



# **UNIVERSITÀ DELLA TUSCIA DI VITERBO**

Dipartimento di Scienze Ambientali

Corso di Dottorato di Ricerca  
in  
“EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA XXI CICLO”

**“Studio dell’espressione di geni coinvolti nello sviluppo di un  
sistema immunitario funzionale  
nella spigola (*Dicentrarchus labrax* L.)”**

Settore scientifico disciplinare: BIO/05

Coordinatore: Prof.Federico Federici

Tutor: Prof.ssa Anna Maria Fausto

Dottoranda: Dott.ssa Laura Guerra



# **UNIVERSITY OF TUSCIA-VITERBO**

Department of Environmental Sciences

PhD Course  
in  
“BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EVOLUTION XXI CYCLE”

**“Expression analysis of genes involved in the development of a functional immune system in sea bass”**

Scientific and disciplinary area: BIO/05

PhD coordinator: Prof. Federico Federici

Tutor: Prof. Anna Maria Fausto

PhD student: Dr. Laura Guerra

# INDICE

|                                                                                                             |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>SUMMARY</b>                                                                                              | pag. 1  |
| <b>CAPITOLO I: INTRODUZIONE: PREMESSA</b>                                                                   | pag. 6  |
| <b>1. IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI</b>                                                              | pag. 8  |
| <b>1.1 Immunità innata dei Teleostei</b>                                                                    | pag. 9  |
| <b>1.2 Immunità acquisita dei Teleostei</b>                                                                 | pag. 15 |
| 1.2.1 Immunoglobuline e cellule B nei Teleostei                                                             | pag. 16 |
| 1.2.2 I linfociti T nei Teleostei                                                                           | pag. 17 |
| <b>2. STRUTTURA E FUNZIONE DEGLI ORGANI LINFATICI</b>                                                       | pag. 20 |
| <b>2.1 Timo</b>                                                                                             | pag. 21 |
| <b>2.2 Rene</b>                                                                                             | pag. 23 |
| <b>2.3 Milza</b>                                                                                            | pag. 24 |
| <b>2.4 Immunità mucosale dei Teleostei</b>                                                                  | pag. 25 |
| <b>3. ONTOGENESI DEL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI.</b>                                                 | pag. 28 |
| <b>3.1 Ontogenesi dei leucociti nei Teleostei</b>                                                           | pag. 28 |
| 3.1.1 Ematopoiesi embrionale nei Teleostei                                                                  | pag. 28 |
| 3.1.2 Mielopoiesi nei teleostei in sviluppo                                                                 | pag. 31 |
| 3.1.2.1 <i>Monociti / Macrofagi</i>                                                                         | pag. 31 |
| 3.1.2.2 <i>Granulociti</i>                                                                                  | pag. 32 |
| 3.1.3 Istogenesi degli organi linfatici e linfopoiesi delle cellule T e B durante lo sviluppo               | pag. 33 |
| 3.1.3.1 <i>Istogenesi del timo e formazione di un microambiente idoneo alla maturazione dei linfociti T</i> | pag. 33 |
| 3.1.3.2 <i>Ontogenesi dei linfociti T ed espressione di marker specifici</i>                                | pag. 35 |
| 3.1.3.3 <i>Istogenesi del rene e formazione delle cellule B</i>                                             | pag. 37 |
| 3.1.3.4 <i>Istogenesi della milza</i>                                                                       | pag. 39 |
| 3.1.3.5 <i>Sviluppo del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT)</i>                                 | pag. 40 |

