

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI

DOTTORATO DI RICERCA IN EVOLUZIONE BIOLOGICA E
BIOCHIMICA - XIX CICLO

ATTIVITÀ CELLULARI E MOLECOLARI
NEI LEUCITI DEI TELESOTEI

(Settore scientifico-disciplinare: BIO 05)

Tutor: Prof. Massimo Mazzini

Correlatore: Prof. Giuseppe Scapigliati

Firma:

Firma:

Coordinatore: Prof. Lucia Mastrolia

Dottoranda: Stefania Benedetti

Firma:

Firma:

*Ai miei genitori
per il loro sostegno*

a Marco

*“Ich sah dich, und die milde Freude
Floß aus dem süßen Blick auf mich.
Ganz war mein Herz an deiner Seite,
Und jeder Atemzug für dich“*

Io credo nel mio Dio Onnipotente.

Nella Mente che tutto comprende.

Nel cuore misericordioso

e nel braccio vittorioso.

Io credo nella Spada che non fallisce.

Nella Vita che non finisce.

Nella Giustizia mai assente.

La Libertà che non si svende.

Nella Dignità perigliosa.

Nella Carità meravigliosa

Nello Scudo per l'indifeso.

Nel Guanto per chi è offeso.

Io credo nella Fede implacabile.

Nella Forza incrollabile.

Nell'Onore per mantello.

La Verità per suggello.

Nel Sogno incandescente.

Nell'Amore sorprendente.

Io credo nel coraggio di chi osa.

Nella certezza che mai riposa.

Negli antichi padri e la loro Gloria.

In chi ero, sono e ancor sarò. Nella mia storia.

Io credo nella Volontà che non vacilla.

Nella Conoscenza che scintilla.

Nello Spirito non cadente.

La pietra e la stella che tocca a me far più splendente.

Nella Magia del Mondo, il Fato e nel mio cammino.

Io credo nel mio destino!

La candidata **Benedetti Stefania**, ha frequentato il triennio del corso di Dottorato in “Evoluzione Biologica e Biochimica” (XIX ciclo), svolgendo una tesi dal titolo “*Attività cellulari e molecolari nei leucociti dei Teleostei*”. In particolare, si è dedicata allo studio della trasduzione del segnale via calcio, indotta da: IL-1 β ricombinante, terreno condizionato, *Photobacterium damsela* e nodavirus, ed ha investigato gli effetti della stimolazione sia a livello cellulare che a livello molecolare.

Durante gli anni del corso di Dottorato ha avuto modo di apprendere numerose tecniche, in particolare: produzione e purificazione di citochine ricombinati, stimolazione cellulare, misurazione del calcio intracellulare, purificazione per sorting magnetico, cross-linking, SDS-PAGE, western blotting, 2D-gel, marcature metaboliche, proteomica, reazioni “MLR”. Durante il suo soggiorno presso l’Istituto Regina Elena di Roma ha, inoltre, imparato a manipolare sostanze radioattive.

Nel triennio ha sempre svolto autonomamente e con perizia il suo lavoro presso il Laboratorio di Biotecnologie Animali e Zoologia Applicata dell’Università degli studi della Tuscia (prof. Giuseppe Scapigliati), ed ha partecipato alla vita del laboratorio partecipando anche ad altri progetti di ricerca in studio nel suddetto laboratorio. Il suo impegno è stato sempre continuo e i risultati del suo lavoro sono stati pubblicati su diverse riviste scientifiche di buon livello internazionale e discusso in numerosi congressi sia nazionali che internazionali. Ha, inoltre, partecipato a diversi corsi per approfondire le sue conoscenze in ambito biochimico e biotecnologico, ed è risultata vincitrice di premi di ricerca e borse di specializzazione, come mostrato nel curriculum allegato.

Per i motivi esposti, ritengo che la candidata abbia raggiunto una buona maturità scientifica, che risulta del tutto idonea per il titolo di Dottore di Ricerca che si accinge a conseguire.

Visto che il prof. Mazzini è fuori per motivi logistici, la dottoranda è stata valutata, dopo aver sentito il professore, dalla sottoscritta prof. Anna Maria Fausto, docente nel settore zoologico e facente parte del consiglio di questo Dottorato. Pertanto tale giudizio scaturisce da collaborazione tra il prof. Mazzini e me.

Prof. Anna Maria Fausto

CURRICULUM VITAE

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI SCIENTIFICI

2004

XVII Meeting of the Protein Workgroup

E. Randelli, M. Forlenza, S. Meloni, **S. Benedetti**, C.J. Secombes, J. Zou, G. Scapigliati, S. Costantini, A. Facchiano, F. Buonocore POTENTIAL APPLICATION OF SEA BASS INTERLEUKIN-1 β IN FISH VACCINATION. Viterbo, 20-22 maggio.

65° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana

F. Buonocore, E. Ovidi, D. Casani, E. Randelli, **S. Benedetti**, S. Meloni, G. Scapigliati, M. Mazzini PRODUZIONE DI IMMUNOGLOBULINE NELLA SPIGOLA (*Dicentrarchus labrax*) dopo vaccinazione contro *Vibrio anguillarum* tramite marcatori molecolari e cellulari. Taormina-Giardini-Naxos (ME), 21-25 settembre.

2005

7° Incontro scientifico della Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo

S. Benedetti, M. Tiberi, E. Randelli, F. Buonocore, M. Mazzini and G. Scapigliati RECOMBINANT IL-1 β DIRECTLY AFFECTS INTRACELLULAR Ca²⁺ CONCENTRATION ON LEUCOCYTES OF THE SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*). Trapani, 10-12 febbraio.

7° Incontro scientifico della Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo

S. Meloni, G. Zarletti, S. Benedetti, E. Randelli, F. Buonocore, G. Scapigliati
LYMPHOCYTE ACTIVITIES “IN VITRO” OF THE SEA BASS *DICENTRARCHUS LABRAX*. Trapani, 10-12 febbraio.

International Marine Biotechnology Conference

S. Meloni, F. Buonocore, E. Randelli, S. Benedetti, G. Zarletti, M. Mazzini and G. Scapigliati
IMMUNE SYSTEM AND BIOTECHNOLOGY: “IN VITRO” LYMPHOCYTE
ACTIVITIES OF THE SEA BASS *DICENTRARCHUS LABRAX*. Wageningen, The
Nederland, 15-16 April.

66° congresso dell’Unione Zoologica Italiana

S. Benedetti, M. Tiberi, E. Randelli, F. Buonocore, M. Mazzini, J. Zou, C. J. Secombes, G.
Scapigliati EVOLUZIONE DELLE RISPOSTE DI SEGNALAZIONE ORMONALE:
INTERLEUCHINA-1 β RICOMBINANTE DI TELEOSTEI E CONCENTRAZIONE
INTRACELLULARE DI Ca²⁺. Roma, 19-22 settembre.

2006

10° congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology

G. Scapigliati, S. Benedetti, E. Randelli, F. Buonocore, J. Zou, C.J. Secombes
EVOLUTION OF CYTOKINE RESPONSES: IL-1 β DIRECTLY AFFECTS INTRACELLULAR Ca²⁺
CONCENTRATION OF TELEOST FISH LEUKOCYTES THROUGH A RECEPTOR-
MEDIATED MECHANISM. Charleston, South Carolina (USA) 1-6 luglio.

2007

8°Incontro scientifico della Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo

F. Buonocore, E. Randelli, S. Bird, C.J., Secombes, S. Costantini, A., Facchiano, S. Benedetti,
G. Scapigliati MOLECULAR CLONING, STRUCTURAL ANALYSIS AND ANTIGEN-

INDUCED “IN VIVO” EXPRESSION OF INTERLEUKIN-10 IN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX* L.). Napoli, 1-2 marzo.

Vth SIICA National Conference

S. Benedetti, E. Randelli, F. Buonocore, J. Zou, C.J. Secombes, G. Scapigliati EVOLUTION OF CYTOKINE RESPONSES: IL-1 β DIRECTLY AFFECTS INTRACELLULAR Ca²⁺ CONCENTRATION OF TELEOST FISH LEUKOCYTES THROUGH A RECEPTOR-MEDIATED MECHANISM. Trieste, 6-9 giugno.

PUBBLICAZIONI

2004

E. Randelli, M. Forlenza, S. Meloni, **S. Benedetti**, C.J. Secombes, J. Zou, G. Scapigliati, S. Costantini, A. Facchiano, F. Buonocore POTENTIAL APPLICATION OF SEA BASS INTERLEUKIN-1 β IN FISH VACCINATION. *Italian Journal of Biochemistry* Vol. 53 (Suppl.1) p. 68.

2005

F. Buonocore, M. Forlenza, E. Randelli, **S. Benedetti**, P. Bossù, S. Meloni, C.J. Secombes, M. Mazzini and G. Scapigliati BIOLOGICAL ACTIVITY OF SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX* L.) RECOMBINANT INTERLEUKIN-1 β . *Marine Biotechnology* 7, 609-17.

2006

S. Meloni, G. Zarletti, **S. Benedetti**, E. Randelli, F. Buonocore, G. Scapigliati THE MIXED LEUKOCYTE REACTION IN THE TELEOST (*DICENTRARCHUS LABRAX*). *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 739-49

S. Benedetti, E. Randelli, F. Buonocore, J. Zou, C.J. Secombes, and G. Scapigliati EVOLUTION OF CYTOKINE RESPONSES: IL-1 β DIRECTLY AFFECTS INTRACELLULAR Ca²⁺ CONCENTRATION ON TELEOST FISH LEUKOCYTES THROUGH A RECEPTOR-MEDIATED MECHANISM. *Cytokine* **34**(1-2):9-16.

ALTRE INFORMAZIONI

2004

Abilitazione all'esercizio della professione di biologo conseguita presso la Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Partecipazione al workshop "RNA-2Day" presso l'università La Sapienza (Roma), 10-11 Giugno. Coordinazione: Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie, Consiglio Nazionale delle Ricerche

Partecipazione al corso "TUTELA DEL TERRITORIO E QUALITÀ DELL'AMBIENTE NELLA PROVINCIA DI VITERBO" presso l'università degli Studi della Tuscia (Viterbo), 29 settembre. Coordinazione: Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio; ARPA-Lazio, Regione Lazio.

Vincitrice di un contratto di prestazione occasionale presso il Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università degli studi della Tuscia-Viterbo riguardante il progetto UE QLK2-CT-2000-01076 "STIMULATION OF FISH LARVAL DEFENCE MECHANISMS AGAINST INFECTIOUS DISEASES", consistente nell'analisi immunoenzimatica di campioni di larve di spigola-Responsabile scientifico prof. G. Scapigliati.

2005

Partecipazione al corso: “LA REAL-TIME PCR NELLA VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELL’ESPRESSIONE GENICA: APPLICAZIONI IN IMMUNOBIOLOGIA” presso il Polo Universitario di Trapani, 12 febbraio. Coordinazione del corso: Società italiana di immunobiologia comparata e dello sviluppo (SIICS) e Applied Biosystems.

Vincitrice di un premio per giovani ricercatori indetto dal Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie (con sede amministrativa a Padriciano-Trieste).

Vincitrice di una borsa di specializzazione annuale della Fondazione Ca.Ri.Vit. (con sede amministrativa a Viterbo) inerente il progetto di ricerca “EVOLUZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE INNATE ED ACQUISITE”.

2006

Vincitrice di una borsa di studio del Dipartimento di Scienze Ambientali dell’Università della Tuscia (Viterbo), inerente il progetto di ricerca “IMPIEGO DI SAGGI IMMUNOENZIMATICI PER LO STUDIO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DI PESCI TELESOTEI”.

Biological Activity of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Recombinant Interleukin-1b

Francesco Buonocore,¹ Maria Forlenza,¹ Elisa Randelli,¹ Stefania Benedetti,¹ Paola Bossu,¹ Sabrina Meloni,¹ Christopher J. Secombes,² Massimo Mazzini,¹ Giuseppe Scapigliati¹

¹ Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, I-01100 Viterbo, Italy

² Scottish Fish Immunology Research Centre, University of Aberdeen, AB24 2TZ Aberdeen, Scotland

Received: 17 November 2004 / Accepted: 10 March 2005 / Online publication: 21 July 2005

Abstract

Biological activities of a putative mature sea bass interleukin-1b peptide, produced as a recombinant protein (rIL-1b) in *Escherichia coli*, have been investigated. The rIL-1b contains a 6-histidine tag at the N-terminus, and protein purification has been achieved through this tag by affinity chromatography. Biological activities have been investigated both at the cellular and gene expression levels. In *in vitro* assays sea bass rIL-1b induced the proliferation of murine D10.G4.1 cells and increased yeast phagocytosis by sea bass head kidney leukocytes. The purified cytokine was also tested in a lymphocyte-activation factor assay, where it induced the proliferation of sea bass thymocytes. Finally, in an *in vivo* assay, rIL-1b administered intraperitoneally increased expression levels of the IL-1b gene and activated macrophages to produce a cyclooxygenase 2 homologue (COX-2) gene in the head kidney.

Key words: European sea bass — cytokine — interleukin 1b — proliferation — phagocytosis — cyclooxygenase 2

Introduction

Interleukin-1 (IL-1) is a common name for a family of diverse cytokine proteins of which IL-1a (IL-1F1), IL-1b (IL-1F2), and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra, IL-1F3) are the most studied. Other members of the IL-1 family (IL-1F) have been discovered recently in mammals and include IL-1F to IL-1F10 (D.E. Smith

et al., 2000; Debets et al., 2001). In mammals IL-1a and IL-1b are produced as 31-kDa precursor molecules that have about 23% homology in their peptide sequence. In common with the fibroblast growth factor (FGF) family, IL-1F members have a b-trefoil structure composed of 12 b sheets (Nicola 1994). IL-1b has pleiotropic activity (Dinarello 1997) affecting nearly every cell type (Auron 1998). *In vivo*, IL-1 plays a pivotal role in the regulation of acute inflammatory events (Dinarello 1997). Other *in vivo* effects include the activation of lymphocytes (K.A. Smith et al., 1980) and natural killer cells (Kullberg and Vander Meer 1995), and the stimulation of macrophages to secrete proinflammatory mediators. IL-1 activity occurs as a consequence of binding to its receptor complex (IL-1R) on the cell surface of target cells (Sims and Dower 1994; Dinarello 1996), with the type I receptor transducing the signal, whereas a second, type II, receptor acts as a decoy receptor and lacks the necessary intracellular domains for signal transduction.

In recent years there has been clear evidence that fish produce IL-1b during immune responses (Secombes et al., 1999), and this cytokine has been cloned in a number of different fish species (Zou et al., 1999a; Fujiki et al., 2000; Pelegrin et al., 2001; Bird et al., 2002). In addition, 3 genes homologous to the IL-1R_I and IL-1R_{II} have been cloned in salmonids (Holland et al., 2000; Sangrador-Vegas et al., 2000; Subramaniam et al., 2002). The production of fish recombinant IL-1b (rIL-1b) molecules has allowed the characterization of *in vitro* and *in vivo* biological activities of IL-1b (Hong et al., 2001; Hong et al., 2003) and the production of a monoclonal antibody to carp rIL-1b (Mathew et al., 2002). These studies have shown that rIL-1b affects cell proliferation, phagocytosis, and immune gene expression and can act as a chemoattractant for phagocytes (Peddie

Correspondence to: Francesco Buonocore;
E-mail: fbuono@unitus.it

et al., 2001). Carp rIL-1b has also been shown to act as an adjuvant for bacterial vaccines (Yin and Kwang, 2000), and it has been demonstrated that trout rIL-1b can affect the hypothalamic-pituitary-interrenal axis (Holland et al., 2002).

Sea bass is one of the most important cultured fish species in the Mediterranean (Scapigliati et al., 2003), and the IL-1b gene has been cloned from this species (Scapigliati et al., 2001). As for other nonmammalian IL-1b molecules (Zou et al., 1999a; Engelsma et al., 2001), analysis of the sea bass IL-1b sequence reveals the absence of a putative cut site for the interleukin 1 converting enzyme (ICE) that in mammals cleaves the precursor peptide to give the biologically active mature protein. The sequence alignment, together with the gene organization (Buonocore et al., 2003) and predicted 3-dimensional molecular structure (Scapigliati et al., 2004), suggests that a possible mature peptide would start at Ala⁸⁶, giving a protein of 176 amino acids (with a predicted molecular weight of 19.7 kDa), larger than that in mammals. This putative mature peptide has been expressed in *E. coli*, purified, and tested as an immunoadjuvant (Buonocore et al., 2004). In this paper, we describe the bioactivity (Vega-Rubin de Celis et al., 2003) of the recombinant protein in a range of in vitro and in vivo immune assays.

Materials and Methods

Production and Purification of Recombinant Sea Bass IL-1b. Recombinant sea bass IL-1b was produced and purified as described previously (Buonocore et al., 2004). Briefly, rIL-1b was expressed in *E. coli* after cloning into the pQE-30 vector (Invitrogen) and purified by affinity chromatography through a 6-histidine tag present at the N-terminus of the protein. The rIL-1b purity was determined by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the endotoxin levels in the protein sample were determined with a Limulus Amebocyte Lysate Kit (LAL Test, Bio Whittaker) as previously documented (Hong et al., 2001; Buonocore et al., 2004) to ensure no lipopolysaccharide (LPS) contamination.

Proliferation of D10.G4.1 Cells. The rIL-1b biological activity was first tested in vitro using the murine D10.G4.1 cells (Th2 clone) proliferation assay (Horowitz et al., 1986). Initially the concentration of concanavalin A (Con A, from *Canavalia ensiformis*) that just caused proliferation of the murine cells was determined.

Cells were plated in triplicate at $4 \cdot 10^4$ per well in 50 μ l of RPMI medium (Gibco) plus 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) and antibiotics. To

such wells 50 μ l of serially diluted sea bass (from 0.1 to 30 ng/ml) or human (from 0.1 to 30 pg/ml) rIL-1b was added in the presence of 0.3 μ g/ml Con A (previously determined concentration) as a costimulatory factor. To the control wells 50 μ l of medium only was added. After 48 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, the cells were pulsed with 10 μ l per well of medium containing 0.5 μ Ci ³H-thymidine (Pharmacia Amersham). Subsequent to an overnight incubation the cells were harvested, and the incorporation of radioactivity was determined with a scintillation counter. Two independent experiments were performed, and the results were presented as the mean $\pm$ SE of the combined data. Data were analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA).

Proliferation of Sea Bass Thymocytes. Sea bass thymocytes were isolated from juvenile fish (20-30 g), grown, and maintained in a local fish farm (Nuova Azzurro, Civitavecchia, Italy), as described previously (Scapigliati et al., 2001). As for the D10.G4.1 cell test, a suboptimal concentration of Con A that was still capable of inducing an appreciable proliferation of thymocytes was first tested. Cells were plated in triplicate at $5 \cdot 10^5$ per well in 50 μ l of RPMI medium plus 5% FBS and antibiotics. Then 50 μ l of serially diluted sea bass (from 0.5 to 50 ng/ml) rIL-1b was added to the wells in the presence of the suboptimal concentration of Con A (0.1 ng/ml) as a costimulatory factor. After incubation for 48 hours at 18°C, cell proliferation was measured by an ATP bioluminescence method using a CytoLux Kit (Wallac, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. Luminescence emission was monitored as relative light units (RLU) over a 10-second period using a luminometer (Victor II, Wallac, PerkinElmer). Two independent experiments were performed, and the results were presented as the mean $\pm$ SE of the combined data. Data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA followed by Tukey's pairwise comparisons.

Phagocytosis of Sea Bass Head Kidney Cells. Head kidney leukocytes were purified from sea bass juveniles (300-500 g) as described previously (Scapigliati et al., 2001), and the phagocytosis assay was performed in a similar manner to that previously reported (Crampe et al., 1997; Hong et al., 2001). Briefly, the cells were adjusted to $1.6 \cdot 10^7$ viable leukocytes per milliliter of L-15 (Gibco) medium. Glass-culture chamber slides (0.5 cm², Becton Dickinson), each containing 250 μ l of head kidney cells ($4 \cdot 10^6$ cells), were incubated with

various concentrations (from 0 to 100 ng/ml) of rIL-1b for 4 hours at 18°C. Each experimental point was in triplicate. The slides were then washed twice with Hanks balanced salt solution (HBSS, Gibco) to remove nonadherent cells, and 250 μ l of a heat-killed (15 minutes in boiling water) FITC-labeled *Saccharomyces cerevisiae* yeast suspension was added at a concentration of $4.8 \cdot 10^5$ cells/ml in L-15. Phagocytosis was allowed to occur for 1 hour at 18°C in the chamber slide before excess yeast was washed off with HBSS and the slides air dried. Following methanol fixation the preparations were stained sequentially with May-Grunwald and Giemsa stains. Slides were viewed at $\times 40$ magnification on a fluorescence microscope. Approximately 100 cells were counted in random fields of view for each experimental point, and the number of phagocytosed yeast cells and the number of yeast particles engulfed by each cell were recorded. Data were expressed as the mean percentage $\pm$ SE of phagocytosis and phagocytic index and analyzed for statistical significance by one-way ANOVA followed by Tukey's pairwise comparisons.

In Vivo Induction of Immune Gene Expression. The in vivo biological activity of rIL-1b was studied through its effects on the induction of IL-1b and cyclooxygenase 2 (COX-2) homologue gene expression in head kidney leukocytes. All the solutions used were adjusted to sea bass osmolarity (360 mOsm/kg). Three different groups of 5 fish (50 g in weight) were used: one was injected intraperitoneally with 100 μ l of PBS; the second was injected intraperitoneally with 100 μ l of PBS containing 5 μ g/ml LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma); the third was injected intraperitoneally with 100 μ l of PBS containing 500 ng of rIL-1b. After 24 hours, head kidney leukocytes were isolated and total RNA was purified from cells using Tripure (Roche) following the manufacturer's instructions. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia). For complementary DNA synthesis, 1 μ g of total RNA and 0.5 μ g of random primers (pd(N)₆) were used for each reverse transcription reaction in a 50 μ l total volume. To check the RNA quality and quantity, PCRs were performed initially using primers that amplified a 543-bp product from sea bass b-actin, a gene constitutively expressed. The primers were 5'-ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC (forward) and 5'-CTCCTTAATGTACACGACGATTTC (reverse), and the cycling protocol was one cycle of 94°C for 5 minutes, 17 cycles of 94°C for 45 seconds, 55°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds, followed by one cycle of 72°C for 10 minutes. To exclude DNA contami-

nation, a PCR was also performed using the RNA as template with the same protocol and primers that were designed to span an intron.

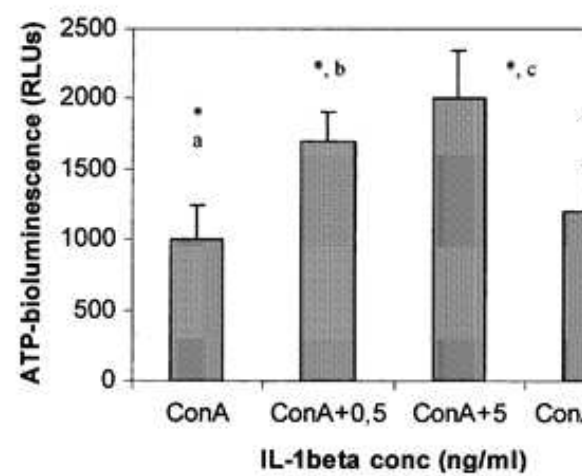
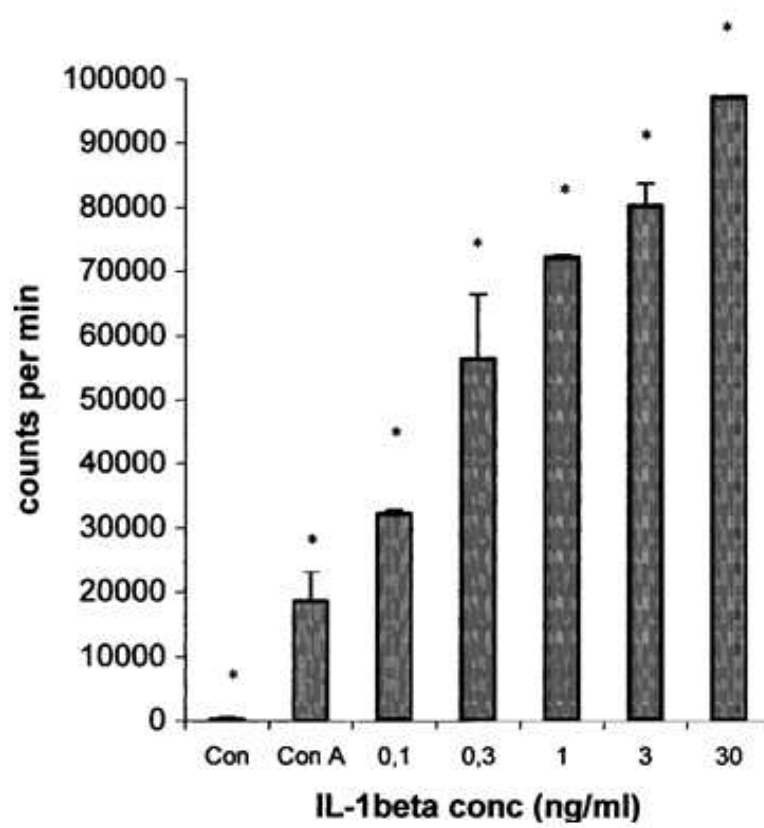
Subsequently, RT-PCR was performed using specific primers designed for the amplification of a 240-bp product of sea bass IL-1b. The primers were 5'-CACAAGGATGGAGAGGAGCC (forward) and 5'-GAT-GTTGAAGGCTCGGTGG (reverse), and the cycling protocol was one cycle of 94°C for 5 minutes, 17 cycles of 94°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, 72°C for 45 seconds, followed by one cycle at 72°C for 10 minutes. Finally, a RT-PCR was performed using specific primers designed for the amplification of a 180-bp product of a sea bass COX-2 gene (Buonocore et al., 2005). The primers were 5'-GGTGGACCTCAGC-CACATT (forward) and 5'-ACAGCGAAGCGG-TGAGCTT (reverse), and the cycling protocol was one cycle of 94°C for 5 minutes, 17 cycles of 94°C for 45 seconds, 50°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds, followed by one cycle of 72°C for 10 minutes. A low cycle number was used to ensure the linearity of the assay and to allow semiquantitative analysis of the IL-1b and COX-2 expression by comparison to the b-actin product, as described below.

All PCR reactions were conducted using the MiniCycler model PTC-150-16 (MJ Research) and were overlaid with mineral oil. PCR products (25 μ l) were visualized on 1% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide (10 ng/ μ l) using a 123-bp ladder (Sigma) as size marker. PCR fragments were purified from agarose gels using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and directly sequenced on an ABI 377 automated sequencer (Applied Biosystems, U.K.). The messenger RNA IL-1b and COX-2 levels were expressed as a ratio relative to b-actin level after densitometric scanning of the agarose gels using GeneImage IR software from Li-COR, and data were expressed as the mean $\pm$ SE of the values for 5 fish used per group.

Results

Proliferation Assays. The in vitro biological activity of purified sea bass rIL-1b was first investigated for its effects on the D10.G4.1 murine cell lines. The results, (Figure 1) showed a clear enhancement of proliferation depending on the concentration of rIL-1b used ($P < 0.05$ by one-way ANOVA). The maximum amount of sea bass rIL-1b used (30 ng/ml) induced the highest proliferation of the murine cells. The positive control employed in this assay, human rIL-1b, gave the same proliferative effect at a concentration of 30 pg/ml (data not shown).

The results obtained using sea bass rIL-1b in the thymocytes assay (Figure 2) showed a dose-depen-



dent increase of proliferation with increasing concentrations of the recombinant cytokine from 0.5 to 5 ng/ml ($P < 0.05$ by one-way ANOVA). The highest quantity of rIL-1b employed (50 ng/ml) showed less stimulation, and the degree of proliferation was not significantly different from that with the control. Tukey's pairwise comparison test showed that cells treated with 0.5 and 5 ng/ml sea bass IL-1b had significantly higher values than those for the control, and that these two groups were significantly different from each other.

Phagocytosis Assay. The effect of rIL-1b on sea bass head kidney cell phagocytosis was next studied (Figure. 3). Macrophages were stimulated with rIL-1b diluted in L-15 medium at concentrations ranging from 1 to 100 ng/ml. Percentage of phagocytosis in cells treated with 1 ng/ml rIL-1b showed little variation in comparison with the controls and was not statistically significant. In contrast, stimulation was clearly increased in samples treated with 10 and 30 ng/ml rIL-1b ($P < 0.05$ by one-way ANOVA). However, treatment with 100 ng/ml rIL-1b showed no such effect ($P < 0.05$ by one-way ANOVA), and the values were not significantly higher than those in untreated and elution buffer controls. Similar results were obtained for the phagocytic index (Figure. 3). Values from cells treated with 1 ng/ml rIL-1b were

not statistically different from those for the two controls. A clear stimulation was observed in cultures treated with 10 and 30 ng/ml rIL-1b ($P < 0.001$

Fig. 1. Proliferation of murine D10.G4.1 cells stimulated with varying concentrations of sea bass rIL-1b (0.1, 0.3, 1, 3, and 30 ng/ml) in the presence of a suboptimal dose of Con A (0.3 ng/ml). Cells were stimulated without rIL-1b and Con A (Con) as a negative control and with Con A (ConA) alone as a positive control. Data are presented as means $\pm$ SE of triplicate samples, with each experiment performed twice. * $P < 0.05$.

Fig. 2. Proliferation of sea bass thymocyte cells stimulated with varying concentrations of sea bass rIL-1b (0.5, 5, and 50 ng/ml) in the presence of a suboptimal dose of Con A (0.1 ng/ml). Cells were stimulated without rIL-1b and Con A (Con) as a negative control and only with Con A (ConA) as a positive control. Data are presented as means $\pm$ SE of triplicate samples, with each experiment performed twice. * $P < 0.05$. Means with no letters in common are significantly different (thus "a" is significantly different from "b" and "c").

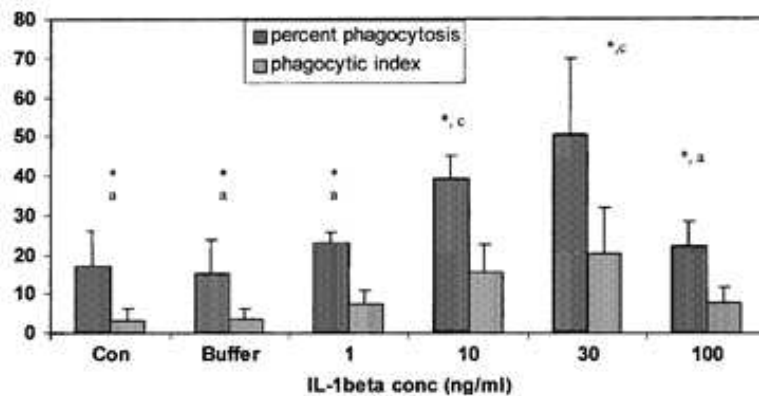


Fig. 3. Yeast phagocytosis of sea bass head kidney leukocytes stimulated with varying concentrations of sea bass rIL-1b (1, 10, 30 and 100 ng/ml). Cells were stimulated without rIL-1b (Con) and with the elution buffer (Buffer) used in rIL-1b production as negative controls. Data are presented as means $\pm$ SE of triplicate samples, with each experiment performed twice. * $P < 0.05$. Means with no letters in common are significantly different (thus "a" is significantly different from "b" and "c").

by one-way ANOVA), whereas treatment with 100 ng/ml rIL-1b showed no such effect ($P < 0.001$ by one-way ANOVA). In both cases Tukey's pairwise comparison test showed that cells treated with 10 and 30 ng/ml sea bass IL-1b had significantly higher values than those in untreated and buffer controls, and that these two groups were significantly different from each other. Values from cells treated with 1 ng/ml and 100 ng/ml showed no significant effect for either percentage of phagocytosis or phagocytic index.

In Vivo Immune Gene Expression Assay. The biological activity of rIL-1b was tested in vivo through its effects on the induction of IL-1b and COX-2 homologue gene expression in head kidney cells purified from sea bass (Figures. 4 and 5). LPS

was used as a positive control because it is well known that this molecule can upregulate IL-1b and COX-2 gene expression (Zou et al., 1999a; 1999b; Scapigliati et al., 2001). After 24 hours of induction, total RNA was extracted from all samples and its quality and quantity were checked by RT-PCR with b-actin primers. The absence of DNA contamination was determined by performing a PCR using the RNA sample as template for PCR with b-actin primers that crossed an intron. In no case was a b-actin product larger than 543 bp obtained.

Similar results were obtained for each fish of the 3 tested experimental groups. Therefore the agarose gel data for only one fish of each group are presented. RT-PCR analyses of the cDNA samples for b-actin generated a product of the expected size (excluding the presence of an intron) in each case (upper panels,

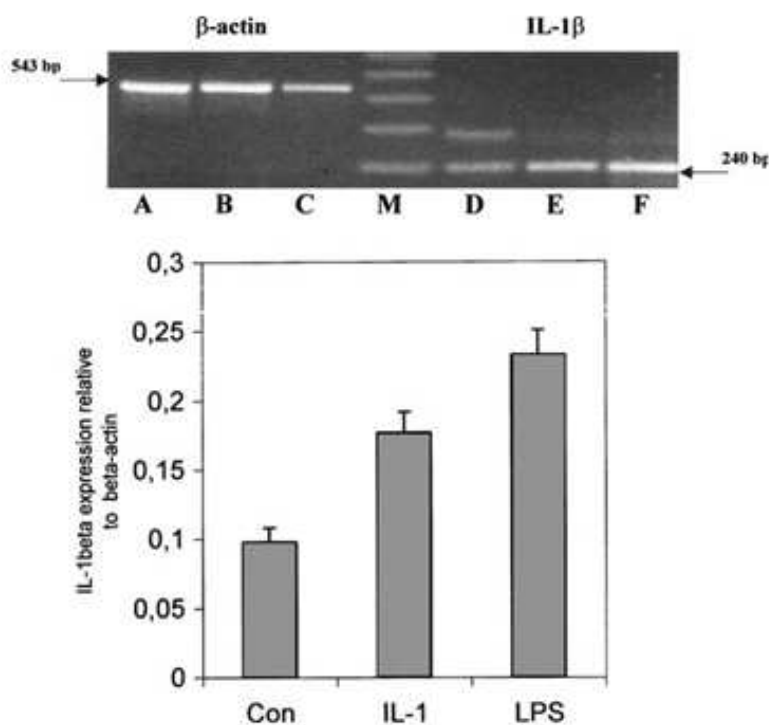


Fig. 4. IL-1b gene expression in sea bass head kidney leukocytes. Upper panel: 1% (w/v) agarose gel loaded with the RT-PCR products obtained using primers for b-actin (left side) and IL-1b (right side) are shown for a representative fish of the 5 examined. Sea bass were injected intraperitoneally with PBS (Con) (lanes A and D), with rIL-1b (500 ng) (lanes B and E) or with LPS (5 μ g/ml) (lanes C and F). Lower panel: IL-1b mRNA levels expressed as a ratio relative to b-actin levels in the same samples, after densitometric scanning of the gels with the Gene Image IR software (Li-COR). The DNA molecular weight markers were loaded in lane M.

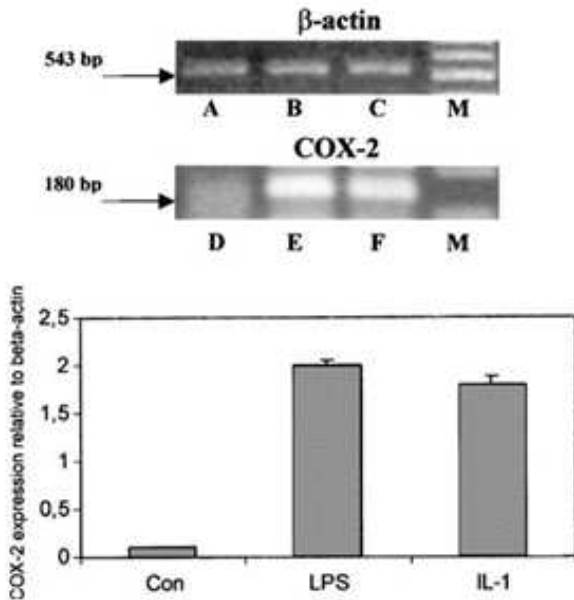


Fig. 5. COX-2 gene expression in sea bass head kidney leucocytes. Upper panel: 1% (w/v) agarose gels loaded with the RT-PCR products obtained using primers for β -actin and COX-2 are shown for a representative fish of the 5 examined. Sea bass were injected intraperitoneally with PBS (Con) (lanes A and D), with LPS (5 lg/ml) (lane B and E), or with rIL-1b (500 ng) (lane C and F). Lower panel: COX-2 mRNA levels expressed as a ratio relative to β -actin levels in the same samples, after densitometric scanning of the gels with the Gene Image IR software (LICOR). The DNA molecular weight markers were loaded in lane M.

Figures 4 and 5). IL-1b expression was next examined using the specific sea bass primers. An amplified product of the expected size (240 bp) was seen in all samples (upper panel, Figure. 4), with lower levels of transcript seen in cells from fish injected with PBS relative to those from fish injected with LPS or rIL-1b. A larger amplification product at approximately 346 bp was also clearly observed in samples from fish injected with PBS and, to a lesser extent, in the stimulated samples, and this was due to the presence of an incompletely spliced transcript containing an intron of 108 bp as reported previously (Scapigliati et al., 2001).

COX-2 expression was studied (Figure. 5) using the specific sea bass primers obtained from a COX-2 sequence (Buonocore et al., 2005). An amplified product of the expected size (180 bp) for the COX-2 gene was seen in samples from LPS- and IL-1b stimulated fish (Figure. 5), whereas in the control a very faint band was visible because this gene is usually not constitutively expressed, as already reported in rainbow trout (Zou et al., 1999b).

When IL-1b mRNA levels were expressed as a ratio relative to the β -actin products obtained after

densitometric scanning of the agarose gels (lower panel, Figure 4), it was clear that under the conditions of these experiments IL-1b mRNA induction was higher with LPS stimulation (approx. 2.5 times more than the control), than with rIL-1b stimulation (approx. 2 times more than the control). Similar results were obtained for COX-2 mRNA levels: stimulation with LPS gave higher induction (approx. 2 times more than the control) than stimulation with rIL-1b (approx. 1.8 times more than the control).

Whether these results would be true for other timings and doses of LPS and rIL-1b remains to be determined.

Discussion

IL-1b is a key modulator of immune responses in vertebrates, and the aim of the present work was to study the biological activity of a sea bass recombinant IL-1b peptide expressed in *E. coli*. As already stated, mammalian IL-1b is produced as a precursor molecule that must be cleaved by the enzyme ICE to give the biologically active mature protein (Thornberry et al., 1992). While fish IL-1b precursors lack signal peptide sequences and there is no clear ICE cut site (Zou et al., 1999a; Engelsma et al., 2001; Scapigliati et al., 2001), it has been recently demonstrated that IL-1b is processed in trout macrophages in a way analogous to the situation in mammals (Hong et al., 2004).

In sea bass it has been possible to predict a putative mature peptide starting at Ala⁸⁶, identified by IL-1b sequence alignment, resulting in a putative mature protein of 176 amino acids (Scapigliati et al., 2001). The sequence coding for this peptide was cloned in a commercial expression vector, and details of the rIL-1b production in *E. coli* and purification have been described previously (Buonocore et al., 2004). In addition, the bacterial endotoxin contamination of the rIL-1b preparation was determined, as it could be a contributor to the effects induced by the sea bass recombinant peptide. Limulus amebocyte lysate (LAL) test data showed that the LPS concentration was low, typically 0.02 to 10 ng/ml over the concentration range used in this study, and this is less than the amount considered to be the minimum dose able to induce IL-1b expression in trout head kidney leucocytes (Zou et al., 2000) and found in mammalian rIL-1b preparations (Blecha et al., 1995).

One of the most widely employed assays to detect IL-1b bioactivity is the *in vitro* IL-1-induced proliferation of the mouse T-helper cell clone D10.G4.1. These Th2-type cells, specifically require exogenous IL-1 for proliferation in the presence of

Con A as a co-stimulator (Tartakovsky et al., 1986), which stimulates IL-4 production that is an essential growth factor for the cells (Kupper et al., 1987). With this assay, using human recombinant IL-1b as a positive control, sea bass rIL-1b induced a dose-dependent proliferation response of D10.G4.1 cells in the range of 1 to 30 ng/ml. It is interesting that, as for rainbow trout rIL-1b (Hong et al., 2001), the amount of sea bass rIL-1b needed to induce levels of proliferation comparable to those induced by human rIL-1b was approximately 1000 times higher. This is likely a consequence of differences between mouse and sea bass IL-1b 3-dimensional structures. In a recent modeling study (Scapigliati et al., 2004), it was shown that sea bass IL-1b is predicted to interact with the mouse IL-1R with considerably less energy than mouse IL-1b and for this reason more sea bass IL-1b may be needed relative to human IL-1b, which has a 3-dimensional structure similar to mouse IL-1b. Nevertheless, despite this drawback, the D10 assay appears a sensitive and reliable test for the bioactivity of fish rIL-1b.

We also investigated the ability of sea bass rIL-1b to induce the proliferation of sea bass thymocytes, in an assay that has been employed extensively in mammalian studies of IL-1 action (Dalmau et al., 1993). Sea bass rIL-1b induced the proliferation of thymocytes from juveniles in a dose-dependent manner, although the highest dose used (50 ng/ml) was significantly less stimulatory, potentially attributable to rIL-1b toxicity for cells at this concentration or to receptor saturation.

Phagocytosis of foreign particles by leukocytes and its modulation by various immunoregulatory molecules is a well studied process in fish (Secombes and Fletcher 1992; Benanni et al., 1995; Solem et al., 1995). IL-1b has been shown to upregulate phagocytosis by rainbow trout leukocytes (Hong et al., 2001). To better study in vitro bioactivity of sea bass rIL-1b, we performed phagocytosis experiments with adherent head kidney leukocytes and fluorescently labeled yeast particles. The results from these experiments clearly showed that both the percentage of phagocytosis and the phagocytic index were affected by rIL-1b. As for the thymocyte proliferation test, the highest dose tested (100 ng/ml) was less stimulatory, and again one can speculate that this IL-1 concentration is toxic for cells or that receptor saturation has occurred.

Finally, we investigated the in vivo biological activity of rIL-1b on immune gene expression, through the induction of the expression of two proinflammatory molecules (i.e., IL-1b itself and COX-2) after intraperitoneal injection of rIL-1b into sea bass juveniles. Head kidney leukocyte gene

expression was examined because these cells are known to be responsive to IL-1b. LPS was used as a positive control for both IL-1b and COX-2 production by these cells. Results obtained from these experiments showed that IL-1b and COX-2 transcription was increased in head kidney leukocytes after rIL-1b injection, to a similar extent to that obtained by LPS induction. Other studies have shown similar increases of IL-1b and COX-2 levels induced by comparable quantities of rIL-1b, as seen in humans (Warner et al., 1987) and in trout (Hong et al., 2001, 2003). A second IL-1b transcript was observed in the RT-PCR study, most obvious in the control (PBS-injected) fish. This transcript has been detected in other RT-PCR experiments and is attributable to the presence of an unspliced intron (Scapigliati et al., 2001). This incompletely spliced form may have a role in posttranslational regulation of the mature, fully spliced transcript (Jarrous and Kaempfer 1994).

In conclusion, in this study both in vitro and in vivo approaches have been used to examine the bioactivity of a recombinant fish cytokine. The results obtained suggest that sea bass rIL-1b is likely to be an important cytokine in fish, as in mammals, with a wide range of effects. In addition, rIL-1b could be a useful molecule for the modulation of the immune system of farmed sea bass, although such potential applications will require much further work to establish.

References

1. Auron PE (1998) The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 221-237
2. Benanni N, Schmid-Alliana A, Lafaurie M (1995) Evaluation of phagocytic activity in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol* 5, 237-246
3. Bird S, Wang T, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2002) The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1b in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *J Immunol* 168, 3329-3340
4. Blecha F, Reddy DN, Chitko-Mckown CG, Mcvey DS, Chengappa MM, Goodband RD, Nelssen J.L (1995) Influence of recombinant bovine interleukin-1b and interleukin2 in pigs vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 329-346
5. Buonocore F, Frugnoli D, Falasca C, Secombes CJ, Scapigliati G (2003) Peculiar gene organisation and incomplete splicing of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin 1b. *Cytokine* 21, 257-264
6. Buonocore F, Mazzini M, Forlenza M, Randelli E, Secombes CJ, Zou J, Scapigliati G (2004) Expression in *E. coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus*

- labrax) interleukin-1b, a possible immuno-adjuvant in aquaculture. *Mar Biotechnol* 6, 53-59
7. Buonocore F, Randelli E, Casani D, Mazzini M, Cappuccio I, Secombes CJ, Scapigliati G (2005) cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after vaccination. *Aquaculture* 245, 301-310
 8. Crampe M, Farley SR, Langston A, Pulsford AL. (1997) Measurement of phagocytosis: a comparative evaluation of microscopic and microplate methods. In: *Methodology in Fish Diseases Research*. Aberdeen: Fisheries Research Services, pp. 81-89
 9. Dalmau SR, Freitas CS, Savino W (1993) A modified assay for measuring thymocyte co-stimulatory activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88, 419-425
 10. Debets R, Timans JC, Homey B, Zurawski S, Sana TR, Lo S, Wagner J, Edwards G, Clifford T, Menon S, Bazan JF, Kastelein RA (2001) Two novel IL-1 family members, IL-1d and IL-1, function as an antagonist and agonist of NF- κ B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol* 167, 1440-1446
 11. Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin 1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147
 12. Dinarello CA (1997) Interleukin 1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 253-265
 13. Engelsma MY, Stet RJM, Schipper H, Verburg-van Kemenade BML (2001) Regulation of interleukin-1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol* 25, 195-203
 14. Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T (2000) Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1b high affinity immunoglobulin E Fc receptor (b subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol* 10, 229-242
 15. Holland JW, Pottinger TG, Cunningham C, Secombes CJ (2000) Sequencing and expression analysis of the type 1 interleukin-1 receptor gene. EMBL accession number AJ295296
 16. Holland JW, Pottinger TG, Secombes CJ (2002) Recombinant interleukin 1b activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Endocrinol* 175, 261-267
 17. Hong S, Zou J, Crampe M, Peddie S, Scapigliati G, Bols N, Cunningham C, Secombes CJ (2001) The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1b. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 1-14
 18. Hong S, Peddie S, Campos-Perez J, Zou J, Secombes CJ (2003) The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1b on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immun* 27, 801-812
 19. Hong S, Zou J, Collet B, Bols NC, Secombes CJ (2004) Analysis and characterisation of IL-1b processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol* 16, 453-459
 20. Horowitz JB, Kaye J, Conrad PJ, Katz ME, Janeway Jr CA (1986) Autocrine growth inhibition of a cloned line of helper T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1886-1890
 21. Jarrous N, Kaempfer R (1994) Induction of human interleukin 1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *Journ Biol Chem* 269, 23141-23149
 22. Kullberg BJ, Van der Meer JWM (1995) *Cytokines in the Treatment of Infectious Diseases: Options for the Modulation of the Host Defense*. (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers)
 23. Kupper T, Flood P, Coleman D, Horowitz M (1987) Growth of an interleukin 2/interleukin 4-dependent T cell line induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Immunol* 138, 4288-4292
 24. Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg-Van Kemenade BML, Kwang J (2002) Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1b and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish Shellfish Immunol* 13, 85-95
 25. Nicola NA (1994) *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*. (Oxford, U.K: Smbrook and Tooze)
 26. Peddie S, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2001) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1b and derived peptide induce migration of head-kidney leucocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 11, 697-709
 27. Pelegrin P, Garcia-Castillo J, Mulero V, Meseguer J (2001) Interleukin1b isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. *Cytokine* 16, 67-72
 28. Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, Zou J, Pelegrin P, Falasco C, Frugnoli D, Secombes CJ (2001) Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin1 b. *Fish Shellfish Immunol* 11, 711-726
 29. Scapigliati G, Meloni S, Buonocore F, Bossu P, Prugnoli D, Secombes CJ (2003) Immunopurification of B lymphocytes from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) *Mar Biotechnol* 5, 214-221
 30. Scapigliati G, Costantini S, Colonna G, Facchiano A, Buonocore F, Bossu P, Cunningham C, Holland JW, Secombes CJ (2004) Modelling of fish interleukin1 and its receptor. *Dev Comp Immun* 28, 429-441
 31. Sangrador-Vegas A, Martin SAM, O Dea PG, Smith TJ (2000) Cloning and characterisation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin1 receptor cDNA. *Eur J Biochem* 267, 7031-7037
 32. Secombes CJ, Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. *Ann Rev Fish Des* 2, 53-71
 33. Secombes CJ, Bird S, Cunningham C, Zou J (1999) Interleukin1 in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9, 335-343
 34. Sims JE, Dower SK (1994) Interleukin1 receptors. *Eur Cytokine Netw* 5, 517-531
 35. Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE (2000) Four new members expand the IL-1 superfamily. *J Biol Chem* 275, 1169-1175

36. Smith KA, Lachman LB, Oppenheim JJ, Favata MM (1980) The functional relationship of the interleukins. *J Exp Med* 151, 1551-1556
37. Solem ST, Jørgensen JB, Robertsen B (1995) Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol* 5, 475-491
38. Subramaniam S, Stansberg C, Olsen L, Zou J, Secombes CJ, Cunningham C (2002) Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Dev Comp Immunol* 26, 415-431
39. Tartakovsky B, Kovacs EJ, Takacs L, Durum SK (1986) T cell clone producing an IL1-like activity after stimulation by antigen-presenting B cells. *J Immunol* 137, 160-166
40. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin1b processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774
41. Vega-Rubin Celis de S, Gomez P, Calduch-Giner JA, Medale F, Perez-Sanchez J (2003) Expression and

characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin: assessment of *in vivo* metabolic effects. *Mar Biotechnol* 5, 92-101

42. Warner SJC, Auger KR, Libby P (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1, II: recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 139, 1911-1917
43. Yin Z, Kwang J (2000) Carp interleukin 1b in the role of an immuno-adjuvant. *Fish Shellfish Immunol* 10, 375-378
44. Zou J, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1999) Molecular cloning of interleukin 1b from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine* 11, 552-560
45. Zou J, Neumann NF, Holland JW, Belosevic M, Cunningham C, Secombes CJ, Rowley F (1999a) Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochem J* 340, 153-159
46. Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, Cunningham C, Secombes CJ (2000) Factors influencing the expression of interleukin 1b in rainbow trout. *Dev Comp Immunol* 24, 575-582

Cellular activities during a mixed leucocyte reaction in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax*

Sabrina Meloni, Gianpaolo Zarletti, Stefania Benedetti,
Elisa Randelli,
Francesco Buonocore, Giuseppe
Scapigliati*

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Largo dell'Università, I-01100 Viterbo, Italy

Received 19 July 2005; revised 20 September 2005; accepted 4 October 2005
Available online 15 November 2005

Abstract

In this investigation a number of “in vitro” activities of sea bass peripheral blood leucocytes (PBL) against allogeneic PBL inactivated by irradiation were studied. Stimulator PBL were cultured with inactivated allogeneic PBL, and direct counting of lymphocytes was done after 2 weeks by immunofluorescence and flow cytometry using mAbs DLT15 and DLIg3 specific for T-cells and B-cells, respectively. In a one-way mixed leucocyte reaction (MLR), results showed an increase of T lymphocytes, whereas B lymphocytes had values similar to those in control PBL. The increase of T-cells in MLR cultures was also confirmed using RT-PCR by analyzing the expression of the T-cell receptor (β -subunit) mRNA. The addition of 5 mg/ml of cyclosporin A (CsA) to the MLR caused a significant decrease in T-cell proliferation. Leucocytes from MLR cultures displayed an enhanced cytotoxic activity against xenogeneic target cells with respect to control PBL, raising the possibility of the presence of cytotoxic-like T lymphocytes. Cellular activation of PBL was confirmed in 2 weeks MLR by measuring antibody-induced intracellular Ca^{2+} mobilization with Fura-2 AM. This work represents the first direct quantitative determination of an “in vitro” T-cell activity in a teleost species.

2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sea bass *Dicentrarchus labrax*; T-cell; Leucocyte; Teleost; Allogeneic recognition; Cytotoxicity; In vitro

1. Introduction

In recent years, many fundamental molecules produced by leucocytes of teleosts have been cloned, which include immunoglobulins (Ig) [1e3], class I and class II major histocompatibility complex (MHC) antigens [4,5], T-cell receptors (TcR) [6e8], CD8 and CD4 coreceptors [9,10], and a growing number of cytokines [11]. Despite this impressive progress, the biology of teleost lymphocytes is poorly known, and this is mainly due to the lack of good specific cell surface markers, especially for T-cells [12].

The response to non-self recognition MHC molecules by T lymphocytes is a common feature in all jawed vertebrates [13], and is characterized by an intense primary immune reaction, due to a very high frequency of alloreactive precursor T-cells. This behaviour may be reproduced “in vitro” using the mixed leucocyte reaction (MLR), and “in

* Corresponding author. Tel.: þ39 0761 357137; fax: þ39 0761 357029.

E-mail address: scapigg@unitus.it (G. Scapigliati).

vivo” leads to allograft rejection and to graft versus host reaction (GVRH). Both these “in vivo” activities have been shown to take place in teleost species such as damselfish [14], sea bass [15], and carp [16]. The “in vitro” activities of teleost T-cells have been known for many years, when peripheral blood leucocytes (PBL) from rainbow trout were found to exhibit an MLR against an allogeneic target [17]. A two-ways and one-way MLR were shown in carp [18], and this work showed that a weak leucocyte recognition response could be strongly increased by mutual “in vivo” priming of the reacting donor fish. Allorecognition mechanisms are known in teleosts to generate natural killer (NK) cells bearing the receptor for the Fc of immunoglobulins (FcR) [19]. A good indirect indication of the involvement of T lymphocytes in the MLR came from work in catfish [20], which showed their putative proliferation after depletion of B-cells and macrophages from PBL. It has recently been suggested that the activation of teleost T-cells can very likely be influenced by cytokines [21], since the “in vitro” proliferation of catfish PBL stimulated by Con A was inhibited by cyclosporin A (CsA), a substance known in mammals to inhibit T-cell activities through the depression of T-cell growth factor production [22,23]. However, despite the clear evidence of the involvement of T lymphocytes described in these previous works, their participation in fish MLR was only supposed, since no specific markers were available for direct analysis. We previously investigated the involvement of T-cells and B-cells during “in vivo” allograft rejection in sea bass by quantitative immunocytochemistry [15], and provided data on the participation of T lymphocytes during non-self recognition processes in fish.

In this study we show for the first time in a teleost species the direct involvement of T-cells during “in vitro” allorecognition. We also investigated the effects induced by the presence of CsA, the antibody-induced cellular activation of leucocytes, and the possible presence of cytotoxic T lymphocyte-like cells (CTL-like).

2. Materials and methods

2.1. Fish and leucocyte cultures

Sea bass were bred and reared in seawater at a local fish farm (Nuova Azzurro, Civitavecchia, Italy), and genetically outbred, 2-year-old fish of ca. 300 g in weight were used in the experiments. Fish were vaccinated by immersion against vibriosis 1 year before the experiments and did not display any sign of pathology at sampling. All buffers and solutions used in handling fish cells were brought to 355 mOsm kg⁻¹ with 2 M NaCl. Cell viability of leucocytes was determined by counting in a haemocytometer with trypan blue. Fish were lethally anaesthetised with 1 g l⁻¹ of benzocaine (Sigma), and 5 ml of blood per fish was drawn from the caudal vein using HBSS/heparin. Whole blood from individual fish was washed twice in HBSS/heparin, resuspended in 8 ml of the same solution and loaded over 1.04 and 1.07 g cm⁻³ Percoll gradients as previously described [7]. After centrifugation (30 min at 840 $\times$ g) at 4 $^{\circ}$ C, cells at the interface between the two densities were collected, washed twice with HBSS (10 min at 680 $\times$ g) at 4 $^{\circ}$ C, resuspended in flasks at 2×10^6 cells/ml in 5 ml of L15 medium (Gibco) containing 5% heat-inactivated FCS (Gibco) and antibiotics, and incubated at 18 $^{\circ}$ C. PBL from one stimulator fish (1×10^8 cells) in 5 ml of L15 in a 25-cm² flask were treated at 20 $^{\circ}$ C with 22 Gy using an X-ray machine (Gilardoni, Italy) and cultured with PBL from other individual responders. Typically, 1×10^7 irradiated cells were added to 5×10^7 PBL in a T-25 flask, and five samples were run in each experiment. Controls were done by omitting stimulatory cells, and where necessary 5 mg/ml of cyclosporin A (Sigma) was added to cultures.

Cell proliferation was determined by assaying intracellular ATP levels of leucocyte cultures using a luminometric assay (ATP-lite, Perkin Elmer) [24]. Briefly, 100 μ l of culture medium containing 5×10^5 PBL was transferred into each well of a 96-well luminometric plate (Isoplate TC Perkin Elmer), cells were lysed with 50 μ l of the solution contained in the kit following the manufacturer’s instructions and ATP read with a luminometer (Victor II, Wallac) by the light emitted when adding the kit reagent.

2.2. Immunofluorescence and flow cytometry

Indirect immunofluorescence (IIF) was carried out as previously described [7] at 4 $^{\circ}$ C in solutions containing 0.1% sodium azide. Briefly, cells were washed by centrifugation with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with 250 μ l of DLT15 (specific for sea bass thymocytes and T-cells, IgG3 subclass) or DLIg3 (specific for Ig and Ig-bearing cells, IgG1 subclass) mAb as undiluted culture supernatants for 45 min. These mAbs have been previously described and characterized (for review see [12]). Control staining was performed by incubating cells with myeloma culture

supernatant or with an irrelevant mAb (anti-human CD4, BD-Pharmingen cat no. 555344). After washing with PBS, a 1:300 dilution of fluorescein-labelled goat anti-mouse Ig serum (Sigma) was added for 30 min. The cells were then washed and monitored for their morphology and fluorescence with a FACScalibur (Becton-Dickinson, USA). Analysis was done using the Cellquest program on 10,000 events acquired without gating.

To test for the presence of NK cells bearing receptors for Ig, leucocyte cultures were incubated for 45 min with 20 mg/ml of sea bass Ig purified by affinity chromatography from serum as previously described [25], and then processed for IIF using mAb DLlg3 as above.

2.3. Ca^{bp} determinations

PBL cultures in flasks were washed twice in serum-free L15 by centrifugation (480 $\times$ g, 10 min), cells resuspended in serum-free L15 medium and incubated for 45 min at 18 $^{\circ}\text{C}$ with the cell permeant Fura-2 AM (Sigma) at a final concentration of 4 mM. Cells were then washed by centrifugation (480 $\times$ g, 10 min) with DMEM without FCS and phenol red and resuspended at 10^7 ml^{-1} in the same medium (control) or in undiluted mAb culture supernatant and dialyzed overnight against PBS to remove phenol red. Cells were immediately plated at 1×10^6 cells/well in triplicates in 96-well plates, and emitted fluorescence from each well automatically read for 5 min at 1-min intervals with a Victor II fluorimeter (WallacePerkin Elmer, USA).

2.4. RT-PCR

Total RNA was isolated from 1×10^7 viable cells of control and MLR cultures using Tripure (Roche) following the manufacturer's instructions and suspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. For cDNA synthesis, 1 mg of total RNA and 0.5 mg of random primers (pd(N)₆) were used for each reverse transcription reaction in a 50-ml total volume. To check the RNA quality and quantity, a PCR was performed using primers for the amplification of a 543-bp product from sea bass b-actin. To exclude DNA contamination, PCR was performed using the RNA as template with the same protocol. Subsequently, RT-PCR was performed using primers designed for the amplification of a 503-bp product from the sea bass TcR β constant region [7], and for a 224-bp product of sea bass Ig light chain constant region [26]. TcR β primers were as follows: 5'-AGATTACCGGACCATCAGTGAAAG-3' (forward) and 5'-TCAGTAGTTC TGCTTTCCCTTTGA-3' (reverse). The cycling protocol was one cycle of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, and 16 or 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, followed by one cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Ig primers were 5'-GAGCTGCAGAAGGACAGTG-3' (forward) and 5'-TCAGACTGGCCTCACAGCT-3' (reverse). The cycling protocol was one cycle of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 16 or 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, followed by one cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min.

All PCR reactions were conducted using a MiniCycler, model PTC-150-16 (MJ Research). PCR products (15 μl) were visualised on a 1% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide (10 ng ml^{-1}) using 123-bp ladder (Sigma) or 1-kb ladder (Gibco) as a size marker. To confirm PCR sequences, fragments were purified from agarose gels using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and were directly sequenced on an ABI 377 automated sequencer.

2.5. Cytotoxicity assay

PBL cultures (control and MLR) were used as effector cells (E), and after 2 weeks of incubation cells were washed by centrifugation (680 $\times$ g) with L15 medium, resuspended at the desired concentration in 100 ml of complete medium and added to microwells of a luminometric plate containing target cells. Target cells (T) were the fibroblast adherent cell line SAF-1 obtained from sea bream [27] plated 1 day before at 15,000 cells/well in complete L15 medium. Experimental wells (E $\times$ T) were filled in triplicates with varying numbers of effector PBL to achieve the different effector to target cell (E/T) ratios of 20:1, 10:1, 5:1, and 1:1. Control wells were with T alone, and E alone at the same concentrations. Cultures were incubated for 72 h at 18 $^{\circ}$ C, then the effector cells from each well were removed, the wells washed twice with 100 ml of PBS and 100 ml of DMEM without phenol red (Gibco) were added. The killing activity was determined as previously described [24] by measuring intracellular ATP concentration in the remaining adherent SAF-1 cells using a luminometric assay and following the manufacturer's instructions. The percentage of specific cytotoxicity was calculated using the formula: % target cell viability $\frac{1}{4}$ (E $\times$ T) $\div$ E/T $\times$ 100.

