spermatofore, dalla propria cavità del mantello a quella della femmina, a mezzo di un tentacolo specializzato detto ectocotile. Le uova fecondate vengono deposte in masse, che spesso vengono custodite e accudite dalla femmina, in particolare nei polpi. Lo sviluppo è diretto: dall'uovo fecondato crescono forme giovanili simili agli adulti. La classe dei cefalopodi è suddivisa in due sottoclassi: quella dei tetrabranchiati, comprendente l'ordine dei nautiloidei, e quella dei dibranchiati; quest'ultima è ulteriormente suddivisa nei due ordini dei decapodi (calamari e seppie) e degli ottopodi (polpi).

CAPITOLO II

SCOPI E PROGRAMMA DELLA RICERCA

SCOPI

2.1 Obiettivo della ricerca e scelta del materiale biologico

L'obiettivo del mio progetto di ricerca è di studiare la caspasi 3 in alcune specie di molluschi, al fine di stabilirne la presenza, la localizzazione e di caratterizzarne la sequenza. Il successo dei Molluschi è legato ad una storia evolutiva che ha consentito la realizzazione di una notevole radiazione adattativa, ben evidenziabile nelle forme attuali. Infatti, nel corso della loro evoluzione sono passati da forme allungate e striscianti, lunghe pochi millimetri e con abitudini fossorie, a forme via via più complesse che hanno potuto colonizzare un'ampia gamma di habitat che va dai mari polari a quelli tropicali, ad altitudini che superano i 7000 metri, in pozze, laghi e corsi d'acqua, nella risacca ed in mare aperto. Questa radiazione adattativa verificatasi grazie ad una serie di modificazioni morfologiche, genetiche e fisiologiche ha reso il phylum dei molluschi un materiale di studio particolarmente vario e scientificamente interessante. A tale soggetto di studio si affianca lo studio della caspasi 3 un enzima noto per essere principalmente coinvolto nella cascata apoptotica ma recenti studi, svolti negli ultimi anni, stanno evidenziando il suo coinvolgimento in una lunga serie di funzioni alternative. E' stato infatti dimostrato che la caspasi 3 è coinvolta nel mantenimento delle sinapsi (Gulyaeva, 2003; Bravarenko, 2006), nella proliferazione e nel differenziamento (Schwerk et al., 2003), nella secrezione pancreatica e nell'immagazzinamento del calcio nelle cellule pancreatiche (Rosado et al., 2006), e nell'esposizione della fosfatidilserina durante la reazione acrosomiale (Martin et al., 2005; Kurz et Al., 2005).

Condurrò le indagini su esemplari appartenenti alle tre classi più rappresentative di Molluschi: Bivalvi, Gasteropodi e Cefalopodi,

comparandoli. Tra i Bivalvi studierò la *Callista chione* perché è una specie marina di notevoli dimensioni, facile da manipolare e reperire in quanto vive anche nel Golfo di Napoli. La sua gonade è generalmente a sessi separati anche se sono stati riportati rari casi di ermafroditismo (Grassè, 1970). Per confronto, in alcuni esperimenti utilizzerò anche alcuni esemplari di altre due specie marine, *Adamussium colbecki*, specie tipica antartica, gonocorica, pescata nel Mare di Ross di fronte alla base italiana di Terra Nova, e *Tapes decussatus*, anche essa mediterranea (tutte queste specie sono gonocoriche, a sviluppo indiretto con stadio larvale). Tra i Gasteropodi studierò *Helix pomatia* in quanto terrestre, polmonato con gonade ermafrodita. Lo sviluppo è diretto in quanto non è presente alcuno stadio larvale e dall'uovo che si schiude esce un piccolo gasteropode. Per confronto, in alcuni esperimenti analizzerò anche due specie marine, la *Sphaeronassa mutabilis*, gasteropode a sessi separati diffuso nelle zone del Tirreno e il *Neobuccinum eatoni*, ermafrodita, diffuso nelle coste antartiche del Mare di Ross. Tra i Cefalopodi ho scelto *Octopus vulgaris*, anch'esso marino, perché di grandi dimensioni e facile da reperire. La sua gonade è sempre a sessi separati, le uova sono grandi e lo sviluppo è diretto.

Gli esemplari di *Callista*, *Sferonassa*, *Octopus* e *Tapes* sono stati ottenuti da fonti commerciali. *Helix* è stata catturata in campo nelle campagne intorno ai comuni situati nella zona di Napoli Nord. Gli esemplari delle due specie antartiche sono stati catturati e fissati durante le campagne di pesca dell'estate australe del 1998 e del 2004.

2.2 Programma della ricerca

Premessa. Condurrò le ricerche utilizzando organi prelevati da animali in vivo o trattati sperimentalmente in vitro. Le colture in vitro offrono il vantaggio di poter manipolare il materiale biologico isolandolo dalle

possibili interferenze fisiologiche dovute alle interazioni con altri organi e/o tessuti.

Per gli esperimenti utilizzerò anticorpi e mezzi di coltura già disponibili in commercio e liberi da impurità e contaminazioni come garantito dalle case produttrici.

Per le ricerche in programma utilizzerò tecniche citologiche, immunocitochimiche e biochimiche, sia seguendo protocolli già riportati in letteratura che adattandoli al materiale biologico in esame.

Dai vari esemplari preleverò le gonadi (maschili, femminili o gli ovotestis) e, per confronto, anche campioni di intestino, epatopancreas e branchie. Questi organi saranno immediatamente processati per le indagini biochimiche oppure inclusi, affettati e colorati ottenendo preparati adatti per le indagini morfologiche in microscopia ottica. A tale scopo eseguirò colorazioni bicromiche (emallume-eosina) e tricromiche (Galgano).

Obiettivo 1: caratterizzazione morfologica delle gonadi e localizzazione della caspasi 3 nelle diverse specie in esame

Indagini morfologiche.

Descriverò la struttura generale della gonade maschile e femminile e di quella ermafrodita. Quando possibile, condurrò osservazioni in diversi periodi dell'anno per chiarire l'esistenza di eventuali differenze tra diversi periodi del ciclo riproduttivo.

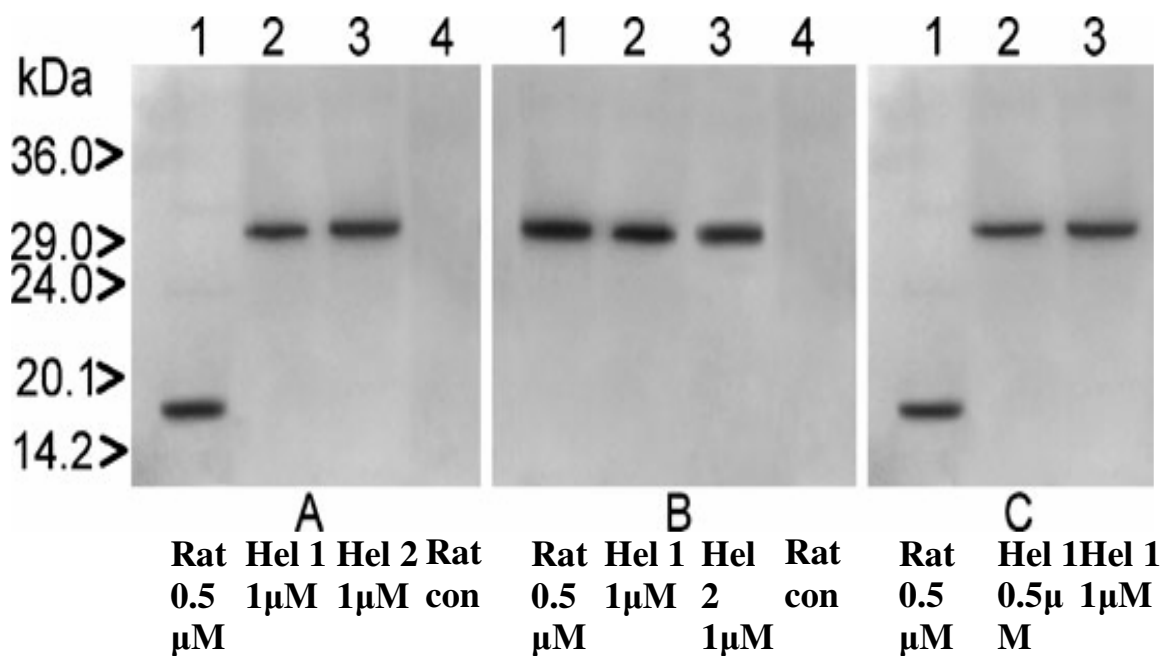
Localizzerò nell'ovaio la posizione delle cellule germinali prefollicolari, i rapporti esistenti tra ovociti e cellule follicolari, e verificherò se l'accrescimento è sincrono, se si verificano atresie follicolari e se queste sono sincrone o asincrone.

Nella gonade maschile localizzerò gli elementi germinali nei diversi stadi. In particolare individuerò gli spermatogoni e gli spermatociti e stabilirò se sono sparsi o raccolti in aree germinative. Verificherò inoltre la presenza e la localizzazione degli spermatozoi.

Presenza e caratterizzazione biochimica della caspasi 3

Estrarrò le proteine dagli organi dei vari esemplari, in particolare branchie, gonadi, intestino ed epatopancreas dei bivalvi *Callista chione* e *Tapes decussatus*, dei gasteropodi *Spheronassa mirabilis* ed *Helix pomatia* e del cefalopode *Octopus vulgaris*. Quindi sottoporro gli estratti proteici a Western blotting utilizzando un anticorpo anti caspasi 3 di mammifero. Queste indagini mi permetteranno di individuare l'eventuale presenza di una caspasi 3-like nei diversi tessuti e specie e di caratterizzarne il peso molecolare.

Per le indagini di western blot utilizzerò un anticorpo la cui specificità sui molluschi è stata già documentata. Bravarenko e collaboratori (2006), infatti, lo hanno utilizzato per rivelare la presenza di una caspasi 3-like e del suo subframmento attivo p17 nel sistema nervoso centrale del gasteropode *Helix lucorum*. A conferma di questo dato gli autori riportano la presenza nei blots di una banda immuno-reattiva a 29 kDa (figura sotto).



Bravarenko et al., 2006
European Journal of Neuroscience

Dopo aver verificato la presenza della caspasi 3 e averne caratterizzato il peso molecolare, condurrò esperimenti preliminari di immunocitochimica. Essi mi permetteranno di verificare se l'anticorpo nei tessuti delle diverse specie effettivamente riconosce i tipi cellulari in cui la presenza/assenza dell'enzima è stata già dimostrata in altri invertebrati e vertebrati. Inoltre, in esperimenti paralleli, per verificare che la proteina riconosciuta dall'anticorpo sia effettivamente una caspasi condurrò esperimenti in vitro di induzione dell'apoptosi. A questo scopo metterò in coltura organi diversi con staurosporina, un noto induttore della via apoptotica mitocondriale (Jacobson et al., 1997). Poi estrarrò le proteine, eseguirò i western blot e controllerò che compaia la banda corrispondente alla caspasi 3 nei campioni inizialmente negativi e che aumenti la positività in quelli già positivi.

Se con questi tests preliminari dimostrerò la presenza di una caspasi 3 nelle diverse specie di mollusco, allora procederò alla ricerca dell'enzima

nelle gonadi maschili, femminili ed ermafrodite. Condurrò colorazioni immunocitochimiche in situ su sezioni, e confronterò la risposta all'anticorpo di ovociti, cellule follicolari, spermatogoni, spermatociti e spermatozoi. La presenza di caspasi non comporta necessariamente che il processo apoptotico sia in corso (Motta et al., 2007). Per questo la distribuzione dell'enzima potrà essere molto più ampia di quanto non prevedibile sulla sola base delle osservazioni morfologiche.

Obiettivo 2) Sequenziamento della caspasi 3-like di mollusco

Dopo aver dimostrato che nelle gonadi delle diverse specie è presente una caspasi 3-like avvierò una serie di indagini di biologia molecolare per isolarla e sequenziarla. Intendo effettuare allineamenti multipli tra le sequenze di caspasi 3 di invertebrati già note in letteratura per costruire diverse coppie di primers (forwards e reverse). Considerando la variabilità del codice genetico, i primers saranno costruiti in modo da presentare alcune degenerazioni. Quindi estrarrò l'RNA totale dai campioni e li userò in reazioni di RT e PCR. Qualora dovessi ottenere bande del peso molecolare previsto, le eluirò, le clonerò e le sequenzierò.

Ottenuta la sequenza per verificare che si tratti di una caspasi 3, immetterò la sequenza stessa in banca dati e la analizzerò in cerca di omologie con quelle già disponibili in banca dati usando i programmi Blasta e Fasta.

CAPITOLO III
MATERIALI E METODI

3.1 Prelievo degli organi

Gli animali sono stati presi, lavati con acqua distillata e aperti utilizzando un coltello. Dopo l'apertura delle valve, gli organi sono stati esposti, prelevati con l'ausilio di pinzette e forbici e immediatamente processati per le analisi citologiche (fissativo) o biochimiche (congelamento).

3.2. Indagini citologiche ed immunoistochimiche

Gli organi sono stati fissati in Bouin (acido picrico/formalina/acido acetico; 15/5/1,v/v/v) per 12-24 ore. Quindi sono stati lavati in alcool etilico 75° per scaricare i residui di acido picrico. Dopo la completa decolorazione, gli organi sono stati disidratati in alcool etilico 90% (2h), assoluto (2h), chiarificati in xilolo (2x30min) e impregnati di paraffina, in stufa a 59-60° C per circa 2 ore. I blocchetti sono stati quindi affettati al microtomo e le risultanti sezioni (circa 5 µm) sono state montate su vetrini poli-lisinati per le reazioni di immunocitochimica, su vetrini super frost per le reazioni di ibridazione in situ e su vetrini normali per le reazioni di colorazione. Le fette sono state distese utilizzando acqua distillata, su piastra riscaldata ad una temperatura massima di 40° C.

Preparazione dei vetrini poli-lisinati

I vetrini sono stati sgrassati con alcool etilico assoluto e quindi strisciati con una goccia (circa 10 µl) di soluzione acquosa di poli-L-lisina (Sigma; 1mg/ml). Dopo asciugatura in ambiente pulito, i vetrini sono stati riposti in una scatola chiusa, e conservati in frigo per un massimo di pochi giorni prima dell'uso.

Indagini citologiche

Le sezioni sono state sparaffinate in xilolo, reidratate in alcool etilico/acqua e colorate secondo i seguenti protocolli.

Colorazione Galgano.

Dopo immersione in emallume-acido di Mayer per 5 min, i vetrini sono stati sciacquati in H_2O_{dist} e, quindi di fonte per 15 min. Dopo nuovo lavaggio in H_2O_{dist} , i vetrini sono stati colorati con fucsina (0.1%) acidificata per 1 min, sciacquati in H_2O_{dist} e differenziati al microscopio ottico. Dopo mordenzatura in acido fosfomolibdico (2%) per 5 min e lavaggio in H_2O_{dist} , le sezioni sono state colorate con miscela Mallory per 2 ore. Terminato tale periodo i vetrini sono stati lavati in acqua, disidratati in etanolo, chiarificati in xilolo.

Colorazione con Emallume-Eosina.

I vetrini sono stati immersi in emallume-acido di Mayer per 3 min, poi sono stati sciacquati in H_2O_{dist} e, successivamente in H_2O di fonte per 15 min. Prima di immergere i vetrini in eosina acidificata per 5 sec, sono stati sciacquati molto velocemente in H_2O_{dist} . Dopo l'eosina i vetrini sono stati lavati in H_2O di fonte e differenziati in alcool 75°. Successivamente si è proceduto con la disidratazione in etanolo e chiarificazione in xilolo.

Colorazione con Alcian-Blu

I vetrini sono stati lasciati in una soluzione di alcian-blu per 1 ora. Dopo due lavaggi in H_2O_{dist} , sono stati immersi in una soluzione di acido acetico

(2%) per 2 min, e di nuovo sciacquati in H₂O dist. Infine sono stati disidratati in etanolo e chiarificati in xilolo.

Immunolocalizzazione in situ della caspasi 3

Le sezioni sparaffinate sono state lavate in PBS (10 mM, pH 7.2-7.4, 3x5 min) e bollite in tampone citrato (0,01 M, pH 6.0, 2x5 min) per esporre i siti antigenici. Dopo lavaggio in PBS le sezioni sono state incubate in H₂O₂ 0,3% in PBS per 15 min per neutralizzare le perossidasi endogene. Dopo ulteriore lavaggio in PBS (15 min), le sezioni sono state incubate con una soluzione contenente siero di capra (1:200 in PBS, 15 min) e, quindi, nella soluzione contenente l'anticorpo primario (IgG anti-CPP32, in coniglio, Novocastra) diluito 1:250 in una soluzione costituita da BSA 1%, Tween20 0,5% in PBS. L'incubazione si è protratta a 4° C over night.

Terminato tale periodo, le sezioni sono state lavate nella soluzione costituita da BSA 1%, Tween20 0,5% in PBS e incubate con l'anticorpo secondario (IgG anti-coniglio, in capra, coniugata con perossidasi, Dako) diluito 1:100 in BSA 1%, Tween20 0,5% in PBS per 2 h, a temperatura ambiente.

L'anticorpo secondario è stato quindi rivelato incubando per 2 ore con un anticorpo terziario, una perossidasi anti-perossidasi in coniglio (Dako) diluito 1:100 in BSA 1%, Tween20 0,5% in PBS. Questo è stato infine rivelato con Sigma Fast.

Il vetrino è stato quindi reso permanente disidratando in etanolo, chiarificando in xilolo e montando con DPX.

3.3 Estrazione, SDS-PAGE e western blot di proteine

Dopo aver prelevato gli organi in ghiaccio, è stato aggiunto 1ml di tampone di estrazione (glicerolo 0.9 M, NaN₃ 0.02%, ATP 1 mM, DDT 1

mM, EDTA 5 mM, HEPES 25 mM, E64 10 μ M, TAME 2 mM, SBTI 5 μ g/ml, aprotinina 5 μ g/ml, pH 7.5) ed è stata effettuata una omogeneizzazione a freddo. L'omogenato è stato lasciato a 25° C per qualche minuto e successivamente sono stati aggiunti 100 μ l di NaCl 2 M continuando ad omogeneizzare. Infine, è stato aggiunto un volume di Freon e i campioni sono stati prima vortexati e poi centrifugati (14000 g a 25° C) per 30 min. Dopo centrifugazione il supernatante è stato recuperato e diviso in aliquote che sono state conservate a -20° C.

Calcolo del contenuto di proteine allo spettrofotometro

La determinazione proteica dei campioni provenienti dalla precipitazione selettiva con solventi organici è stata eseguita con il metodo di Lowry (Lowry e altri, 1951), modificato. Ad ogni campione sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione costituita da 50 parti di NaCO₃ al 3% in NaOH 0.1N, 1 parte di Sodio Tartrato al 2% e 1 parte di CuSO₄ all'1%. I campioni sono stati lasciati per 10 minuti a temperatura ambiente, poi ad essi sono stati aggiunti 200 μ l di Folin 1M e tenuti altri 10 minuti a temperatura ambiente. Trascorso tale periodo, è stata misurata l'assorbanza dei vari campioni con lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 750 nanometri.

La concentrazione proteica è stata quindi calcolata rapportando l'assorbanza dei campioni a quella di pari quantità di albumina usata come standard.

Il contenuto di proteine nei campioni ottenuti dai tessuti di Callista è stato determinato utilizzando il metodo Pierce e uno spettrofotometro autoanalitico Hitachi (modello U2000), precedentemente programmato per la lettura dell'assorbanza a 562 nm.

SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Una volta assemblata la camera elettroforetica si è lasciato polimerizzare il lower gel (1.25 ml di soluzione L, 1.65 ml di soluzione N, 65 µl di glicerolo al 75%, 2 ml di H₂O, 20 µl di APS (Sigma), 5 µl di TEMED (Sigma)) per circa 1h. Successivamente è stato posto il pettine per la formazione dei pozzetti ed è stato versato lo stacking gel (312 µl di soluzione M, 188 µl di soluzione N, 815 µl di H₂O, 6.25 µl di APS (Sigma), 5 µl TEMED (Sigma)) lasciandolo polimerizzare.

