

Università degli studi di Modena e Reggio Emilia

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea

Triennale

Scienze Biologiche

**Caratterizzazione molecolare e localizzazione
tissutale di un trascritto C3-simile nel gasteropode
*Pomacea canaliculata***

Relatore
Dott.. Nicola Franchi

Tesi di laurea di
Filippo Bertolasi

Anno Accademico 2021/2022

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	4
1.1 IMMUNITÀ INNATA	4
1.1.1 <i>Immunità cellulo-mediata</i>	5
1.1.2 <i>Immunità umorale</i>	5
1.1.3 <i>Immunità innata negli invertebrati</i>	6
1.2 IMMUNITÀ ADATTATIVA	6
1.2.1 <i>Immunità cellulo-mediata</i>	6
1.2.2 <i>Immunità umorale</i>	7
1.3 SISTEMA DEL COMPLEMENTO	8
1.3.2 <i>Funzioni non immunitarie del complemento</i>	10
1.4 POMACEA CANALICULATA	10
2. SCOPO DELLA TESI.....	11
3. RISULTATI.....	12
3.1 STANDARDIZZAZIONE DEL PROGRAMMA DI PCR PER LA SEQUENZA C3-SIMILE.....	12
3.2 LOCALIZZAZIONE TISSUTALE DEL TRASCRITTO C3-SIMILE	12
4 DISCUSSIONE.....	14
5 CONCLUSIONI.....	16
6 MATERIALI E METODI.....	17
6.1 ANIMALI.....	17
6.2 PRELIEVO DEI CAMPIONI.....	17
6.3 ESTRAZIONE RNA.....	17
6.4 RETROTRASCRIZIONE	18
6.5 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	18
6.6 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO	19
BIBLIOGRAFIA	20

Riassunto

Il sistema del complemento è un componente fondamentale della difesa immunitaria sia per vertebrati che per invertebrati. Indagare circa le sue origini ed evoluzione è un passaggio chiave per comprendere come sono cambiate le sue proteine in modo da adattarsi a nuove condizioni ambientali, cicli vitali o, nel caso dei vertebrati, all’interazione con l’immunità adattativa. In *Pomacea canaliculata* queste indagini possono essere utili anche per comprendere un eventuale coinvolgimento del sistema del complemento nei processi definiti “non canonici” come la rigenerazione.

In questo studio abbiamo gettato le basi per futuri esperimenti disegnando dei primer, per poi testarli individuando i migliori per l’amplificazione della sequenza C3-simile. È stato valutato poi il miglior profilo di PCR che offre una miglior resa in termini di intensità degli amplificati e quantità di amplificati inattesi. Abbiamo eseguito uno screening di tutti i principali tessuti di *P.canaliculata* e riscontrato la presenza della sequenza nei tessuti di ampolla, tentacolo, rene anteriore, muscolo del piede, emociti, gangli, occhi e cuore. Il dato fondamentale prodotto dallo studio è l’effettiva presenza della sequenza C3-simile a livello degli emociti. Per quanto riguarda gli altri tessuti andranno condotti ulteriori esperimenti in modo da chiarire che la positività non sia dovuta ad un inquinamento per contatto con emolinfa.

1. Introduzione

Tutti i metazoi hanno evoluto dei meccanismi cellulari ed umorali per difendersi dal “non-self”. Storicamente, il sistema immunitario è stato suddiviso in due: immunità innata ed immunità adattativa. L’immunità innata fornisce una difesa aspecifica e rappresenta la prima forma di difesa che andrà ad agire contro l’organismo patogeno e/o qualsiasi altra molecola riconosciuta come non appartenente all’ospite, al “self”. L’immunità adattativa invece rappresenta una seconda linea di difesa, specifica per i singoli organismi/molecole antigeniche (Alberts et al., 2009).

1.1 Immunità innata

L’imunità innata viene detta anche naturale, il nome deriva dal fatto che fornisce protezione da agenti patogeni senza necessità di una prima esposizione ad essi. In altre parole, quando il sistema immunitario innato incontra un antigene *non-self*, reagirà istantaneamente per isolarlo o rimuoverlo dall’ospite (Kimbrell, 2001). Questa funzione è molto importante dato che la risposta immunitaria adattativa e specifica richiede anche una settimana per diventare efficace. In generale ci sono tre linee di difesa immunitaria innata che possono agire: la prima è rappresentata dalle barriere fisiche e chimiche che impediscono il semplice ingresso di microrganismi all’interno del corpo. Queste barriere comprendono lo strato di tegumento esterno, le giunzioni strette tra cellule epiteliali, il pH acido nello stomaco e i componenti degli strati di muco che inibiscono la colonizzazione ed uccidono i batteri estranei. La flora simbionte ha un ruolo anche nel proteggere le superfici corporee dagli invasori, competendo per la stessa nicchia ecologica e limitando così la colonizzazione. La seconda linea di difese innate comprende le risposte intrinseche della cellula, tramite cui una singola cellula può riconoscere una cellula bersaglio e rispondere di conseguenza con misure atte alla fagocitosi o all’attività citotossica. La maggior parte delle cellule che hanno internalizzato un batterio tramite fagocitosi indotta da patogeni, per esempio, dirigerà immediatamente il fagosoma a fondersi con un lisosoma, esponendo il microrganismo invasore agli enzimi digestivi. Un altro meccanismo di difesa intrinseco è la capacità di cellule ospiti di degradare l’RNA a filamento doppio, che è un intermediario comune nella replicazione virale; le cellule infette degraderanno anche qualsiasi RNA a singolo filamento che ha innescato il meccanismo. La terza linea di difese immunitarie dipende da una serie specializzata di proteine e cellule ad attività immunitaria (fagociti e cellule citotossiche) che riconoscono le caratteristiche conservate dei patogeni e si attivano velocemente per aiutare a distruggere gli invasori. Tra

queste troviamo le cellule specializzate degli invertebrati e neutrofili, macrofagi e cellule natural-killer dei Vertebrati oltre a sistemi molecolari complessi come il sistema del complemento (Alberts et al., 2009).