2.6. Statistical analysis

Data are represented as mean values $\pm$ standard deviation (S.D.), or mean values $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of all experiments was performed by comparing groups using one-way ANOVA and a significant difference was assumed for p values less than 0.05, unless indicated.

3. Results

3.1. Lymphocyte counting in the MLR

Irradiation of PBL with X-rays (22 Gy) completely blocked their proliferation since in two-way MLR with irradiated PBL no signs of cell proliferation were detected after 3 weeks (not shown).

The content of T-cells and B-cells during one-way MLR, analyzed by immunofluorescence and flow cytometry with mAb DL122 and DLIg3, is shown in Fig. 1. Reported mean values are the percent of positive cells after subtracting the background staining. The mean content of B-cells (Fig. 1) decreased at 2 weeks in control PBL cultures from $21.1 \pm 3.8\%$ to $13.3 \pm 7.2\%$. In the MLR, each sample was analyzed with respect to its own control, and the results showed that T-cells increased from $3.1 \pm 0.8\%$ in controls to $8.8 \pm 4.7\%$. In the MLR, B-cell percentages were $21.1 \pm 3.8\%$ in controls and became $6.71 \pm 3.2\%$ at 2 weeks. The number of total viable cells decreased from 1.1×10^7 to 1.6×10^6 in control unstimulated PBL, whereas total viable cells decreased from 1.2×10^7 (including irradiated cells that were present and counted) to $6 \pm 0.8 \times 10^6$ in MLR.

Statistical analysis, by ANOVA, showed that the decrease of B-cells and the increase of T-cells in the MLR were significant with respect to initial values.

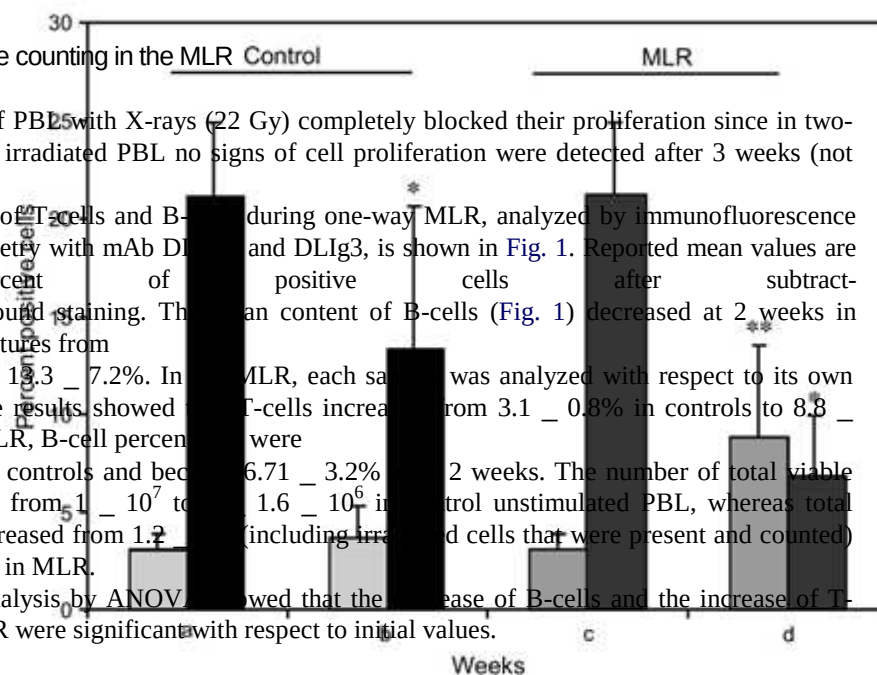


Fig. 1. Lymphocytes in controls and MLR. IIF monitored by flow cytometry was performed in control PBL (a, b) and after 2 weeks in MLR cultures (c, d) with mAbs DLlg3 (B-cells, black bars) and DLT15 (T-cells, grey bars). Values are the mean percent $\pm$ S.D. of positive cells in cell cultures subtracted of background staining. Statistical analysis was performed by ANOVA, with significant differences taken at $p < 0.05$. Asterisks (* for B-cells, ** for T-cells) indicate significant differences between samples at 2 weeks with respect to 0 weeks.

3.2. Effects of CsA

The effects of 5 mg/ml CsA on the MLR are shown in Fig. 2A. In the MLR, the percentage of T-cells increased from $3.8 \pm 3.2\%$ to $8.3 \pm 3.8\%$, whereas the presence of CsA depressed the number of T-cells to a value of $3.8 \pm 0.9\%$. Statistical analysis showed a significant difference between MLR and control data (indicated by an asterisk), but no difference between CsA and controls.

Fig. 2B shows the cellular activation of leucocytes tested by stimulating PBL cell cultures with mAbs DLT15 and DLIg3, and by measuring the concentration of intracellular Ca^{bp} using Fura-2 AM. The Ca^{bp} concentration is reported as the relative mean values of fluorescence units (RFU), which is the fluorimeter readout measured in all experiments after 5 min of incubation with mAb, with the background value subtracted. Using DLT15, control leucocytes of blood gave a mean RFU value of 1.250 ± 348 (SEM), cells from a 2-week MLR had a value of 2.500 ± 442 (SEM), and cells from MLR incubated for 2 weeks with CsA had a value of 1.500 ± 109 (SEM). Using DLIg3, control PBL gave a mean RFU value of 770 ± 260 (SEM), cells from a 2-week MLR had a value of 380 ± 180 (SEM), and cells from MLR with CsA added had a value of 900 ± 290 (SEM). Comparison of data between MLR and MLR p CsA by statistical analysis (ANOVA) gave a p value of 0.001 for DLT15, and a p value of 0.009 for DLIg3. As a further control, the addition of CsA to cell cultures together with mAbs did not affect results (not shown).

The flow cytometric pattern of a selected MLR experiment is shown in Fig. 3. In Fig. 3A the cytometric morphology of PBL is shown, where three main populations can be recognized. No gating was used when analyzing these populations for fluorescence intensity, and the background staining (3.2%) obtained when incubating PBL with an irrelevant mAb is shown in Fig. 3B. DLT15 staining of control PBL (7.4%) is shown in Fig. 3C with a broad distribution of positive cells having a scarcely identifiable single peak. The DLT15 staining of an MLR experiment (14.6%) is shown in Fig. 3D and in this case a clear peak of DLT15-positive cells at a higher fluorescence value can be appreciated.

3.3. RT-PCR

Fig. 4 shows the RT-PCR pattern of PBL cultures analyzed for the expression of sea bass Ig light chain gene (for B lymphocytes) and for sea bass TcR_b (for T lymphocytes). In control unstimulated PBL there is an evident expression of the Ig (224 bp) and the TcR_b (503 bp) genes when performing 35 cycles of the PCR reaction (Fig. 4a). When the number of PCR cycles was reduced to 16, only the expression for Ig could be detected in control PBL (Fig. 4b),

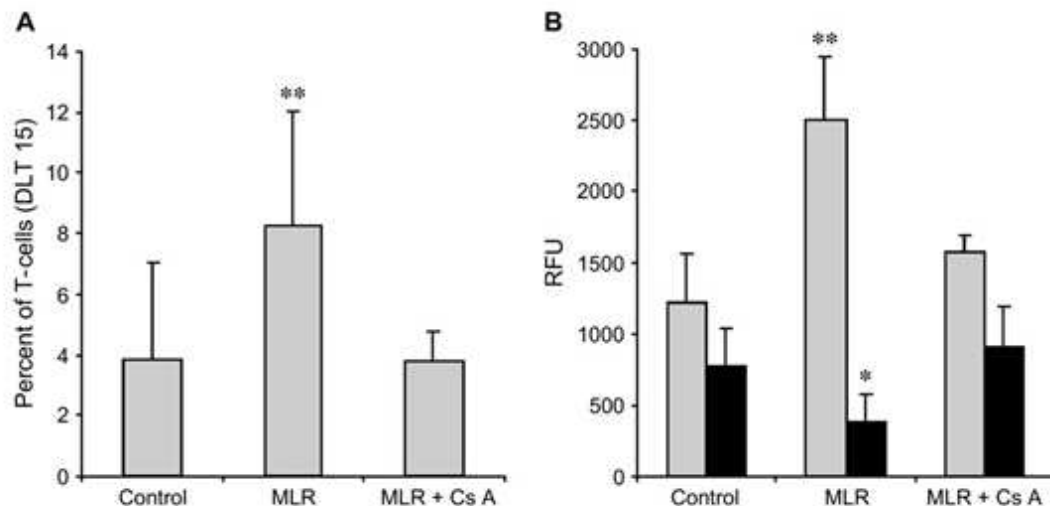


Fig. 2. Effects of cyclosporin A. IIF with mAb DLT15 monitored by flow cytometry was performed in control PBL, in a 2-week MLR, and in a 2week MLR added with 5 mg/ml of CsA (A). Values are the mean percent $\pm$ S.D. of positive cells subtracted of background values. (B) shows mean $\pm$ S.D. content of intracellular concentration of Ca^{bp} measured with Fura-2 AM at 5 min. Cells from indicated samples were stimulated with mAb DLT15 (grey bars) and DLIg3 (black bars) as undiluted culture supernatants, and values are expressed as relative fluorescence units (RFU) subtracted of background staining. Statistical analysis was performed by ANOVA, with significant differences at $p < 0.05$. Asterisks indicate significant difference between MLR and control PBL values (*for B-cells, **for T-cells).

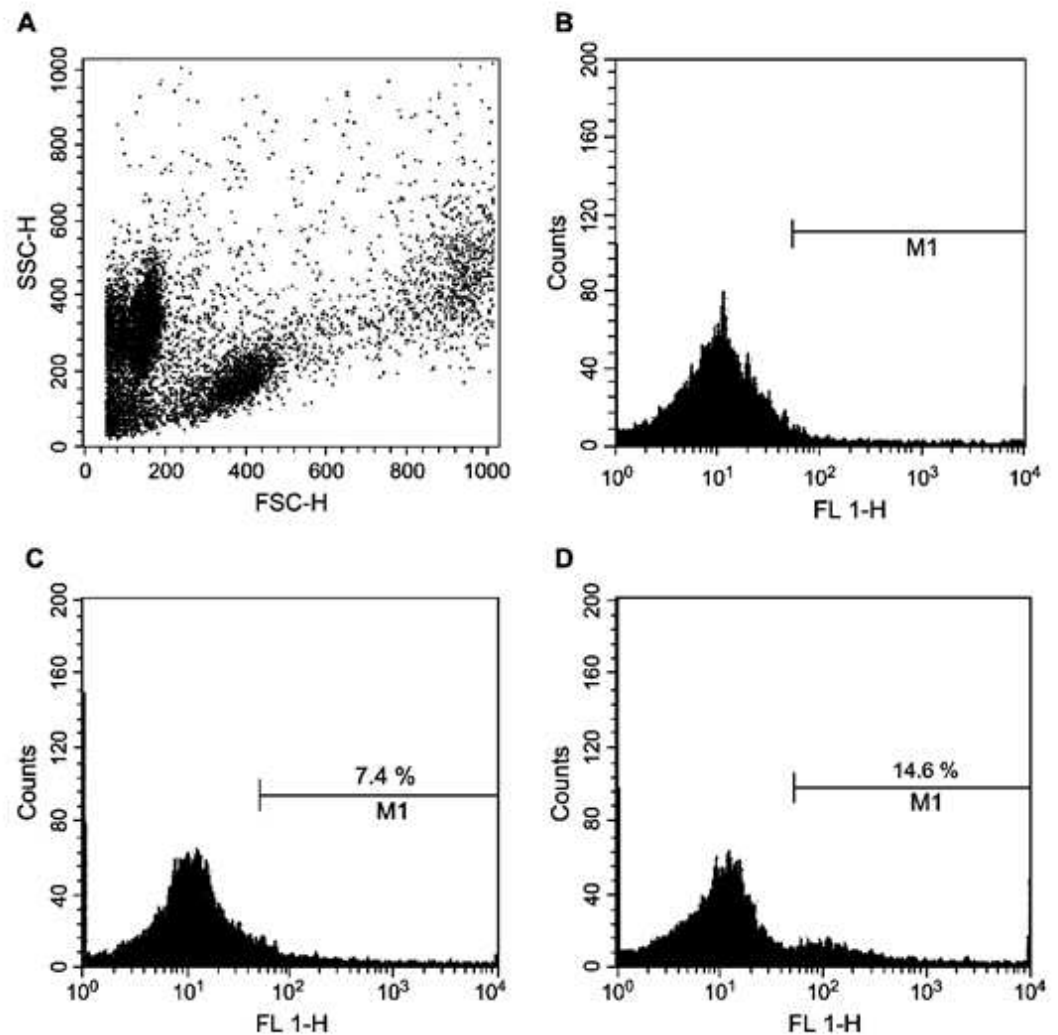


Fig. 3. Flow cytometric analysis. Flow cytometric scatter analysis of Percoll-enriched PBL is shown in (A), where three main cell populations can be recognized by their forward and side scatter values. IIF with mAb DLT15 on PBL is shown in (C), and background staining obtained with an irrelevant mAb is shown in (B). DLT15 staining of leucocytes from a 2-week MLR is shown in (D). The cursor bars are shown in each cytogram, and reported percentages in (C) and (D) were obtained after subtraction of the background staining.

whereas with the same number of cycles MLR cultures showed a low but evident expression of TcR_b gene (Fig. 4c). For comparison, the RT-PCR gene expression of β -actin, already shown to be a suitable housekeeping gene reference for sea bass [28,29], is shown in all samples. To confirm that no genomic DNA contamination was present in the total RNA, a PCR was performed using the same primers and after 30 cycles no products were detected by gel electrophoresis (not shown).

3.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of leucocytes from MLR against the xenogeneic target SAF-1 cells is shown in Fig. 5. The figure

shows values of intracellular concentration of ATP in target SAF-1 cells after incubation with effector cells from MLR, or after incubation of SAF-1 cells with control PBL cultures, expressed as the mean ratio $\pm$ S.D. between values of MLR and corresponding control PBL cultures. Increasing the number of effector cells clearly decreased target cell viability.

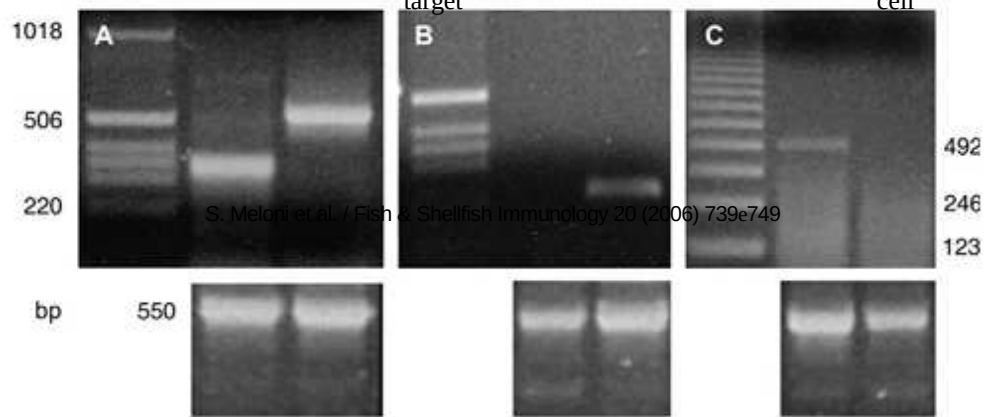


Fig. 4. RT-PCR analysis. The figure shows part of 1.0% agarose gels loaded with molecular weight markers (123-bp ladder in A, B; and 1 kb in C) and with 10 μ l of a 50- μ l RT-PCR solution using specific primers for Ig (224 bp) and for TcR β (503 bp) after 35 cycles (A) and after 16 cycles (B, C). mRNAs were extracted from control PBL (A, B), and from MLR leucocytes (C). The size of some molecular weight markers is indicated. Lower panel shows the expression of b-actin in the same samples at 35 cycles.

In these experiments the incubation of control PBL and MLR leucocytes with purified sea bass Ig followed by IIF with the DL1g3 mAb did not show an increment in the number of positive cells (data not shown).

Statistical analysis of groups by ANOVA confirmed that the differences between the 20:1 E/T ratio and 5:1 and 1:1 E/T ratios were significant with a p value < 0.05 .

4. Discussion

Being a fundamental “in vitro” reaction of the vertebrate adaptive immune system, the MLR has been used to test leucocyte responses for many years in most jawed vertebrate groups, namely teleosts [17,20,30,32], amphibians [33], reptiles [34], birds [35], and mammals [36]. The MLR is only “in vitro” antigen-specific response of

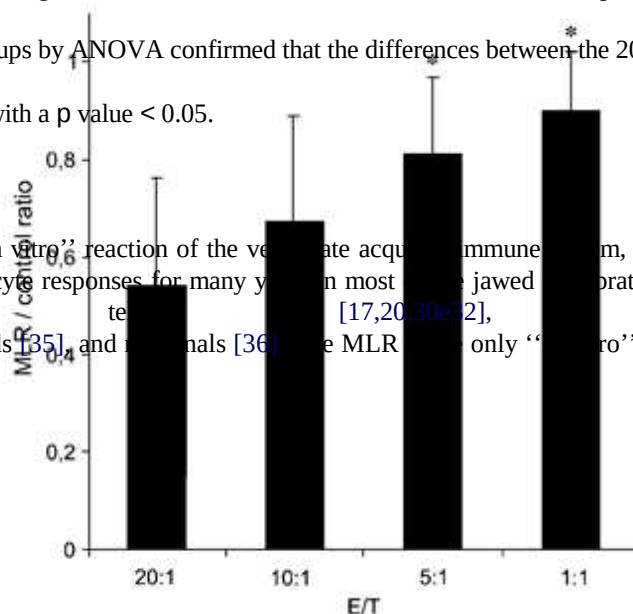


Fig. 5. Cytotoxicity. Cytotoxic activity of leucocytes against the xenogeneic target SAF-1 cells measured as intracellular [ATP] in SAF-1 cells. Displayed values are the intracellular [ATP] in SAF-1 cells after 16 h of incubation with leucocytes from a 2-week MLR and control leucocytes (2 weeks in culture), and expressed as the ratio $\pm$ S.D. between values from MLR and respective control PBL cultures. Statistical analysis was performed by ANOVA, with significant differences at $p < 0.05$. Asterisks indicate significant differences between E:T ratios of 5:1 and 1:1 with respect to 20:1.

T-cells that can be easily obtained without prior “in vivo” immunisation [37], and unprimed T-cells of mammals can be induced to proliferate by a variety of agents including pharmacological drugs, cytokines and antibodies against differentiation-inducing molecules such as CD3 or TcR. In teleosts most of these stimulants are not yet available, as well as markers for T-cells. However, markers for sea bass lymphocytes have been previously produced and characterized [25,38], and employed to directly monitor in this species T-cells and B-cells during an “in vivo” allorecognition [15]. The mAb DLT15 has been extensively employed for the characterization of T-cells in sea bass in adult fish [7], and during larval development [39–41]. Unfortunately, for the sea bass neither clonal lines of fish nor long-term leucocyte cell lines, like those obtained in catfish, are at present available or in preparation [42,43]. Consequently, all experiments were done using genetically outbred wild fish coming from a broodstock of about 150 spawners. For these reasons and as expected, a high degree of variability was present between individual fish in “in vitro” cellular responses. To simplify this problem, defined conditions for sea bass leucocyte culture were developed (see Section 2) and a sufficient number of individuals were analyzed (15 responders out of 25 sampled fish) in order to achieve statistical significance in the experimental data.

A tentative explanation for the presence of non-responder fish in the MLR could be that: (i) such individuals had a recent activity “in vivo” that involved T-cells which in turn suppressed their “in vitro” response, likely due to pathogenic conditions not evident at sampling; (ii) the stress induced by handling could have resulted in immunosuppression [44,45]; and (iii) “in vitro” conditions were not sufficient to trigger an increase of T-cells in all responders, due to the genetic differences among individuals, namely MHC class II matching between stimulator and responder. For a comprehensive view, the obtained IIF data are summarized in Figs. 1 and 2. After 2 weeks in culture a high mortality of leucocytes was detected (about 50%), as determined by trypan blue counting. By considering percentages of B-cells and T-cells at the beginning and in the MLR, the number of remaining viable cells was consistent with the observed mean percentage of T-cells (8%, corresponding to 5.2×10^5 cells).

In our experimental conditions, the “in vitro” allorecognition by PBL required 2 weeks to reach the mean peak of T-cell increase and to have statistically significant data, consequently this timing was used to study the MLR and for further leucocyte sampling. In these conditions, IIF results (Figs. 1 and 3) clearly showed a two-fold increase of T-cells. The value of this mean increase is lower than that reported for T-cell proliferation during an MLR in mammals and represents a first observation in a teleost species, not necessarily reflecting a common feature of this group. It is important to remember that in a previous work we observed in sea bass an “in vivo” T-cell involvement during allograft rejection after 2 weeks [15], thus confirming this time to be consistent to achieve a detectable cellular response. For comparison, in humans an “in vitro” MLR may require 7–10 days [37].

The MLR is a typical T-cell reaction in which B lymphocytes remain substantially unaffected [37], and this feature was also observed in sea bass, where the number of Ig-bearing cells decreased with time, together with the number of total viable leucocytes. This observation is in agreement with previous data on catfish [20], where a selective proliferation of surface Ig-negative leucocytes (putative T-cells) was detected during a one-way MLR. In addition, our data are in close agreement with those previously obtained “in vivo” in sea bass [15], in which B-cells were observed to participate in very low numbers during allograft rejection.

To further confirm the increase of T-cells in “in vitro” allorecognition, we performed RT-PCR experiments from cDNA prepared by control PBL and MLR cultures using unequivocal marker sequences for lymphocytes, the Ig and TcR β , both available for sea bass [7,26]. The results of these experiments clearly showed that by adjusting the number of cycles during PCR, and with respect to control PBL, only the expression of TcR β can be detected in MLR.

Cyclosporin A specifically inhibits mammalian T-cells by preventing dephosphorylation and subsequent nuclear translocation of transcription factors termed nuclear factor of activated T-cells (NFAT) involved in cytokine gene expression, and this feature has been recently studied in channel catfish [21]. In this study, catfish PBL and antigen-specific T-cells were treated with CsA which inhibited the “in vitro” proliferation of lectin-stimulated PBL, and of specific alloantigen stimulated T-cells. To test this hypothesis in sea bass, we added CsA to MLR cultures and the obtained results were in close agreement with those reported in the above work. Indeed, CsA lowered the number of DLT15-positive cells and brought their number to basal levels, as shown in Fig. 2. It is hence conceivable to suggest the involvement of cytokines that may directly affect T-cell proliferation, like IL-2 and IL-4, in the activation of teleost T-cells, as earlier supposed [30], and that T-cell activation processes are conserved among vertebrates. As yet a homologue for IL-4 has not been identified in teleosts, but IL-2 has been characterized in the Japanese pufferfish [46]. In addition, CsA was previously employed as a probe in mammals to study intracellular signal transduction [47], and it was shown to block the Ca²⁺-dependent signal transduction pathway emanating from the T-cell receptor, thereby

inhibiting the activation of helper T-cells. Therefore, the decrease of RFU values observed in MLR when CsA was present (Fig. 2) might be attributable to this feature of vertebrate T-cells.

As reported above MLR did not affect B-cells, but the presence of CsA in MLR cultures did have a slight effect, since the sensitivity of cells to the anti-B-cell mAb DLlg3, measured as Ca^{bp} mobilization, was similar to control values (shown in Fig. 2). This observation will be a matter for future studies.

To show the IIF and cytometric behaviour of leucocytes, the flow cytometric patterns of selected experiments are displayed in Fig. 3. Blood leucocytes are shown in Fig. 3A, where three main cell populations can be recognized in the cytogram. The IIF histograms show the profiles of DLT15-positive cells in control PBL (Fig. 3C) and in MLR (Fig. 3D), giving a visual confirmation of experimental data. This flow cytometric pattern is typical of sea bass leucocytes, as can be compared with a previous work [48].

To further investigate if the complex alloantigenic recognition mechanisms in our experiments induce an activation of intracellular activity in leucocytes, we analyzed a common and general parameter involved in fish cell activation, the receptor-induced intracellular Ca^{bp} mobilization [49]. This approach was previously and successfully employed to assess the functional role of molecules present on the cell surface of catfish nonspecific cytotoxic cells when stimulated by specific mAb [50]. Consequently, leucocyte cultures were stimulated with mAb that bind antigens at the cell surface of lymphocytes: mAb DLT15 (specific for a 42-kDa polypeptide of unknown function) and mAb DLlg3 (specific for the light chain of sea bass Ig), with the aim of triggering intracellular pathways in these cells as previously reported by antibody binding in mammals [51] and in catfish [52]. Intracellular Ca^{bp} mobilization was determined as a transient increase in Ca^{bp} -induced fluorescence measured with the reagent Fura-2 AM, as previously reported for fish leucocytes [50] or fish cells [53]. The results of this set of experiments, reported in Fig. 2B with respect to control PBL, showed that MLR cultures contained cells more sensitive towards a rise in intracellular $[\text{Ca}^{bp}]$ induced by the anti-T cell mAb. However, in MLR cultures with CsA added the rise in intracellular $[\text{Ca}^{bp}]$ induced by DLT15 was inhibited and similar to controls. This observation can be explained by remembering the work above reported [47], where CsA inhibited the Ca^{bp} -dependent signal transduction pathway of T-cells, and suggests a further functional similarity between fish and mammalian lymphocytes. On the other hand, by adding the anti-B lymphocyte mAb DLlg3 to MLR leucocytes no detectable increase of intracellular Ca^{bp} was detected (Fig. 2B). These results strongly suggest that MLR cultures also contain activated T lymphocytes.

In mammals, the “in vitro” allorecognition mechanisms are known to generate cytotoxic T lymphocytes (CTL) that can be MHC-restricted [54], and MHC-unrestricted [55,56], and the presence of CTL has been observed also in teleosts, namely in the catfish [57]. To test if CTL-like leucocytes may be generated in our conditions during an MLR, we performed a cytotoxicity assay by adding leucocytes deriving from control and MLR cultures to a xenogeneic target, as already reported in mammals [55]. The results showed that, as expected, control PBL displayed a spontaneous cytotoxic activity against SAF-1 cells, and this activity was significantly increased in a dose-dependent fashion in PBL deriving from MLR cultures. Cellular killing activities “in vitro” are also performed by NK cells, and NK-like cells have been identified in teleost fish [58]. By considering that NK-like cells have receptors for Ig [19] we tested by IIF and flow cytometry if the number of Ig-binding cells were higher in MLR than in their own controls, but they were unchanged (not shown). Although more experiments are needed to refine and clarify in details these results, they may suggest the presence of MHC-unrestricted CTL-like cells among the leucocyte population detected by IIF in the MLR.

The MLR is the result of complex cellular and molecular interactions for the recognition of non-self, and our work gives an initial contribution to investigate the role of fish leucocytes in this basic process.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge Prof. F. Palitti (University of Tuscia, Italy) for the use of X-ray irradiation machine, and Dr. M.C. Alvarez (University of Malaga, Spain) for the kind gift of the sea bream cell line SAF-1. This work was partially supported by the European 6FP project IMAQUANIM FOOD-CT-2005-007103.

References

- [1] Warr GW. The immunoglobulin genes of fish. *Dev Comp Immunol* 1995;19:1e12.
- [2] Wilson M, Bengten E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L, Warr GW. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4593e7.
- [3] Bengten E, Wilson M, Miller N, Clem LW, Pilstrom L, Warr GW. Immunoglobulin isotypes: structure, function and genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;248:189e219.
- [4] Klein JR. Mapping of MHC class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* 1997;46:129e34.
- [5] Stet RJM, Kruiswijk CP, Saeji JPJ, Wiegertjes GF. Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice. *J Immunol Rev* 1998;166:101e316.
- [6] Partula S, De Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the TCR b-chain in a teleost fish. *Immunology* 1996;157:207e12.
- [7] Scapigliati G, Romano N, Abelli L, Meloni S, Ficca AG, Buonocore F, et al. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 2000;10:329e41.
- [8] Ham BH, Hirono I, Aoki T. The four genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-chains. *J Immunol* 2003;170:3081e90.
- [9] Hansen JD, Strassburger P. Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8a, in rainbow trout. *J Immunol* 2000;164:3132e9.
- [10] Suetake H, Araki K, Suzuki Y. Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics* 2004;56:368e74.
- [11] Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ. Evolution of interleukin-1beta. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:483e502.
- [12] Scapigliati G, Romano N, Abelli L. Monoclonal antibodies in teleost fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B- lymphocytes. *Aquaculture* 1999;172:3e28.
- [13] Du Pasquier L. The phylogenetic origin of antigen-specific receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;248:160e85.
- [14] McKinney EC, Schmale MC. Primed allogeneic reactions to leukocytes and epithelial cells in the bicolor damselfish. *Transplantation* 1992;54:313e7.
- [15] Abelli L, Baldassini MR, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a teleost, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Immunol* 1999;191:152e60.
- [16] Nakanishi T, Ototake M. The graft-versus-host reaction (GVHR) in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev Comp Immunol* 1999;23:15e26.
- [17] Heiger HM, Hodgins HO, Chiller JM. Evolution of the lymphoid system. II. Evidence for immunoglobulin determinants on all rainbow trout lymphocytes and demonstration of mixed leukocyte reaction. *Eur J Immunol* 1977;7:881e7.
- [18] Caspi RR, Avtalion RR. The mixed leukocyte reaction (MLR) in carp: bidirectional and unidirectional MLR responses. *Dev Comp Immunol* 1984;8:631e7.
- [19] Shen L, Stuge TB, Evenhuis JP, Bengten E, Wilson M, Chinchur VG. Channel catfish NK-like cells are armed with IgM via a putative Fc-microR. *Dev Comp Immunol* 2003;27:699e714.
- [20] Miller NW, Deuter A, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leukocyte reaction with channel catfish. *Immunology* 1986;59:123e8.
- [21] Park H, Zhou H, Bengten E, Wilson M, Chinchur VG, Clem LW, et al. Activation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)

T-cells involves

- NFAT-like transcription factors. *Dev Comp Immunol* 2002;26:775e84.
- [22] Andrus L, Lafferty KJ. Inhibition of T-cell activity by cyclosporin A. *Scand J Immunol* 1981;15:449e58.
- [23] Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, et al. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5214e8.
- [24] Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993;160:81e8.
- [25] Scapigliati G, Romano N, Picchiatti S, Mazzini M, Mastrolia L, Scalia D, et al. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish Shellfish Immunol* 1996;6:383e401.
- [26] Dos Santos NM, Hermesen T, Rombout JH, Pilstrom L, Stet RJ. Ig light chain variability in DNP(494)-KLH immunised sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): evidence for intra-molecular induced suppression. *Dev Comp Immunol* 2001;25:387e401.
- [27] Perez-Prieto SJ, Rodriguez-Saint-Jean S, Garcia-Rosado R, Castro D, Alvarez MC, Borrego JJ. Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. *Dis Aquat Org* 1999;35:149e53.
- [28] Buonocore F, Prugnoli D, Falasca C, Secombes CJ, Scapigliati G. Peculiar gene organisation and incomplete splicing of sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) Interleukin-1b. *Cytokine* 2001;21:257e64.
- [29] Buonocore F, Randelli E, Casani D, Mazzini M, Cappuccio I, Secombes CJ, et al. cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) after vaccination. *Aquaculture* 2005;245:301e10.
- [30] Caspi RR, Avtalion RR. Evidence for the existence of an IL-2-like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish, *Cyprinus carpio*. *Dev Comp Immunol* 1984;8:51e60.
- [31] Kastrup P, Nielsen B, Horlyck V, Simonsen M. Mixed lymphocyte reactions (MLR) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sibling. *Dev Comp Immunol* 1988;12:801e8.
- [32] Somamoto T, Sato A, Nakanishi T, Otake M, Okamoto N. Specific cytotoxic activity generated by mixed leucocyte culture in ginbuna crucian carp. *Fish Shellfish Immunol* 2004;17:187e91.
- [33] Barlow EH, Cohen N. Effect of skin allograft immunization on the mixed leukocyte reaction of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Transplantation* 1981;32:282e5.
- [34] El Deeb S, Saad AH. Ontogeny of con A responsiveness and mixed leucocyte reactivity in the lizard, *Chalcides ocellatus*. *Dev Comp Immunol* 1987;11:595e604.

- [35] Lehtonen L, Vainio O, Toivanen P. Ontogeny of alloreactivity in the chicken as measured by mixed lymphocyte reaction. *Dev Comp Immunol* 1989;13:187e95.
- [36] Thibault PM, Main RK, Kountz SL. Detection of antigenic differences with the MLR and MSLR between skin, leukocytes, and kidney in rats. *Transplant Proc* 1973;5:397e400.
- [37] Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. In: Cellular and molecular immunology. PA, USA: W.B. Saunders, Company, ed.; 1991. p. 320e3. [38] Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L. Production and characterisation of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol* 1995;5:393e405.
- [39] Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 1996;6:493e505.
- [40] Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 1997;7:235e46.
- [41] Picchietti S, Terribili FR, Mastrolia G, Scapigliati G, Abelli L. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing GALT of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat Embryol* 1997;196:457e63.
- [42] Miller NW, Ryczyn MA, Wilson MR, Warr GW, Naftel JP, Clem LW. Development and characterization of channel catfish long term B cell lines. *J Immunol* 1994;152:2180e9.
- [43] Miller N, Chinchar V, Clem LW. Development of leucocyte cell lines from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Tissue Cult Methods* 1994;16:117e23.
- [44] Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev* 1997;77:591e625.
- [45] Esteban MA, Rodriguez A, Ayala AG, Meseguer J. Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream. (*Sparus aurata* L.). *Gen Comp Endocrinol* 2004;137:89e98.
- [46] Bird S, Zou J, Kono T, Sakai M, Dijkstra JM, Secombes CJ. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny. *Immunogenetics* 2005;56:909e23.
- [47] Liu J. FK506 and cyclosporin: molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:182e8.
- [48] Esteban MA, Munoz J, Meseguer J. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *Anat Rec* 2000;258:80e9.
- [49] Radman DP, McCudden C, James K, Nemeth EM, Wagner GF. Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:111e9.
- [50] Evans DL, Harris DT, Jaso-Friedmann L. Function associated molecules on nonspecific cytotoxic cells: role in calcium signaling, redirected lysis, and modulation of cytotoxicity. *Dev Comp Immunol* 1992;16:383e94.
- [51] Tsoukas CD, Landgraf B, Bentin J, Valentine M, Lotz M, Vaughan JH, et al. Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes. *J Immunol* 1985;135:1719e23.
- [52] Van Ginkel FW, Miller NW, Cuchens MA, Clem LW. Activation of channel catfish B cells by membrane immunoglobulin cross-linking. *Dev Comp Immunol* 1994;18:97e107.
- [53] Guibolini ME, Pierson PM, Lahlou B. Neurophysiological hormone receptors and second messengers in trout hepatocytes. *J Endocrinol* 2000;167:137e44.
- [54] Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 1985;3:31e58.
- [55] Green LM, Stern ML, Haviland DL, Mills BJ, Ware CF. Cytotoxic lymphokines produced by cloned human cytotoxic T lymphocytes. I. Cytotoxins produced by antigen-specific and natural killer-like CTL are dissimilar to classical lymphotoxins. *J Immunol* 1985;135:4034e43.
- [56] Kaiser M, Hoskin DW. Expression and utilization of chymotrypsin-like but not trypsin-like serine protease enzymes by nonspecific T killer cells activated by anti-CD3 monoclonal antibody. *Cell Immunol* 1992;141:84e98.
- [57] Zhou H, Stuge TB, Miller NW, Bengten E, Naftel JP, Bernanke JM, et al. Heterogeneity of channel catfish CTL with respect to target recognition and cytotoxic mechanisms employed. *J Immunol* 2001;167:1325e32.

[58] Shen L, Stuge TB, Bengten E, Wilson M, Chinchar VG, Naftel JP, et al. Identification and characterization of clonal NK-like cells from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 2004;28:139e52.



CYTOKINE

elsevier.com/locate/issn/10434666

www.e

Cytokine 34 (2006) 9–16

Evolution of cytokine responses: IL-1b directly affects intracellular Ca^{2+} concentration of teleost fish leukocytes through a receptor-mediated mechanism

S. Benedetti^a, E. Randelli^a, F. Buonocore^a, J. Zou^b, C.J. Secombes^b, G. Scapigliati^{a,*}

^a Department of Environmental Sciences, University of Tuscia, I-01100 Viterbo, Italy

^b Scottish Fish Immunology Research Centre, University of Aberdeen, AB24 2TZ Aberdeen, Scotland

Received 12 December 2005; received in revised form 6 February 2006; accepted 19 March 2006

Abstract

In this work we studied the biological activities of recombinant IL-1b from the teleosts sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by investigating the effects induced on intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of spleen leucocytes. Splenocytes were loaded with the Ca^{2+} -permeant Fura-2AM, and then stimulated with rIL-1b. The emitted fluorescence was read for 5 min at 1 min intervals on a dual excitation fluorescence fluorimeter. Results showed that rIL-1b induced in both species a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and a subsequent decrease until 5 min after stimulation. The stimulating effect was dose-dependent in both species reaching a plateau at 200 ng/ml of rIL-1b, was abolished by heat-treatment of rIL-1b, and affected in a dose-dependent fashion by treatment of leucocytes with trypsin. These features suggested a functional IL-1 receptor was involved in the binding. The observed rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not detected in human PBMC and was species-specific, since rIL-1b from sea bass, trout, and human were unable to interfere each other in the assay. Moreover, incubation of splenocytes with rIL-1b induced a rapid tyrosine phosphorylation of a 24 kDa polypeptide in both species. This work represents the first evidence of a direct effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by IL-1b and suggests that in the evolution of IL1 activities, teleost fishes display a peculiar IL-1-associated behaviour that is lacking in mammals.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: IL-1; Teleost; Intracellular Ca^{2+} ; Phosphorylation; Cytokine evolution; Sea bass; Rainbow trout

1. Introduction

Interleukin-1b (IL-1b) is a key molecule for the regulation of immune responses in jawed vertebrates, and its discovery in cartilaginous and bony fish dates back cytokine evolution at ca. 400 My ago [1-3]. IL-1b has a pleiotropic activity, affecting in mammals nearly every cell type [4], is mainly produced by activated macrophages as an inactive precursor peptide, and to achieve a biological activity must be cleaved intracellularly by an IL-1b converting enzyme (ICE) [5]. In contrast to mammals, fish IL-1b precursors cloned to date lack a clear ICE cut site [6,7].

* Corresponding author. Fax: +39 0761 357179.
E-mail address: scapigg@unitus.it (G. Scapigliati).

1043-4666/\$ - see front matter _ 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cyto.2006.03.009

To compare the biological activity of IL-1b between evolutionary-distant vertebrates, the availability of fish recombinant IL-1b (rIL-1b) molecule allowed its testing in “in vitro” and “in vivo” biological assays in some teleost species like trout [8-10], carp [11,12], and sea bass [13,14]. These studies clearly showed the activity of rIL-1b on various assays, suggesting that this cytokine may be endowed with a pleiotropic activity also in teleosts.

IL-1 activity occurs as a consequence of binding to its receptor complex (IL-1R) on the cell surface of target cells [4,15,16], and the IL-1R transduction system in mammals is extraordinarily sensitive in that just a few ligand-occupied receptors can account for all biological activity [16,17]. In teleost fish, the IL-1R has been cloned and sequenced [18-20], and the 3D-structure of the IL-1/IL-1R complex revealed [21].

Binding of IL-1 to the IL-1R complex in mammals triggers signal transduction through different intracellular signalling pathways [4]. These pathways play a pivotal role in inflammatory and immune responses and include activation of the NF κ B gene, of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and of Jun N-terminal kinase [22–24]. In mammals, various signal events have been reported to be elicited by IL-1b, and several second messengers have been shown to be affected by this cytokine, like diacylglycerol [25], protein kinase C (PKC) and cyclic AMP (cAMP), protein kinase A (PKA) [17,26,27], MAP kinase pathways [28,29], I κ B kinase [30], and IRAK [31].

A first step in receptor-mediated intracellular signalling is an alteration in $[Ca^{2+}]_i$, which provides a ubiquitous cell signalling system among vertebrate species that mediates a variety of cellular processes [32,33]. However, the knowledge on the effects elicited by rIL-1b on $[Ca^{2+}]_i$ is still unclear, since in mammals it was reported to decrease $[Ca^{2+}]_i$ in murine pre-B cells [34], have no effects in murine T-cells [35], in human neutrophils [36], in human clonal pituitary cells [37], or to increase Ca^{2+} influx from the outside in murine fibroblasts [38].

In order to add new insights on the evolution of IL-1-induced signalling mechanisms, in this work we studied the effects of rIL-1b on $[Ca^{2+}]_i$ of teleost fish leucocytes from two evolutionary distant species (rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and sea bass *Dicentrarchus labrax*) by measuring $[Ca^{2+}]_i$ using the Fura-2 fluorescence method [39,40]. In addition, we studied the effects of human rIL-1b in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), the species-specificity of rIL-1b between fish and human leucocytes, and the effect of rIL-1 on tyrosine phosphorylation of intracellular peptides.

2. Materials and methods

2.1. Leucocytes

Farmed sea bass and rainbow trout (ca. 300 g in weight) used in all experiments were obtained from local fish farms and were killed by anaesthetic overdose (1 g/l of tricaine methanesulfonate in water). Every fish was healthy at sampling. All buffers and solutions were adjusted to 355 mOsm/kg for sea bass or to 308 mOsm/kg for rainbow trout. Splenocytes were prepared as described previously [41] by teasing spleens over a 100 μ m nylon grid, resuspending cells in 8 ml HBSS and loading over 1.07–1.02 g/cm³ Percoll gradients. After centrifugation at 840g for 30 min at 4 °C, the cells at the interface between the two Percoll densities were collected, washed in HBSS (10 min, 680g) at 4 °C and resuspended in 5 ml of L-15 medium (Gibco) containing 10% heat-inactivated FCS (Gibco) and penicillin/streptomycin (Sigma). Splenocyte cultures were incubated at 10⁷ cells/ml overnight at 18 °C in 25 cm² flasks.

Human peripheral mononuclear blood cells (PBMC) were obtained from healthy donors through the local hos-

pital blood bank. PBMC were purified by stratifying 5 ml of whole blood diluted in 20 ml of phosphate-buffered saline (PBS) over Ficoll gradients following standard protocols [42]. Cells collected at the interface were washed with PBS and PBMC, resuspended at 10⁷ cells/ml in RPMI containing antibiotics (penicillin, streptomycin), and immediately used.

Leucocytes and human PBMC viability were determined by counting with Trypan blue and was always not less than 90%.

2.2. rIL-1b production and purification

Rainbow trout and sea bass IL-1b genes were previously characterized [6,43] and expressed in *Escherichia coli* after cloning into the pQE30 vector (Qiagen) [8,13]. The recombinant peptides from both species contain a six-histidine tag at the N-terminus and protein purification has been achieved through this tag by affinity chromatography using Ni-NTA spin columns Kit (Qiagen). The rIL-1b purity was determined by SDS-PAGE and the LPS levels in protein preparation were determined with a Limulus Amebocyte Lysate Kit (LAL Test, Bio Whittaker) to ensure no endotoxin contamination. Biological activity of purified sea bass and rainbow trout rIL-1b were tested using the D10.G4.1 proliferation assay as described previously [8,13]. Where necessary, rIL-1 was treated for 2 min at 100 °C.

Human IL-1b was purchased from Peprotech (Peprotech Europe, UK), fish and human IL-1 were aliquoted in L15 medium containing 1% FCS and stored at 80 °C until use.

2.3. Intracellular Ca^{2+} measuring

Splenocytes and PBMC were washed twice with FCS-free L-15 medium (10 min, 680g) at 18 °C, resuspended at 2×10^7 /ml in the same medium, then loaded with a final concentration of 4 μ M of the calcium-binding fluorochrome Fura-2AM (Sigma) for 45 min at 18 °C. After incubation, splenocytes and PBMC were washed as above with serum-free and phenol red-free RPMI, resuspended in the same medium at 10⁷ cells/ml, and 100 μ l plated in duplicate (10⁶ cells/well) in 96-well fluorimetric plates (Isoplate TC PerkinElmer). rIL-1b (1 μ l to each well) was then added at various concentrations. As a positive control 5 μ M of the calcium ionophore ionomycin (Sigma) was employed, or as a negative control 1 μ l of IL-1b-diluting buffer. For species-specificity tests, fish splenocytes or PBMC were added with 200 ng/ml of sea bass, rainbow trout or human rIL-1b. To test if the measured Ca^{2+} was due to intracellular mobilization or intake from extracellular sources, 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was added to samples before stimulation with IL-1.

The fluorescence emitted by leucocytes was read for 5 min at 1 min intervals on a dual excitation fluorescence fluorimeter (Victor II, Wallac, USA) that allows simultaneous excitation of fluorescence at 355 and 460 nm. Num-

bers were expressed as relative fluorescence units (RFU), which are the numerical values recorded by the instrument at the reported wavelengths.

2.4. Trypsin treatment

Splenocytes were loaded at $2 \cdot 10^7$ /ml with 4 IM Fura-2AM as described above and washed twice with RPMI without FCS and phenol red. Then aliquots of $4.5 \cdot 10^6$ cells in 200 μ l of RPMI were added with 200 μ l of several dilutions of trypsin-EDTA (Gibco) from 1:2 to 1:40,000. After 60 s of trypsin treatment, 50 μ l of FCS were added to each cellular suspension to block the protease, and leucocytes washed in RPMI (480g, 3 min), resuspended in the same medium and stimulated with 200 ng/ml of rIL-1b as above. The emitted fluorescence was read as above.

2.5. Anti-phosphotyrosine Western blotting

Splenocytes from sea bass and rainbow trout at $5 \cdot 10^6$ /ml in serum-free L15 were stimulated with 200 ng/ml rIL-1b, and aliquots of $5 \cdot 10^6$ cells were removed after 1, 5, 10, and 20 min from stimulation. Unstimulated cells were used as control. Splenocytes were then pelleted at 480g for 3 min, resuspended in 50 μ l of a lysis solution (PBS containing 0.5 M PMSF and 0.5% Triton X-100) and kept in ice for 15 min. After vigorous vortexing, cell lysates were centrifuged at 10,000g for 5 min and the supernatant denatured with 15 μ l of Laemmli sample buffer (LSB 4-) without boiling.

Cellular lysates (20 μ l each lane) were resolved in a 12% SDS-PAGE, then electroblotted onto nitrocellulose for Western blotting analysis as above. Tyrosine-phosphorylated proteins were detected by incubating BSA-saturated nitrocellulose blots with the anti-phosphotyrosine mAb clone 4G10 (Upstate Biotechnology, USA) diluted 1:1000

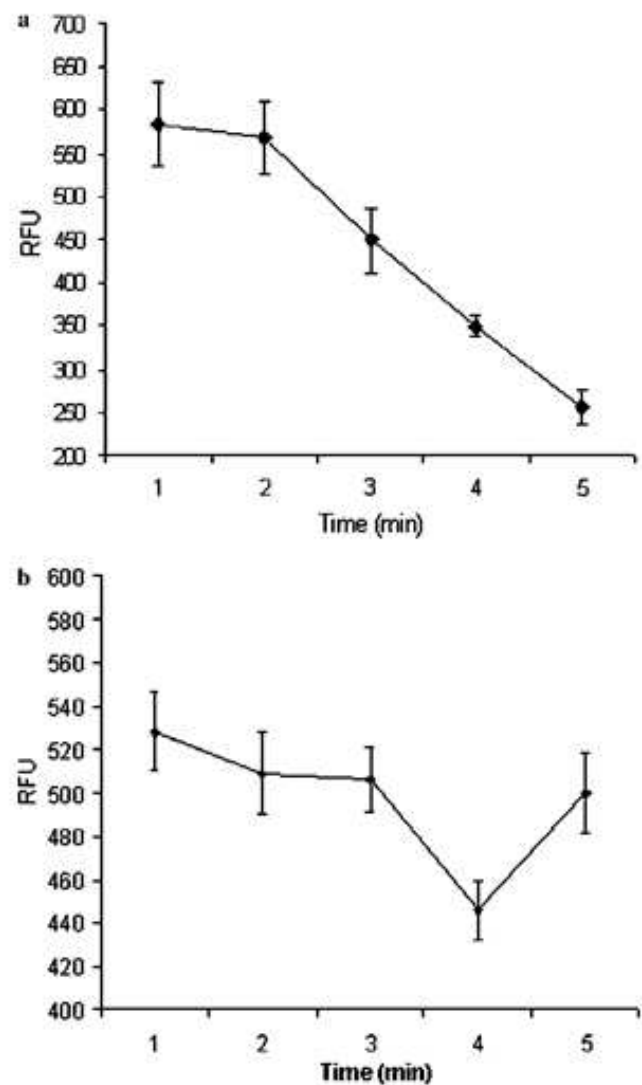


Fig. 1. Time-course of IL-1b effect on intracellular Ca²⁺ in splenocytes. Splenocytes from sea bass (a) and rainbow trout (b) were loaded with

(1 μ g/ml). The membrane was incubated with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (ICN Biomedicals USA) diluted 1:1.500 for 90 min at room temperature. Positive binding was visualized with enhanced chemiluminescence ECL (Amersham Life Science, Pharmacia) and exposure to autoradiographic film. As a control, 5×10^6 splenocytes were pre-treated with 200 μ M of the protein-kinase inhibitor genistein (Sigma) for 30 min at 37°C, then incubated with 200 ng/ml rIL-1b and processed as above.

2.6. Data analysis

Reported mean RFU values of $[Ca^{2+}]_i$ represent the experimental values subtracted of the corresponding controls. Each experiment was repeated three times. Statistical comparison of group values was made using paired t-tests (two-tailed), and values were considered significantly different at $p \leq 0.05$. Data presented in Fig. 1 were also analysed with Wilcoxon signed rank test, a nonparametric alternative to the paired t-test, and taken as significant for $p < 0.05$. Data presented in Figs. 2-4, were also analysed

Fura-2AM for 45 min at 18 °C, washed and incubated with 200 ng/ml of homologous rIL-1b. Measurements of fluorescence were made every minute for 5 min. RFU values are the mean ± SD of three experiments using 12 spleens for each species. Data were analyzed by Wilcoxon signed rank test, with values considered significant when $p < 0.06$. A significant difference between a particular time and the precedent mean value was always present for both species.

as non-parametrical with Mann-Whitney rank sum tests and taken as significant for $p < 0.06$. Data are presented as mean value ± SD (standard deviation).

3. Results

3.1. Time course and EDTA treatment

Splenocytes from sea bass and rainbow trout were stimulated with 200 ng/ml of rIL-1b for 5 min. The results are shown in Fig. 1. In sea bass, the initial burst of fluorescence around 600 RFU, the decrease had a different profile, linear in the first

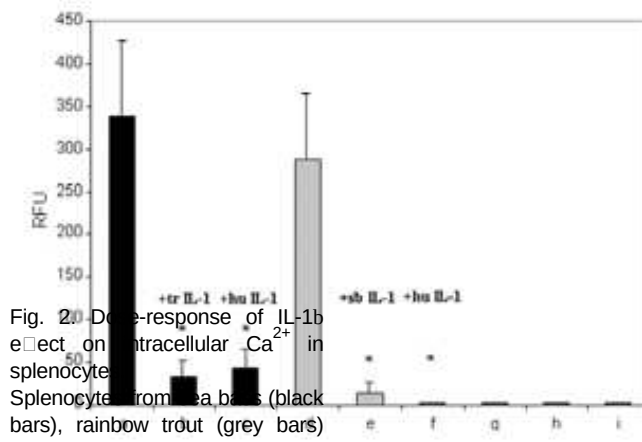
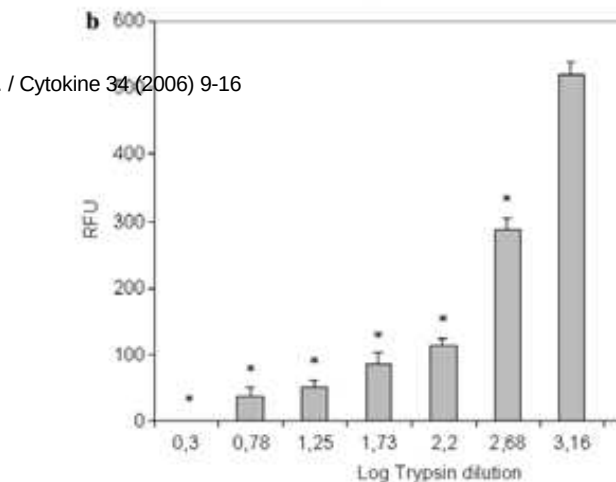
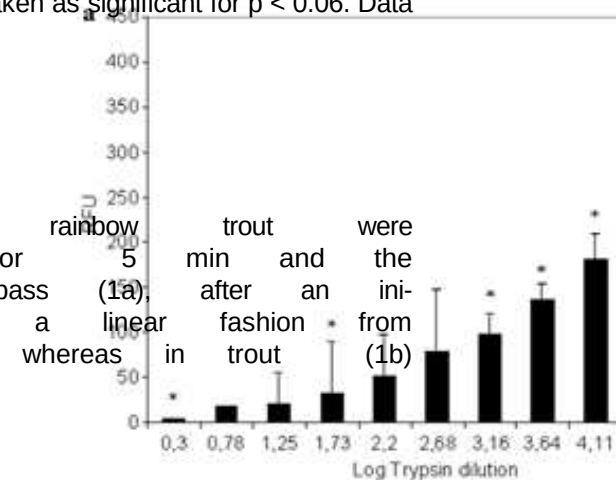


Fig. 2. Dose-response of IL-1b effect on intracellular Ca^{2+} in splenocytes from sea bass (black bars), rainbow trout (grey bars) were loaded with Fura-2AM for 45 min at 18 °C, washed and incubated with indicated amounts of homologous rIL-1b, and measurements of fluorescence made 5 min later. RFU values are the means ± SD of three experiments using 10 spleens for each species. Data were analyzed by Mann-Whitney rank sum tests, with values considered significant when $p < 0.06$. Asterisks indicate a significant difference between a particular concentration and the precedent mean value one for sea bass (*).

and
rainbow trout (**).

Fig. 4. Trypsin sensitivity of IL-1 β effect on intracellular Ca^{2+} in splenocytes. Splenocytes from sea bass (a) and rainbow trout (b) were treated for 1 min with indicated dilutions of trypsin-EDTA solution, then loaded with Fura-2AM for 45 min at 18 °C, washed and incubated with 200 ng/ml of rIL-1 β . The control value (c) was not treated with trypsin. Measurements of fluorescence were made at 5 min, and RFU values

Fig. 3. Species-specificity of IL-1b. Splenocytes from sea bass, and rainbow trout, and human PBMC were loaded with Fura-2AM for 45 min at 18 °C, washed and stimulated with 100 ng/ml of rIL-1b from sea bass (a), trout (d), and human (g). Sea bass splenocytes (black bars) were also incubated with 100 ng/ml of rIL-1b from trout (b), and human (c); trout splenocytes (grey bars) were also incubated with 100 ng/ml of rIL-1b from sea bass (e), and human (f); and human PBMC were also incubated with 100 ng/ml of rIL-1b from sea bass (h), and trout (i). Measurements of fluorescence were made 5 min later. RFU values presented as the means $\pm$ SD of two experiments using six individuals for each species. Data were analyzed by Mann-Whitney rank sum tests, with values considered significant when $p < 0.06$. A significant difference is indicated with an asterisk when comparing trout (+tr IL-1) and human IL-1 (+hu IL-1) with sea bass, and when comparing sea bass (+sb IL-1) and human IL-1 with trout.

4 min and then starting to increase with values from 540 to 420 RFU. For a better comparison of data, Fig. 1 shows RFU values for 5 min for both species. Times of incubation were tested after 5 min and until 30 min, and in both species complex profiles were observed (not shown). Consequently, all subsequent experiments were recorded for the first 5 min.

presented as the means $\pm$ SD of two experiments using eight spleens for each species. Data were analyzed by Mann-Whitney rank sum tests, with values considered significant when $p < 0.06$. Asterisks indicate a significant difference between a particular concentration and the precedent mean value one.

Testing the effects of 200 ng/ml of rIL-1b at 2 min in the presence of EDTA had no significant effects on the $[Ca^{2+}]$ values, since mean RFU values for sea bass were 580 ± 30 without EDTA and 569 ± 20 with EDTA; for trout mean RFU values were 507 ± 28 without EDTA, and 499 ± 16 with EDTA. The treatment of rIL-1b at 100 °C had no effects on $[Ca^{2+}]$ values in both fish species (data not shown).

3.2. Dose-response and species-specificity

Fig. 2 shows the RFU of $[Ca^{2+}]_i$ in splenocytes from sea bass and rainbow trout stimulated with increasing concentrations of rIL-1. For both species, 200 ng/ml of rIL-1b was a saturating concentration since at 400 ng/ml no fur-

ther increase in RFU values was observed. On the other hand, decreasing the amount of rIL-1b resulted in a dose-response decrease in RFU for both species, with sea bass and trout showing no response or little response, respectively, at 2 ng/ml of rIL-1b. Analysis of data by Mann-Whitney statistics showed that for sea bass (Fig. 2, *) the decrease observed from 200 to 2 ng/ml of IL-1 was significant with values of $p < 0.06$, whereas for trout (Fig. 2, **) the same was observed from 200 to 7 ng/ml.

To test the species-specificity of $[Ca^{2+}]_i$ -induction, splenocytes of sea bass, trout, and human PBMC were treated with 100 ng/ml of homologous and heterologous rIL-1b, and the results are shown in Fig. 3. For sea bass (3a), homologous rIL-1b gave a value of 338 RFU, whereas trout (3b) 32 RFU (9.4%), and human (3c) 43 RFU (12%). For rainbow trout (3d), homologous rIL-1b gave a value of 287 RFU, sea bass (3e) 13 RFU (4.5%), and human (3f) no effects. For human, no effects were detected on $[Ca^{2+}]_i$ using homologous (3g), or fish (3h, 3i) rIL-1b. Statistical analysis of data showed that the differences between species were significant, with values of $p < 0.05$.

3.3. Trypsin treatment

Sea bass and rainbow trout splenocytes were briefly treated for 1 min with trypsin-EDTA before rIL-1b stimulation, and the obtained results are shown in Fig. 4. In both species a dose-dependent effect on $[Ca^{2+}]_i$ was observed: in sea bass (4a) a dilution of trypsin of 1:38,000 (4.59 log dilution) was required to have RFU values similar to control, whereas in trout (4b) a dilution of trypsin of 1:4000 (3.16 log dilution) was required to have RFU values similar to control.

3.4. Anti-phosphotyrosine blotting

Cell lysates of sea bass and rainbow trout splenocytes treated with 200 ng/ml of rIL-1b for various times and tested by Western blotting with a mAb anti-phosphotyrosine are shown in Fig. 5. The Coomassie staining of 12% SDS-PAGE of sea bass splenocytes before and after addition of rIL-1b (5a) showed no detectable differences between samples, with main bands at 130, 40, 33, 24 and 11 kDa. In a similar experiment performed in the presence of genistein (5c), only bands at 130, 40, and 30 kDa were detected. In rainbow trout, Coomassie staining of 12% SDS-PAGE of a similar experiment showed main bands at 130, 40, 30, and 11 kDa (5e). After electroblotting gels of splenocyte lysates onto nitrocellulose and incubating with the anti-phosphotyrosine mAb 4G10, weak but clear bands at 24 kDa in both sea bass (5b) and trout (5f) were seen. The stained polypeptide was detectable at 5 and 10 min after rIL-1b stimulation in sea bass, and at 5, 10, and 20 min in trout. Pre-treatment of sea bass splenocytes with 250 IM genistein abolished the positivity at 24 kDa (5d).

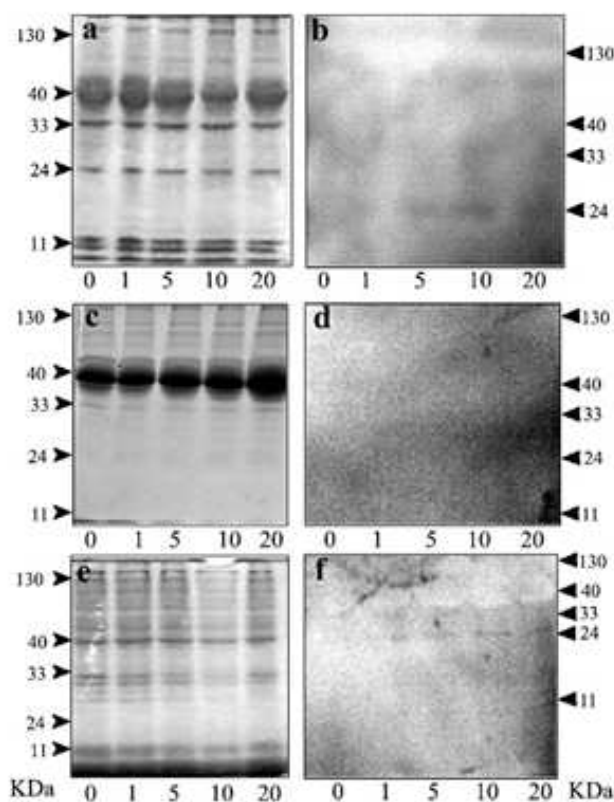


Fig. 5. Western blotting with anti-phosphotyrosine antibody. Splenocytes from sea bass (a, c) and rainbow trout (e) were incubated with 200 ng/ml of rIL-1b, and at indicated times cells were dissolved in LSB and electrophoresed on a 12% SDS-PAGE. The Coomassie stain of sea bass splenocytes is shown in (a), and of sea bass splenocytes preincubated with genistein is shown in (c). The Coomassie stain of trout splenocytes is shown in (e). Western blotting of these samples after incubation with the anti-phosphotyrosine mAb 4G10 is shown for sea bass in (b and d), and for trout in (f). A faint positive band is present for both species at 24 kDa in (b and f), and absent in (d). Molecular weight markers are shown.