I campioni sono stati preparati diluendoli con SBr (0.6 g di Tris-HCl 1 M, pH 6.8, 5 mL di glicerolo al 50%, 1 ml di blu di bromofenolo 1%, 2 ml di SDS al 10%, β-mercaptoetanololo 5% H₂O fino a 10 ml) e facendoli bollire a 100° C (5 min). I campioni sono stati caricati nei pozzetti, la camera elettroforetica è stata riempita con tampone di corsa (3 g Tris-base, 14.4 g di glicina, 2 g di SDS, H₂O distillata fino ad un litro) ed è stata avviata la corsa a 40 mA (1h).

Colorazione con Blu Coomassie

Il gel è stato immerso in una soluzione fissativa (alcool etilico 45%, acido acetico 10% in H₂O) per 1h. Poi è stato lasciato nella soluzione Coomassie (acido acetico 10%, alcool metilico 30%, Blu Coomassie 0.25%) over night. Infine, è stato decolorato con una soluzione di mantenimento (alcool metilico 30%, acido acetico 10% in H₂O), circa 24h.

Western Blot

Le proteine sono state trasferite dal gel di poliacrilammide su un foglio di nitrocellulosa nell'apposita camera elettroforetica riempita di soluzione di trasferimento (Tris-base 25 mM, glicina 0.2%, metanolo 20%). Terminato il trasferimento, la nitrocellulosa è stata lavata in PBS ed è stata immersa

nella soluzione colorante (Rosso Ponceau 0.2%, TCA 0.3%, acido sulfosalicilico 3%). Una volta segnati con la matita i pesi molecolari di riferimento si è proceduto con la decolorazione della membrana e con l'incubazione con lo specifico anticorpo. La nitrocellulosa è stata lavata in PBS (3x5 min) ed è stata immersa in PBS-T (Tween 20 0.1% in PBS) per 15 min. Successivamente è stata immersa nella soluzione blotto (latte magro 5% in PBS-T) per 2h e incubata con anticorpo primario (IgG anti-CPP32 in coniglio Novacastra) 1:500 in soluzione blotto over night. Dopo ulteriore lavaggio in PBS-T, la membrana è stata incubata con anticorpo secondario (IgG anti-coniglio in capra, coniugata con perossidasi (Dako) 1:1000, in PBS-T) per 2h e poi, sempre dopo lavaggio in PBS-T, con anticorpo terziario (IgG anti-perossidasi in coniglio (Dako), 1:1000 in PBS-T) per 90 min. Dopo la rivelazione (pasticche di DAB e urea Sigma Fast) la reazione è stata bloccata in H₂O e la membrana è stata asciugata all'aria.

Acquisizione ed elaborazione delle immagini

Tutte le immagini di microscopia ottica sono state acquisite utilizzando una telecamera Progress 3800 (Kontron Elettronica, Germania) montata su di un microscopio Zeiss Axioskop e il programma Ks300. Le acquisizioni sono state fatte a vari ingrandimenti, variabili tra 5 e 100x.

3.4. Indagini molecolari

Isolamento dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente TRIAGENT (Sigma Chemical), secondo il metodo messo a punto da Chomczynski e Sacchi (1987). I vari tessuti sono stati omogeneizzati con 1 ml di reagente per 100 mg di tessuto. Il campione è stato agitato, lasciato a temperatura

ambiente per 10 min. e centrifugato a 17.000g per 15 min. Dopo la centrifugazione, è stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA, che è stato recuperato mediante precipitazione con isopropanolo. Il campione è stato successivamente centrifugato a 6.700g per 5 min. e il pellet è stato sciolto in H₂O trattata con l'inibitore delle ribonucleasi DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1%.

La purezza e la concentrazione dell'RNA sono state verificate sia spettrofotometricamente che mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'analisi elettroforetica è stata effettuata con gel d'agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA), con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 30 min a 50 Volts costanti. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro d'etidio ad una concentrazione finale di 1,66 mg/ml, che permette di visualizzare l'RNA mediante irraggiamento del gel con luce ultravioletta.

Calcolo del contenuto del DNA/RNA allo spettrofotometro

La quantità del DNA/RNA presente nei campioni è stata determinata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Hitachi (modello U2000). Il rapporto delle assorbanze a 260 e 280nm (DNA: 1.5 e 1.8) (RNA: 1.8 e 2.1) ha fornito una chiara indicazione sul grado di purezza del campione.

Produzione dei cDNA a singola elica

I vari cDNA a singola elica sono stati prodotti a partire da 5µg di RNA totale ottenuto dalle gonadi delle diverse specie di molluschi esaminati, mediante polimerizzazione con l'enzima Trascrittasi Inversa. L'RNA è stato denaturato alla temperatura di 65°C per 5 min, ed è stato retrotrascritto aggiungendo 10 pmoli di una miscela contenente i deossiribonucleotidi dATP, dGTP, dTTP e dCTP, 15 U/µl dell'enzima c-Master Reverse Transcriptase Enzyme (Eppendorf) e, in alcune reazioni, come primer di

innesco, 50 pmoli di un oligo(dT)₁₇ fornito di un adattatore costituito da 27 basi: CGGAGATCTCCAATGTGATGGGAATTC(T)₁ (sintetizzato da Amersham Pharmacia Biotech.), mentre in altre reazioni 50 pmoli di una miscela di random primers (Sigma). La reazione è stata condotta a 42°C per 1 ora, successivamente l'enzima è stato inattivato per 5 min a 65°C.

Amplificazione mediante PCR (Polimerase Chain reaction).

La PCR è stata condotta utilizzando come DNA stampo il cDNA a singola elica ottenuto dalla reazione di trascrizione inversa. Come primers sono stati utilizzati un primer non specifico, corrispondente all'adattatore sopra citato, troncato della coda di dt, mentre, come primers specifici, sono stati utilizzati 4 oligonucleotidi di 20 basi. I primers, forwards e reverse, sono stati disegnati in base ad un allineamento multiplo tra le sequenze della caspasi 3 di vertebrati ed invertebrati presenti in banca dati. Considerando la variabilità del codice genetico alcuni primer sono stati costruiti in modo da presentare alcune degenerazioni.

La miscela di reazione della PCR conteneva: un'aliquota di cDNA a singola elica (0.5 µg), 5U di Taq DNA polimerasi, 50pmoli di ciascuno dei primers sopra citati, 0,2mM (concentrazione finale) di una miscela di dNTPs in Tris-HCl 10mM pH 8.3 contenente KCl 5mM e MgCl₂ 2.5mM. Dopo una denaturazione a 95 °C per 3 minuti, i successivi cicli di PCR sono stati costituiti nel seguente modo: 95 °C per 1 minuto, 50°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto (35 cicli), seguiti da un ciclo finale di polimerizzazione a 72°C per 7 minuti. I cicli di PCR sono stati condotti su un blocco termico programmabile PTC-100 Genenco.

I prodotti dell'amplificazione da PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5%.

Clonaggio

Il vettore utilizzato nel nostro caso è il pGEM T-EASY, lungo 3.9 kb, che presenta il gene LacZa, codificante l'attività β -galattosidasi, all'interno del quale si trova il sito di policlonaggio; i siti di riconoscimento per gli oligonucleotidi di innesco di sequenza del fago M13, i promotori Sp6 e T7, le resistenze ad ampicillina e kanamicina e l'origine di replicazione f1 (Fig.13). Ai lati del frammento clonato sono presenti due siti di restrizione per l'enzima EcoRI, che ne consentono una più semplice escissione. Il cDNA proveniente dalla PCR è stato inserito nel vettore pGEM-T (Promega) fornito dalla casa produttrice già linearizzato. Tale vettore oltre a determinare la resistenza all'antibiotico ampicillina da parte del batterio ospite, presenta all'estremità 3' una T-protudente, complementare alla A-protudente presente all'estremità 5' del cDNA amplificato mediante PCR. Il cDNA è stato legato al plasmide utilizzando 1 unità di enzima T4 DNA ligasi (Promega). La reazione è stata condotta a 14°C per 16 ore.

La miscela di reazione è stata incubata a temperatura ambiente (25°C) per 5' ed è stato aggiunto 1 μ l dell'apposita soluzione di terminazione della reazione.

Per la trasformazione sono state utilizzate le cellule competenti di *E. coli* dH5 α , con una efficienza di trasformazione di 1×10^9 trasformanti per μ g di DNA, alle quali sono stati aggiunti e 2 μ l di reazione di ligasi. Il tutto è stato incubato in ghiaccio per 30'.

La trasformazione è stata ottenuta per shock termico incubando le cellule per 30" a 42°C e successivo trasferimento in ghiaccio per 2'. Sono stati poi aggiunti 150 μ l di terreno SOC (Bacto-Tryptone 2.0%, estratto di lievito 0.5%, MgSO₄ 10mM, glucosio 20 mM) e il tutto è stato incubato a 37°C per 30'.

Le cellule trasformate sono state fatte crescere in terreno semisolido su piastra Petri LB-agar + 50 mg/ml di ampicillina con 40 μ l di X-gal (40

mg/ml in dimetilformammide). La crescita batterica è stata condotta a 37°C over-night.

Il metodo di selezione delle colonie si basa sul fatto che il sito in cui viene inserito il frammento di DNA donato è posizionato all'interno del gene lacZa e pertanto le cellule che hanno incorporato la molecola saranno prive dell'attività della β -galattosidasi ed appariranno bianche; invece, le cellule che non hanno il frammento al loro interno saranno blu, perché metabolizzano il galattosio (X-gal), precedentemente aggiunto al terreno.

Da ogni singola colonia bianca ottenuta, è stato preparato un inoculo di LB (bacto-Tryptone 1.2%, estratto di lievito 2.4%, glicerolo 0.4% più il 10% di una soluzione 0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4) + ampicillina lasciato a 37°C over-night, per poter eseguire poi una estrazione di DNA plasmidico.

Il DNA plasmidico così ottenuto è stato amplificato con l'utilizzo dei primers Sp6 e T7 forward e reverse, in modo da ottenere la sequenza dell'inserito clonato.

Purificazione del DNA plasmidico ricombinante

Il DNA plasmidico è stato purificato utilizzando il Cleaning kit (Eppendorf), basato sul metodo della lisi con alcali descritto da Sambrook e coll. (1982). Una singola colonia batterica del ceppo opportunamente trasformato con il plasmide contenente il frammento di DNA esogeno è stata inoculata in 5ml di LB contenente ampicillina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e fatta crescere a 37°C per 16 ore. La coltura è stata poi centrifugata a 8.000g per 15 min ed il pellet batterico risospeso in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenente EDTA 10 mM. Successivamente la sospensione batterica è stata lisata in condizioni alcaline ed il lisato neutralizzato in un tampone ad elevata concentrazione salina. Il DNA plasmidico è stato quindi adsorbito

su una colonnina di gel di silice e separato da RNA, proteine ed altri componenti cellulari. L'eluizione finale è avvenuta mediante Tris 10 mM pH 8,0.

CAPITOLO IV

RISULTATI

4.1 Caratterizzazione morfologica delle gonadi dei bivalvi

Callista chione

Il testicolo in *Callista chione* è un organo pari formato da lobi di forma rotondeggiante (Tav. 1, fig. A), In sezione ogni lobo presenta al centro i tubuli seminiferi (Tav. 1, fig. A) che convergono nel dotto collettore comune e, marginalmente, aree contenenti cellule germinali in vari stadi di differenziamento: spermatogoni, spermatociti e spermatozoi. (Tav. 1, fig. A-B). Gli spermatogoni, sono riconoscibili per il nucleo più grosso e la cromatina più dispersa, tendono a disporsi più esternamente rispetto agli spermatociti che si riconoscono per il nucleo piccolo e denso (Tav. 1, fig. C-D). Gli spermatozoi sono localizzati in prossimità dei tubuli (Tav. 1, fig. C-D), e sono riconoscibili per il nucleo allungato, a virgola, e cromatina molto densa. Le code sono visibili, in molti casi, all'interno del lume del tubulo. Nelle aree marginali si riconoscono alcune cellule in apoptosi (Tav. 1, fig D).

L'ovaio di *Callista* è un organo compatto contenente un elevato numero di ovociti immersi in scarso stroma connettivale (Tav. 2, fig. A): sono presenti contemporaneamente ovociti in differenziamento e in regressione (Tav. 2, fig. B). Gli ovociti in regressione sono riconoscibili per il contorno irregolare e per il citoplasma poco denso e disorganizzato. Gli ovociti in accrescimento sono attaccati individualmente ai cordoni di stroma e hanno una forma tipicamente a pera, con un corto prolungamento citoplasmatico terminante nell'ilo (Tav. 2, fig C). Essi presentano un citoplasma molto denso e un grosso nucleo contenente un singolo nucleolo (Tav. 2, fig. D). Tutti gli ovociti hanno la stessa dimensione indicando una ovogenesi sincrona. Le cellule follicolari sono poste alla base dell'ovocita, nel punto

di contatto con lo stroma, e non formano il tipico epitelio e, come riportato, hanno funzione nutrice (Grasse P.P., 1970).

Tra i 60 esemplari di *Callista chione* esaminati è stato rinvenuto anche un esemplare ermafrodita; nella gonade, organizzata in ovaio è presente infatti un residuo di testicolo in regressione. Questo è costituito da una massa fibrosa (Tav. 3, fig A) nel cui interno si notano piccoli ovociti, teste di spermatozoi, spermatidi allungati riconoscibili per la forma e per la cromatina addensata, nonché numerose cellule con nuclei contenenti cromatina densa (Tav. 3, fig. B-C).

Adamussium colbecki

Lo studio delle gonadi prelevate a gennaio, in piena estate australe, ha evidenziato un ovaio costituito da una serie di piccole cisti cave sulla cui superficie sono ancorati gli ovociti (Tav. 4, fig. A,B). L'ovogenesi non sembra essere sincrona in quanto tutte le cisti contengono ovociti in diversi stadi di accrescimento (Tav. 4, fig. C). Gli ovociti sono rotondi, con scarso citoplasma e un grosso nucleo contenente un evidente nucleolo singolo. Gli ovociti non sono rivestiti da un epitelio (Tav. 4, fig. C-D): le cellule follicolari, infatti, sono localizzate alla base dell'ovocita in corrispondenza della regione in cui questo prende contatto con lo stroma (Tav. 4, fig. C). Lungo la parete della cisti si notano numerose piccole aree germinative contenenti ovogoni e ovociti nelle prime fasi di accrescimento (Tav. 4, fig. E).

Il testicolo di *Adamussium colbecki* presenta una struttura simile a quella già descritta in *Callista chione*. Esso è costituito, infatti, da lobi in cui si distinguono zone più marginali contenenti gli spermatogoni riconoscibili per il grosso nucleo con cromatina dispersa (Tav. 5, fig. B-C). Procedendo verso il centro del lobo si notano gli spermatociti, caratterizzati dai nuclei

contenenti cromatina più compatta, mentre mancano spermatidi e spermatozoi (Tav 5, fig D).

4.2 Caratterizzazione morfologica delle gonadi dei gasteropodi.

Helix pomatia

Lo studio della morfologia della gonade del gasteropode polmonato *Helix pomatia* ha evidenziato un ovaio-testis la cui organizzazione varia nei diversi periodi dell'anno. Tra settembre e dicembre la gonade è in una fase di riposo in cui è maggiormente rappresentata la componente maschile costituita da lunghi tubuli (Tav. 6, fig A), contenenti dall'esterno verso l'interno, gli spermatogoni, gli spermatociti (Tav. 6, fig. E), e numerosi fasci di spermatozoi (Tav. 6, fig. B-C). Gli spermatozoi sono riconoscibili per le teste disposte a "bouquet" e per le lunghe code che invadono la parte centrale del tubulo (Tav. 6, fig C-D). Nella parte più esterna del tubulo si notano anche numerosi ovociti nelle primissime fasi dell'accrescimento, disposti in piccoli gruppi (Tav. 6, fig. F). Occasionalmente, nei tubuli, si notano cellule in mitosi (Tav. 6, fig G-H). In alcuni tubuli dell'ovaio-testis, tra febbraio-aprile, cominciano a comparire alcuni ovociti in una fase più avanzata di accrescimento (dati non mostrati).

Nel periodo riproduttivo, tra maggio-agosto, i tubuli sono deformati per la presenza di grossi ovociti in accrescimento (Tav. 7, fig. B). Questi presentano un citoplasma chiaro, omogeneo e un grosso nucleo al cui interno si notano i cromosomi filamentosi e il nucleolo (Tav. 7, fig. C); intorno agli ovociti sono presenti alcune cellule follicolari (Tav. 7, fig. C-D). All'interno di alcuni tubuli, sono presenti numerosi piccoli ovociti in accrescimento frammisti agli elementi maschili (Tav. 7, fig. A).

Neobuccinum eatoni.

L'analisi istologica della gonade di *Neobuccinum eatoni* prelevata in gennaio-febbraio (estate australe), mette in evidenza che in questa specie è presente un ovaio testis costituito da una serie di tubuli (Tav. 8, fig. A) in cui coesistono elementi germinali della linea maschile e femminile (Tav. 8, fig. B). La componente maschile è rappresentata da numerosi gruppi di spermatogoni e spermatociti disposti soprattutto alla periferia del tubulo (Tav. 8, fig. C) e da numerosi spermatozoi, riconoscibili per il nucleo a virgola contenente cromatina compatta, e per le lunghe code che si dispongono a fasci al centro del lume (Tav. 8, fig. B). Inoltre, all'interno del tubulo si notano anche numerosi spermatidi con nucleo allungato e corte code (Tav. 8, fig. D).

Gli elementi femminili sono rappresentati da numerosi gruppi di piccoli ovociti in fase molto iniziale di accrescimento (Tav. 8, fig. E). In nessuno degli esemplari esaminati sono stati invece notati ovociti in fasi più avanzate di accrescimento o ovociti in degenerazione. Inoltre negli ovociti si nota una grossa vescicola trasparente in prossimità del nucleo (Tav. 8, fig. F).

4.3 Caratterizzazione morfologica delle gonadi del cefalopode *Octopus vulgaris*

Tutti gli esemplari esaminati sono risultati di sesso femminile.

L'ovaio si presenta costituito da numerosi follicoli primari e secondari, in sviluppo asincrono, ancorati a sottili cordoni di stroma (Tav. 9, fig A), in cui si notano le aree germinative contenenti gli ovogoni e gli ovociti nelle primissime fasi di crescita (Tav. 9, fig B). Gli ovociti presentano abbondante citoplasma e un grosso nucleo con cromatina che ricorda la fase lampbrush, e un singolo nucleolo (Tav. 9, fig. C-D). Esternamente l'ovocita

è rivestito da un epitelio follicolare mono-bistratificato che si continua via illo, nello stroma connettivale (Tav. 9, fig C).

4.4 Presenza e localizzazione della caspasi 3 nelle diverse specie.

Verifica della specificità dell'anticorpo utilizzato

Prima di procedere nelle analisi citologiche è stata verificata la cross-reattività dell'anticorpo anti-caspasi 3 con i tessuti dei molluschi in esame. In esperimenti preliminari l'anticorpo ha riconosciuto specificamente la caspasi 3 nel rettile lacertiliano *Podarcis sicula* e nel teleosteo *Danio rerio*. L'analisi mediante western blot, infatti, ha dimostrato che, nel lacertiliano l'anticorpo riconosce una banda del peso previsto per il proenzima in diversi tessuti. In *Podarcis*, dopo induzione fisiologica o farmacologia dell'apoptosi, si evidenzia un significativo aumento dell'intensità della banda del proenzima e, inoltre, la comparsa di una banda corrispondente al subframmento attivo p17. Bande di 17 e 32 kDa circa, corrispondenti alla forma attiva e al proenzima sono state rivelate dallo stesso anticorpo anche nell'ovaio e nell'intestino di *Danio* (Tav. 10), due organi in cui è stata già dimostrata la presenza di apoptosi fisiologica (Uchida et al., 2002; Ferrando et al., 2005; Andreu-Vieyra et al., 2005).