1.1.1 Immunità cellulo-mediata

Il riconoscimento di pattern molecolari conservati dei patogeni causa l'attivazione, nei Vertebrati, dei leucociti: granulociti neutrofili, macrofagi, monociti, cellule dendritiche. Il loro ruolo principale è quello di immunità cellulo-mediata che include: fagocitosi, lisi della cellula bersaglio, ed immunomodulazione. Per l'attivazione di queste cellule vengono riconosciuti i PAMP (pathogen associated molecular patterns), si tratta di pattern molecolari, costituiti ad esempio da zuccheri sulla superficie del microrganismo, che durante l'evoluzione si sono conservati e quindi permettono all'organismo di individuare la presenza di un patogeno e generare una risposta aspecifica, ma selettiva (Alberts et al., 2009).

1.1.2 Immunità umorale

La componente umorale della risposta immunitaria innata comprende: il sistema del complemento, il CAS (contact activation system) e le lectine. Il CAS è una cascata di proteasi plasmatiche che legano la superficie batterica e promuovono coagulazione e infiammazione, molti componenti di questo sistema inoltre promuovono il taglio proteolitico di C3 e C5, questo suggerisce un certo livello di collaborazione tra i due sistemi (Shishido, 2012). Molte lectine fanno parte di famiglie di PRR (pattern recognition receptors) che riconoscono specifici zuccheri sulla superficie delle cellule e quindi diversi patogeni e ligandi intrinseci come cellule apoptotiche e componenti della matrice extracellulare (Bassi, 2009. Hirschfield, 2003). Queste proteine vengono riconosciute dai macrofagi ed altre cellule dell'immunità innata facilitando la clearance dei patogeni e dei detriti cellulari tramite fagocitosi (Shishido, 2012).

Sistema del complemento

Il sistema del complemento è una componente fondamentale dell'immunità innata che si propone come una prima linea di difesa contro cellule estranee o cellule alterate dell'organismo stesso (Ricklin, 2010). Il sistema del complemento nei Mammiferi è composto da proteine plasmatiche prodotte principalmente a livello epatico o proteine di membrana espresse sulla superficie cellulare. Il complemento agisce a livello plasmatico, nei tessuti o sulla superficie cellulare (Kolev, 2014). Le proteine del complemento collaborano come una cascata per opsonizzare cellule bersaglio ed indurre una serie di

risposte infiammatorie mirate alla fagocitosi e al mantenimento dell'omeostasi. Il sistema del complemento può essere attivato a seconda del contesto da tre diverse vie: la classica, la via lectinica e l'alternativa, ognuna delle quali porta all'attivazione della proteina principale del complemento: C3 (Merle, 2015).

1.1.3 Immunità innata negli invertebrati

Gli invertebrati possiedono solamente l'immunità innata, ma non una semplice versione primitiva di quella dei vertebrati bensì una più evoluta e specializzata (Accorsi, 2015). Anche in assenza di linfociti, la discriminazione di varie cellule bersaglio è ottenuta mediante la diversificazione dei PRRs e delle molecole effettrici (Gosh et al., 2011). Inoltre oggi sappiamo che la caratteristica di mantenere una memoria immunitaria non è più prerogativa dell'immunità adattativa poiché un processo simile, detto priming, è stato individuato anche in alcuni invertebrati. Questo processo di priming consiste di due step: un primo step di apprendimento dove l'organismo incontra per una prima volta il patogeno ed un secondo detto di memoria dove viene appunto reclutata l'informazione acquisita dal primo contatto. Si tratta di un fenomeno ancora poco chiaro ma esperimenti su spugne, cnidari e artropodi hanno dimostrato un aumento nell'efficienza della risposta verso cellule estranee già incontrate in precedenza (Brehélin e Roch, 2008).

1.2 Immunità adattativa

L'immunità adattativa è detta anche specifica. Si tratta di un più complesso meccanismo immunitario condiviso da tutti i Vertebrati Gnatosomi (Klein et al., 1999) ed assente negli invertebrati. La risposta adattativa è altamente specifica verso molecole non-self e fornisce una protezione a lunga durata eliminando o distruggendo cellule estranee, invasori e tutte le molecole tossiche che producono. Grazie alla sua specificità, il sistema immunitario adattativo utilizza meccanismi multipli per evitare risposte dannose contro le proprie molecole ed inoltre può anche distinguere tra classi diverse di patogeni e reclutare la forma più efficiente di risposta immunitaria adattativa per eliminarle. Questo tipo di risposte sono eseguite da globuli bianchi chiamati linfociti. Di queste ne esistono due classi che determinano due diverse tipologie di difese immunitarie adattative: immunità cellulo-mediata ed immunità umorale (Alberts et al., 2009).

1.2.1 Immunità cellulo-mediata

Le cellule deputate a questo tipo di risposta immunitaria sono i linfociti T, questi richiedono la collaborazione di cellule presentanti l'antigene (APC) che elaborano l'antigene e lo

presentano in modo che possa essere specificatamente riconosciuto dal recettore del linfocita T, il T-cell receptor. La presentazione ed il riconoscimento sono garantite dall'MHC, una proteina di membrana presente sulle APC. Dopo il riconoscimento le due classi di linfociti T avranno un'azione differente:

- Linfociti T-Helper producono delle citochine che agiscono sui linfociti B e sugli stessi linfociti T contribuendone all'attivazione.
- Linfociti T-Citotossici agiscono secernendo molecole che portano alla lisi delle cellule infettate. Questi sono impiegati soprattutto per eliminare cellule danneggiate, modificate o infettate da virus.

1.2.2 Immunità umorale

Consiste nell'attivazione dei linfociti B per secernere gli anticorpi, ossia le proteine dette immunoglobuline. Gli anticorpi entrano nel flusso sanguigno e legano specificatamente gli antigeni che hanno stimolato la loro produzione. Il legame antigene-anticorpo inattiva queste molecole antigeniche impedendo il legame con il recettore target e funziona anche da marcitore per guidare la fagocitosi della molecola antigenica o della cellula associata (Alberts et al., 2009).

Gli anticorpi sono costituiti da due catene leggere e due pesanti, entrambe presentano una regione variabile ed una costante; vi possono essere più tipologie di regioni costanti e queste determineranno la classe dell'immunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. La classe è fondamentale perché ognuna è specializzata in una particolare funzione, IgM sono secrete e formano strutture pentameriche riuscendo a legare fino a 10 antigeni diversi dato che sono coinvolte nella risposta adattativa più precoce, IgG vengono secrete subito dopo le IgM e fungono da ponte tra antigeni e macrofagi per promuoverne la degradazione, IgD sono anticorpi di membrana che collaborano nella risposta precoce assieme alle IgM, IgA sono tendenzialmente presenti in secrezioni (saliva, lacrime, latte etc.) sono molto importanti dato che queste secrezioni si troveranno tra l'ambiente esterno e l'organismo quindi formano una prima linea di difesa, infine le IgE sono principalmente coinvolte nella sensibilizzazione allergica. (Alberts et al., 2009).