4. Discussion

The cytokine IL-1b is a potent mediator of inflammatory and immune responses to injury and infection [44], and its multiple biological activities are exerted through receptor-mediated processes and complex intracellular pathways of second messengers. The IL-1b gene has been found in all jawed vertebrates and so it may represent an ideal gene to study for cytokine evolution in these organisms [41]. In this respect, it may be interesting to study the evolution of pleiotropic activities associated with IL-1 from its appearance in fish to higher vertebrates. Biological functions exerted “in vitro” and “in vivo” by fish rIL-1 were investigated, and some activities have been found to overlap with those of other vertebrates [8–12,14]. From these studies it is clear that fish IL-1 is the best characterized cytokine among non-mammalian vertebrates.

Variations in $[Ca^{2+}]_i$ may mediate a variety of cellular processes and provide an ubiquitous cell signalling system (see Section 1 for references), and the aim of our work was to investigate the effects of rIL-1 stimulation on $[Ca^{2+}]_i$ in two important teleost species, sea bass and trout.

After screening for the best IL-1 responders among leu- mild trypsinization, suggesting the presence in splenocytes

kocytes prepared from lymphoid organs, splenocytes were selected, as they gave highest RFU values of $[Ca^{2+}]_i$ in both species (not shown).

Upon addition of rIL-1 a rapid increase of $[Ca^{2+}]_i$ was observed in splenocytes of both species, with a subsequent decrease for the following 5 min, more evident for sea bass, as shown in Fig. 1. Several oscillations of $[Ca^{2+}]_i$ were observed after 5 and until 30 min (not shown), likely deriving from responses of the diverse cellular populations composing splenocytes.

Next we assessed if the observed IL-1-dependent Ca^{2+} mobilization was due to a release from intracellular stores or by an uptake from the extracellular environment. By sequestering extracellular Ca^{2+} with EDTA no variations were observed in $[Ca^{2+}]_i$ (see Section 3), thus revealing the intracellular origin of Ca^{2+} mobilization.

To assess if the effects on $[Ca^{2+}]_i$ were due to a saturable binding of rIL-1 to a putative receptor, as shown in mammals [15], increasing amounts of rIL-1 were added to splenocytes (see Fig. 2). From 2 to 200 ng/ml of rIL-1 a dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed, and this increase stopped at 400 ng/ml of rIL-1, thus suggesting a saturation of the effect in both species, although at a different extent. As a control, rIL-1 was heat-denatured before assay and, as expected, no effects on $[Ca^{2+}]_i$ were observed.

Human PBMC and human rIL-1b were also used as a model cell population to study the response to rIL-1 on $[Ca^{2+}]_i$, since previous work suggested that in mammals IL-1b may induce “in vitro” different responses with respect to the cell type [25,34-38,45,46]. In agreement with these studies, no variation in $[Ca^{2+}]_i$ was observed to be induced after 5 min by human rIL-1b (Fig. 3). This observation may suggest that in the evolution of IL-1, a direct and rapid effect on $[Ca^{2+}]_i$ was lost between fish and mammals, or was gained by the fish molecule after divergence from the tetrapod lineage.

The effects induced by rIL-1b on $[Ca^{2+}]_i$ were species-specific, since the addition to both sea bass and trout splenocytes of 100 ng/ml of the heterologous cytokine

had no effects, as shown in Fig. 3. These data are in agreement with a previous work [8], in which was observed a 1000-fold excess of trout IL-1 required to elicit the same effect of human IL-1 in the D10.G4.1 assay. Hence, considering the significant homology in the peptide sequence among human and fish IL-1 [6,43], and the recent data on three-dimensional modelling of IL-1/IL-1R_i interactions in fish [21], the observed species-specificity may originate from different binding properties of ligands to the IL-1R as, for instance, in the case of the IL-1R antagonist that is unable to trigger intracellular signalling [47].

From the data we obtained the involvement of a functional IL-1R_i mediating IL-1 signalling appears evident. Knowing that an IL-1R_i homolog was cloned in fish [10,19,20], we treated splenocytes with the enzyme protease trypsin before rIL-1 binding and $[Ca^{2+}]_i$ determination. The results (Fig. 4) showed a strong sensitivity of cells to

of both fish species of an ecto-peptide involved in the rIL-1 binding and sensitive to trypsin, being very likely an IL-1R.

Binding of IL-1 to the IL-1R complex of mammals triggers complex intracellular signal transduction pathways (see Section 1 for references) among which protein phosphorylation by protein kinases is a downstream event that plays a major role [48]. To test this pathway in fish, we incubated splenocytes with rIL-1 and probed obtained lysates in Western blotting with a monoclonal anti-phosphotyrosine (see Fig. 5). A weak but evident clear band at 24 kDa was detected in both fish species at 5 and 10 min after rIL-1b stimulation in sea bass, and at 5, 10, and 20 min in trout. As a control, sea bass splenocytes were pre-treated with genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor [49,50] before rIL-1b stimulation, and no phosphorylation was detected in such lysates.

To better understand these data, it should be remembered that interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) homologs are evolutionarily conserved and have been found in insects and mammals [51], and IRAK-4 and IRAK-1 mediate downstream events in the IL1R-mediated signal transduction. IRAK-1 was recently shown to also be involved in the rapid phosphorylation of a cytoplasmic unknown 24 kDa polypeptide in mouse EL-4 cells [52], thus suggesting a putative similarity in conserved downstream events associated with IL-1 signalling. In addition, it should be remembered that in a previous study, a phosphatidylinositol 3-kinase was tyrosine phosphorylated within 5 min in response to IL-1 in a human cell line [53]. Although much work is required for the elucidation of IL-1-driven second messenger cascades in fish, these previous studies may help to provide a clue to the nature of the phosphorylated 24 kDa polypeptide in sea bass and trout splenocytes.

In conclusion, our work shows that in the evolution of IL-1 activities, teleost fish display a peculiar IL-1-associated activity that is lacking in mammals. Future work will investigate similar IL-1-driven pathways in other vertebrates, to assess the point in evolution where IL-1 lost or acquired pleiotropic activity.

Acknowledgements

Authors are indebted to Dr. C. Dinarello for the critical reading of the manuscript. This work was partially supported by the EU integrated project IMAQUANIM, Contract No. FOOD-CT-2005-007103.

References

- [1] Bird S, Wang T, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ. The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1b in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *J Immunol* 2002;168:3329-40.
- [2] Secombes CJ. The non specific immune system: cellular defense. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. *The fish immune system*. Boston: Academic press; 1996. p. 63-103.

- [3] Secombes CJ, Bird S, Cunningham C, Zou J. Interleukin-1 in fish. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9:335–43.
- [4] Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:221–37.
- [5] Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al.. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 1992;356:768–74.
- [6] Zou J, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ. Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine* 1999;11:552–60.
- [7] Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol* 2000;10:229–42.
- [8] Hong S, Zou J, Crampe M, Peddie S, Scapigliati G, Bols N, et al.. The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β . *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81:1–14.
- [9] Hong S, Peddie S, Campos-Perez J, Zou J, Secombes CJ. The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 β on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immun* 2003;27:801–12.
- [10] Holland JW, Pottinger TG, Secombes CJ. Recombinant interleukin-1 β activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Endocrinol* 2002;175:261–7. [11] Yin Z, Kwang J. Carp interleukin-1 β in the role of an immuno-adjutant. *Fish Shellfish Immunol* 2000;10:375–8.
- [12] Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg van Kemenade BM, Kwang J. Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish Shellfish Immunol* 2002;13:85–95.
- [13] Buonocore F, Mazzini M, Forlenza M, Randelli E, Secombes CJ, Zou J, et al.. Expression in *Escherichia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin-1 β , a possible immuno-adjutant in aquaculture. *Mar Biotechnol* 2004;6:53–9.
- [14] Buonocore F, Forlenza M, Randelli E, Benedetti S, Bossu` P, Meloni S, et al.. Biological activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) recombinant IL-1 β . *Mar Biotechnol* 2005;7:609–17.
- [15] Scapigliati G, Boraschi D, Tagliabue A, Ghiara P. The interleukin-1 receptor on B and T cells: different binding properties for IL-1 α and IL-1 β . *FEBS Lett* 1989;234:394–8.
- [16] Sims JE, Dower SK. Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw* 1994;5:539–46.
- [17] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095–147.
- [18] Holland JW, Pottinger TG, Cunningham C, Secombes CJ. Sequencing and expression analysis of the type 1 interleukin-1 receptor gene EMBL accession number AJ295296; 2000.
- [19] Sangrador-Vegas A, Martin SAM, O'Dea PG, Smith TJ. Cloning and characterisation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur J Biochem* 2000;267:7031–7.
- [20] Subramaniam S, Stansberg C, Olsen L, Zou J, Secombes CJ, Cunningham C. Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Dev Comp Immunol* 2002;26:415–31.
- [21] Scapigliati G, Costantini S, Colonna G, Facchiano A, Buonocore F, Bossu` P, et al.. Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Dev Comp Immunol* 2004;28:429–41.
- [22] May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 1998;19:80–8.
- [23] Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The Kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999;398:252–6.
- [24] Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, et al.. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997;158:3165–73.
- [25] Roso` PM, Savage N, Dinarello CA. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* 1988;54:73–81.
- [26] Mizel SB. Cyclic AMP and interleukin-1 signal transduction. *Immunol Today* 1990;11:390.
- [27] Plata-Salaman CR, Ffrench-Mullen JMH. Interleukin-1 β inhibits Ca²⁺ channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C. *Eur J Pharm* 1994;266:1–10.
- [28] Han J, Lee J-D, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265:808–11.
- [29] Wilmer WA, Tan LC, Dickerson JA, Danne M, Rovin BH. Interleukin-1 β induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J Biol Chem* 1997;272:10877–81.
- [30] Wesche H, Neumann D, Resch K, Martin MU. Coexpression of mRNA for type I and type II interleukin-1 receptor accessory protein correlates to IL-1 responsiveness. *FEBS Lett* 1996;391:104–8.
- [31] Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: A kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 1996;271:1128–31.
- [32] Lytton J, Nigam SK. Intracellular calcium: molecules and pools. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:220–6.
- [33] Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992;10:295–331.
- [34] Stanton TH, Maynard M, Bomszyk K. Effect of interleukin-1 on intracellular concentration of sodium, calcium, and potassium in 702/3 cells. *J Biol Chem* 1986;261:5699–701.
- [35] Abraham RT, Ho SN, Barna TJ, McKean DJ. Transmembrane signaling during interleukin 1-dependent T cell activation. Interactions of signal 1- and 2-type mediators with the phosphoinositide-dependent signal transduction mechanism. *J Biol Chem* 1987;262:2719–28.
- [36] Georgilis K, Schaefer C, Dinarello CA, Klempner MS. Human recombinant interleukin 1 β has no effect on intracellular calcium or on functional responses of human neutrophils. *J Immunol* 1987;138:3403–7.
- [37] Schettini G, Meucci O, Florio T, Scala G, Landolfi E, Grimaldi M. Effect of interleukin 1 β on transducing mechanisms in 235-1 clonal pituitary cells. Part II: Modulation of calcium fluxes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:1097–104.
- [38] Bouchelouche PN, Reimert C, Bendtzen K. Effects of natural and recombinant interleukin-1 α and - β on cytosolic free calcium in human and murine fibroblasts. *Leukemia* 1988;2:691.
- [39] Malgaroli A, Milani D, Meldolesi J, Pozzan T. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca²⁺ in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J Cell Biol* 1987;105:2145–55.
- [40] Verburg-Van Kemenade BML, Saeij JPJ, Flik G, Willems PHGM. Ca²⁺ signals during early lymphocyte activation in carp *Cyprinus carpio* L. *J Exp Biol* 1998;201:591–8.
- [41] Scapigliati G, Romano N, Abelli L, Meloni S, Ficca AG, Buonocore F, et al.. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 2000;10:329–41.
- [42] Gibson KM, McLean KA, Clewley JP. A simple and rapid method for detecting human immunodeficiency virus by PCR. *J Virol Methods* 1991;32:277–86.
- [43] Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, Zou J, Pelegri P, Falasca C, et al.. Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 β . *Fish Shellfish Immunol* 2001;11:711–26.
- [44] Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8:1314.
- [45] Pacifici R, Civitelli R, Rifas L, Hakstead L, Alveoli LV. Does interleukin-1 affect intracellular calcium in osteoblast-like cells (UMR-106)? *J Bone Miner Res* 1988;3:107–11.

- [46] Pita I, Jelaso AM, Ide CF. IL-1b increases intracellular calcium through an IL-1 type 1 receptor mediated mechanism in C6 astrocytic cells. *Int J Dev Neuroscience* 1999;17:813-20.
- [47] Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, et al.. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990;343:336-40.
- [48] Saklatvala J, Bird TA, Kaur P, O'Neill LA. IL-1 signal transduction: evidence of activation of G protein and protein kinase. *Prog Clin Biol Res* 1990;349:285-95.
- [49] Trevillyan JM, Lu YL, Atluru D, Phillips CA, Bjorndahl JM. Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J Immunol* 1990;145:3223-30.

- [50] Atluru D, Jackson TM, Atluru S. Genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;59:379-87.
- [51] O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998;63:650-7.
- [52] Bo'Il GF, Jurrmann N, Brigelius-Flohe' R. Cellular trafficking of the IL-1R_i-associated kinase-1 requires intact kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:279-87.
- [53] Marmiroli S, Bavelloni A, Faenza I, Sirri A, Ognibene A, Cenni V, et al.. Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I. *FEBS Lett* 1998;32:277-86.

SCOPO DELLA TESI

Il lavoro svolto durante il triennio del Dottorato di Ricerca è stato quello di saggiare le risposte dei leucociti dei Teleostei a diversi stimoli di natura biologica: rIL-1 β , terreno condizionato, *Photobacterium damsela*e e nodavirus. In particolare, si è cercato di investigare gli effetti che questi quattro stimoli sono in grado di indurre sulla concentrazione di calcio intracellulare, una volta venuti a contatto con i leucociti, e se evocavano un processo a cascata in cui lo ione Ca²⁺ interviene con il ruolo di secondo messaggero.

La maggior parte del lavoro è stata concentrata sullo studio degli effetti dell'interleuchina-1 β ricombinante, con la finalità di andare ad approfondire le conoscenze sull'attività biologica della citochina; a tale scopo, oltre agli esperimenti di stimolazione, sono stati effettuati anche saggi di western blotting e proteomica volti a determinare l'attivazione o meno di fattori proteici durante il processo di trasduzione del segnale.

Gli studi compiuti sul terreno condizionato sono stati necessari per comprendere se i cataboliti e i fattori di crescita, rilasciati dai leucociti durante una reazione "MLR", sono in grado di evocare un processo di trasduzione del segnale via calcio. Invece, le stimolazioni effettuate con *Photobacterium damsela*e e nodavirus sono state fatte con lo scopo di verificare non solo le variazioni del Ca²⁺ intracellulare, ma anche il cambiamento delle risposte alla stimolazione, esaminando i leucociti in vari stadi dopo l'esposizione all'antigene di immunizzazione.

Introduzione

INTRODUZIONE

1.1 INTRODUZIONE

I pesci ossei si sono originati circa 400 milioni di anni fa e rappresentano il gruppo più numeroso di Vertebrati viventi, infatti il numero di specie di Teleostei (più di 20000) è circa uguale a quello di tutti gli altri Vertebrati considerati nel loro insieme. I Teleostei rappresentano il gruppo più eterogeneo dei Vertebrati, in quanto è composto da individui che sfruttano pressoché ogni habitat (Moyle, 1982); risulta, quindi, difficile caratterizzare un gruppo così diverso, ma, in generale, i Teleostei possiedono un minor numero di vertebre e di ossa della mascella rispetto agli altri Osteitti, hanno una coda omocerca, sono privi di spiracolo e hanno una vescica natatoria che funziona come organo idrostatico. Le scaglie sono formate da osso non mineralizzato, sono flessibili e la loro forma è indice delle abitudini generali del pesce: i nuotatori più veloci hanno scaglie più piccole e numerose rispetto ai pesci bentonici o che nuotano più lentamente.

I Teleostei rappresentano anche il più antico gruppo animale ad avere un sistema immunitario molto simile a quello dei Vertebrati superiori: la scoperta del sistema immunitario nei pesci risale agli anni '40 (Duff, 1942) e i primi studi inerenti la risposta anticorpale dei pesci ad un antigene virale sono stati effettuati negli anni '60 (Siegel, 1965); sempre negli stessi anni sono state scoperte dapprima le attività T-mediate (Leslie, 1969) e successivamente le stesse cellule T (Cuchens, 1977). Soltanto negli ultimi venti anni si è posta attenzione sull'identificazione di marcatori immunitari specifici necessari per una conoscenza dettagliata dei meccanismi molecolari e delle popolazioni cellulari coinvolte nelle risposte immunitarie; a questo scopo la produzione di anticorpi monoclonali diretti contro specifiche popolazioni cellulari ha permesso di caratterizzare le diverse popolazioni leucocitarie presenti nei pesci. Le popolazioni leucocitarie dei Teleostei possono essere suddivise in cellule B (Irwin and Kaattari, 1986; Miller et al., 1994; Koumans-van Diepen et al., 1994), cellule T (Lin et al., 1992, Miller et al., 1994), granulociti (Bly et al., 1990; Ainsworth et al., 1992; Hine et al., 1992; Sliegerendrecht et al., 1995; Verburg-van Kemenade et al., 1995), trombociti (Esteban et al., 1989; Rombout et al., 1996), macrofagi (Meseguer et al., 1991; Hardie et al., 1994;

Sveinbjornsson and Seljelid, 1994) e cellule citotossiche non specifiche (Evans et al., 1992; Hogan et al., 1996). Fino ad oggi sono stati prodotti anticorpi monoclonali contro le immunoglobuline e le cellule B di numerose specie: la carpa *Cyprinus carpio* (Koumans van-Diepen et al., 1994; Koumans van-Diepen et al., 1995), il merluzzo *Gadus morhua* (Israellson et al., 1991), l'anguilla *Anguilla anguilla* (van der Heijden et al., 1995), il rombo *Scophthalmus maximus* (Estévez et al., 1994), il salmone *Salmo salar* (Thuvander et al., 1990), la trota *Oncorhynchus mykiss* (Sanchez and Dominiguez, 1991) e la spigola *Dicentrarchus labrax* (Scapigliati et al., 1995; Romestand et al., 1995; Palenzuela et al., 1996). Soltanto per poche specie sono stati prodotti anticorpi monoclonali contro timociti o cellule putative T; attualmente sono disponibili anticorpi monoclonali contro timociti di carpa *Cyprinus carpio* (Huttenhuis et al., 2005; Romano et al., 1999) e di ricciola *Seriola quinqueradiata* (Nishimura et al., 1997); tali anticorpi, però, non sono specifici per le cellule T, ma cross reagiscono anche con altre popolazioni leucocitarie. Attualmente gli unici anticorpi specifici per le cellule T putative e timociti sono disponibili per la spigola (Dos Santos et al., 2000), il pesce gatto (Passer et al., 1996) e la carpa (Rombout et al., 1998). In alcuni studi, inoltre, è stato evidenziato che il Tessuto Linfoide Associato all'Intestino (GALT, gut associated Lymphoid tissue) dei Teleostei contiene un elevato numero di cellule T (Picchietti et al., 2007), la presenza di tale popolazione cellulare potrebbe rappresentare il primo passo verso l'evoluzione del sistema immunitario mucosale. (Matsunaga, 1998). La risposta immunitaria umorale dei pesci comporta la secrezione di immunoglobuline specifiche e l'attivazione della cascata del complemento (Holland and Lambris, 2002). Le immunoglobuline dei pesci sembrano appartenere ad una singola classe, quella delle IgM, possiedono una struttura sia monomerica che tetramerica e mostrano similarità con le immunoglobuline di Mammifero sia a livello molecolare che fisiologico (Pilström and Bengtén, 1996; Hsu et al., 2006; Warr, 1995). Studi morfologici sono stati effettuati con lo scopo di studiare l'organizzazione anatomica degli organi linfoidi (Manning, 1994), la presenza di linfociti funzionali (Anderson et al., 2004; Marsden, 1996; Boesen, 1997), il complesso maggiore di istocompatibilità (Dijkstram et al., 2007) e il recettore delle cellule T (Kamper and McKinney, 2002; Scapigliati, 2000): tutte prove sperimentali che permettono di concludere che i pesci Teleostei sono il più antico gruppo animale con un sistema immunitario che mostra omologie con il sistema di difesa innato e adattativi dei Mammiferi e degli Uccelli.

1.2 IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI VERTEBRATI

Gli organismi multicellulari conservano la loro capacità di mantenersi e di riprodursi tanto più a lungo quanto più riescono a resistere agli attacchi potenzialmente dannosi di microrganismi e parassiti; la resistenza deriva in parte da rivestimenti esterni con funzione di barriera, in parte da un insieme di fattori capaci di riconoscere, isolare, distruggere o limitare l'espansione di elementi estranei presenti nei rivestimenti esterni e nelle mucose e che possono penetrare in queste barriere per poi invadere l'organismo. Questa proprietà dell'organismo viene chiamata "immunità".

Nella prima metà del XX secolo, gli immunologi fecero una distinzione chiara tra due forme di immunità: naturale e acquisita. La prima fu considerata come una caratteristica ereditata e specie-specifica, la seconda come una forma di resistenza ad un'infezione, avvenuta nel corso della vita come conseguenza di un precedente contatto con un potenziale patogeno (Zilber, 1958). Più tardi le due forme di immunità vennero definite in modo alternativo: l'immunità naturale prese il nome di "innata" o "non-specifica", quella acquisita di "specificata" o "adattativa".

Nei Vertebrati il sistema immunitario acquisito affianca quello innato. Linfociti, monociti-macrofagi, cellule dendritiche, trombociti, mastociti ed altre cellule specializzate migrano costantemente lungo i vasi linfatici e sanguigni, tra gli organi linfoidi e gli spazi intercellulari di tessuti non-linfoidi. Altre cellule rimangono immobili per formare lo stroma reticolato del midollo osseo, del timo, dei linfonodi e della milza. I fattori umorali (anticorpi, citochine, etc.), sintetizzati da queste cellule, svolgono diverse funzioni regolatorie sia indipendentemente che interagendo con il sistema dell'immunità innata. I componenti che formano il sistema immunitario adattativo sono mostrati nella tabella 1.

Components	Vertebrate taxons						
	Agnata	Chondroichthyes	Osteichthyes	Amphibia	Reptilia	Aves	Mammalia
Organs and tissues							
Intestinal lymphoid tissue	+	+	+	+	+	+	+
Thymus	+	+	+	+	+	+	+
Spleen	—	+	+	+	+	+	+
Bone marrow	—	—	—	+	+	+	+
Lymph nodes	—	—	—	—	—	+	+
Cellular elements							
Monocytes-macrophages	+	+	+	+	+	+	+
$\gamma\delta$ T-lymphocytes	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha\beta$ T-lymphocytes	—	+	+	+	+	+	+
B1-lymphocytes	—	+	+	+	+	+	+
B-lymphocytes	—	+	+	+	+	+	+
Plasma cells	—	+	+	+	+	+	+
Receptors							
T cell receptor	—	+	+	+	+	+	+
B cell receptors (IgM, IgD)	—	+	+	+	+	+	+
Class I MHC antigens	—	+	+	+	+	+	+
Class II MHC antigens	—	+	+	+	+	+	+
Fc-receptors	—	+	+	+	+	+	+
Immunoglobulins	—	+	+	+	+	+	+
Complement*	—	+	+	+	+	+	+
Cytokines	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 1: componenti dell'immunità adattativa; il segno + indica la presenza di un componente, il segno — la sua assenza, il segno +? indica che i dati non sono chiari (tabella da Klimovich, 2002)

Studi effettuati sulla risposta immunitaria innata dei Vertebrati hanno evidenziato poche similarità con il sistema immunitario degli Invertebrati. Gli insetti, ad esempio, hanno sviluppato una risposta acuta di tipo infiammatorio per certi versi simile a quella riscontrata nei Mammiferi ma, con l'esclusione dei recettori toll-like (TLR), scarse sono le omologie per fattori solubili, recettori e molecole regolatorie nell'espressione dei geni.

Nei processi di riconoscimento dell'antigene, nell'ambito dell'immunità adattativa, partecipano tre tipi cellulari:

1. i linfociti B che con il loro recettore specifico riconoscono i siti complementari di molecole antigeniche e producono anticorpi (Nezlin, 1998);
2. i linfociti T (York and Rock, 1996; Benham et al., 1995) di tipo $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$.
3. le cellule che presentano l'antigene (APC), che processano e legano l'antigene (Stainman, 1991) alle molecole di classe I e II del complesso maggiore di

istocompatibilità (MHC). Solo in questa forma di complesso il peptide-MHC può essere riconosciuto dai linfociti T $\alpha\beta$.

Il sistema immunitario adattativo deve la sua unicità a due geni estremamente variabili codificanti le molecole per i recettori chiave dell'immunità: l'MHC e i recettori linfocitari (Yin et al., 2001). I geni per l'MHC di classe I e II codificano per proteine estremamente polimorfiche e sono in grado di presentare una vasta gamma di tipi antigenici diversi. I geni per i recettori dei linfociti T (TcR) e per le immunoglobuline (Ig) sono presenti in cellule della linea germinale in gruppi separati di segmenti allelici multipli. Dopo la fecondazione, nell'embrione avviene la differenziazione dei linfociti T e B, sotto l'effetto dei geni attivatori della ricombinazione somatica (RAG-1 e RAG-2): singoli segmenti di ciascun gruppo si uniscono in interi geni codificando la catena polipeptidica completa (Thompson, 1995).

Il sistema immunitario adattativo fece la sua comparsa nei primi Vertebrati mandibolati durante il Cambriano, cioè circa 450-540 milioni di anni fa, durante una specie di "Big Bang" immunologico, i cui dettagli sono ancora ben lontani dall'essere chiariti (Kasahara et al., 2004) (Fig. 1).

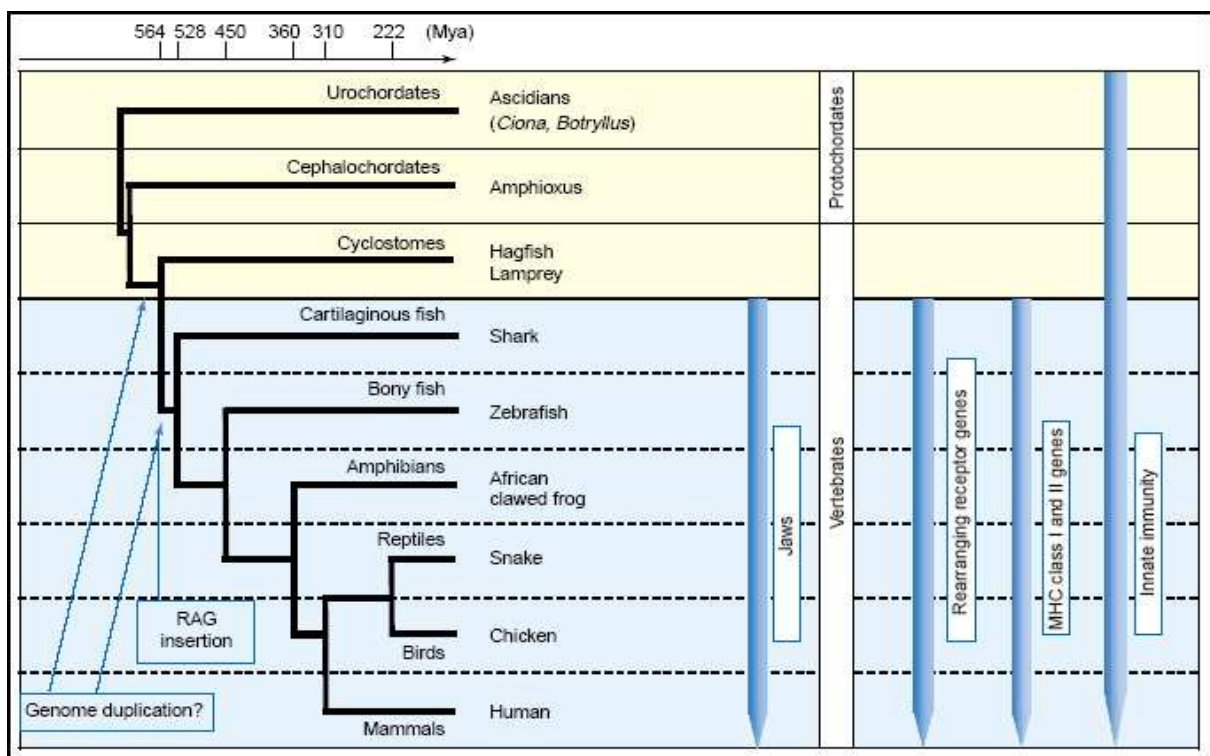


Fig1: filogenesi dei cordati e dei principali eventi nell'evoluzione del sistema immunitario adattativo

Nei Vertebrati il recettore per l'antigene è composto da due catene polipeptidiche appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF): le catene pesante (H) e leggera (L) per gli anticorpi, e le catene α/β e γ/δ per il TcR.

Negli Agnati (lamprede e missine) sono state individuate cellule morfologicamente non distinguibili dai linfociti, anche se poi in realtà esse non possedevano alcun elemento genetico chiave. Isolotti di tessuto linfoide sono localizzati nell'intestino e nel pronefro, ma non è possibile distinguere anatomicamente dei veri e propri organi linfoidei (Du Pasquier and Flajnik, 1998). Molecole che in un primo momento vennero descritte come anticorpi di missine, furono poi definite omologhe al componente C3 del sistema del complemento dei Mammiferi (Hanley et al., 1992). Dati sul rigetto in seguito ad un allotrapianto in questi animali non sono mai stati successivamente confermati (Raison and Dos Remedios, 1998). Per queste ragioni, gli Agnati rappresentano il gruppo di organismi filogeneticamente più giovane che ha esclusivamente un sistema immunitario di tipo innato; tuttavia, le presenze del gene *ikaros* nei vermi di mare (Cupit et al., 2003), di CD45, della proteina BCAP, di CD3, di CD9 (Uinuk-Ool et al., 2002) e di un nuovo tipo di recettore variabile dei linfociti (VLR) (Pancer et al., 2004) hanno aperto un dibattito sul fatto che forse sia giusto parlare di una primitiva immunità acquisita anche nei Vertebrati privi di mandibola.

Nei pesci cartilaginei e nei pesci ossei il sistema immune di tipo adattativo ha caratteristiche primordiali: l'emopoiesi è concentrata nel fegato e nel rene, solo la milza ed il timo sono anatomicamente separati e con forma definita, mentre le cellule linfoidei sono distribuite nell'intestino. Tra queste sono stati identificati i linfociti B con le immunoglobuline ed elementi che presumibilmente omologhi ai linfociti $T\gamma\delta$ (Rombout, 1993a). Quest'ultimi, in accordo con i risultati recenti, (Boismenu and Havran, 1997), sono una popolazione speciale di cellule T, la cui maturazione non avviene nel microclima timico. I linfociti $T\gamma\delta$, come le cellule del sistema immunitario innato, hanno dei recettori con una spiccata specificità, non riconoscono il complesso MHC-peptide, ma l'antigene nativo, senza alcuna partecipazione delle cellule presentanti l'antigene (Chien et al., 1996). Non si sa ancora precisamente se i pesci cartilaginei abbiano o meno i linfociti $T\alpha\beta$. I linfociti T in squalo e in razza sono attivati solo da mitogeni, mentre nei pesci ossei possono essere attivati sia da mitogeni (concanavalina-A) che da colture con cellule allogeniche; essi partecipano nella risposta immune insieme ai macrofagi e ai linfociti B (Clem et al., 1991; Miller and Clem, 1984; Vallejo et al., 1991); anche nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato è stata dimostrata l'attivazione dei linfociti T di spigola utilizzando un mix di cellule allogeniche (Meloni et al., 2006). Per quanto riguarda la funzione dei linfociti T nei pesci, essi producono

quei fattori umorali coinvolti poi nell'attivazione dei macrofagi (Graham and Secombes, 1988) e proliferano in risposta al contatto con i macrofagi che hanno processato e presentato l'antigene (Vallejo et al., 1991). La classe predominante di anticorpi nei pesci sono le IgM. In squalo e razza sono stati individuati isotipi che non hanno una struttura canonica (Schluter et al., 1997). Gli anticorpi nei pesci sono piuttosto omologhi: l'omologia del loro sito costante arriva fino al 90%; possono interagire con diversi antigeni esterni e con autoantigeni; sono definiti "normali" o "anticorpi naturali" (autoanticorpi), quelli la cui sintesi non ha bisogno dell'immunizzazione e della partecipazione delle cellule T-helper e che vengono prodotti dai linfociti B1, una popolazione cellulare specifica che si differenzia al di fuori del microambiente del midollo osseo (Avrameas and Ternynck, 1995).

Lo sviluppo della risposta immunitaria anticorpale nei pesci teleostei dipende dalla temperatura; gli anticorpi sono generalmente prodotti in basso titolo e hanno una bassa affinità che incrementa leggermente nel corso della risposta. Iniezioni ripetute di un antigene non hanno un sensibile effetto sul titolo e sull'affinità degli anticorpi prodotti: questo può significare che nei pesci i processi di maturazione e formazione di memoria immunologica hanno componenti e cinetiche diverse (Press, 1998).

Gli Anfibi, oltre il timo e la milza, hanno un midollo osseo, le cui cellule hanno i geni RAG attivati (Greenhalgh et al., 1993), isole di tessuto linfoide morfologicamente distinte attraverso tutta la lunghezza dell'intestino, dove non sono però presenti centri germinali (Manning, 1991), e aggregati linfoidei nel rene, milza e mesentero. La presenza di linfociti T può essere individuata dalla proliferazione cellulare in reazioni allogene, dalla risposta a stimoli mitogeni e dalle risposte in seguito a trapianto; la difficoltà maggiore nello studio dei linfociti T consiste nel fatto che solo in tempi recenti sono stati identificati un numero esiguo di markers antigenici omologhi ai linfociti T dei Mammiferi (Nagata, 1985; Jurgens et al., 1995).). Allo stesso tempo, alcuni studi di biologia molecolare hanno permesso di stabilire che nel genoma degli Anfibi sono presenti copie multiple codificanti il TcR e le Ig (Charlemagne and Tourneier, 1998). Negli anfibi Urodeli, gli anticorpi hanno un limitato repertorio di specificità, appartengono soprattutto alla classe delle IgM e sono prodotti principalmente in risposta ad un antigene timo-dipendente; esistono anche altre due classi di anticorpi, quella di più alto peso molecolare IgX e quella di più basso peso molecolare IgY, in risposta ad un antigene T-dipendente. La loro risposta immunitaria si sviluppa lentamente, raggiungendo il picco circa 40 giorni dopo l'immunizzazione; negli anfibi Anuri e nei Rettili, invece, il picco della risposta primaria corrisponde con la fine del quattordicesimo giorno,

mentre quello della risposta secondaria si ha verso la terza settimana, osservando anche un moderato aumento dell'affinità anticorpale (Wilson et al., 1995).

Il sistema immunitario adattativo raggiunge un elevato livello di sviluppo negli animali omeotermi, sebbene negli Uccelli esso non sia così completamente sviluppato come nei Mammiferi. Negli Uccelli le risposte immuni, che sono mediate o che comunque prevedono la partecipazione dei linfociti T, sono simili per molti parametri a quelle dei Mammiferi (Le Douarin, 1986); gli anticorpi sono di tre classi: IgM, IgA e IgY, sono relativamente omogenei, hanno un limitato repertorio di specificità e la loro affinità può essere di 3-4 volte più bassa di quella di coniglio o topo (Warr et al., 1995; Voss and Watt, 1977); i linfonodi nei Mammiferi sono completamente sviluppati e formati, e sono il sito principale di sviluppo della risposta immunitaria; i processi di riproduzione clonale, di ipermutazione e selezione delle cellule che producono anticorpi si sviluppano nei centri germinativi; il numero delle classi anticorpali nei Mammiferi aumenta a cinque: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE. La risposta immune primaria si sviluppa in 5-8 giorni, quella secondaria in 3-5 giorni e gli anticorpi hanno un'elevatissima variabilità di specificità, effetti multilaterali e funzioni regolatorie.

Nel suo insieme, il sistema immunitario dei Vertebrati Superiori può essere considerato un complesso costituito da tre parti con una differente età filogenetica (Murakami and Honjo, 1995) (Fig.2):

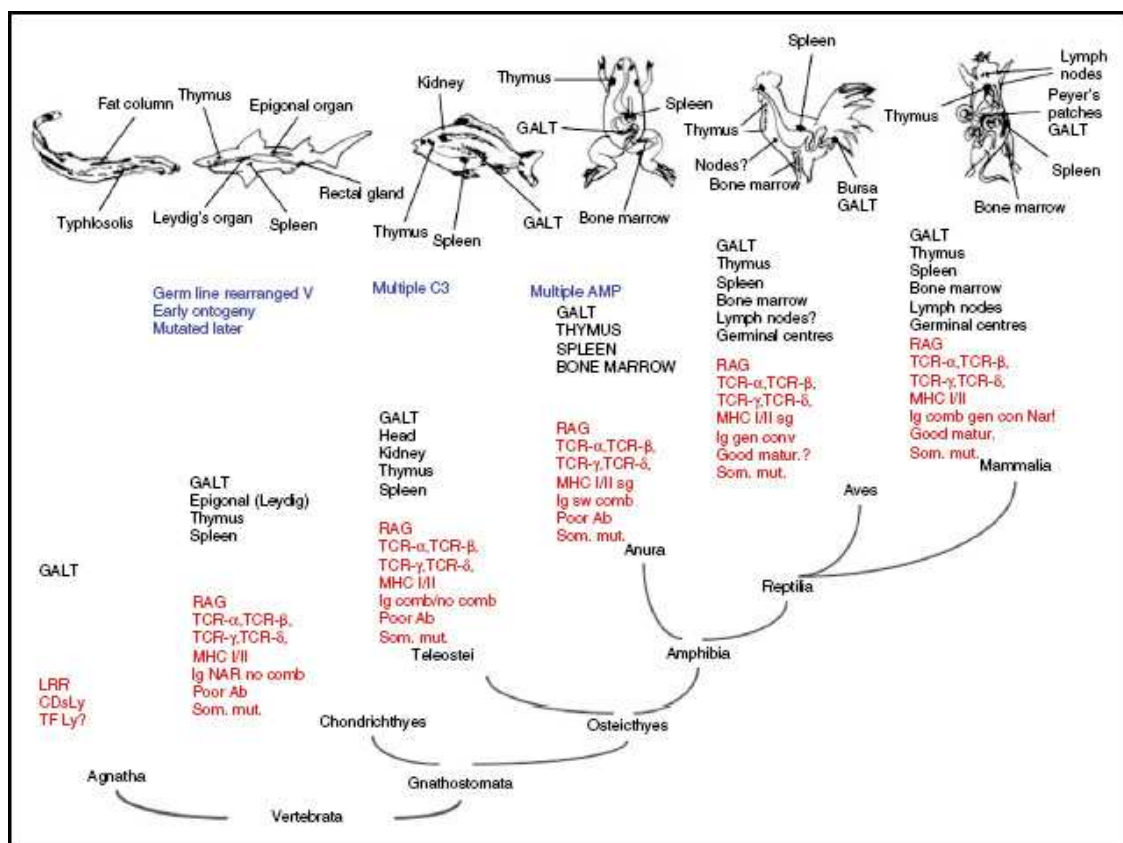


Fig. 2: evoluzione del sistema immunitario dei Vertebrati

lo “strato” più antico è formato da fattori dell’immunità innata ereditati dagli Invertebrati; il secondo “strato” è formato da componenti del sistema immunitario primordiale dei Vertebrati Inferiori, cioè dai linfociti $T\gamma\delta$ localizzati principalmente nel tessuto mucosale epiteliale e dai linfociti B1 che producono autoanticorpi naturali della classe delle IgM; il terzo “strato”, quello più recente, è composto dai linfociti $T\alpha\beta$, dalle cellule presentanti l’antigene e dai linfociti B, che provvedono alla sintesi degli anticorpi delle cinque classi.

1.3 IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

Il sistema immunitario dei Telesotei mostra tutti gli aspetti di base che verranno poi sviluppati nei Vertebrati più evoluti: veri linfociti, tessuto linfoide, sintesi di anticorpi, memoria a lungo termine, produzione di citochine e linfocine (Plouffe et al., 2005; Zapata et al., 2006; Press and Evensen, 1999). Le popolazioni leucocitarie svolgono due diversi tipi di difesa immunitaria: immunità aspecifica o innata e immunità specifica o adattativa (Pancer and Cooper, 2006; Magnadottir, 2006); le cellule fagocitiche (monociti, macrofagi e granulociti neutrofili), invece, intervengono nelle risposte costitutive in quanto utilizzano il patogeno e le sostanze “non self” e le distruggono senza lasciarne memoria.

1.3.1 ORGANIZZAZIONE DEL TESSUTO LINFOIDE

Nei mammiferi gli organi linfoidi primari sono il timo, da cui si originano i linfociti T deputati alla risposta specifica cellulare e all’immunosorveglianza, ed il midollo osseo dove si originano le cellule granulocitarie, monocitarie, eritrocitarie e trombocitarie e in cui si ha la maturazione dei linfociti B. Gli organi linfoidi secondari, cioè il microambiente dove i

linfociti interagiscono sia tra di loro sia con gli antigeni, sono i linfonodi, la milza e il tessuto associato alle mucose (MALT). Tale organizzazione del sistema immunitario non è, però, applicabile ai Teleostei in quanto essi presentano organi a funzione mista o linfomielioidi, cioè in grado di produrre cellule sia della linea mieloide che della linea linfocitaria (Fänge, 1982; Rombout et al., 1993); inoltre, nei Teleostei sono assenti anche i linfonodi e il midollo osseo. Probabilmente una funzione simile a quella del midollo osseo viene svolta dal rene cefalico (Zapata, 1979; Zapata et al., 2006); infatti, il rene cefalico (pronefro) e il rene del tronco (opisthonefro), sono considerati organi emopoietici maggiori, mentre, come è stato già dimostrato in molti pesci, la milza è coinvolta nel processo dell'eritropoiesi (Rowley et al., 1988; Van Muiswinkel et al., 1991). In studi recenti si è poi dimostrato che nella spigola il timo potrebbe essere considerato un organo linfoide primario per le cellule T (Abelli et al., 1996). Va osservato che alcuni leucociti sono stati ritrovati nella pelle e nelle branchie di alcuni Teleostei (Van Muiswinkel, 1995).

1.3.1.1 Il timo

Il timo dei Teleostei è stato molto studiato (Bowden et al., 2005; Danilova et al., 2004; Langenau and Zon, 2005) ed è stato dimostrato che nell'adulto risulta essere una struttura linfoide (Abelli et al., 1996). Negli Elasmobranchi e nei pesci più evoluti il timo è divisibile in una zona midollare e una corticale facilmente distinguibili ed è associato alla camera branchiale (Rumfelt et al., 2002; Abelli et al., 1996), ma nei salmonidi questa distinzione in zona corticale e midollare non è presente (Chilmonczyk, 1983). Il timo nei Teleostei è l'organo deputato alla maturazione e alla selezione dei linfociti T ed è popolato da linfociti e linfoblasti in relazione con cellule reticolari epiteliali. Esso si trova collocato vicino alla faringe e alla regione branchiale, e proprio questa sua collocazione ha fatto ipotizzare ad alcuni autori un coinvolgimento dell'organo stesso nella difesa immunitaria in caso di infezioni orali. Nei pesci il timo subisce un processo di involuzione che è correlato all'età, alle stagioni e agli ormoni (Picchiatti et al., 1993). Durante l'ontogenesi del tessuto linfoide della spigola il timo è il primo organo ad essere popolato da cellule putative T (Abelli et al., 1996), confermando precedenti osservazioni fatte sulla trota iridea (Tatner and Manning, 1983; Chilmonczyk, 1983; Manning, 1994).

1.3.1.2 *Il rene cefalico*

Il rene è un organo lungo, rosso scuro, che si estende nella parte dorsale del pesce; i reni, in realtà, sono due ma sono così vicini da essere fusi nella zona di contatto. Mentre la regione posteriore del rene è coinvolta nella funzione secretoria (Manning, 1994), il rene cefalico dei Teleostei, formato da tessuto cromaffine, svolge un ruolo emopoietico/linfoide: in effetti si possono riscontrare cellule reticolari e fagociti somiglianti a quelli del midollo osseo dei Tetrapodi. Probabilmente nei Teleostei il rene sostituisce il midollo osseo poiché è ricco di cellule staminali (Lamers, 1985; Zapata, 1979) e utilizzando saggi che permettono di evidenziare la formazione di placche emolitiche (Chiller et al., 1969; Miller et al., 1984) e saggi immunoenzimatici (Secombes et al., 1991) sono stati riscontrati sia nel pronefro che nell'opistonefro cellule produttrici anticorpi. I linfociti B nei Teleostei potrebbero formarsi nel rene cefalico poiché le prime cellule recanti immunoglobuline (Ig⁺) in *Oncorhynchus kisutch* sono state trovate in quest'organo (Irwin and Kaattari, 1986). La maggioranza degli autori concorda che il rene sia il sito principale di differenziamento degli eritrociti, monociti, granulociti e linfociti B (Ellis, 1977; Zapata, 1979; Bielek, 1981; Botham and Manning, 1981).

1.3.1.3 *La milza*

Negli Elasmobranchi e nei pesci più evoluti la milza è già una struttura ematopoietica (granulopoietica ed eritropoietica) che fa da organo di accumulo di cellule linfoide. Nei Teleostei la milza, di colore bruno-rossastro, è l'ultimo organo del sistema linfoide a svilupparsi (Ellis, 1977; Tatner and Manning, 1983). A differenza dei Mammiferi, nei Teleostei non c'è una chiara distinzione del parenchima splenico in polpa rossa e polpa bianca, anche se la capsula connettivale elastica invia in profondità dei setti che suddividono l'organo. Dopo stimolazione con antigeni, si è notata una risposta proliferativa diffusa in tutto l'organo e sono state distinte aree timo-dipendenti e non (Manning, 1994). È stato mostrato

che la milza è sede di linfociti T e linfociti B (Scapigliati et al., 1995; Scapigliati et al., 1996) e potrebbe svolgere un ruolo come organo linfatico secondario. Sia nel rene che nella milza sono presenti particolari cellule contenenti pigmenti, definite melanomacrofagi.

1.3.1.4 Il tessuto linfoide mucosale

Il tessuto linfoide mucosale è presente a livello della mucosa del tratto gastro-intestinale (GALT), delle vie respiratorie (BALT) e delle vie genito-urinarie. Esso è costituito da elementi linfoidi associati all'intestino, alle branchie e alla pelle che rappresentano la prima barriera che incontrano gli agenti patogeni (Manning, 1994). In tutti i Teleostei, la parete intestinale presenta linfociti, granulociti e macrofagi sia singoli che organizzati in gruppi (Manning, 1994; Rowley et al., 1988; Abelli et al., 1996; Picchietti et al., 1997) mentre sia nelle branchie che nella pelle sono stati riscontrati soprattutto linfociti (Peleteiro and Richards, 1985; Abelli et al., 1997).

1.3.2 IMMUNITÀ INNATA

L'immunità innata è il risultato di un vario e complesso numero di fenomeni. Rispetto al sistema immunitario di tipo adattativo, in cui tutte le cellule sono linfociti e tutte le molecole effettrici appartengono alla famiglia delle immunoglobuline, nell'immunità innata sia le molecole effettrici che le cellule sono estremamente diversificati; questo dipende dal fatto che il sistema linfoide si è sviluppato più recentemente (Boehm and Bleul, 2007). Prima della comparsa degli Gnatostomi l'unico meccanismo di difesa degli animali nei confronti di invasioni fungine, batteriche e virali e per la riparazione di danni tissutali, era costituito dalle risposte innate, cioè non-linfoidi. Il sistema immunitario adattativo, quindi, può essere

considerato come uno strumento formatosi in aiuto del sistema innato affinché l'organismo potesse rispondere in maniera più efficiente. Molti dei meccanismi innati sono presenti già a livello degli Invertebrati (Schulemburg, 2007), ma nei Teleostei sono organizzati in maniera più articolata (Huttenhuis et al., 2006; Stafford, 2003): in particolare è stato dimostrato che i Teleostei sono in grado di attuare una risposta innata in seguito a stimoli antigenici o contro patogeni (Ingram, 1980; Fletcher, 1982; Ellis, 1989; Evans, 1992; Manning, 1994; Van Muiswinkel, 1995). La prima linea difensiva di un organismo è rappresentata da una vera e propria barriera chimica o fisica che si oppone all'invasione da parte del microrganismo, ne sono un esempio le superfici epiteliali come: pelle, branchie e intestino. Ogni epitelio è ricoperto da uno strato di muco che viene secreto da cellule del calice e che ha la funzione di non far aderire funghi, batteri e parassiti (Pickering e Richards, 1980). Se i microrganismi patogeni riescono a penetrare si ha un'inflammatione, cioè un isolamento dell'area invasa da parte di macrofagi e granulociti (Roberts, 1978; Van Muiswinkel and Jagt, 1984). Le risposte infiammatorie acute nei pesci sono paragonabili a quelle dei Mammiferi (Finn and Nielsen, 1971). Nella trota, dopo somministrazione di batteri o di adiuvante completo di Freund, infiltrazioni di granulociti possono essere osservate nelle 12-24 ore successive, e la loro concentrazione insieme a quella dei macrofagi continua ad aumentare fino al quarto giorno (Van Muiswinkel, 1995). Nei Mammiferi un danno chimico o fisico localizzato porta ad un accumulo di macrofagi e neutrofili ad attività fagocitica che si attivano sia in presenza di antigeni che in risposta a determinate sostanze rilasciate dalle cellule danneggiate. Le cellule fagocitiche attivate durante il processo di infiammazione rilasciano una serie di mediatori solubili quali chemochine e citochine che, a loro volta, portano ad un incremento della permeabilità

vascolare, all'attrazione e proliferazione di leucociti e alla sintesi e successivo rilascio dei mediatori della fase acuta dal fegato (proteina C-reattiva, proteine sieriche amiloidi P e A, lectine leganti il mannosio, transferrina, lisozima, complemento, interferone) e di quelli della risposta febbrile attraverso la mediazione dell'ipotalamo. Molti autori ritengono probabile che queste molecole siano presenti anche nei Teleostei.

1.3.3 CELLULE EFFETTRICI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA

1.3.3.1 Cellule citotossiche non specifiche (NCC)

Le NCC sono piccole cellule leucocitarie presenti nel sangue periferico, nella milza, nel pronefro dei Teleostei e possono essere paragonate alle cellule Natural-Killer (NK) dei Mammiferi di cui potrebbero essere i precursori filogenetici (Evans and Jaso-Friedmann, 1992), infatti si somigliano nei tipi di cellule bersaglio soggette alla lisi, nei meccanismi di riconoscimento delle cellule bersaglio, nella necessità di un contatto con il bersaglio per poterlo neutralizzare (Koumans-van Diepen, 1993). Le cellule NCC, però, sono in grado di mediare una risposta citotossica acuta innata molto più potente rispetto alle NK in quanto è necessario un numero minore e un tempo minore per uccidere una singola cellula bersaglio (Evans and Jaso-Friedmann, 1992). Le NCC sono in grado di eliminare molte cellule bersaglio incluse le cellule tumorali allogeniche e xenogeniche allo stesso modo delle cellule NK di Mammifero (Rostow et al., 2000). Le NCC sono state caratterizzate meglio nel pesce gatto, nella tilapia e in altri Teleostei (Evans et al., 1984; Evans and Jaso-Friedmann, 1992); nella spigola è stata dimostrata la capacità che queste cellule hanno di uccidere i loro bersagli inducendo la necrosi e l'apoptosi (Meseguer et al., 1996). Le NCC collaborano, inoltre, con macrofagi e granulociti per fornire una resistenza in condizioni di stress acuto che può essere indotto da diversi stimoli: presenza di agenti infettivi o avverse condizioni ambientali.

1.3.3.2 Monociti, Macrofagi e Granulociti

La fagocitosi è importante non solo nelle risposte innate, ma anche nella riparazione dei danni tissutali (Secombes and Fletcher, 1992). Cellule B, fibroblasti, macrofagi e granulociti dei

Vertebrati possiedono un'attività fagocitica che ha principalmente la funzione di limitare la diffusione e la crescita di microrganismi estranei, a questo scopo nei granuli e nei lisosomi dei principali fagociti si possono riscontrare accumulate diverse molecole ad attività antibatterica che degradano la particella fagocitata (Gabay and Almeida, 1993; Levy et al., 1995; Alberdi et al., 1995; Ganz and Lehrer, 1997; Borelli, 1999; Kaplan, 1999). Le principali cellule fagocitiche dei pesci comprendono: granulociti (specialmente neutrofili), monociti e macrofagi. I monociti sono fagociti mononucleati circolanti, mentre i macrofagi possono essere localizzati fissi o circolanti a livello tissutale. Questi ultimi possono essere suddivisi in melanomacrofagi, che contengono melanina ed altri pigmenti, e in un secondo gruppo che si distingue dai monociti per le dimensioni e il numero di lisosomi. Nei Teleostei monociti e macrofagi hanno le stesse funzioni presenti nei Mammiferi (Koumans-van Diepen, 1993). Numerose evidenze sperimentali, inoltre, hanno mostrato che i macrofagi ricoprono un ruolo importante anche nella risposta umorale mediante la presentazione dell'antigene e la secrezione di citochine interleuchina-1-simili (Secombes, 1991; Verburg-van Kemenade et al., 1995).

I granulociti sono cellule aventi un citoplasma granulare; studi ultrastrutturali hanno mostrato un certo grado di similitudine con i granulociti dei Mammiferi. Essi possono essere suddivisi in: neutrofili, basofili ed eosinofili; non tutti sono presenti in tutte le specie di Teleostei e la loro stessa morfologia è molto variabile (Koumans-van Diepen, 1993).

1.3.3.3 Linfociti B e linfociti T

I linfociti sono difficili da caratterizzare con una semplice osservazione al microscopio in quanto presentano molte somiglianze morfologiche con i trombociti. Essi sono molto simili ai leucociti dei Mammiferi; sono cellule di piccole dimensioni (3-8 μm) con un elevato rapporto nucleo/citoplasma. La presenza di due diverse popolazioni linfocitarie è stata messa in evidenza mediante l'utilizzo di tecniche immunocitochimiche e mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro le immunoglobuline (e per questo molto utili nella

caratterizzazione dei linfociti B che possiedono una superficie Ig⁺) (Manning, 1994). Ciascun linfocita B è in grado di riconoscere una specifica molecola antigenica mediante recettori superficiali; in seguito al riconoscimento il linfocita si divide e si trasforma in plasmacellula che secerne anticorpi, cioè la forma solubile del recettore che ha riconosciuto l'antigene. Dal punto di vista molecolare gli anticorpi possono essere definiti come delle glicoproteine in grado di legarsi in maniera specifica all'antigene che ne ha stimolato la liberazione; essi possono essere riscontrati sia nel sangue che in altri fluidi biologici e la loro presenza induce l'attivazione di altre componenti del sistema immunitario (Roitt et al., 1994). I Teleostei hanno linfociti B che producono immunoglobuline multimeriche paragonabili alle IgM ed appartenenti ad una sola classe anche se non è da scartare l'ipotesi della presenza di altre immunoglobuline (per esempio IgA). Le immunoglobuline multimeriche sono presenti in tutti i Vertebrati dotati di mascelle e rappresentano l'isotipo maggiormente conservato. Nei Teleostei le IgM possono essere presenti anche in forma monometrica e in forma dimerica (Litman, 1976; Warr and Marchalonis, 1982); sembra probabile che queste versioni a basso peso molecolare abbiano una funzione fisiologica, per esempio nel caso in cui sia richiesto un tipo più diffusibile di immunoglobulina (Manning, 1994).

Nei Teleostei non è ancora presente il cambiamento isotipico da IgM a una classe a basso peso molecolare (es. IgG dei Mammiferi) che avviene durante il corso della risposta immunitaria dei Mammiferi (Manning, 1994). La molecola Ig nativa dei Teleostei ha una struttura tetramerica con quattro unità strutturali (H₂L₂); tale molecola presenta 4x2 siti di legame per l'antigene e una massa molecolare di circa 800 kDa (Van Muiswinkel, 1995). La catena pesante (H) corrisponde alla catena μ delle immunoglobuline dei Vertebrati, ma non sono state riscontrate analogie con le catene $\alpha, \epsilon, \sigma, \gamma$ dei Mammiferi (Manning, 1994). Inoltre i teleostei, pur essendo privi di IgE, presentano reazioni anafilattiche di ipersensibilità del IV° tipo (Roitt et al., 1994). Studi precedenti sul sistema immunitario hanno anche evidenziato la trasmissione delle immunoglobuline dalla femmina alle uova nel pesce gatto, nella tilapia e nella platessa (Bly et al., 1986; Hayman and Lobb, 1993).

I linfociti T hanno recettori di superficie simili al TCR (Evans et al., 1988; Rast e Litman, 1994), sono capaci di proliferare “*in vitro*” in presenza di stimoli T-specifici (Manning, 1994) e sono capaci di attività biologiche quali reazioni MLR (Luft et al., 1994). I linfociti T garantiscono l'immunità mediata da cellule, come dimostrato dal rigetto degli allo-trapianti, dalla forte reazione MLR, dalla formazione di rosette e, in presenza del complemento, dalla lisi di eritrociti eterologhi.

1.3.4 LE PROTEINE DELLA FASE ACUTA

Le proteine della fase acuta possono essere raggruppate in base all'ampiezza del cambiamento della loro concentrazione (basso, intermedio, alto) e alla direzione del loro cambiamento (positiva o negativa) (Steel, 1994) oppure in base alla loro funzione (Gabay, 1999).

1.3.4.1 La transferrina

La transferrina è una glicoproteina presente nel sangue, la cui funzione è quella di trasportare il ferro. Durante le infezioni batteriche, la presenza della transferrina è molto importante in quanto essa, legando il ferro, rende quest'ultimo meno accessibile agli organismi patogeni (Van Muiswinkel, 1995); questo è stato dimostrato nella trota dove si è potuto osservare un abbassamento della concentrazione di ferro libero nelle 24-48 ore successive alla somministrazione di LPS (Bayne et al., 2001).

1.3.4.2 Le lectine

Le lectine sono proteine o glicoproteine di origine non immunitaria, riscontrate anche nelle uova di alcune specie (Van Muiswinkel, 1995), che somigliano alle agglutinine presenti in piante e Invertebrati. Esse hanno la funzione di legare (mediante cross-linkage) i carboidrati presenti sulla superficie di cellule xenogeniche o sui microrganismi; inoltre, sono anche in grado di immobilizzare i microrganismi per fagocitosi e neutralizzare le esotossine batteriche

(Fletcher, 1982). In alcuni pesci quali l'anguilla e il salmone atlantico, è stato dimostrato che la lectina legante il mannosio ha un ruolo fondamentale nei processi di difesa (Gerken and Renwranzt, 1994; Ottinger et al., 1999).

1.3.4.3 Il lisozima

E' un enzima litico che catalizza la lisi delle cellule batteriche in maniera simile al complemento. Il lisozima è presente nei fagociti, nel siero e nel muco e agisce sulle componenti dei peptidoglicani dei microrganismi (Manning, 1994). In diversi lavori (Ellison and Giehl, 1991; Engstad et al., 1992; Jorgensen et al., 1993) è stata messo in evidenza l'incremento di questo enzima in seguito a somministrazione di diversi glucani.

1.3.4.4 L'interferone

L'interferone (o interferon) è una proteina antivirale che viene secreta in seguito ad infezione e che ha il compito di rendere le cellule più resistenti alle infezioni batteriche (De Kinkelin and Dorson, 1973).

1.3.4.5 *La proteina C-reattiva e la proteina sierica P*

Entrambe queste proteine appartengono alla famiglia delle pentraxine, proteine pentameriche calcio-dipendenti. La proteina C-reattiva è una componente del siero, la cui concentrazione può aumentare in seguito ad esposizione di endotossine batteriche (Ingram, 1980); essa è in grado di legare il polisaccaride C del *Pneumococcal*, la fosforilcolina, la fosfoetanolamina e strutture ad esse correlate presenti sulla superficie di numerosi agenti microbici e di cellule danneggiate (Manning, 1994). La proteina C-reattiva, inoltre, attiva il complemento, opsonizza batteri, funghi e parassiti, lega la cromatina libera, induce il rilascio di citochine e agglutina particelle (Ballou and Lozanski, 1992; Steel and Whitehead, 1994). La proteina sierica P, al contrario, è in grado di legare solamente la fosfoetanolamina e l'agarosio.

1.3.4.6 *La proteina sierica amiloide A*

La proteina sierica amiloide A è un'apolipoproteina la cui funzionalità non è ancora stata accertata, si pensa, tuttavia, che essa possa essere coinvolta in alcuni processi quali: la detossificazione delle endotossine, la mediazione della risposta infiammatoria, l'inibizione della proliferazione dei linfociti e delle cellule endoteliali, il trasporto dei lipidi (Banka et al., 1995; Urieli-Shoval et al., 2000). Fino ad oggi sono state clonate le proteine sieriche amiloidi dei Mammiferi, dell'anatra (Gou et al., 1996), della carpa (Fujiki et al., 2000) e dei pesci salmonidi (Jensen et al., 1997; Bayne et al., 2001).

1.3.4.7 Il sistema del complemento

Il sistema del complemento è costituito da un insieme di componenti, proteici e non, che intervengono sia nelle risposte immunitarie innate che nell'immunità adattativa specifica. Nel processo di difesa dai microrganismi invasori esso può agire secondo due diverse vie: a) la via classica, che richiede una stimolazione del tipo antigene-anticorpo; b) la via alternativa, che richiede il contatto con i polisaccaridi presenti sulla superficie di alcuni microrganismi. In entrambi i casi, il risultato finale è l'opsonizzazione e la lisi delle cellule estranee (Van Muiswinkel, 1995).