La verifica della cross-reattività dell'anticorpo nelle varie specie di mollusco ha richiesto, come primo passo, l'estrazione delle proteine dai vari tessuti delle diverse specie. Quindi, dopo averne verificato l'integrità tramite corsa elettroforetica (Tav. 11, fig. A), queste sono state utilizzate per gli esperimenti di Western blot. E' stato dimostrato che una caspasi 3-like è presente in *Callista chione* (Tav 11, fig. B), *Helix pomatia* (Tav 11, fig. D) e *Octopus vulgaris* (Tav 11, fig. E). Nelle gonadi delle 3 specie esaminate infatti, l'anticorpo ha riconosciuto una banda del peso previsto,

cioè circa 32 kDa. Nella sola *Callista* l'anticorpo ha riconosciuto anche una possibile isoforma di 40 kDa circa (Tav. 11, fig. B).

La presenza di questa isoforma è stata verificata effettuando un western blot in *Tapes decussatus*, un'altra specie appartenente alla classe dei bivalvi, e per confronto, anche in *Sphaeronassa mutabilis*, specie appartenente alla classe dei gasteropodi (dato non mostrato). In entrambe le specie l'anticorpo ha riconosciuto solo la banda prevista a 32 kDa.

Per quanto riguarda la localizzazione della proteina nei tessuti, essa è presente nelle gonadi di tutte le specie esaminate e nell'intestino di *Helix*, ma non nell'epatopancreas, nel cuore, e nelle branchie.

Per verificare i risultati ottenuti, i campioni proteici sono stati preparati utilizzando procedure differenti di estrazione e/o corsa elettroforetica per escludere che le differenze osservate nella positività all'anticorpo dipendessero dalla formazione di artefatti dovuti ad interazioni aspecifiche.

Per ottenere un'ulteriore evidenza della natura della proteina riconosciuta dall'anticorpo anticaspasi è stata verificata la sua inducibilità. A questo scopo campioni di branchie e di gonadi di *Callista chione* sono stati messi in coltura in presenza di staurosporina, un noto induttore della morte cellulare. L'indagine ha confermato la presenza delle due isoforme a 32 e 40 kDa nelle gonadi ma non ha rilevato un aumento significativo della loro intensità, o la comparsa di una banda a 17 kDa, corrispondente al subframmento attivo. Nelle branchie, dopo il trattamento si è evidenziata la comparsa della sola banda a 32 kDa, che invece non è mai presente nei controlli effettuati con branchie non sottoposte alla staurosporina (Tav. 12). La comparsa di questa banda conferma che l'anticorpo usato effettivamente riconosce una caspasi 3-like, ovvero una proteina del peso di 32 kDa, inducibile con un proapoptotico e, quindi, coinvolta nell'apoptosi.

I dati ottenuti dalle indagini di western blot sono stati verificati su sezioni di branchie, intestino ed epatopancreas di *Callista chione* e su sezioni di intestino ed epatopancreas di *Helix pomatia*.

L'indagine ha confermato che nelle sezioni di *Callista* l'enzima è presente nelle gonadi, in alcune cellule frontali delle branchie (Tav 13, Fig F), è scarsamente presente nel citoplasma delle cellule dell'epitelio intestinale, ed è assente nell'epatopancreas (Tav. 13, fig B). In *Helix pomatia* l'enzima risulta presente nell'intestino (Tav. 13, fig D), ma è assente nell'epatopancreas.

Immunolocalizzazione della caspasi 3 nelle gonadi dei bivalvi *Callista chione* e *Adamussium colbecki*

Nel testicolo di *Callista* l'anticorpo riconosce la presenza di caspasi 3 solo in alcune cellule poste a livello delle lamine germinative marginali (Tav. 14, fig. A-B). La positività è localizzata negli spermatogoni più grossi e negli spermatociti ed è assente negli spermatozoi (Tav. 14, fig. C), e nei controlli negativi (Tav. 14, fig. D).

Nell'ovaio di *Callista* la caspasi 3-like è localizzata nel citoplasma di tutti gli ovociti sia in accrescimento sia in regressione, mentre lo stroma connettivale risulta negativo (Tav. 15, fig. A), come i nuclei degli ovociti (Tav. 15 fig. B-C), e i controlli (Tav. 15, fig. D), che sono stati preparati omettendo l'anticorpo primario.

Nell'ovaio del bivalve antartico *Adamussium colbecki* la caspasi 3-like è specificamente presente nel citoplasma di tutti gli ovociti (Tav. 16, fig. A). L'enzima non è presente nel nucleo e nel nucleolo che risultano completamente negativi (Tav. 16, fig. B-C). Anche i controlli sono negativi.

Nel testicolo di *Adamussium* non si nota una marcatura significativa nelle cellule germinali (dato non mostrato).

Immunolocalizzazione della caspasi 3 nell'ovaiotestis dei gasteropodi *Helix pomatia* e *Neobuccinum eatoni*

In tutti i periodi dell'anno la caspasi 3-like è presente, nella gonade di *Helix pomatia*, in alcuni spermatogoni, spermatociti (Tav. 17, Fig. A-B) e negli spermatozoi (Tav. 17, fig. C). L'enzima è anche presente nel citoplasma di alcuni ovociti nelle prime fasi di accrescimento, in cui si localizza in prossimità del nucleo dove la marcatura forma una piccola sfera (Tav. 17, fig. E). Con il procedere dell'accrescimento la caspasi 3-like si distribuisce in una zona più ampia del citoplasma, sempre però in prossimità del nucleo (Tav. 17, fig. G). In una fase ancora successiva, gli ovociti risultano invece negativi. (Tav. 17, fig. H). Nei controlli negativi tutte le cellule risultano sempre negative.

L'indagine eseguita sull'ovaiotestis di *Neobuccinum eatoni* dimostra che la caspasi 3-like è presente nel citoplasma di tutti gli spermatogoni e spermatociti (Tav. 18, fig A, B,C), negli spermatidi (Tav. 18, fig. D, E), e nelle teste degli spermatozoi (Tav. 18, fig. F). Gli ovociti nelle prime fasi di accrescimento, hanno il citoplasma chiaramente positivo (Tav. 18, fig. G). Non è invece disponibile nessuna notizia sulle fasi successive. Nei controlli negativi nessuna cellula è mai marcata.

Immunolocalizzazione della caspasi 3 sull'ovaio di *Octopus vulgaris*

In questa specie la caspasi 3-like è presente in tutti gli ovociti (Tav. 19, fig. A), a livello del citoplasma mentre i nuclei sono sempre negativi (Tav. 19, fig. B). Una significativa marcatura è presente anche a livello di alcuni

nuclei delle cellule dell'epitelio follicolare (Tav. 19, fig. C). Nel controllo negativo non è presente alcuna positività (Tav. 19, fig. D).

4.5 Clonaggio e sequenziamento della caspasi 3

La presenza negli immunoblot della banda di circa 32 kDa ha posto le basi per avviare una serie di indagini per chiarire l'eventuale presenza di una forma caspasi 3-like anche in questi molluschi.

Un primo tentativo di sequenziamento è stato effettuato utilizzando due primers precedentemente usati per sequenziare la caspasi 3 nel rettile *Podarcis sicula*, che non hanno dato alcun risultato significativo. In un secondo tentativo sono state allineate le sequenze della caspasi 3 di uomo, pollo e topo e sono stati costruiti quattro nuovi primers, due forwards, F₁ e F₂ e due reverse, R₁ e R₂, che si appaiano ipoteticamente alle regioni maggiormente conservate del gene per l'enzima. Considerando la variabilità del codice genetico i primers sono stati costruiti in modo da presentare alcune degenerazioni.

L'RNA totale estratto dai vari organi di *Callista chione* e *Helix pomatia* (Tav. 20, fig. A-B) è stato utilizzato per esperimenti di RT-PCR. La coppia di primers F₂- R₁ (Tav. 20, fig. C), ha fornito due frammenti di cDNA di circa 500 bp (Tav. 20, fig. D-E), che sono stati eluiti e clonati in un plasmide pGEM cloning vector (Promega).

Le sequenze ottenute inserite in banca dati utilizzando i programmi BLASTA e FASTA, e non hanno fornito allineamenti significativi.

Nel corso del 2007 è stato pubblicato un frammento di una sequenza di caspasi 3 ottenuta da *Mytilus galloprovincialis* (**EMBLCDS:ABM66071**), che è stato usato per scrivere una coppia di primers forward e reverse (F-Myt e R-Myt). Le PCR effettuate con questi primers hanno dato un trascritto che immesso in banca dati non ha dato allineamenti significativi.

A questo punto è stato effettuato un allineamento multiplo usando le sequenze di caspasi 3 già note nei pesci (*Dicentrarchus labrax* e *Oryzias latipes*), poriferi (*Geodia cydonium*) e cnidari (*Hydra vulgaris* e *Aiptasia pallida*). Allineando prima le sequenze aminoacidiche (fig A) e poi le sequenze nucleotidiche (fig B), sono state evidenziate le zone con maggiore omologia e su queste è stata scritta una nuova coppia di primers forwards (Casp3vcn1 e Casp3geo1), che sono stati usati con i reverse R1, R2, Pk72, un primer reverse che si lega all'estremità 3' del prodotto di PCR, e R-Myt.

Solo la coppia di primers Casp3geo1- R-Myt (Tavola 21, fig A-B) ha fornito un trascritto di 731 coppie di basi (Tavola 21, fig C) che tradotto ha fornito un frammento proteico di 125 amminoacidi contenente il dominio QACLG caratteristico delle caspasi (Tav. 21, fig D). Questo frammento immesso in banca dati non ha dato allineamenti significativi con caspasi già note ma ha mostrato una bassa omologia con una proteina di funzione ignota in un antozoo.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
Oryzias latipes -----MASNRPGEDSTD
Dicentrarchius_labrax -----MSLNGPAGEDSTD
Aiptasia_pallida TREERAQTLLEDMLPRKGPKAFNAFCDALIDISPHLERLLNPSSQPTQGAP
Hydra_vulgaris -----MIQTNESLSSTQ
Geodia cydonium TDGEEAADELMKALRRRDSSVLDILVECLAEQQEANADLIKKIRSFFPEKP
:

Oryzias latipes ARKDNGELAAGASPAPDRMDVDGKPPSSHSFR-----
Dicentrarchius_labrax ARRGDQGESEASF SASGPMVDVAKPNSRSFR-----
Aiptasia_pallida TSESDVRVTRAAVHPRSVESTFSDQTAEKTPIASTDGASENSGEDNPDGG
Hydra_vulgaris SKPENII IKQETVLRNDEDEG IQF SHIRYFPNEPKIDLLKVDKFNDS--
Geodia cydonium RPPPPPTIDSTPVTRYDDWPAPIAPTATSHPPIPPPPEEGTDAGRKD--
:

Oryzias latipes -----YSLNFPTIGLCII INNKNFDRGTGMNQ-
Dicentrarchius_labrax -----YSLNYPMSGQCI I INNKNFDRRTGMNQ-
Aiptasia_pallida LSIFGSGSTRTRTSEP IDTRSMYKMDKTPRGVAVI INNKSF LPASGMHRY
Hydra_vulgaris -----NFYNTNTFPRGTLTI INVKNFMKSSNKHEY
Geodia cydonium -----AYKMSSRPRGMALI INNRNFTCG----MK
* . . . * *** :.*

Oryzias latipes -RNGTDIDAASAMKVF SKLGYRVKIYNDQTVKQIKQLLTDVSRMDHSDSA
Dicentrarchius_labrax -RNGTDVDAGNAMKVF TKLGYKTKIYNDQTV EQMKQVLI SVSKEDHSCNA
Aiptasia_pallida PRNGTDVDRDALDKV FQKLGFN TLVYNDQSVYEIQKIFKSLAARDYSKEN
Hydra_vulgaris PRLGTDVDAESL CDFLKLGFKIDRLN NPKSTDVNLN ILKQAANEDYSSMS
Geodia cydonium ERVGTDKDAENLYGLFNWLG MATIRKDNLTGKAMTREFEDLARRDHSAID
* *** * :* ** :: . : . : . : *:*

Oryzias latipes SFVCILLSHGDEGVFFGTD-GSIELKTLTSLFRGDHCKSLV GPKPLFFIQ
Dicentrarchius_labrax SFICVLLSHGDEGVFFGTD-GSVELKYL TSLFRGNHCISLV GPKPLFFIQ
Aiptasia_pallida ALIVSILTHGEEGILYATD-GTIQIRDMMRWFKG---TNLV GPKKIFIFIQ
Hydra_vulgaris CCVVALLSHGEEGKI ICTN-ESLNIREITNLFCT---KALAGPKPLFLFIQ
Geodia cydonium CVVVAILTHGISGRLYSTDGDLIPVEDLTKYFDGVNRP SLI GPKKVFVVQ
. : :*:** .* : * : : : * * *****:*.

Oryzias latipes ACRGTELDDGIEADSKED-----
Dicentrarchius_labrax ACRGTDLDPGIETDSGEDG-----
Aiptasia_pallida ACOGHEYM DGV DATDAP-----
Hydra_vulgaris ACRGTEYMESLDTVDGLGPGL-----
Geodia cydonium ACRG GKFYDYGVESESTDGEGESVNKETANEMMEKQFDKVV EKALDADET
**:* . . : : .

Oryzias latipes -----TTKIPVEADFLYAFSTAPGYYSWRNTMTGSWF INSLCEMLS KYGK
Dicentrarchius_labrax -----TTKIPVEADFLYAFSTAPGYYSWRNTT TGSWF IQSLCDLISKY GK
Aiptasia_pallida -PADKR VQIPVEADFLYAYSTVPGYYSWRNSVNGSWF IQSIAEVFDKYAK
Hydra_vulgaris SNEPNVLDVTVESDFLYAYSTVLGYYSWSSQKLGSWF INAAVSVFRDYAH
Geodia cydonium GGGYSREALPTEADFLAYATVPGYVSWRNSEYGSWF IKAFVDTMRDLAS
:. . :*:** :*:*. ** ** . *****: . : . .
```

Fig A: esempi di allineamento proteico condotto con il programma clustal W in cui sono evidenziate le zone con maggiore omologia.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
Oryzias latipes          GAAACGGTACAGACATCGATGCGACCTCTGCAATGAAAGTGTTCACAAAGTTGGGCTATA 271
Dicentrarchius_labrax  GAAATGGTACAGATGTGGATGTGGCAACGCGATGAAAGTGTTCACAAAGTTGGGTTATA 271
Aiptasia_pallida       GAAATGGAAGTGTGTTGACCGTGTGCCCTTGACAAAAGTTTCACAAAATTAGGTTTTTA 655
Hydra_vulgaris         GATTAGGTACAGATGTTGATGCAGAGAGTTTATGTGATCTTTTTCTAAAATTAGGTTTTA 373
Geodia_cydonium        GAGTGGGGACTGACAAGGATGCAGAGAACCTGTACGGCCTCTTCAACTGGCTCGGAATGG 594
**  **  **  **  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Oryzias latipes          GAGTGAAGATTTACAATGACCAGACAGTTAAACAGATTAACAGCTTTTGACTGATGTAT 331
Dicentrarchius_labrax  AGACGAAGATTTACAATGACCAGACAGTCGAGCAGATGAAACAGGTTTTAATTTCTGTGT 331
Aiptasia_pallida       ATACATTGGTTTACAATGATCAAAGTGTCTATGAAATCCAAAAGATTTTCAAGAGTCTTG 715
Hydra_vulgaris         AAATAGATAGGTTAAATAATCCCAAGTCAACTGATGTATTAACATACTGAAGCAGGCAG 433
Geodia_cydonium        CCACCATCCGTAAGGACAACCTGACTGGGAAGGCAATGACAAGGGAGTTTGAGGATTGG 654
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Oryzias latipes          CAAGGATGGACCACAGTGACTCCGCCTCTTTCGTCTGCATCCTTTTGAGTCATGGCGACG 391
Dicentrarchius_labrax  CAAAGGAAGATCACAGCTGCAACGCCTCATTATCTGTGTTCTGTTGAGTCATGGAGATG 391
Aiptasia_pallida       CTGCTAGAGATTACAGTAAAGAAAATGCATTAATAGTTAGTATATTGACCCATGGTGAGG 775
Hydra_vulgaris         CAAATGAAGATTATCTTCAATGAGTTGTTGTGTGGTGGCATTACTATCACATGGAGAAG 493
Geodia_cydonium        CTCGACGTGACCACTCAGCGTACGACTGTGTGGTGGTAGCTATCCTGACGCATGGTATCA 714
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Oryzias latipes          AGGGCGTTTTCTTCGGCACGGATGG---TTCGATAGAAGTCAAACTCTGACGTCCCTGT 448
Dicentrarchius_labrax  AGGGTGTGTTCTTTGGTACGGACGG---CTCAGTAGAGCTTAAGTACCTAACGTCACCTT 448
Aiptasia_pallida       AAGGGATTTTGTATGCTACTGATGG---CACCATTCAAATTAGAGATATGATGA-GGTGG 831
Hydra_vulgaris         AGGGTAAAATTATTTGCACAAACGA---ATCTTTAAATATAAGGGAAATAACAAATCTGT 550
Geodia_cydonium        GTGGTCGACTGTACAGCACAGACGGAGACCTGATTCCTGTGGAGGACCTCACAAAATACT 774
**  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Oryzias latipes          TCCGAGGGGATCACTGCAATCACTGGTGGGAAAGCCCAAAGTGTTCATCCAGGCTT 508
Dicentrarchius_labrax  TTCGTGGCAATCACTGTATATCACTGGTGGGAAAGCCCAAAGTGTTCATCCAGGCTT 508
Aiptasia_pallida       TTCAAAGGCACCAAT-----CTTGTGGTAAACCAAAGATCTTTATCTTCAAGCAT 883
Hydra_vulgaris         TCTGCACTAAAGCTT-----TAGCAGGAAAACCAAATTTATTTTAAATCAAGCAT 601
Geodia_cydonium        TTGATGGTGTGAACCGTCCGTCCCTCATTGGGAAAGCCCAAAGGTGTTCTGTTGTTTCAGGCTT 834
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Oryzias latipes          GCAGAGGCACCGAAC-----TGGA-----TGATGGCATTGAAG 541
Dicentrarchius_labrax  GCAGAGGCACCTGATT-----TGGA-----TCCAGGCATTGAAA 541
Aiptasia_pallida       GCCAAGGTCATGAATACA-----TGGA-----TGGTGTGACGCAA 919
Hydra_vulgaris         GTCGAGGAACAGAATACA-----TGGAATCATTAGACACGGTTGATGGTCTCGGAC 652
Geodia_cydonium        GTAGAGGGGGCAAGTTTGACTATGGGGTGGAGAGTGAGTCAACAGATGGAGAAGGAGAAA 894
*  ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Oryzias latipes          CAGAT---TCCAAAGAAG---A---CACCACCAAGATCC--CAGTGGAAAGCTGACT---- 586
Dicentrarchius_labrax  CAGAC---AGTGGAGAAG---ATGGCACTACTAAGATCC--CTGTGGAGGCTGACT---- 589
Aiptasia_pallida       CTGATGCACCTCCAGCTG---ACAAGCGTGTCCAGATCC--CTGTAGAAGCAGACT---- 970
Hydra_vulgaris         CTGGA--TTGTCAAATGA---ACCAAATGTCCTAGATGTAAGTGTGAAAGCGATT---- 703
Geodia_cydonium        GTGTGAATAAGGAAACTGCCAATGAAATGATGGAGAAACAGTTTGACAAGGTTGTTGAAA 954
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
```

Fig B: esempio di allineamento nucleotidico condotto con il programma clustal W in cui sono evidenziate le zone con maggiore omologia

CAPITOLO V
DISCUSSIONE

5.1 DISCUSSIONE

Analisi morfologica

Lo studio istologico ha evidenziato che le gonadi maschili e femminili delle specie in esame differiscono per l'organizzazione morfologica.

Testicolo

Nei bivalvi *Callista chione* e *Adamussium colbecki*, specie gonocoriche, i dati dimostrano che i testicoli sono costituiti da una serie di grossi lobuli ciascuno contenente i tubuli seminiferi. Nelle regioni marginali di ciascun lobulo sono localizzate le cellule germinali in stadi precoci del differenziamento, spermatogoni e spermatociti. In *Callista*, inoltre, in tutti i periodi dell'anno sono presenti numerosi spermatidi e fasci di spermatozoi. In letteratura è descritto che tale specie si riproduce tra febbraio e settembre (Forster, 1981). La presenza di spermatozoi indicherebbe quindi, che in questa specie i testicoli accumulano cellule germinali differenziate pronte per essere utilizzate al momento della riproduzione.