|                                                                 |         |
|-----------------------------------------------------------------|---------|
| <b>3.2 Ontogenesi di parametri immunitari umorali nei pesci</b> | pag. 41 |
| 3.2.1 IgM materne ed endogene                                   | pag. 41 |
| 3.2.2 Complemento                                               | pag. 43 |
| 3.2.3 Lisozimi ed altri enzimi coinvolti nella difesa innata    | pag. 44 |
| 3.2.4 Lectine                                                   | pag. 45 |
| <br><b>4. MATURAZIONE DELLA COMPETENZA IMMUNOLOGICA</b>         | pag. 45 |
| <br><b>CAPITOLO II: MATERIALI E METODI</b>                      |         |
| <b>1. ANALISI D'ESPRESSIONE TRAMITE RT-PCR</b>                  | pag. 47 |
| <b>1.1 Animali</b>                                              | pag. 47 |
| <b>1.2 Estrazione dell'RNA totale</b>                           | pag. 47 |
| <b>1.3 PCR</b>                                                  | pag. 48 |
| <b>1.4 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio</b>              | pag. 51 |
| <b>1.5 Procedure di clonaggio</b>                               | pag. 51 |
| 1.5.1 Vettore utilizzato                                        | pag. 51 |
| 1.5.2 Microrganismo utilizzato                                  | pag. 52 |
| 1.5.3 Terreni di coltura                                        | pag. 52 |
| 1.5.4 Purificazione del DNA da gel d'agarosio                   | pag. 53 |
| 1.5.5 Ligazione di frammenti di DNA                             | pag. 53 |
| 1.5.6 Trasformazione delle cellule competenti                   | pag. 54 |
| 1.5.7 Colture batteriche                                        | pag. 54 |
| 1.5.8 Estrazione del DNA plasmidico                             | pag. 54 |
| 1.5.9 Analisi di sequenza                                       | pag. 55 |
| <b>2. ANALISI D'ESPRESSIONE DI TIPO QUANTITATIVO</b>            |         |
| <b>2.1 Quantificazione del cDNA</b>                             | pag. 57 |
| <b>3. ISTOLOGIA E IMMUNOISTOCHEMICA</b>                         | pag. 58 |
| <b>3.1 Istologia</b>                                            | pag. 58 |
| <b>3.2 Immunoistochimica</b>                                    | pag. 58 |
| <b>3.3 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</b>         | pag. 59 |
| <b>3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)</b>            | pag. 59 |

|                                                                   |         |
|-------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>4. IBRIDAZIONE <i>IN SITU</i></b>                              | pag. 60 |
| 4.1 Preparazione del template per la trascrizione <i>in vitro</i> | pag. 60 |
| 4.2 Trascrizione e marcatura <i>in vitro</i>                      | pag. 62 |
| 4.3 DOT-BLOT                                                      | pag. 63 |
| 4.4 Procedura di detezione colorimetrica                          | pag. 64 |
| <b>5. ANALISI STATISTICA</b>                                      | pag. 65 |

## **CAPITOLO III: RISULTATI**

|                                                                                                                                                                                                                               |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>1. SVILUPPO DELL'ESPRESSIONE DEL <i>TcRβ</i>, <i>CD8α</i>, <i>CD4</i> e <i>MHCII-β</i> NELLA SPIGOLA</b>                                                                                                                   | pag. 66 |
| <b>2. Q-PCR DEI TRASCRITTI DEL <i>TcRβ</i>, <i>CD8α</i>, <i>CD4</i> e <i>MHCII-β</i> DURANTE LO SVILUPPO DELLA SPIGOLA</b>                                                                                                    | pag. 73 |
| <b>3. Q-PCR DEI TRASCRITTI DEL <i>TcRβ</i>, <i>CD8α</i>, <i>CD4</i> e <i>MHCII-β</i> NEL TIMO DI PESCI DI UN ANNO</b>                                                                                                         | pag. 75 |
| <b>4. LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE <i>TcRβ</i><sup>+</sup>, <i>CD8α</i><sup>+</sup> e <i>MHCII-β</i><sup>+</sup> NEL TIMO IN SVILUPPO</b>                                                                                     | pag. 77 |
| <b>5. LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE <i>TcRβ</i><sup>+</sup>, <i>CD8α</i><sup>+</sup>, <i>CD4</i><sup>+</sup> e <i>MHCII-β</i><sup>+</sup> E IMMUNONOLOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE EPITELIALI NEL TIMO DI SPIGOLA DI UN ANNO</b> | pag. 82 |
| <b>6. STUDIO DELL'ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELL'ACQUISIZIONE DI UN SISTEMA IMMUNITARIO FUNZIONALE NELL'INTESTINO DELLA SPIGOLA</b>                                                                                       | pag. 91 |
| 6.1 Q-PCR dei trascritti dei geni <i>TCRβ</i> , <i>CD8α</i> , <i>CD4</i> e <i>MHCII-β</i> nel GALT di spigola di un anno                                                                                                      | pag. 91 |
| 6.2 Localizzazione delle cellule <i>TcRβ</i> <sup>+</sup> , <i>CD8α</i> <sup>+</sup> , <i>CD4</i> <sup>+</sup> e <i>MHCII-B</i> <sup>+</sup> nel GALT di spigola di un anno                                                   | pag. 93 |