Tra i Vertebrati inferiori i Teleostei rappresentano il gruppo in cui il complemento è stato meglio caratterizzato, infatti sono state già isolate tutte le molecole coinvolte: C1r, C3, C4, C5, C8, C9, fB, fD, fH, MASP, MBL. In alcuni lavori (Koppenheffer, 1987; Sunyer and Tort 1994; 1995) sono state messe in evidenza le relazioni che intercorrono tra il sistema del complemento dei Pesci e quello dei Mammiferi e in particolare si è evidenziato che l'ambiente acquatico ha selezionato una temperatura di attivazione e una temperatura di inattivazione più basse rispetto ai Mammiferi; inoltre, il sistema del complemento dei Pesci, rispetto a quello umano, è in grado di lisare eritrociti di pecora, capra, cane e uomo mediante la via alternativa (Zarkadis, 2001a). Il complemento rappresenta per i Teleostei uno dei più efficaci meccanismi di difesa immunitaria.

1.3.5 LE CHEMOCINE

Le chemochine sono una famiglia di proteine di piccole dimensioni che generalmente vengono suddivise in due classi (chemochine α e chemochine β) a seconda della sequenza del residuo di cisteina del polipeptide (Baggiolini, 1998). Esse hanno il compito di attivare e dirigere determinati tipi cellulari nei siti di infiammazione mediante interazione con i loro recettori di membrana, proteine multipasso con sette domini transmembrana associate a

proteine-G nel dominio intracellulare. Alcune chemochine, con i loro recettori, sono state clonate in diversi Teleostei come le chemochine β nella trota (Dixon et al., 1998) e nella carpa (Fujiki et al., 1999) ed il recettore CCR7 ad esse associato (Daniels et al., 1999), ed i recettori delle chemochine α nella carpa (Fujiki et al., 1999; Daniels et al., 1999; Nam et al., 2000).

1.3.6 LE CITOCHINE

Le citochine sono una classe eterogenea di proteine secrete prodotte da vari tipi cellulari la cui funzione è stata ampiamente conservata durante il processo evolutivo nei vari gruppi animali, questo sta ad indicare che il ruolo svolto dalle citochine, permettere la segnalazione e il riconoscimento cellula-cellula, è essenziale nei processi di difesa. Essendo questo tipo di riconoscimento uno dei più antichi, basti pensare ai protozoi che lo utilizzano nei processi di riconoscimento “sessuale”, è facile dedurre che anche le citochine siano comparse abbastanza presto durante lo sviluppo evolutivo dei Vertebrati, circa 400 milioni di anni fa. Molte evidenze hanno confermato la presenza di queste molecole anche nei pesci cartilaginei, il gruppo di pesci più antico che presenta un sistema immunitario funzionante come quello conosciuto per i Mammiferi; molti autori sono concordi, infatti, nel ritenere che proprio in questi organismi si siano originati i meccanismi di base della risposta adattativa poi migliorati nei Vertebrati (Clem and Small, 1967; Rast and Litman, 1994; Litman, 1996; Bartl et al., 1997; Najakshin et al., 1999).

Nei Pesci, soprattutto nei Teleostei che sono stati quelli maggiormente studiati, è stata mostrata la presenza di citochine omologhe a quelle dei Mammiferi (Secombes et al., 1996). Nei Mammiferi le cellule ad attività fagocitica rispondono alla presenza di antigeni microbici secernendo citochine quali: TNF- α , interleuchina-1, interleuchina-6 (che inducono la sintesi delle proteine della fase acuta, l'attivazione dell'endotelio vascolare, il potenziamento dell'extravasazione cellulare, la stimolazione dei macrofagi, la proliferazione dei linfoblasti e l'attivazione delle cellule B e T) ed una chemochina β : l'interleuchina-8.

1.3.6.1 Il fattore della necrosi tumorale- α (TNF- α)

Il TNF- α appartiene alla famiglia del TNF alla quale appartengono anche le linfotossine α e β . I TNF recentemente clonati nella trota (Laing et al., 2001) e nel passerino giapponese (Hirono, 2000) hanno mostrato un grado di similitudine con i TNF dei Mammiferi pari al 20-40% d'identità e, in special modo, sono molto simili al TNF- α dei Mammiferi per: la conservazione della coppia di cisteine necessarie al ripiegamento della proteina; la conservazione delle sequenze di confine introne/esone; la presenza di un sito di taglio nel precursore del TNF- α ; la produzione dell'omologo del TNF in leucociti isolati dal sangue periferico (PBL) indotta da LPS, IL-1- β , Concanavalina-A (ConA), PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Girono et al., 2000; Laing et al., 2001). Il TNF- α , principalmente prodotto in seguito all'attivazione di monociti/macrofagi, svolge le sue funzioni immunologiche regolando le risposte alle infiammazioni e all'immunità cellulare (Vassalli, 1992; Aggarwal and Natarajan, 1996). Queste funzioni includono la necrosi emorragica dei tumori trasformati, l'aumento della fagocitosi e della citotossicità dei neutrofili (Canetti et al., 2001), l'aumento della sintesi della prostaglandina E2 e dell'ossido nitrico (Cunha et al., 1994; Huang et al., 2000), e la modulazione e l'espressione di alcune citochine, come IL-1 e IL-6, e alcune chemochine. Il TNF- α , nella sua forma matura, si lega a due distinti recettori sulla superficie cellulare, TNFR1 e TNFR2, che producono diverse risposte come, la differenziazione cellulare, la proliferazione e l'apoptosi (Locksley et al., 2001). Non ci sono dati inerenti la bioattività del TNF- α negli squali, mentre, nei pesci teleostei, l'esistenza del TNF e dei suoi recettori sono stati dimostrati già in lavori precedenti, in cui si era osservato che il TNF umano andava ad alterare le funzioni di macrofagi, neutrofili e linfociti di trota (Jang et al., 1995; Hardie et al., 1994).

1.3.6.2 Il fattore di crescita trasformante β (TGF- β)

Il TGF- β è uno dei membri della superfamiglia del TGF che comprende un gruppo di molecole che svolgono varie funzioni tra cui la regolazione dell'embriogenesi, la differenziazione delle cellule adulte, l'infiammazione e la riparazione delle ferite, ma solo i membri della sottofamiglia del TGF- β intervengono nella regolazione delle risposte immunitarie. Nei Teleostei sono stati clonati diversi omologhi del TGF- β , tra cui quello della carpa, della trota (Hardie et al., 1998), della spigola (Harms et al., 2000) e della platessa (Laing et al., 2001).

1.3.6.3 L'interleuchina-1

L'interleuchina-1 β è stata inizialmente scoperta in topi e uomini e nell'arco di dieci anni è stata caratterizzata in un'ampia varietà di specie animali (Tab 2).

Organism	Gene	GenBank accession nu
<i>Homo sapien</i> (Human)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	M15330 M15840
<i>Cercopithecus torquatus</i> (Red-Crowned Mangabey)	IL-1 β mRNA	U19837
<i>Macaca fascicularis</i> (Crab-Eating Macaque)	IL-1 β mRNA	D63353
<i>Macaca mulatta</i> (Rhesus Monkey)	IL-1 β mRNA	U19845
<i>Macaca nemestrina</i> (Pig-Tailed Macaque)	IL-1 β mRNA	U19853
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	M15131 X04964
<i>Rattus norvegicus</i> (Norway Rat)	IL-1 β mRNA	M98820
<i>Sigmodon hispidus</i> (Hispid Cotton Rat)	IL-1 β mRNA	AF421387
<i>Equus caballus</i> (Horse)	IL-1 β mRNA	D42147
<i>Bos taurus</i> (Cow)	IL-1 β mRNA	M35589
<i>Cervus elaphus</i> (Red Deer)	IL-1 β mRNA	U20500
<i>Ovis aries</i> (Sheep)	IL-1 β mRNA	X54796
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	M86725 X74568
<i>Capra hircus</i> (Goat)	IL-1 β mRNA	D63351
<i>Felis domesticus</i> (Cat)	IL-1 β mRNA	M92060
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	IL-1 β mRNA	D21835
<i>Tursiops truncatus</i> (Bottle-Nosed Dolphin)	IL-1 β mRNA	AB028216
<i>Trichosurus vulpecula</i> (Brush-Tailed Possum)	IL-1 β mRNA	AF071539
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Duck-Billed Platypus)	IL-1 β gene	AJ239048
<i>Mesocricetus auratus</i> (Golden Hamster)	IL-1 β mRNA, partial	AB028497
<i>Canis familiaris</i> (Dog)	IL-1 β mRNA, partial	Z70047
<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	Y15006 AJ245728
<i>Xenopus laevis</i> (African Clawed Frog)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	AJ010497 AJ314758
<i>Dicentrarchus labrax</i> (European Seabass)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	AJ269472 AJ311925
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow Trout)	IL-1 β 1 mRNA IL-1 β 1 gene IL-1 β 2 mRNA IL-1 β 2 gene	AJ223954 AJ004821 AJ245925 AJ245925
<i>Sparus aurata</i> (Gilthead Seabream)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	AJ277166 AJ419178
<i>Carrasius auratus</i> (Goldfish)	IL-1 β 1 mRNA IL-1 β 1 gene IL-1 β 2 mRNA IL-1 β 2 gene	AJ249136 AJ419848 AJ249137 AJ419849
<i>Cyprinus carpio</i> (Common Carp)	IL-1 β 1 mRNA IL-1 β 1 gene IL-1 β 2-1 mRNA IL-1 β 2-2 mRNA	AB010701 AJ245635 AJ401030 AJ401031
<i>Scophthalmus maximus</i> (Turbot)	IL-1 β mRNA, partial	AJ295836
<i>Pleuronectes platessa</i> (Plaice)	IL-1 β mRNA, partial	AJ010640
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	IL-1 β mRNA, partial	AJ330756
<i>Scyliorhinus canicula</i> (Small Spotted Catshark)	IL-1 β mRNA IL-1 β gene	AJ251201 AJ295947

Tab 2: lista delle sequenze note dell'IL-1 β

Con il termine interleuchina-1 si intende una famiglia di quattro citochine: IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) e IL-18 ad attività regolatoria (Dinarello, 1997). L'IL-1 è la più grande famiglia di mediatori dell'infiammazione ed è coinvolta nella risposta a invasioni microbiche, infiammazioni e reazioni immunologiche. Studi condotti sia "in vivo" che "in vitro" hanno mostrato che l'IL-1 α e IL-1 β hanno effetti simili ma non identici e che agiscono su un recettore comune presente sulle cellule bersaglio; entrambe le citochine

vengono prodotte in molti tipi cellulari compresi neutrofili, cellule Natural Killer, linfociti B e T e cellule del sistema nervoso centrale, ma la produzione più cospicua avviene in monociti e macrofagi. Nei Mammiferi sia l'IL-1 α che l'IL-1 β sono sintetizzati come precursori molecolari di 31 kDa che presentano il 23% di identità nella loro sequenza aminoacidica (Nicola, 1994); il precursore molecolare dell'IL-1 α dei Mammiferi è biologicamente attivo e rimane localizzato a livello intracellulare o associato alla superficie cellulare stessa; solo dopo la morte della cellula esso viene rilasciato e, in seguito a taglio enzimatico, si forma un peptide maturo di 17 kDa. Al contrario il precursore molecolare dell'IL-1 β ha un'attività molto bassa e solo in seguito al taglio enzimatico, associato alla secrezione dell'IL-1 β , diviene biologicamente attivo e, in questa forma, va ad agire su cellule ed organi coinvolti nelle risposte immunitarie. L'IL-1, dunque, risulta la principale molecola coinvolta sia nelle risposte immuni che in quelle infiammatorie (Dinarello, 1997) ed esplica la sua attività andando ad attivare le cellule B e T (Smith et al., 1980) e le Natural Killer (Kullberg and Van der Meer, 1995), e stimolando i macrofagi a secernere citochine e prostaglandine, fattori solubili pro-infiammatori.

Per quanto concerne i Pesci, studi condotti sui macrofagi di pesce gatto e su linee cellulari epiteliali e macrofagiche di carpa hanno mostrato che tali cellule sono in grado di produrre un terreno condizionato ad attività IL-1 simile (Clem et al., 1985; Siegel et al., 1986); recentemente le stesse scoperte sono state fatte anche sui macrofagi e i neutrofili di carpa (Verburg-van Kemenade et al., 1995; Weyts et al., 1997).

1.3.6.4 Il recettore dell'IL-1

L'attività dell'IL-1 si attua come conseguenza del legame tra la citochina e il suo recettore (IL-1R), situato sulla superficie delle cellule bersaglio; l'instaurarsi di questo legame comporta l'attivazione di complesse vie intracellulari che portano all'attivazione di alcuni geni e alla modificazione di determinate proteine.

Due differenti tipi di recettori, tipo I e tipo II, sono stati caratterizzati e clonati nei Mammiferi (Sims and Dower, 1994); entrambi i recettori presentano tre domini extracellulari, altamente conservati, responsabili del legame con l'IL-1. Il legame avviene senza che intervengano molecole accessorie. L'affinità dell'IL-1 per i recettori di tipo I e II varia in base ai tipi cellulari. L'IL-1R appartiene alla superfamiglia interleuchina-1/Toll-like receptor (IL-1/TLR), che è composta da un gruppo di recettori coinvolti nella difesa immunitaria e nei processi infiammatori ed è presenti in Mammiferi, Insetti e Piante (Mitcham et al., 1996; O'Neill and Green, 1998; O'Neill, 2000). Il sistema di trasduzione dell'IL-1R è altamente sensibile, infatti basta una piccola concentrazione di ligando ad attivare il processo ((Sims and Dower, 1994; Ghiara et al., 1989; Scapigliati et al., 1989; Mitcham et al., 1996; O'Neill and Green, 1998; O'Neill, 2000; Dinarello, 1996). Il complesso IL-1/IL-1R_I forma un ulteriore complesso, legandosi con alta affinità, alla proteina accessoria del recettore (IL-1RacP) e ciò fa iniziare il processo di trasduzione del segnale che può avvenire attraverso differenti vie di segnalazione (Auron, 1998). Queste vie includono l'attivazione del gene dell'NFκB, della proteina chinasi attivata da mitogeno p38 (MAPK), e della Jun N-terminale chinasi che porta all'induzione di molti geni codificanti per molecole pro-infiammatorie e immuno-modulatorie (Ridley et al., 1997; May et al., 1998; Ninomiya-Tsuji et al., 1999)

1.4 STRUTTURA E FUNZIONE DELLE VIE DI SEGNALAZIONE

Una delle più grandi capacità degli organismi multicellulari consiste nella loro capacità di coordinare le reazioni biochimiche delle varie cellule che compongono l'organismo totale. La base per questa coordinazione è la comunicazione intercellulare che può avvenire in differenti modi (Fig. 3):

- ✓ *Messaggeri chimici*: le cellule inviano segnali in forma di specifici messaggeri chimici a cellule bersaglio; queste ultime commutano il messaggio in reazione biochimica. Questo tipo di segnalazione può influenzare più cellule contemporaneamente.

- ✓ *Gap junctions*: la comunicazione avviene attraverso giunzioni che uniscono le membrane cellulari formando dei canali attraverso i quali passano metaboliti e molecole-segnale.
- ✓ *Interazione cellula-celulla mediante proteine di superficie*: in questo processo una proteina di superficie presente su una cellula lega una porotaina specifica presente su un'altra cellula; come conseguenza della formazione di questo complesso, si scatena una reazione biochimica che coinvolge entrambe le cellule.
- ✓ *Processi elettrici*: avviene essenzialmente nelle cellule nervose, la conduzione dell'impulso elettrico si basa sui cambiamenti del potenziale di membrana; i segnali elettrici vengono poi trasformati in segnali chimici al livello delle estremità cellulari altamente specializzate nel rilascio di neurotrasmettitori.

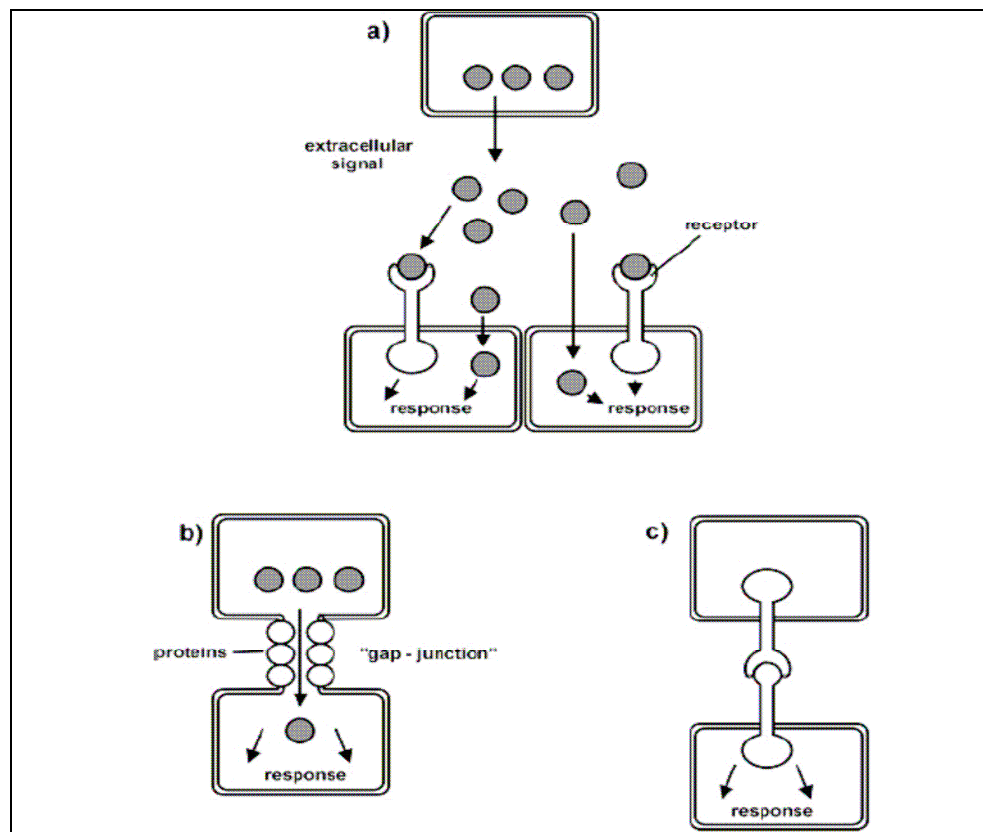


Fig 3: principali meccanismi di comunicazione intercellulare: a) comunicazione attraverso messaggeri chimici; b) comunicazione mediante gap junctions; c) comunicazione attraverso proteine di superficie

La trasduzione del segnale intercellulare regola molte funzioni fisiologiche tra cui: la coordinazione del flusso di metaboliti tra cellule di vari tessuti, la coordinazione e regolazione della divisione cellulare, la differenziazione e lo sviluppo degli organismi. Le vie di segnalazione sono importanti anche nell'analizzare informazioni sensoriali: segnali esterni, come segnali ottici, acustici e gradienti di nutrimenti, vengono “registrati” dalle cellule sensoriali e trasmessi alle altre cellule mediante queste vie di segnalazione (Krauss, 2003).

1.5 STRUTTURA DELLE VIE DI SEGNALAZIONE

La comunicazione intercellulare si basa sulla creazione di specifici meccanismi di ricezione e analisi dei segnali; questi segnali vengono registrati dalla cellula bersaglio e processati a livello intracellulare mediante una cascata di eventi che viene identificata come trasduzione del segnale.

1.5.1 I MECCANISMI DELLA COMUNICAZIONE INTERCELLULARE

Nella comunicazione tra cellule di un organismo, i segnali, chimici o elettrici, vengono prodotti in cellule specializzate che sono in grado di regolarne la produzione in maniera tale che il segnale venga prodotto soltanto in determinati momenti.

La comunicazione intercellulare si basa sui seguenti steps:

- ✓ Formazione del segnale
- ✓ Trasporto del segnale alle cellule bersaglio

- ✓ Registrazione del segnale sulla cellula bersaglio
- ✓ Trasmissione del segnale all'interno della cellula bersaglio
- ✓ Trasformazione del segnale in reazione elettrica o biochimica
- ✓ Fine del segnale

Le cellule bersaglio convertono il segnale ricevuto in una catena di reazioni intracellulari la cui natura è caratterizzata dai seguenti parametri: natura del segnale esterno, meccanismo di registrazione del segnale, meccanismo di trasmissione e terminazione del segnale, e natura della reazione indotta nella cellula bersaglio.

1.5.2 PRINCIPI DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

I componenti delle vie di trasduzione del segnale sono proteine e piccole molecole dette messaggeri: il segnale viene ricevuto da proteine che innescano un processo a cascata che comporta, a sua volta, la liberazione dei messaggeri; la trasduzione del segnale comporta l'attivazione delle proteine coinvolte nel processo e questa può avvenire per modificazione chimica, taglio enzimatico, cambiamento conformazionale. Le molecole maggiormente coinvolte nella trasduzione del segnale sono: recettori, proteine chinasi, proteine fosfatasi, GTPasi e proteine adattatrici.

1.5.2.1 I recettori

I recettori delle cellule bersaglio possono essere suddivisi in due categorie: recettori di membrana e recettori intracellulari. I recettori di membrana sono proteine multipasso che presentano un dominio extracellulare, uno intracellulare e uno transmembrana; il legame di un ligando al dominio extracellulare induce reazioni specifiche all'interno della cellula target. I recettori intracellulari, invece, prevedono l'entrata, in genere passiva, della molecola-stimolo nella cellula bersaglio; la maggior parte di questi recettori possono essere classificati come attivatori della trascrizione attivati da ligando: il recettore attivato dal legame con la molecola-segnale stimola l'attività trascrizionale di determinati geni. Ogni recettore è specifico per un ligando e la specificità è determinata dalla struttura chimica del recettore stesso. Il riconoscimento e il legame sono governati dagli stessi principi e interazioni del legame enzima-substrato (H-bonds): interazioni elettrostatiche, interazioni di Van der Waals e interazioni idrofobiche; l'affinità del legame segnale-recettore è invece molto più grande rispetto a quella enzima-susbrato. Decisiva per l'intensità del segnale è la concentrazione del complesso segnale-recettore che dipende da: concentrazione della molecola segnale, concentrazione del recettore, e affinità di legame.

1.5.2.2 Proteine chinasi e proteine fosfatasi

Entrambe le classi di proteine sono alla base della trasduzione del segnale, la loro funzione è quella di andare ad attivare/disattivare determinate proteine aggiungendo/togliendo gruppi fosfato sui residui amminoacidici; l'attività delle proteine chinasi e fosfatasi è finemente regolata.

La prima proteina chinasi ottenuta in forma pura è stata la serina/treonina chinasi (Ser/Thr kinase), successivamente venne scoperta un'altra classe di proteine ad attività regolatoria: le

tirosina chinasi (Tyr kinase); ad oggi possono essere distinte quattro classi di proteine chinasi (Fig. 4) in base alla sequenza del dominio catalitico composto da 270 aminoacidi:

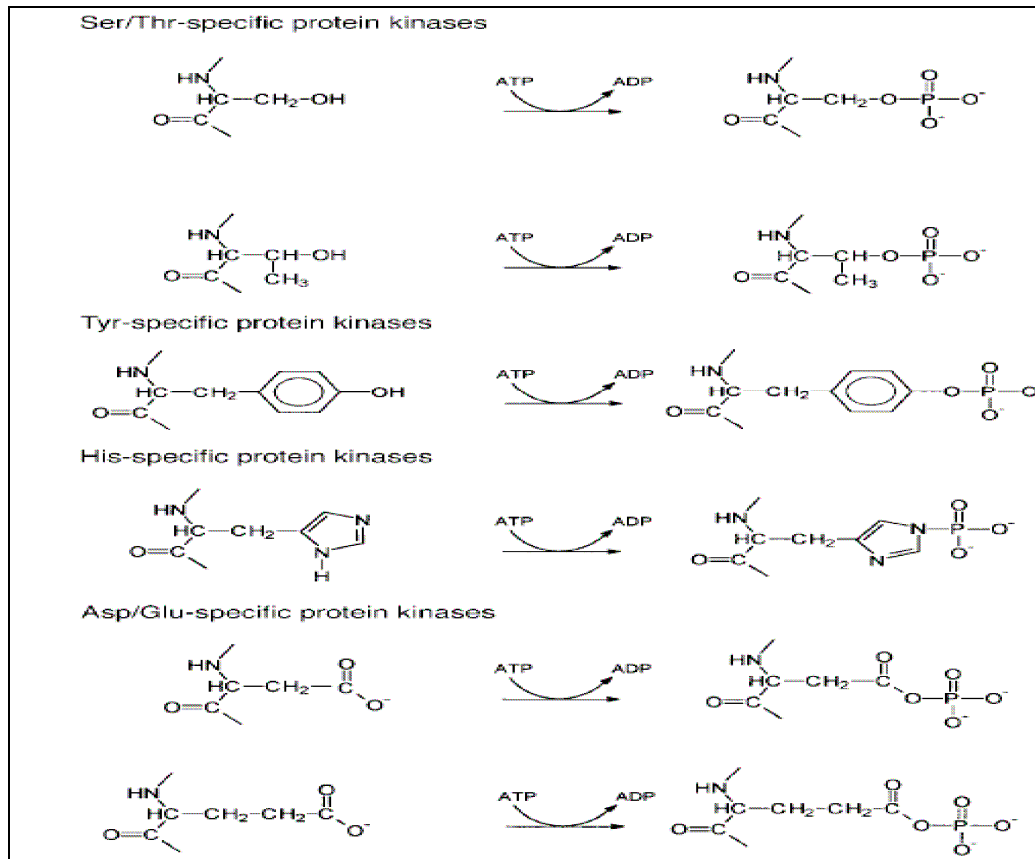


Fig. 4: specificità aminoacidica delle protein-chinasi

1. *Ser/Thr-kinase*: aggiunge un gruppo fosfato al gruppo $-\text{OH}$ dei residui di serina e treonina
2. *Tyr-kinase*: crea un estere fosfato con il gruppo $-\text{OH}$ fenolico dei residui di tirosina
3. *His-kinase (istidina chinasi)*: forma una fosforo-amide in posizione 1 e 3 dei residui di istidina; queste chinasi agiscono anche sui residui di lisina (Lys) e arginina (Arg)
4. *Aspartate/glutammate kinase*

La fosforilazione reversibile dei residui di Ser/Thr e Tyr è un segnale regolatorio delle vie di segnalazione; gli esteri fosfati formati sulle proteine per azione delle chinasi sono modificazioni stabili che causano profondi cambiamenti nell'attività proteica. A causa della

stabilità degli esteri fosfati, nelle cellule bersaglio sono presenti anche proteine fosfatasi che rimuovono tali legami. L'azione altamente regolata delle proteine chinasi e fosfatasi viene utilizzata dalla cellula per creare segnali temporaneamente e spazialmente localizzati.

1.5.2.3 Le GTPasi

Le proteine della superfamiglia delle GTPasi sono state riscontrate in piante, batteri e animali e presentano un'attività estremamente conservata. Esse sono coinvolte in: biosintesi proteica sui ribosomi, trasduzione del segnale a livello delle membrane, percezione sensoriale, controllo della differenziazione e divisione cellulare, traslocazione di proteine attraverso le membrane e trasporto vescicolare.

Le GTPasi ricevono il segnale in entrata nella cellula bersaglio e lo passano alle altre componenti della catena di segnalazione. Il funzionamento di queste proteine si basa su un processo ciclico e unidirezionale che prevede la transizione nei seguenti stati: attivo legato a GTP e inattivo legato a GDP; nella forma attiva il segnale viene passato alla proteina che si trova subito dopo nella catena di trasduzione del segnale, nella forma inattiva il segnale è bloccato, per riattivarsi la TPS asi deve scambiare il GDP con il GTP.

1.5.2.4 Proteine adattatrici

Le proteine adattatrici mediano la trasmissione del segnale tra le varie proteine che compongono la catena della trasduzione; esse funzionano come pinze che localizzano le proteine coinvolte in una via di trasmissione e le portano sullo specifico substrato.

1.5.3 I SECONDI MESSAGGERI

L'attivazione intracellulare degli enzimi coinvolti nella catena di trasduzione del segnale può portare alla formazione di molecole chimiche diffusibili chiamate secondi messaggeri; essi vengono formati o rilasciati in seguito a specifiche reazioni enzimatiche durante il processo di trasduzione del segnale. Esistono due differenti tipi di secondi messaggeri:

- ✓ Messaggeri idrofobici (diacilglicerolo e fosfatidilinositolo) che sono localizzati a livello della membrana
- ✓ Messaggeri idrofilici (cAMP, cGMP, Ca^{2+}) che hanno un'elevata solubilità in acqua e sono localizzati nel citosol

I secondi messaggeri sono caratterizzati da una serie di proprietà che li rendono adatti ad essere elementi del processo di trasduzione del segnale; alcuni possono, infatti, essere sintetizzati e degradati mediante reazioni enzimatiche in tempi brevissimi, altri messaggeri (come il Ca^{2+}) vengono immagazzinati in particolari compartimenti citoplasmatici.

1.5.3.1 cAMP

L'AMP ciclico è un importante secondo messaggero che influenza molte reazioni come la gluconeogenesi, la glicolisi, la lipidogenesi, la contrazione muscolare, il controllo della crescita e l'apoptosi. La sua concentrazione è finemente regolata da due enzimi: l'adenilato ciclasi (sintesi) e la fosfodiesterasi (degradazione); l'attività dell'adenilato ciclasi è sensibile ai segnali mediati dai recettori accoppiati a proteine G e che coinvolgono le proteine $G\alpha$ e $G\beta\gamma$, ma può essere anche regolata da segnali via Ca^{2+} . La degradazione del cAMP da parte delle fosfodiesterasi è necessaria per mantenere la concentrazione di questo secondo

messaggero sotto controllo; più di dieci isoforme di fosfodiesterasi sono state caratterizzate. L'AMP ciclico funziona come attivatore delle proteine che possiedono un sito di legame per esso; tutte le proteine coinvolte nella segnalazione via cAMP, senza eccezione, svolgono la loro funzione in associazione con la membrana cellulare.

L'AMP ciclico si lega e attiva i canali ionici legati al cAMP e la proteina chinasi A.

1.5.3.2 cGMP

Analogamente al cAMP, il cGMP è formato dalla guanilato ciclasi a partire dal GTP; sebbene la guanilato ciclasi catalizzi una reazione simile a quella dell'adenilato ciclasi, le due classi di enzimi differiscono notevolmente nella struttura e nel meccanismo di attivazione. Le guanilato ciclasi possono essere suddivise in tre gruppi in base ai segmenti transmembrana presenti: un gruppo comprende gli enzimi che non possiedono parti transmembrana e i suoi membri vengono indicati come guanilato ciclasi solubili; il secondo gruppo è composto da enzimi che possiedono un solo segmento transmembrana e il terzo gruppo è costituito da guanilato ciclasi con due segmenti transmembranali. Le guanilato ciclasi con un singolo frammento transmembrana sono recettori che contengono un dominio extracellulare, in grado di legare il ligando, e vari domini intracellulari che sono richiesti per l'attivazione dell'enzima. Una complessa serie di reazioni seguono l'attivazione, che includono la fosforilazione di un dominio, il legame con l'ATP e la sintesi del cGMP.

Le guanilato ciclasi solubili sono eterodimeri regolati dal secondo messaggero NO (ossido nitrico); un gruppo eme che conferisce affinità per il NO si trova legato all'estremità N-terminale di questi enzimi, il legame con il NO attiva l'enzima.

Il cGMP agisce direttamente su tre bersagli:

- ✓ *proteine chinasi dipendenti da cGMP*: vengono attivate dal legame col cGMP ed hanno elementi strutturali simili alla proteina chinasi A.

- ✓ *canali cationici*: il legame col cGMP provoca l'apertura dei canali e un susseguente influsso di cationi
- ✓ *fosfodiesterasi cAMP specifiche*

1.5.3.3 Inositolo-fosfolipidi e Inositolo-fosfato

I fosfolipidi della membrana citoplasmatica che contengono inositolo servono per la creazione di secondi messaggeri a basso peso molecolare (diacilglicerolo e inositolotrifosfato) in risposta a vari stimoli intra- ed extracellulari. La membrana citoplasmatica contiene fosfatidilinositol fosfolipidi (PtdIns), in cui il gruppo fosfato è esterificato con un alcool ciclico, myo-D-inositolo. Partendo dai PtdIns, una serie di reazioni enzimatiche portano alla formazione di diversi secondi messaggeri: il PtdIns viene fosforilato in posizione 4' e 5' del residuo di inositolo e si forma il fosfatidilinositol 4-5-difosfato; questo viene ulteriormente fosforilato da una chinasi e dalla reazione si ottiene l'inositol (3,4,5) trifosfato che funziona come messaggero localizzato sulla membrana. L'inositol (3,4,5) trifosfato è substrato dell'enzima fosfolipasi C che porta alla formazione dell'inositol 1,4,5 trifosfato e del glicerolo; entrambi i composti sono secondi messaggeri che possono attivare specifiche vie: il primo induce la liberazione del Ca^{2+} , mentre il secondo agisce sotto stimolazione della proteina chinasi C.

1.5.3.3.1. Inositolo fosfato e regolazione della fosfolipasi C

La fosfolipasi C è un enzima presente in molti tipi cellulari che regola due vie di segnalazione (fig. 5): le fosfolipasi C β vengono attivate dalle proteine G e intervengono in vie di segnalazione in cui sono coinvolti recettori collegati a proteine G. Le fosfolipasi di tipo C γ

vengono attivati da recettori transmembrana con attività di tirosin-chinasi associata o intrinseca.

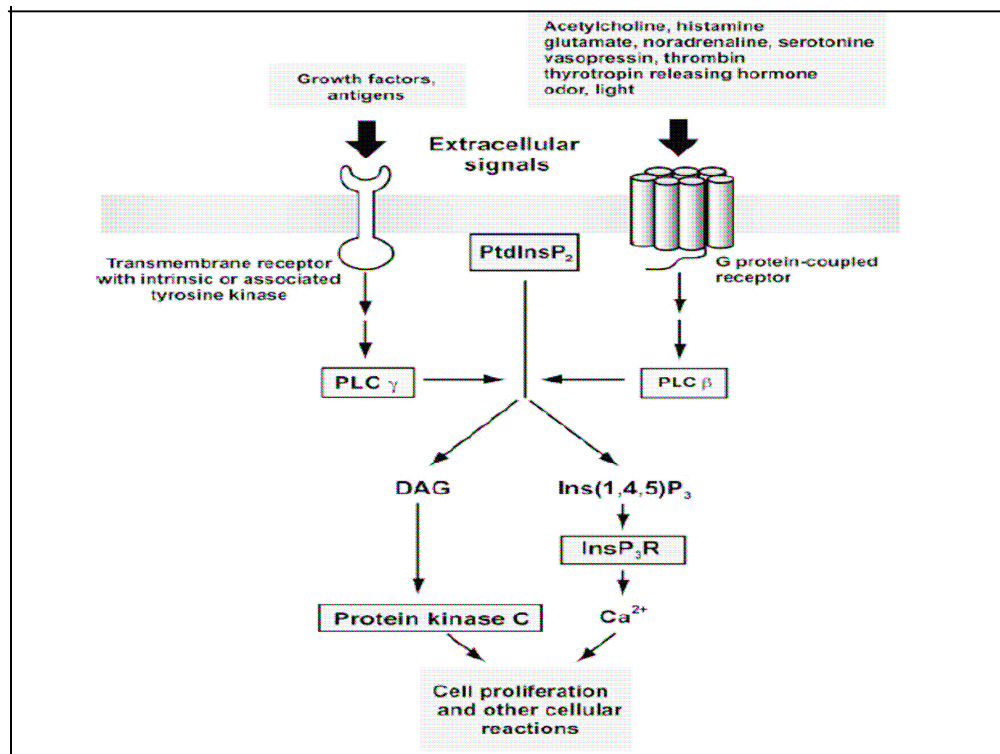


Fig. 5: vie di segnalazione regolate dalla fosfolipasi C

Gli inositoli fosfato vengono continuamente degradati e rigenerati in un ciclo metabolico in cui interviene il diacilglicerolo.

1.5.3.4 Inositolo 1,4,5 trifosfato e rilascio di calcio

La funzione primaria dell'inositolo(1,4,5)trifosfato è la mobilitazione del calcio dagli organi di accumulo.

Il calcio è una molecola di segnalazione ubiquitaria: esso, infatti, può sia essere rilasciato dagli organuli intracellulari sia entrare dall'esterno della cellula mediante canali ionici presenti sulla membrana. Una moltitudine di secondi messaggeri è in grado di mobilitare il calcio (Bootmann et al., 2002); per quanto concerne il rilascio di calcio dagli organuli citoplasmatici, tre sono i messaggeri in grado di provocare il flusso di questo ione: inositolo trifosfato, ADP ciclico e NADP, di questi, soltanto l'inositolo trifosfato è stato maggiormente caratterizzato.

La concentrazione di Ca^{2+} libero presente nel citoplasma è molto bassa, circa 10^{-7}M ; uno dei motivi per cui le cellule tendono a mantenere bassi i livelli di questo ione è la sua scarsa capacità di formare complessi solubili con il fosfato inorganico. La bassa concentrazione di calcio citosolico libero si oppone alla grande capacità di accumulo nei compartimenti citoplasmatici e alla grande concentrazione (mM) che si trova nell'ambiente extracellulare. Nel citosol il Ca^{2+} è immagazzinato nei mitocondri e in speciali organuli di accumulo del reticolo endoplasmatico. In questi ultimi compartimenti il calcio forma complessi con la calreticulina, una proteina che ha una grande capacità di formare legami a bassa affinità col Ca^{2+} ; nella forma legata e compartimentalizzata, il calcio non è utilizzabile dalla cellula, ma può essere liberato soltanto durante i processi di trasduzione del segnale.

Nelle cellule muscolari, il calcio viene accumulato nel reticolo sarcoplasmatico complessato con la proteina calsequestrina; in questo caso, il rilascio dello ione avviene in seguito all'arrivo di uno stimolo neurale e la sua liberazione dà inizio alla contrazione muscolare.

1.5.3.5 Rilascio di calcio dai compartimenti intracellulari

Il passaggio del calcio dal reticolo endoplasmatico al citoplasma avviene attraverso due tipi di canali: quelli che hanno il recettore per l'inositolo trifosfato e quelli che hanno il recettore per la ryanodina; entrambi i canali formano con il ligando un'unità strutturale funzionante. I recettori per l'inositolo trifosfato sono presenti nei canali degli organuli associati al reticolo endoplasmatico, mentre il recettore per la ryanodina si trova nei canali del reticolo sarcoplasmatico.

1.5.3.5.1 Il recettore per l'inositolo trifosfato

Il legame tra l'inositolo trifosfato (InsP₃) e il suo recettore comporta l'apertura del canale con la conseguente liberazione del calcio nel citoplasma. Questo recettore è una proteina transmembrana, probabilmente con due domini transmembrana situati in prossimità dell'estremità C-terminale. Il recettore attivo è composto da quattro subunità identiche e si presuppone che il canale sia formato dai domini transmembrana del C-terminale con il sito di legame per il ligando localizzato verso la regione citoplasmatica.

L'apertura dei canali è un processo complesso che coinvolge Ca²⁺, Mg²⁺, ATP, InsP₃, e proteine che legano il calcio (Bootman et al, 2002). La regolazione del recettore da parte del Ca²⁺ è di particolare importanza per la generazione delle onde dello ione stesso: bassi livelli di calcio stimolano il rilascio dello ione mediante il recettore, mentre le alte concentrazioni hanno un effetto inibitorio.

1.5.3.5.2 Il recettore della ryanodina e l'ADP-ribosio ciclico

Il recettore della ryanodina è molto simile nella sua struttura al recettore dell'inositolo trifosfato ed è localizzato essenzialmente nelle cellule di tipo eccitatorio, come le fibre muscolari e i neuroni. L'apertura di questo recettore è controllata in parte dal Ca²⁺ e in parte dal cambiamento del voltaggio o dal legame di un trasmettitore: un primo flusso di calcio viene generato dall'apertura dei canali voltaggio- o ligando-dipendenti, lo ione appena entrato nella cellula si lega al recettore della ryanodina e provoca la totale apertura dei canali e un'amplificazione nel flusso di calcio.

In alcuni tipi di cellule (come le cellule cardiache e pancreatiche), un altro secondo messaggero è coinvolto nell'apertura dei recettori della ryanodina: l'ADP-ribosio ciclico, che si forma dal NADP in una reazione catalizzata dall'enzima ADP-ribosio ciclasi che prevede la ciclizzazione dopo eliminazione della nicotinammide.

Tutte le vie, in grado di indurre la mobilitazione del calcio dai compartimenti intracellulari, sono mostrate nella fig. 6:

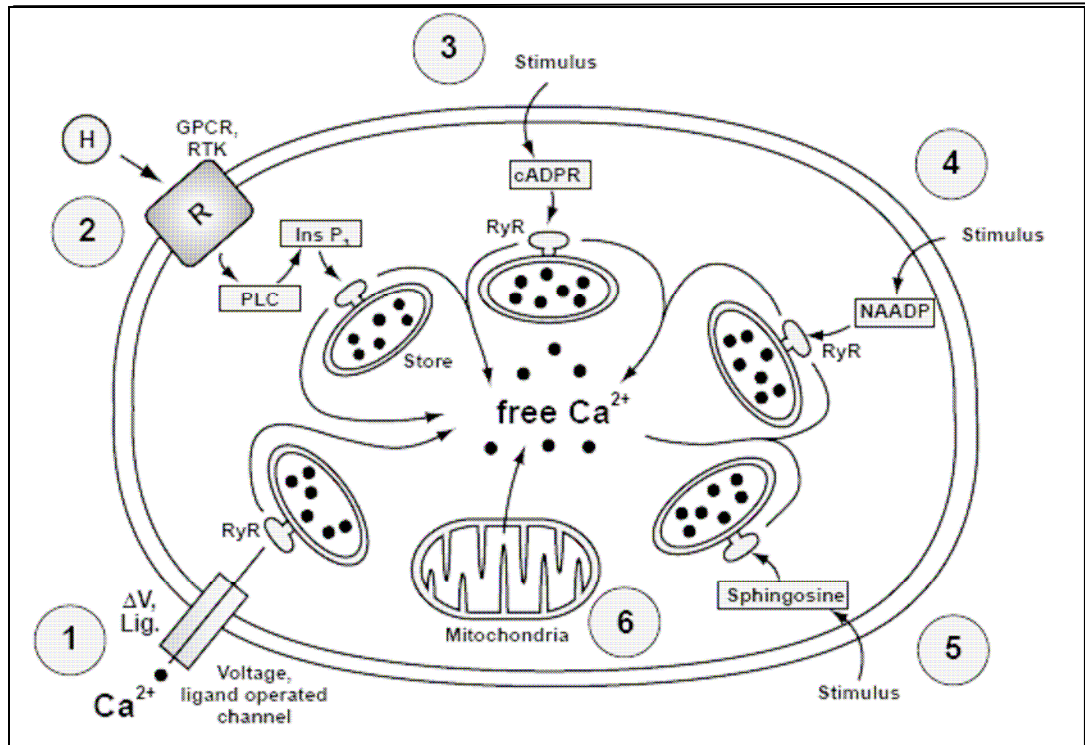


Fig. 6: vie di rilascio del calcio: 1) via ryanodina-recettore e canali voltaggio- ligando-dipendenti; 2) via inositolo trifosfato; 3) via ADP-ribosio ciclico 4) via nicotin-acido denina dinucleotide fosfato; 5) via sfingosina; 6) rilascio dai mitocondri.

1.5.3.6 Influsso di calcio dalla regione extracellulare

Nella regione extracellulare, la concentrazione di calcio è superiore a 10^{-3} M, molto più elevata, quindi, di quella presente nell'ambiente citoplasmatico. La membrana cellulare contiene una gran varietà di canali per il calcio che regolano il passaggio dalla regione extracellulare al citosol. Una delle funzioni primarie dell'entrata del Ca^{2+} all'interno della

cellula è “riempire” i compartimenti di accumulo per poter, poi, generare il segnale di trasduzione del segnale.

I principali canali che mediano l’influsso di calcio sono:

1. Canali voltaggio-dipendenti: si aprono in seguito a depolarizzazione o cambiamento del potenziale di membrana.
2. Canali ligando-dipendenti: l’apertura viene regolata dal legame di un agonista al dominio extracellulare del canale.
3. Canali che si aprono in seguito a stress meccanici
4. Canali che si aprono in seguito allo svuotamento dei compartimenti di accumulo intracellulari (la via di comunicazione tra questi canali e i compartimenti però non è stata ancora studiata)
5. Canali controllati dalle proteine G_a
6. Canali, la cui apertura è controllata dagli sfingolipidi.

1.5.3.7 Rimozione ed accumulo del Ca^{2+}

La concentrazione citosolica del calcio cambia durante la stimolazione delle cellule stesse. Esse posseggono un efficiente sistema di trasporto del calcio, che può rapidamente trasportare questo ione nella regione extracellulare o nei compartimenti di accumulo. In particolare, le Ca^{2+} -ATPasi sono coinvolte nel drenare il calcio dal citosol e riversarlo nell’ambiente extracellulare; questo tipo di trasporto è attivo, cioè viene eseguito contro gradiente di concentrazione usando l’idrolisi dell’ATP come sorgente di energia. Le Ca^{2+} -ATPasi si riscontrano anche nelle membrane del reticolo endoplasmatico.

Altri sistemi di trasporto associati alla membrana citoplasmatica comportano lo scambio degli ioni Na^+ con il Ca^{2+} ; questi scambiatori Na^+ - Ca^{2+} sono perlopiù localizzati nelle fibre muscolari e nei neuroni.

Il complesso costituito da questi canali per il calcio deve funzionare sempre alla perfezione nelle cellule; in seguito all'influsso di calcio, infatti, nel citosol si raggiungono concentrazioni di calcio pericolose per la vita stessa della cellula. La rimozione e il riaccumulo del calcio sono, quindi, necessari per la sopravvivenza.

1.5.3.8 Cambiamenti temporali e spaziali nella concentrazione del calcio

Quando i canali di membrana e quelli intracellulari di rilascio del calcio sono attivati, soltanto brevi impulsi di calcio possono essere osservati, poiché i canali hanno tempi di apertura molto brevi. Questi segnali sono localizzati attorno ai canali e servono come input per alcune reazioni fisiologiche, come l'attivazione di altri canali ionici o di vie di segnalazioni nucleari specifiche.

Tutti i piccoli impulsi di calcio dovuti all'apertura dei canali, vengono sommati a livello intracellulare e innescano un processo globale durevole, ampiamente distribuito e di natura pulsante che appare come un susseguirsi di onde e picchi; i meccanismi che portano alla formazione delle onde sono molteplici e dipendono dalla via di segnalazione che viene innescata dallo stimolo.

Nelle cellule, inoltre, sono presenti vari meccanismi a feedback che si attivano quando i livelli di calcio intracellulare si innalzano; un esempio è dato dai sottotipi di proteine RGS dipendenti dal calcio (Ishii et al, 2002) che possono attenuare i segnali mediati dalle proteine G. Uno degli effettori delle proteine G_q è la fosfolipasi $C\beta$ che stimola il rilascio di calcio in seguito alla formazione di inositolo trifosfato; l'attivazione delle proteine G_q può essere terminata dalle proteine RGS che sono attivate da alte concentrazioni di Ca^{2+} e inibiscono l'ulteriore attivazione della fosfolipasi $C\beta$ e l'induzione del segnale inositolo trifosfato/ Ca^{2+} .

La segnalazione via calcio è molto versatile e viene utilizzata per codificare una grande varietà di informazioni. Come per i segnali elettronici e ottici usati nel campo dell'ingegneria, le informazioni contenute nei segnali via calcio vengono “comprese” dalla cellula in base alla

loro localizzazione, frequenza, periodo e ampiezza del picco. La sequenza temporale dei segnali del Ca^{2+} ha funzione regolatoria.

Come la frequenza delle oscillazioni del calcio sia decodificata o integrata in specifiche reazioni biochimiche non è ancora ben chiaro; è stato messo in evidenza, però, che la CaM chinasi 2 è coinvolta nella decodificazione di segnali ripetitivi del Ca^{2+} (De Koninck and Schulmann, 1998).

La modulazione dell'ampiezza della segnalazione via calcio è stata studiata nei linfociti B. Questi, infatti, in seguito al legame di un antigene col recettore delle cellule B possono generare un picco di calcio di differente ampiezza.

A seconda dell'ampiezza, diverse molecole effettrici e vie di trasduzione vengono attivate. I segnali di più grande ampiezza, portano all'attivazione del fattore di trascrizione NF κ B, mentre i segnali ad ampiezza più piccola determinano l'attivazione del fattore di trascrizione NF-AT (Berridge, 1997).

1.5.4 IL CALCIO COME MOLECOLA SEGNALE

Il calcio è una molecola-segnales fondamentale per le cellule. In seguito a stimolazione ormonale o elettrica, si può osservare un aumento nella concentrazione citosolica di questo ione, che porta all'instaurarsi di altre reazioni biologiche. Come detto in precedenza, questo aumento è limitato nel tempo e nello spazio e porta all'attivazione di diverse vie quali, per esempio, la contrazione muscolare, il processo di visione, la proliferazione cellulare, la secrezione, la motilità cellulare, la formazione del citoscheletro, l'espressione genica e alcune reazioni metaboliche.

Tre sono le vie principali che portano all'aumento della concentrazione citoplasmatica del Ca^{2+} : attraverso i recettori associati a proteine G, attraverso recettori delle tirosin-chinasi, e mediante i canali per il Ca^{2+} voltaggio- o ligando-dipendenti.

La decodificazione del messaggio avviene grazie alla presenza di proteine che, legandosi allo ione, convertono il segnale in un'ampia varietà di modificazioni biochimiche.

Ci sono due meccanismi principali attraverso i quali il calcio svolge la sua funzione: l'attivazione diretta di proteine e i legami ai recettori per il Ca^{2+} .

1.5.4.1 Attivazione diretta di proteine

Alcune proteine (tab. 3) hanno siti di legame specifici per il calcio e la loro attività dipende direttamente dal legame con questo ione.

protein	function
troponin C	modulator of muscle contraction
caldesmon	modulator of muscle contraction
α -actinin	bundling of actin
villin	organization of actin filaments
calmodulin	modulator of protein kinases and other enzymes
calcineurin B	protein phosphatase
caplain	protease
phospholipase A2	release of arachidonic acid
protein kinase C	ubiquitous protein kinase
Ca^{2+} -activated K^+ channel	effektor of hyperpolarization
InsP_3 receptor	intracellular Ca^{2+} release
ryanodin receptor	intracellular Ca^{2+} release
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporter	exchange of Na^+ and Ca^{2+} via the cell membrane
Ca^{2+} ATPase	transport of Ca^{2+} through cell membrane
recoverin	regulation der guanylyl cyclase
parvalbin	Ca^{2+} storage
calreticullin	Ca^{2+} storage
calbindin	Ca^{2+} storage
calsequestrin	Ca^{2+} storage

Tab 3:proteine che legano il calcio e loro funzione

Ci sono specifici enzimi che hanno nel loro centro attivo un sito di legame per il calcio, e lo ione interviene direttamente nel processo di catalisi. Un esempio è costituito dalla fosfolipasi A2 che contiene due siti di legame per il calcio: uno dei due ioni è direttamente coinvolto nel processo di catalisi aiutando a neutralizzare la carica durante il processo di idrolisi degli esteri degli acidi grassi; l'altro ione svolge un ruolo di stabilizzatore dello stato di transizione.

1.5.4.2 Legame ai recettori per il calcio

Un altro meccanismo centrale di trasduzione del segnale via calcio è costituito dal legame dello ione con recettori specifici. I recettori sono delle proteine regolatrici che accoppiano il segnale del calcio a quello di altre proteine segnale, attivando proteine bersaglio in risposta alle variazioni della concentrazione del calcio.

Il recettore più noto è la calmodulina, una piccola proteina di circa 150 amminoacidi (Hoeftlich and Ikura, 2002); la struttura del complesso Ca^{2+} /calmodulina consta di due domini globulari separati da un'alfa elica. Entrambi i domini hanno due siti di legame per il calcio e il legame avviene in una struttura denominata elica-giro-elica. Il complesso che si forma è molto flessibile, cosa che è di grande importanza per il perfetto funzionamento della struttura.

I meccanismi attraverso i quali la calmodulina regola l'attività delle proteine bersaglio possono essere suddivisi in sette classi (Chin and Means, 2000), le più importanti sono:

- ✓ Legame irreversibile della calmodulina alle proteine bersaglio
- ✓ Formazione di complessi inattivi a bassa affinità quando il calcio è presente in basse concentrazioni e attivi quando la concentrazione dello ione aumenta
- ✓ Attivazione delle proteine mediante il complesso Ca^{2+} /calmodulina
- ✓ Inibizione mediata dal complesso Ca^{2+} /calmodulina

Il complesso Ca^{2+} /calmodulina è coinvolto in molti processi, quali la regolazione della proliferazione, della mitosi, della trasduzione del segnale neuronale, della contrazione muscolare e del metabolismo del glucosio.

A tuttoggi si conoscono diversi tipi di calmodulina, ognuno delle quali agisce su una determinata proteina bersaglio; di queste ultime quelle maggiormente caratterizzate sono: le adenilil-ciclasti calmodulina-dipendenti, le fosfodiesterasi, le CaM chinasi e la calcineurina.

Le cellule contengono anche altri recettori, simili in funzione alla calmodulina. Un esempio è la troponina C, strutturalmente molto simile alla calmodulina. Questo recettore si trova come componente dell'apparato contrattile della muscolatura: il legame del Ca^{2+} induce cambiamenti conformazionali tali da permettere la contrazione del muscolo. Un altro recettore è la ricoverina che si trova associata alla porzione citosolica della membrana citoplasmatica; la distribuzione tra la forma libera e quella associata alla membrana di questo recettore è regolata dal calcio: il legame con lo ione porta alla traslocazione del recettore dal citosol alla membrana (Ames et al., 1997).

1.5.4.3 Evoluzione del calcio come messaggero

Nonostante all'interno della cellula siano presenti anche altri ioni, il calcio sembra godere di uno status molto speciale. Esso è uno ione versatile la cui concentrazione viene finemente controllata dalla cellula (Jaisval, 2001). I compartimenti di accumulo e i canali ionici specifici per il calcio sono due meccanismi che la cellula usa per regolare il livello di calcio libero; si presuppone che i compartimenti si siano originati proprio con lo scopo di difesa della cellula da questo ione.

Mentre la vita si originava sulla Terra, il calcio si trovava abbondante nelle rocce ignee presenti sulla calda crosta terrestre ed era completamente inutilizzabile dalla materia vivente. Dopo il raffreddamento della crosta, varie reazioni chimiche e biologiche aumentarono il livello di calcio disponibile. Questo fu un problema serio per le primitive cellule, poiché il Ca^{2+} ad alte concentrazioni causa danni agli organelli, alle proteine e agli acidi nucleici,

inoltre porta alla precipitazione dei fosfati; ognuno di questi eventi è in grado di causare la morte istantanea della cellula, quindi divenne necessario contenere il calcio in maniera tale che questo fosse il meno pericoloso possibile. Queste dovevano essere le premesse della pressione selettiva che hanno portato all'evoluzione delle pompe ioniche e dei compartimenti intracellulari, e la presenza di queste strutture ha fatto sì che il Ca^{2+} si trasformasse in ione-segnalatore.

Una spiegazione al perché proprio il calcio è stato scelto come messaggero rispetto agli altri cationi normalmente presenti nei sistemi biologici, la si può avere analizzandone alcuni parametri quali: struttura molecolare, stato di valenza, forza del legame, potenziale di ionizzazione e i parametri cinetici delle reazioni biologiche. Per poter avere effetti biologici ad ampio raggio, uno ione metallico deve essere in grado di interagire con ligandi come proteine, lipidi e carboidrati e più precisamente deve essere in grado di legarsi ai centri reattivi delle molecole. Al contrario di Mg^{2+} e Zn^{2+} che hanno una grande affinità di legame per i gruppi nitrogeni, il Ca^{2+} ha la sua massima affinità per l'ossigeno del gruppo carbossilico; gli aminoacidi contenenti il gruppo COO^- (acido aspartico e acido glutammico) sono più frequenti nello scheletro delle proteine rispetto a quelli che hanno il gruppo nitrogeno (asparagina, istidina e glutammina), ciò rende il calcio migliore degli altri due cationi (Ochiai, 1991). Nell'uomo l'acido glutammico e l'acido aspartico sono presenti in concentrazioni che sono circa l'82% superiori rispetto a quelle di asparagina, istidina e glutammina e, inoltre, sono prevalentemente localizzati nelle proteine coinvolte nella segnalazione cellulare.

Un altro parametro rilevante per un ottimo secondo messaggero è la rapidità della cinetica di legame; come misura di questo parametro si utilizza la velocità di scambio con l'acqua dei complessi acqua-metallo; a 25°C si è stimato che la velocità (espressa in s^{-1}) è 10^8 per il calcio, 2×10^7 per lo zinco e il manganese, 7×10^5 per il magnesio. Dunque, il calcio si lega e si dissocia dalle proteine in maniera circa 100 volte più veloce rispetto al magnesio (Ochiai, 1991).

Il Ca^{2+} ha un numero di coordinazione ionica molto alto (6-8) e una geometria di coordinazione (indotta da proteine) spesso irregolare, dovuta al suo raggio ionico (100-120 pm) e alla sua struttura elettronica (Swain and Amma, 1989; Carugo et al., 1993). Il Cd^{2+} (95 pm) e il Pb^{2+} (119 pm) sono simili al calcio, ma biologicamente inutilizzabili a causa delle loro interazioni con i tiolati (Cys-). Il Mn^{2+} (83 pm) e lo Sr^{2+} (118 pm) sono sostituiti meno tossici del calcio ma sono meno abbondanti del calcio.

Per quanto concerne la stereochimica, il magnesio di preferenza assume una configurazione ottaedrica (Carugo et al., 1993) che è molto rigida e non consente molte interazioni; al contrario il calcio può assumere due configurazioni pentagonali (a bipyramide e trigonale prismatica) che consentono allo ione di interagire con vari siti di legame.

La geometria irregolare e l'alto numero di coordinazione mettono il calcio in vantaggio rispetto agli altri ioni anche nel formare legami incrociati. Al contrario dei ponti disolfuro e del legame zucchero-peptide che sono irreversibili, il cross-linking mediato da calcio è reversibile e quindi in grado di rispondere ai cambiamenti dello stato di riposo della cellula.

1.5.5 METODI DI MISURA DEL CALCIO INTRACELLULARE

Il calcio agisce come secondo messaggero in una grande varietà di cellule. Quasi duecento anni fa Ringer e i suoi collaboratori dimostrarono che il calcio era essenziale per la contrazione della muscolatura cardiaca della rana. Nel 1940 venne scoperto che iniettando calcio in una fibra muscolare questa si contraeva, ma il fenomeno non si ripeteva se venivano iniettati magnesio, potassio e sodio; negli anni '60 Ebashi e Lipmann scoprirono i siti di accumulo intracellulari e il reticolo sarcoplasmatico nelle fibre muscolari e successivamente chiarirono l'esatto meccanismo della contrazione muscolare e il ruolo della troponina. Più recenti sono stati invece gli studi che hanno messo in relazione il calcio con varie funzioni cellulari (Kretsinger, 1976; Kakiuchi et al., 1981). La prima misurazione veritiera sulla concentrazione intracellulare di calcio è stata effettuata da Ridgeway e Ashley iniettando la fotoproteina equorina nella fibra muscolare. Soltanto a partire dagli anni '80, Tsien e collaboratori iniziarono a produrre un'ampia gamma di marcatori fluorescenti per il calcio che, di conseguenza, hanno portato allo sviluppo di molti metodi per la determinazione della concentrazione del calcio intracellulare.

Con l'avvento della microscopia confocale e multifotonica, in aggiunta alle misurazioni della concentrazione, si è reso possibile effettuare l'analisi spaziale e temporale dell'attività del calcio a livello subcellulare; questo è dovuto soprattutto al fatto che la fluorescenza emessa

rilevata dal microscopio confocale e multifotonico è limitata ad uno specifico piano focale (Berridge et al., 1997; Lipp et al., 1997).

1.5.5.1 Indicatori chimici fluorescenti

Gli indicatori maggiormente utilizzati sono le sonde di natura chimica poiché, in generale, il loro segnale è in grado di visualizzare anche piccole variazioni nella concentrazione intracellulare del calcio. Sono stati prodotti diversi indicatori fluorescenti, ognuno adatto ad una tecnica. In genere, gli indicatori possono essere suddivisi in più classi in base a differenti criteri; uno dei metodi di suddivisione consiste nel dividere le sonde in raziometriche e non raziometriche (una singola lunghezza d'onda): i primi includono indo1 e fura2, mentre gli altri fluo3 e rhod2. Un altro importante criterio per la suddivisione in categorie è lo spettro di eccitazione/emissione; gli indicatori del calcio, secondo la loro emissione, possono essere suddivisi in quattro gruppi:

- 1) gruppo che emette nel blu: quin2, indo1, benzothiazia e fura2
- 2) gruppo che emette nel verde: fura2, BTC, fluo3, calcium green, Oregon green, BAPTA
- 3) gruppo che emette nel giallo-arancio: calcium orange, calcium crimson, rhod2
- 4) gruppo che emette nel rosso e vicino all'infrarosso: calcium crimson e fura red.

Tra le più importanti considerazioni che vanno fatte per scegliere l'indicatore ci sono: il conoscere l'affinità di legame per il Ca^{2+} che si rifletta sulla sua costante di dissociazione, e la scelta della giusta forma chimica (acido, estere, ecc.)

I primi indicatori chimici fluorescenti utilizzati sono stati quelli eccitabili con gli ultravioletti, i loro svantaggi stavano nel fatto che non solo gli ultravioletti hanno effetto citotossico ma anche alcuni organelli, stimolati con gli UV, emettono spontaneamente fluorescenza e contaminano i risultati.

Gli indicatori eccitabili nel visibile hanno alcuni vantaggi rispetto ai precedenti: innanzitutto la loro emissione cade in regioni dello spettro elettromagnetico in cui il background e l'autofluorescenza cellulare è quasi del tutto assente, poi la citotossicità è molto minore.