Differentemente, nei testicoli della specie antartica *Adamussium*, prelevati nel periodo dicembre-gennaio, non sono stati evidenziati cellule germinali allo stadio di spermatidi e spermatozoi. Questo dato indica, quindi, che in questi animali la riproduzione non è continua né si ha accumulo di cellule germinali differenziate nelle gonadi. Tale condizione del testicolo può essere interpretata come una condizione di stasi post-riproduttiva, in accordo con Berkman (Berkman et al., 1991) che propone una riproduzione all'inizio della primavera australe. In alternativa, la gonade potrebbe essere in una condizione pre-riproduttiva in accordo con quanto riportato da Cattaneo-Vietti (Cattaneo-Vietti et al., 1997) che ha dimostrato che la maturazione delle gonadi avviene in tarda estate.

La stessa organizzazione con tubuli centrali e aree germinative marginali si riscontra negli ovotestis delle due specie di gasteropodi. Sia in *Helix* che in *Neobuccinum* questa organizzazione è particolarmente evidente durante il periodo non riproduttivo, quando la componente femminile è ridotta. La presenza di spermatozoi indica che anche in queste specie si verifica uno stoccaggio degli spermatozoi in attesa della fase riproduttiva.

L'ovaio

Le indagini morfologiche dimostrano che nelle specie esaminate l'organizzazione dell'ovaio è alquanto diversa: è compatto in *Callista*, con cisti cave in *Adamussium* o organizzato in cordoni come in *Octopus*. Il dato che nella gonade sono presenti ovociti di uguali dimensioni suggerisce che in questi molluschi le cellule germinali costituiscono pool che si differenziano sincronamente.

Un aspetto interessante che emerge dalle indagini morfologiche riguarda le differenze esistenti nell'organizzazione del follicolo e, in particolare, nei rapporti tra ovocita e cellule follicolari. Nelle due specie di bivalvi studiate, l'ovocita è nudo, allungato e le cellule follicolari sono disposte in corrispondenza del sito di attacco allo stroma. Nei due gasteropodi le cellule follicolari costituiscono un epitelio monostratificato e continuo che circonda l'ovocita. In *Octopus* l'epitelio è complesso e pluristratificato.

Queste differenze suggeriscono che l'epitelio nelle diverse specie svolga funzioni diverse. Nei due gasteropodi e in *Octopus*, l'organizzazione dell'epitelio è paragonabile a quella degli epitelii della maggior parte degli invertebrati e vertebrati. Questo suggerisce che l'epitelio protegge meccanicamente l'ovocita e garantisce il mantenimento di un microambiente adatto alla sua sopravvivenza. Questo implica, per esempio, che a) l'epitelio traduce le informazioni che provengono dal resto del corpo

grazie alla presenza di recettori per le gonadotropine, gli steroidi o i vari fattori di crescita (Kanda et al 2006); b) l'epitelio produce esso stesso fattori che esplicano la loro azione localmente e/o per via sistemica influenzando così una grande varietà di funzioni ovariche e non (Campbell e Baird, 2001; Glistner et al., 2001; Sica et al., 2001).

Per quanto riguarda le cellule follicolari delle due specie di bivalvi esaminate, sulla base di quanto riportato da Grassè (1970) e Woods (1931) si può ipotizzare un ruolo nutrice e che i loro materiali possano essere trasferiti all'ovocita e contribuire al suo accrescimento.

L'apporto di sostanze nutritive all'ovocita da parte di cellule somatiche (follicolari) è stato già descritto in alcuni vertebrati quali i condroitti (Andreuccetti, 1999) e rettili lacertiliani (Taddei, 1972; Motta et al., 1996). In queste specie è stato dimostrato che la cellula follicolare elabora materiali (organelli e molecole informazionali) e li invia all'ovocita tramite un ponte intercellulare contribuendo così alla suo accrescimento. Dati recenti dimostrano che il trasferimento è caratterizzato da due momenti diversi. Nel primo la follicolare trasferisce materiali di sintesi, nel secondo i suoi componenti fondamentali, citoplasma e nucleo, dopo che questi hanno subito un processo di degenerazione programmata, di apoptosi, che coinvolge le proteasi caspasi e la nucleasi DNasi (De Caro et al., 1998; Motta et al., 2001).

Al momento non abbiamo indicazioni morfologiche riguardo ai meccanismi di regressione delle cellule follicolari nei due bivalvi esaminati. I dati raccolti, alquanto preliminari, indicano che nelle cellule follicolari non sarebbe presente caspasi 3 ne positività alla TUNEL (dati non mostrati) e suggeriscono che la regressione delle follicolari non è accompagnata da processi di apoptosi.

B: Presenza e localizzazione della caspasi 3-like nei diversi tessuti.

Al momento non sono disponibili in bibliografia dati sulla presenza e localizzazione delle caspasi nei molluschi né informazioni circa i meccanismi coinvolti nell'apoptosi nelle specie appartenenti a questo phylum. Di conseguenza, non è possibile reperire anticorpi o sonde specie specifici per affrontare studi citologici e molecolari su tali proteasi.

Per iniziare un approccio immunocitochimico e molecolare su questo enzima è stato utilizzato un anticorpo anti caspasi 3 di mammifero attualmente in commercio. I primi tests sono stati condotti per verificare la cross reattività di questo anticorpo sui tessuti di mollusco. Dati bibliografici indicavano che l'anticorpo utilizzato, pur essendo di mammifero, riconosce specificamente una caspasi 3 nel tessuto nervoso di *Helix* (Bravarenko et al., 2006) e in vari tessuti dei due vertebrati *Podarcis* e *Danio* (Tammaro et al., 2007 dati non pubblicati).

Le analisi di western blot condotte evidenziano che in *Callista*, *Helix*, *Tapes* e *Octopus* l'anticorpo riconosce una banda del peso previsto di 32 kDa. In *Callista*, inoltre, i blot dimostrano la presenza di una isoforma di circa 40 kDa. Al momento non è possibile stabilire se la proteina identificata corrisponde ad una caspasi 3 o una forma 3-like. In attesa che tale punto sia chiarito mediante sequenziamento dell'enzima, la banda identificata sarà denominata caspasi 3-like.

La caspasi 3 è una proteina molto conservata durante l'evoluzione essendo presente in tutte le specie. Tale proteasi, però, presenta una gran varietà di isoforme, sia negli invertebrati che nei vertebrati; che differiscono per il numero e il tipo di amminoacidi presenti (Tabella sotto). In *Hydra vulgaris* (Cnidari, Hydrozoi), per esempio, esistono 2 isoforme, di 3800 (caspase 3a) e di 3100 nucleotidi (caspase 3b), che mostrano un'omologia con le altre caspasi del 28 e 41% rispettivamente (Cikala et al. 1999) e che,

se allineate tra loro, mostrano un'identità del 29%. Analogamente, anche nella spugna *Geodia cydonium* sono presenti 2 isoforme (Wiens et al., 2003). La più lunga, di 426 aa (Geocycas 3a) contiene il tipico dominio CARD e ha un peso molecolare di circa 48 kDa; la sua sequenza aminoacidica mostra una similarità del 65% e una identità del 39% con le caspasi 6 di drosophila e 9 di vertebrati. La subunità corta (Geocycas 3s) ha un peso molecolare di 35,3 kDa, è costituita da 316 aa e manca del dominio CARD. Questa isoforma mostra una buona similarità con la caspasi 3 umana e per questo, è stata considerata una caspasi 3-like (Wiens et al.2003).

specie		numero di aa	P.M. (kDa)
<i>Homo sapiens</i>	CPP 32	277	32
<i>Danio rerio</i>	casp 3a	282	32
	casp 3b	285	32
<i>Geodia cydonium</i>	Geocycas 3a	426	48
	Geocycas 3b	316	35
<i>Aiptasia pallida</i>	Acasp	415	46

Tabella: esempi di differenti caspasi 3

E' stato ipotizzato che le isoforme siano legate probabilmente ad eventi di splicing alternativi che nel corso dell'evoluzione si sarebbero accompagnati a duplicazione genica. E' infatti ormai evidente che le caspasi nei Phyla più evoluti sono codificate da un numero più elevato di geni (Wiens et al., 2003; Blencowe, 2006).

Durante l'evoluzione anche la funzione delle caspasi avrebbe subito variazioni. È stato dimostrato infatti che nei bassi metazoi sarebbero presenti forme antiche di caspasi, dei prototipi che mostrano contemporaneamente funzioni sia di iniziatori che di esecutori (Dunn et al., 2006). In seguito queste funzioni sarebbero state assunte da singole isoforme che si sarebbero ulteriormente specializzate nel controllo e/o esecuzione di specifici eventi. In questo modo la ridondanza di forme di enzima avrebbe portato ad un più efficiente sistema di regolazione della

cascata caspasi e, in particolare, del processo apoptotico (Wiens et al., 2003).

I dati ottenuti mediante analisi di western blot indicano che la caspasi 3-like è presente in diversi tessuti anche se non viene sintetizzata in tutti i tipi cellulari alla stessa maniera. Questo dato è confermato dalle indagini di immunocitochimica che rivelano che le gonadi sono gli organi in cui la proteina è maggiormente presente seguita dall'intestino e, in misura minore dalle branchie; mentre nell'epatopancreas non si ha sintesi della proteina. Questi dati concordano con quanto riportato in letteratura sulla localizzazione dell'enzima negli organi di mammiferi, pesci e invertebrati (Godlewski e Hallay, 2007, Rojo e Gonzales, 1998).

In particolare, nelle gonadi, la caspasi 3-like è presente nell'ovaio, nel testicolo e nell'ovotestis di tutte le specie di mollusco esaminate, anche se la sua localizzazione differisce. Per quanto riguarda la linea germinale femminile le osservazioni condotte dimostrano che l'enzima è presente nel citoplasma di tutti gli ovociti in fase iniziale di accrescimento indipendentemente dalla presenza di fenomeni di atresia follicolare: L'enzima, infatti, è presente sia negli ovociti di specie in cui i follicoli vanno in atresia (*Callista* ed *Helix*) che in quelli in cui l'atresia non è stata finora osservata (*Octopus*). Questo dato suggerisce che la caspasi 3-like negli ovociti dei molluschi possa essere coinvolta innanzitutto nel rimaneggiamento apoptotico; in particolare, in *Callista* ed *Helix* l'enzima sarebbe prodotto e accumulato, pronto per essere utilizzata durante l'atresia. Ma non può essere escluso che la caspasi 3-like possa essere utilizzata anche in attività connesse con l'accrescimento e il differenziamento ovocitario. In effetti è stato dimostrato che tale proteasi è anche implicata nella proliferazione cellulare e nel differenziamento (Schwerk et al., 2003). Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che in *Ocotpus* è presente una caspasi in assenza di atresia. Non è possibile al momento escludere che in tale specie

l'atresia sia comunque presente ma che si verifichi in una fase più tardiva dell'accrescimento.

I dati dimostrano che la caspasi 3-like è espressa anche nella linea germinale maschile. Nelle specie esaminate l'enzima è presente durante le fasi iniziali della gametogenesi e, in particolare, negli spermatogoni e spermatociti; in aggiunta, nei Gasteropodi l'enzima è presente anche negli spermatozoi. La presenza dell'enzima in queste cellule conferma il ruolo cruciale che la caspasi 3 svolge nella produzione dei gameti maschili e può essere associata alla presenza di significativi fenomeni di selezione apoptotica. Questo dato ben si accorda con la letteratura disponibile per i mammiferi (Print et al., 2000). Nella normale spermatogenesi, infatti, dal 25 al 75% delle cellule germinali che iniziano il differenziamento sono destinate a degenerare (Lue et al., 1999).

La diversa espressione della caspasi 3-like negli spermatozoi di *Callista* ed *Helix* è un dato interessante anche perché pone il problema di quale sia realmente il ruolo dell'enzima nella fase di differenziamento degli spermatidi in spermatozoi. Si potrebbero al momento formulare due ipotesi a) che l'enzima contribuisca al riassorbimento dei materiali citoplasmatici residui così come già riportato, per esempio, in drosophila (Arama et al., 2003); b) che l'enzima sia coinvolto in funzioni legate alla fecondazione e, in particolare al flip della fosfatidilserina (Kurz et al, 2005).

c): Clonaggio e sequenziamento della caspasi 3

L'approccio di biologia molecolare ha permesso di ottenere una serie di trascritti in media di circa 700 bp di cui uno, in particolare, presenta la sequenza QACLG, corrispondente alla sequenza QACxG (Cohen, 1997) caratteristica della famiglia delle caspasi. L'aspetto interessante di questo dato, anche se preliminare, è che il trascritto ottenuto rappresenta la

seconda sequenza mai individuata in un mollusco che contenga la sequenza QACxG considerata in bibliografia l'impronta digitale delle caspasi.

I trascritti immessi in banca dati non hanno mostrato significativi allineamenti ad eccezione fatta per il trascritto contenente la sequenza QACLK che ha mostrato una bassa omologia con un trascritto di ignota natura di in un basso vertebrato (antozoo). Il fatto che tale trascritto abbia una sequenza nucleotidica completamente diversa da quella di tutte le altre caspasi note può essere interpretata alla luce del fatto che le caspasi mostrano una grande variabilità. È stato dimostrato che le caspasi nelle diverse specie mostrano percentuali di omologie che sono spesso indipendenti dalla distanza filogenetica: infatti, può succedere che due isoforme della stessa specie presentino una omologia minore del 30% (*Geodia*) mentre isoforme di specie distanti presentino un elevato grado di omologia, fino all'80% (*Danio* e *Homo*).

5.2 CONCLUSIONI

In sintesi il lavoro condotto ha consentito di dimostrare che:

1. in tutte le specie considerate è presente una caspasi 3-like del peso di 32 kDa e che nel solo bivalve *Callista chione* è probabilmente presente anche una isoforma di 40 kDa
2. che l'enzima è diversamente espresso nei diversi tessuti e, in particolare, che è presente nella linea germinale femminile e maschile.
3. che l'enzima è sempre presente negli stadi precoci della gametogenesi femminile e maschile ma non necessariamente negli stadi tardivi. Questo permette di ipotizzare che l'enzima svolga non solo il classico ruolo

nell'apoptosi, ma anche ruoli alternativi durante il differenziamento delle cellule germinali e durante la fecondazione.

4. che nelle specie esaminate è stato individuato un frammento di circa 731 paia di basi che per la presenza del tipico pentapeptide QACLG può essere per il momento interpretato come un frammento di una isoforma di caspasi.

Bibliografia

- Alnemri E.S., Livingstone D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W. and Yuan J. (1996) “Human ICE/CED3 protease nomenclature” *Cell* 87:171-180.
- Ameisen, (2002) “On the origin, evolution and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years” *Cell. Death Differ.* 9:367-393.
- Andreuccetti P, Iodice M, Prisco M, Gualtieri R. (1999) “Intercellular bridges between granulosa cells and the oocyte in the elasmobranch *Raya asterias*”. *Anat Rec.* 255: 180-7.
- Andreu-Vieyra C.V., Buret A.G., Habibi H.R. (2005) “Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*)” *Endocrinology.* 146:1588-96.
- Arama E., Agapite J., Steller H. (2003) “Caspase activity and a specific cytochrome C are required for Sperm differentiation in *Drosophila*” *Dev. Cell.* Vol. 4, 687-697.
- Arnoult D., Akarid K., Grodet A., Petit P.X., Estaquier J., Ameisen J.C. (2002) “On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization” *Cell Death Differ.* 9:65-81.
- Bates W-R, (2004). Cellular features of an apoptotic form of programmed cell death during the development of the ascidian, *Boltenia villosa*. *Zoological Science* 21: 553- 563.
- Berkman A., Wallert R. & Alexandes R., P. (1991). “Unprotected larval development in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae).” *Antarctic Science*, 3, 151-157.
- Blencowe, B.J. (2006). Alternative splicing: New insights from global analyses. *Cell* 126 (1): 37-47.

- Boldin M. P., Varfolomeev E. E., Pancer Z., Mett I. L., Camonis J. H. and Wallach D. (1995) "A novel protein that interact with the death domain of Fas/Apo 1 contains a sequence motif related to the death domain." *J. Biol. Chem.* 271:7795-7798.
- Bratton S. B., MacFarlane M, Cain K, Cohen G. M., (2000). "Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis." *Exp Cell Res.*; 256 (1): 27-33.
- Bravarenko N. I., Onufriev M.V., Stepanichev Yu, Ierusaimsky V. N., Balaban P. M., Gulyaeva N. V. (2006) "Caspase-like activity is essential for long-term synaptic plasticity in the terrestrial snail *Helix*" *Europ. J. of Neuro.* 23: 129-140.
- Campbell B. K., Bairdt D. T. (2001) "Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep". *J. Endocrinol.*, 169: 333-45.
- Cattaneo-Vietti R., Chiantore M. C. & Albertarelli G. (1997). "The population structure and ecology of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* at Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica)." In: J.D. Ros & A. Guerra (Eds). *Ecology of Marine Molluscs. Scientia Marina.* 61 (2): 15-24.
- Caulin C., Salvenes G.S. and Oshima R.G. (1997) "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis." *J. Cell. Biol.* 138:1379-1394.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Lane B.R., Dixit V.M. (1997) "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." *Science* 275:1122-1126.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewwari M. and Dixit W.M. (1995) "FADD, a novel death domain-containing protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* 81:505-512.

- Cikala M., Wilm B., Hobmayer E., Böttger A., David C.N. (1999) “Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra.” *Current Biology* 9: 959-962.
- Clark J. A., Lane R.H., Maclennan N.K., Holubec H., Dvorakova K., Halpern M.D., Williams C.S., Payne C.M., Dvorak B. (2005) “Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:G755-62.
- Clem R.J., Cheng E.H., Karp C. L., Kirsch D. G., Ueno K., Takahashi A., Kastan M. B., Griffin D. E., Earnshaw W. C., Veluona M. A., Hardwick J. M. (1998) “Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction” *Proc. Natl: Acad. Sci. USA* 95:554-559.
- Cohen J.M. (1997) “Caspases: the executioners of apoptosis” *Biochem. J.* 326:1-16.
- Cory S. (1995) “Regulation of lymphocytes survival by the Bcl-2 gene family” *Annu. Rev. Immunol.* 13:513-543.
- De Caro M. Indolfi P., Iodice C., Spagnuolo S., Tammaro S., Motta C. M., (1998) “How the ovarian follicle of *Podarcis* recycles the DNA of its nurse, regressing follicle cells”. *Mol. Reprod. Dev.*, 51: 421-429.
- Dunn S. R, Thomason J. C., Le Tissier MD, Bythell JC. (2004). “Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration”. *Cell Death Differ.*; 11(11):1213-22.
- Dunn S.R., Phillips W.S., Spatafora J.W., Green D.R., Weis V.M. (2006) “Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution” *J. Mol. Evol.* 63:95-107.
- Durrieu F., Samejima K., Fortune J. M., Kandels-Lewis S., Osheroff N., Earnshaw W. C. (2000). “DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD

nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution.” *Curr Biol.*; 10 (15): 923-6.

- Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. (1999) “Mammalian caspase: structure, activation, substrates and functions during apoptosis.” *Annu. Rev. Biochem.* 68: 383-424.
- Ellis H.M. and Horvits H.R. (1986) “Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*” *Cell* 44:817-829.
- Ellis R.E., Yuan J.Y. and Horvitz H.R. (1991) “Mechanisms and functions of cell death” *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7:663-698.
- Ferendes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Alnemri E.S. (1996) “In vitro activation of Cpp32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7464-7469.
- Ferrando S., Ferrando T., Girosi L., Mauceri A., Fasulo S., Tagliafierro G. (2005) “Apoptosis, cell proliferation and serotonin immunoreactivity in gut of *Liza aurata* from natural heavy metal polluted environments: preliminary observations” *Eur J. Histochem.* 49: 331-340.
- Fesus L. (1993) “Biochemical event in naturally occurring forms of cell death” *Febs Lett.* 328:1-5.
- Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. (1999) “More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage” *Oncogene* 18:7719-7730.
- Forsyth C.M., Lemongello D., LaCount D.J., Friessen P.D., Fisher A.J. (2004) “Crystal structure of an invertebrate caspase” *J. Biol. Chem.* 279: 7001-7008.
- Forster G. R., (1981) “The age and growth of *Callista chione*.” *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 61, 881 - 883.