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| <b>CAPITOLO IV: DISCUSSIONE</b> | pag. 98 |
|---------------------------------|---------|

|                     |          |
|---------------------|----------|
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> | pag. 117 |
|---------------------|----------|

|                                                   |          |
|---------------------------------------------------|----------|
| <b>PUBBLICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONGRESSO</b> | pag. 140 |
|---------------------------------------------------|----------|

## SUMMARY

This thesis investigated the development of a functional immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), one of the most important species in aquaculture in the south Mediterranean.

The study on the ontogeny of the immune system in fish is relevant for two reasons. First, the comparison of the ontogeny of the fish immune system with that of “higher” Vertebrates offers new insights into developmental biology in general and the generation of a functional immune system in particular. Second, knowledge of the developmental sequence of immune function is imperative to design preventive measures against problems concerning infectious diseases in aquaculture.

Over the past few years, a considerable amount of work was performed on the ontogeny of Teleost immune system. In fact, a variety of hematopoietic genes have been sequenced, which allowed a detailed picture of the development of the distinct leucocytes and their precursors. Despite these informations, basic questions including the identification of the first lympho-hematopoietic sites, the origin of T- and B-lymphocytes and the acquisition of full immunological capacities remain to be resolved (Zapata et al., 2006).

This thesis applied RT-PCR to investigate the developmental appearance of *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* and *MHCII- $\beta$* , four important genes involved in T cell function. In addition, specific primers were used to quantify by real time PCR gene transcripts on pools of specimens sampled at different days post hatching (ph) and on thymus and intestine of 1 year old specimens. The localization of *TcR $\beta$ <sup>+</sup>*, *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>*, *CD4<sup>+</sup>* and *MHCII- $\beta$ <sup>+</sup>* cells was defined for the first time in Teleost larvae, post-larvae and juveniles by *in situ* hybridisation. These results provide new information about the thymic compartmentalisation and thymocyte differentiation pathways in a Teleost and suggest that the sea bass GALT mainly consists of T cells with likely cytotoxic activity.

### **Developmental appearance of *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* and *MHCII- $\beta$* transcripts: gene expression profiling and *in situ* hybridisation studies.**

Semi-quantitative PCRs were performed on eggs, pools of specimens sampled at different days ph (2, 4, 6, 8, 13, 16, 21, 25, 32, 39, 51, 62, 75 and 92) and thymus of 1 year old specimens, reared at 15±1 °C. Gene expression was studied using specific primers designed to amplify a specific sequence of sea bass *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* and *MHCII- $\beta$* .

First expression of *TcR $\beta$*  was detected at day 25 ph. The early expression confirms data obtained in other Teleost species. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae, which develop faster than sea bass, RT-PCR revealed *TcR $\beta$*  expression from 2 weeks post-fertilization (Fischer et al., 2005). Hansen and Zapata (1998) mentioned that rainbow trout *TcR $\beta$*  was transcribed from around 15 days after fertilization on, in concert with early development of the thymus. Previous research has shown that the thymus is the first organ to become lymphoid in Teleosts (Botham and Manning 1981; Padros and Crespo 1996; Schroder et al., 1998; Lam et al., 2002), while the kidney can earlier contain hematopoietic precursors but not lymphocytes (Zapata et al., 2006). In this study, lymphoid colonisation of the thymus has been found to occur at 25 days ph (data not shown) therefore at a developmental stage coincident with the first expression of *TcR $\beta$* . A previous study in sea bass reared at 14±1 °C evidenced lymphoid colonisation of the thymus two days later (Abelli et al., 1994). The slight difference may be interpreted considering that the development timeframe can differ when accounting for temperature effects on growth. The relationship between growth and development can be dynamic and physiological age expressed as degree-days does not factor out all differences in temperature history (McCormick et al., 1995). Otherwise, *CD8 $\alpha$*  and *CD4* expressions were detected at day 51 ph, when the thymus is well developed and is characterized by a distinctive lymphoid