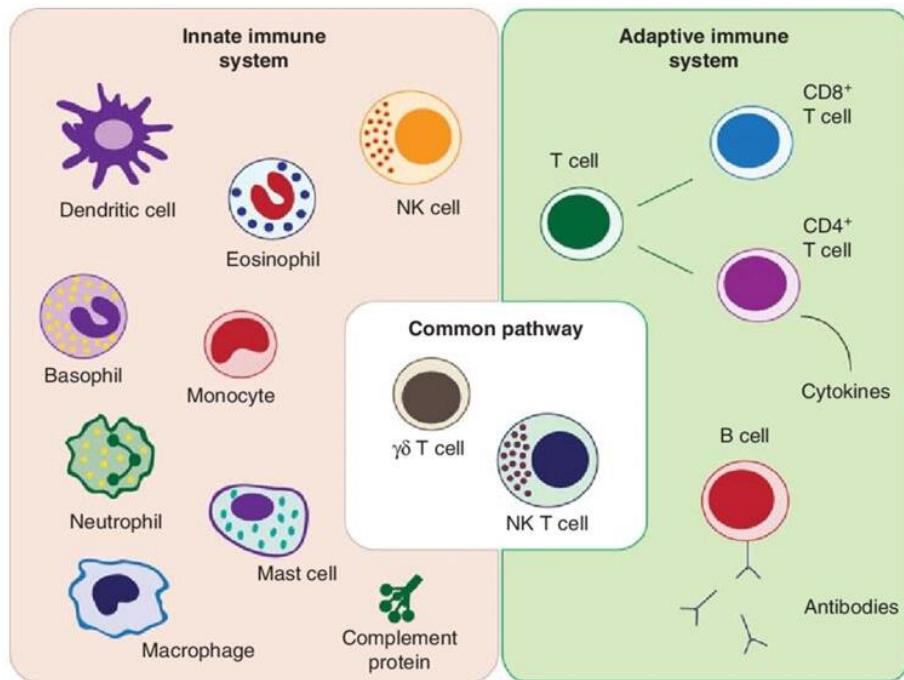


Figura 1 Panoramica del sistema immunitario dei vertebrati. Modificato da: <https://microbiologynotes.org/innate-immunity-description-functions-and-facts/>

1.3 Sistema del complemento

Il sistema del complemento, pur essendo parte dell'immunità umorale innata, ha un ruolo chiave sia nella risposta immunitaria innata che in quella adattativa (Kohl et al., 2006). È formato da più di 40 proteine plasmatiche con funzione enzimatica o di legame. Il sistema del complemento contribuisce a numerose funzioni come fagocitosi, lisi cellulare, infiammazione, solubilizzazione degli immunocomplessi, rimozione delle cellule apoptotiche e stimolazione della risposta immune umorale (Shmidt, 2000).

Nei vertebrati sono conosciute 3 vie di attivazione: la classica, la via lectinica e la via alternativa. Tutte comprendono al loro interno una molecola capace di riconoscere e legare la superficie microrganica ed una serina proteasi, che quando attivata, esegue il taglio della proteina C3 in C3a e C3b. C3 rappresenta l'elemento fondamentale del sistema del complemento dato che ha la capacità di esercitare un ruolo nell'opsonizzazione mediante legame di C3b sulla superficie microrganica, ma può anche reclutare gli immunociti sul sito di infusione tramite rilascio di C3a ed eventualmente portare alla lisi cellulare tramite formazione del Complesso di Attacco alla Membrana (MAC) (Song et al., 2000).

Nella via alternativa C3b richiede l'interazione con il fattore B (Bf), una proteasi, per formare la C3 convertasi che promuove la formazione di C3a e C3b. Il legame di C3b alla

convertasi attivata causa un cambiamento nell'affinità per il substrato del complesso enzimatico che esegue, nei soli Vertebrati, il taglio di C5 in C5a e C5b che avrà un ruolo iniziale nell'assemblaggio del MAC. La via lectinica inizia con il riconoscimento di zuccheri su superfici cellulari da parte di lectine come le MBLs (mannose-binding lectins), che portano all'attivazione di una serina proteasi associata alle MBLs (MASPs) la quale eseguirà il taglio di C3 in C3a e C3b (Wallis, 2007). La via classica, a differenza delle precedenti, inizia con lo specifico riconoscimento micrubbico da parte degli anticorpi che interagiranno con C1q che è associato a due serin-proteasi (C1r e C1s), questa via è esclusiva dei Vertebrati (Walport, 2001).

Nel caso degli invertebrati oggi sappiamo che molecole appartenenti alla via lectinica ed alternativa sono presenti in molti taxa così come ubiquitario sembra essere C3. Ma dati specifici sulla funzionalità di queste molecole sono ancora rari e presenti in alcune poche specie (Nonaka et al., 1999).