- Foyouzi-Youssefi R., Arnaudeau S., Borner C., Kelley W.L., Tschopp J., Lew D.P., Demaureux N. and Krause K. (2000) “Bcl-2 decreases the free calcium concentration within the endoplasmic reticulum” *Pnas* 97:5723-5728.
- Glister C., Tannetta D. S., Groome N. P., Knight P. G. (2001) “Interaction between follicle stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by non luteinized bovine granulosa cells”. *Biol. Reprod.*, 65: 1020-1028.
- Godlewski M.M., Hallay N., Bierła J.B., Zabielski R. (2007) “Molecular mechanism of programmed cell death in the gut epithelium of neonatal piglets”. *J Physiol Pharmacol.* 58 Suppl 3: 97-113.
- Goldberg Y, Nassif II, Pittas A, Tsai LL, Dynlacht BD, Rigas B, Shiff SJ. (1996). “The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins”. *Oncogene.* 12(4):893-901.
- Golstein P., Ojcius D.M., Young J.D-E (1991) “Cell death mechanisms and immune system” *Immunol. Rev.* 121: 29-65.
- Graber M.B., Moran L.B. (2002). “Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases”. *Bain Pathol*, 12(3):385-90.
- Grandgirand D., Studer E., Monney L., Belser T., Fellay I., Borner C., Michel M.R. (1998) “Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2” *EMBO J.* 17:1268-1278.
- Granville D.J., Carthy C.M., Hunt D.W. and McManus B.M. (1998) “Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease” *Lab. Invest.* 78:893-913.
- Grasse, P. P. (1970) *Traité de Zoologie.* Paris, Masson, 14.
- Green DR, Martin SJ. (1995). “The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy”. *Curr Opin Immunol.* 7(5):694-703.

- Grieb, T.M. (1976) A study of spermatogenesis in the spawning population of the squid, *Loligo opalescens* (Cephalopoda, Decapoda). M.A. Thesis, San Francisco State University (U.S.A.), 102 pages.
- Gulyaeva NV. (2003). “Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue”. *Biochemistry (Mosc)*; 68(11):1171-80.
- Hajmohamadreza I., Treherne J.M. (1997). “The role of apoptosis in neuridegenerative diseases”. *Prog. Drug. Res.*;48:55-98.
- Hengertner M.O., Ellis R.E., Horvitz R.H. (1992) “*Caenorabtidis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death” *Nature* 356:494-499.
- Herren B., Levkau B., Raines E.W., Ross R. (1998) “Cleavage of beta-catenin and resistant human ovarian cancer cell lines” *Cancer Res.* 57:4488-4492.
- Hockenbery D., Nuñez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990) “Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death” *Nature* 348: 334-338.
- Hsu H., Xiong J. and Goeddel D.V. (1995) “The TNF-receptor1-associated protein TRADD signals cell death and NK-Kb activation” *Cell* 81:495-504.
- Hsu H., Huang J., Shu H.B., Baichwal V., Goeddel D.V. (1996a) “TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the Tnf receptor-1 signaling complex” *Immunity* 4:387-396.
- Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V. (1996b) “TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways” *Cell* 84:299-308.
- Hsu C.A., Rishi A.K., Su-Li X., Gerald T.M., Dawson M.I., Schiffer C., Reichert U., Shroot B., Poirer G.C., Fontana J. A. (1997) “Retinoid induced apoptosis in leukaemia cells through a retinoic acid nuclear receptor-independent pathway” *Blood* 89:4470-4479.

- Hu S., Snipas S.J., Vincenz C., Salvesen G., Dixit V.M. (1998) “Caspase-14 Is a Novel Developmentally Regulated Protease” J. Biol. Chem. 273: 29648-29653.
- Hupperts B., Frank H.G. and Kaufmann P. (1999) “The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization” Anat. Embryol. 200:1-18.
- Hyoh Y, Ishizaka S, Horii T, Fujiwara A, Tegoshi T, Yamada M, Arizono N. (2002) “Activation of caspases in intestinal villus epithelial cells of normal and nematode infected rats” Gut. 50:71-7.
- Israels L.G., I.E.D. (1999) “Apoptosis” Stem cells 17: 306-313.
- Jacobson M.D., Weil M. and Raff M.C. (1997) “Programmed cell death in animal development” Cell 88:347-354.
- Janicke R.U., Ng P., Sprengart M.L., Porter A.G. (1998) “Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis” J. Biol. Chem. 273:15540-15545.
- Kamada S., Kusano H., Fujita H., Ohtsu M., Koya R.C., Kuzumaki N., Tsujimoto Y. (1998) “A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8532-8537.
- Kanda A., Takahashi T., Satake H., Minakata H. (2006) “Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*) “. Biochem. J. 395 (125–135)
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972) “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics” Br. J. Cancer 26:239-257.
- Kyprianou N, Isaacs JT. (1998) “Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration“. Endocrinology. Feb;122(2):552-62.

- Kishkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. (1995) "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signalling complex (DISC) with receptor" *Embo J.* 14:5579-558.
- Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Müller K. (2005). "Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction". *Reproduction.*; 130(5):615-26.
- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenaabeele (2002). "Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man". *Cell Death Differ.*; 9(4):358-361.
- Liu X., Kim C.N., Jemmerson R., Wang X. (1996) "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C" *Cell* 86: 147-157.
- Liu X., Zou H. Slaughter C. and Wang X. (1997) "DDF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis" *Cell* 89:175-184.
- Lue Q, Sun QY, Breitbart H and Chen DY (1999) Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Arch Androl* 43:55-66.
- Majno G, Joris I. (1995) "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death". *Am J Pathol.* 146(1):3-15.
- Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson E.P., Casciola-Rosen L.A. (1998) "The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling" *J. Cell. Biol.* 140:1485-1495.
- Martins L.M., Mesner P.W., Kottke T.J., Basi G.S., Sinha S., Tung J.S., Svingen P.A., Madden B.J., Takahashi A., McCormick D.J., Earnshaw W.C., Kauffman S.H. (1998) "Comparison of caspase activation and

subcellular localization in HL-60 and K562 cells undergoing etoposide-induced apoptosis” *Blood* 90:4283-4296.

- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. “Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction”. *Hum Reprod.*; 20(12):3459-68.
- Mashima T., Naito M., Noguchi K., Miller D.K., Nicholson D.W., Tsuruo T. (1997) “Actin cleavage by cpp-32/apopain during the development of apoptosis” *Oncogene* 14:1007-1012.
- McConkey D.J. e Orrenius S. (1997) “The role of calcium in the regulation of apoptosis” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:357-366.
- Meier P, Finch A., Evan G. (2000) “Apoptosis in development” *Nature* 407:796-801.
- Mire P., Venable S. (1999) “Programmed cell death during longitudinal fission in a sea Anemone” *Invert Biol.* 16: 404-405.
- Monaghan P., Robertson D., Amos T.A., Dyer M.J., Mason D.Y., Greaves M.F. (1992) “Ultrastructural localization of Bcl-2 protein” *J. Histochem. Cytochem.* 40:1819-1825.
- Motta C. M., Castriota Scanderbeg M., Filosa S., Andreuccetti P., (1995) - Role of the pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. *J. Exp. Zool.*, 273: 247-256.
- Motta C.M., Filosa S., Andreuccetti P. (1996) “Regression of epithelium in late previtellogenic follicles of *Podarcis sicula*: a case of apoptosis”. *J. Exp. Zool.* 276: 233-241
- Motta C.M., Tamaro S., Cicale A., Indolfi P., Iodice C., Spagnuolo M.S., Filosa S. (2001) “Storage in the yolk platelets of low MW DNA produced by the regressing follicle cells”. *Mol Reprod Dev.* 59: 422-30.

- Motta C. M., Simoniello P., Tammaro S., Filosa S. (2007) “Follicles cell differentiation in the wall of lizard *P. sicula*” Cell differentiation; Nova science publishers inc. Hauppauge N. Y. (In press).
- Nagata S. (1997) “Apoptosis by death factor” Cell 88:355-365.
- Nagata S. (2000) “Apoptotic DNA fragmentation” Exp. Cell. Res. 256:12-18.
- Nagata, Golstein (1995) “The Fas death factor” Science 267:1449-1456.
- Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C. K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.G., Labelle M., Lazebnik Y.A. (1995) “Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis” Nature 376:37-43
- Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. (2003) “Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link” Nature 4: 552-565.
- Peitsh M.C., Irmeler M., French L.E. and Tschopp J. (1994) “Genomic organization and expression of mouse Dnase I” Bioch. Biophys. Res. Com. 207:62-68.
- Pinton P., Ferrari D., Megalhaes P. (2000) “Reduced loading of intracellular calcium store and downregulation of capacitative calcium influx in Bcl-2 overexpressing cells” J. Cell. Biol. 148:857-862.
- Print CG and Loveland KL (2000) Germ cell suicide: new insights into apoptosis
- Raff M.C. (1992) “Social controls on cell survival and cell death” Nature 356:397-400.
- Rao L., Perez D., White E. (1996) “Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis” J. Cell Biol. 135:1441-1455.
- Raupach B., Peuschel S.K., Monak D.M., Zychlinsky A. (2006) “Caspase-1 mediated activation of interleukin-1-beta (IL-1-beta) and IL-18 contributes to innate defenses against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection” Infect Immun. 74: 4922-4926.

- Richter C., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C. (1996) “Control of apoptosis by the cellular ATP level” *Febs Lett.* 378:107-110.
- Robbins (2000) “Le basi patologiche delle malattie” 6^a edizione. Edizione italiana a cura di Vincenzo Eusebi, Kumar V., Abbas A. K., Fausto N. Elsevier Italia.
- Rojo M.C, Gonzalez M.E. (1998) “In situ detection of apoptotic cells by TUNEL in the gill epithelium of the developing brown trout (*Salmo trutta*)”. *J Anat.* 193: 391-8.
- Rosado JA. (2006). “Discovering the mechanism of capacitative calcium entry”. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 291(6):C1104-6. Comment on: *Am J Physiol.* 1990 Jun; 258(6Pt1): C1006-15.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. (1998). “Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis”. *Nature* 391, 96-99.
- Samejima K. and Earnshaw W.C. (1998) “ICAD/DFP regulator of apoptotic nuclease is nuclear” *Exp. Cell. Res.* 243:453-459.
- Savill J., Fadok V., (2000) “Corpse clearance defines the meaning of cell death” *Nature* 407: 784-788.
- Savill J., Fadok V., Henson P., Haslett C. (1993) “Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis” *Immunol. Today* 14:131-136.
- Schwerk C., Osthoff K. S. (2003) „Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation” *Bioch. Pharm.* 66:1453-1458.
- Shah GM, Poirier D, Desnoyers S, Saint-Martin S, Hoflack JC, Rong P, ApSimon M, Kirkland JB, Poirier GG. (1996). “Complete inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activity prevents the recovery of C3H10T1/2 cells from oxidative stress”. *Biochim Biophys Acta*; 1312(1):1-7.
- Shah GM, Shah RG, Poirier GG (1996). “Different cleavage pattern for poly (ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells”. *Biochem Biophys Res Commun.*; 229 (3): 838-44.

- Sica S., Fierro D., Iodice C., Muoio R., Filosa S., Motta C. M. (2001) "Control of oocyte recruitment: regulative role of follicle cells through the release of a diffusible factor". *Mol. Reprod. Dev.*, 58: 444-450.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. (1996) "Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14486-14491.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. (1998) "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization" *Mol. Cell.* 1:949-957.
- Steller H. "Mechanism and genes of cellular suicide". *Scienze*; 267(5203):145-9.
- Susin S.A., Zampami N., Castedo M., Daugas E., Wang H.G., Geley S., Fassy F., Reed J.C., Kraemer G. (1997) "The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/Apo1/CD-95 and ceramide-induced apoptosis" *J. Exp. Med.* 186: 25-37.
- Taddei C. (1972) "Significance of pyriform cells in ovarian follicle of *Podarcis sicula*". *Exp. Cell Res.*, 72: 562-566.
- Taylor MK, Cohen JJ. (1992) "Cell-mediated Cytotoxicity". *Curr Opin Immunol.* Jun;4(3):338-43.
- Tang D., Kidd V.J. (1998). "Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis". *J. Biol Chem.*; 273(44):28549-52.
- Tatsumi T., Shiraishi J., Keira N., Akashi K., Mano A., Yamanaka S., Matoba S., Fushiki S., Fliss H. and Nakagawa M. (2003) "Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes" *Cardiovasc. Res.* 59:428-440.

- Thompson CB. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease" *Science*.; 267(5203):1456-62.
- Thornberry N.A. and Lazebnik Y. (1998) "Caspase: enemies within" *Science* 281:1312-1316.
- Uchida D., Yamashita M., Kitano T., Iguchi T. (2002) "Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish" *J. Exp. Biol.* 205:711-8.
- Ueda S., Masutani H., Nakamura H., Tanaka T., Ueno M., Yodoi J. (2002) "Redox control of cell death" *Antioxid Redox Signal* 4:405-414.
- Vaux D.L., Haecker G., Strasser A. (1994) "An evolutionary perspective on apoptosis" *A. Cell* 76:777-779.
- Weil M., Jacobson M.D., Coles H.S.R., Davies T.J Gardner R.L., Raft K.D., Raft M.C. (1996) "Constitutive Expression of the Machinery for Programmed Cell Death". *J Cell Biol.* Jun;133(5):1053-9.
- Wiens M., Krasko A., Perovic S., Muller W. E.G. (2003). Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from metazoan. *Bioch et Biophysica Acta*, 1593: 179-189.
- Woods, F. 1931. History of the germ cells in *Sphaerium striatinum* (Lam.). *Journal of Morphology* 51: 545-595.
- Wu D., Wallen H.D., Nuñez G. (1997) "Interactions and regulation of subcellular localization of Ced-4 by Ced-9" *Science* 275:1126-1129.
- Yamashita N, Shin-ya K, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H. (1998). "New ravidomycin analogues, FE35A and FE35B, apoptosis inducers produced by *Streptomyces rochei*". *J Antibiot (Tokyo)*.; 51(12):1105-8.
- Yuan J. (1997) "Transducing signals of life and death". *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):247-51

- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R. (1993) “The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme” *Cell* 75:641-652.
- Zamzami N., Susin S. A., Marchetti P., Hirsch T. Gómez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. (1996) “Mitochondrial control of nuclear apoptosis” *J. Exp. Med.* 183: 1533-1544.
- Zoratti M., Szabo I. (1995) “The mitochondrial permeability transition” *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 139-176.

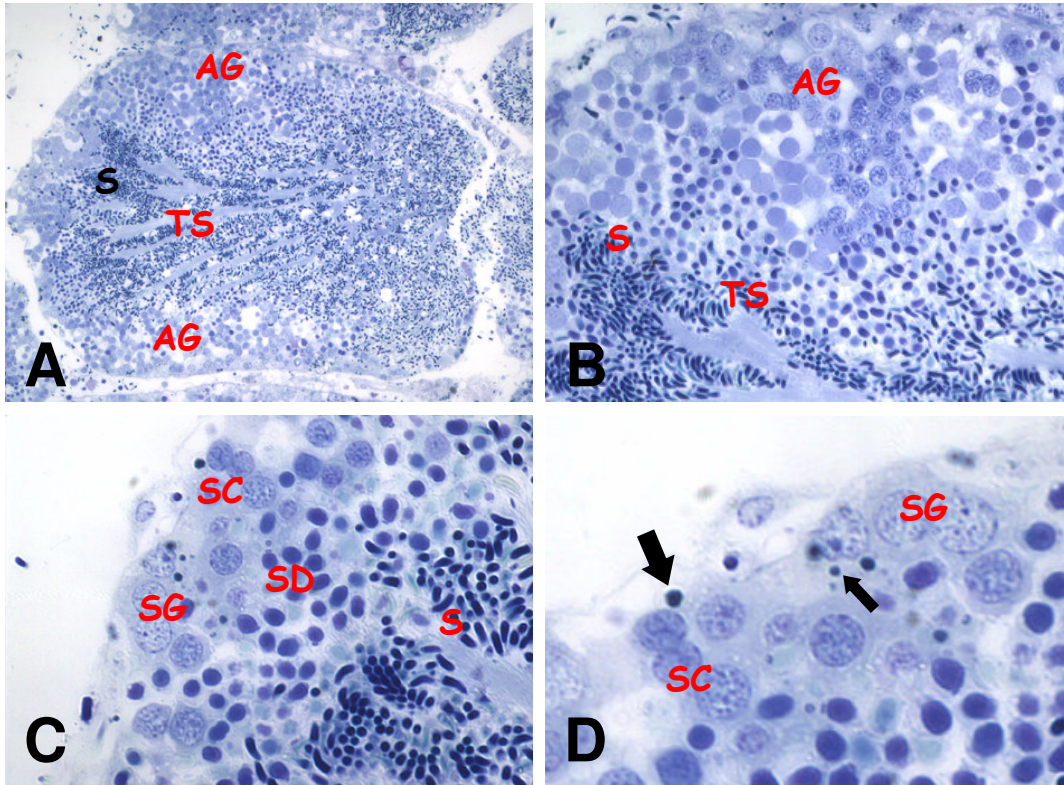


Tavola 1: morfologia del testicolo di *Callista chione*. **A:** lobulo in toto con al centro i tubuli seminiferi (TS), gli spermatozoi (S) e le aree germinative marginali (AG). **B:** dettaglio di un lobulo. Si notano gli elementi germinali nei diversi stadi di differenziamento all'interno dell'area germinativa (AG). **C:** dettaglio di regioni marginali del testicolo in cui si riconoscono gli spermatogoni (SG), gli spermatociti (SC), gli spermatidi (SD) e gli sperm (S) in prossimità dei tubuli (TS). **D:** dettaglio di area germinativa con spermatogoni (SG), spermatociti (SC). Si notano anche nuclei picnotici (freccia) e corpi apoptotici (freccia piccola)

Riprese a: 10x (A), 20x (B), 40x (C-D). Sezioni semifini colorate con blu di toluidina.