1.5.5.2 Indicatori bioluminescenti

La bioluminescenza è la produzione di luce da organismi biologici; tra questi indicatori ci sono le fotoproteine che legano il calcio come l'equorina, l'obelina, la mitocromina e la clytina. Poiché queste fotoproteine emettono nel visibile, non sono necessari strumenti complessi per l'analisi dell'emissione; il problema maggiore, invece, sta nel fatto che sono poco sensibili ai minimi cambiamenti.

Le green fluorescent proteins (GFP) sono proteine fotosensibili che vengono sintetizzate dalla medusa *Aequorea victoria*; queste proteine assorbono nel blu e danno una fluorescenza verde; per le loro capacità le GFP vengono spesso usate nello studio dell'espressione genica e nella localizzazione proteica.

1.6 BIOLOGIA DELLA SPECIE *Dicentrarchus labrax*

La spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Linnaeus, 1758), nota anche come branzino o “ragno” di mare, è un Teleosteo appartenente all’ordine dei Perciformi, Famiglia Percichthyidae. Essa può arrivare a raggiungere la lunghezza di un metro, è di colore grigio-argento con dorso grigio verdastro portante due pinne dorsali, di cui la prima ha raggi spiniformi (Fig 7)

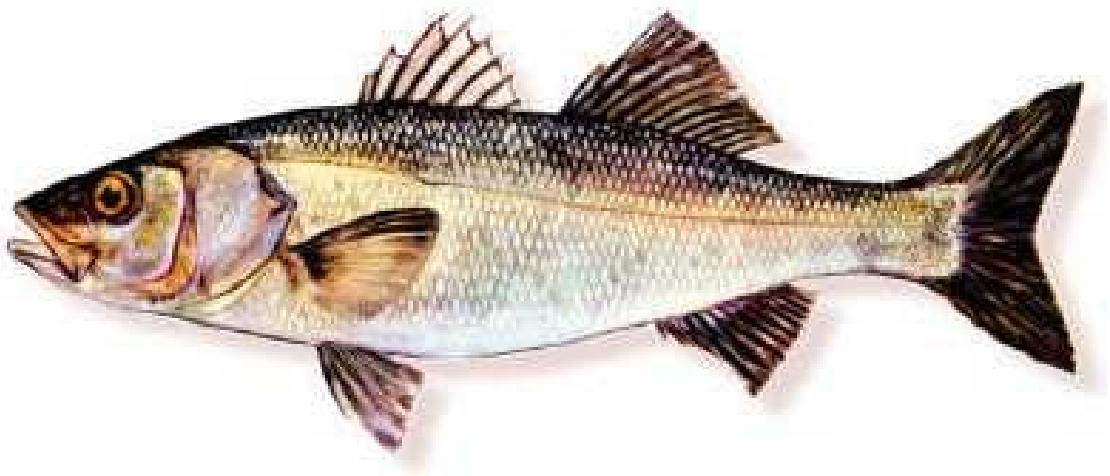


Fig 7: caratteristiche morfologiche della spigola

Comune nel Mediterraneo e nel Mar Nero, il suo areale si estende dalle coste atlantiche del Senegal fino alla Norvegia (Fig 8)

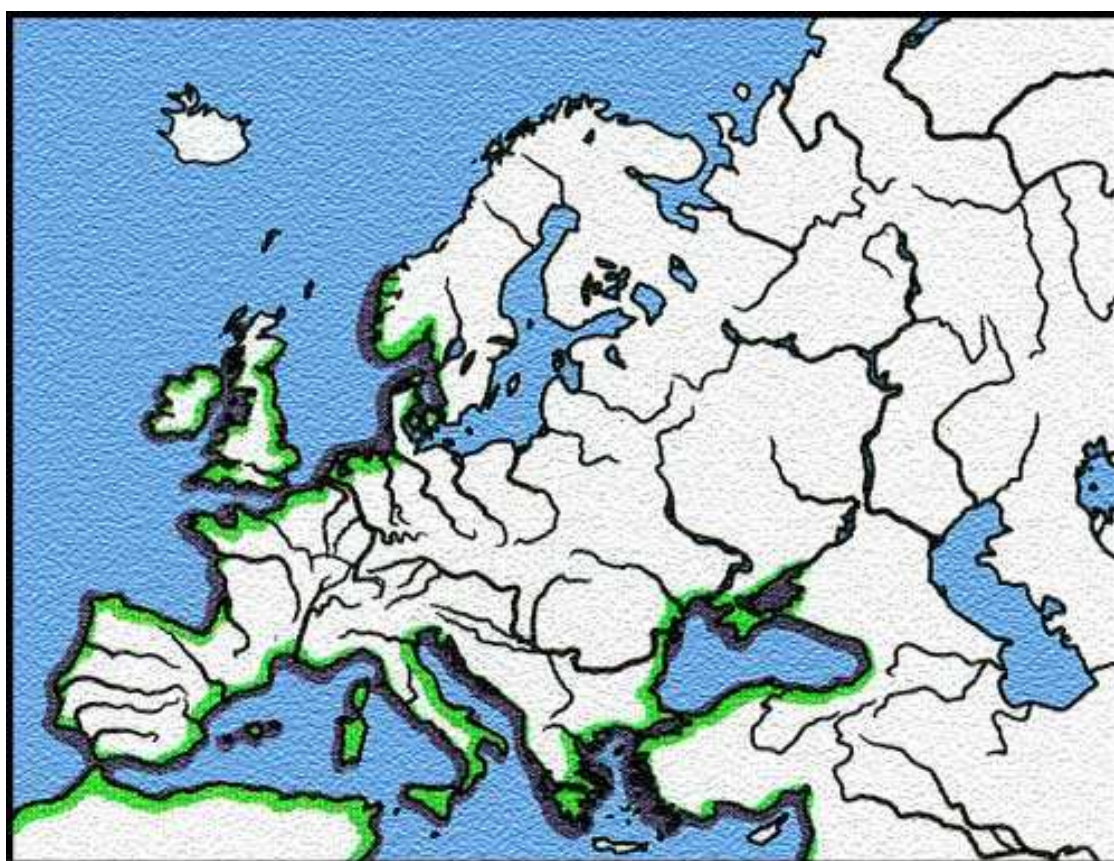


Fig 8: localizzazione geografica della specie *Dicentrarchus labrax*

Essendo una specie eurialina, cioè in grado di sopportare cambiamenti di salinità e sbalzi termici, la spigola si può riscontrare in acque dolci, salmastre, marine e ipersaline fino al 9%; la salinità minima sopportata è pari allo 0.05%.

Gregaria in fase giovanile, diviene solitaria da adulta. Gli adulti sono predatori voracissimi, soprattutto di pesci, crostacei ed anellidi. Gli ambienti lagunari e di foce rappresentano l'habitat ideale per gli stadi larvali, con una successiva migrazione degli avannotti verso l'interno a fini alimentari. La rimonta inizia a marzo con picchi in aprile-maggio; lungo le coste toscane, i movimenti avvengono nelle ore crepuscolari e con temperature superiori a 15-16°C. Soprattutto a causa delle variazioni di temperatura, questa specie effettua altre migrazioni: durante la stagione invernale essa popola le acque nord-mediterranee (5-6°C), mentre in estate si riscontra nelle acque sud-mediterranee (27°C).

La spigola è gonocorica e il raggiungimento della maturità sessuale dipende più dalla taglia che dall'età. Il dimorfismo sessuale è poco pronunciato: le differenze tra i due sessi risiedono unicamente nel fatto che le femmine presentano dimensioni leggermente maggiori e una

forma della testa più appuntita. La spigola si riproduce in inverno, da dicembre a marzo, e le uova vengono generalmente deposte ad una profondità di 10 metri; uova e spermatozoi vengono rilasciati in acqua e la fecondazione è esterna. Le uova sono trasparenti e, poiché hanno un peso specifico minore dell'acqua, galleggiano. La temperatura dell'acqua è il fattore che maggiormente influenza lo sviluppo e la crescita delle larve: le uova devono essere incubate ad una temperatura di 13°C e l'allevamento avviene a 15°C (Bernabè et al., 1976).

La schiusa dell'uovo avviene grazie all'azione di un enzima, secreto dalle ghiandole situate nella testa dell'embrione, che va a rompere il corion (Hagenmaier, 1974). Dopo la schiusa si ha il periodo di sviluppo post-natale nel quale possono distinguersi ben quattro fasi. La prima fase, da 1 a 5 giorni post-schiusa (P.S.), è detta pre-larvale: la pre-larva manca di apertura orale e si nutre assorbendo il sacco del tuorlo. La seconda fase, dal 5° al 34° giorno P.S., corrisponde alla fase larvale: la larva ha un'apertura orale e iniziano a formarsi le pinne pettorali; le larve si posizionano, immobili, con la testa rivolta verso il basso. Termina il processo di pigmentazione dell'occhio e dal 10° giorno l'attività si alterna a fasi di immobilità. Dal 12° giorno l'attività alimentare è completamente stabilita. La terza fase, o fase di avannotto, va dal 35° all'85° giorno P.S.: durante questo stadio si completa il differenziamento di tutte le strutture anatomiche e morfologiche. La quarta fase è quella giovanile, in cui il giovane differisce dall'adulto essenzialmente per le sue dimensioni. La fase adulta inizia al raggiungimento della maturità sessuale, che nelle femmine corrisponde al raggiungimento di una taglia di 30-40cm.

1.7 BIOLOGIA DELLA SPECIE *Oncorhynchus mykiss*

La trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum, 1792) è un Telesoteo appartenente alla famiglia dei Salmonidi, ordine Salmoniformi. Essa ha un corpo fusiforme, slanciato e leggermente compresso lateralmente; la trota iridea è un pesce di taglia medio-grande che raggiunge una lunghezza di circa 30-35 cm. Il peduncolo caudale è robusto e la coda omocerca è leggermente forcata con il margine posteriore leggermente concavo. La testa è conica con un muso generalmente ottuso, la bocca è ben sviluppata, ha posizione terminale ed è leggermente obliqua verso l'alto. Il mascellare si estende all'indietro fino a raggiungere il margine posteriore dell'occhio o poco più. Il dorso presenta due pinne: la prima spiniforme e la seconda è adiposa. La livrea della trota iridea è punteggiata da macchioline scure che si estendono dal muso fino alla coda. Ha riflessi multicolori con predominio di verde, viola e azzurro; il dorso generalmente è verde bruno scuro mentre il ventre ha una colorazione grigiasta, l'opercolo, invece, ha riflessi metallici roseo-violacei. Dall'opercolo al peduncolo caudale si osserva una fascia più o meno alta, estesa, di tonalità rosata o purpurea, che diviene più intensa nel periodo riproduttivo. L'intensità della livrea può cambiare in relazione all'ambiente e allo stato fisiologico del soggetto. Tutto il corpo è rivestito da squame cicloidali, piccole e profondamente infisse nel derma. (Fig. 9)

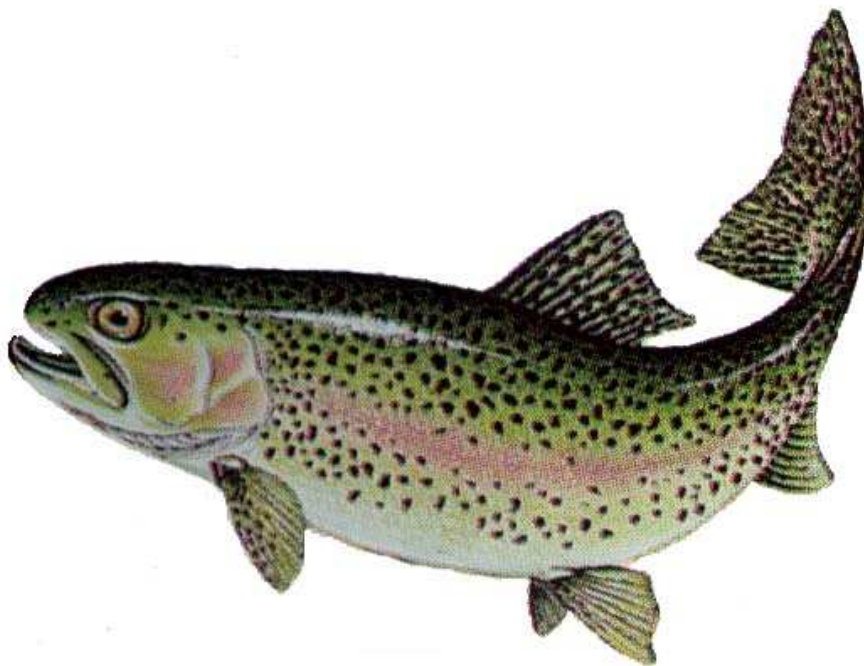


Fig. 9: caratteristiche morfologiche della trota iridea

La trota iridea è un salmonide d'origine nord americana, in Italia quindi la specie è alloctona e vi è stata introdotta verso il 1880; le prime introduzioni avvennero nei laghi del Moncenisio, di Lys, di Verney e della Venezia Giulia, ora si trova presente in quasi tutto il territorio. (Fig. 10)

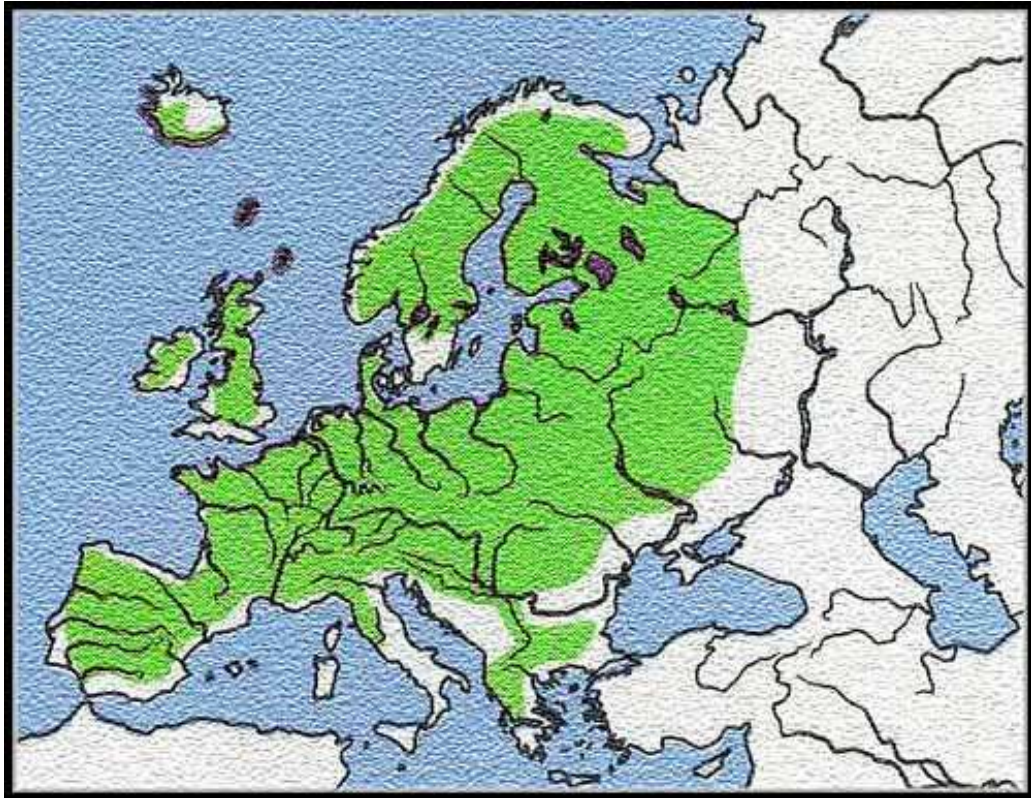


Fig 10: localizzazione geografica della specie *Oncorhynchus mykiss*

In Italia e in Europa vive in acque limpide ricche di ossigeno e riesce a resistere a temperature fino a 20°C; vive bene nei grandi fiumi montani e di pianura che abbiano acque correnti e pure, ma si adatta anche ai grandi laghi di montagna e ai laghi di pianura. La resistenza di questo salmonide ai bassi tenori di ossigeno è notevole.

Rispetto alle altre trote, l'iridea ha un atteggiamento meno pigro e sospettoso, si getta con maggiore voracità sulle esche e si sposta con maggiore facilità dal suo rifugio per andare a caccia. La dieta della trota iridea si compone principalmente di organismi bentonici, ma si nutre anche di insetti alati, larve, vermi, uova di pesci e avannotti.

La maturità sessuale viene raggiunta in 2-3 anni. Nel nord america, dove è originaria, la trota iridea si riproduce principalmente in primavera; in ogni caso, la maturazione dei gameti può oscillare, nei diversi ceppi, tra ottobre e maggio. In Europa e in Italia, in ambiente libero le iridee raramente riescono a riprodursi e la gran parte dei soggetti presenti nelle acque proviene da allevamenti. Ogni femmina emette da 1600 a 2000 uova circa per chilogrammo di

peso. Le uova sono di colore variabile dal rosa all'arancione, hanno un diametro di circa 3-5 mm, ed hanno un periodo di incubazione che varia, a seconda della temperatura, da trenta a sessanta giorni. All'inseminazione delle uova, rilasciate in una buca scavata dalla femmina, partecipano generalmente due maschi, uno più piccolo e uno più grande della femmina. Gli avannotti crescono velocemente: nel 1° anno raggiungono i 10-15 cm, nel 2° 20-25 cm e nel 3° 30-35 cm.

Materiali e Metodi

MATERIALI E METODI

2.1 LEUCOCITI

Le spigole utilizzate per il lavoro descritto in questa tesi di dottorato sono state ottenute dall'impianto "Nuova Azzurro" di Civitavecchia (RM), e le trote iridee sono state fornite dal "Pesca Club Albatros" di Cura di Vetralla (VT); tutti i pesci prima di venire sacrificati, sono stati anestetizzati con una soluzione acquosa contenente 1 mg/ml di tricaina metasulfonato (Sigma).

Tutte le soluzioni utilizzate sono state in precedenza portate ad osmolarità (355 mOsm/kg per la spigola, 310 mOsm/kg per la trota iridea e 300 mOsm/Kg per l'uomo) con 0.15M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 e 8 mM Na_2HPO_4 a pH 7.4 (PBS).

Il sangue da cui si sono ottenuti i PBL (leucociti di sangue periferico) non è stato fatto coagulare; esso è stato prelevato dalla vena caudale con una siringa contenente 3 ml di una soluzione costituita da 0.7 mg/ml di eparina (Sigma) disciolta in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free. Il sangue, poi, è stato ulteriormente diluito in HBSS e la soluzione ottenuta è stata caricata su un gradiente discontinuo di Percoll (Pharmacia, AB, Uppsala, Svezia) a densità 46% e 40% e, infine, centrifugato senza freno a 2000 giri per 30 minuti. Le cellule presenti all'interfaccia sono state raccolte, lavate in HBSS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free + eparina, centrifugate a 1800 giri per 10 minuti e risospese in 5 ml di terreno L-15 (Gibco) contenente il 10% di FCS inattivato da calore (Gibco) e penicillina/streptomycin (Sigma).

I PBMC (cellule mononucleate di sangue periferico umano) sono stati ottenuti da donatori sani attraverso la locale banca del sangue e sono stati purificati stratificando 5 ml di sangue totale diluito in 20 ml di soluzione fisiologica (PBS) su un gradiente di Ficoll seguendo i protocolli standard (Gibson et al., 1991).

Le branchie, la milza, il rene cefalico, il timo e l'intestino sono stati prelevati da pesci appena deceduti, per evitare l'insorgere dei processi di necrosi, e messi in una soluzione di HBSS eparina 1X ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free) a 4°C. Le cellule di tali organi sono state ottenute dopo frammentazione (teasing) dell'organo stesso, effettuata usando un pestello e un filtro di nylon da 100 μm , e lavando il campione con HBSS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free + eparina. Successivamente, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1800 giri per 10 minuti a 4°C ed i pellet sono stati

dapprima risospesi in 4 ml di HBSS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free + eparina, poi nuovamente centrifugati senza freno a 2000 giri per 30 minuti a 4°C, dopo essere stati caricati su un gradiente discontinuo di Percoll a densità 1.07 e 1.02 g/cm³. Le cellule presenti all'interfaccia sono state lavate in HBSS, centrifugate a 1800 giri per 10 minuti a 4°C e risospese in 5 ml di L-15.

Prima di poter essere utilizzate, le cellule ottenute dai vari organi e dal sangue sono state contate al microscopio utilizzando un emocitometro di Neubauer con 0.2% di Tripan blu (Gibco), allo scopo di determinare la vitalità cellulare.

2.2 PRODUZIONE E PURIFICAZIONE DELL'IL-1 β RICOMBINANTE

I geni dell'interleuchina-1 β di spigola (Fig 11a) e di trota (Fig 11b) sono stati caratterizzati (Zou et al., 1999; Scapigliati et al., 2001) ed espressi (Hong et al., 2001; Buonocore et al., 2004) in *Escherichia coli* dopo clonaggio nel vettore pQE30 (Qiagen), come descritto in lavori precedenti. I peptidi ricombinanti di entrambe le specie contengono un tag di sei istidine all'estremità N-terminale, e il processo di purificazione avviene sfruttando la presenza di questo tag mediante cromatografia di affinità, effettuata con il kit Ni-NTA spin columns (Qiagen). Il grado di purezza dell'IL-1 β ricombinante è stato determinato mediante un SDS-PAGE al 10% di acrilammide, mentre i livelli di LPS nella preparazione proteica, per assicurarsi che la preparazione non fosse stata contaminata da endotossine, sono stati determinati con un *Limulus* Amebocyte Lysate Kit (LAL test, Bio Whittaker). L'attività biologica dell'interleuchina-1 β ricombinante è stata valutata mediante un saggio di proliferazione della linea cellulare murina D10.G4.1, come descritto in lavori precedenti (Hong et al., 2001; Buonocore et al., 2004).

L'interleuchina umana (Fig. 11c) è stata ottenuta dalla Peprotech (Peprotech Europe, UK).

Tutte le interleuchine sono state aliquotate in terreno L-15 contenente l'1% di FCS e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

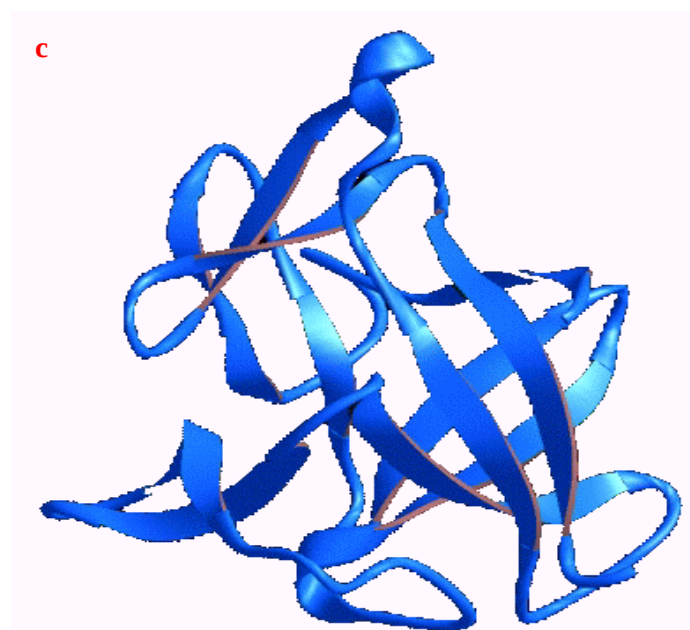
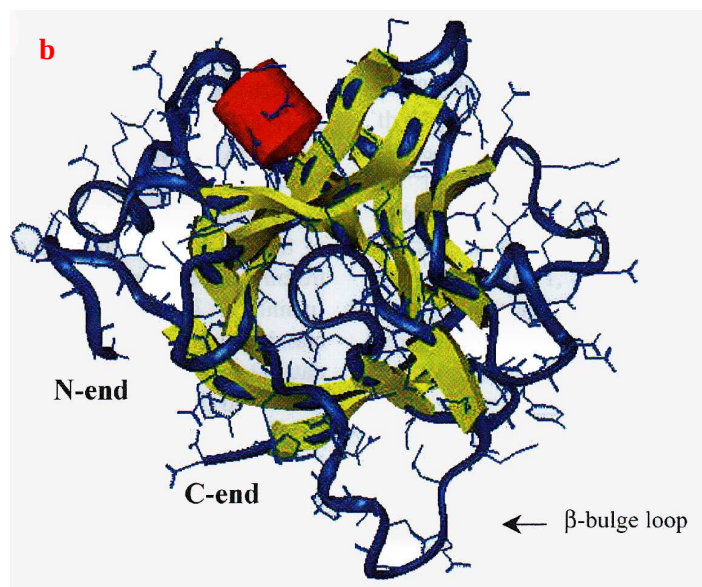
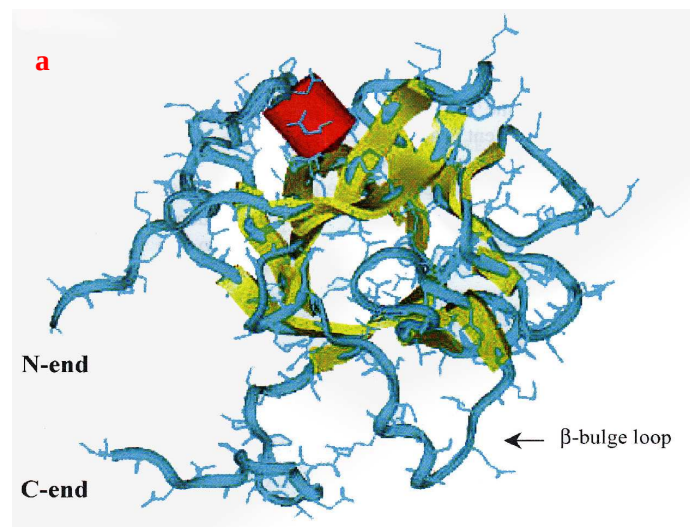


Fig. 11: struttura tridimensionale dell'interleuchina di spigola (a), trota (b), uomo (c)

2.3 MISURA DEL Ca^{2+} INTRACELLULARE DOPO STIMOLAZIONE CON rIL-1 β

I leucociti e i PBMC sono stati lavati due volte con terreno L-15 senza FCS a 1800 giri per 10 minuti a 18°C, risospesi ad una concentrazione pari a 2×10^7 cellule/ml nello stesso terreno, infine incubati con il fluorocromo Fura-2AM (Sigma) (Fig. 12) ad una concentrazione finale di 4 μM per 45 minuti a 18°C; questo fluorocromo è in grado di penetrare nella cellula attraverso la membrana e di legarsi agli ioni calcio rendendoli visibili nel campo della fluorescenza.

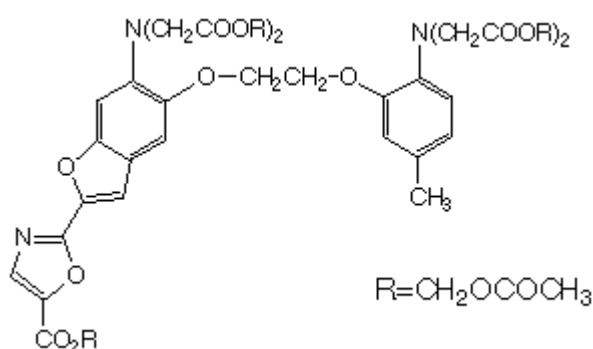


Fig 12: formula chimica del Fura-2AM

Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate due volte a 1800 giri per 10 minuti a 18°C con terreno RPMI (Sigma) senza FCS e senza rosso fenolo, risospesi nello stesso terreno ad una concentrazione di 10^7 cell/ml e piastrati (10^6 cell/pozzetto) in duplicato (100 μl /pozzetto) in piastre per fluorimetria da 96 pozzetti (Isoplate TC PerkinElmer). Ad ogni pozzetto è stato aggiunto 1 μl di interleuchina-1 β diluita a differenti concentrazioni (200, 70, 20, 7, 2 ng/ml); come controllo positivo è stata utilizzata la ionomicina (Sigma) (Fig. 13) ad una concentrazione finale di 5 μM ; i controlli negativi effettuati, invece, sono stati due: in un caso alle cellule è stato aggiunto 1 μl del buffer di eluizione dell'interleuchina-1 β (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 250 mM imidazolo, 0.05% Tween 20, pH 8.0), nell'altro caso le cellule sono state stimulate con l'interleuchina-1 β ricombinante (200 ng/ml) denaturata dopo un'esposizione a 100°C per 2 minuti.

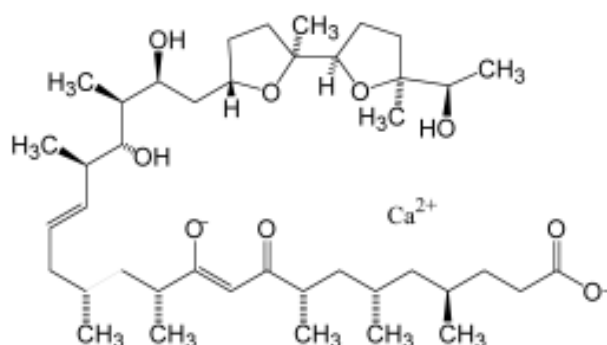


Fig 13: formula chimica della ionomicina

Per verificare se l'aumento della concentrazione del calcio intracellulare fosse dovuto alla liberazione dello ione dai compartimenti intracellulari o all'entrata, all'interno della cellula, del Ca^{2+} contenuto nel terreno di coltura, 2 mM di acido etilendiamminico tetraacetico (EDTA) sono stati aggiunti ai campioni sia stimolati che di controllo prima della stimolazione con l'IL-1 β .

La fluorescenza emessa dai leucociti è stata letta per 5 minuti dalla stimolazione con intervalli di 1 minuto mediante un fluorimetro a doppia emissione di fluorescenza (Victor II, Wallac, USA) (Fig 14), che stimola le cellule simultaneamente con l'emissione di due lunghezze d'onda, corrispondenti a 355 e 450 nm, per 0.1 secondi; i valori di fluorescenza registrati dallo strumento vengono espressi in RFU (unità di fluorescenza relativa).



Fig. 14: 1420 Victor II-Wallac

2.4 TEST DI SPECIE-SPECIFICITÀ

Un test di specie-specificità è stato effettuato per verificare la risposta dei leucociti di ciascuna specie alle interleuchine delle altre specie; a tale scopo i leucociti di spigola, trota e i PMBC purificati e marcati con il Fura-2AM, come descritto in precedenza, sono stati stimolati sia con la propria interleuchina che con quella delle altre specie (200 ng/ml). La lettura delle RFU è stata effettuata come descritto precedentemente.

2.5 TRATTAMENTO CON TRIPSINA

2×10^7 leucociti/ml sono stati marcati con $4 \mu\text{M}$ di Fura-2AM, come descritto in precedenza, e lavati due volte a 1800 giri per 10 minuti a 4°C con RPMI senza FCS e rosso fenolo. I leucociti sono stati suddivisi in aliquote da 4.5×10^6 cellule in $200 \mu\text{l}$ dello stesso terreno utilizzato per i lavaggi e ad ogni aliquota sono stati aggiunti $200 \mu\text{l}$ di tripsina-EDTA (Gibco) a diluizioni da 1:2 a 1:40000 in RPMI senza FCS e rosso fenolo. Dopo 1 minuto ad ogni sospensione cellulare sono stati aggiunti $50 \mu\text{l}$ di FCS con lo scopo di bloccare l'attività proteolitica della tripsina, i leucociti sono stati lavati a 1000 giri per 3 minuti in RPMI senza FCS e rosso fenolo, risospesi nello stesso terreno e stimolati con 200 ng/ml di rIL- 1β . La fluorescenza emessa è stata letta nel modo descritto precedentemente.

2.6 PURIFICAZIONE PER SORTING MAGNETICO

5×10^7 splenociti sono stati centrifugati a 1800 giri per 10 minuti a 4°C , il sopranatante è stato rimosso e il pellet è stato risospeso nell'anticorpo DLIg3 per selezionare le cellule B. Uno stesso numero di splenociti è stato trattato come in precedenza, ma risospeso nell'anticorpo DLT15 con lo scopo di selezionare le cellule T. Entrambi i gruppi sono stati incubati con il rispettivo anticorpo per 45 minuti in ghiaccio. Trascorso questo tempo, gli

splenociti sono stati nuovamente centrifugati a 1800 giri per 10 minuti a 4°C e risospesi in 150 µl di L-15 osmolare senza FCS; a questa sospensione cellulare è stata aggiunta una soluzione contenente l'anticorpo monoclonale GAM-Fe²⁺ (30 µl di anticorpo in 100 µl di L-15) (Milteniy Biotech, Germany) per 20 minuti, mantenendo le cellule in ghiaccio e al buio. Durante il tempo di incubazione, è stata preparata la colonnina per il sorting (Fig. 15), attaccandola al magnete e lavandola più volte con soluzione fisiologica; trascorsi i 20 minuti, un campione alla volta è stato caricato sulla colonnina, le prime cellule ad uscire sono state quelle Ab- (cioè le non-B o le non-T a seconda dell'anticorpo primario utilizzato per la selezione). A campione completamente defluito, è stato aggiunto qualche ml di PBS osmolare, che è stato raccolto finché la goccia uscita dalla colonnina non diventava incolore; a questo punto la colonna è stata staccata dal magnete, è stato aggiunto 1 ml di PBS osmolare e le cellule Ab+ sono state staccate aiutandosi con un pistoncino. La purezza delle cellule raccolte con il sorting è stata valutata mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando gli anticorpi monoclonali DLlg3 e DLT15 e come secondario l'anticorpo GAM-FITC (ICNBiomedicals Inc., Aurora, Ohio, U.S.A.). Le cellule B, non-B, T e non-T ottenute sono state risospese in 5ml di terreno L-15, marcate con il Fura-2AM e stimulate con l'interleuchina-1β come descritto in precedenza.

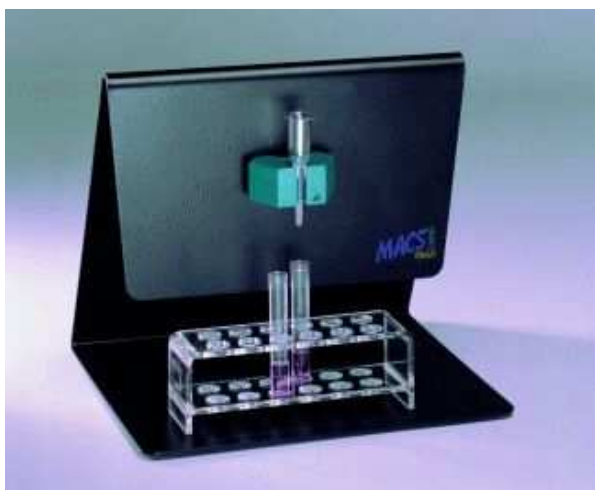


Fig 15: sistema miniMacs Milteniy Biotech

2.7 CROSS-LINKING

2×10^8 splenociti di spigola sono stati risospesi in 5 ml di terreno L-15 contenente lo 0.1% di sodio azide, stimolati con 200 ng/ml di interleuchina-1 β per 90 minuti in ghiaccio, lavati in PBS freddo e risospesi in 0.5 ml di PBS osmolare. Alla sospensione cellulare sono stati, poi, aggiunti 7 μ l di una soluzione, preparata all'istante, di disuccimidil suberato (DSS, Pierce, USA) in DMSO ad una concentrazione pari a 50 mg/ml; il DSS, che non è stato aggiunto ai campioni di controllo, è stato lasciato nella sospensione cellulare per un'ora in ghiaccio con agitazione frequente. Gli splenociti sono stati, quindi, centrifugati a 1800 giri per 10 minuti a 4°C, lavati con PBS e poi risospesi in 50 μ l di Laemmli sample buffer (LSB). Gli splenociti denaturati sono stati centrifugati a 25000 giri per 5 minuti e il sopranatante è stato risolto su un SDS-PAGE al 12% di acrilammide; il gel, infine, è stato trasferito su nitrocellulosa (BA85 Schleicher & Schuell, Germany) a 100mA per 90 min.

Il Western blotting è stato effettuato incubando a temperatura ambiente per un'ora la nitrocellulosa, precedentemente saturata con BSA, con un anticorpo Anti-His coniugato con perossidasi (HRP) (Qiagen), in grado di riconoscere e marcare il gruppo di istidine situato nella porzione N-terminale dell'IL-1 β , diluito 1:1500 in blocking buffer (3% BSA in PBS). La nitrocellulosa è stata lavata due volte con PBS e i polipeptidi legati all'interleuchina sono stati visualizzati con 4-Cl-1-naftolo (Serva).

2.8 WESTERN BLOTTING

5×10^7 splenociti di spigola e trota iridea in L-15 senza FCS sono stati stimolati con 200 ng/ml di IL-1 β , e aliquote da 5×10^6 cellule sono state rimosse dopo 1, 5, 10 e 20 minuti; un'aliquota era stata prelevata prima della stimolazione in modo tale da poterla usare come controllo. Gli splenociti sono stati centrifugati a 1800 giri per 3 minuti, risospesi in 50 μ l di soluzione di lisi (PBS contenente 0.5 M PMSF, 0.5% Triton X-100), e messi in ghiaccio per 15 minuti. Dopo una vigorosa agitazione, il lisato cellulare è stato centrifugato a 2000 giri per 5 minuti e il sopranatante è stato denaturato con 15 μ l di LSB 4X senza bollitura.

Il lisato cellulare (20 µl per ogni corsia) è stato caricato su un gel al 12% di acrilammide, poi blottato su nitrocellulosa come descritto in precedenza. Le proteine fosforilate sui residui di tirosina sono state evidenziate incubando la nitrocellulosa, precedentemente saturata con BSA, con l'anticorpo monoclonale anti-fosfotirosina clone 4G10 (Upstate Biotechnology, USA); quelle fosforilate sui residui di serina e treonina, invece, sono state evidenziate con gli anticorpi policlonali antifosfoserina e antifosfotreonina (Upstate Biotechnology, USA). Tutti gli anticorpi sono stati diluiti 1:1000 (1 µg/ml) in T-PBT (PBT + 0.5% Tween-20). La nitrocellulosa è stata, successivamente, incubata o con un anticorpo monoclonale o con un anticorpo policlonale coniugati con perossidasi (GAM-HRP o GAR-HRP) (ICN Biomedicals, USA) e diluiti 1:1500 in T-PBT per 90 minuti a temperatura ambiente. Le bande positive sono state evidenziate mediante ECL (enhanced chemiluminescence) (Amersham Life Science, Pharmacia) ed esposizione su lastra autoradiografica.

Come controllo, 5×10^6 splenociti sono stati pre-trattati con 200 µM di genisteina (Fig. 16) (Sigma), un inibitore delle protein-chinasi, per 30 minuti a 18°C, poi stimolati con 200 ng/ml di IL-1β ricombinante e processati come descritto in precedenza.

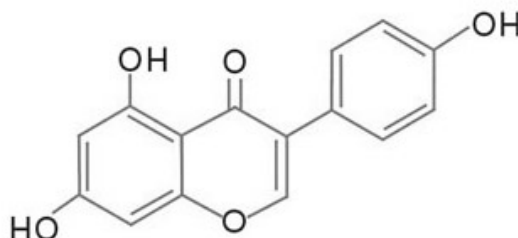


Fig. 16: struttura della genisteina

2.9 MARCATURA METABOLICA

Due gruppi da 5×10^7 splenociti di spigola sono stati lasciati overnight in L-15 + FBS 10% a 18°C, dopodiché sono stati lavati e risospesi in RPMI senza metionina (Sigma) al quale era stata aggiunta L-Metionina in polvere (Sigma) ad una concentrazione pari ad 1/100 (1.5 mg/ml) rispetto alla concentrazione normalmente presente nella composizione di un terreno. Gli splenociti sono stati lasciati in questo mezzo di coltura per 7 ore a 18°C, dopodiché alle

cellule sono stati aggiunti 0.5 mCi/ml (1.85×10^9 Bq) di L-metionina marcata con S^{35} ; le cellule sono state lasciate ad incubare con la metionina radioattiva overnight a 18°C. A questo punto, uno dei due gruppi è stato stimolato con 200 ng/ml di rIL-1 β per 20 minuti, l'altro gruppo, invece, è stato lasciato come controllo; dopo la stimolazione entrambe le sospensioni cellulari sono state lavate per due volte a 1800 giri per 10 minuti con PBS, e, infine, lisate con 60 μ l della soluzione di lisi descritta in precedenza.

2.10 IMMUNOPRECIPITAZIONE CON ANTICORPO ANTI FOSFOTIROSINA (CLONE 4G10)

Sia al campione di controllo che a quello stimolato, ottenuti dal saggio di marcatura metabolica, sono stati aggiunti 40 μ l di PBS e 2 μ l di anticorpo antifosfotirosina clone 4G10, e sono stati lasciati ad incubare overnight a 8°C su un agitatore rotante. Il giorno successivo si è proceduto a ricostituire la proteina A-Sepharose (Amersham Life Science, Pharmacia) in PBS; 50 μ l di proteina A-Sepharose sono state messe in ciascuna delle due eppendorf utilizzate e su ognuna è stato messo un campione (stimolato e controllo); le provette, poi, sono state lasciate per 3 ore a 8°C su un agitatore rotante. Trascorso questo tempo, i campioni sono stati centrifugati a 6000 giri per 5 minuti, il sopranatante è stato raccolto e conservato, e i pellet sono stati dapprima lavati tre volte con 200 μ l di PBS, poi risospesi in 50 μ l di LSB 2X e denaturati mediante esposizione a 100°C per 1 minuto. Pellet e sopranatanti sono stati quindi caricati su un gel al 12% di acrilammide e blottati su nitrocellulosa come descritto precedentemente.

Le proteine di interesse sono state evidenziate mediante esposizione su lastra autoradiografica per 40 ore.

2.11 DIGESTIONE TRIPTICA DELLE PROTEINE IN-GEL

5×10^6 splenociti di spigola, sono stati risospesi in L-15 e stimolati per 20 minuti con 200 ng/ml di rIL-1 β , un uguale numero di splenociti non è stato stimolato ma tenuto come controllo. Gli splenociti, sia stimolati che di controllo, sono stati centrifugati a 1800 giri per 3 minuti, risospesi in 50 μ l della soluzione di lisi descritta precedentemente, e messi in ghiaccio per 15 minuti. Dopo una vigorosa agitazione, il lisato cellulare è stato centrifugato a 2000 giri per 5 minuti e il sopranatante è stato denaturato con 15 μ l di LSB 4X senza bollitura.

Il lisato cellulare (20 μ l per ogni corsia) è stato caricato su un gel al 12% di acrilammide, che è stato dapprima lasciato overnight a colorare in Blue Coomassie colloidale (ammonio solfato, coomassie G250, 0.5% acido acetico, 34% metanolo) precedentemente messo in agitazione a 50°C per 2 ore, infine messo a decolorare in una soluzione acquosa con acido acetico al 5%. Le bande corrispondenti al peso di 24 kDa sono state ritagliate utilizzando un sottile bisturi e soggette a digestione triptica in accordo con il metodo proposto da Shevchenko et al. (1996). I pezzi di gel, posti a 4°C, sono stati lasciati imbibire nel tampone di digestione contenente 50 mM NH_4HCO_3 e 12.5 ng/ μ l di tripsina (modified porcine trypsin, sequencing grade; Promega, Madison, WI, USA). Dopo 30 minuti il sopranatante è stato rimosso e sono stati aggiunti 20 μ l di una soluzione 50 mM di NH_4HCO_3 lasciando i frammenti di gel ad incubare overnight ad una temperatura costante di 37°C. Al termine dell'incubazione è stato recuperato il sopranatante contenente i peptidi triptici; l'estratto, portato a secco centrifugando sotto vuoto, è stato conservato a -20°C fino al momento dell'uso. Prima dell'utilizzo delle miscele peptidiche per le analisi di spettrometria di massa, queste sono state disciolte in 10 μ l di una soluzione contenente il 5% di acido formico.

2.12 SEQUENZIAMENTO DEI PEPTIDI MEDIANTE NANO RP-HPLC-ESI-MS/MS

La miscela peptidica è stata separata utilizzando un autosampler/nanoHPLC LC-Packings (a Dionex Company, Italy). I campioni del volume di 8 μ l sono stati caricati nell'autosampler e concentrati su una colonna commerciale a trappola ionica (Zorbax 300 SB-C18, 5 μ m, 300 μ m I.D. x 5 mm; Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA) ad una velocità di flusso di 10

µl/min. La separazione è stata effettuata con una colonna capillare (Zorbax 300 SB-C18, 3.5 µm, 75 µm I.D. x 10 cm, Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA) a una velocità di flusso di 200 nl/min. Per l'HPLC sono stati utilizzati due solventi: il solvente A contenente lo 0.1% di acido formico e il 2% di acetonitrile (ACN) e il solvente B contenente il 98% di ACN. La colonna è stata pre-equilibrata con il 100% del solvente A; l'eluizione è stata effettuata mediante un gradiente multisegmentato con un primo step dallo 0% al 5% del solvente B in 5 minuti, un secondo step dal 5% al 12% del solvente B in 2 minuti, un terzo dal 12% al 50% del solvente B in 30 minuti e un ultimo passaggio dal 50% al 100% del solvente B in 8 minuti. I peptidi sono stati eluiti direttamente in una trappola ionica Bruker Esquire 3000+ (Bruker-Daltonics, Germany); il voltaggio del capillare è stato mantenuto tra 1.5 e 2 kV, la velocità del flusso del gas è stata impostata su 3 l/min ad una temperatura di 230°C. Lo scan range utilizzato è stato tra 300 e 1800 m/z. L'identificazione delle proteine è stata effettuata mediante ricerca nel National Center of Biotechnology Information non-redundant database (NCBI nr) usando il programma Mascot (<http://www.matrixscience.com>) che, basandosi sull'algoritmo Mowse, tiene conto dell'abbondanza relativa dei peptidi nel database e delle dimensioni della proteina identificata. I seguenti parametri sono stati adottati per la ricerca nel database: completa carbamidometilazione delle cisteine e parziale ossidazione delle metionine, peptide Mass Tolerance ± 1.2 Da, fragment Mass Tolerance ± 0.9 Da, missed cleavages 2. Per l'identificazione sono stati considerati validi i valori con $P < 0.05$.

2.13 “MIXED LEUCOCYTES REACTION” E PRODUZIONE DI TERRENO CONDIZIONATO

Il sangue intero e le cellule di rene cefalico, ottenute dopo teasing, sono state lavate due volte in HBSS eparina, risospese in 8 ml della stessa soluzione e caricate su un gradiente discontinuo di Percoll a densità 1.07 e 1.04 come descritto in precedenza. Le cellule ottenute all'interfaccia dopo aver centrifugato a 2000 giri per 30 minuti a 4°C sono state risospese in 4 ml di L-15 contenente il 5% di FCS e antibiotici ad una concentrazione di 2×10^6 cellule/ml, e incubate a 18°C. 1×10^8 cellule di rene cefalico e 1×10^8 PBL di un pesce donatore sono state risospese in 1 ml di L-15 e aggiunte alle cellule preparate in precedenza. Dopo 24, 48, 72, 96 e 120 h, 1 ml è stato prelevato dalla cultura cellulare, centrifugato a 1800 giri per 10 minuti a

18°C e il sopranatante (terreno condizionato) è stato utilizzato come stimolo da aggiungere (2, 10, 20 µl) alle cellule marcate con il Fura-2AM come precedentemente descritto.

2.14 STIMOLAZIONE DI LEUCOCITI DI SPIGOLA CON NODAVIRUS E *Photobacterium damsela*

I leucociti di PBL, rene cefalico, milza, intestino e branchie ottenuti da spigole trattate con nodavirus e *Photobacterium damsela* (progetto IMAQUANIM) sono stati marcati col Fura-2AM come descritto precedentemente, risospesi ad una concentrazione di 10^7 cell/ml in RPMI senza rosso fenolo e FBS e piastrati (10^6 cell/pozzetto) in duplicato (100 µl/pozzetto) in piastre per fluorimetria da 96 pozzetti (Isoplate TC PerkinElmer). I leucociti ottenuti da esemplari vaccinati con nodavirus sono stati stimolati con 1 µl per pozzetto (1 mg/ml) di sospensione di nodavirus inattivati, mentre quelli ottenuti da pesci vaccinati contro il *Photobacterium damsela* sono stati stimolati aggiungendo 1 µl (1×10^7 batteri/ml) per pozzetto di sospensione batterica.

La fluorescenza emessa dai leucociti è stata letta per 5 minuti dalla stimolazione con intervalli di 1 minuto mediante un fluorimetro a doppia emissione di fluorescenza (Victor II, Wallac, USA), che stimola le cellule simultaneamente con l'emissione di due lunghezze d'onda corrispondenti a 355 e 450 nm; i valori di fluorescenza registrati dallo strumento sono stati espressi in RFU (unità di fluorescenza relativa).

2.15 ANALISI DEI DATI

I valori della media delle RFU riportati rappresentano i numeri sperimentali ottenuti ai quali sono stati sottratti ai rispettivi controlli. Ogni esperimento è stato ripetuto non meno di tre volte. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante un test *t*-Student a due code, e i valori sono stati considerati statisticamente significativi a $P \leq 0.05$.

I dati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.

Risultati

RISULTATI

3.1 DOSE-RISPOSTA

Per la determinazione della giusta concentrazione di rIL-1 β e per verificare se il rilascio di Ca²⁺ fosse dose-dipendente, splenociti di spigola e trota iridea sono stati stimolati con 1 μ l della rispettiva citochina diluita in concentrazioni pari a 200, 70, 20, 7, 2 ng/ml. I risultati mostrati nella figura 17 indicano che il rilascio di Ca²⁺ in seguito a stimolazione è strettamente dose-dipendente. Le due specie danno valori paragonabili di RFU (unità di fluorescenza relativa) a tutte le diluizioni; il valore più elevato si ottiene stimolando con 200 ng/ml, mentre aggiungendo 2 ng/ml ai pozzetti non si ottengono valori statisticamente significativi.

3.2 DIREZIONE DEL FLUSSO DEL Ca²⁺

I leucociti di spigola e trota iridea, messi in un mezzo di cultura contenente 2 mM EDTA, hanno dato valori di RFU paragonabili a quelli ottenuti quando le cellule sono state poste in un terreno privo dell'agente chelante come riportato in tabella:

MEDIUM - EDTA	MEDIUM + EDTA
580 $\pm$ 30	569 $\pm$ 20

I dati indicano che il calcio si muove dai compartimenti intracellulari di accumulo al citoplasma, la presenza o meno dello ione nel mezzo di cultura non influisce nel segnale osservato.

3.3 STIMOLAZIONE DEI LEUCOCITI DI SPIGOLA CON rIL-1 β

La cinetica del rilascio del calcio nei leucociti di spigola, marcati con il fluorocromo Fura-2AM e stimolati con 200 ng/ml di rIL-1 β , è stata analizzata per 5 minuti dopo l'aggiunta dello stimolo ad intervalli di 1 minuto mediante un fluorimetro a doppia emissione di fluorescenza. I leucociti hanno risposto con cinetiche e ampiezza del segnale (espressa in RFU) differenti; nei PBL (fig. 18a) subito dopo la stimolazione si ha il rilascio del Ca²⁺ nel citoplasma, il riassorbimento dello ione avviene, al contrario, molto lentamente: ha inizio dopo 1 minuto dall'aggiunta dello stimolo e termina 5 minuti dopo la stimolazione. I leucociti di rene cefalico (fig. 18b) hanno un rilascio di calcio molto lento, il massimo delle RFU si osserva dopo 3 minuti dall'aggiunta della citochina e tale livello viene mantenuto costante per circa 1 minuto; il riassorbimento avviene velocemente, inizia dopo 4 minuti dalla stimolazione e dura 1 minuto. Nella milza (fig. 19a) si osserva una cinetica ancora differente: subito dopo la stimolazione il calcio viene rilasciato nel citoplasma e raggiunge un plateau che viene mantenuto fino a 2 minuti dopo l'aggiunta dell'IL-1 β ; l'immagazzinamento dello ione nei compartimenti intracellulari avviene molto lentamente e termina dopo 5 minuti. Una cinetica analoga si osserva nei leucociti delle branchie (fig. 19b), l'ampiezza del segnale in questo organo, però, è circa sei volte minore rispetto a quella osservata negli splenociti. I leucociti intraepiteliali (IEL) dell'intestino (fig. 20a) hanno mostrato un andamento di rilascio del calcio simile a quello osservato nei PBL ma con un'ampiezza circa tredici volte maggiore. Il timo, infine, (fig. 20b) presenta un rilascio del calcio piuttosto simile al rene cefalico, ma i valori osservati e l'ampiezza del segnale sono molto più elevati (circa quattro volte) in questo organo.

3.4 STIMOLAZIONE DI SPLENOCITI DI TROTA IRIDEA CON rIL-1 β

Un esperimento del tutto identico a quelli descritti nel paragrafo precedente è stato effettuato con gli splenociti di trota iridea (fig 21). L'aggiunta della citochina provoca un rilascio istantaneo del Ca²⁺ intracellulare; questo resta su valori di RFU pressoché costanti per circa 3 minuti, poi si ha un repentino riassorbimento che termina 4 minuti dopo l'aggiunta dello

stimolo. Dopo 5 minuti dalla stimolazione si osserva un nuovo rilascio del calcio nel citoplasma.

3.5 CONTROLLO DELL'EFFETTO DELL'IL-1 β

Gli splenociti di spigola e trota iridea sono stati stimolati sia con la rispettiva interleuchina-1 β che con il peptide denaturato, con lo scopo di verificare se il rilascio del calcio osservato con gli esperimenti precedenti fosse dovuto soltanto all'aggiunta della citochina nei pozzetti delle piastre. I risultati mostrati nella fig. 22 indicano che l'IL-1 β induce rilascio di Ca²⁺ ma il peptide denaturato non induce alcun flusso dello ione.

3.6 SPECIE-SPECIFICITÀ

Splenociti di spigola e trota iridea e PBMC umani sono stati stimolati sia con la propria IL-1 β che con quella delle altre specie. Nella spigola (fig. 23a) si è osservato che l'interleuchina-1 β di trota e umana inducono un lieve rilascio di calcio, ma i valori ottenuti non sono statisticamente significativi per cui si può affermare che, in questa specie, l'attivazione della via di rilascio del Ca²⁺ da parte della citochina è specie-specifica. Anche nella trota iridea (fig. 23b) si osserva la stessa situazione: il rilascio di calcio avviene solamente se le cellule sono stimulate con l'interleuchina della propria specie. Al contrario, i PBMC (fig. 24) non rispondono alla stimolazione con l'interleuchina, nemmeno quella della propria specie.

3.7 TRATTAMENTO CON TRIPSINA

Gli splenociti di spigola e trota iridea sono stati pre-trattati con tripsina-EDTA per verificare la se la risposta osservata con la stimolazione fosse dovuta al legame ligando-recettore. I grafici rappresentati nelle figure 25 e 26 indicano che, se le cellule vengono sottoposte a trattamento triptico, la loro risposta alla citochina sarà tanto minore quanto minore sarà la diluizione della tripsina. In particolare, se il pre-trattamento è effettuato con una soluzione 1:2 di tripsina i leucociti non rilasciano calcio dopo la stimolazione; invece, se questi vengono trattati con soluzioni di tripsina diluita 1:13000 per la spigola o 1:1400 per la trota iridea, il danno causato al recettore di membrana per la citochina sarà minore e il flusso di calcio risulterà inalterato. Gli esperimenti effettuati hanno portato alla conclusione che il rilascio di calcio dai compartimenti intracellulari è dovuto alla formazione del complesso ligando-recettore.

3.8 STIMOLAZIONE CON rIL-1 β DI SOTTOPOPOLAZIONI LEUCOCITARIE PURIFICATE CON L'ANTICORPO DLT15

La figura 27 mostra i valori di RFU ottenuti in seguito a stimolazione con rIL-1 β delle sottopopolazioni T e non-T purificate mediante l'anticorpo monoclonale DLT15. I dati indicano che le cellule non-T dopo stimolazione rilasciano lentamente il Ca²⁺; il picco della concentrazione citoplasmatica dello ione si ottiene dopo 3 minuti dall'aggiunta della citochina; il riassorbimento, invece, avviene velocemente e termina 5 minuti dopo la stimolazione. Le cellule T rispondono in maniera differente: la formazione del legame citochina-recettore induce la liberazione di tutto il calcio nel citoplasma; questo, poi, viene parzialmente riassorbito e si ha un nuovo rilascio dopo 3 minuti dalla stimolazione.

3.9 STIMOLAZIONE CON rIL-1 β DI SOTTOPOPOLAZIONI LEUCOCITARIE PURIFICATE CON L'ANTICORPO DLIg3

Nella figura 28 sono riportati i dati ottenuti in seguito a stimolazione con rIL-1 β delle sottopopolazioni leucocitarie B e non-B purificate mediante l'anticorpo monoclonale DLIg3. Nelle cellule non-B, analogamente a quanto osservato per le cellule T, il legame della citochina con il suo recettore provoca un rilascio istantaneo di calcio, che viene parzialmente riassorbito per generare un nuovo picco dopo 2 minuti dalla stimolazione. Nelle cellule B, come visto per le cellule non-T, il rilascio di calcio dura fino a 3 minuti dopo l'aggiunta della citochina, dopodiché si ha un rapido e parziale riassorbimento che precede un nuovo picco a 5 minuti dopo la stimolazione.

3.10 CROSS-LINKING

La figura 29a mostra l'SDS-PAGE per l'analisi del cross linking in cui è possibile osservare la corsie dei pesi molecolari, dell'IL-1 β , del lisato cellulare in cui è stato effettuato il crosslinking, e la corsia degli splenociti di controllo. La figura 29b mostra le bande che si ottengono in Western blotting utilizzando l'anticorpo anti 6-His tag: nella seconda corsia è possibile notare la presenza di una banda di circa 84 kDa, che corrisponde alla somma del peso molecolare della citochina e del suo recettore di membrana.

3.11 WESTERN BLOTTING DELLA STIMOLAZIONE CON rIL-1 β DEGLI SPLENOCITI DI *Dicentrarchus labrax*

La figura 30a mostra l'SDS-PAGE ottenuto caricando un lisato di splenociti di spigola; ciascuna lane corrisponde ad un diverso tempo di prelevamento dopo la stimolazione del campione (0, 1, 5, 10, 20 minuti); l'SDS-PAGE indica la presenza di cinque bande principali corrispondenti a 130, 40, 33, 24 e 11 kDa.

La figura 30b è un western blotting effettuato mediante l'anticorpo monoclonale antifosfotirosina clone 4G10; in essa si può vedere la comparsa di una banda di circa 24 kDa nella corsia dei campioni prelevati dopo 5 minuti dalla stimolazione. Il risultato ottenuto, confrontato con gli esperimenti di stimolazione, permette di affermare che la fosforilazione sui residui di tirosina del substrato di 24 kDa avviene quando il Ca²⁺ viene di nuovo immagazzinato nei compartimenti citoplasmatici.

L'immagine 30c è quella di un western blotting effettuato con l'anticorpo policlonale antifosfotreonina; anche in questo caso si può vedere la banda a 24 kDa che compare dopo 5 minuti dalla stimolazione in corrispondenza del riassorbimento del calcio.

Le analisi fatte con l'anticorpo antifosfoserina non hanno mostrato alcuna banda reattiva.

3.12 WESTERN BLOTTING DELLA STIMOLAZIONE CON rIL-1 β DEGLI SPLENOCITI DI *Oncorhynchus mykiss*

L'SDS-PAGE (fig 31a) effettuato con splenociti di trota iridea lisati ha messo in evidenza una parte compresa tra 130 e 33 kDa molto più ricca di bande rispetto alla spigola. L'analisi in Western blotting ha rilevato la fosforilazione sui residui di serina (fig. 31b) di due substrati di 40 e 24 kDa; tale fosforilazione inizia 1 minuto dopo la stimolazione quindi i gruppi fosfato vengono aggiunti alla serina in concomitanza col rilascio di calcio nel citoplasma. Il blotting

effettuato con l'anticorpo antifosfotirosina (fig 31c) ha rivelato la fosforilazione, come per la spigola, del substrato di 24 kDa dopo 5 minuti dalla stimolazione.

Il blotting effettuato con l'anticorpo antifosfotreonina non ha evidenziato bande reattive.

3.13 WESTERN BLOTTING DI SPLENOCITI PRE-TRATTATI CON GENISTEINA

La figura 32 mostra l'SDS-PAGE fatto con splenociti lisati e pretrattati con genisteina, un inibitore delle proteine chinasi; nel gel non si notano più le bande a 24 e 11 kDa. I Western blotting fatti con gli anticorpi antifosfotirosina, antifosfotreonina e antifosfoserina non hanno evidenziato la presenza di bande a 24 e/o 40 kDa.

3.14 IMMUNOPRECIPITAZIONE E ANALISI PROTEOMICA

Nella figura 33 è possibile osservare le autoradiografie dei pellet (33a) e dei sopranatanti (33b) degli splenociti di spigola, sia stimolati con IL-1 β che di controllo, marcati con ³⁵S-Metionina e precipitati con l'anticorpo antifosfotirosina clone 4G10. Nella figura a si può vedere che nei campioni stimolati c'è una minore presenza di bande ad alto peso molecolare rispetto al controllo e quelle a medio e basso peso molecolare sono meno intense; questo dovrebbe indicare che la stimolazione con l'IL-1 β ha soppresso e/o ridotto la sintesi di alcune proteine. Nella figura b, invece, è rappresentata l'autoradiografia del blotting in cui sono stati caricati diversi volumi dei sopranatanti; si può vedere che la proteina di 24 kDa fosforilata sui residui di tirosina è costitutiva, ossia espressa sia nel controllo che negli stimolati, ma in questi ultimi campioni l'espressione è notevolmente aumentata. Un'analisi col programma MASCOT (fig 34) ha mostrato che, in seguito alla stimolazione, si ha l'aumento

dell'espressione di un peptide molto simile alla timidilato chinasi e con sequenze aminoacidiche altamente conservate (Fast-all analysis) (fig. 35).