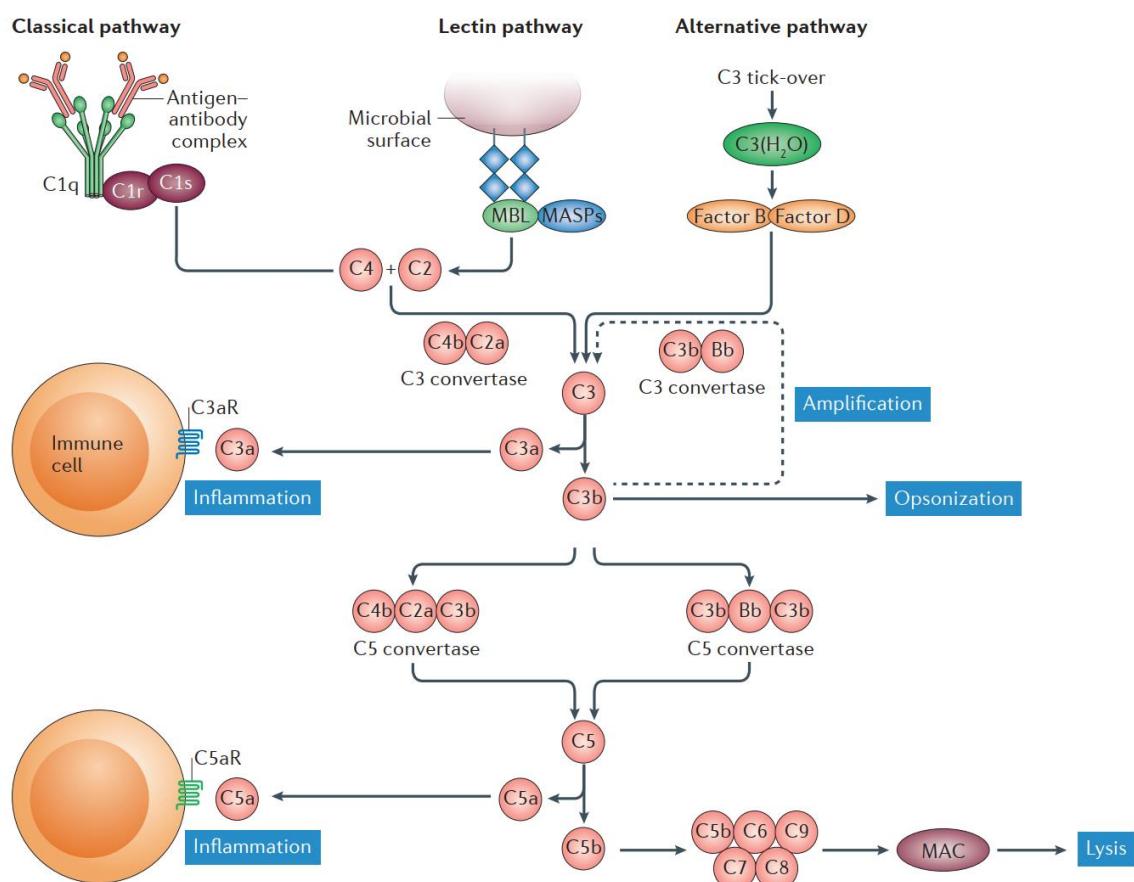


Figura 2 Sistema del complemento. Modificata da: Trouw, 2017.

1.3.2 Funzioni non immunitarie del complemento

Con l'avanzare della ricerca sono state evidenziate molte funzioni definite anche “non canoniche” per il sistema del Complemento tra le quali: controllo nella morfogenesi dei tessuti, riparazione delle ferite e pruning sinaptico. Come costante, la presenza di molecole associate al complemento garantisce la prevenzione della risposta autoimmune ad esempio in spermatozoi e durante lo stadio di blastocisti. In particolare negli spermatozoi alcune molecole del Sistema del Complemento aiutano l'interazione oocita-spermatozoo e facilitano la fecondazione (Harris et al., 2006. Rooney et al., 1996), allo stadio di blastocisti contribuiscono allo sviluppo della massa cellulare interna e del trofoblasto (Taylor et al., 1996), durante l'organogenesi (piu specificatamente durante la neurulazione) facilitano la chiusura del tubo neurale e contribuiscono alla migrazione delle cellule delle creste neurali (Danny et al., 2016), inoltre partecipano al pruning sinaptico ossia il rimodellamento di alcune connessioni sinaptiche per la maturazione dei circuiti neurali (Stevens et al., 2007) mentre nella formazione della placenta sembrano avere un compito di prevenzione contro eventuali patogeni (Stevens et al., 2007. Faulk et al., 1980.).

A livello di organismo adulto le proteine del complemento sono coinvolte in processi vitali delle cellule andando ad influenzarne proliferazione, differenziazione e collocazione (Hawksworth et al., 2018).

1.4 *Pomacea canaliculata*

Pomacea canaliculata (*Pc*) è un mollusco gasteropode d'acqua dolce interessante da più punti di vista, soprattutto per la sua grande resistenza a condizioni di stress e spiccate capacità rigenerative nell'organismo adulto (Bever et al., 1988. Accorsi et al., 2017). L'elevata fecondità e capacità di adattamento di *Pc* ad un ampia varietà di ambienti la rende una delle 100 specie più invasive secondo l'ISSG (Invasive Species Specialist Group) (View 100 of the world's worst invasive alien species, 2000). *Pc* è anche un ospite intermedio del nematode parassita umano *Angiostrongylus cantonensis* perciò è molto studiata per la sua eradicazione (Yang et al., 2013). Il sistema immunitario di *Pc* è composto da una componente cellulare, gli emociti, ed una componente umorale (Smith et al., 2016). Attualmente esistono informazioni circa la morfologia (Accorsi et al., 2013. Cueto, 2015) e la proliferazione (Accorsi, 2014) degli emociti ma sono pochi i dati molecolari.

2. Scopo della tesi

Numerosi studi hanno evidenziato la presenza di geni per il Sistema del Complemento in molti taxa di animali invertebrati. Anche se il trascritto per C3 è stato descritto già in alcuni bivalvi poco o nulla si conosce per i molluschi Gasteropodi (Peng, 2016). Con il seguente lavoro l'obbiettivo è quello di provare l'esistenza di una sequenza C3-simile nel mollusco Gasteropode *P.canaliculata*, standardizzare un profilo di PCR atto alla produzione di amplificati, determinare in modo preliminare la localizzazione tissutale del trascritto e mettere a punto i primer da rtPCR per la valutazione dell'espressione.

3. Risultati

3.1 Standardizzazione del programma di PCR per la sequenza C3-simile

Sono stati eseguiti screening dei tessuti utilizzando diverse temperature di appaiamento in PCR. Come si può osservare in Figura 3, i risultati con una miglior resa in termine di intensità d'emissione ed assenza di amplificati inattesi sono i campioni con temperatura di appaiamento tra 56,6°C e 61,8°C, queste temperature verranno quindi adottate nei protocolli di PCR. Delle varie coppie di primer testate sono state selezionate la coppia PC3rt F2 – PC3rt R2 e la coppia Pcc3 F3 – Pcc3 R3.