composition whose normal development, which involves differentiation, selection and expansion of immuno-competent cells, is dependent upon cell interactions with thymic stroma and secreted molecules (Zapata et al., 1997). At difference with our findings in developing sea bass, a recent study evidenced *CD8 $\alpha$*  transcription in rainbow trout already from 7 days post-fertilization on, that is around 1 week before the onset of thymic development and *TcR $\beta$*  expression (Fischer et al., 2005). These latter results can be tentatively interpreted by detection of sterile/aberrant transcripts which are reported to be abundant in Teleosts (Lam et al., 2004) or by a *CD8 $\alpha$*  function in early trout development before appearance of the thymus (Fischer et al., 2005). However, studies in Mammals clearly reported a lack of *CD8* and *CD4* expression before thymus appears (Maddox et al., 1987) and well documented that the normal development of T lymphocytes is dependent upon cell interactions with thymic stroma and secreted molecules.

*MHCII- $\beta$*  also appears very early during sea bass development and the first expression was detected at day 4 ph. The early expression of  $\alpha$  and  $\beta$  chains of *MHCII* molecule has been described also in carp embryos (1 day pf) (Rodrigues et al., 1998) and at 1w ph in rainbow trout (Fisher et al., 2005), suggesting a possible role of this gene in early mechanisms of ontogeny.

Thereafter transcripts of all four genes increased until day 92 ph and the relative expression levels of *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* and *MHCII- $\beta$*  was quantified by real time PCR. The results showed that at 92 days ph, *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  and *MHCII- $\beta$*  transcripts were significantly increased by all previous stages ( $P < 0.001$ ), while *CD4* transcripts were significantly higher compared with 25 and 51 days ph ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$  respectively). These data suggest that the critical events of differentiation and selection of T-lymphocytes could occur between 51 and 92 days ph.

At this point I focused on understanding of microenvironment of the sea bass thymus, especially as it relates to the positive selection and differentiation of T cells, crucial steps in the development of a functional immune system in all jawed Vertebrates.

Then *in situ* hybridisation with digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes for mRNA encoded the *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  and *MHCII- $\beta$* , was performed in post-larvae at 51, 75 and 92 days ph. At 51 days ph, the thymus was not yet lobulated while the parenchyma was regionalized. In fact, lymphocytes filled the outer thymic region while were less numerous in the inner region. At this stage *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>* and *TcR $\beta$ <sup>+</sup>* cells were in the outer/lateral zones of the thymus. Moreover, at 51 days ph *MHCII- $\beta$ <sup>+</sup>* cells were mainly localized in the inner zone of the thymus. Already at 51 days ph and from this age to 75 days ph an active lymphopoiesis was observed in the gland resulting in a cortex/medulla demarcation depicted by histology and pattern of *CD8 $\alpha$*  and *TcR $\beta$*  expression mainly restricted to cortical thymocytes. On the contrary, at 75 days ph *MHCII- $\beta$ <sup>+</sup>* cells were localized in the medulla and at the cortico-medullary junction. At 92 days ph the histology of the thymus was well established, in fact the penetration of connective tissue trabeculae, coming from the capsule, divide the thymus into compartments. *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>* and *TcR $\beta$ <sup>+</sup>* cells were mainly localized in the cortex and at the cortico-medullary junction. Previous research in sea bass distinguished thymic cortex and medulla by histology (different concentration and size of lymphoid cells) and immunohistochemistry with the anti-thymocyte monoclonal antibody DLT15 (Abelli et al., 1996). This pattern can be found also in other Teleosts. In carp, *in situ* hybridisation of recombination activating genes and immunohistochemical detection of early thymocytes (with the mAb WCL9) distinguished in the thymus from approximately 7 days post-fertilization *rag-1<sup>+</sup>/WCL9<sup>+</sup>* and *rag-1<sup>-</sup>/WCL9<sup>-</sup>* areas, which indicated a cortex/medulla organization (Huttenhues et al., 2005). In zebrafish, a *rag-1<sup>+</sup>* cortex and a *rag-1<sup>-</sup>* medulla become established throughout the thymic growth (Danilova et al., 2004). Distribution of *MHC* class I and II in rainbow trout thymus similar to that in Mammals further supports the

ideas that the outer and inner zones of the Teleost thymus fairly correspond to cortex and medulla and have a function in T cell selection (Fischer et al., 2005).