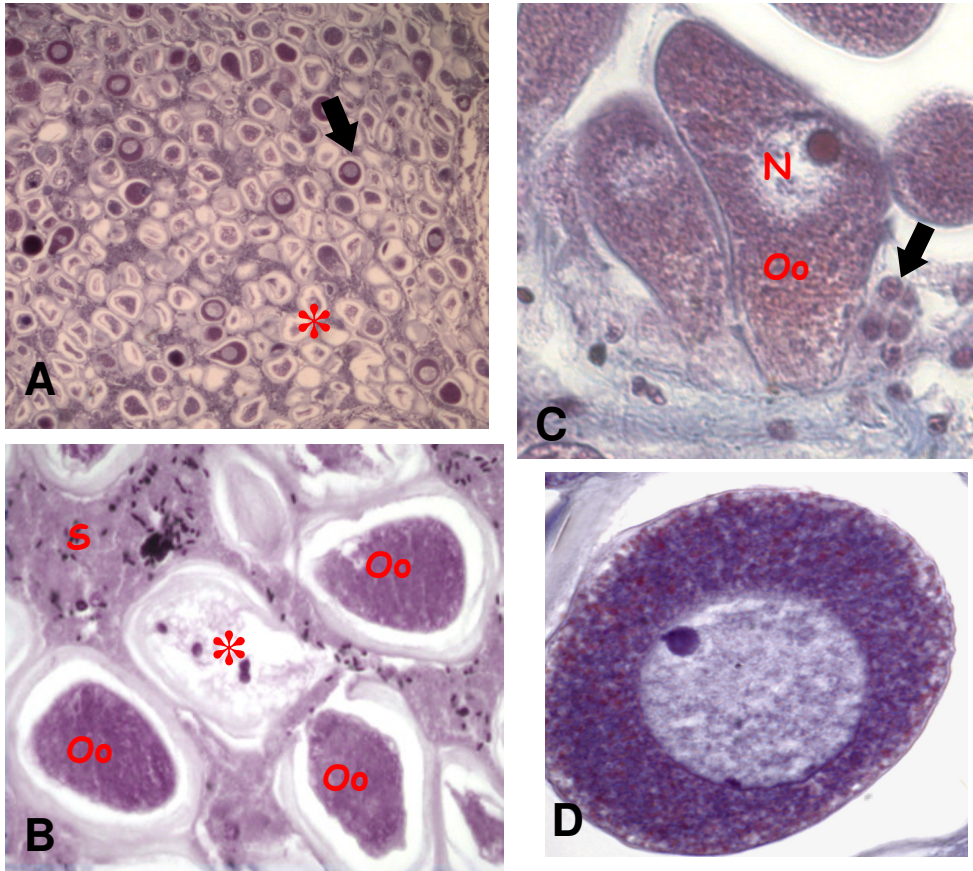


Tavola 2: morfologia dell'ovaio di *Callista chione*. **A:** piccolo ingrandimento di porzione di ovaio che dimostra la presenza di ovociti in accrescimento (freccia) e regressione (*) sincrona. **B:** gruppo di ovociti in accrescimento (Oo), caratterizzati dal citoplasma denso. Si notano anche un ovocita in regressione con citoplasma disorganizzato (*) e il denso stroma (S). **C:** dettaglio di ovocita in accrescimento (Oo) caratterizzato dal grosso nucleo (N) e nucleolo (freccia) e dal denso citoplasma che si protende basalmente verso le cellule follicolari basali (freccia). **D:** dettaglio dell'ovocita. Riprese a: 10x (A), 20x (B), 40x (C) 100x (D). Colorazione tricromica di Galgano

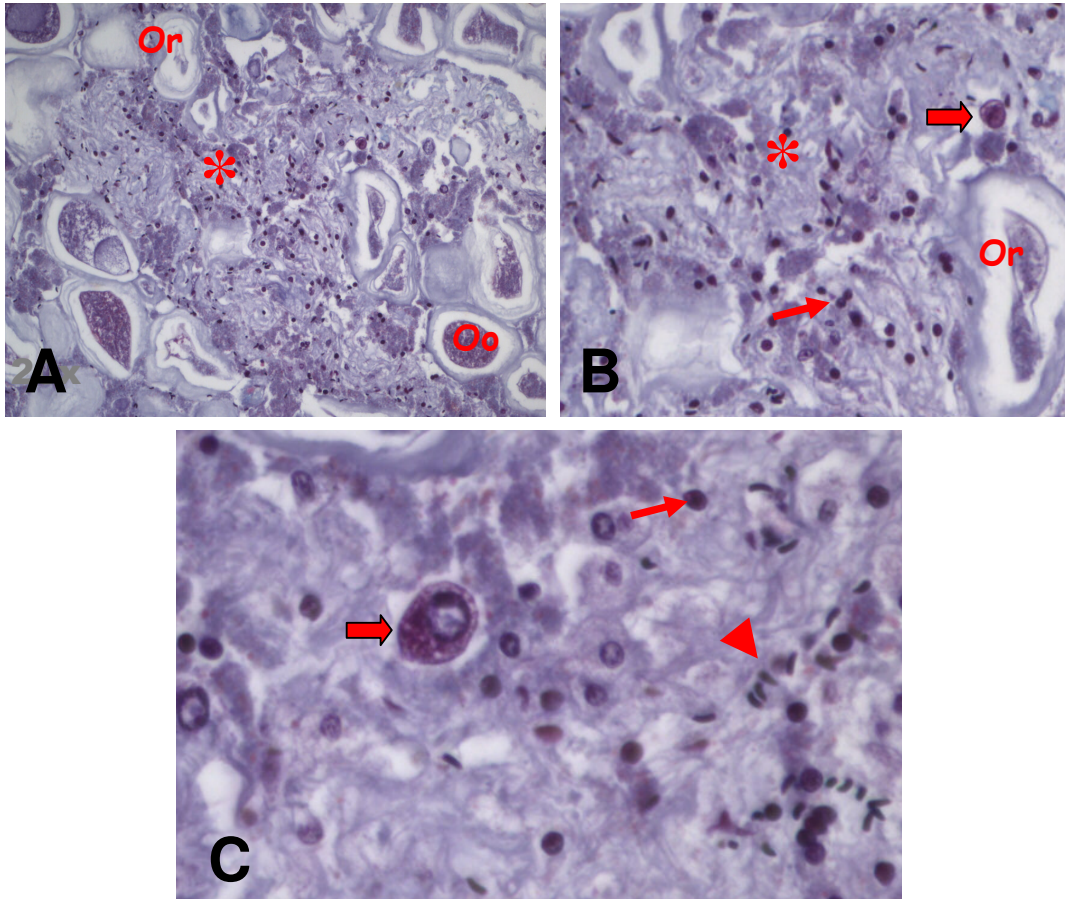


Tavola 3: ovaio di *Callista chione* con componente maschile in regressione. A: residuo testicolare in regressione (*) tra gli ovociti in accrescimento (Oo) o in regressione (Or). **B:** dettaglio in cui si nota la natura fibrosa del residuo (*) e la presenza di piccoli ovociti (freccia) e nuclei picnotici (freccia piccola). **C:** ulteriore ingrandimento in cui si notano un ovocita in accrescimento (freccia), alcuni nuclei picnotici (freccia piccola) e teste di spermatozoi (punte di freccia). Riprese a: 20x (A), 40x (B), 100x (C).

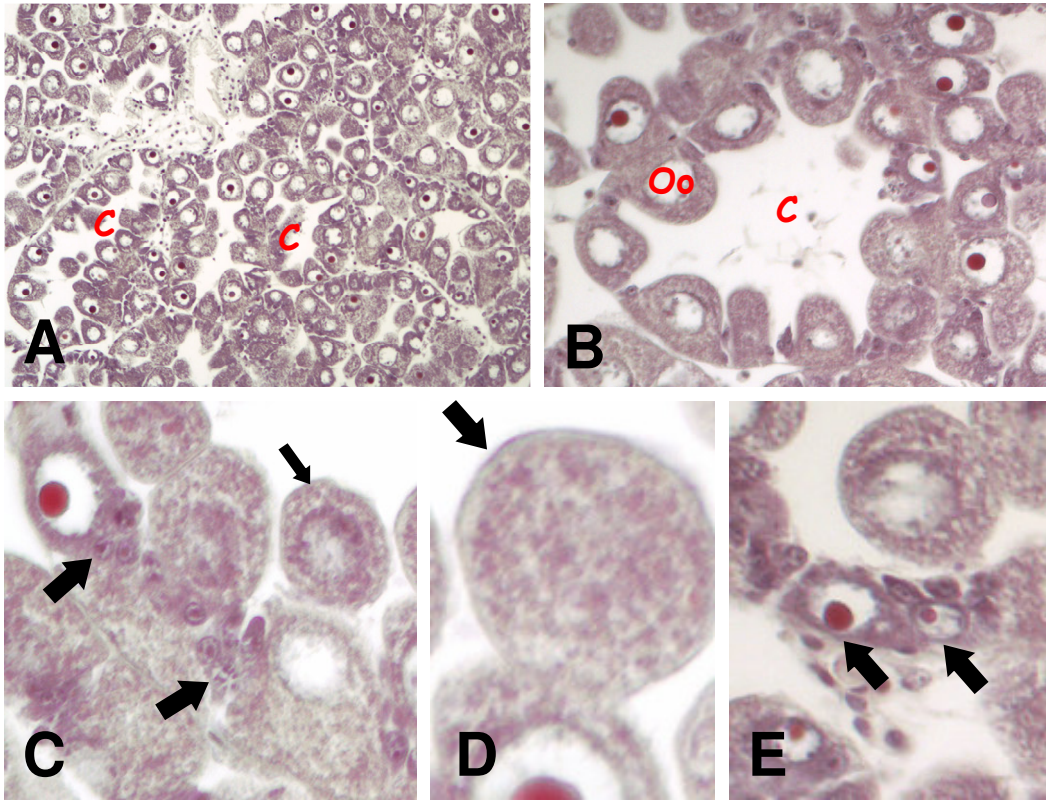


Tavola 4: morfologia dell'ovaio di *Adamussum colbecki*. **A:** l'ovaio è costituito da piccole cisti (C) cave al centro. **B:** gli ovociti (Oo), tutti allo stesso stadio di maturazione, sono allineati lungo la parete della cisti. **C:** dettaglio in cui si nota la presenza di cellule follicolari (freccie) solo alla base dell'ovocita. **D:** dettaglio della superficie dell'ovocita (freccia) non rivestita da epitelio follicolare. **E:** piccola area germinativa nella parete della cisti. Si notano gli ovociti nelle primissime fasi dell'accrescimento (freccie).

Riprese a: 10x (A), 20x (B, D), 40x (C). Colorazione con emallume-eosina.

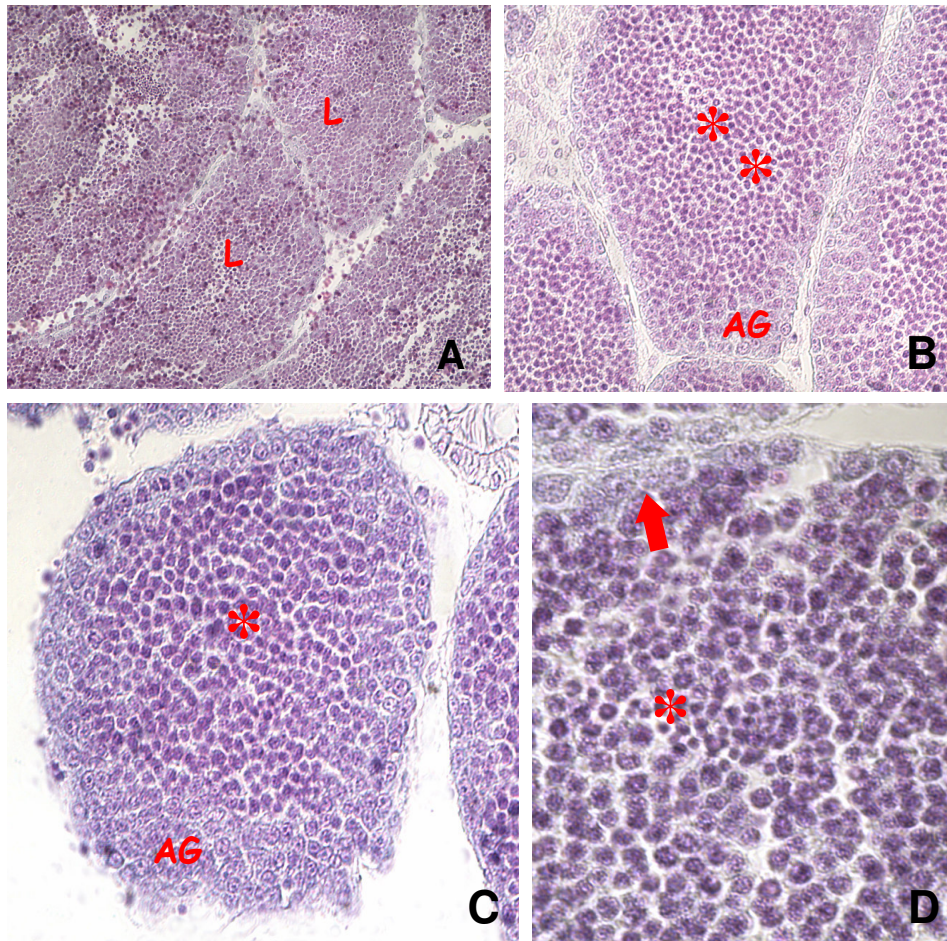


Tavola 5: Morfologia del testicolo di *Adamussium colbecki* tra gennaio-febbraio. A: piccolo ingrandimento in cui si nota l'organizzazione in lobuli (L) strettamente addossati. B-C: ingrandimenti di lobuli in cui si distinguono le aree germinative marginali (AG) contenenti spermatogoni e il centro del tubulo contenente gli spermatociti (*). D: dettaglio in cui si notano gli spermatogoni (freccia) e gli spermatociti (*). Riprese a: 20x (A), 40x (B,C), 100x (D).

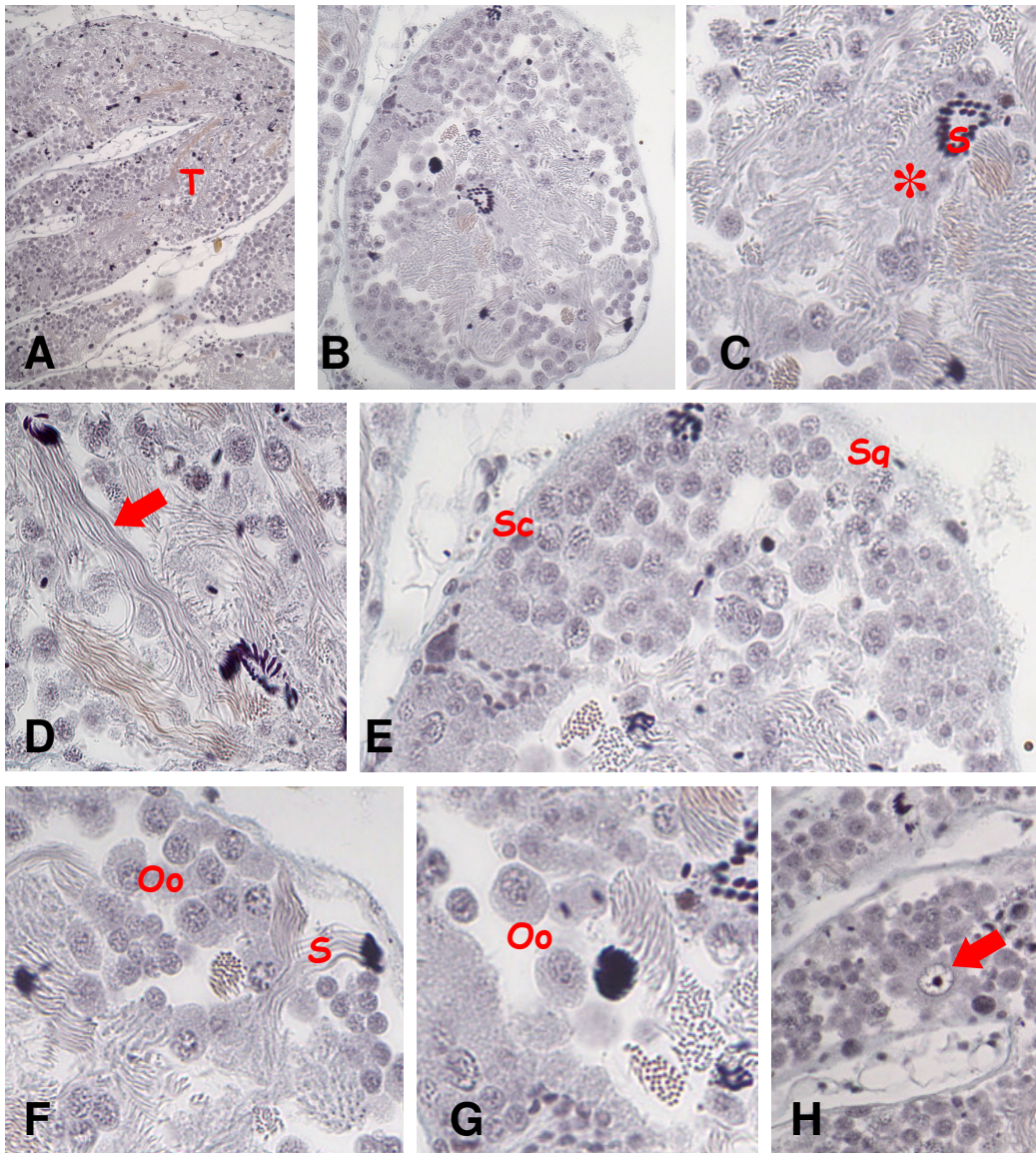


Tavola 6: morfologia della gonade di *Helix pomatia* nel periodo di stasi riproduttiva (settembre-dicembre). A: ovotestis composto da tubuli (T). B: sezione trasversale di tubulo in cui si nota la presenza di elementi germinali in diversi stadi di sviluppo. C: dettaglio della regione centrale contenente fasci di spermatozoi (S) con le lunghe code (*). D: ulteriore ingrandimento di un fascio di spermatozoi (freccia). E: particolare di area germinativa marginale con spermatogoni (SG) e spermatociti (Sc). F-G: piccoli ovociti in accrescimento (Oo) sparsi tra gli elementi maschili. Fasci di spermatozoi (S). H: ovocita in diplotene (freccia). Riprese a: 10x (A, D), 20x (B), 40x (C), 100x (D). Colorazione con emallume.

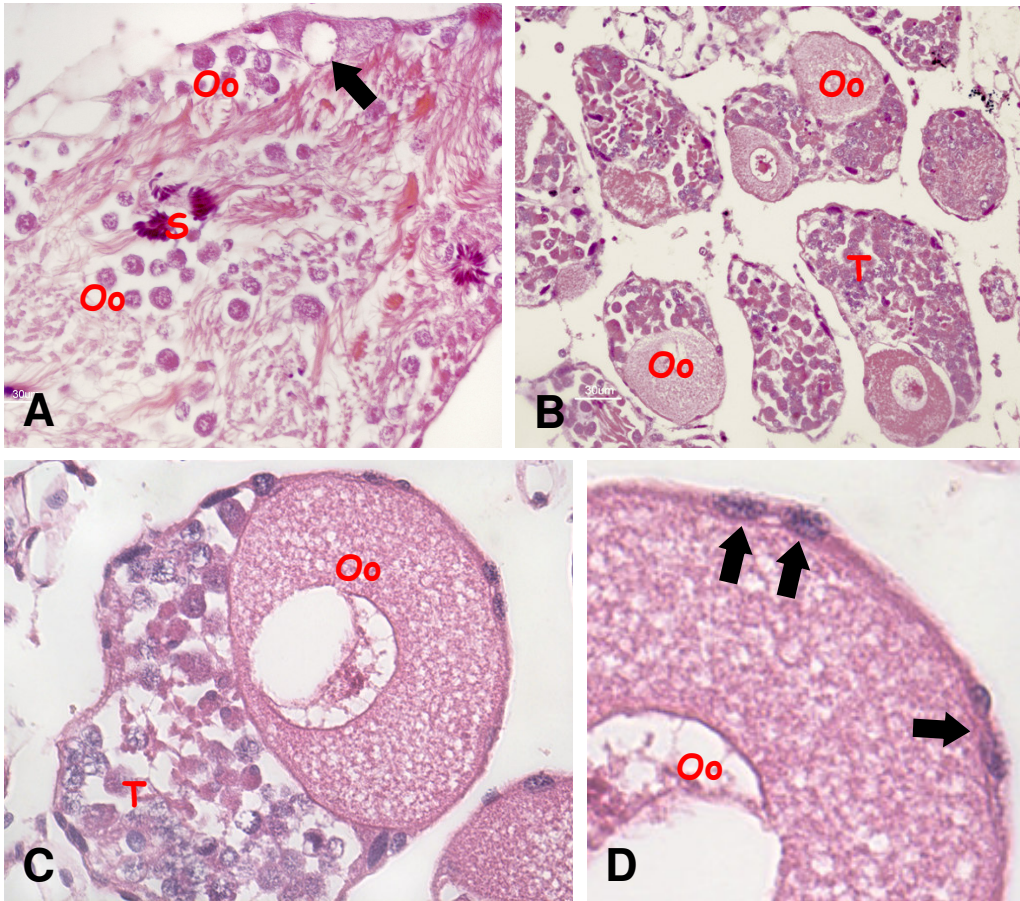


Tavola 7: morfologia della gonade di *Helix pomatia* durante il periodo riproduttivo. **A:** inizio del periodo riproduttivo (marzo). Nei tubuli sono presenti numerosi ovociti nelle primissime fasi dell'accrescimento (Oo). Si notano anche occasionali ovociti con citoplasma più abbondante (freccia) e i fasci di spermatozoi (S). **B-C:** periodo riproduttivo. Gli ovociti (Oo) hanno abbondante citoplasma e grosso nucleo; la componente maschile (T) è ben rappresentata. **D:** dettaglio della superficie dell'ovocita rivestita dalle cellule follicolari (freccie).
 Riprese a: 10x (A, D), 20x (B), 40x (C-D). Colorazione emallume-eosina.