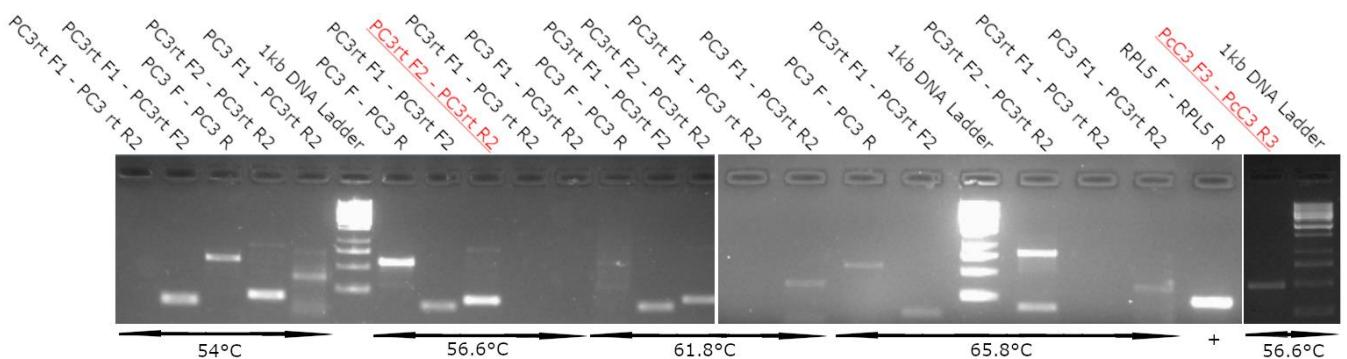


Figura 3 Screening delle temperature d'appaiamento delle varie combinazioni di primer. Il campone utilizzato è cDNA retrotrascritto da ampolla.

3.2 Localizzazione tissutale del trascritto C3-simile

Le amplificazioni con i diversi primer per il trascritto di C3 di *Pomacea canaliculata* (Pcc3) ha dato esito positivo nei campioni di cDNA estratti da: ampolla, tentacolo, rene anteriore, muscolo del piede, emociti, gangli, occhi e cuore. Inoltre è stato evidenziato che l'estrazione di RNA con il kit Promega Quick-RNA MiniPrep è risultato ottimale per i tessuti di ampolla, tentacolo, rene anteriore, muscolo piede ed emociti. Il metodo di estrazione con il TRIreagent è risultato invece ottimale per i tessuti di gangli, occhi e cuore. Le due coppie di primer considerate hanno dato esito di amplificazione negativo per alcuni tessuti e alcuni metodi di estrazione (Tabella 1 e Figura 4).

Campione	Metodo di estrazione	PcC3
Ampolla	Quick-RNA MiniPrep	x
Branchie	TRI reagent	
Cuore	TRI reagent	x
Emociti	Quick-RNA MiniPrep	x
Gangli	Quick-RNA MiniPrep	
Ghiandola del tuorlo	Quick-RNA MiniPrep	
Ghiandola digerente	Quick-RNA MiniPrep	
Gonade femminile	Quick-RNA MiniPrep	
Intestino	TRI reagent	
Mantello	TRI reagent	
Muscolo piede	Quick-RNA MiniPrep	x
Occhi	TRI reagent	x
Polmone	Quick-RNA MiniPrep	
Rene anteriore	Quick-RNA MiniPrep	x
Rene posteriore	Quick-RNA MiniPrep	
Tentacolo	Quick-RNA MiniPrep	x

Tabella 1 Screening tessuti per Pcc3.

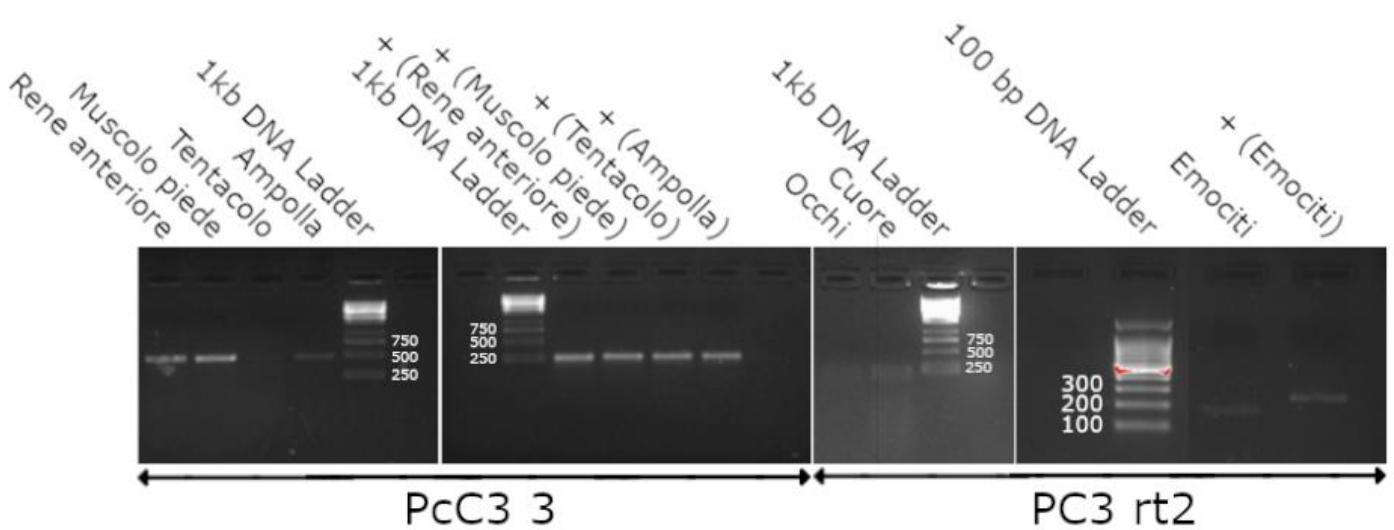


Figura 4 Screening dei tessuti di *P.canaliculata*. Segnati con “+” i controlli positivi con primer per RPL5.

4 Discussione

Dei primer disegnati sulle sequenze di *P. canaliculata* e depositati nelle banche dati NCBI solo alcuni hanno dato un esito di amplificazione positivo con ampliconi delle dimensioni attese. Tali ampliconi sono presenti solo da campioni di: rene anteriore, muscolo piede, tentacolo, ampolla, emociti, gangli, occhi e cuore. Si tratta sicuramente di un risultato preliminare che necessita della validazione data dal sequenziamento degli ampliconi ottenuti, però può fornire importanti informazioni per proseguire con ulteriori studi atti a determinare in modo più sicuro l'espressione e la localizzazione tissutale del C3 in *P. canaliculata*. Questo non toglie il fatto che si possano formulare delle ipotesi supportate dai dati ricavati con l'esperienza.