### Thymocyte decisions in sea bass: CD4 or CD8?

In Mammals, during thymic development, early T cell progenitors arrive from the bloodstream and undergo a series of migration, proliferation and differentiation events in the thymus before returning to the circulation as mature T cells. Each of these T-cell maturation events takes place in a discrete region of the thymus and relies on interactions with specialized resident cells of the thymus found in each of these anatomical regions (Ladi et al 2006). In the Teleost, instead, although some progress in the understanding of the thymic microenvironment has been made, nothing is still known about the origin of lymphoid progenitors that colonize the thymic rudiment, as well as about positive selection of thymocytes, a crucial steps to establish a functional immune system in all Vertebrates.

In this thesis, an expression analysis by Q-PCR and *in situ* hybridisation studies of *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* and *MHCII- $\beta$*  genes were performed in thymus of sea bass juveniles to investigate the selection processes of thymocytes in Teleost.

The real time PCR analysis quantified amounts of *CD4* and *CD8 $\alpha$*  transcripts not statistically different in the thymus of one year old sea bass, but also evidenced that *CD4* transcripts were significantly lower compared with *TcR $\beta$*  transcripts ( $p < 0.05$ ). This latter finding can be interpreted in different ways: I) higher numbers of  $TcR\beta^+$  thymocytes [that include double negative thymocytes (DN), double positive thymocytes (DP) and single positive thymocytes (SP)] respect to  $CD4^+$  subpopulations, II) expression of different *TcR* chains (most likely  $\gamma\delta$ ) by a fraction of  $CD8\alpha^+$  thymocytes, III) higher number of *CD8 $\alpha$*  mRNA molecules per cell compared with *CD4* transcripts. Further studies are needed to prove these hypotheses and clarify the developmental program of sea bass thymus.

Then, digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes for *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* and *MHCII- $\beta$*  genes were synthesized to localize their expression in the thymus of sea bass juveniles. At this age the thymus retained a superficial localization and was more extensively lobulated compared with previous developmental stages. Cortex and medulla regions could be easily recognised by different concentration of lymphoid cells. *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  and *CD4* expression was detected in the cortex and at the cortico-medullary junction, evidencing the compartmentalisation of the parenchyma. Large cords of  $CD8\alpha^+$  cells extended in the medulla, whereas *CD4* transcripts were detected in isolated thymocytes. A  $CD8\alpha^-$ ,  $CD4^+$  and  $TcR\beta^+$  subcapsular lymphoid zone was seen near the septa coming from the inner connective capsule that delimited the thymus. This was followed by a  $CD8\alpha^+$  and  $CD4^+$  cortical region where epithelial cells, forming the stromal network, were negative.

These results may provide new evidence about the functional compartmentalization of the teleost thymus and we hypothesize that the positive selection process, could occur in the sea bass thymus, as described in Mammals (Ladi et al., 2006): immature thymocytes would migrate from the subcapsular zone to the cortex, where they express high levels of *CD8 $\alpha$*  and of *CD4*. In the cortex the thymocytes would positively selected to become  $CD8^+ CD4^+$  double-positive thymocytes. Then, they would migrate from the cortex to the medulla to differentiate to  $CD8^+$  or  $CD4^+$  single-positive thymocytes. This migration of presumptive single positive thymocytes is also suggested by the presence of large cords of  $CD8\alpha^+ TcR\beta^+$  and isolated  $CD4^+ TcR\beta^+$  cells in the medulla.

Moreover, as described in Mammals, during intrathymic development, thymocytes are selected so that only those cells that are able to bind self-MHC molecules with an appropriate affinity will leave the thymus and colonize peripheral lymphoid organs. Those cells that do not bind self-MHC molecules or bind these molecules with a too affinity will

be either physically or functionally eliminated (apoptosis) (Ramsdell e Fowlkes, 1990). Positive selection, allows thymocytes binding self-MHC molecules to proceed in the maturation process, while negative selection is responsible for the functional elimination of potential autoreactive cells. In both processes during the generation of the T-cell repertoire thymic stromal cells have a pivotal function (Blackman et al., 1990).