3.15 STIMOLAZIONE CON TERRENO CONDIZIONATO DA PBL

La figura 36 mostra i grafici ottenuti stimolando gli splenociti di spigola con 2, 10, 20 μ l di terreno condizionato prelevato dopo 24 h dall'inizio della reazione MLR. I grafici mostrano come la cinetica di rilascio e riassorbimento del calcio e l'ampiezza del segnale cambino al variare della concentrazione dello stimolo. Tutte e tre le stimolazioni inducono un rapido rilascio dello ione e un lento riassorbimento, ma mentre stimolando con 2 μ l di terreno condizionato si ha il raggiungimento di un plateau che viene mantenuto fino a 2 minuti dopo la stimolazione, l'aggiunta di 10 e 20 μ l induce il riassorbimento di calcio subito dopo 1 minuto dalla stimolazione. I valori più elevati di RFU si ottengono stimolando con 20 μ l di terreno condizionato.

Nella figura 37 sono rappresentati i grafici ottenuti stimolando gli splenociti con il terreno condizionato prelevato dopo 48 h dalla reazione MLR; ciò che si evince è che le cinetiche osservate in precedenza vengono rispettate ma i valori di RFU sono all'incirca il doppio.

La figura 38, invece, mostra ciò che si ottiene stimolando gli splenociti di spigola con il terreno condizionato prelevato dopo 72 h dalla reazione MLR alle stesse concentrazioni utilizzate in precedenza: anche in questo caso si può notare che le cinetiche del flusso di calcio restano più o meno invariate e i valori di RFU sono paragonabili a quelli ottenuti stimolando col terreno condizionato prelevato dopo 48 h.

3.16 STIMOLAZIONE CON TERRENO CONDIZIONATO OTTENUTO DA RENE CEFALICO

Nella figura 39 sono riportati tre grafici relativi alla stimolazione degli splenociti di spigola con 2, 10 e 20 μ l di terreno condizionato ottenuto in seguito a reazione MLR dei leucociti di rene cefalico e prelevato dopo 24 h dalla reazione stessa. Si osserva che in tutti e tre i casi la stimolazione induce un lento rilascio di calcio, ma stimolando con 2 e 10 μ l si ha, dopo 2 minuti dall'aggiunta del terreno, il raggiungimento di un valore soglia che viene mantenuto per circa 1 minuto. Il riassorbimento del Ca^{2+} , invece, avviene in maniera abbastanza rapida e si conclude nel giro di 1 minuti (dopo 4 minuti dalla stimolazione), ma stimolando con 10 e 20 μ l si può osservare un secondario rilascio di calcio 5 minuti dopo la stimolazione.

Nella figura 40 vengono riportati gli stessi grafici ma ottenuti stimolando con terreno condizionato prelevato dopo 48 h; ciò che appare subito evidente è il cambiamento delle cinetiche: la stimolazione con 2 μ l causa un rapido rilascio di calcio e un lento riassorbimento che termina 3 minuti dopo la stimolazione; un altro picco si innalza dopo 4 minuti e forse si tratta di una risposta secondaria alla stimolazione. La stimolazione con 10 μ l produce un lento rilascio di calcio che termina 2 minuti dopo l'aggiunta dello stimolo e un lento riassorbimento che finisce dopo 5 minuti. La stimolazione con 20 μ l non sembra aver dato risultati significativi.

La figura 41 mostra cosa accade stimolando con terreno condizionato prelevato dopo 72 h, anche in questo caso le cinetiche osservate sono differenti le une dalle altre. Le stimolazioni con 2 e 20 μ l non sembrano aver dato risultati significativi; quella, invece, con 10 μ l induce un lento rilascio di calcio che termina 3 minuti dopo l'aggiunta del terreno condizionato ed un lento riassorbimento che si protrae fino a 5 minuti dalla stimolazione.

Se si stimola con il terreno condizionato prelevato dopo 96h (fig. 42), si può osservare un rilascio di calcio che termina 2 minuti dopo la stimolazione sia nella stimolazione con 2 che con 20 μ l; nel primo caso, però, dopo 3 minuti insorge un nuovo flusso di calcio, mentre nella stimolazione con 20 μ l si ha un lento riassorbimento. 10 μ l di terreno condizionato non producono effetti rilevanti.

La stimolazione con 10 μ l non da risultati significativi nemmeno utilizzando terreno condizionato prelevato dopo 120 h (fig. 43); la stimolazione con 2 μ l, come nel caso

precedente, produce due risposte: una più immediata e veloce che termina dopo 2 minuti dall'aggiunta dello stimolo, e una più lenta. Anche l'aggiunta al pozzetto di 20 µl di terreno condizionato induce due risposte, ma, al contrario della stimolazione con 2 µl, si ha una prima risposta molto lenta e una seconda veloce.

3.17 STIMOLAZIONE CON NODAVIRUS

I grafici della figura 44 mostrano come rispondono alla stimolazione con nodavirus i leucociti, ottenuti da vari organi di spigole esposte a nodavirus e spigole di controllo. Di tutti gli organi esaminati, soltanto rene cefalico, milza e intestino hanno mostrato un'alterazione nelle cinetiche rispetto agli esemplari di controllo; rene cefalico ed intestino hanno una cinetica molto simile, ma nel rene cefalico l'ampiezza della risposta, misurata in RFU, è due volte più grande. Nella milza rilascio e assorbimento del calcio avvengono in maniera più lenta rispetto agli altri organi.

Dopo 30 giorni dalla seconda esposizione al virus (73 giorni dall'inizio) (fig. 45), soltanto gli splenociti danno una risposta significativa alla stimolazione con nodavirus; la cinetica è cambiata rispetto all'analisi fatta nel campionamento precedente, qui, infatti, si può osservare un rilascio immediato di calcio e un lungo riassorbimento che dura per tutti i 5 minuti analizzati.

60 giorni dopo il richiamo (103 giorni dalla vaccinazione) (fig 46 e 47) si ottengono risposte alla stimolazione da milza, PBL, rene cefalico e intestino; nel caso della milza, a questa data di campionamento sembra che la stimolazione induca un minore rilascio di calcio rispetto al controllo.

3.18 STIMOLAZIONE CON *Photobacterium damsela*

I leucociti di esemplari di controllo ed esposti al batterio *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* sono stati stimolati con lo stesso batterio di immunizzazione, ucciso dal calore; soltanto i leucociti ottenuti dall'intestino (fig. 48) hanno dato una risposta significativa in paragone ai dati ottenuti dagli esemplari di controllo. In questo caso, la cinetica tra i vaccinati e i non vaccinati è molto simile ma l'ampiezza della risposta nei vaccinati è molto minore.

La figura 49 mostra i dati ottenuti dopo 30 giorni dalla seconda esposizione al batterio (60 giorni dall'inizio): a questa data si sono ottenuti risultati solamente dai leucociti purificati dalle branchie; ciò che si può osservare è che, mentre nei pesci di controllo la stimolazione con il *Photobacterium damsela* non induce alcun rilascio di calcio, nei pesci trattati l'aggiunta dello stimolo comporta un rilascio di calcio che dura fino a 3 minuti dopo la stimolazione.

Figure

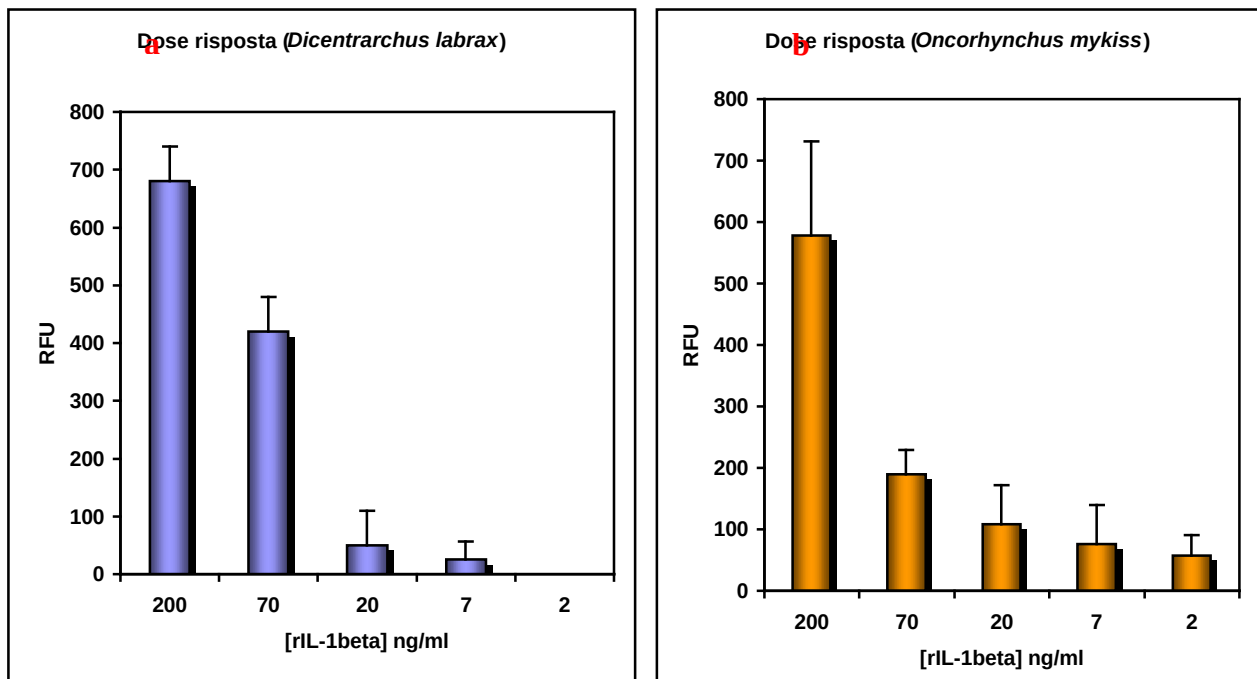


Figura (17):Dose-risposta effettuato su splenociti di spigola e trota iridea per la determinazione della concentrazione di rIL-1 β da utilizzare come stimolo

Il grafico mostra i valori di RFU (unità di fluorescenza relativa) $\pm$ deviazione standard relativi alla stimolazione dei leucociti di milza di spigola (a) e trota iridea (b) con differenti concentrazioni della rispettiva IL-1 β ricombinante.

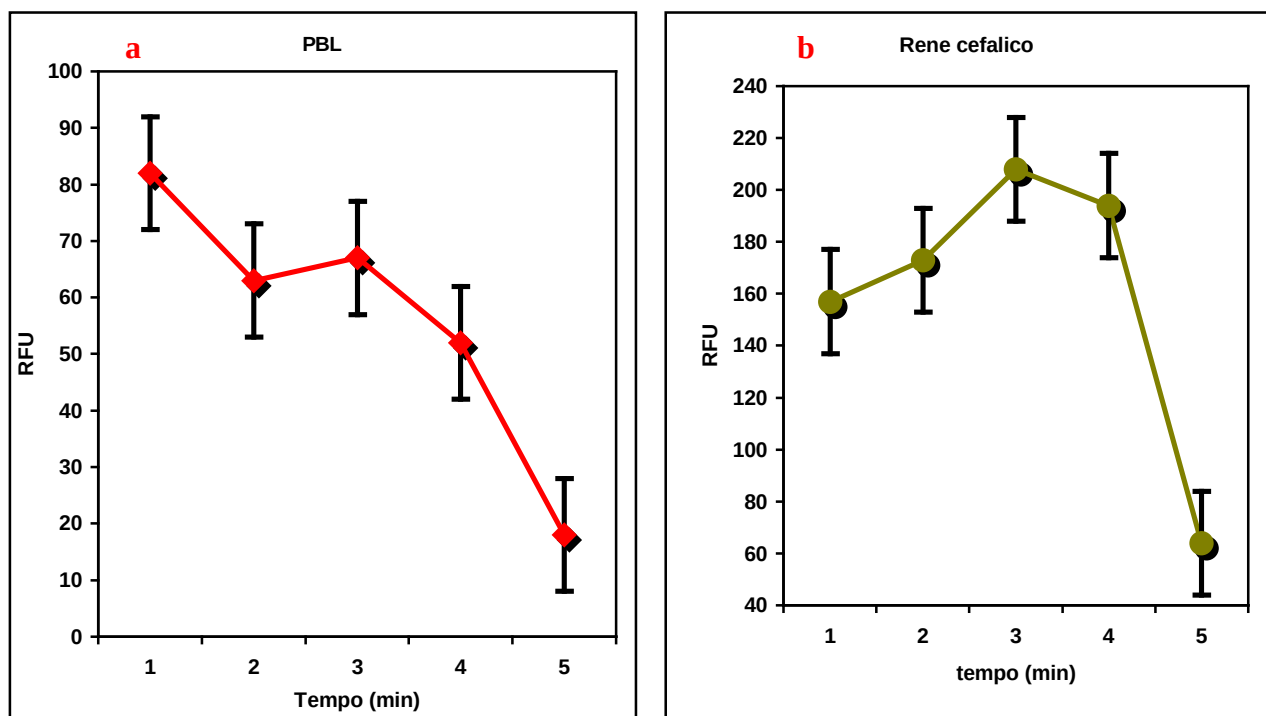


Figura 18: Stimolazione con rIL-1 β di leucociti da sangue periferico (PBL) (a) e rene cefalico (b) di spigola

I grafici mostrano la cinetica di rilascio di Ca^{2+} ; i dati vengono mostrati come media delle RFU $\pm$ deviazione standard.

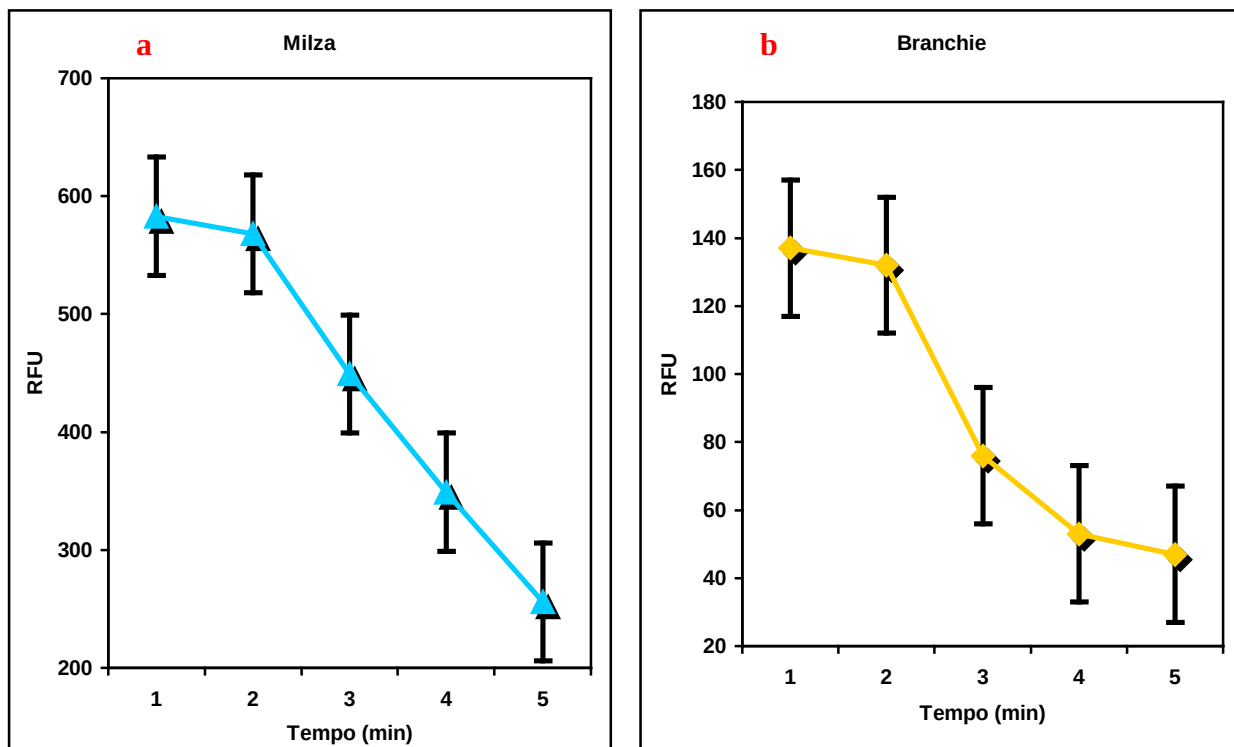


Figura 19: Stimolazione di splenociti (a) e leucociti di branchie (b) di spigola con rIL-1 β

I valori di RFU dei grafici rappresentano i valori medi ottenuti analizzando 30 esemplari $\pm$ la deviazione standard.

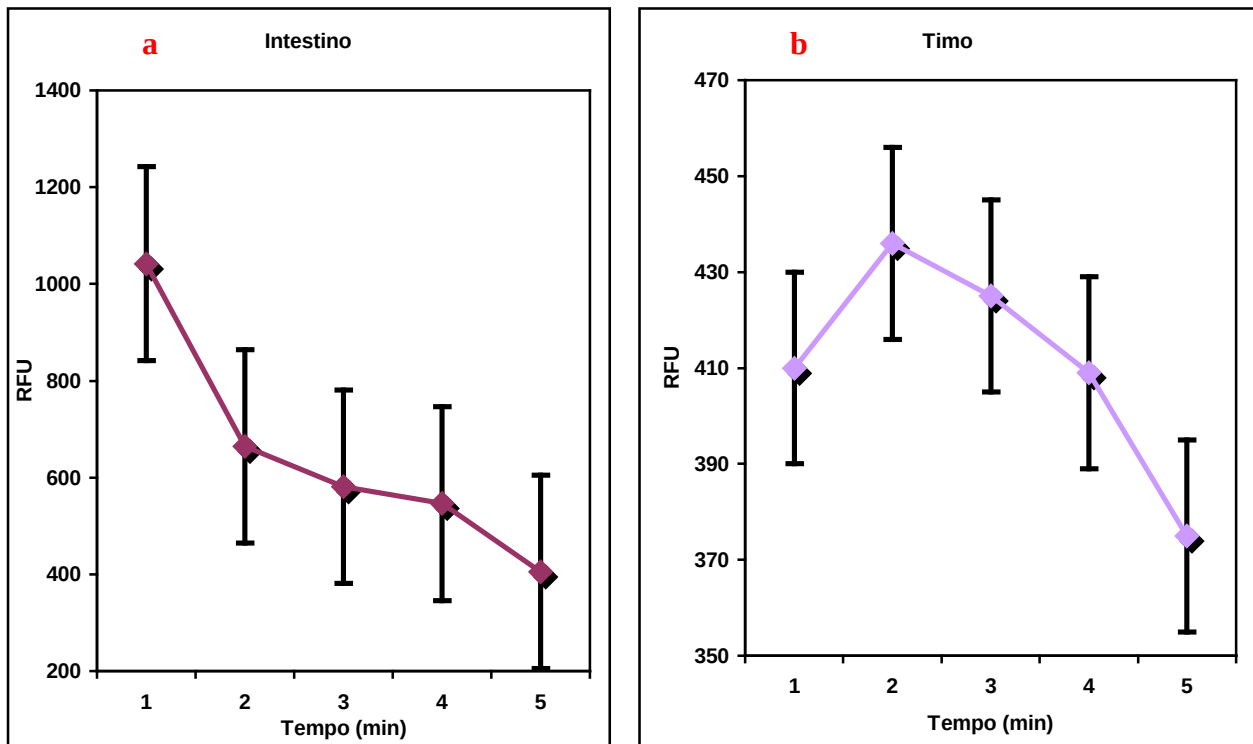


Figura 20: Stimolazione dei leucociti dell'intestino (a) e di timo (b) di spigola

Il grafico mostra le medie delle RFU $\pm$ le deviazioni standard, relative alla cinetica di rilascio del calcio in seguito a stimolazione.

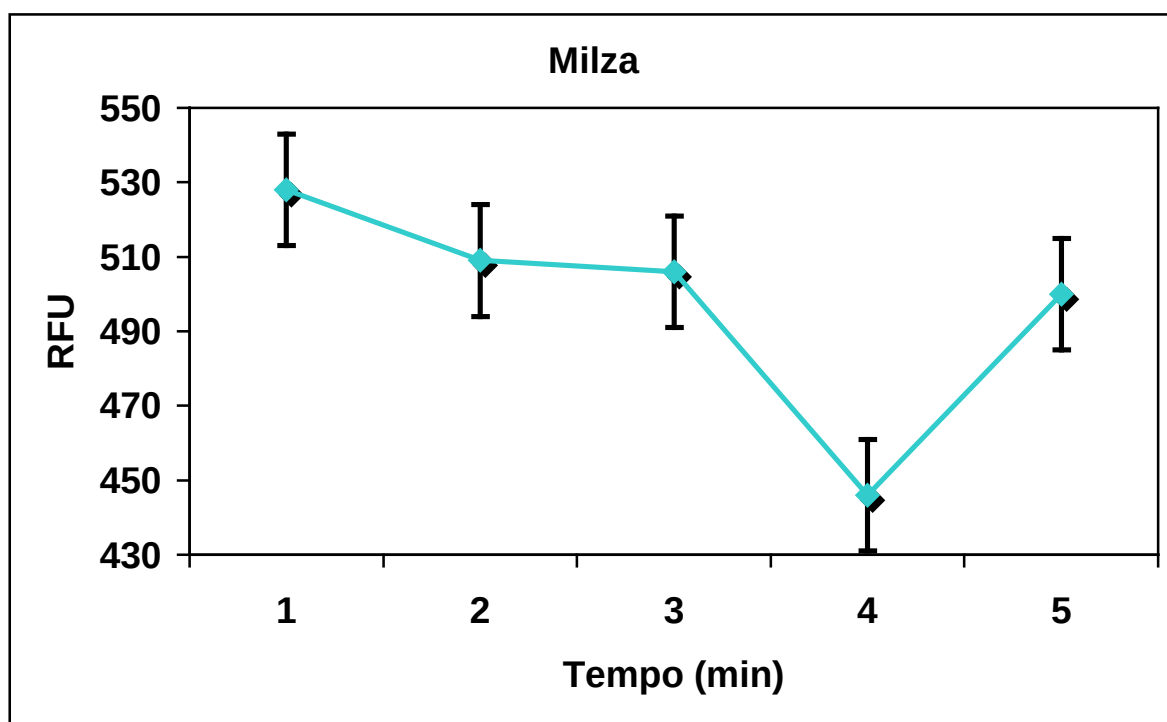


Figura 21: Stimolazione di splenociti di trota iridea

L'immagine mostra la cinetica di rilascio di calcio negli splenociti di trota iridea in seguito a stimolazione con la rispettiva IL-1 β ; i dati indicano la media $\pm$ deviazione standard dei valori ottenuti esaminando 30 esemplari.

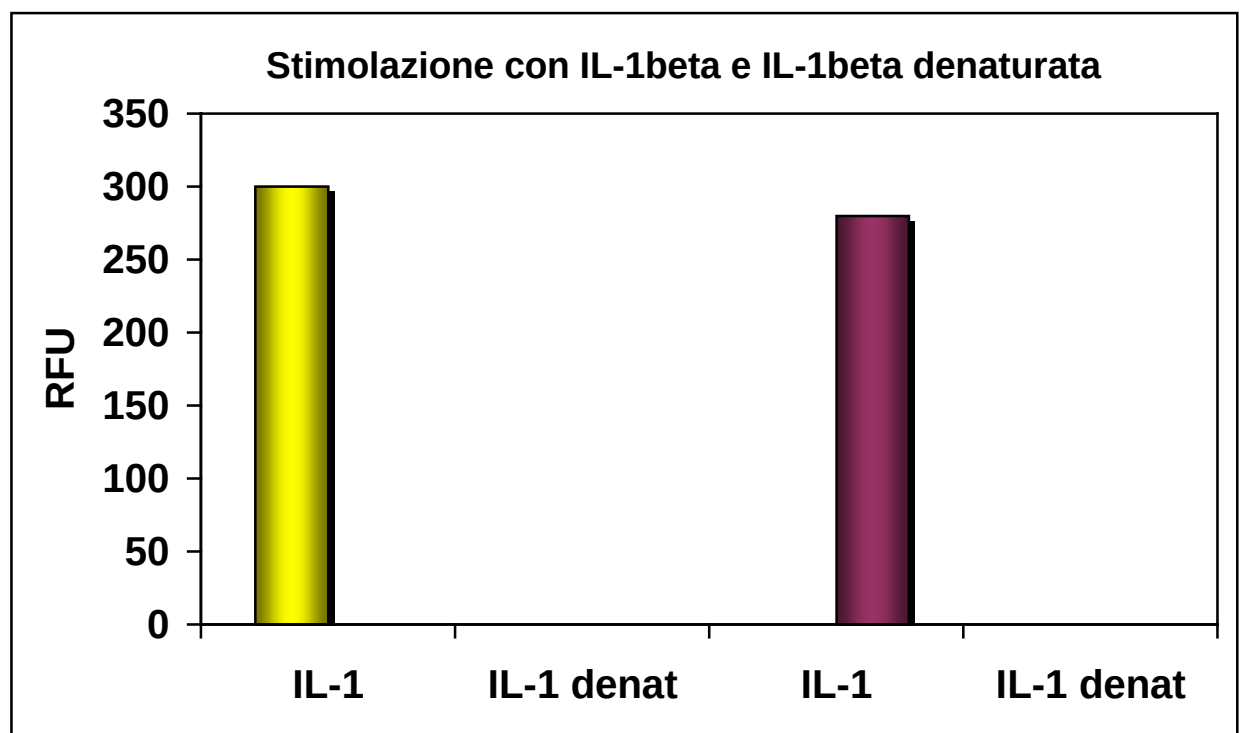


Figura 22: Controllo dell'effetto stimolatorio dell'IL-1 β effettuato su splenociti di spigola ■ e trota iridea ■

La figura mostra i valori di RFU ottenuti stimolando gli splenociti di spigola e trota iridea con l'IL-1 β e IL-1 β denaturata dopo esposizione per 1 minuto a 100°C.

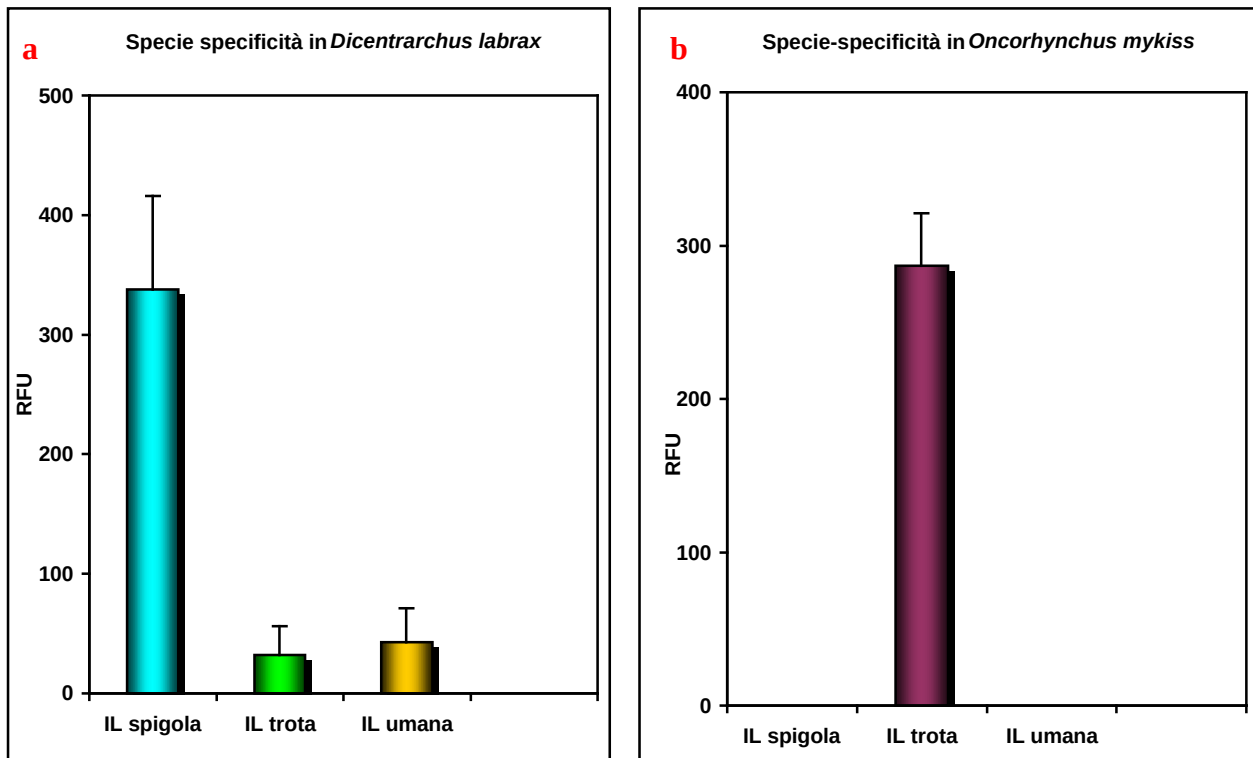


Figura 23: Specie –specificità effettuata su splenociti di spigola (a) e trota iridea (b)

I dati mostrano i valori di RFU che si ottengono stimolando gli splenociti di spigola e trota iridea con la rispettiva IL-1 β , con quella dell'altra specie e con la citochina umana. I dati sono rappresentati come media delle RFU $\pm$ deviazione standard.

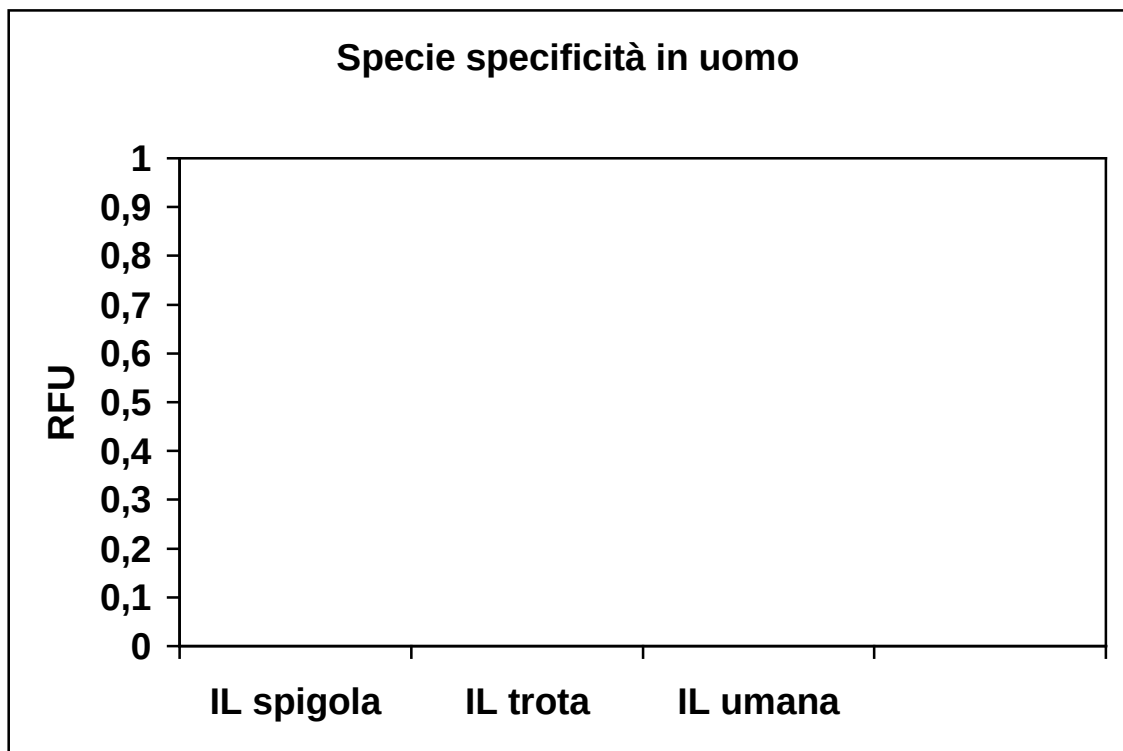


Figura 24: Specie-specificità in PBMC umani

Il grafico mostra l'ampiezza del rilascio di Calcio ottenuta stimolando i PBMC umani con la propria citochina e con le IL-1 β di spigola e trota iridea.

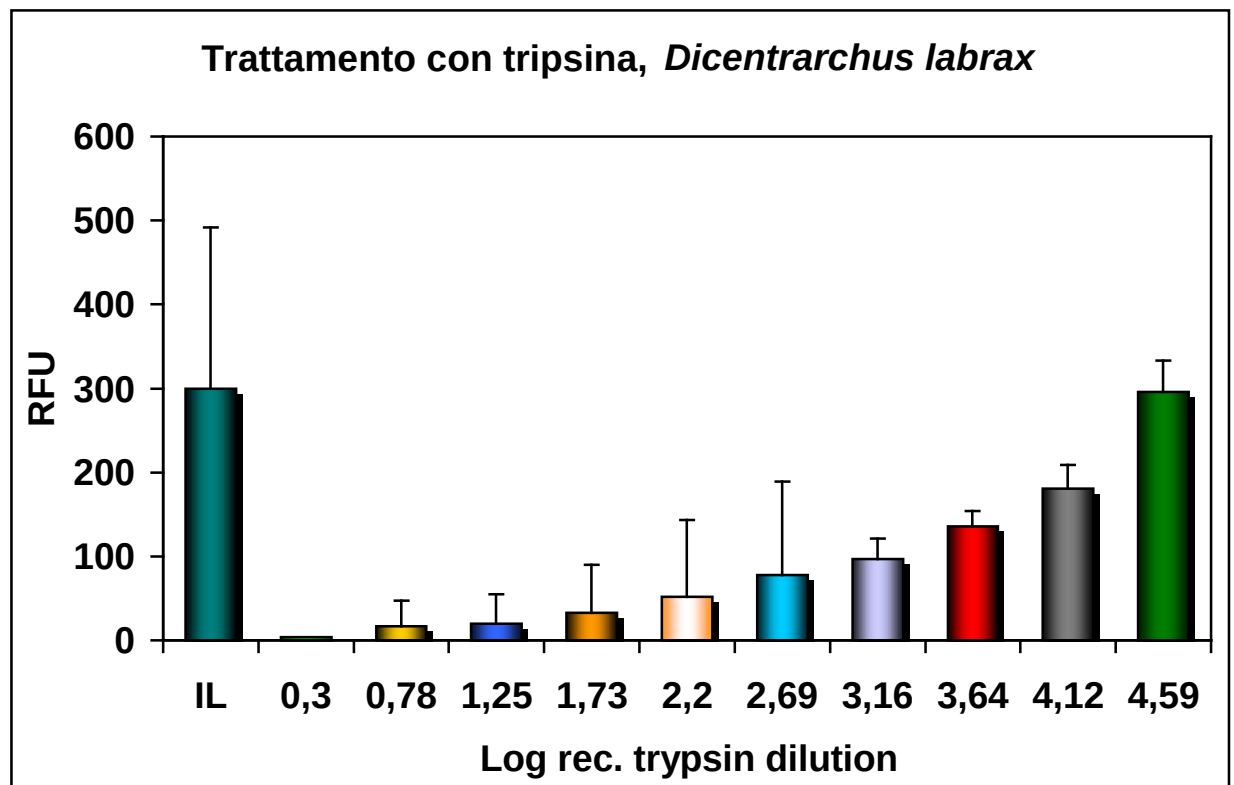


Figura 25: Trattamento con tripsina di splenociti di spigola

Il grafico mostra la media $\pm$ deviazione standard delle RFU ottenute stimolando con IL-1 β gli splenociti di spigola non trattati e pre-trattati con differenti diluizioni di tripsina.

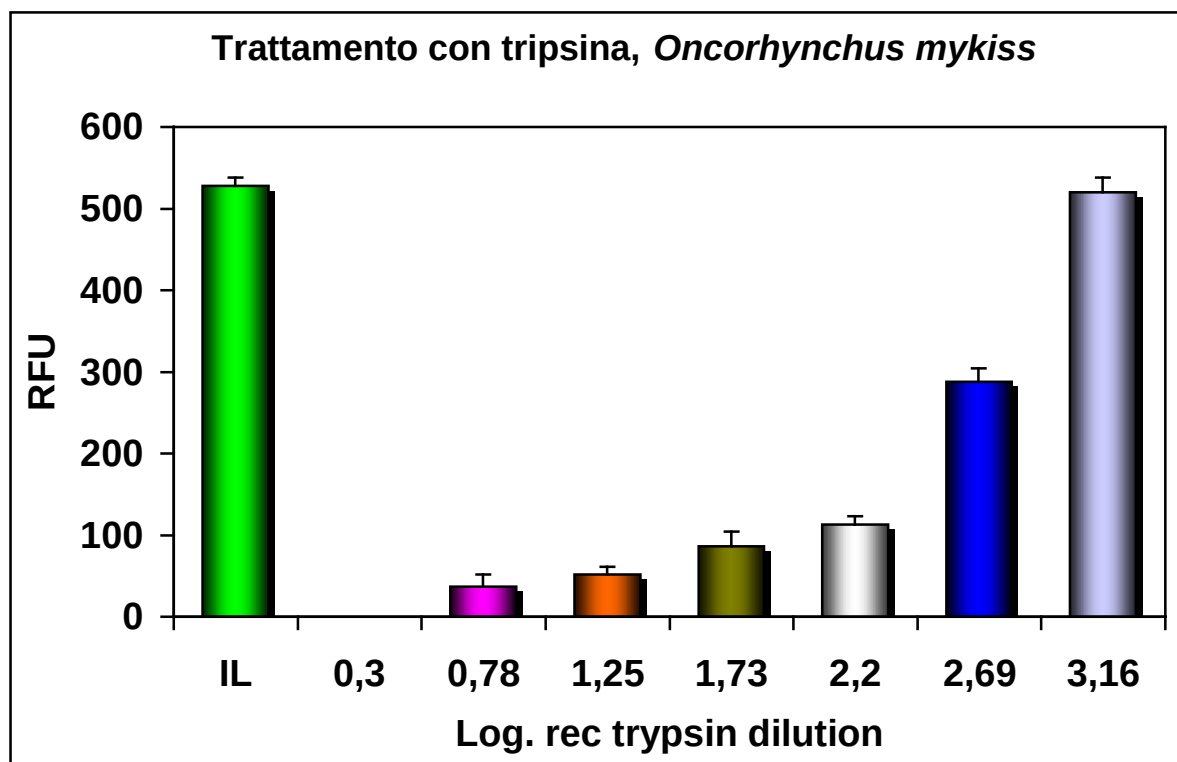


Figura 26: Trattamento con tripsina di splenociti di trota iridea

Le barre del grafico rappresentano la risposta alla stimolazione con IL-1 β degli splenociti di trota iridea non- e pre-trattati con differenti diluizioni di tripsina. I dati sono indicati come RFU $\pm$ deviazione standard.

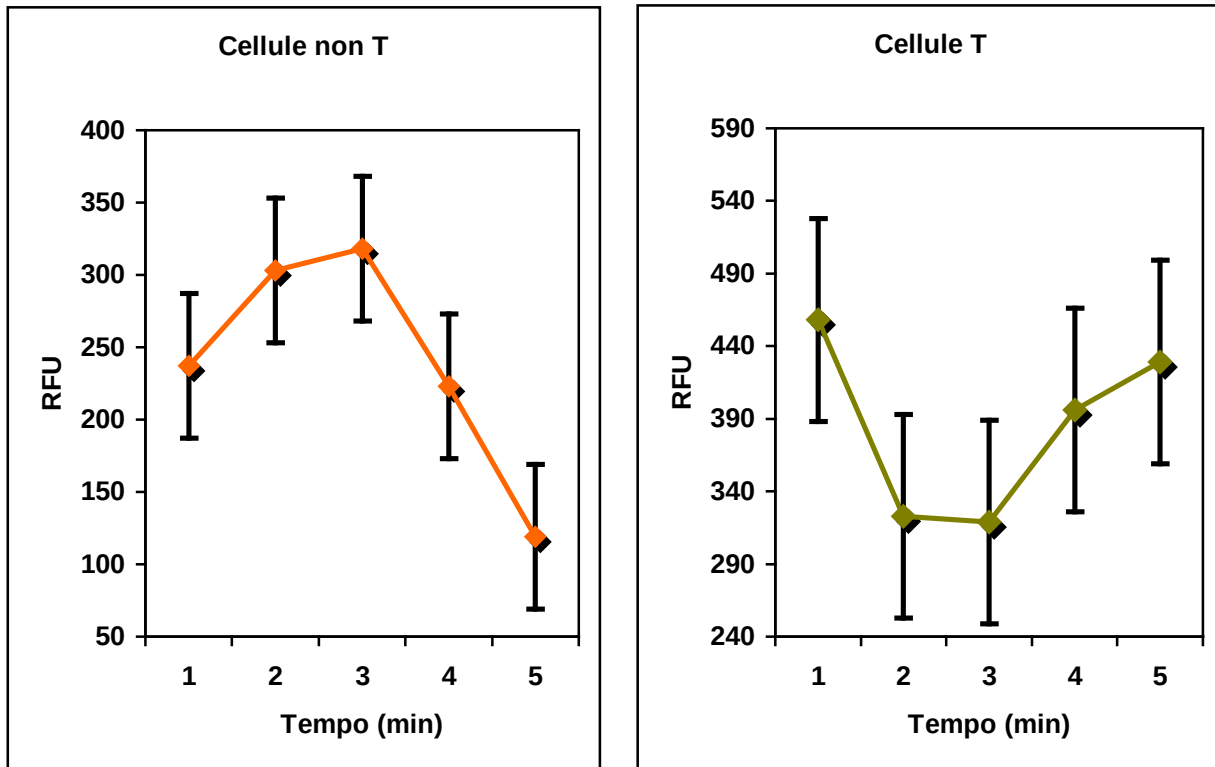


Figura 27: Stimolazione di cellule T e non T di spigola purificate mediante sorting magnetico con l'anticorpo DLT15

I grafici mostrano le cinetiche di rilascio e assorbimento del calcio dopo stimolazione con rIL-1 β effettuata su cellule T e non T ottenute con sorting magnetico.

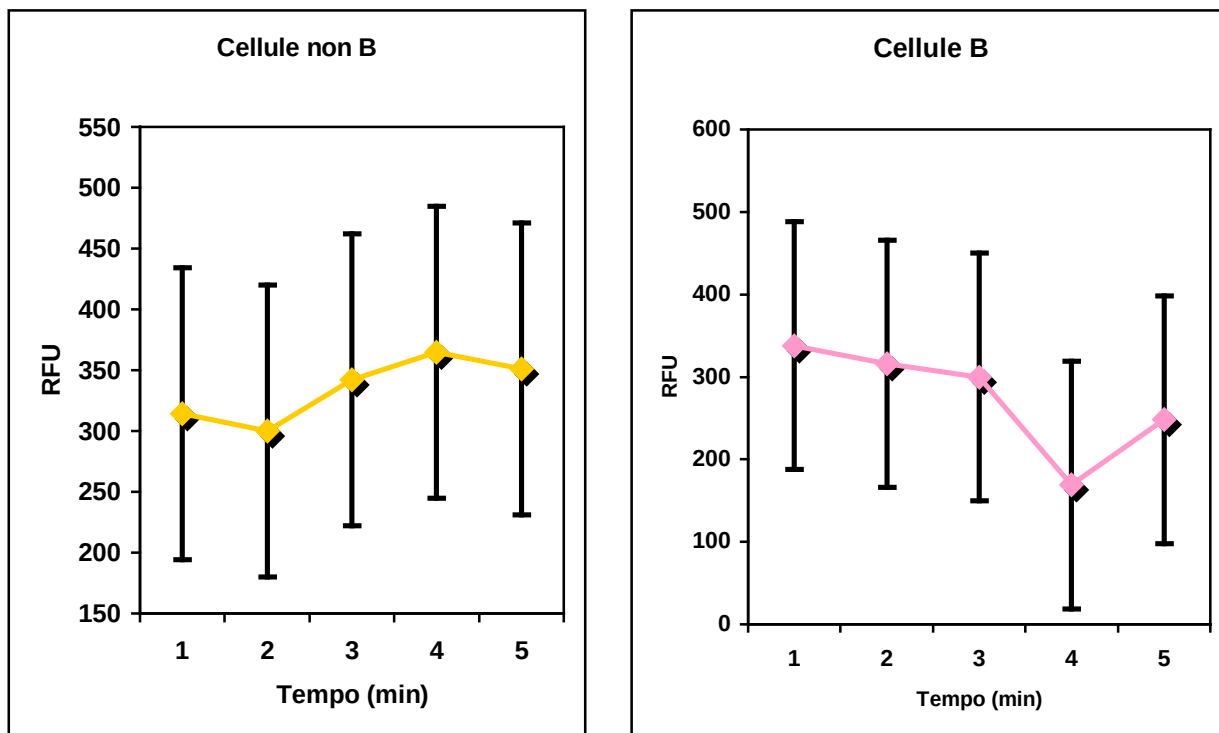


Figura 28: Stimolazione di cellule B e non B di spigola purificate mediante sorting magnetico con l'anticorpo DLIg3

I due grafici evidenziano le differenti cinetiche del Ca^{2+} nelle cellule B e non B purificate da splenociti di spigola mediante sorting magnetico.

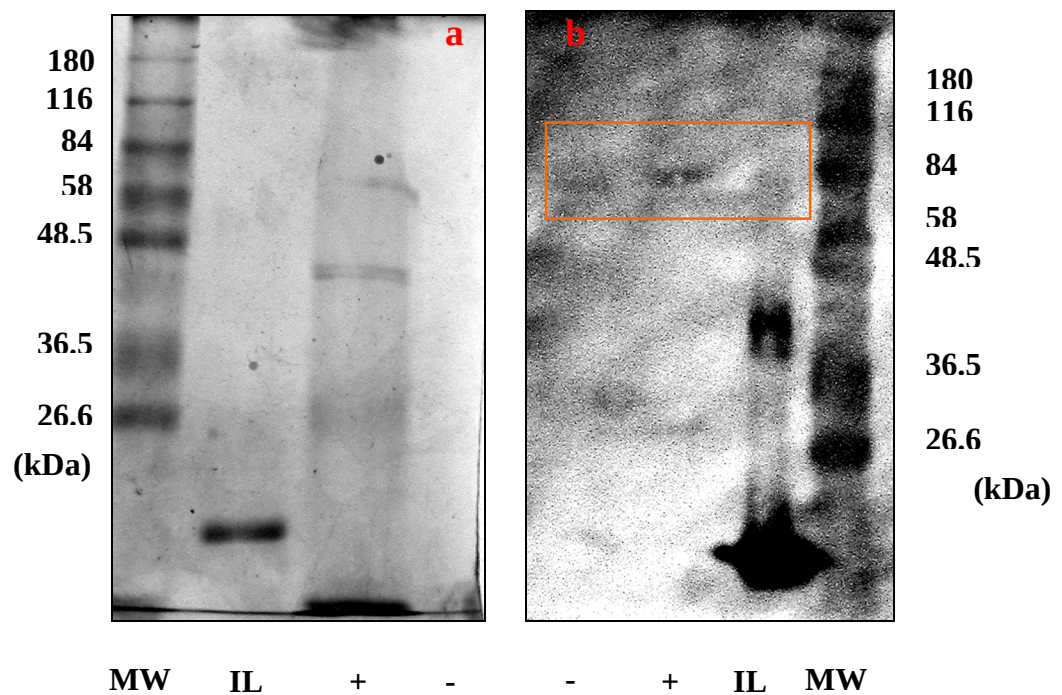


Figura 29: Cross-linking effettuato su splenociti di spigola

La figura a mostra un SDS-PAGE in cui sono stati caricati l'IL-1 β (IL), gli splenociti con cui si è effettuato il cross-linking (+) e splenociti di controllo (-). La figura b mostra le bande ottenute in western blotting utilizzando un anticorpo anti-His: nella corsia + è possibile osservare un banda di circa 84 kDa.

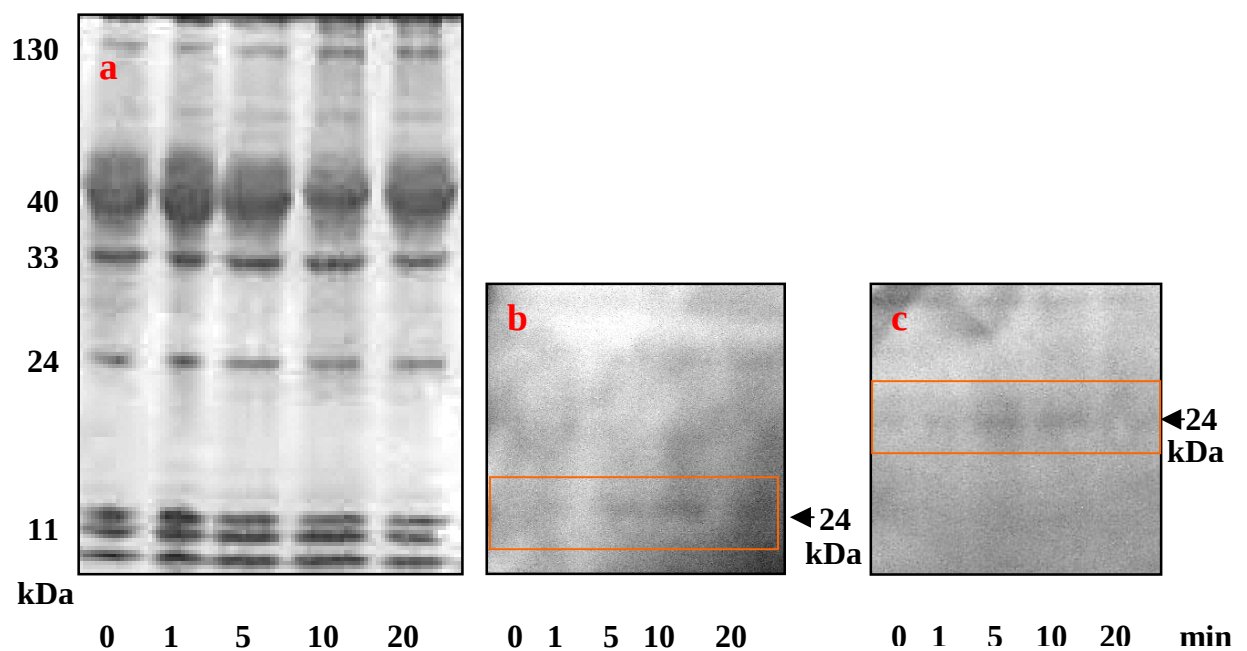


Figura 30: SDS-PAGE e Western blotting con splenociti di spigola

La figura a mostra l'SDS-PAGE effettuato con lisato di splenociti di spigola, ad ogni corsia corrisponde un prelievo di splenociti fatto dopo 0, 1, 5, 10, e 20 minuti dopo la stimolazione con IL-1 β .

L'immagine b è un western blotting fatto con l'anticorpo antifosfotirosina clone 4G10.

L'immagine c è un western blotting fatto con un anticorpo antifosfotreonina.

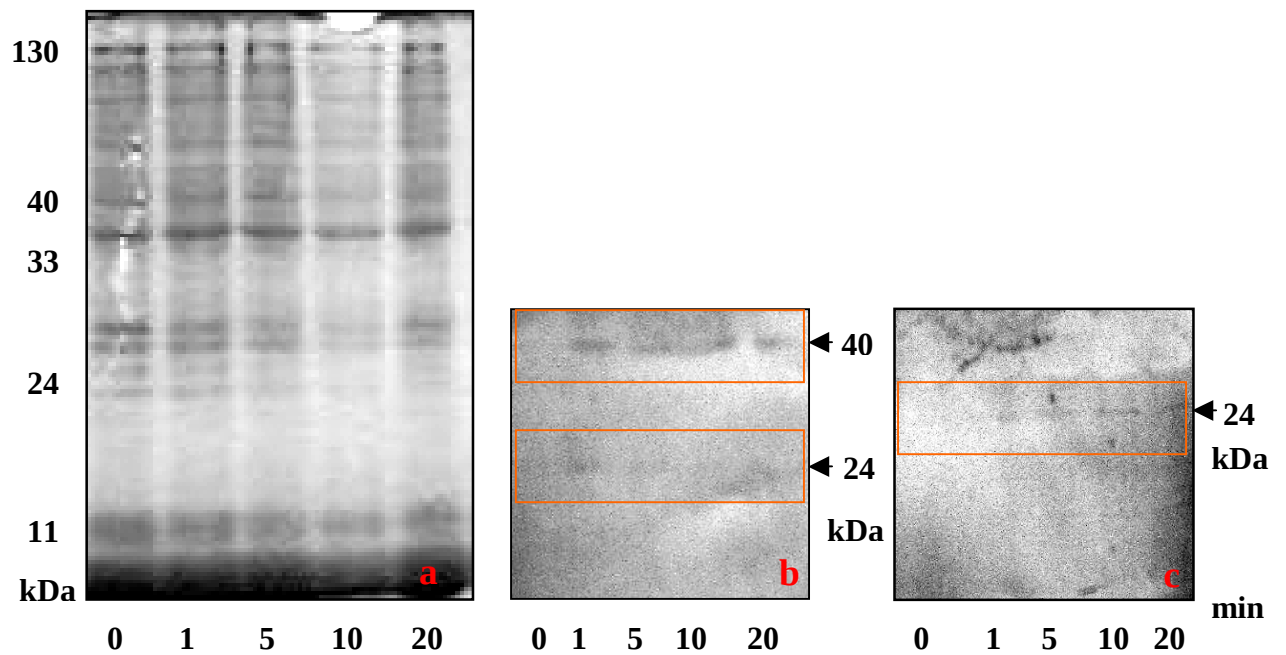


Figura 31: SDS-PAGE e Western blotting di splenociti di trota iridea

La figura a mostra l'SDS-PAGE effettuato con lisato di splenociti di trota iridea, ad ogni corsia corrisponde un prelievo di splenociti fatto dopo 0, 1, 5, 10, e 20 minuti dopo la stimolazione con IL-1 β .

La figura b è un western blotting fatto con l'anticorpo antifosfoserina.

L'immagine c è un western blotting fatto con un anticorpo antifosfotirosina.

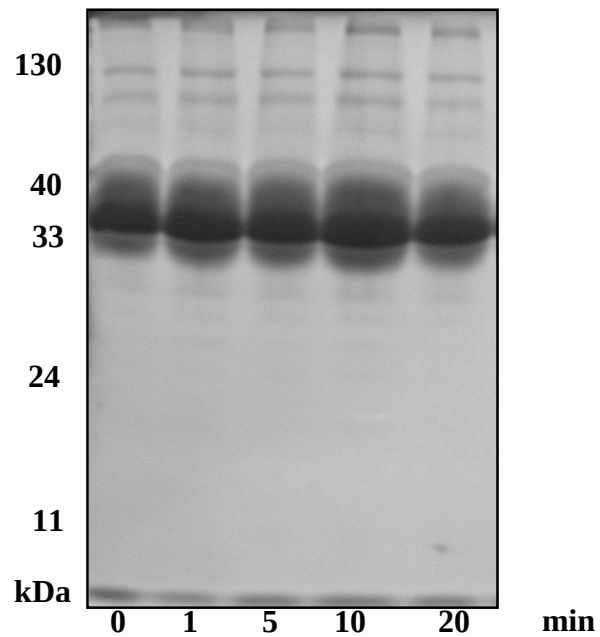


Figura 32: SDS-PAGE effettuato con splenociti di spigola pre-trattati con genisteina

La figura mostra un SDS-PAGE di splenociti trattati con genisteina, un inibitore delle proteine chinasi, il gel è stato blottato su nitrocellulosa e esaminato con i tre anticorpi ma nessuna banda è stata evidenziata (dati non mostrati).

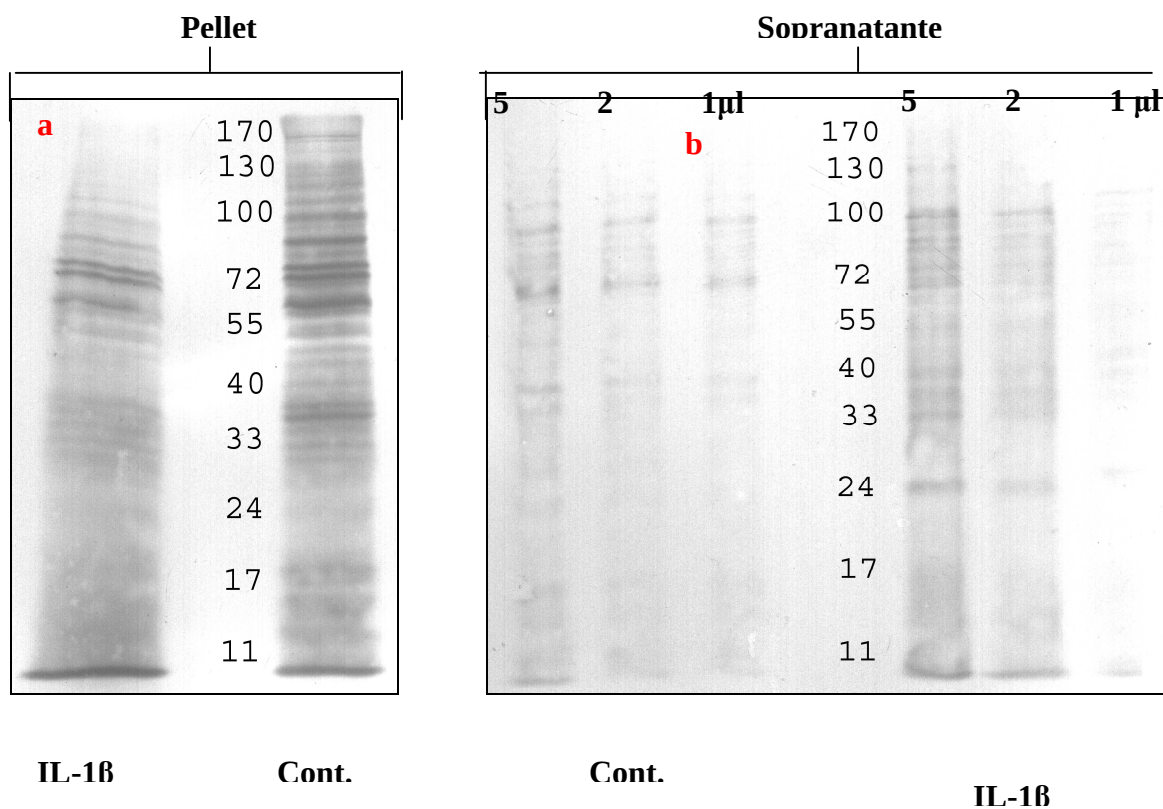


Figura 33: Immunoprecipitazione con anticorpo antifosfotirosina

La figura a mostra l'autoradiografia del blotting effettuato con anticorpo antifosfotirosina sui pellet dei lisati di splenociti di sogliola marcati radioattivamente trattati con IL-1 β e di controllo; la figura b mostra lo stesso blotting effettuato con i sobranatanti dei campioni usati per la figura a.

		nigroviridis] (NCBI accession number: gi 47190944)
BAND 1 results		ras-related G3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2) [Danio rerio] (NCBI accession number: gi 50344776)
1	natural killer enhancing factor [Scophthalmus maximus] (NCBI accession number: gi 193211500)	40S ribosomal protein S9 [Ictalurus punctatus] (NCBI accession number: gi 15294029)
2	unnamed protein product (Thymidine monophosphate kinase) [Tetraodon nigroviridis] (NCBI accession number: gi 47218682)	hypothetical protein LOC436741 (peroxiredoxin family) [Danio rerio] (NCBI accession number: gi 50539996)
3	40S ribosomal protein S9 [Ictalurus punctatus] (NCBI accession number: gi 15294029)	40S ribosomal protein S5 [Ictalurus punctatus] (NCBI accession number: gi 15294021)
4	RAB family member rab-7 [Danio rerio] (NCBI accession number: gi 41055538)	
5	Ribosomal protein L18 [Salmo salar] (NCBI accession number: gi 13624842)	
6	hemoglobin beta-A chain [Siniperca chuatsi] (NCBI accession number: gi 67772043)	
BAND 2 results		
1	unnamed protein product (Thymidine monophosphate Kinase) [Tetraodon nigroviridis] (NCBI accession number: gi 47218682)	
2	40S ribosomal protein S9 [Ictalurus punctatus] (NCBI accession number: gi 15294029)	
3	ribosomal protein L14 [Lepomis hardwickii] (NCBI accession number: gi 18000283)	
4	40S ribosomal protein S5 [Dermacentor variabilis] (NCBI accession number: gi 29825585)	
5	GTP-binding protein o-rab1 - electric ray (Discopyge ommata) (NCBI accession number: gi 103720)	
6	hypothetical protein LOC436741 (peroxiredoxin family) [Danio rerio] (NCBI accession number: gi 50539996)	
7	unnamed protein product (Putative NADH-flavin reductase) [Tetraodon nigroviridis] (NCBI accession number: gi 47221026)	
8	60S ribosomal protein L13A [Platichthys flesus] (NCBI accession number: gi 160417180)	
BAND 3 results		
1	unnamed protein product (Thymidine monophosphate kinase) [Tetraodon nigroviridis] (NCBI accession number: gi 47218682)	
2	Ribosomal protein L18 [Salmo salar] (NCBI accession number: gi 13624842)	
3	unnamed protein product (high-mobility group box 2) [Tetraodon	

Figura 34: risultati ottenuti col programma MASCOT (www.matrixscience.com)

Band 1 indica la banda di 24 kDa di splenociti di controllo

Band 2 e 3 sono le bande di 24 kDa di splenociti stimolati con IL-1 β

In tutte e tre le bande analizzate i peptidi trovati sono elencati in ordine decrescente di concentrazione.