Proteine C3-simili e relativi trascritti sono sempre più individuate in invertebrati (Nonaka, 2011) questo indica l'alta conservazione delle componenti del sistema del complemento durante il processo evolutivo che ha portato fino ai vertebrati. Una proteina C3-simile è stata identificata in molluschi bivalvi (Chen, Yongxia et al., 2018) la quale presenta i domini altamente conservati. I tessuti in cui è stata individuata l'espressione comprendono emociti, branchie, epatopancreas, muscolo abduttore, mantello, gonade e ghiandola digestiva. L'espressione maggiore è stata rilevata nelle branchie, seguita poi dagli emociti ed epatopancreas (Chen, Yongxia et al., 2018). Il nostro studio ha evidenziato la presenza in emociti, questa è molto probabile visto il ruolo cardine nella difesa immunitaria degli invertebrati che possiedono queste cellule (Smith et al., 2016).

L'origine degli immunociti avviene in tessuti connettivi ed organi specializzati che vengono denominati amebocyte producing organs (APO), questi sono stati osservati nel mollusco *Biomphalaria glabrata* e definiti come piccole aree di aggregati cellulari situati tra il monostrato di epitelio pericardico e le cellule epiteliali del mantello posteriore e spesso queste masse cellulari si trovano anche in vicinanza del rene (Jeong et al., 1983). In *P. canaliculata* gli emociti sembrano essere generati vicino al cuore a livello della vena polmonare che si affaccia sulla cavità pericardica (Accorsi et al., 2014). Questo può indicare che essendo in probabile associazione con la genesi degli immunociti, i quali contengono la sequenza C3-simile, i tessuti di cuore e rene anteriore risultati positivi a screening esprimono PcC3 per il corretto sviluppo degli emociti.

Il rene a livello dei gasteropodi ha principalmente il compito di osmoregolazione sia a livello di organismi acquatici che terrestri ma è coinvolto anche nell'escrezione di sostanze di

scarto. Per svolgere la funzione di filtrazione, essendo un celomodotto, sarà a stretto contatto con l'emolinfa, l'ipotesi è che potendo facilmente venire in contatto con patogeni o molecole dannose la presenza di PcC3 a livello di questo distretto possa essere fondamentale nella risposta immunitaria.

Studi hanno dimostrato la capacità di *P.canaliculata* di rigenerare l'occhio a camera (Accorsi et al., 2018) ed il tentacolo (Accorsi, 2015). Durante tale processo di rigenerazione gli emoti si infiltrano nell'organo e qui permangono per le prime 24 ore, questo suggerisce che probabilmente queste cellule sono importanti attori nella prima fase del processo rigenerativo del tentacolo in *P.canaliculata* (Bergamini et al., 2021). Possiamo sospettare quindi in una partecipazione da parte del complemento nel processo di fagocitosi delle cellule danneggiate o morte necessario alla ricostituzione dei vari tessuti, quindi la presenza di PcC3 potrebbe essere dovuta ad immunociti residenti in questi tessuti con grande capacità rigenerativa.

Dato che *P.canaliculata* è un gasteropode possiede un sistema circolatorio aperto quindi gli organi sono a contatto diretto con l'emolinfa, nel processo di prelievo dei tessuti potrebbero aver adeso al campione degli immunociti circolanti dando così dei falsi positivi. Possiamo dire in ogni caso con un buon grado di sicurezza che l'esperienza ha prodotto dati utili circa la localizzazione tissutale visto che non tutti i tessuti hanno dato positività alla presenza di PcC3 pur avendo preso in analisi anche organi a stretto contatto con l'emolinfa come l'intestino. Future indagini chiariranno questo punto.

Avendo dimostrato la presenza di una sequenza C3-simile si potrà procedere con la caratterizzazione della proteina codificata da tale sequenza e la valutazione di eventuali ulteriori componenti del Sistema Del Complemento in *P.canaliculata*, se dovessero avere esito positivo potrebbe diventare un utile organismo nella valutazione della storia evolutiva del sistema del complemento e renderebbe possibile svolgere analisi che potrebbero suggerire un eventuale coinvolgimento di quest'ultimo in processi di rigenerazione.

Le prospettive future per questo lavoro sono svariate, sicuramente l'impiego dei primer per rtPCR nella valutazione dell'espressione del trascritto PCC3 nei vari tessuti è un passaggio chiave per ottenere ancora più informazioni circa la regolazione dell'espressione di questo gene. Avendo inoltre degli amplificati del gene, si potranno da qui costituire delle sonde per ibridazione *in situ* andando così a verificare l'ipotesi circa la localizzazione tissutale.

5 Conclusioni

L'esperienza ha confermato la presenza di un trascritto C3-simile nel gasteropode *Pomacea canaliculata*, sono stati inoltre identificati gli organi o tessuti nel quale è espresso. Lo studio necessita di ulteriori analisi per confermare la localizzazione tissutale a causa di una possibile contaminazione dei tessuti da parte di emociti circolanti dovuti al fatto che l'organismo trattato possiede un sistema circolatorio aperto.

Lo studio ha inoltre prodotto un profilo di PCR adatto ai primer disegnati appositamente per l'esperienza e di conseguenza ha aperto la strada a futuri esperimenti che coinvolgeranno gli ampliconi ottenuti per la formazione di sonde per ibridazione *in situ* e valutazione dell'espressione del gene Pcc3 in modo da ottenere più informazioni circa il suo funzionamento e coinvolgimento nei processi cellulari.

6 Materiali e metodi

6.1 Animali

Le specie di *P.canaliculata* sono state acquistate da T.A.F. Trans Aquarium Fish srl (Torino, Italia) e mantenute in acquari riempiti d'acqua areata a 23.1°C. Organismi adulti ed attivi nella riproduzione (diametro della conchiglia 35-55 mm) sono stati mantenuti in un acquario separato. Gli animali sono stati nutriti *ad libitum* con verdure e frutta. Il 10-20% del contenuto dell'acquario è stato regolarmente sostituito. Il benessere degli animali è stato accertato dalla continua valutazione della riproduzione in acquario. Per i prelievi di campioni gli animali sono stati lasciati in una vasca separata per 24 ore prima di proseguire al prelievo.