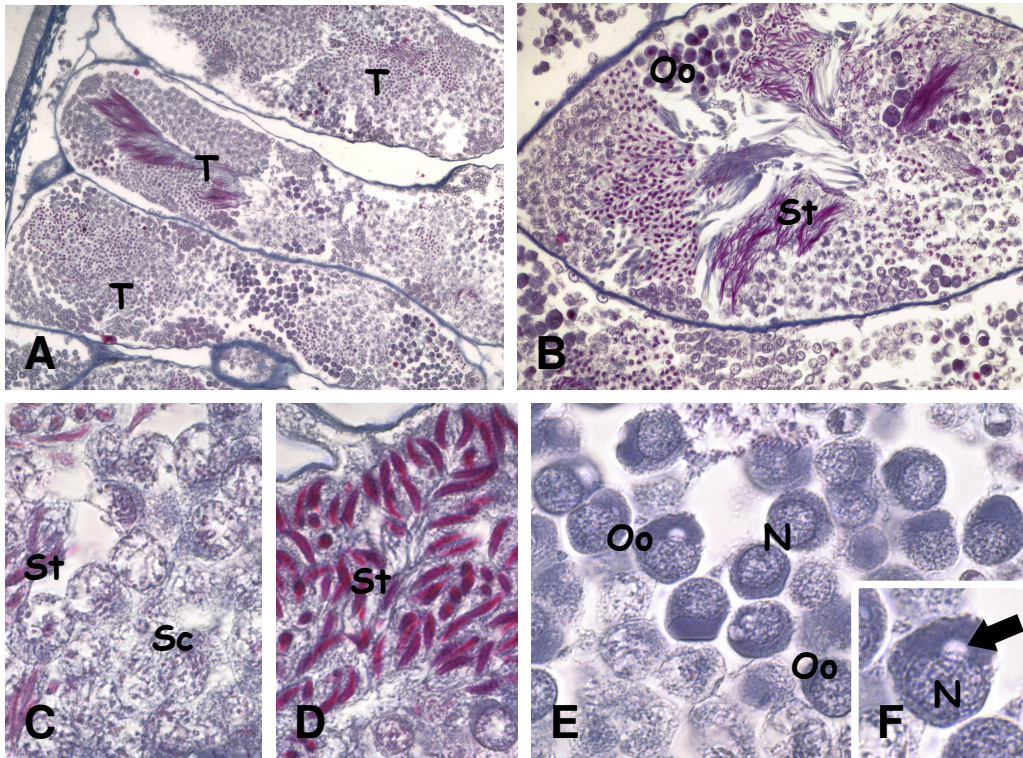


Tavola 8: morfologia dell'ovotestis di *Neobuccinum eatoni*. **A:** la gonade è costituita da una serie di tubuli (T). **B:** ingrandimento in cui si nota la coesistenza di elementi germinali maschili (St spermatidi) e femminili (ovociti Oo) in diverse fasi del differenziamento. **C:** gruppo di spermatociti I (Sc) e spermatidi (St). **D:** nuclei di spermatidi (St). **E:** gruppo di ovociti (Oo) caratterizzati dal grosso nucleo (N) e scarso citoplasma denso. **F:** dettaglio di ovocita in cui si nota la presenza di una grossa vescicola trasparente (freccia) in prossimità del nucleo (N).

Riprese a: 10x (A), 20x (B), 40x (C,E) 100x (D,F). Colorazione tricromica di Galgano

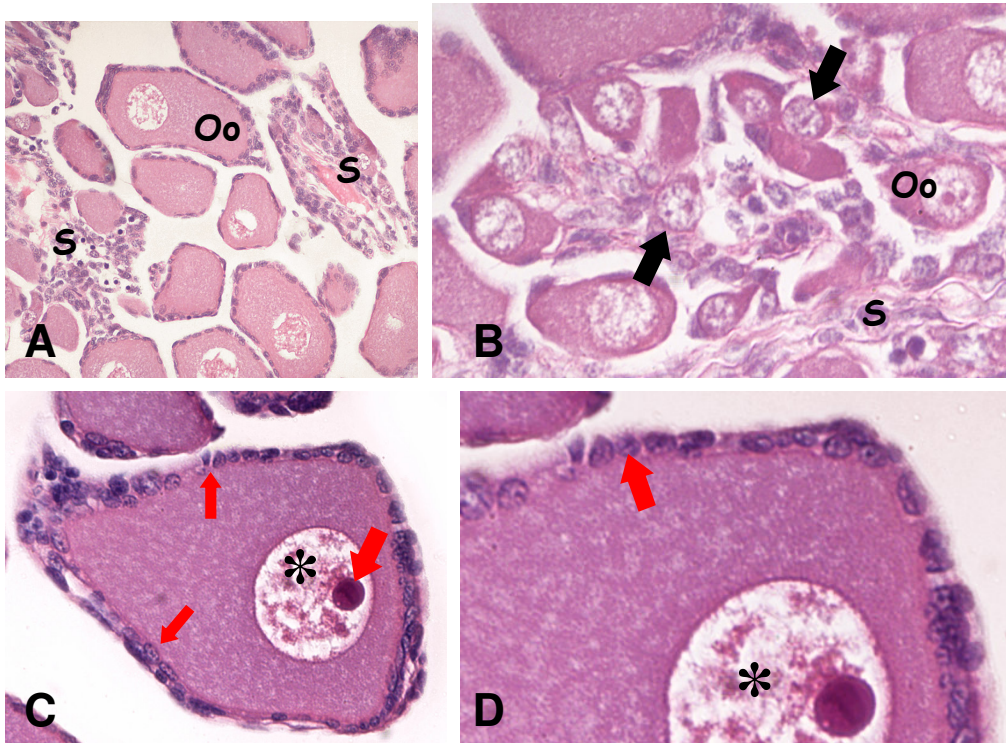


Tavola 9: morfologia dell'ovaio di *Octopus vulgaris*. **A:** ovociti (Oo) in fasi diverse dell'accrescimento sono dispersi tra i cordoni di stroma (S). **B:** area germinativa contenente cellule germinali in stadi prefollicolari (freccie). **C:** ovocita in accrescimento. Si notano i cromosomi lumpbrush nel nucleo (*), il grosso nucleolo (freccia) e l'epitelio follicolare monostratificato (freccie piccole). **D:** dettaglio della figura C in cui si notano i nuclei delle cellule follicolari (freccie). Riprese a: 20x (A), 40x (B,C). 100x (D). Colorazione: emallume-eosina.

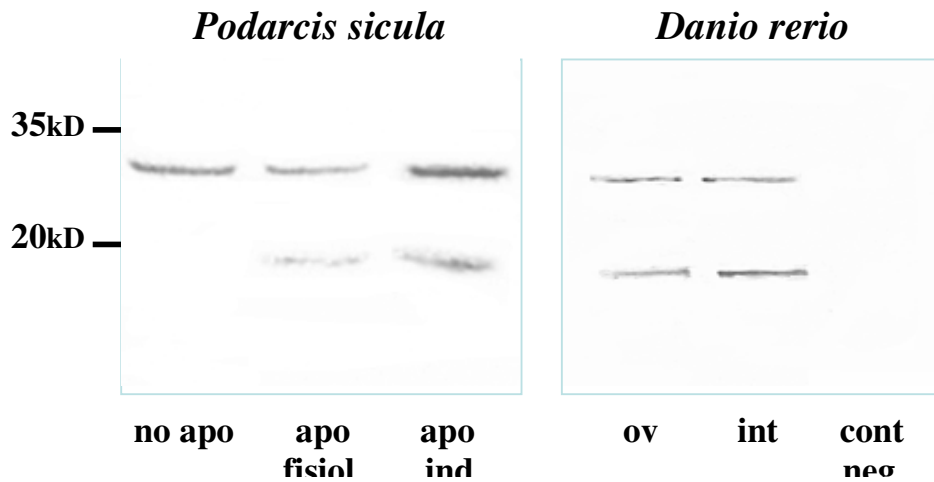


Tavola 10: riconoscimento della caspase 3 in *Podarcis* e *Danio*. In cellule follicolari di *Podarcis*, in assenza di evidenze di apoptosi (no apo), l'anticorpo anti caspase di mammifero riconosce una banda a circa 32 kDa. In epiteli in apoptosi fisiologica (apo fisiol) o in apoptosi indotta mediante staurosporina (apo ind) l'anticorpo riconosce due bande, a 32 e 17 kDa circa. Bande dello stesso peso sono riconosciute anche in *Danio*, in ovaio ed intestino. Nel controllo negativo non viene riconosciuta alcuna proteina.

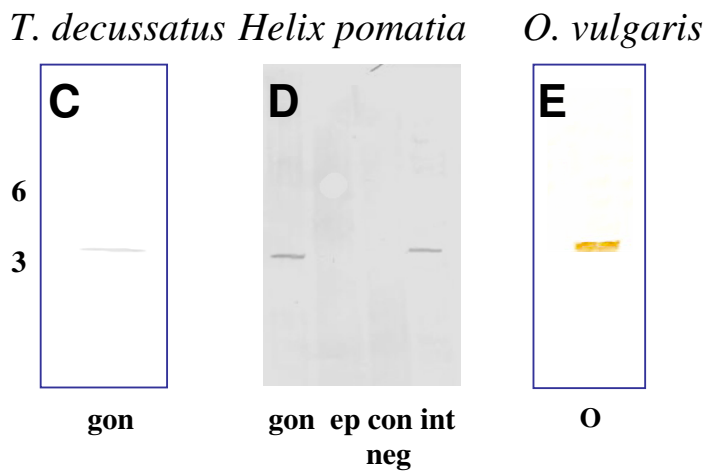
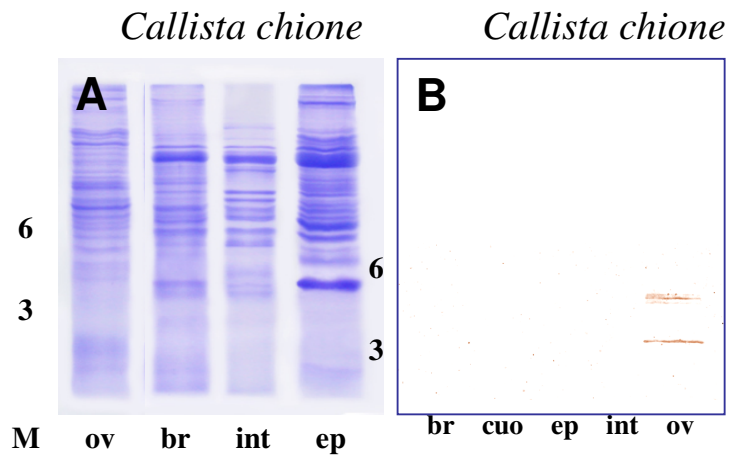


Tavola11. Immunorivelazione della caspasi 3-like in estratti ottenuti da vari organi. **A:** Elettroforesi campione di proteine di *Callista chione*. **B:** Immunoblot, *Callista*. Sono presenti due bande positive a 32 e 17 kDa nel solo estratto ottenuto da ovaio. In branchie (bra), cuore (cuo), epatopancreas (ep) e intestino (int) non si notano bande. **C:** Immunoblot, *Tapes decussatus*. Presenza di una banda a 32 kDa negli estratti di gonade. **D:** immunoblot, *Helix pomatia*. Presenza di una banda a 32 kDa nell'ovaiotestis (gon) e intestino (int), l'epatopancreas (ep) risulta negativo **E:** immunoblot, *Octopus vulgaris*. E' presente una sola banda positiva a circa 32 kDa nell'ovaio.

M: markers di peso molecolare.

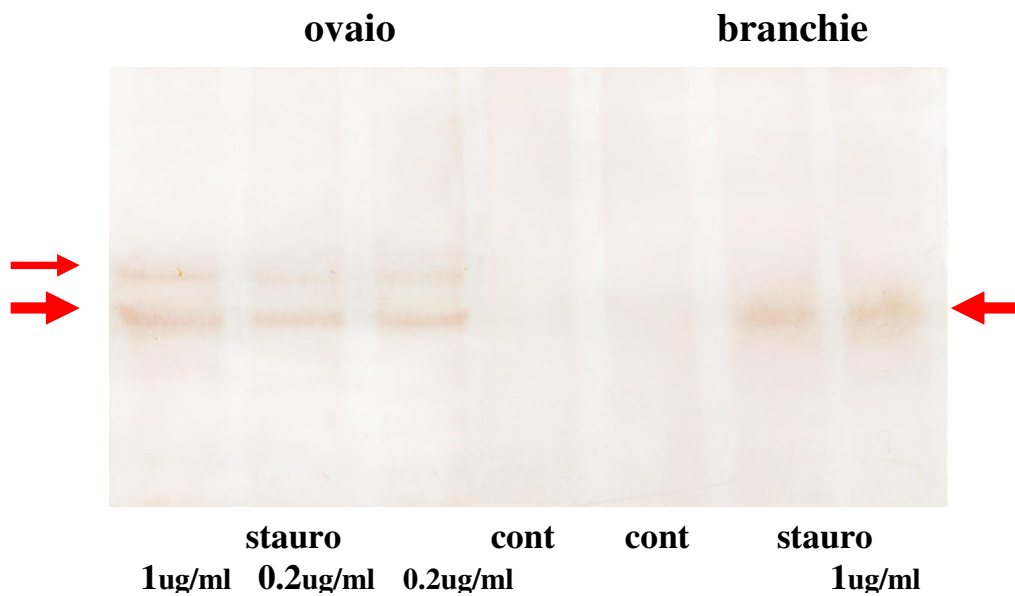


Tavola 12: attivazione di una caspasi 3-like in *Callista chione*. La staurosporina, un pro apoptotico induce la comparsa della banda a 32 kDa negli estratti proteici di branchie (freccia). Nei campioni di ovaio sono presenti la banda a 32 kDa (freccia), e l'isoforma a 40 kDa (freccia piccola)

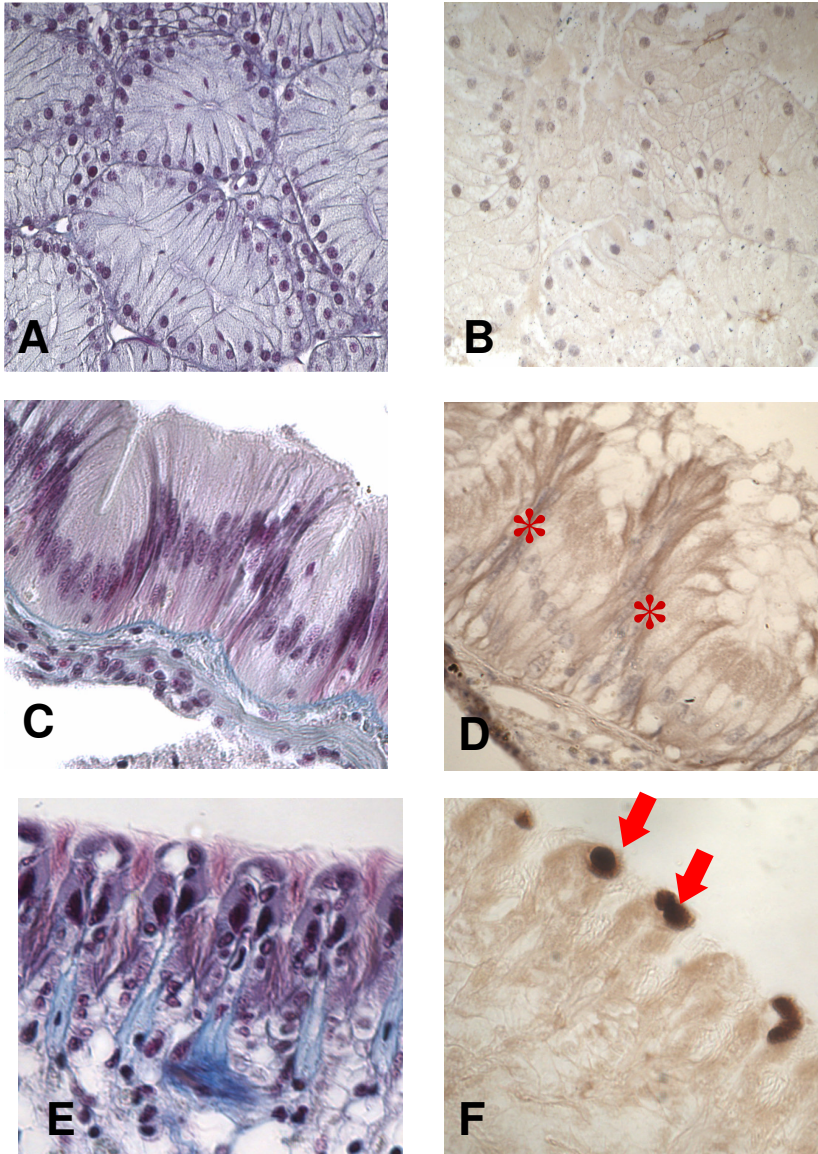


Tavola 13: verifica della specificità dell'anticorpo anticaspasi su diversi tessuti.

A-B: epatopancreas di *Callista chione*. Le cellule dei tubuli restano incolori dopo reazione immunocitochimica. C-D: intestino di *Helix pomatia*. L'enzima è localizzato nel citoplasma delle cellule della mucosa (*). E-F: branchia di *Callista chione*. L'anticorpo riconosce le cellule frontali della lamella (frecce)
 Riprese: 20 x (A, B, C), 40x (D, E, F).

Colorazione galgano (A, C, E), immunocitochimica B, D, F.

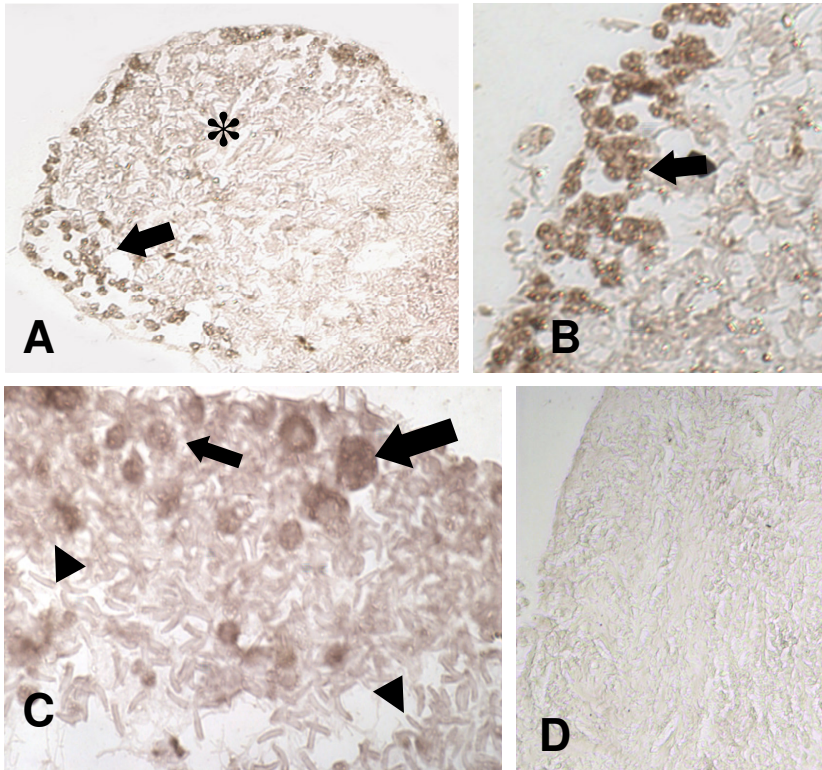


Tavola 14: Immunolocalizzazione della caspasi nella gonade maschile di *Callista chione*. **A:** particolare di lobulo in toto in cui si notano cellule marcate nella aree germinative marginali (freccia). I tubuli seminiferi, centrali (*) sono completamente negativi. **B:** ingrandimento che mostra le cellule marcate dell'area germinativa (freccia) e i tubuli negativi. **C:** ulteriore ingrandimento della zona marginale del lobo testicolare. Sono evidenti gli spermatogoni (freccia) e gli spermatociti (freccia piccola) positivi e gli spermatozoi negativi (punte di freccia). **D:** controllo negativo. Tutte le cellule risultano negative.