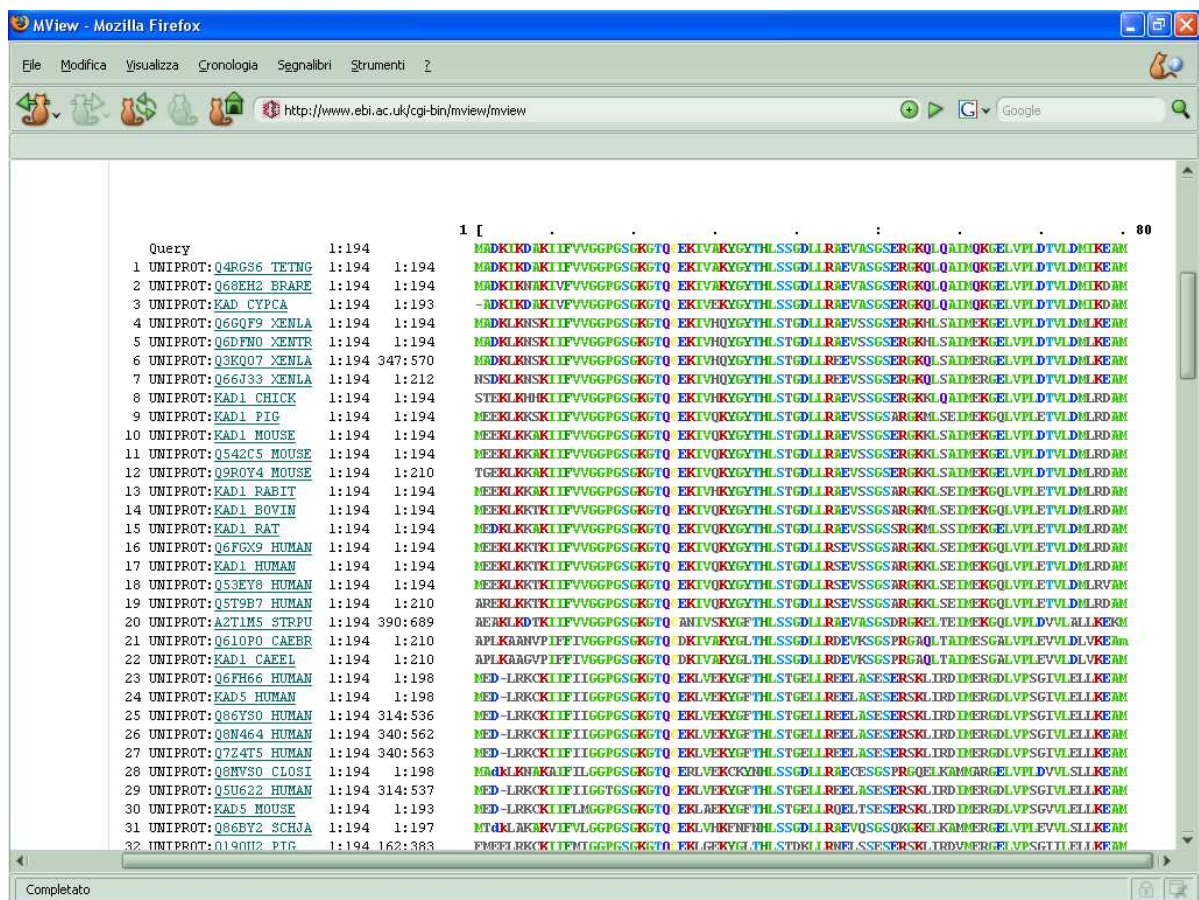


Figura 35: Omologie fra sequenze aminoacidiche ottenute mediante il programma FASTA (FAST-All) (www.ebi.ac.uk/fasta/)

La figura mostra le omologie tra la sequenza aminoacidica della timidina monofosfato chinasi, con i peptidi di altre specie.

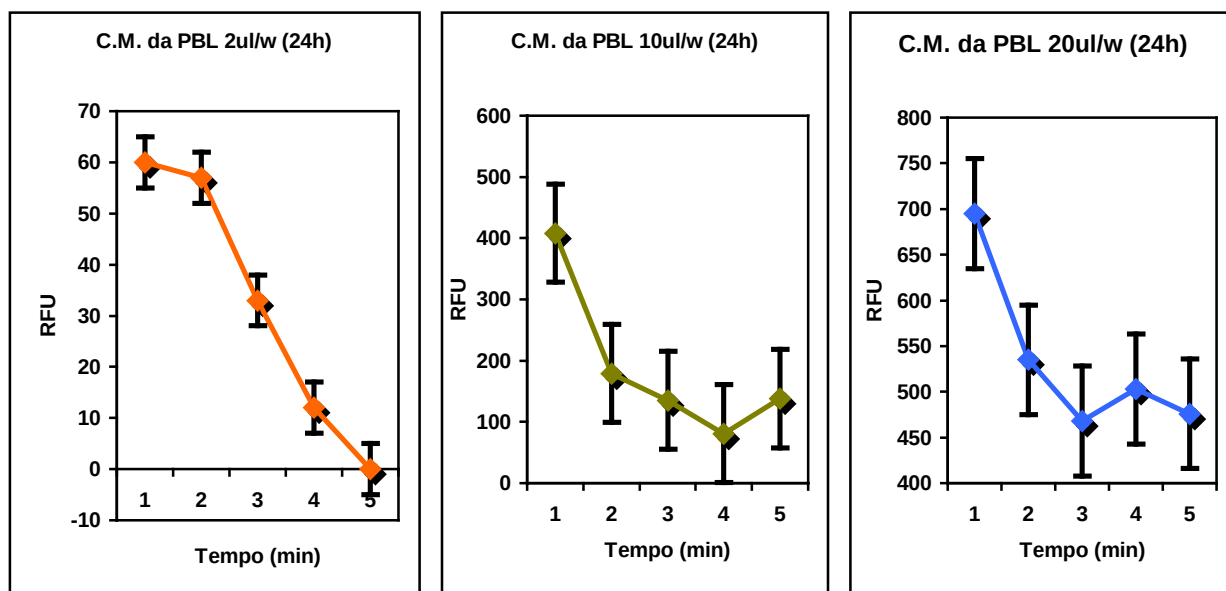


Figura 36: Stimolazione con terreno condizionato da PBL prelevato dopo 24h

I tre grafici mostrano le cinetiche ottenute, stimolando gli splenociti di spigola con il terreno condizionato ottenuto in seguito a “MLR” dei PBL e prelevato dopo 24h dall’inizio della reazione. I dati vengono mostrati come media delle RFU $\pm$ deviazione standard.

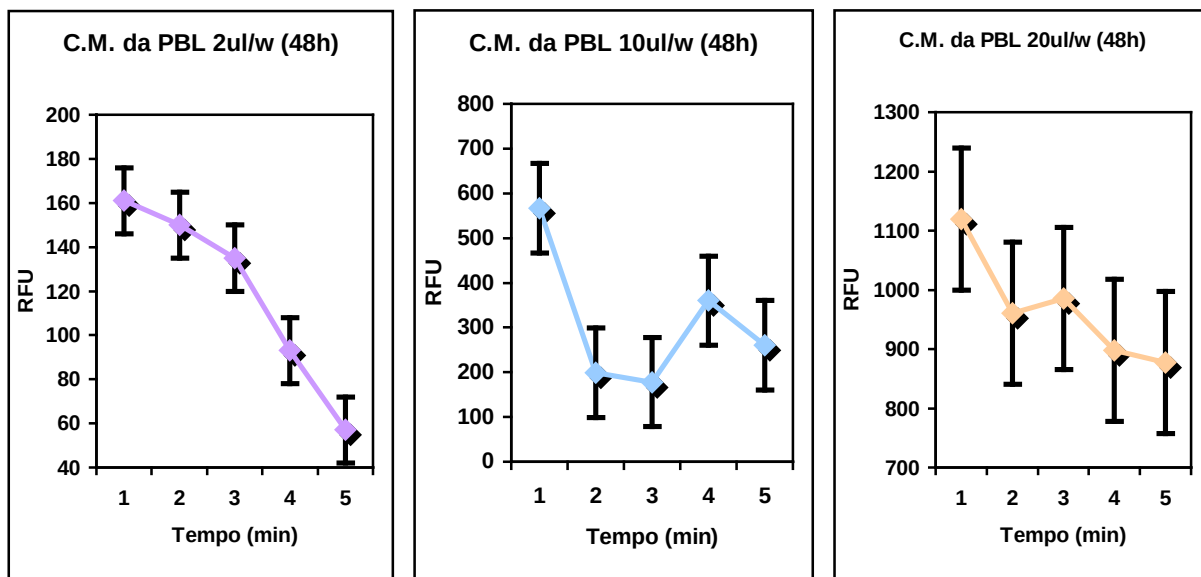


Figura 37: Stimolazione con terreno condizionato da PBL prelevato dopo 48h

I tre grafici mostrano i risultati in RFU $\pm$ deviazione standard, ottenuti stimolando con il terreno condizionato ottenuto dai PBL e prelevato dopo 48h dall'inizio della reazione "MLR", gli splenociti di spigola.

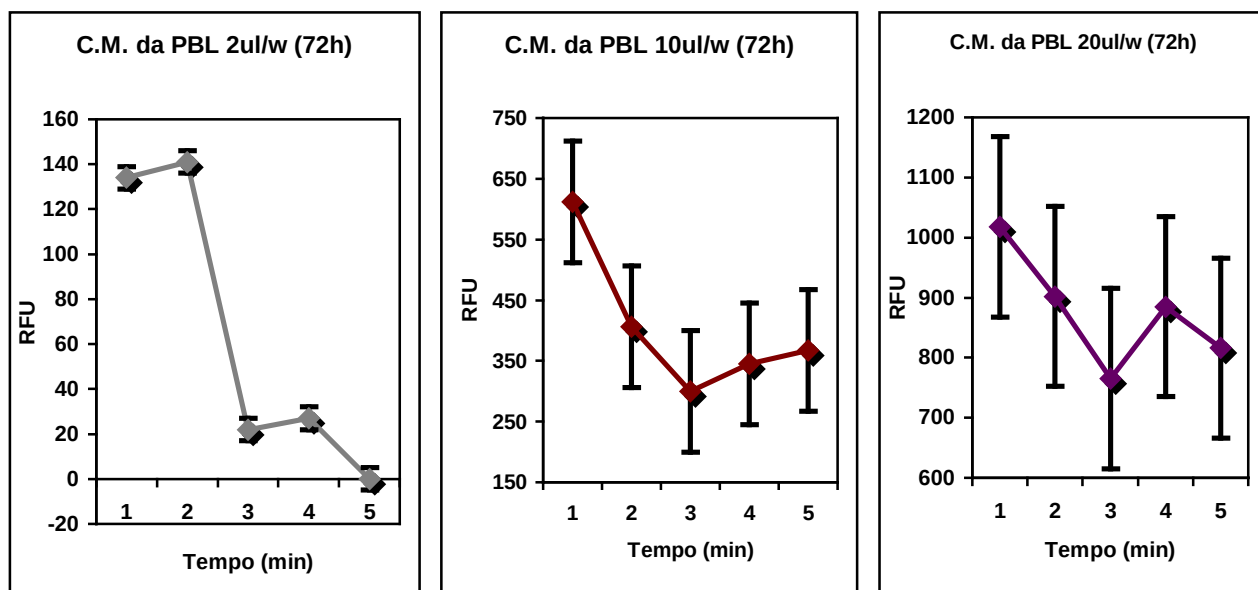


Figura 38: Stimolazione con terreno condizionato da PBL prelevato dopo 72h

I grafici mostrano le cinetiche di rilascio del calcio osservate negli splenociti di spigola in seguito a stimolazione con il terreno condizionato ottenuto dai PBL dopo 72h dalla “MLR.

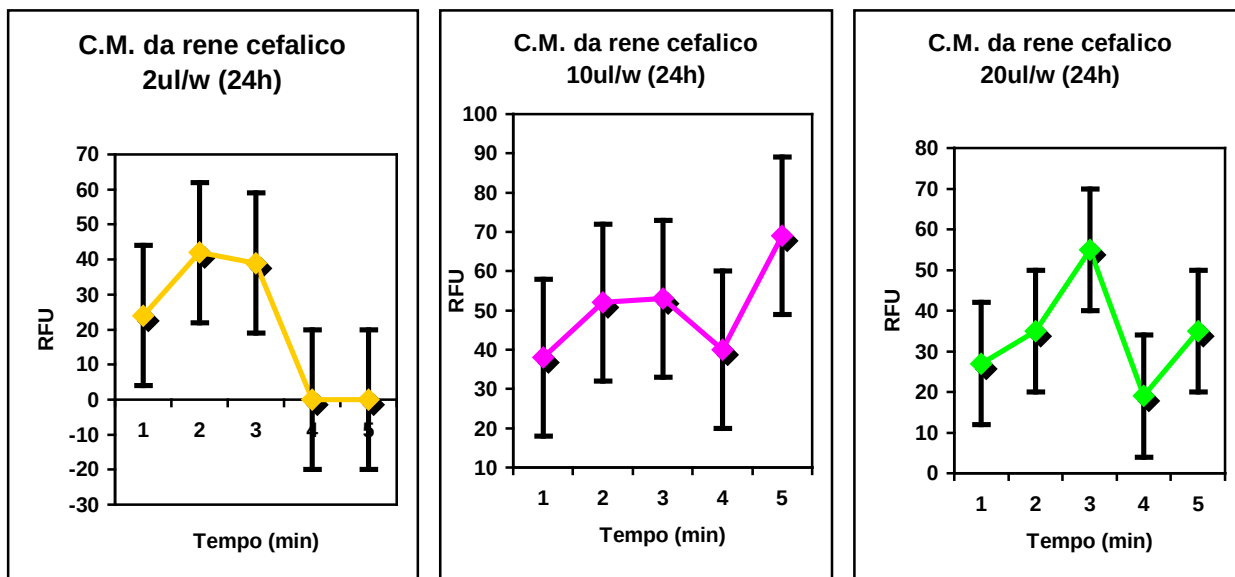


Figura 39: Stimolazione con terreno condizionato di rene cefalico prelevato dopo 24h

I grafici mostrano le cinetiche della risposta di rilascio del Ca^{2+} che si verifica in seguito a stimolazione con terreno condizionato prelevato dopo 24h dall'inizio della reazione "MLR" dei leucociti di rene cefalico

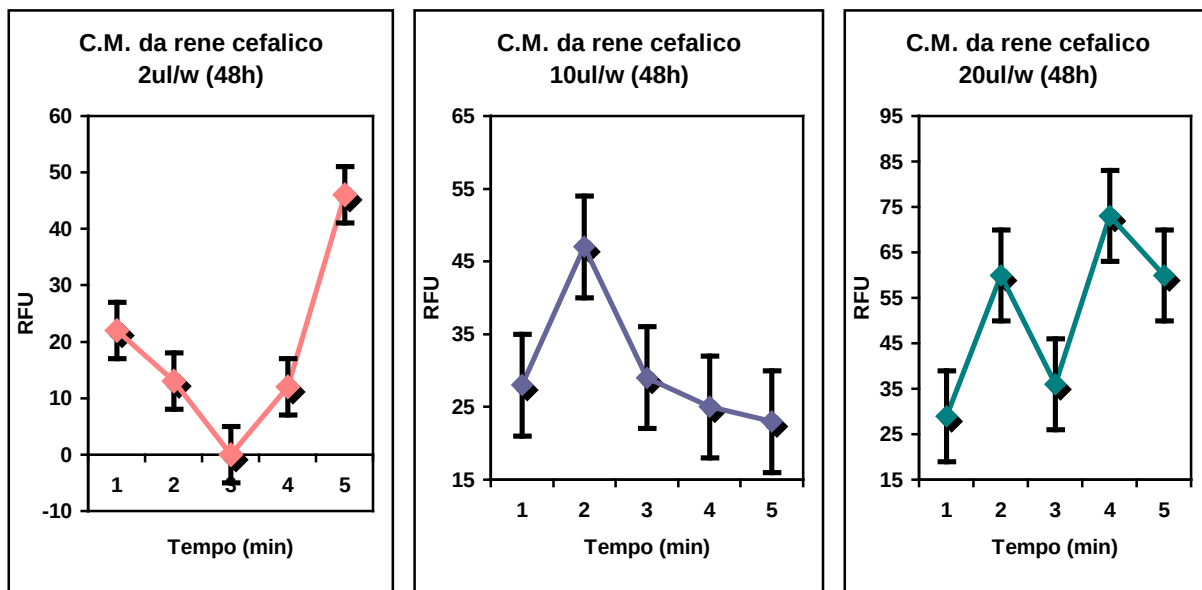


Figura 40: Stimolazione con terreno condizionato di rene cefalico prelevato dopo 48h

I grafici mostrano la risposta degli splenociti di spigola, espressa in RFU $\pm$ deviazione standard, alla stimolazione con terreno condizionato prelevato dopo 48h dall'inizio di una reazione "MLR" effettuata con leucociti di rene cefalico.

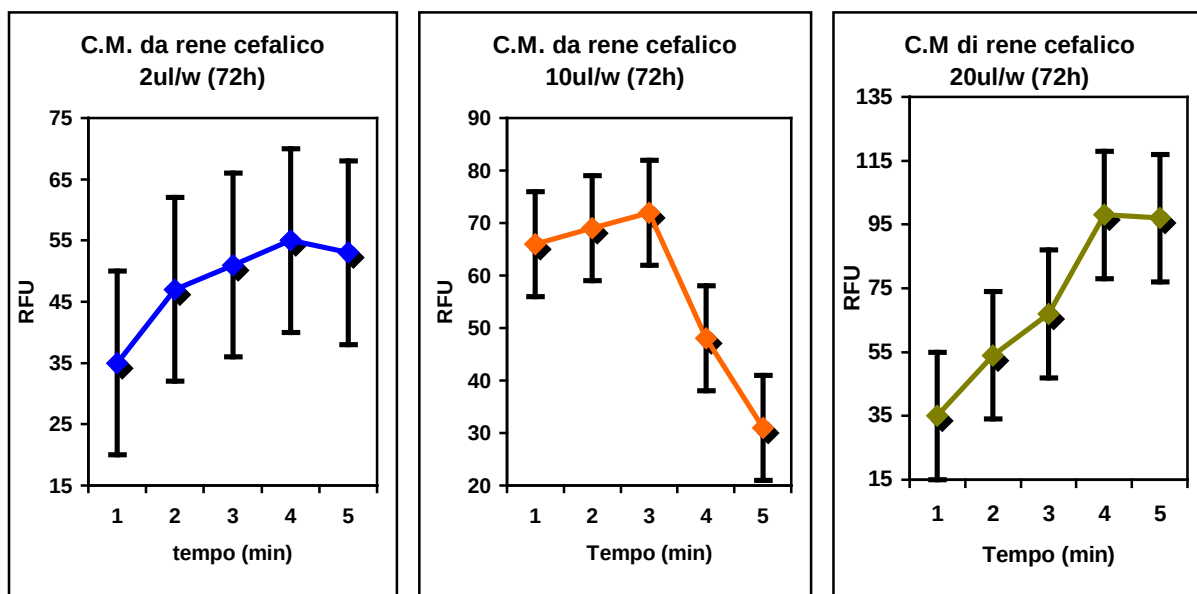


Figura 41: Stimolazione con terreno condizionato di rene cefalico prelevato dopo 72h

Le cinetiche rappresentate nei tre grafici ed espresse come RFU $\pm$ deviazione standard, mostrano la modalit  di rilascio di calcio in seguito a stimolazione con terreno condizionato prelevato dopo 72h dall'avvenuta reazione "MLR" dei leucociti di rene cefalico

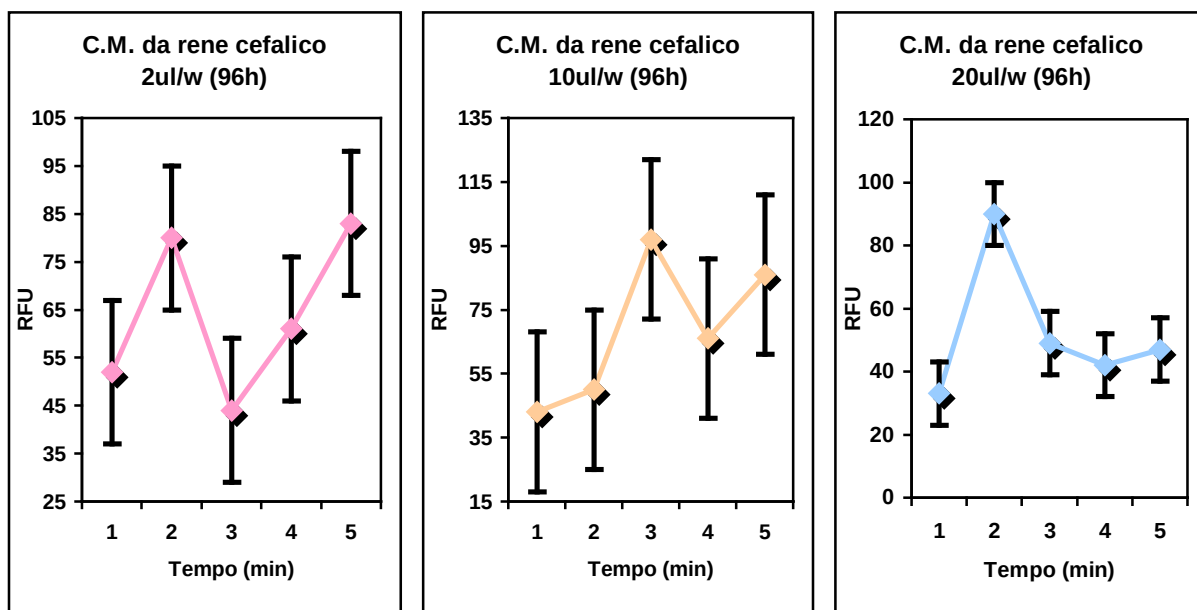


Figura 42 Stimolazione con terreno condizionato di rene cefalico prelevato dopo 96h

Nei grafici si può osservare il valore di RFU $\pm$ deviazione standard relativo alla stimolazione degli splenociti di spigola con terreno condizionato di rene cefalico, prelevato 96h dopo la reazione “MLR”.

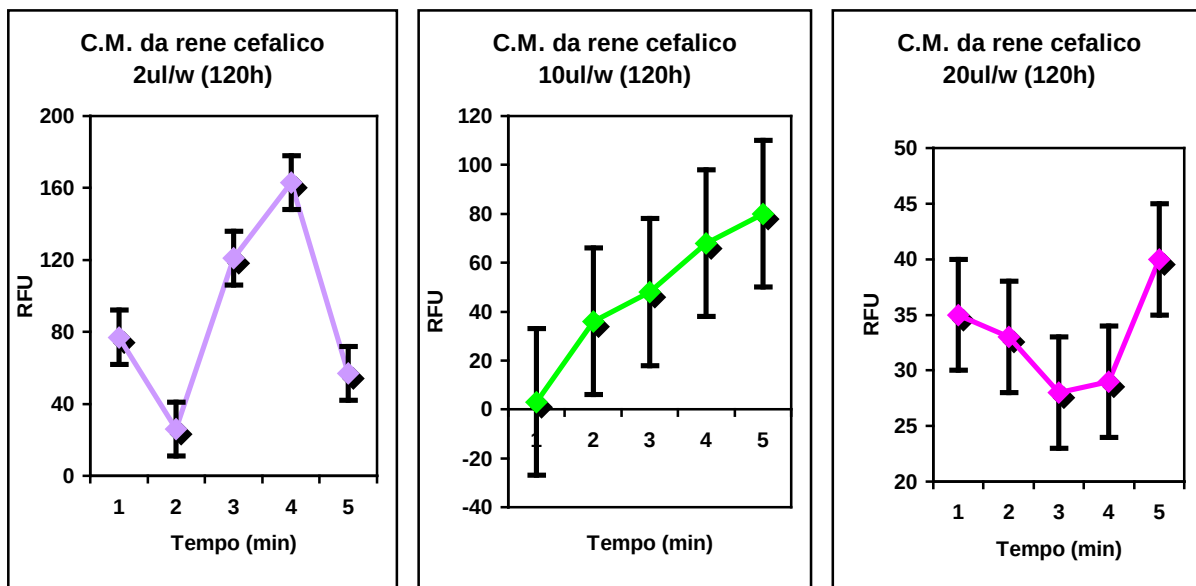


Figura 43: Stimolazione con terreno condizionato di rene cefalico prelevato dopo 120h

I dati, espressi in RFU $\pm$ deviazione standard, mostrano l'andamento del rilascio di calcio in seguito a stimolazione con terreno condizionato prelevato dopo 120h dall'inizio della reazione "MLR" dei leucociti di rene cefalico.

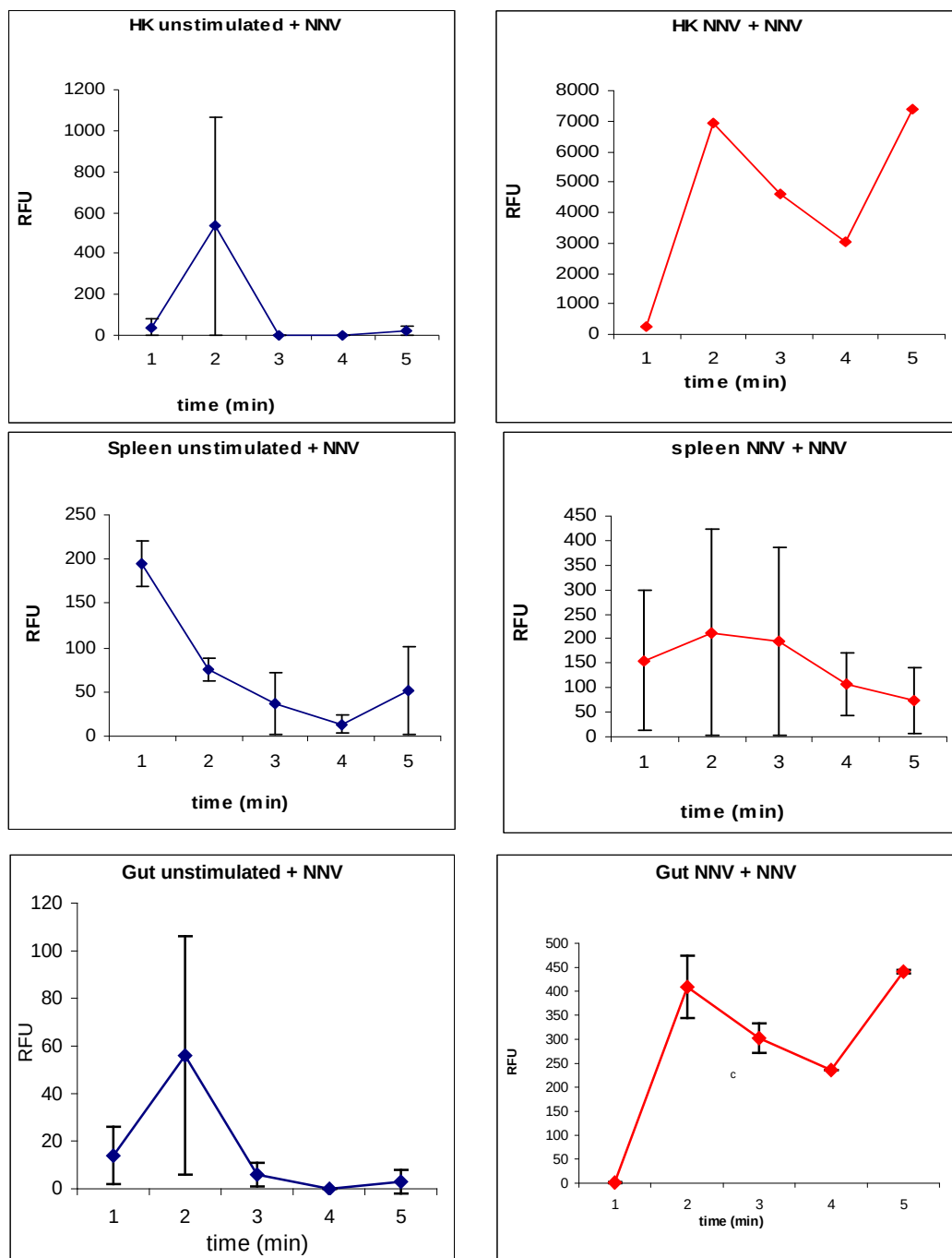


Figura 44: Stimolazione con nodavirus di leucociti di spigola

I grafici mostrano le differenti cinetiche del rilascio di calcio in seguito a stimolazione con nodavirus di leucociti di rene cefalico, milza e intestino di spigole vaccinate da 43 giorni con nodavirus (in rosso) e di controllo (blu). I dati sono riportati come media delle RFU $\pm$ deviazione standard.

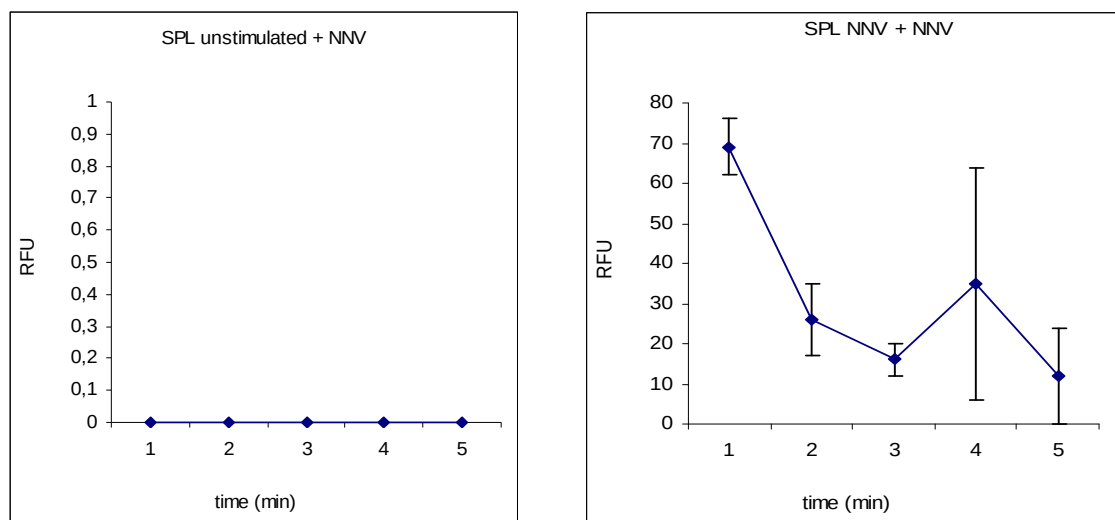


Figura 45: Stimolazione di splenociti di spigola con nodavirus

I grafici mostrano i valori di RFU $\pm$ deviazione standard della cinetica di rilascio del calcio in splenociti di spigole di controllo e vaccinate con nodavirus (30 giorni dopo il richiamo, 73 giorni dall'inizio della vaccinazione)

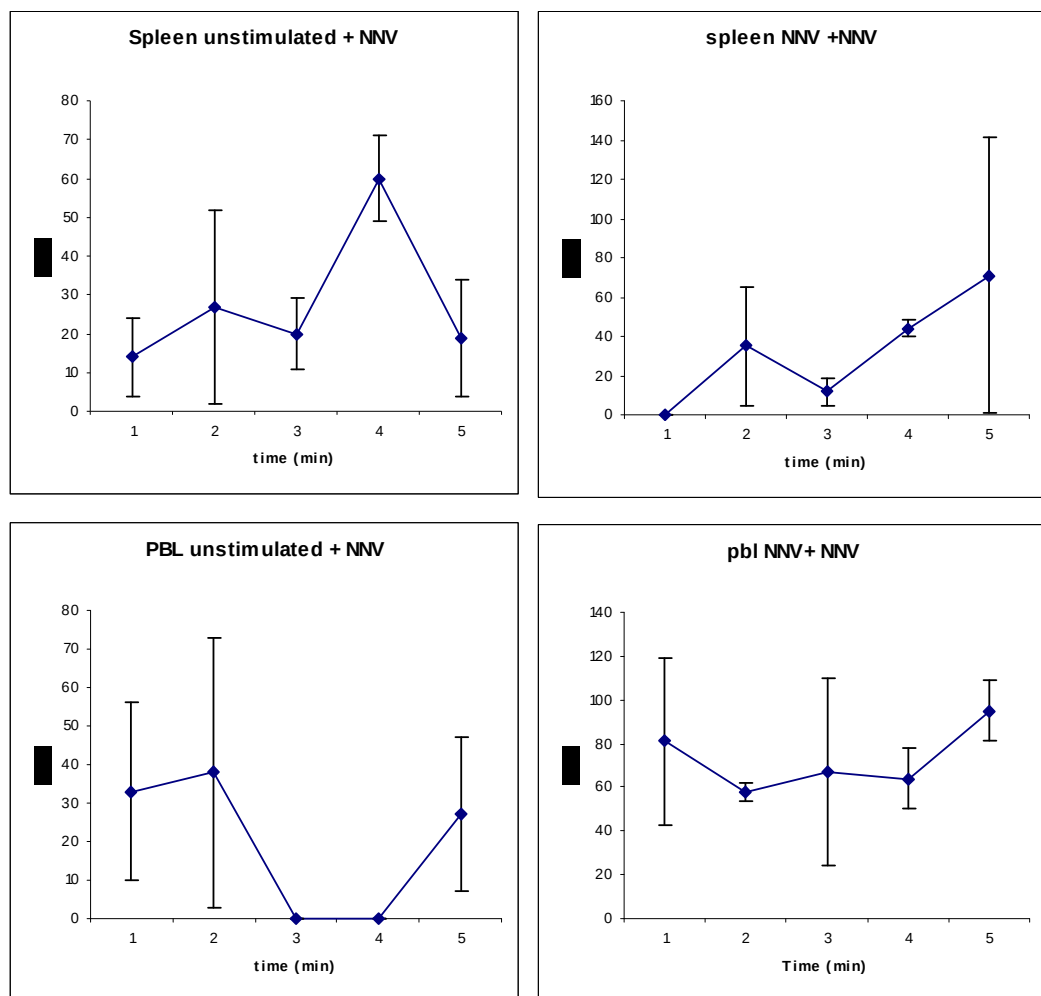


Figura 46: Stimolazione di splenociti e PBL di spigola con nodavirus

I grafici mostrano le cinetiche del rilascio del calcio in seguito a stimolazione con nodavirus di leucociti di milza e PBL di esemplari di controllo e vaccinati con nodavirus (60 giorni dopo il richiamo, 103 giorni dall'inizio dell'immunizzazione).

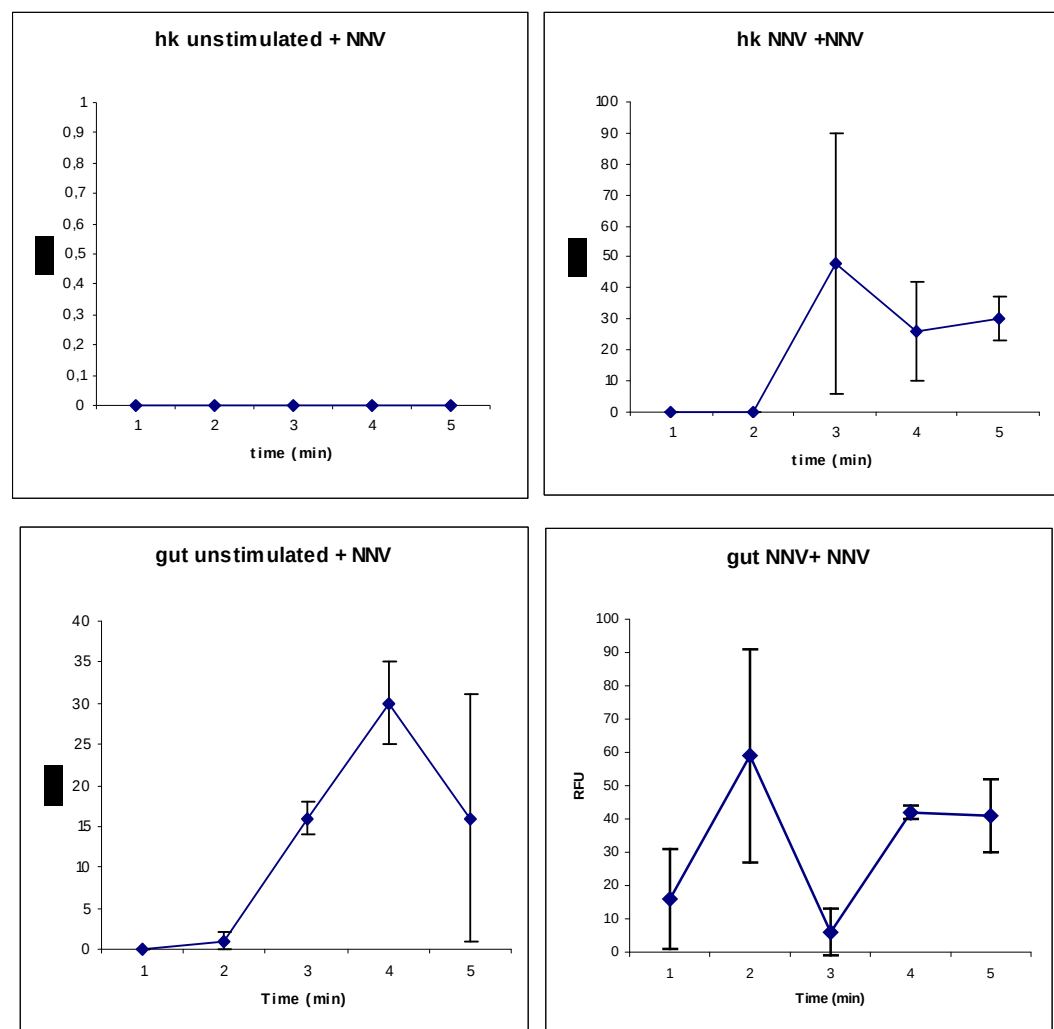


Figura 47: Stimolazione di leucociti di spigola con nodavirus

Questi grafici mostrano la modalità di rilascio del calcio in leucociti di rene cefalico e intestino di pesci di controllo e vaccinate (60 giorni dopo il richiamo, 103 giorni dall'inizio dell'immunizzazione).

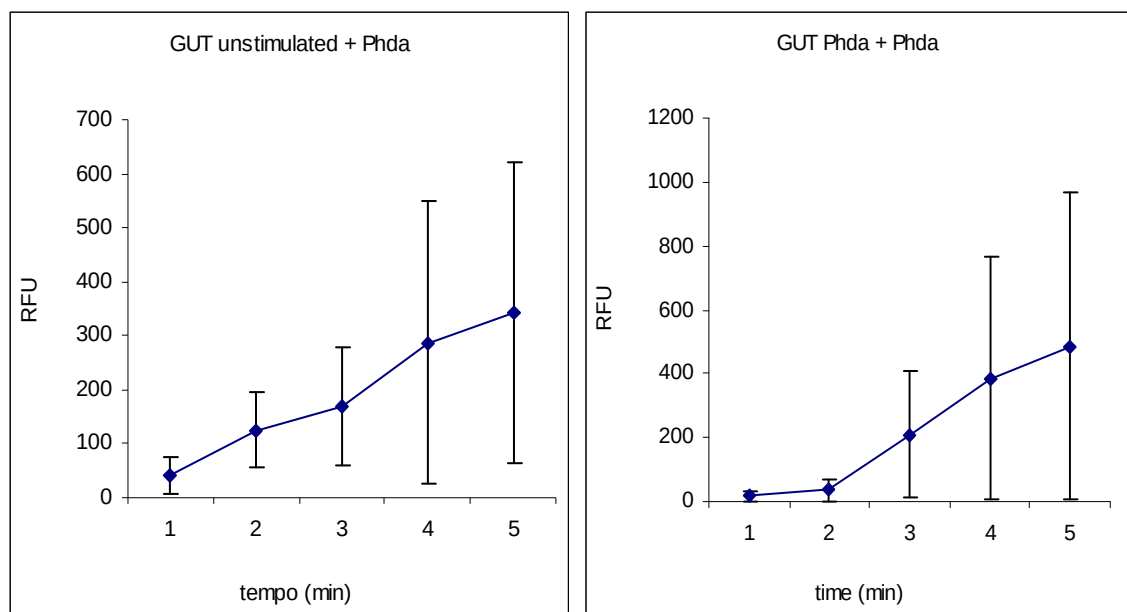


Figura 48: Stimolazione di leucociti dell'intestino di spigola con *Photobacterium damsela*

I grafici mostrano il rilascio di Ca^{2+} , in seguito a stimolazione con il batterio *Ph. damsela*, dei leucociti dell'intestino di spigole di controllo e vaccinate da 30 giorni con *Photobacterium damsela*.

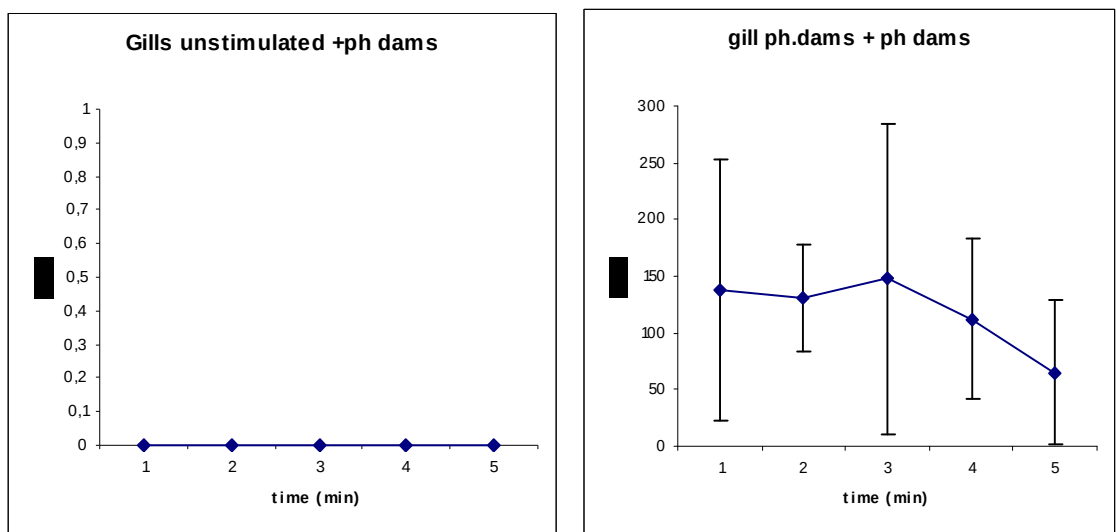


Figura 49: Stimolazione di leucociti di branchie con *Photobacterium damsela*

I grafici mostrano la cinetica del rilascio di Ca^{2+} in seguito a stimolazione con il batterio dei leucociti delle branchie di spigole vaccinate con *Photobacterium damsela* (30 giorni dopo il richiamo, 60 giorni dall'inizio della vaccinazione) e di controllo.

Discussione e Conclusioni

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli studi sulla fisiologia del sistema immunitario dei pesci teleostei possono essere utili, poiché questo gruppo di Vertebrati rappresenta un modello sempre più utilizzato sia per studi sull'evoluzione del sistema immunitario, che per studi sull'applicazione dei risultati nel campo delle biotecnologie animali, attualmente in forte crescita. Inoltre, essendo i pesci ossei tra i Vertebrati più antichi, la loro architettura anatomica è alla base di quella presente in tutti gli altri gruppi di questo subphylum; di conseguenza, geni omologhi a quelli dei Mammiferi sono presenti nei Teleostei e lo studio di questi ultimi può essere di aiuto per comprendere i vari passaggi evolutivi che hanno accompagnato le specializzazioni presenti in tutti i gruppi di Vertebrati.

La trasduzione del segnale è un processo di comunicazione cellulare che ha un ruolo fondamentale per la vita degli organismi; in questa tesi di Dottorato si è studiata una delle vie di segnalazione: la trasduzione del segnale via calcio; le variazioni nella concentrazione intracellulare di tale ione, possono mediare, infatti, una vasta gamma di reazioni cellulari e far parte di molte vie di segnalazione. I risultati ottenuti in questa tesi potranno contribuire a chiarire l'evoluzione delle risposte di segnalazione mediate da recettore e dei meccanismi di segnalazione delle molecole immunomodulatorie.

Lo scopo di questa tesi di Dottorato è stato investigare gli effetti indotti dalla stimolazione con IL-1 β ricombinante, terreno condizionato, *Photobacterium damsela* e nodavirus sulla concentrazione intracellulare di calcio nei leucociti di due specie importanti di Teleostei: la spigola (*Dicentrarchus labrax*) e la trota (*Oncorhynchus mykiss*). La scelta è caduta su queste due specie, in quanto paragonando i risultati ottenuti da una specie marina e una dulciacquicola è possibile capire se un determinato processo è tipico solo di una specie o è comune ai pesci che vivono in entrambi gli ambienti. Inoltre spigola e trota sono anche due specie rappresentative di due gruppi di Teleostei evolutivamente distanti.

I Teleostei stanno, inoltre, acquisendo un ruolo sempre più rilevante anche in campo biotecnologico. L'acquacoltura in allevamento intensivo ha avuto una crescita imponente in tutto il mondo negli ultimi due decenni arrivando ad una produzione di circa 100 milioni di tonnellate di specie allevate contro i 27 milioni di 50 anni fa. Il contributo dell'acquacoltura al

mercato ittico, che era dell'1.5% sul totale dei pesci pescati nel 1950, rappresenta ora il 30% del totale mondiale (dati FAO del 2002). Contemporaneamente, anche il consumo medio pro-capite di pesce segue lo stesso andamento di crescita, arrivando fino ad una media mondiale di 16.3 kg/anno; tuttavia, il consumo pro-capite nei paesi europei cambia con le differenze culturali e con le diverse abitudini alimentari e si aggira intorno ai 26.3 kg/anno, mentre in Italia è superiore ai 24 kg/anno.

I moderni allevamenti ittici praticano l'acquacoltura secondo criteri rigorosi per offrire un prodotto sicuro e controllato, in modo da soddisfare la crescente domanda di prodotto pregiato a costi contenuti, senza arrecare danni all'ambiente marino.

Considerati il continuo aumento del fabbisogno alimentare mondiale ed il conseguente impoverimento delle riserve ittiche naturali, si cerca di fare affidamento sulle biotecnologie applicate all'acquacoltura, il cui obiettivo principale è quello di migliorare e/o aumentare le produzioni negli allevamenti, cercando naturalmente di ridurre i costi. Attualmente l'allevamento e le tecnologie ad esso collegate sono più spesso rivolti alle specie d'acqua dolce, ma appare sempre più chiara l'insufficienza della pesca di approvvigionamento e la necessità di una maggiore applicazione delle biotecnologie nell'utilizzazione delle risorse marine. Per migliorare ed aumentare la produzione in acquacoltura, ci si indirizza principalmente verso lo studio e la ricerca finalizzata al miglioramento genetico delle specie ittiche pregiate, al miglioramento delle condizioni di allevamento e alla riduzione dell'utilizzo di antibiotici e sostanze farmacologicamente attive. Purtroppo, la situazione nell'acquacoltura non è allo stesso livello biotecnologico degli altri settori zootecnico-veterinari. Questo fatto è dovuto principalmente alla minore conoscenza della fisiologia degli organismi acquatici allevati, dovuta al ritardo con cui sono iniziati gli studi sia sui pesci che sui loro patogeni. Infine, vi è un certo ritardo tra quanto sperimentato ed ottenuto nei pesci d'acqua dolce rispetto a quanto fatto sinora sulle specie marine.

La citochina IL-1 β è una potente mediatrice delle risposte immuni e infiammatorie alle infezioni (Dinarello, 1994) e le sue molteplici attività biologiche si esplicano attraverso processi recettore-mediati e complesse vie intracellulari di trasduzione del segnale. Il gene codificante per l'IL-1 β è stato riscontrato in tutti i Vertebrati mandibolati, per questo motivo esso rappresenta il gene ideale per lo studio dell'evoluzione delle citochine in questi organismi (Scapigliati et al., 2000); a tale proposito, è interessante studiare l'evoluzione delle attività pleiotropiche associate all'IL-1 β dalla sua comparsa nei pesci fino ai Vertebrati superiori. Le funzioni biologiche dell'IL-1 β dei pesci sono state in parte studiate sia "*in vivo*" che "*in vitro*" e alcune di esse sembrano essere identiche a quelle presenti negli altri

Vertebrati (Hong et al., 2001; 2003; Holland et al., 2002; Yin and Kwang 2000; Mathew et al., 2002; Buonocore et al., 2005; Scapigliati et al., 2006); da questi studi si evince che l'IL-1 β è la citochina meglio caratterizzata in tutti i Vertebrati non-Mammiferi.

L'IL-1 β ricombinante di entrambe le specie è stata clonata ed espressa nel batterio *Escherichia coli*, che presentava il gene per l'interleuchina inserito nel vettore d'espressione pQE30 (Qiagen); le caratteristiche di questo vettore sono: presentare un promoter T5, un *lac* operator, un sito per il legame dei ribosomi (RBS), il codone di start (ATG), la sequenza per il tag di sei istidine (6xHis), il sito di riconoscimento per il fattore delle proteasi Xa, un sito di clonaggio multiplo (MCS), i codoni di stop, il punto di origine della replicazione (Col E1) e il gene per la resistenza all'ampicillina che permette la selezione delle colonie.

La purificazione, in condizioni native, è avvenuta mediante cromatografia di affinità con il kit Ni-NTA spin column (Qiagen) che è in grado di riconoscere la presenza del tag di sei istidine situato all'N-terminale della citochina. L'avvenuta induzione e il grado di purezza sono stati stabiliti con un SDS-PAGE al 10% di acrilammide e la concentrazione della citochina purificata è stata stimata mediante il dosaggio Bradford. Questa tecnica prevede l'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant blue, in grado di legarsi ai residui basici delle proteine; poiché il contenuto di aminoacidi basici varia a seconda della proteina presa in esame, questo metodo fornisce solo una misura relativa della quantità della proteina. Per calcolare la concentrazione proteica è stato necessario costruire una retta di taratura che esprimesse l'assorbanza a 595 nm in funzione della concentrazione di una proteina nota, l'albumina di siero bovino (BSA). La retta di taratura così ottenuta è stata utilizzata per interpolare la concentrazione dell'IL-1 β trattata alla stessa maniera della BSA e opportunamente diluita, per fare in modo che la sua assorbanza ricadesse nell'intervallo di quella della BSA.

Il primo passo per studiare la risposta intracellulare indotta dall'interleuchina è stato valutare se questa induceva o meno un flusso di calcio; a tale scopo, i leucociti di entrambe le specie, pre-marcati col fluorocromo Fura-2AM, sono stati stimolati con diverse concentrazioni della propria citochina. L'analisi del flusso di calcio è stata effettuata mediante un fluorimetro a doppia emissione di fluorescenza; i leucociti sono stati contemporaneamente eccitati con due lunghezze d'onda, 355 e 450 nm, per 0.1 secondi e la misurazione della fluorescenza emessa dalle cellule ha permesso la quantificazione del calcio intracellulare, che è stata espressa in unità di fluorescenza relativa (RFU).

Dopo questo screening iniziale, che ha permesso di stabilire quale fosse la migliore concentrazione di interleuchina di entrambe le specie con la quale poter lavorare, e se gli effetti sul calcio intracellulare fossero dovuti al legame saturante col recettore, il peptide è

stato utilizzato come stimolo su leucociti purificati da PBL, rene cefalico, milza, branchie, intestino e timo di spigola e sugli splenociti di trota iridea ad una concentrazione pari a 200 ng/ml. Dopo l'aggiunta della citochina è stato possibile osservare un rapido aumento del calcio intracellulare in entrambe le specie con un successivo decremento che termina 5 minuti dopo la stimolazione; tale decremento risulta molto più evidente nella spigola.

I parametri della risposta alla stimolazione, ovvero ampiezza e cinetica, si è visto che variano da organo a organo; la cinetica più veloce è stata osservata in PBL, e intestino di spigola, mentre l'ampiezza maggiore si è ottenuta in milza e intestino di spigola. Se si continua il monitoraggio del flusso di calcio dopo i 5 minuti, si possono osservare una serie di oscillazioni della concentrazione dello ione a livello citoplasmatico (dati non mostrati) che forse sono risposte aspecifiche dovute alla prolungata esposizione delle cellule allo stimolo.

Il flusso di calcio non è stato osservato sia quando i leucociti sono stati stimolati con il peptide denaturato dopo esposizione a 100°C per 1 minuto sia quando le cellule sono state stimulate col buffer di eluizione della citochina stessa, quest'ultimo risultato (non mostrato) ha permesso di affermare ancora con più certezza che l'effetto sul calcio citoplasmatico è stato indotto dal legame peptide-recettore.

La conferma che il flusso di calcio si generasse negli organuli di accumulo presenti nel citoplasma e non dal mezzo di coltura, è venuta da esperimenti di stimolazione effettuati su leucociti risospesi in terreno contenente l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), un agente chelante che è in grado di formare complessi molto stabili con tutto il Ca^{2+} extracellulare, rendendolo così indisponibile per la cellula.

I risultati inerenti le variazioni nella concentrazione di calcio intracellulare, osservate con gli esperimenti precedenti, rappresentano la sommatoria degli effetti indotti sull'intera popolazione leucocitaria, ovvero sia sulle cellule B che sulle cellule T; per poter studiare il contributo delle singole sottopopolazioni, è stata effettuata la purificazione di queste ultime mediante sorting magnetico impiegando gli anticorpi monoclonali DLig3 e DLT15, precedentemente prodotti nel Laboratorio di Biotecnologie Animali e Zoologia Applicata dell'università della Tuscia (Scapigliati et al., 1995; 1996). Questa tecnica permette di separare le cellule B dalle T, impiegando due anticorpi: un monoclonale specifico per le cellule B (DLig3) o T (DLT15), e un anticorpo secondario coniugato con ferro; le cellule selezionate con l'anticorpo primario resteranno intrappolate all'interno della colonnina, a sua volta collegata ad un magnete, mentre le altre fuoriescono. L'eluizione delle cellule selezionate avviene semplicemente staccando la colonna dal magnete. I risultati ottenuti con il sorting magnetico hanno mostrato che le due sottopopolazioni rispondono in maniera

differenti: le cellule T hanno una cinetica di rilascio e riassorbimento più veloce, l'ampiezza del segnale è, però, maggiore nelle cellule B. È interessante notare che cinetiche migliori si osservano nelle cellule selezionate negativamente (per esempio nelle cellule T non legate al DLlg3), una spiegazione di questa alterazione può essere che le cellule che hanno interagito con l'anticorpo di selezione abbiano già innescato a livello intracellulare dei meccanismi di trasduzione del segnale che vanno, quindi, a sommarsi a quelli provocati dalla stimolazione con l'IL-1 β .

Gli stessi esperimenti sono stati effettuati sulle cellule mononucleari di sangue periferico umane (PBMC) utilizzando l'interleuchina umana come agente stimolante, poiché lavori precedenti avevano mostrato che nei Mammiferi si avevano "*in vitro*" risposte differenti in base ai tipi cellulari presi in esame (Mizel, 1990; Stanton et al., 1986; Georgilis et al., 1987; Abraham et al., 1987; Schettini et al., 1988; Bouchelouche et al., 1988; Malgaroli et al., 1987; Verburg-van Kemenade et al., 1998; Pacifici et al., 1988; Pita et al., 1999). In accordo con questi studi, nessuna oscillazione del calcio intracellulare è stata osservata durante i 5 minuti di stimolazione analizzati. Questa osservazione ha portato alla conclusione che, durante il processo evolutivo, il rapido e diretto effetto sulla concentrazione di calcio intracellulare, osservato nei pesci, è andato perso.

Il passo seguente dello studio sugli effetti indotti dall'interleuchina-1 β è stato verificare se questi sono specie-specifici; a tale scopo, leucociti di spigola, trota iridea e i PBMC sono stati stimolati con le citochine delle altre specie. Poiché l'aggiunta delle interleuchine eterologhe non ha prodotto effetti sulla concentrazione di calcio intracellulare, si può affermare con sicurezza che la risposta dei leucociti all'interleuchina è strettamente specie-specifica; questi dati sono in accordo con lavori precedenti (Hong et al., 2001) in cui è stato osservato che, per poter avere lo stesso effetto dell'interleuchina umana, una dose 1000 volte maggiore di interleuchina di trota era necessaria per stimolare la linea cellulare murina D10.G4.1.

Quindi, considerando la significativa omologia tra l'interleuchina umana e di pesce (Zou et al., 1999; Scapigliati et al., 2001) e i dati recenti sulla struttura tridimensionale dell'interazione IL-1/IL-1R_I nei pesci (Scapigliati et al., 2004), la specie-specificità osservata può generarsi dalle diverse proprietà di legame del ligando all'IL-1R come, per esempio, è il caso dell'IL-1R antagonista che non è capace di provocare la segnalazione intracellulare (Hannum et al., 1990).

La verifica dell'avvenuto legame tra la citochina e il suo recettore è stata effettuata con esperimenti di cross-linking; i leucociti e l'interleuchina sono state incubati, poi lisati e analizzati in Western blotting con l'anticorpo anti-6xHis, ciò ha permesso di osservare la

presenza di una struttura proteica di circa 84 kDa corrispondente al complesso citochina + recettore.

Dai dati ottenuti, appare, quindi, evidente il coinvolgimento di un IL-1R_I funzionale e in grado di mediare la segnalazione. Sapendo che un omologo dell'IL-1R_I è stato clonato nei pesci (Holland et al., 2002; Sangrador-Vegas et al., 2000; Subramanian et al., 2002), gli splenociti sono stati trattati, prima della stimolazione e dell'analisi della concentrazione intracellulare di calcio, con diverse diluizioni dell'enzima proteolitico tripsina con lo scopo di danneggiare il recettore di membrana per la citochina. I risultati hanno mostrato una forte sensibilità delle cellule alla blanda tripsinizzazione alla quale sono state sottoposte, suggerendo la presenza, negli splenociti di entrambe le specie, di un ecto-peptide coinvolto nel legame dell'interleuchina-1β e sensibile alla tripsina, similmente all'IL-1R.

Il legame tra IL-1 e il suo recettore innesca nei Mammiferi l'attivazione di una via che porta alla fosforilazione di substrati proteici a livello dei residui di tirosina (Saklatvala et al., 1990); in particolare, è stato osservato che nella linea cellulare murina EL-4, l'interleuchina, oltre alla fosforilazione sui residui di tirosina, induce anche l'idrolisi del GTP e l'attivazione delle proteine G (O'Neill et al., 1990).

Per testare se questa via era presente anche nei pesci, gli splenociti di spigola e trota sono stati incubati con la rispettiva citochina e lisati. Il lisato è stato, poi, analizzato in Western blotting con l'anticorpo monoclonale antifosfotirosina clone 4G10. Lo sviluppo della nitrocellulosa ha evidenziato una banda reattiva di debole intensità ma chiara che è stata evidenziata per entrambe le specie; questa banda appare ad un'altezza che corrisponde ad un peso di circa 24 kDa. Nella spigola questa banda compare 5 minuti dopo la stimolazione e permane fino a 10 minuti, nella trota essa si ritrova anche nei campioni prelevati dopo 20 minuti dalla stimolazione. In entrambi casi, paragonando questo risultato con le cinetiche di rilascio e riassorbimento del calcio, è possibile affermare che la fosforilazione del substrato di 24 kDa avviene quando il calcio citoplasmatico è stato di nuovo riassorbito negli organuli di accumulo.

Gli splenociti di entrambe le specie sono stati esaminati anche con gli anticorpi policlonali antifosfoserina e antifosfotreonina, per poter verificare se anche altri residui amminoacidici venivano fosforilati. Questa ulteriore analisi ha mostrato risultati differenti nelle due specie; nella spigola, infatti, si è osservata una fosforilazione a livello dei residui di treonina di un substrato di 24 kDa; anche in questo caso, la banda compare nei campioni prelevati dopo 5 minuti dall'avvenuta stimolazione e permane fino a 10 minuti, si può affermare, quindi, che anche la fosforilazione dei residui di treonina avviene quando non c'è più calcio libero nel

citoplasma. Il blotting effettuato con l'anticorpo antifosfoserina non ha evidenziato bande reattive.

Nella trota iridea, al contrario di quanto visto per la spigola, non si sono osservate bande reattive con l'analisi fatta mediante l'anticorpo antifosfotreonina, invece il Western blotting effettuato con l'anticorpo antifosfoserina ha evidenziato ben due bande reattive; queste bande, che hanno un peso corrispondente a circa 40 e 24 kDa, compaiono subito nei campioni prelevati dopo un minuto dall'aggiunta dello stimolo. Di queste due bande, quella di 24 kDa non è più presente nei campioni prelevati dopo 5 minuti dalla stimolazione, mentre quella di 40 kDa resta visibile per tutti i 20 minuti analizzati; si può affermare quindi che, nella trota iridea, la fosforilazione sui residui di serina del substrato di 24 kDa avviene contemporaneamente alle fasi iniziali del rilascio di calcio nel citoplasma, mentre la fosforilazione del substrato di 40 kDa si ha subito dopo l'aggiunta dello stimolo e il substrato resta fosforilato durante l'intero processo di rilascio e riassorbimento del calcio. In lavori precedenti, è stata già riscontrata la fosforilazione di tale substrato in una linea cellulare umana, in cui questo substrato sembra corrispondere ad una MAP chinasi che fosforila una heat shock protein, la hsp27 (Freshney et al., 1994); una doppia fosforilazione è stata osservata anche da Huot et al. (1995), nel cui lavoro veniva messo in evidenza che una MAP chinasi di circa 40 kDa, dopo essere stata fosforilata sui residui di serina in seguito a stimolazione con IL-1, andava a fosforilare una heat shock protein di circa 27 kDa.

Come controllo, gli splenociti di spigola sono stati trattati, prima della stimolazione con l'IL-1 β , con la genisteina, ovvero il 4'-5'-7'-triidrossiisoflavone. Questa molecola è un isoflavone isolato per la prima volta in *Pseudomonas* sp. (Papazisis et al., 2006) ed è noto soprattutto per essere un agente chemoprotettivo (Ravindranath et al., 2004), e in grado di bloccare la tumorigenesi (Dorai and Aggarwal, 2004). Essa ha molteplici attività: è una sostanza fitoestrogena, e svolge anche una attività fortemente inibitoria specifica per le tirosin-chinasi (Trevillyan et al., 1990; Atluru et al., 1991); ad alte concentrazioni, agisce da inibitore anche sul fattore di crescita epidermico, sulle src chinasi, sulle abl chinasi e sulla topoisomerasi II, questo ultimo effetto può essere giustificato dalla similarità del sito di legame per l'ATP, presente nella topoisomerasi, con quello per la genisteina delle tirosin-chinasi. A livello cellulare, la genisteina inibisce la progressione del ciclo cellulare e blocca le cellule, che esprimono il fattore di crescita epidermico, nella fase G2 del ciclo cellulare (Matsukawa et al., 1993; Constantonou et al., 1998; Lian et al., 1998). La scelta dell'uso della genisteina per questa tesi di Dottorato è stata effettuata con lo scopo di verificare se la fosforilazione del substrato di 24 kDa avveniva dopo la stimolazione e quindi faceva parte della cascata di

eventi della trasduzione del segnale dell'interleuchina; a tale scopo si è sfruttata la capacità dell'isoflavone di bloccare le tirosin-chinasi.