6.2 Prelievo dei campioni

Il prelievo di emolinfa è stato effettuato applicando una lieve e continua pressione a livello dell'opercolo, sono stati prelevati circa 2 ml di emolinfa all'interno di un tubo posto in ghiaccio in modo da evitare l'adesione delle cellule e la coagulazione. Il prelievo dei restanti tessuti è stato eseguito dal Dott. Franchi ed i campioni conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione.

6.3 Estrazione RNA

L'estrazione di RNA totale dai vari campioni appartenenti ai diversi tessuti è stata eseguita con il kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo research) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. In breve: i tessuti sono stati omogeneizzati in un volume di 300-600 µl di buffer di lisi. Il lisato è stato trasferito in un filtro Spin-Away™ (giallo) posto in un tubo per poi essere centrifugato. È stato aggiunto un volume di etanolo 95% al filtrato e trasferito poi in una colonna Zymo-Spin™ IIICG Column (verde), dopo un passaggio di centrifugazione ne è stato eseguito un ulteriore dopo aggiunta di 400 µl di buffer di lavaggio. Viene quindi scartato il filtrato ed aggiunti al filtro 80 µl di una soluzione composta da DNAsi e buffer di digestione. Dopo aver lasciato riposare per 15 minuti a temperatura ambiente abbiamo aggiunto 400 µl di prep buffer e centrifugato. Rimosso il filtrato sono stati poi aggiunti 700 µl di buffer di lavaggio e centrifugato. Rimosso per un'ultima volta il filtrato è stato compiuta un'ultima centrifugazione per 1 minuto in modo da assicurarsi la completa rimozione del buffer di lavaggio dal filtro. A questo punto l'RNA è stato eluito in 75 µl di acqua RNAsi-free. I passaggi in centrifuga sono stati eseguiti per 30 secondi a 10000 giri.

E' stata utilizzata anche la metodica del TRI reagent (Sigma aldrich). Questa consiste nel omogeneizzazione del tessuto in 1ml di TRIreagent aiutandosi con pestello, vortex ed eventualmente con una pipetta se il residuo è molto grande. Sono poi stati aggiunti 200 μ l di cloroformio e lasciato riposare a temperatura ambiente per 5 minuti. In seguito è stato centrifugato il campione per 15 minuti a 12000 giri, sono poi stati aggiunti 500 μ l di isopropanolo e lasciato a riposare per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente è stato fatto un ultimo passaggio di centrifugazione per 10 minuti a 12000 giri, è stato poi rimosso il surnatante con una pipetta e risospeso l'RNA in 20 μ l di acqua RNAsi free.

La pulizia dell'estratto è stata determinata tramite osservazione spettrofotometrica con NanoDrop valutando il rapporto A260/280 e A260/230. L'integrità è stata verificata tramite visualizzazione degli RNA su gel di agarosio (1.5%) con etidio bromuro.

6.4 Retrotrascrizione

I filamenti di cDNA sono stati retrotrascritti partendo dagli RNA estratti utilizzando il kit iScript (biorad) seguendo il protocollo fornito con il kit. In breve le reazioni di retrotrascrizione sono state eseguite in un volume di 20 μ l contenente 1 ng di RNA estratto dai tessuti di *P.canaliculata*, 1 μ l di retrotrascrittasi iScript, 4 μ l di iScript Reaction Mix, acqua RNAsi free fino a volume. Il termociclatore Applied biosystems è stato impostato con il seguente programma: 25°C per 5 minuti, 46°C per 20 minuti, 95°C per 1 minuto.

6.5 Polymerase chain reaction (PCR)

L'amplificazione dei cDNA è stata ottenuta attraverso l'uso di primer appositamente disegnati per il progetto riportati in tabella 2.

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume di 25 μ l contenente 100 ng di cDNA retrotrascritti dai vari campioni di *P. canaliculata*, 5 μ l di reaction buffer 10x (Gotaq promega g2 kit), 0.5 μ l dNTPs 10mM, 0.5 μ l di primer forward e reverse, 1 μ l di cDNA, 0.2 μ l di DNA polimerasi GoTaq (Gotaq promega g2 kit), acqua RNAsi free fino a volume. Le PCR sono state eseguite in un termociclatore Applied biosystems con il seguente programma: 95°C per 5 minuti, poi 35-40 cicli a 95°C per 30 secondi, 56-57°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi - 1 minuto, ed infine 72°C per 10 minuti. Gli ampliconi sono stati successivamente analizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio e bromuro di etidio all'1,5%.

Primer	Sequenze 5'-3'	Amplificato atteso
PC3 F1	TAGTGCATGGGAGATTGCTAG	572 bp
PC3 R1	TGTACCTCTTCTCCAAGTGATGC	
PC3rt F1	ACCTTCTCACTGACCAACAAAGT	130 bp
PC3rt R1	CTAGCAAATCTCCCATGGCACTA	
PC3rt F2	AGCCAGCGAAAGTTCAAGTTAC	180 bp
PC3rt R2	GCCAGTCTTATCATGCCATGTG	
PCC3 F2	TGTTGCAGCAATTCTTCTGG	360 bp
PCC3 R2	CACATACCTCCATGCACAGG	
PCC3 F3	CCTGTGCATGGAGGTATGTG	478 bp
PCC3 R3	CACCGTCAACACGTTGGTAG	
RPL5 F	CGTATGCCAGAATTGAGGGT	250 bp
RPL5 R	CAACATCCAAGTATGCACGG	

Tabella 2 Primer utilizzati

6.6 Elettroforesi su gel di agarosio

Le corse elettroforetiche sono state eseguite su gel di agarosio 1.5% e 5 µl bromuro di etidio; questo è stato preparato con TBE 1x (da TBE 10x: Tris, acido borico ed EDTA) come tampone di corsa. I risultati sono poi stati osservati tramite Gel doc XR (Bio-rad).