With regard to these informations from Mammals, *in situ* hybridisation studies with RNA probes for *MHCII-β* gene were performed to investigate a possible role of stromal cell subpopulations in thymocytes selection in sea bass juveniles. The results evidenced the presence of scattered *MHCII-β*<sup>+</sup> cells, in the cortex of the thymus, while many *MHCII-β*<sup>+</sup> cells were detected in the medulla and at the cortico-medullary junction. Particularly, to know which subpopulation of thymic cells express *MHCII-β* transcripts, the monoclonal antibody AE1/AE3, anti human cytokeratin that cross-react with cytokeratin of sea bass, was used to localize thymic epithelial cells. The results allowed to compare the localization of *MHCII-β*<sup>+</sup> and *CK*<sup>+</sup> cells, suggesting a possible their involvement in T cell selection.

### **Expression analysis of *TCRβ*, *CD8α*, *CD4* and *MHCII-β* genes on gut immune system of the sea bass**

The thymus is the major primary immune tissue for the production of functional T lymphocytes in Vertebrates. However, in Mammals, it has recently been shown that the generation of local T cells also occurs in the gut-associated lymphoid tissue (GALT). This suggests that the thymus and GALT have similar functions and that they might be evolutionary related (Matsunaga and Rahman 2001). The GALT of Teleosts differs from the GALT of mammalian in that it comprises only intraepithelial lymphocytes (IELs) scattered throughout the mucosa, but no specialized structures similar to ileal or Peyer's patches. Cells with lymphoid morphology residing between gut epithelial cells have been observed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Nelson et al., 1997), carp (*Cyprinus carpio*) (Rombout et al., 1993), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Picchiatti et al., 1997) and several other Teleost species. Furthermore, molecular data have evidenced that the GALT consists mainly of T cells, whose origin, selection and functions are still unclear. This thesis reports about the *TCRβ*, *CD8α*, *CD4* and *MHCII-β* transcription in the intestine of the sea bass and localization of T cells expressing such genes. First, the real time PCR analysis quantified amounts of *TcRβ*, *CD8α* and *CD4* transcripts in the anterior, middle and posterior intestine of one-year-old specimens. The results evidenced that *TCRβ* and *CD4* transcripts did not differ along the intestine, while *CD8α* transcripts rose in the posterior segment ( $p < 0.05$  vs. middle). These data are in agreement with previous studies performed in the sea bass that showed an increase of number of T-like cells along the gut from the anterior to the posterior segment (Picchiatti et al., 1998). A similar regional distribution has been described in other species of fish in which the posterior segment shows important immunological functions (Ida e Yamamoto, 1985; Geogopoulou e Venier, 1986; Fujino et al., 1987; Rombout e Van de Berg, 1989). Moreover, in the whole intestine *TCRβ* and *CD8α* transcripts were higher than *CD4* ones ( $p < 0.001$ ), suggesting that the GALT of the sea bass consists mainly of T cells with a likely cytotoxic activity.

Then, *in situ* hybridisation study was performed with digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes for *TCRβ*, *CD8α*, *CD4* and *MHCII-β* genes, in the posterior segment of the intestine. The choice to focus the study on this district was dictated by the fact that it shows the highest level of *CD8α* transcripts and then a probable specialized immunological function.

The RNA probes for *TcRβ* and *CD8α* genes confirm the data obtained by Q-PCR, in fact numerous *TCRβ*<sup>+</sup> and *CD8α*<sup>+</sup> cells were identified intraepithelially and in the lamina propria, the latter forming aggregates, while rare *CD4*<sup>+</sup> cells were localized in the

epithelium and lamina propria of mucosa. These results are very interesting if compared with the data obtained recently in Mammals. In fact, in mice, the IELs have been classified into two subsets. The first subgroup contains TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells that express either CD4 or CD8 $\alpha\beta$  co-receptors and are specific for non-self antigens presented by MHC class II and I, respectively (Das et al., 1999). These IELs are the progeny of conventional naive T cells that were initially positively selected in the thymus in response to self-MHC/self peptide antigens and subsequently primed in the periphery in response to their cognate non self-antigens (Arstila et al., 2000). IELs that express homodimers of CD8 $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>) but lack expression of either of the known TcR coreceptors, CD4 or CD8  $\alpha\beta$ , form the second group (Parrott et al., 1983). In sharp contrast to the CD4<sup>+</sup> and CD8  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> IELs, “unconventional” CD8  $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> IELs are not the progeny of circulating naive T cells, and can develop in the absence of a functional thymus in lymphoid aggregates, the cryptopatches, localized in the lamina propria.