Gli splenociti, pre-trattati con la genisteina, stimolati con l'IL-1 β e lisati, sono stati analizzati in Western blotting con gli anticorpi antifosfoserina, antifosfotreonina e antifosfotirosina e nessuno dei tre anticorpi ha evidenziato la presenza delle bande reattive osservate, invece, in assenza della genisteina; i risultati ottenuti, quindi, hanno permesso di affermare che le fosforilazioni sui residui di serina, treonina e tirosina osservate in precedenza fanno parte della via di trasduzione del segnale innescata dall'IL-1 β e mediata dal calcio.

Per comprendere meglio questi dati, è necessario ricordare che omologhi del recettore per l'interleuchina –associato alle chinasi (IRAK) sono altamente conservati e sono stati scoperti in Insetti e Mammiferi (O'Neill and Green, 1998). IRAK è una famiglia composta da quattro membri: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M, IRAK-4; tutti i membri possiedono un dominio death all'N-terminale e un dominio ad attività chinasi alla porzione C-terminale; tra i membri di questa famiglia, IRAK-1 e IRAK-4 sono quelli che mediano gli eventi della trasduzione del segnale. È stato recentemente scoperto, infatti, che, in seguito a stimolazione delle cellule di topo EL-4 con l'interleuchina, IRAK-1 subisce dei cambiamenti tali che portano alla sua traslocazione nel nucleo, all'autofosforilazione, e alla rapida fosforilazione di un substrato citoplasmatico sconosciuto di 24 kDa (Böl et al., 2005); vista la corrispondenza tra il dato osservato da Böl et al e il peso molecolare della banda reattiva all'anticorpo antifosfotirosina vista negli esperimenti di questa tesi di Dottorato, si può ipotizzare che c'è una sorta di conservazione negli eventi associati alla segnalazione dell'IL-1. E' stato osservato, poi, che la stimolazione della linea cellulare 293-TK/Zeo con l'IL-1 β , fa sì che IRAK-1 interagisca con il recettore per il TNF associato al fattore 6 (TRAF6) e che quest'ultimo, a sua volta, formi un complesso con TAB1, TAB2, e TAK1. La formazione di questo complesso e le sue interazioni con alcuni fattori citoplasmatici, necessari tra l'altro per l'attivazione di TAK1, portano all'attivazione del fattore nucleare kappaB (NF- κ B) e di JNK (Jiang et al., 2002).

IRAK-4 è l'unico membro della famiglia IRAK a presentare una vera e propria attività chinasi ed è omologo all'IRAK-like chinasi di *Drosophila* (Lasker et al., 2005); esso è essenziale per la segnalazione indotta dall'IL-1 e mediata dal Toll-like receptor (TLR) e dal T-cell receptor (TCR); l'attività di IRAK-4 porta, tra le altre funzioni, all'attivazione del fattore nucleare kappaB (NF- κ B), aumenta la fosforilazione di c-Jun, attiva l'attivatore della trascrizione della proteina-1 (AP-1), e attiva le MAP chinasi e la c-Jun N-terminale chinasi. E' stato, inoltre, dimostrato che l'IL-1 nell'uomo induce la formazione di un complesso tra

IRAK-4 e Pellino 1 necessaria sia per l'attivazione dell'NF- κ B sia per l'espressione del gene dell'IL-18 (Jiang et al., 2003).

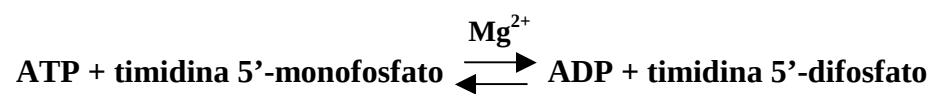
Inoltre, bisogna ricordare che in uno studio precedente, condotto su una linea cellulare umana, è stato osservato che la porzione C-terminale dell'IL-1R_I contiene un putativo dominio di legame (Tyr-E-X-Met) per il fosfatidilinositolo-3 chinasi che è altamente conservato; questo sito di legame viene altamente fosforilato sui residui di tirosina dopo 5 minuti dall'avvenuta stimolazione con l'interleuchina-1 (Marmiroli et al., 1998); anche questo dato è in accordo con ciò che è stato osservato dai Western blotting effettuati con l'anticorpo antifosfotirosina, ovvero in entrambi i casi, la fosforilazione sui residui di tirosina, indotta dalla citochina, avviene dopo 5 minuti dall'aggiunta dello stimolo.

Per poter ulteriormente investigare sulla natura del substrato di 24 kDa, gli splenociti di spigola sono stati marcati con S³⁵, lisati e immunoprecipitati con l'anticorpo antifosfotirosina, sfruttando l'alta affinità di legame tra l'anticorpo e la proteina, dopodiché sono stati analizzati in Western blotting con il medesimo anticorpo e le bande corrispondenti alle proteine fosforilate sono state visualizzate su un'autoradiografia dopo aver esposto per 48h la nitrocellulosa su lastra fotografica; la scelta di utilizzare il radioattivo è giustificata dal fatto che la banda di 24 kDa osservata in Western blotting nei campioni trattati con l'IL-1 β e analizzati con il 4G10 è molto debole e l'autoradiografia, che è molto più sensibile, ne permette una visualizzazione migliore.

La marcatura metabolica e l'immunoprecipitazione hanno fornito due risultati molto interessanti: innanzitutto si è osservato che il substrato di 24 kDa non precipita ma rimane in sospensione, poi è stato evidenziato che esso è un prodotto costitutivo, ovvero si riscontra sia nei leucociti di controllo sia in quelli stimolati con la citochina, ma in questi ultimi la sua espressione è notevolmente aumentata. In base a questi dati, sulla banda di 24 kDa è stata effettuata un'analisi proteomica, uno studio che permette di identificare e localizzare le proteine e le loro interazioni; per poter effettuare questa analisi, è stato approntato un SDS-PAGE al 12% di acrilammide, che è stato caricato con gli splenociti, lisati sia stimolati che di controllo, e colorato con Blue di Coomassie colloidale. La banda corrispondente a 24 kDa è stata, quindi, tagliata con un bisturi e sottoposta a digestione triptica per poterla sequenziare mediante nanoRP-HPLC-ESI-MS/MS; dagli spettri ottenuti è stato possibile stabilire la sequenza del peptide di 24 kDa, e questa è stata confrontata con le sequenze presenti nel National Center of Biotechnology Information non redundant database (NCBI_{nr}) usando il programma Mascot (MatrixScience), che, basandosi sull'algoritmo Mowse, tiene conto dell'abbondanza relativa dei peptidi nel database e delle dimensioni della proteina

identificata. I parametri utilizzati per la ricerca nel database sono stati: completa carbamidometilazione delle cisteine e parziale ossidazione delle metionine, peptide Mass Tolerance ± 1.2 Da, fragment Mass Tolerance ± 0.9 Da, missed cleavages 2. Per l'identificazione sono stati considerati validi i valori con $P < 0.05$.

Con questi esperimenti, si è potuto scoprire che il substrato fosforilato sui residui di tirosina è molto simile alla timidilato chinasi, un enzima che catalizza la fosforilazione della timidina 5'-monofosfato (dTMP) per formare la timidina 5'-difosfato (dTDP), un importante precursore per la sintesi del DNA, in presenza di ATP e magnesio, come schematizzato nella seguente reazione:



La sequenza ottenuta è stata studiata anche con il motore di ricerca FASTA (FAST-All), un programma basato su un algoritmo euristico di allineamento che consente di effettuare una ricerca per similarità tra le proteine presenti in banca dati. In base a questa ricerca, si è potuto verificare che la timidilato chinasi possiede una struttura amminoacidica altamente conservata.

Molti sono gli studi che devono ancora essere effettuati per ben comprendere la natura e la funzione di questo substrato, il lavoro di questa tesi di Dottorato è, però, un contributo fondamentale per tale determinazione.

Visto i risultati ottenuti stimolando i leucociti con l'IL-1 β , il passaggio successivo in questa tesi di Dottorato è stato verificare se anche altri stimoli di natura biologica potessero innescare una via di segnalazione che prevede l'utilizzo del calcio come secondo messaggero; come modello sperimentale per quest'ultima parte è stata utilizzata solamente la spigola, la decisione è stata motivata soprattutto per la più facile reperibilità di questo pesce.

Il secondo agente utilizzato come stimolo, è stato il terreno condizionato, ovvero il sopranatante dei leucociti impegnati in una reazione "MLR". Un terreno condizionato, quindi, è, per sua natura, altamente ricco di cataboliti e fattori di crescita secreti dalle cellule in proliferazione. Una reazione "MLR" comporta la trasformazione blastica dei leucociti coltivati "*in vitro*" in presenza di leucociti allogenici (coltura linfocitaria mista). Si distinguono due tipi di reazioni "MLR": quella a due vie, in cui le due popolazioni di leucociti si stimolano a vicenda a trasformarsi e a proliferare, e reazioni a una via, in cui una sola delle

due popolazioni viene sottoposta ad un trattamento mediante Mitomicina C o irradiazione, in maniera tale da renderla incapace a proliferare. In entrambi i casi, la reazione avviene grazie alle interazioni tra i differenti antigeni di istocompatibilità presenti sulle membrane.

Il terreno condizionato, usato per la determinazione del flusso di calcio, è stato prelevato da reazioni “MLR” a due vie effettuate sia con leucociti di rene cefalico che con leucociti di sangue periferico (PBL). Gli esperimenti sono stati effettuati solamente sugli splenociti di spigola, in quanto, come già osservato per le stimolazioni con l’IL-1 β , sono i leucociti che danno una risposta maggiore in quanto a flusso di calcio.

Il primo passo, in questa serie di esperimenti, è stato cercare la giusta concentrazione delle componenti del terreno condizionato tali da poter indurre la mobilitazione del calcio citoplasmatico, per questo motivo delle aliquote sono state prelevate a diversi stadi della reazione “MLR”. Ovviamente, più il prelievo è stato effettuato tardi e più il terreno condizionato era ricco dei fattori rilasciati dalle cellule in proliferazione. Il terreno, quindi, è stato somministrato alle cellule senza andare a quantificare le sue componenti, poiché lo scopo di questo lavoro era solamente verificare se il calcio interveniva o meno come secondo messaggero anche in questa via di segnalazione. La risposta maggiore, espressa in RFU, si è ottenuta stimolando gli splenociti con terreno condizionato prelevato dopo diversi giorni dall’inizio della reazione “MLR”.

Gli splenociti erano stati, precedentemente, risospesi non in terreno, ma in PBS osmolare $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free, e ciò ha permesso di stabilire con certezza che il flusso di calcio osservato si generava negli organuli cellulari per riversarsi nel citoplasma.

Il flusso di calcio, inoltre, anche in questo caso risulta essere dose-dipendente; infatti, stimolando gli splenociti con diverse concentrazioni di terreno condizionato è possibile notare una diversa ampiezza della curva di rilascio calcio.

L’analisi del flusso, effettuata al fluorimetro, ha permesso di verificare che la stimolazione con terreno condizionato, indipendentemente da quando questo è stato prelevato e dalla dose utilizzata come stimolo, induce un rapido aumento del livello di calcio intracellulare con un successivo decremento che termina 5 minuti dopo l’aver somministrato lo stimolo. Tale decremento risulta avvenire in maniera molto più rapida se, come stimolo, si utilizza il terreno condizionato prelevato dalla “MLR” dei leucociti di sangue periferico (PBL). Dai risultati ottenuti è stato, inoltre, evidenziato che se si utilizza terreno condizionato prelevato oltre 96h dall’inizio della reazione “MLR” le cellule rispondono a questa stimolazione con una serie di oscillazioni ad alta frequenza; questo potrebbe dipendere dall’alta concentrazione dei fattori

rilasciati dalle cellule nel terreno che provocano una serie di aperture/chiusure dei canali per il calcio molto simile con una frequenza molto simile a quella frequenza tetanica.

Tutti i risultati raccolti stimolando con terreno condizionato rappresentano la sommatoria degli effetti indotti sulle cellule B e sulle cellule T.

L'ultima parte di questa tesi di Dottorato si è basata sull'analisi del flusso di calcio su leucociti purificati da PBL, rene cefalico, intestino, milza, e branchie di esemplari di spigola vaccinati con *Photobacterium damsela* e nodavirus.

Questi esperimenti sono stati inseriti nel quadro delle ricerche del progetto integrato europeo IMAQUANIM (acronimo di Improved Immunity of Aquacultured Animals), che è stato iniziato nel 2005 e a tuttoggi coinvolge 22 partners europei tra università, istituti di ricerca ed imprese di dimensioni medio-piccole. Il laboratorio di Biotecnologie Animali e Zoologia Applicata dell'Università degli Studi della Tuscia (Viterbo) è uno dei partecipanti a questo progetto quinquennale. Tutti i partners lavorano allo sviluppo di tecnologie che evitano la produzione di animali geneticamente modificati per comprendere e migliorare il sistema di difesa immunitaria delle principali specie d'acquacoltura europee, come salmone, trota, orata, spigola, carpa, mitili ed ostriche.

Una delle priorità del progetto è quella di ampliare le conoscenze di base su come pesci e mitili acquisiscano l'immunità alle malattie. I dati verranno utilizzati come base tecnologica per individuare strategie di neutralizzazione rapida ed efficace per quelle malattie che incidono su pesci e mitili d'acquacoltura con gravi danni economici per l'industria stessa. Inoltre, i risultati saranno impiegati per lo sviluppo di vaccini e di immunostimolanti al fine di ridurre le perdite causate da malattie.

Le ricerche sulla risposta alle patologie di pesci in acquacoltura hanno sempre sofferto della mancanza di strumenti per identificare e quantificare gli elementi chiave coinvolti nella risposta immunitaria e cioè: di marcatori per i leucociti e per le citochine; della scarsità di dati sulle sequenze geniche; della scarsità di saggi funzionali per la valutazione di risposte di difesa innate ed acquisite. Tuttavia, le recenti attività di sequenziamento del genoma in molte specie, tra cui pesci e bivalvi, ha avuto un notevole risvolto positivo: ora è possibile identificare e marcare gruppi interi di geni e sviluppare strumenti molecolari e immunologici (anticorpi, ad esempio) per studiare la struttura e la funzione di molecole immunomodulatorie. Proprio grazie al coinvolgimento di tutte queste specie ittiche di notevole importanza commerciale ed economica, il progetto IMAQUANIM ha ottenuto un grande sostegno in ambito europeo, interessando oltre l'Italia, anche la Danimarca, la Norvegia, il Regno Unito, la Germania, la Spagna, la Francia, l'Olanda e la Repubblica Ceca, unendo le esperienze

scientifiche ed i mezzi tecnici di ciascun gruppo con il fine ultimo di contribuire il più possibile ad un'acquacoltura redditizia, responsabile e sicura per il consumatore e l'ambiente. I due agenti patogeni utilizzati per le vaccinazioni in questo progetto di ricerca sono stati il *Photobacterium damsela* e il nodavirus.

Il *Photobacterium damsela* è un batterio bastoncellare Gram-negativo, fermentante e non in grado di muoversi. Esso è noto come l'agente eziologico della pseudotubercolosi, una delle patologie più rilevanti delle orate (*Sparus aurata*) e delle spigole (*Dicentrarchus labrax*) (Snieszko et al., 1964, Lewis et al., 1970; Muroga et al., 1977; Ohnishi et al., 1982 Egusa et al., 1983; Yasunaga et al., 1983; Bakopoulos et al., 1997; Dos Santos et al., 2000; 2001 Magarinos et al., 2001). Essenzialmente esso provoca una setticemia in cui raramente si evidenziano segni all'esterno del corpo del pesce, molto spesso, invece, si hanno formazioni granulomatose a livello dei reni e della milza, dovute alla presenza delle colonie batteriche (Kusuda and Yamaoka, 1972), e un accumulo di materiale purulento nella cavità addominale (Lewis et al., 1970). Non c'è dubbio che la pasteurellosi sia una delle patologie più serie in grado di provocare il 40-50% di morti in un impianto (Yasunaga et al., 1983); l'infezione in genere avviene a temperature attorno ai 25°C e il microrganismo usa l'acqua come veicolo per raggiungere l'animale; è stato dimostrato, infatti, che esso non è in grado di resistere per più di 48 h in acqua (Janssen and Surgalla, 1968).

In molti lavori è stato dimostrato che i pesci possono essere "protetti" dalla pasteurellosi mediante vaccinazione (Kusuda and Fukuda, 1980; Dos Santos et al., 2000; 2001; Magarinos et al., 2001).

Usando cellule inattivate da formalina, con o senza adiuvante completo di Freund, e utilizzando più metodi di immunizzazione, Fukuda e Kusuda (1981b) riportarono risultati incoraggianti, il miglior risultato, che conferì il 100% di protezione al pesce, venne ottenuto mediante iniezione intraperitoneale. Più recentemente, Dos Santos et al. (2001) hanno dimostrato in vitro che in spigole (*Dicentrarchus labrax*) di 0.1, 2, 5gr, immunizzate per immersione, le branchie rappresentano l'organo che produce più anticorpi, ottenendo valori elevati circa 15 giorni dopo la vaccinazione.

I nodavirus sono virus molto semplici costituiti da due segmenti di RNA a singolo filamento e dalla proteina del capsido, responsabile anche della stimolazione del sistema immunitario dell'ospite. Ancora sono scarse le informazioni riguardanti le caratteristiche antigeniche della proteina del capsido, conoscenze fondamentali per la comprensione dei meccanismi proteggenti e un possibile suo uso a scopi vaccinali.

Questo virus è l'agente eziologico dell'encefalo retinopatia virale, una patologia a sintomatologia nervosa che colpisce varie specie ittiche di allevamento e che causa ingenti perdite economiche. La malattia, emersa recentemente, e il suo agente causale sono sottoposti a molteplici studi, ma non sono ancora disponibili efficaci mezzi terapeutici o profilattici che permettano di limitare i danni causati dai ricorrenti episodi di mortalità. L'evidenziazione di una immunità proteggente, in soggetti sopravvissuti, ha acceso l'interesse verso la possibilità di allestire dei vaccini per la profilassi vaccinale.

L'analisi effettuata con entrambi gli stimoli ha evidenziato non solo che i leucociti dei vari organi hanno cinetiche differenti tra loro, ma anche che la risposta alla stimolazione è strettamente collegata con il trascorrere del tempo dall'inizio della vaccinazione. Ciò permette di ipotizzare che l'immunizzazione induce degli effetti a lungo termine sulla modalità di trasduzione del segnale.

In conclusione, questo lavoro ha mostrato che nell'evoluzione della segnalazione dell'IL-1 β i Mammiferi hanno perso una funzione di trasduzione, che è rimasta invece nei pesci teleostei; inoltre, è stato messo in evidenza che la via di segnalazione avente il calcio come secondo messaggero può essere avviata anche da altri stimoli di natura biologica; infine, è stato dimostrato come le vaccinazioni influiscano sulla segnalazione cellulare alterando la risposta delle cellule allo stimolo.

Questa ricerca, però, non è che la base da sviluppare per poter ben comprendere i complessi processi della trasduzione del segnale.

Tra gli sviluppi futuri, per quanto concerne l'IL-1 β , ci saranno sicuramente studi volti a determinare la natura dei substrati fosforilati e a dettagliare i vari passaggi della cascata dei secondi messaggeri. Degli approfondimenti saranno effettuati nello studio degli effetti indotti dal terreno condizionato, *in primis* sarebbe opportuno determinare le risposte alla stimolazione delle singole sottopopolazioni leucocitarie, come già fatto per l'interleuchina, e verificare anche in questo caso la presenza e la natura di eventuali substrati fosforilati sui residui di tirosina, serina e treonina. Anche nel caso delle vaccinazioni, sarebbe interessante approfondire lo studio sugli effetti indotti a livello molecolare; inoltre si potrebbero anche ripetere i medesimi esperimenti ma su individui di età differente e trattati con sia con altri antigeni di immunizzazione sia con altre tecniche di vaccinazione, con lo scopo di poter verificare se gli effetti osservati in questa tesi di Dottorato sono da relazionarsi con l'età dei pesci, con l'antigene di immunizzazione, con la tecnica di vaccinazione o con tutti questi fattori.

RINGRAZIAMENTI

Questa tesi di Dottorato è il frutto del lavoro di tre anni, periodo durante il quale ho ricevuto l'appoggio sia morale che scientifico di molte persone. In primo luogo, desidero ringraziare il prof. Massimo Mazzini per avermi concesso l'opportunità di intraprendere questo percorso formativo; desidero ringraziare, inoltre, il prof. Giuseppe Scapigliati che è stato responsabile della mia istruzione scientifica fin dai tempi della tesi di Laurea. Un sentito grazie al prof. Francesco Buonocore non solo per avermi insegnato le tecniche di biologia molecolare utilizzate in questa tesi, ma soprattutto per i suoi preziosi consigli e per la sua disponibilità che non è mai mancata.

Desidero ringraziare, inoltre, anche chi ha collaborato al lavoro della mia tesi: il prof C.J. Secombes e il dottor J. Zou, dello Scottish Fish Research Centre (Aberdeen), per avermi fornito l'IL-1 β ricombinante di trota; la dottoressa Rita Falcioni, dell'Istituto Regina Elena (Roma), per avermi permesso di effettuare, presso il suo laboratorio, la marcatura metabolica e per avermi consigliata nell'uso del radioattivo; il prof. L. Zolla e la dottoressa A.M. Timperio, dell'università della Tuscia, che mi hanno aiutata nella parte della proteomica.

Un ulteriore ringraziamento va alla "Nuova Azzurro" di Civitavecchia (RM), in particolare al dr. Cesare Magugliani e al sig. Lorenzo Vela, per aver fornito le spigole necessarie alla sperimentazione; e al gruppo di pesca sportiva "Albatros" di Cura di Vetralla (VT), in particolar modo al sig. Diego, per aver fornito le trote iridee.

Un ringraziamento va anche alla prof. Nicla Romano per i suoi consigli e per la sua amicizia.

Uno speciale ringraziamento va, inoltre, agli amici e compagni di laboratorio: i miei fratelli goliardici Marco Granelli e Fabrizio Rizzo, Ilenia Boschi, Rosanna Gallo, Francesca Barbalace, Elisa Randelli, Daniela Casani, Maria Cristina Belardinelli, Laura Guerra, Beatriz Martin, Anna Zwart, Francesca Paderi, Giampaolo Zarletti, Massimo Tiberi, Elisabetta Caccia, Rita Piergentili.

Infine, il ringraziamento più importante va ovviamente alla mia famiglia: papà Umberto, mamma Prassede e Marco Vesnaver (hai portato il sole nella mia vita); grazie per avermi sempre aiutato e sostenuto, soprattutto nei momenti di sconforto, sopportando pazientemente il mio umore altalenante.

Dedico, quindi, a loro tre con tutto il cuore questo lavoro.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L and Scapigliati G (1996) Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 493-505

Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L and Scapigliati G (1997) Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 235-46

Abraham RT, Ho SN, Barna TJ, McKean DJ (1987) Transmembrane signalling during interleukin-1-dependent T cell activation. Interactions of signal-1 and 2-type mediators with the phosphoinositide-dependent signal transduction mechanism. *J. Biol. Chem* **262**: 2719-28

Aggarwal BB, Natarajan K (1996) Tumor necrosis factor: developments during the last decade. *Eur. Cytokine. Netw.* **7**: 93-124

Ainsworth AJ (1992) Fish granulocytes: morphology, distribution and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**: 123

Alberdi Jr F, Alderton MR, Korolik V, Coloe PJ, Smith SC (1995) Antibacterial proteins from piscine polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Cell Biol.* **73**: 38-43

Ames JB, Ishima R, Tanaka T, Gordon JI, Stryer L and Ikura M (1997) Molecular mechanics of calcium myristoyl switches. *Nature* **389**: 198-202

Anderson MK, Pant R, Miracle AL, Sun X, Luer CA, Walsh LJ, Telfer JL, Litman GW, Rothenberg EV (2004) Evolutionary origins of lymphocytes: ensemble of T cell and B cell transcriptional regulations in a cartilaginous fish. *J. Immunol.* **172**: 5851-60

Atluru D, Jackson TM, Atluru S (1991) Genistein, a selective protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **59**: 379-87

Auron PE (1998) The interleukin-1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**: 221-37

Avrameas S and Ternynck T (1995) Natural antibodies: the other side of the immune system. *Res. Immunol.* **146**: 235-48

Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocytes traffic. *Nature* **392**(6676): 565-8

Bakopoulos V, Volpatti D, Papangiotou E, Richards R, Galleotti M, Adams A (1997) Development of an ELISA to detect *Pasteurella piscicida* in culture and “spiked” fish tissue. *Aquaculture* **156**: 359-66

Ballou S, Lozanski G (1992) Induction of inflammatory cytokine release from human cultured monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* **4**: 361-8

Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC (1995) Serum amyloid A (SSA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* **36**: 1058-65

Bartl S, Baish MA, Flajnik MF, Ohta Y (1997) Identification of class I genes in cartilaginous fish, the most ancient group of vertebrates displaying an adaptive immune response. *J. Immunol.* **159**: 6097

Bayne CJ, Gerwick K, Fujiki K, Nakano M, Yano T (2001) Immune relevant (including acute phase) genes identified in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* **25**(3): 205-17

Benham A, Tulp A and Neejes J (1995) Synthesis and assembly of MHC-peptide complexes. *Immunol. Today.* **16**: 359-62.

Berridge MJ (1997) The AM and FM of calcium signalling. *Nature* **386**: 759-60

Bielek E (1981) Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* L., *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell and Tissue Research* **220**: 163-80

Bly JE, Grimm AS and Morris IG (1986) Transmission of passive immunity from mother to young in a teleost fish, haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **84A**: 309-14

Bly JE, Miller NW, Clem LW (1990) A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 211

Boehm T, Bleul CC (2007) The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat. Immunol.* **8**: 131-5

Boesen HT, Pedersen K, Koch C, Larsen JL (1997) Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarum* serogroup 01. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 543-53

Boismenu R and Havran WL (1997) A congenital view of $\gamma\delta$ T-Cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:57-63

Böl GF, Jurmann N, Brigelius-Flohé R (2005) Cellular trafficking of the IL-1R_I-associated kinase-1 requires intact kinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**: 279-87

Bootmann MD, Berridge MJ and Roderick HL (2002) Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* **12**: 563-5

Borelli V, Banfi E, Perrotta MG, Zabucci G (1999) Myeloperoxidase exerts microbicidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immunol.* **67**: 4149-52

Botham JW and Manning MJ (1981) The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.* **19**: 403-14

Bouchelouche PN, Reimert C, Bendtzen K (1988) Effects on natural and recombinant interleukin-1 α and β on cytosolic free calcium in human and murine fibroblasts. *Leukemia* **2**: 691

Bowden TJ, Cook P, Rombout JH (2005) Development and function of the thymus in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **19**: 413-27

Buonocore F, Mazzini M, Forlenza M, Randelli E, Secombes CJ, Zou J, Scapigliati G (2004) Expression in *Escherichia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin-1 β , a possible immunoadjuvant in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* **6**: 53-9

Buonocore F, Forlenza M, Randelli E, Benedetti S, Bossù P et al. (2005) Biological activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) recombinant IL-1 β . *Mar. Biotech.* **7**:609-17

Canetti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ (2001) Tumor necrosis factor- α and leukotriene B₄ mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **134**: 1619-28

Carugo O, Djinovic K and Rizzi M (1993) Comparison of co-ordinative behaviour of calcium(II) and magnesium(II) from crystallographic data. *J. Chem. Soc. Dalton Trans* 2127-35

Charlemagne J and Tourneier A (1998) Immunology of Amphibians. *Handbook of vertebrate immunology*, Pastoret PP et al. Eds., Acad. Pp. 63-72.

Chien JH, Jores K and Crowley MP (1996) Recognition by $\gamma\delta$ T-Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 511-32

Chiller JM, Hodgins HO and Weiser RS (1969) Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Studies of the kinetics of development of antibody producing cells and on complement and natural hemolysin. *J. Immunol.* **102**: 1202-7

Chilmonczyk S (1983) The thymus of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Light and electron microscopy study. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 59-68

Chin D and Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell. Biol* **10**: 322-8

Clem LW, Small Jr PA (1967) Phylogeny of immunoglobulin structure and function. I. Immunoglobulins of the lemon shark. *J. Exp. Med.* **125**: 893

Clem LW, Sizemore RC, Ellsaesser CF and Miller NW (1985) Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* **9**: 803-9

Clem LW, Miller NW and Bly JE (1991) Evolution of lymphocyte subpopulations, their interaction and temperature sensitivities. *Phylogenesi s of Immune Functions*, Warr G. and Cohen N. Eds., Boca Raton: CRC. 191-213

Costantinou AI, Kamath N, Murley JS (1998) Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer* **34**: 1927-34

Cuchens MA, Clem LW (1977) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell. Immunol.* **43**: 219

Cunha FQ, Assereuy J, Moss DW, Rees D, Leal LM, Moncada S et al (1994) Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1beta. *Immunol.* **81**: 211-5

Cupit PM, Hansen JD, McCarty AS, White G, Chioda M and Spada F et al. (2003) Ikaros family members from the agnathan *Myxine glutinosa* and the urochordate *Oikopleura*

dioica emergence of an essential transcription factor for adaptive immunity. *J. Immunol.* **171**: 6006–13

Daniels GD, Zou J, Charlemagne J, Partula S, Cunningham C, Secombes CJ (1999) Cloning of two chemokine receptors homologs (CXCR4 and CCR7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Leukoc. Biol.* **65**(5): 684-90

Danilova N, Homman VS, Sacher F, Ota T, Willet C, Steiner LA (2004) T cells and the thymus in developing zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 755-67

De Kinkelin P and Dorson M (1973) Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *J. of General Virology* **19**: 125-7

De Koninck P and Schulmann H (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science* **279**: 227-30

Dijkstra JM, Katagiri T, Hosomichi K, Yanagiya K, Inoko, H, Ototake M, Aoki T, Hashimoto K, Shiina T (2007) A third broad linkage of major histocompatibility complex (MHC) class I in teleost fish; MHC class II linkage and processed genes. *Immunogenetics* **59**: 305-21

Dinarello CA (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* **8**: 1314

Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-147

Dinarello CA (1997) Interleukin-1. *Cytokines and growth factors review* **8**: 253-265

Dixon B, Shum B, Adams EJ, Magor KE, Hedrick RP, Muir DG, Parham P (1998) CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.* **166**(1-2): 341-8

Dorai T, Aggarwal BB (2004) Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**: 129-40

Dos Santos NMS, Romano N, De Sousa M, Ellis AE, Rombout JHWM (2000) Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 583-96

Dos Santos NMS (2000) Development of immunity in sea bass: a study towards vaccination against pseudotuberculosis. *Wageningen University dissertation no. 2870* (Abstract)

Dos Santos NMS, Taverne-Thiele JJ, Barnes AC, Ellis AE and Rombout JHWM (2001) The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* **11**(1): 65-74

Duff DCB (1942) The oral immunisation of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.* **44**: 87

Du Pasquier L. and Flajnik M. (1998) Origin and evolution of the vertebrate immune system. In: *Fundamental Immunology*. Paul WE Ed., Philadelphia – N-Y: Lippincott-Raven, 4th Ed. Pp. 605-50

Ebashi S (1961) Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.* **50**: 236-44

Ebashi S and Lipmann F (1962) Adenosine triphosphate-linked concentrations of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J. Cell. Biol.* **14**: 389-400

Egusa S (1983) Disease problems in Japanese yellowtail, *Seriola quinquiradiata*, culture: a review. In: Stewart J. E. (ed.), *Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish*. Conseil International pour l'Exploration de la Mer, Copenhagen, pp. 10-18

Ellis AE (1977) The leukocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.* **11**: 435-91

Ellis AE (1989) The immunology of teleosts. In: Roberts RJ, editor. *Fish pathology*, 2nd edition. London: Bailliere Tindal, pp. 135-53

Ellison RT, Giehl TJ (1991) Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Investig.* **88**: 1080

Engstad RE, Robertsen B, Frivold E (1992) Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* **27**: 287-97

Esteban MA, Meseguer J, Garcia Ayala A and Agullero B (1989) Erythropoiesi and thrombopoiesis in the head kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural and quantitative study. *Anat record.* **248**: 533-41

Estévez J, Leiro J, Santamarina MT, Dominguez J and Ubeira FM (1994) Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 353-66

Evans DL, Hogan KT, Graves SS, Carlson RL, Floyd E, Dawe DL (1984) Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). III. Biophysical and biochemical properties affecting cytolysis. *Dev. Comp. Immunol* **8**: 599

Evans DL, Jaso-Friedmann L, Smith Jr. EE, ST. John A, Koren HS and Harris DT (1988) Identification of a putative antigen receptor of fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **141**: 324-32

Evans DL, and Jaso-Friedmann L (1992) Non specific cells as effectors on immunity of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**: 109-21

Fange R (1982) A comparative study of limphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2**: 23

Finn JP and Nielsen NO (1971) The inflammatory response in rainbow trout. *J. Fish Biol.* **3**: 463-78

Fletcher TC (1982) Non-specific defense mechanisms of fish. *Dev. Comp. Immunol.* (suppl. 2): 123-32

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**: 1039-49

Fujiki K, Shin DH, Nakao M and Yano T (1999) Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. *Immunogenetic* **49**(10): 909-14

Fujiki K, Shin DH, Nakao M and Yano T (2000) Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1-beta high affinity immunoglobulin E Fc receptor γ subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 229-42

Fukuda Y and Kusuda R (1981b) Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **47**: 147-50

Gabay JE, Almeida RP (1993) Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 97-102

Gabay C, Kushner L (1999) Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England J. Med.* **340**: 448-53

Ganz T, Lehrer RI (1997) Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **4**: 53-8

Gerken J, Renwrantz L (1994) A new mannan-binding lectin from the serum of the eel (*Anguilla anguilla* L.): isolation, characterization and comparison with the fucose-specific serum lectin. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **108**: 449

Georgilis K, Schaefer C, Dinarello CA, Kempner MS (1987) Human recombinant interleukin-1beta has no effect on intracellular calcium or on functional responses of human neutrophils. *J. Immunol.* **138**: 3403-7

Ghiara P, Scapigliati G, Tagliabie A, Boraschi D (1989) Differential binding of IL-1 alpha and IL-1 beta to receptors on B and T cells. *J. Immunol. Res.* **1**: 13-29

Gibson KM, McLean KA, Clewley JP (1991) A simple and rapid method for detecting human immunodeficiency virus by PCR. *J. Virol. Meth.* **32**:277-86

Gou JT, Aldrich CE, Mason WS, Pugh JC (1996) Characterization of serum amyloid A protein mRNA expression and secondary amyloidosis in the domestic duck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(25): 14543-53

Graham S and Secombes CJ (1988) The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leukocytes. *Immunology.* **65**: 293-7.

Greenhalgh P, Olesen CE and Steiner LA (1993) Characterization and expression of recombinant activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*. *J. Immunol.* **151**: 3100-10

Grymkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3444-50

Hanley PJ, Hook JW, Raftos DA, Gooley AA, Trent R and Raison RL (1992) Hagfish humoral defence protein exhibits structural and functional homology with mammalian complement component. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **89**:7910-4.

Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL et al., (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343**: 336-40

Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ (1994) Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **43**: 113

Hardie LJ, Laing KJ, Daniels GT, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1998) Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue

specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Cytokine* **10**(8): 555-63

Hardie LJ, Chappell L, Secombes CJ (1994) Human tumor necrosis factor alpha influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leukocyte responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 73-84

Harms CA, Kennedy-Stoskopf S, Horne WA, Fuller FJ, Tompkins WA (2000) Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) transforming growth factor beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **10**(1): 61-85

Hayman JR. and Lobb CJ (1993) Immunoglobulins in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 241-8

Heilbrunn LV (1940) The action of calcium on muscle protoplasm. *Physiol. Zool.* **13**: 88-94

Heilbrunn LV and Wiercinski FJ (1947) The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* **29**: 15-32

Hine PM (1992) The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* **2**: 79

Hirono I, Nam BH, Kurobe T, Aoki T (2000) Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Immunol.* **165**(8): 4423-27

Hoeflich KP and Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* **108**: 739-42

Hogan RJ, Stuge TB, Clem LW, Miller N and Chinchar VG (1996) Antiviral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* **20**: 115

Holland JW, Pottinger TG, Secombes CJ (2002) Recombinant interleukin-1 beta activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Endocrinol.* **175**: 261-7

Holland MCH, Lambris JD (2002) The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* **12**: 399-420

Hong S, Zou J, Crampe M, Peddie S, Scapigliati G, Bols N, Cunningham C, Secombes CJ (2001) The production and bioactivity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* recombinant IL-1 β . *Vet. Immunol. Immunopathol.* **81**: 1-14

Hong S, Peddie S, Campos-Perez J, Zou J, Secombes CJ (2003) The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 β on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 801-12

Hsu E, Pulham N, Rumfelt LL, Flajnik MF (2006) The plasticity of immunoglobulin gene systems in evolution. *Immunological Rev.* **210**: 8-26

Huang A, Sun D, Koller A (2000) Shear stress-induced release of prostaglandin H(2) in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension* **35**: 925-30

Huot J, Lambert H, Lavoie JN, Guimond A, Houle F and Landry J (1995) Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat shock protein HSP27. *Eur. J. Biochem.* **227**: 416-27

Huttenhuis HBT, Huising MO, van der Meulen T, van Oosterhoud CN et al. (2005) *Rag* expression identifies band T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* **29**: 1033-47

Huttenhuis HBT, Taverne-Thiele AJ, Grou CP, Bergsma J, Saeji JP, Nakayasu C, Rombout JH (2006) Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 557-74

Ingram G (1980) Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. *J. Fish Biol.* **16**: 23-60

Irwin MJ, Kaattari SL (1986) Salmoni B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 39-45

Ishii M, Inanobe A and Kurachi Y (2002) PIP3 inhibition of RGS protein and its reversal by Ca^{2+} /calmodulin mediate voltage dependent control of the G protein cycle in a cardiac K^+ channel. *Proc. Natl Acad. Sci USA* **99**: 4325-30

Israelsson O, Peterson A, Bengten E, Wiersma EJ, Andersson J, Gezelius G, Pilstrom L (1991) Immunoglobulin concentration in Atlantic cod *Gadus morhua*. Serum and cross reactivity between anti-cod antibodies and immunoglobulin from other species. *J. Fish Biol.* **39**: 265

Jaisval JK (2001) Calcium- how and why. *J. Biosci.* **26**: 357-63

Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ (1995) Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages respiratory burst activity with macrophages-derived supernatants. *J. Leukoc. Biol.* **57**: 943-7

Jang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X (2002) Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1 induced signalling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7158-67

Jang Z, Johnson HJ, Nie H, Qin J, Bird TA and Li X (2003) Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signalling through its interactions with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J. Biol. Chem.* **278**: 10952-6

Janssen WA and Surgalla MJ (1968) Morphology, physiology and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*) *Journal of Bacteriology* **96**: 1606-10

Jensen L. E., Hiney M. P., Shields D. C., Uhlar C. M., Lindsay A. J., Whitehead A. S. (1997) Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analysis and acute phase response. *J. Immunol.* **158**: 384-392

Jorgensen JB, Sharp GJE, Secombes CJ, Robertsen B (1993) Effect of a yeast cell wall glucan on the bactericidal activity in rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **3**: 267-77

Jurgens JB, Gartland LA, Du Pasquier L, Horton JD, Guble TW and Cooper MD (1995) Identification of a candidate CDS homologue in the amphibian *Xenopus laevis*. *J. Immunol.* **155**: 4218-23

Kakiuchi S, Sobue K and Fujita M (1981) Purification of a 240,000 M_r calmodulin-binding protein from a microsomal fraction of brain. *FEBS Lett.* **142**: 144-8

Kakiuchi S, Sobue K, Yamazaki R, Kambayashi J, Sakon m, and Kosaki G (1981) Lack of tissue specificity of calmodulin: a rapid and high-yield purification method. *FEBS Lett.* **126**: 203-7

Kamper SM, McKinney LE (2002) Polymorphism and evolution in the constant region of the T-cell receptor beta chain in an advanced teleost. *Fish Immunogenetics* **53**: 1047-54

Kaplan SS, Heine RP, Simmons RL (1999) Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infections. *Infect. Immunol.* **67**: 1640-5

Kasahara M., Suzuki T. and Du Pasquier L. (2004) On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends Immunol.* **25**: 105-11.

Klimovich VB (2002) Actual problems of evolutionary immunology. *J. Evol. Bioch. Physiol.* **38**(5): 562-74.

Koppenheffer TL (1987) Serum complement system of ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 279-86

Koumans-van Diepen JCE (1993) Characterization of fish leucocytes: an immunocytochemical and functional study in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Tesi di dottorato*, Dept. Exp. Animal Morphology and Cell Biology, Agricultural University, Wageningen, Olanda

Koumans-van Diepen JCE, Taverne-Thiele JJ, van Rens BTTM, Rombout JHWM (1994) Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 19-28

Koumans-van Diepen JCE, van den Lisdonk MHM, Taverne-Thiele AJ, Verburg van Kemenade BML and Rombout JHWM (1994) Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 45-56

Koumans-van Diepen JCE, Egberts E, Peixoto BR, Taverne N, Rombout JHWM (1995) B cells and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 19-28

Krauss G (2003) Biochemistry of signal transduction and regulation. 3rd completely revised edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim

Kretsinger RH (1976) Calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 239-66

Kullberg BJ and van der Meer JWM (1995) Cytokines in the treatment of infectious disease: options for the modulation of host defense. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*.

Kusuda R and Yamaoka M (1972) Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent – I. On the morphological and biochemical properties. *Bulletin of the Japanese Society of the Scientific Fisheries* **38**: 1325-32

Kusuda R and Fukuda Y (1980) Agglutinating antibody titers and serum protein changes of yellowtail after immunization with *Pasteurella piscicida* cells. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **46**: 801-7

Laing KJ, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes CJ (2001) Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumor necrosis factor- α . *Eur. J. Biochem.* **268**(5): 1315-22

Lamers CHJ (1985) The reaction of the immune system of fish to vaccination. *Tesi di Dottorato*, Agricultural University Wageningen, The Netherlands

Langenau DM, Zon LI (2005) The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 307-17

Lasker MV, Gajjar MM, Nair SK (2005) Cutting edge: molecular structure of the IL-1R-associated-kinase-4 death domain and its implications for TLR signalling. *J. Immunol.* **175**: 4175-9

Le Douarin N (1986) The microenvironment of T and B lymphocyte differentiation in avian embryos. *Curr. Top. Dev. Biol.* **20**: 291-313.

Leslie GA, Clem LW (1969) Production of anti-hapten antibodies by several classes of lower vertebrates. *J. Immunol.* **103**: 613

Levy O, Ooi, CE, Elsabac P, Doerfler ME, Lehrer RI, Weiss J (1995) Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin. Comparison of bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defenses. *J. Immunol.* **154**: 5403-10

Lewis DH, Grumbles LC, McConnell S and Flowers AI (1970) Pasteurella-like bacteria from a epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay. *J. Wildlife Dis.* **6**: 160-162

Lian F, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M, Sarkar FH (1998) Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutr. Cancer* **31**: 184-91

Lin GL, Elsaesser CF, Clem LW and Miller NW (1992) Phorbol ester/calcium ionophore activate fish leucocytes and induce long term cultures. *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 153

Lipp P, and Bootman MD (1997) To quark or to spark, that is the question. *J. Physiol.* **502**: 1

Litman GW (1976) Physical properties of immunoglobulin of lower species: A comparison with immunoglobulins of mammals. In: *Comparative Immunology* Marchalonis JJ (ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 239-75

Litman GW (1996) Sharks and the origins of vertebrate immunity. *Sci. Am.* **275**: 67

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501

Luft JC, Clem LW and Bly JE (1994) *In vitro* mitogen-induced and MLR-induced responses in leucocytes in the spotted gar, a holostean fish. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 153-6

Magariños B, Couso N, Noya M, Merino P, Toranzo AE, Lamas J (2001) Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*) *Aquaculture* **195**: 17-21

Magnadottir B (2006) Innate immunity in fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 137-51

Malgaroli A, Milani D, Meldolesi J, Pozzan T (1987) Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J. Cell. Biol.* **105**: 2145-55

Manning MJ (1991) Histological organization of the spleen: implication for immune functions in amphibians. *Res. Immunol.* **142**: 355-9.

Manning JM (1994) Fishes. In: Turner RJ, Ed. *Immunology: a comparative approach*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, p.69

Marmioli S, Bavelloni A, Faenza I, Sirri A, Ognibene A, Cenni V et al. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor. *FEBS Lett.* **32**: 277-86

Marsden MJ, Vaughan LM, Foster TJ, Secombes CJ (1996) A live (Δ -aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect. Immunol.* **64**: 3863

Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg-van Kemenade BM, Kwang J (2002) Characterisation of monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish Shellfish Immunol.* **13**: 85-95

Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K et al. (1993) Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.* **53**: 1328-31

Matsunaga T (1998) Did the first adaptive immunity evolve in the gut of jawed fish? (Review). *Cytogenet. Cell. Genet.* **80**: 138

May MJ, Ghosh S (1998) Signal transduction through NF- κ B. *Immunol. Today* **19**: 80-88

Meloni S, Zarletti G, Benedetti S, Randelli E, Buonocore F and Scapigliati G (2006) Cellular activities during a mixed leucocyte reaction in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* **20(5)**: 739-49.

Meseguer J, Esteban MA, Aguilero B (1991) Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) : an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* **54**: 299-309

Meseguer J, Esteban MA, Mulero V (1996) The non-specific cell mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanisms. *Anat. Rec.* **244**: 499-505

Miller NW and Clem LW (1984) Temperature-mediated processes in Teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.* **133**: 2356-9.

Miller NW, Ryczyn MA, Wilson MR, Warr GW, Naftel JP and Clem LW (1994) Non-specific cytotoxic response against tumor target cells mediated by leucocytes from seawater teleosts, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* **57**: 351-8

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **264**: 8171-8

Mitcham JL, Parnet P, Bonnert TP, Garka KE, Gerhart MJ, Slack JL et al (1996) T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *J. Biol. Chem.* **271**: 5777-83

Mizel, SB (1990) Cyclic AMP and interleukin-1 signal transduction. *Immunol. Today* **11**: 390

Moyle PB, Cech JJ Jr (1982) *Fishes: an introduction to Ichthyology*. Englewood Cliffs (N.J., USA), Prentice-Hall

Murakami M and Honjo T (1995) Involvement of B1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunol. Today.* **16**: 534-9.

Muroga K, Sukiyama T and Ueki N (1977) Pasteurellosis in cultured black seabream (*Mylio macrocephalus*). *J. Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University* **16**: 17-21

Nagata SA (1985) Cell surface marker of thymus dependent lymphocytes in *Xenopus laevis* is identifiable by mouse monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* **15**: 837-41.

Najakshin AM, Mechetina LV, Alabyev BY, Taranin AV (1999) Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary difference of chemokines. *Eur. J. Immunol.* **29**: 375

Nam BH, Yamamoto E, Hirono I, Aoki T (2000) A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with Hirame rhabdovirus. *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 13-24

Nezlin R (1998) The immunoglobulins, structure and function. *New York: Acad.*

Nicola NA (1994) Guidebook to cytokines and their receptors. *Oxford: Sambrook and Tooze Publications*

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappa B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**: 252-6

Nishimura H, Ikemoto M, Kawai K, Kusuda R (1998) Cross reactivity of anti-yellowtail thymic lymphocyte monoclonal antibody (YeT-2) with lymphocytes from other fish species. *Arch. Histol. Cytol.* **60**: 113

Ochiai Ei-Ichiro (1991) Why Calcium? *J. Chem. Edu.* **68**: 10-2

Ohnishi K, Watanabe K and Jo Y (1982) *Pasteurella* infection in young black seabream. *Fish Pathol.* **16**: 207-210

O'Neill LA, Bird TA, Gearing AJ, Saklatvala J (1990) Interleukin-1 signal transduction. Increased GTP binding and hydrolysis in membranes of a murine thymomaline (EL4). *J. Biol. Chem.* **265**: 3146-52

O'Neill LA, Green C (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signalling machinery in mammals, insects, and plants. *J. Leukoc. Biol* **63**: 650-7

O'Neill LA (2000) The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 557-63

Ottinger CA, Johnson SC, Ewart KV, Brown LL, Ross NW (1999) Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmo (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**: 53-9

Pacifici R, Civitelli R, Rifas L, Hakstead L, Alveoli LV (1988) Does interleukin-1 affect intracellular calcium in osteoblast-like cells (UMR-106)? *J. Bone Miner.Res.* **3**: 107-11

Palenzuela O, Sitjà-Bodadilla A, Alvarez-Pellittero P (1996) Isolation and partial characterisation of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 81

Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL and Cooper MD (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* **430**: 174-80

Pancer Z, Cooper MD (2006) The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **24**: 497-518

Papazisis KT, Kalemi GT, Zambouli D, Geromichalos GD, Lambropoulos AF, Kotsis A, Boutis LL, Kortsaris AH (2006) Synergistic effects of protein tyrosine kinase inhibitor genistein with camptothecins against three cell lines in vitro. *Cancer Letters* **233**: 255-64

Passer BJ, Chen CH, Miller NW, Cooper MD (1996) Identification of a T lineage antigen in catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **20**: 441-50

Peleteiro MC and Richards RM (1985) Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Fish Dis.* **8**: 161-72

Picchietti S. (1993) Analisi citologica ed istologica dello sviluppo del timo nella spigola *Dicentrarchus labrax* L.. *Tesi di laurea*. Facoltà di Scienze M.M. F.F. N.N. dell' Università della Tuscia.

Picchiatti S, Terribili FR, Mastrolia L, Scapigliati G and Abelli L (1997) Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing GALT of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anatomy and Embriology* **196**: 457-63

Picchiatti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM et al (2007) Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunoistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 57-67

Pickering AD and Richards RH (1980) Factors influencing the structure, function and biota of the salmonid epidermis. *Proceedings of the Royal Society, Edinburgh* **79B**: 93-104

Pilström L, Bengtén E (1996) Immunoglobulin in fish- genes, expression and structure. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 243-62

Pita I, Jelaso AM, Ide CF (1999) IL-1 β increases intracellular calcium through an IL-1 type 1 receptor mechanism. In C6 astrocytic cells. *Int. J. Dev. Neuroscience* **17**: 813-20

Plouffe DA, Hanington PL, Walsh JG, Wilson EC, Belosevic M (2005) Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* **12**: 266-77

Press C McL (1998) Immunology of fishes. *Handbook of vertebrate immunology*, Pastoret P.P. et al. Eds, Acad. 3-62.

Press C McL, Evensen Ø (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* **9**: 309-18

Raison RL and Dos Remedios NJ (1998) The hagfish immune system. *The biology of Hagfish*. Jorgensen J.M. et al. Eds., London: Chapman & Hall, 334-44.

Rast JP and Litman GW (1994) T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Immunology* **91**: 9248-52

Ravindranath MH, Muthugounder S, Presser N, Viswanathan S (2004) Antucancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Adv. Exp., Med. Biol* **546**: 121-65

Ridgeway EB, and Ashley CC (1967) Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 229-34

Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, et al (1997) Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase regulation of prostaglandin H synthase-2 metalloproteinase and IL-6 at different levels. *J. Immunol.* **158**: 3165-73

Ringer S (1882) Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J. Physiol.* **3**: 380-93

Ringer S (1883) A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* **4**: 28-42

Ringer S (1883) A third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricular contraction. *J. Physiol.* **4**: 222-5

Ringer S and Insbury HS (1890) The influence of certain salts upon the act of clotting. *J. Physiol.* **11**: 369-83

Ringer S and Insbury HS (1894) The action of potassium, sodium, and calcium salts on tubifex rivulorum. *J. Physiol.* **16**: 1-9

Ringer S (1895) Further observations regarding the antagonism between calcium salts and sodium potassium and ammonium salts. *J. Physiol.* **18**: 425-9

Roberts R. J. (1978) *Fish Pathology* Bailliere, Tindall. London

Roitt I, Brostoff J and Male D (1994) *Immunologia* 3rd edizione. Zanichelli pp. 14-19

Romano N, Taverne-Thiele AJ, Fanelli M, Baldassini MR, Abelli L et al (1999) Ontogeny of the thymus, in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial environment. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 123-37

Rombout JHWM (1993a) The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Develop. Compar. Immunol.* **17**: 55-66.

Rombout JHWM, Koumans van-Diepen JCEK, Emmer PM, Taverne-Thiele JJ, Taverne N (1996) Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *J. Fish Biol.* **49**: 521-31

Rombout JHWM, Joosten PHM, Engelsma MY, Vos N, Taverne N, Taverne-Thiele JJ (1998) Identification of a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp. *Dev. Comp. Immunol.* **22**: 63-77

Romestand B, Breuil G, Bourmaud C, Coeudacier JL, Bouix G (1995) Development and characterization of monoclonal antibodies against sea bass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 347-57

Rostow S, Evans DL and Jaso-Friedmann L (2000) Analyzing non-specific cytotoxic cells in fish. *Methods Mol. Biol.* **121**: 345-57

Rowley AF, Hunt TC, Page M and Mainwaring G (1988) *Vertebrate blood cells*. AF Rowley & NA Ratcliffe eds. Cambridge University Press pp. 118-27

Rumfelt LL, McKinney EC, Taylor E, Flajnik MF (2002) The development of primary and secondary lymphoid tissues in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*: B-cell zones precede dendritic cell immigration and T-cell zone formation during ontogeny of the spleen. *Scand. J. Immunol.* **56**: 130-48

Saklatvala J, Bird TA, Kaur P, O'Neill LA (1990) IL-1 signal transduction: evidence of activation of G protein and protein kinase. *Prog. Clin. Biol. Res.* **349**: 285-95

Sanchez C and Dominiguez J (1991) Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **28**: 1271-77

Sangrador-Vegas A, Martin SAM, O'Dea PG, Smith TJ (2000) Cloning and characterisation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur. J. Biochem.* **267**: 7031-7

Scapigliati G, Boraschi D, Tagliabue A, Ghiara P (1989) The interleukin-1 receptor on B and T cells: different binding properties for Il-1 alfa and IL-1 beta. *FEBS Lett.* **234**: 394-8

Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L (1995) Production and characterization of a monoclonal antibody against thymocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 393-495

Scapigliati G, Romano N, Picchietti S, Mazzini M, Mastrolia L, Scalia D and Abelli L (1996) Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassay. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 383-401

Scapigliati G, Romano N, Abelli L, Meloni S, Ficca AG, Buonocore F, Bird S, Secombes CJ (2000) Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 329-41

Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, Zou J, Pelegrin P, Falasca C, Prugnoli D, Secombes CJ (2001) Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 β . *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 711-26

Scapigliati G, Costantini S, Colonna G, Facchiano A, Buonocore F, Bossù P, et al., (2004) Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 429-41

Scapigliati G, Buonocore F and Mazzini M (2006) Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective. *Curr. Pharm. Des.* **12**: 3071-81

Schettini G, Meucci O, Florio T, Scala G, Landolfi E, Grimaldi M (1988) Effect of interleukin-1 beta on transducing mechanism in 235-1 clonalpituitary cells. Part II: Modulation of calcium fluxes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **155**: 1097-104

Schluter SF, Bernstein RM, Bernstein H and Marchalonis JJ (1997) Molecular origins and evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed vertebrates. *Immunol. Today*. **18**: 543-9

Schulemburg H, Boehnisch C, Michiels NK (2007) How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol. Immunol.* **44**: 3338-44

Secombes CJ (1991) The phylogeny of cytokines. In: *The cytokine handbook*. (Thomson AW ed), pp. 387-413 London: Academic Press (UK)

Secombes CJ, White A, Fletcher TC and Houlihan DF (1991) The development of an ELISPOT assay to quantify total and specific antibody-secreting cells in dab *Limanda limanda* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* **1**: 87-97

Secombes CJ and Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**: 53-71

Secombes CJ, Hardie LG, Daniels G (1996) Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 291

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12650-4

Siegel MM, Clem LW (1965) Antibody response of fish to viral antigens. *Ann. NY Acad. Sci.* **126**: 662

Siegel MM, Hamby BA, and Huggins Jr EM (1986) Phylogenetic studies on lymphokines. Fish lymphocytes respond to human IL-1 and epithelial cells produce an IL-1 like factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 47-54

Sims JE, Dower SK (1994) Interleukin-1 receptors. *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 517-31

Slierendrecht WJ, Lorenzen N, Glamann J, Koch C and Rombout JHWM (1992) Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **46**: 113

Smith KA, Lachman LB, Oppenheim JJ, Favata MM (1980) The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* **151**: 1551-6

Snieszko SF, Bullock GL, Hollis E and Boone JG (1964) *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriology* **88**: 1814-15

Stafford JL, Belosevic M (2003) Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 539-54

Stainman R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenetics. *Ann. Rev. Immunol.* **9**: 271-96

Stanton TH, Maynard M, Bomsztyk K (1986) Effect of interleukin-1 on intracellular concentration of sodium, calcium and potassium in 70Z/3 cells. *J. Biol. Chem* **261**: 5699-701

Steel DM, Whitehead AS (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* **15**: 81-8

Subramanian S, Stansberg C, Olsen L, Zou J, Secombes CJ, Cunningham C (2002) Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Dev. Comp. Immunol.* **26**: 415-31

Sunyer JO, Tort L (1994) The complement system of the teleost fish *Sparus aurata*. *Ann. NY Acad. Sci.* **712**: 371-3

Sunyer JO, Tort L (1995) Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) are effected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**: 333-45

Sveinbjornsson B, Seljelid R (1994) Aminated (b(-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages *in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 113

Swain AL and Amma EL (1989) The coordination polyhedron of Ca^{2+} , Cd^{2+} in parvalbumin. *Inorg. Chim. Acta* **163**: 5-7

Tatner MF and Manning MJ (1983) The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 93-105

Thompson CB (1995) New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of immune system. *Immunity.* **3**: 531-9.

Thuvander A, Fossum C, Lorenzen N (1990) Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Dev. Comp. Immunol.***14**: 415

Trevillyan JM, Lu YL, Atluru D, Phillips CA, Bjorndahl JM (1990) Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J. Immunol.* **145**: 3223-30

Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochem.* **19**: 2396-26404

Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290**: 527-8

Tsien RY, Pozzan T, and Rink TJ (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* **94**: 325-34

Uinuk-Ool T, Mayer WE, Sato A, Dongak R, Cooper MD and Klein J (2002) Lamprey lymphocyte-like cells express homologs of genes involved in immunologically relevant activities of mammalian lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 14356-61.

Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y (2000) Expression and function of serum amyloid A, a major acute phase protein, in normal and disease state. *Curr. Opin. Haematol.* **7**: 64-9

Vallejo AN, Miller NW and Clem LW (1991) Phylogeny of immune recognition: processing and presentation of structurally defined antigens. *Develop. Immunol.* **1**: 137-48.

Van der Heijden MHT, Rooijakkers J, Booms G, Rombout J, Boon JH (1995) Production, characterization and applicability in immunoassays of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L. 1758) immunoglobulin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**: 151

Van-Muiswinkel WB and Jagt LP (1984) Host-parasite relationship in fish and other ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* **3**: 205-8

Van-Muiswinkel WB, van-Muiswinkel WB, Lamers CHJ. and Rombout JHW (1991) Structural and functional aspects of the spleen in the bony fish. *Research Immunol.* **142**: 362-6.

Van-Muiswinkel WB (1995) The piscine immune system: innate and acquired immunity. In: Woo P. T. K. *Fish disease and disorders. Volume I: Protozoan and metazoan infections*. Canada: Department of Zoology, University of Guelph, pp. 729-49

Vassalli P (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**: 411-52

Verburg-van Kemenade BML, Weyts FAA, Debets R and Flick G (1995) Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 59-70

Verburg-van Kemenade BML, Saeij JPJ, Flick G, Willems PHGM (1998) Ca^{2+} signals during early lymphocyte activations in carp *Cyprinus carpio* L. *J. Exp. Biol.* **201**: 591-8

Voss EW and Watt RH (1977) Comparison of the microenvironment of chicken and rabbit antibody active site. *Adv. Exp. Med. Biol.* **88**: 391-401.

Warr GW and Marchalonis JJ (1982) Molecular basis of self/non-self discrimination in the ectothermic vertebrates. In: *The Reticuloendothelial System*. Vol. 3: *Phylogeny and Ontogeny*, Cohen N and Sigel MM (eds.), Plenum Press, New York, pp. 541-67

Warr GW (1995) The immunoglobulins genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 1-12

Warr GW, Magor KE and Higgins DA (1995) IgY: clues to modern antibodies. *Immunol. Today*. **16**: 392-8.

Weyts FAA, Rombout JHWM, Flik G and Verburg-van Kemenade BML (1997) A common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte cell line shares morphological and functional characteristics with macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 123-33

Williams DA, Fogarty KE, Tsien RY and Fay FS (1985) Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscopy using Fura-2. *Nature* **318**: 558-61

Wilson M, Marcuz A and Du Pasquier L (1995) Somatic mutations during an immune response in *Xenopus tadpoles*. *Dev. Immunol.* **4**: 227-34.

Yasunaga N, Hatai K And Tsukahara J (1983) *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red seabream. *Fish Pathol.* **18**: 107-110

Yin Z, Kwang J (2000) Carp interleukin-1 β in the role of an immunoadjuvant. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 375-8

Yin, L and Shaw S. (2001) The human genome: an immunocentric view of evolutionary strategies. *Trends in Immunol.* **22**: 227-9.

York I.A. and Rock K.L. (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* **14**: 369-99.

Zapata A (1979) Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* **3**: 55

Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-De Frias C, Cortes A (2006) Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 126-36

Zarkadis IK, Mastellos D, Lambris JD (2001a) Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 745-62

Zilber L.A. (1958). *Osnovy immunologii* (Bases of Immunology), 3rd Edition, Moscow, 99-104.

Zou J, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1999) Molecular cloning of interleukin-1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence for an ICE cut site. *Cytokine* : 552-60