Bibliografia

- A.Accorsi, E. Ross, E. Ottaviani, A. S. Alvarado, Eur. J. Histochem. 2017, 61, 1.
- Accorsi, A. Soluble Factors in the Immune-Neuroendocrine System of Invertebrate Models. Ph.D. Thesis, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy, 2015.
- Accorsi, Alice, Enzo Ottaviani, and Davide Malagoli. "Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*." *Fish & Shellfish Immunology* 38.1 (2014): 56-64.
- Accorsi, Alice, et al. "Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*." *Fish & shellfish immunology* 34.5 (2013): 1260-1268.
- Accorsi, Alice, et al. "Complete Regeneration of a Camera-type Eye in the Research Organism *Pomacea canaliculata*." *The FASEB Journal* 32 (2018): 232-4.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, and Osamu Takeuchi. "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124.4 (2006): 783-801.
- Alberts, Bruce, et al. *Biologia molecolare della cellula*. Bologna: Zanichelli, 2009.
- Bassi, N., et al. "Pentraxins, anti-pentraxin antibodies, and atherosclerosis." *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 37.1 (2009): 36-43.
- Bergamini, Giulia, et al. "A New Protocol of Computer-Assisted Image Analysis Highlights the Presence of Hemocytes in the Regenerating Cephalic Tentacles of Adult *Pomacea canaliculata*." *International journal of molecular sciences* 22.9 (2021): 5023.
- Beutler, Bruce. "Innate immunity: an overview." *Molecular immunology* 40.12 (2004): 845-859.
- Bever, Michele Miller, and Richard B. Borgens. "Eye regeneration in the mystery snail." *Journal of Experimental Zoology* 245.1 (1988): 33-42.
- Brehélin, Michel, and Patricia Roch. "Specificity, learning and memory in the innate immune response." *Invertebrate Survival Journal* 5.2 (2008): 103-109.
- Cueto, J. A., Rodriguez, C., Vega, I. A., & Castro-Vazquez, A. (2015). Immune defenses of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): phagocytic hemocytes in the circulation and the kidney. *PLoS One*, 10(4), e0123964.
- Denny, Kerina J., et al. "C5a receptor signaling prevents folate deficiency-induced neural tube defects in mice." *The Journal of Immunology* 190.7 (2013): 3493-3499.
- Faulk, W. P., et al. "Immunological studies of human placentae: complement components in immature and mature chorionic villi." *Clinical and experimental immunology* 40.2 (1980): 299.
- Akira,

Shizuo, Satoshi Uematsu, and Osamu Takeuchi. "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124.4 (2006): 783-801.

Ghosh, Julie, et al. "Invertebrate immune diversity." *Developmental & Comparative Immunology* 35.9 (2011): 959-974.

Harris, Claire L., Masashi Mizuno, and B. Paul Morgan. "Complement and complement regulators in the male reproductive system." *Molecular immunology* 43.1-2 (2006): 57-67. Accorsi, A. Soluble Factors in the Immune-Neuroendocrine System of Invertebrate Models. Ph.D. Thesis, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy, 2015.

Haworth, Owen A., et al. "Complement in stem cells and development." *Seminars in Immunology*. Vol. 37. Academic Press, 2018.

Hirschfield, Gideon M., et al. "Human C-reactive protein does not protect against acute lipopolysaccharide challenge in mice." *The Journal of Immunology* 171.11 (2003): 6046-6051.

Kimbrell, Deborah A., and Bruce Beutler. "The evolution and genetics of innate immunity." *Nature Reviews Genetics* 2.4 (2001): 256-267.

Klein, Jan, and Vaclav Horejsi. *Immunology*. Wiley-Blackwell, 1999.

Köhl, Jörg. "The role of complement in danger sensing and transmission." *Immunologic research* 34.2 (2006): 157-176.

Kolev, Martin, Gaelle Le Friec, and Claudia Kemper. "Complement—tapping into new sites and effector systems." *Nature Reviews Immunology* 14.12 (2014): 811-820.

Merle, Nicolas S., et al. "Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation." *Frontiers in immunology* 6 (2015): 262.

Nonaka, Masaru, et al. "Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*." *The Journal of Immunology* 162.1 (1999): 387-391.

Ochsenbein, Adrian F., et al. "Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies." *Science* 286.5447 (1999): 2156-2159.

Peng, Maoxiao, et al. "Complement C3 gene: expression characterization and innate immune response in razor clam *Sinonovacula constricta*." *Fish & shellfish immunology* 55 (2016): 223-232.

Ricklin, Daniel, et al. "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." *Nature immunology* 11.9 (2010): 785-797.

Rooney, Isabelle A., John E. Heuser, and John P. Atkinson. "GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells." *The Journal of clinical investigation* 97.7 (1996): 1675-1686.

Schmidt, Bela Z., and Harvey R. Colten. "Complement: a critical test of its biological importance." *Immunological reviews* 178 (2000): 166-176.

Shishido, Stephanie N., et al. "Humoral innate immune response and disease." *Clinical immunology* 144.2 (2012): 142-158.

Smith, Valerie J., Alice Accorsi, and Davide Malagoli. "Hematopoiesis and hemocytes in pancrustacean and molluscan models." *The evolution of the immune system*. Academic Press, 2016. 1-28.

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

Stevens, Beth, et al. "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." *Cell* 131.6 (2007): 1164-1178. Accorsi, Alice, et al. "Complete Regeneration of a Camera-type Eye in the Research Organism *Pomacea canaliculata*." *The FASEB Journal* 32 (2018): 232-4.

Stevens, Beth, et al. "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." *Cell* 131.6 (2007): 1164-1178.

Taylor, Clare T., and Peter M. Johnson. "Complement-binding proteins are strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes." *Mol Hum Reprod* 2.1 (1996): 52-59. Accorsi, Alice, Enzo Ottaviani, and Davide Malagoli. "Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*." *Fish & Shellfish Immunology* 38.1 (2014): 56-64.

Trouw, Leendert A., Matthew C. Pickering, and Anna M. Blom. "The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease." *Nature Reviews Rheumatology* 13.9 (2017): 538-547.

V. J. Smith, A. Accorsi, D. Malagoli, in *The Evolution of the Immune System: Conservation and Diversification*, 1st ed. (Ed: D. Malagoli), Academic Press/Elsevier, Cambridge, Massachusetts, USA 2016, Ch. 1.

View 100 of the world's worst invasive alien species, December 2000. Updated and reprinted version: November 2004. https://www.issg.org/worst100_species.html.

Wallis, Russell. "Interactions between mannose-binding lectin and MASP during complement activation by the lectin pathway." *Immunobiology* 212.4-5 (2007): 289-299.

Walport, Mark J. "Complement first of two parts." *N Engl J Med*. 344 (2001): 1058-1066.

Yang, Ting-Bao, Zhong-Dao Wu, and Zhao-Rong Lun. "The apple snail *Pomacea canaliculata*, a novel vector of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*: its introduction, spread, and control in China." *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health* 72.6 Suppl 2 (2013): 23.