Riprese a: 10x (A, D), 20x (B), 40x (C).

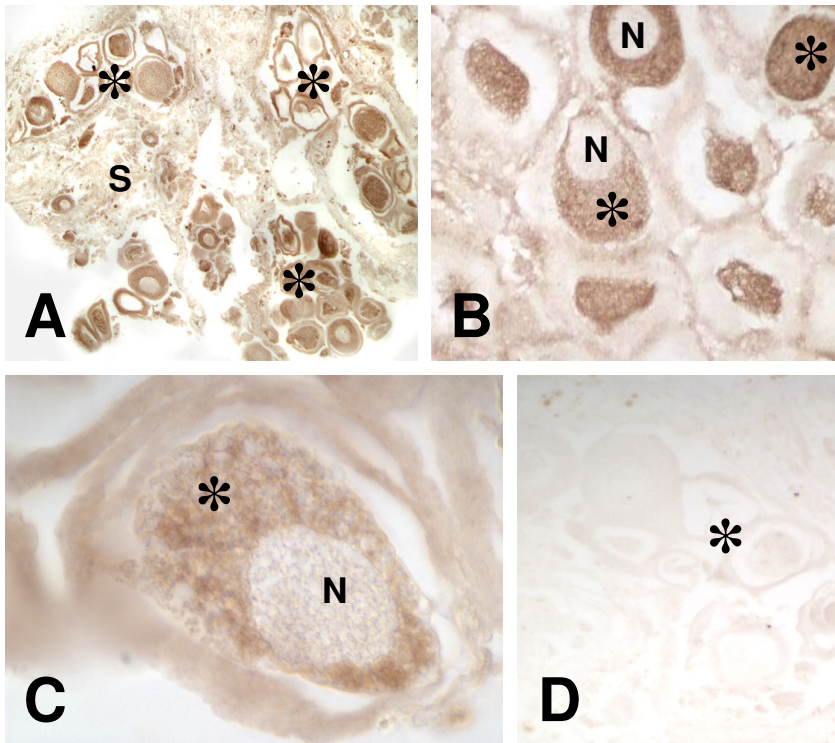


Tavola 15. Immunolocalizzazione della caspasi nell'ovaio di *Callista chione*. **A:** piccolo ingrandimento che mostra i gruppi di ovociti marcati (*) immersi nello stroma (S) negativo. **B:** gruppo di ovociti con intensa positività sparsa nel citoplasma (*) e nuclei (N) negativi. **C:** particolare di ovocita con intensa positività nel citoplasma (*). **D:** controllo negativo. Gruppo di ovociti (*) non marcati.

Riprese a: 10x (A), 20x (D), 40x (B), 100x (C).

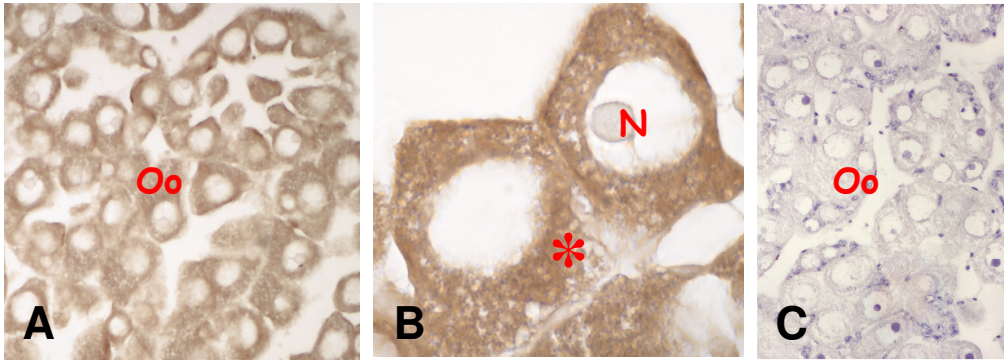


Tavola 16: immunolocalizzazione della caspasi 3-like nell'ovaio di *Adamussium colbecki*. A-B: tutti gli ovociti (Oo) presentano citoplasma marcato (*) e nucleo (N) completamente negativo. C: controllo negativo preparato omettendo l'anticorpo primario.
Riprese a: 20x (A, C), 100x (B).

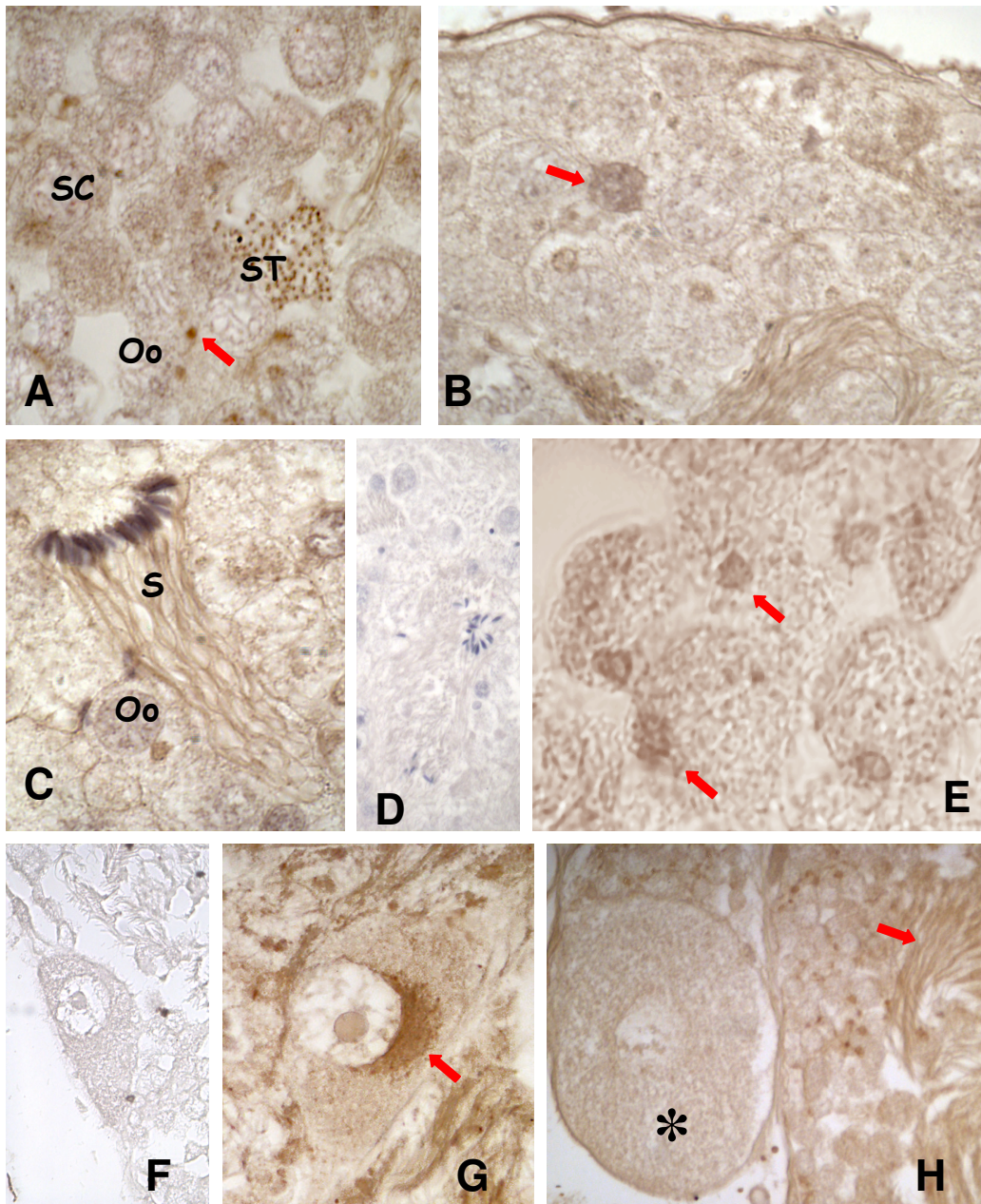


Tavola 17: Immunolocalizzazione della caspasi 3-like nella gonade di *Helix pomatia*:

A-B: area germinativa del tubulo in cui si vedono alcune cellule germinali marcate. **C:** la caspasi 3-like negli spermatozoi è localizzata sia nelle teste che nelle code. **E:** i tubuli presentano ovociti in crescita in cui si nota una piccola sfera marcata in prossimità dei nuclei (freccie). **G:** dettaglio in cui si nota marcatura intorno al nucleo (freccia). **H:**ingrandimento in cui si nota l'ovocita negativo (*) mentre sono marcati gli spermatozoi raccolti in fasci.

D, F: controlli negativi. Riprese a: 40x (B, D, F, H). 100x (A,C,E,G).

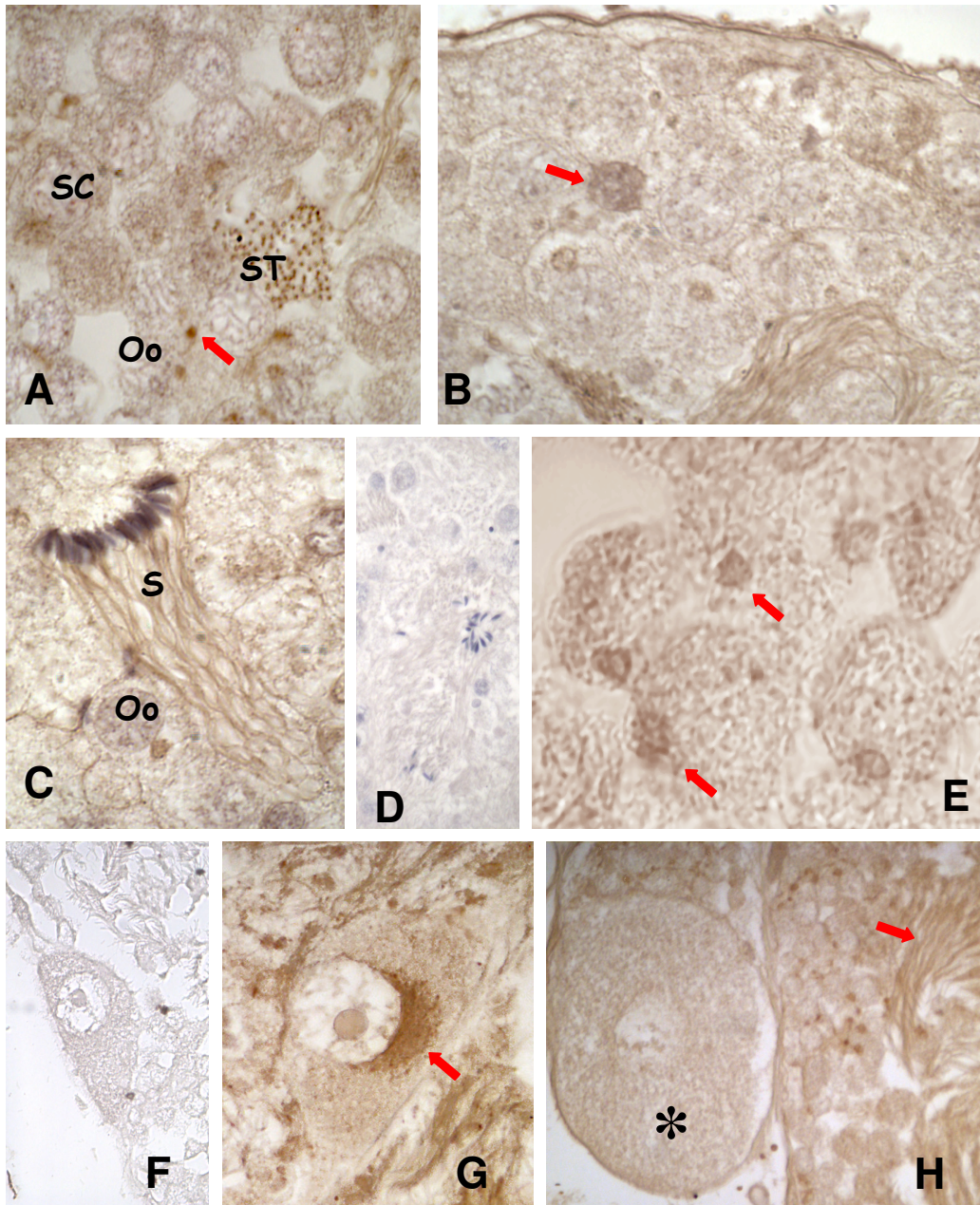


Tavola 17: Immunolocalizzazione della caspasi 3-like nella gonade di *Helix pomatia*:

A-B: area germinativa del tubulo in cui si vedono alcune cellule germinali marcate. **C:** la caspasi 3-like negli spermatozoi è localizzata sia nelle teste che nelle code. **E:** i tubuli presentano ovociti in crescita in cui si nota una piccola sfera marcata in prossimità dei nuclei (freccia). **G:** dettaglio in cui si nota marcatura intorno al nucleo (freccia). **H:**ingrandimento in cui si nota l'ovocita negativo (*) mentre sono marcati gli spermatozoi raccolti in fasci.

D, F: controlli negativi. Riprese a: 40x (B, D, F, H). 100x (A,C,E,G).

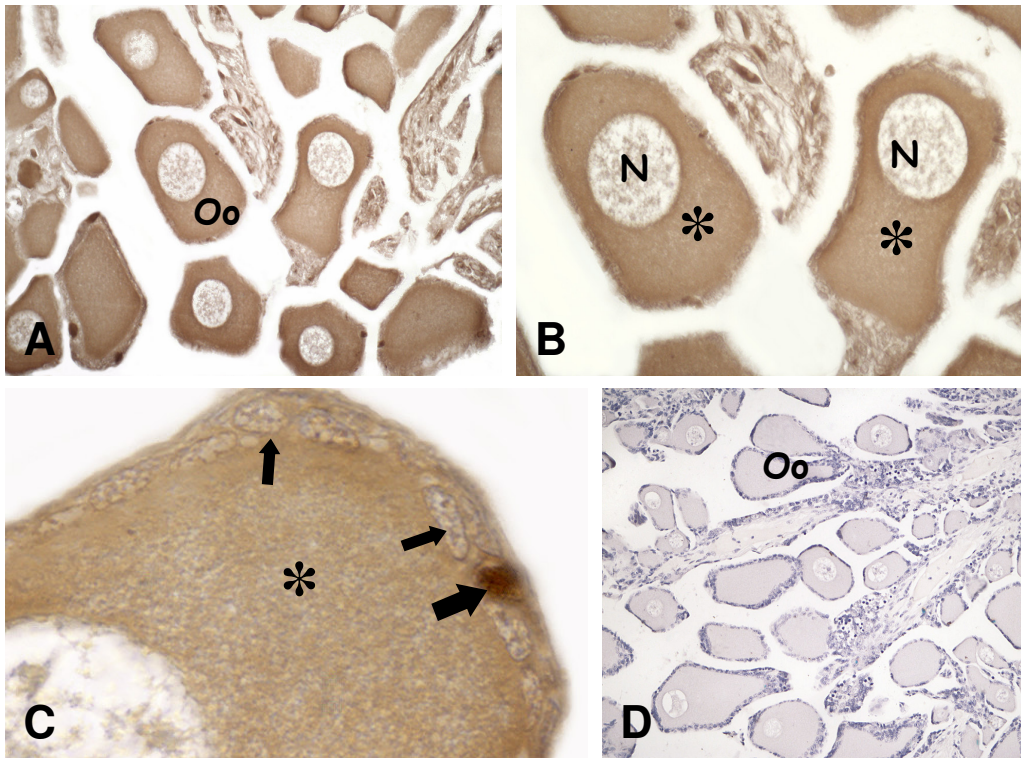


Tavola 19: immunolocalizzazione della caspasi 3-like nell'ovaio di *Octopus vulgaris*. **A-B:** tutti gli oociti (Oo) presentano citoplasma marcato (*) e nucleo (N) completamente negativo. **C:** dettaglio dell'epitelio follicolare. Le cellule hanno generalmente nuclei negativi all'anticorpo (freccie piccole); occasionali nuclei positivi sono tuttavia presenti (freccia). **D:** controllo negativo preparato omettendo l'anticorpo primario.

Riprese a: 20x (A, D), 40x (B) 100x (C).

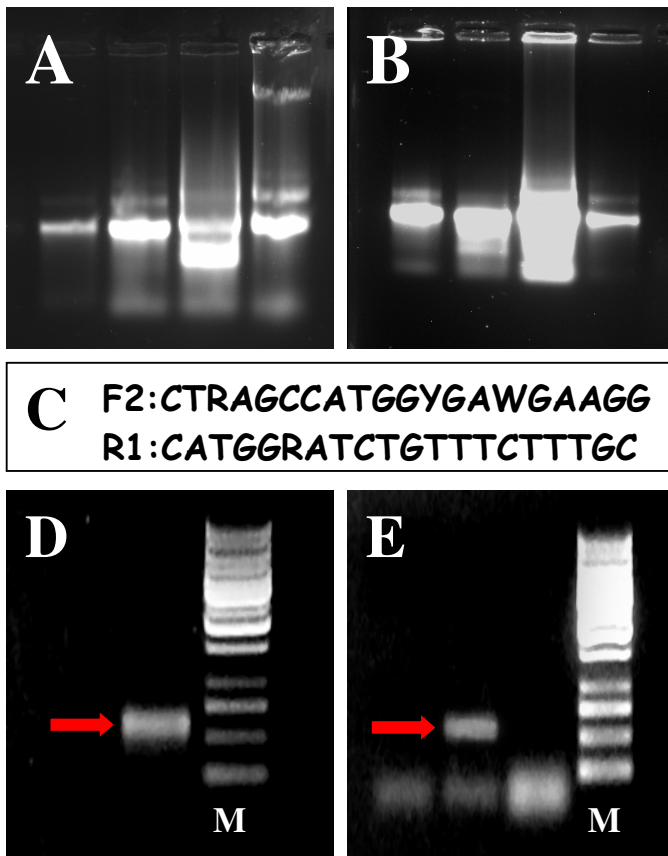
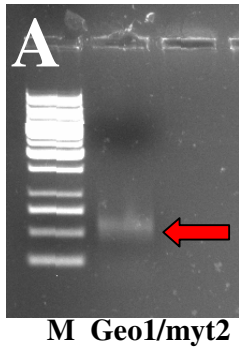


Tavola 20. RNA estratti da ovaio, intestino e testicolo di *Callista chione* (A) e da ovaio, intestino di *Helix pomatia* (B). C: Primers F2-R1 usati negli esperimenti di PCR. D-E: risultato delle PCR condotte con i primers F2R1 in *Callista chione* (D) ed *Helix pomatia* (E). In entrambi i campioni si evidenzia un trascritto di circa 500 bp (frece).



Casp3geo1:GTTTCGTTGTTTCAGGCTTGT **B**
Myt 2 RW TCAACACCACCTCCTAAACC

```

TGTCGACGAGAAAAATACTGAGCCCCGGTGATGAAGGATAAGGGAACAA
CTGCACTGAT
ATTTTGCAAAACATGTTATGAATTTCAATGCACGGGTTGCTCATGCGTACA
TAAAGATTT
TGCTTTCATGGAAAATCACGAGCTTGTGGAGGCGAAAGAAGCAGATTAC
TTCCGAGGTC
ATGTGACATGAAAGGATTACACATATGCGATAAACACCGGAAATTGTTGG
AATTCTTCTG
TGAACACCAGAAATCGCTGTGTTGTATTTCTGAGCTTTCGCGGATCACCG
GAAGTGCCA
CACTGTCCTCAAATAACACCTCATTGCCCACTTTCACGCTCGGCCGATTC

```

```

AFADHRKCHTVLKIHLIAQLSRSA DFASRVKLNMKADT
EMVVKQTHDADERIDHDIKETPLKIGPMPHDLIKIFDEL
QACLGNAQTHFRVNP SXTRHSNSFRQSERWTLQNART
SLVLTFSLCVSI D

```

Tavola 21. **A:** risultato della PCR condotta con i primers Geo/myt2 in ovaio testis di *Helix pomatia* **B:** Primers Casp3geo1-my2. **C:** Trascritto di 731 bp risultante dalla PCR. **D:** frammento proteico tradotto contenente il pentapeptide QACLG caratteristico delle caspasi.