Considering these results obtained in Mammals and the presence of aggregates of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cells in the lamina propria of sea bass intestine, we hypothesized that probably in the GALT of teleosts also could occur a differentiation process of lymphoid cells. Further studies will be necessary to improve the knowledge about the phenotype of these intestinal lymphocytes and their extrathymic origin. Moreover, in Mammals it is known that CD8  $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> IELs, above described, could express either the TCR  $\alpha\beta$ , or TCR  $\gamma\delta$ , and particularly, the TCR  $\gamma\delta$  receptors do not recognize processed peptides presented by MHC I and II and for them it has not been described a positive selection, instead the TCR  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD8  $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> IELs require positive selection and can be restricted for MHC of class I or II (Guehler et al., 1996; Leishman et al., 2001).

On the basis of these results, during my PhD training I analysed the expression of MHCII- $\beta$  transcripts in sea bass GALT, because of its involvement in antigen presentation to CD4<sup>+</sup> cells, and probably also in the selection of intestinal T lymphocytes.

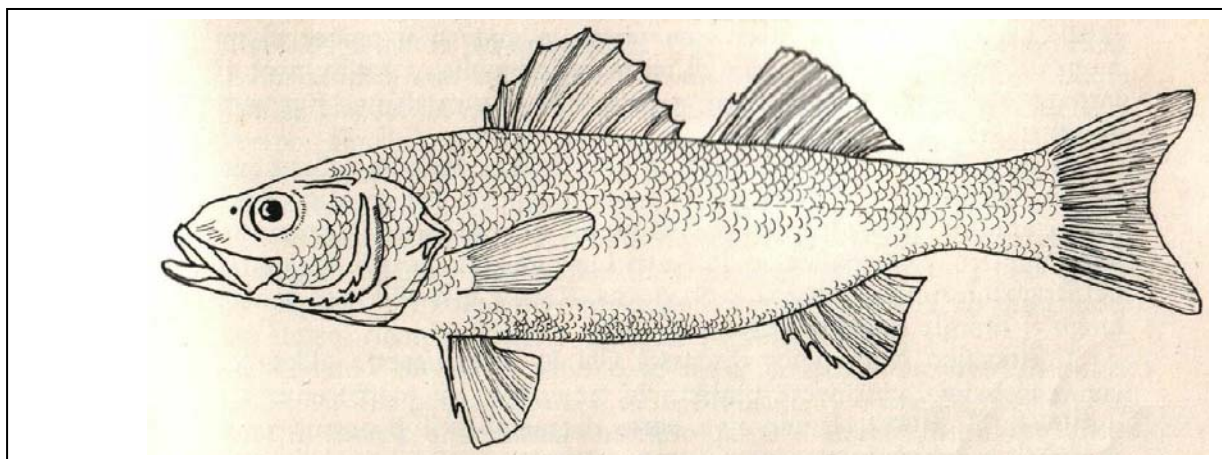
Q-PCR analysis showed an expression of MHCII- $\beta$  transcripts statistically lower in the posterior segment compared with the anterior and middle segments of the intestine ( $p < 0.001$ ) and this result was supported by *in situ* hybridisation with RNA probes for MHCII- $\beta$  gene, that identified rare MHCII- $\beta$ <sup>+</sup> cells, mainly concentrated intraepithelially.

The low expression of MHCII- $\beta$  and CD4 genes and the higher CD8 $\alpha$  transcription in the posterior segment of the sea bass intestine, associated to the significant number of CD8  $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> cells obtained by ISH suggest the presence in this intestinal region of a subset of CD8  $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells that, as described in mammals, do not recognize processed peptides presented by MHC class I or II. Further studies, with MHC class I or TcR  $\gamma/\delta$  probes and studies of cytotoxic activity will be determinant to improve the knowledge of immune responses on gut of the sea bass.

In fact, in Teleosts the immune function of intestinal T cells is also largely unknown and the results obtained in this thesis support the hypothesis of a their probable cytotoxic activity. In Mammals it is known that cytotoxic T lymphocytes (CD8<sup>+</sup> cells) are very important in immune responses against virus-infections and similar processes are described also in fish (Utke et al., 2007). Further studies are necessary to define if the sea bass intestinal lymphocytes can implement cytotoxic responses against allogenic or xenogenic targets.

# CAPITOLO I

## INTRODUZIONE



*Dicentrarchus labrax (L.)*

## PREMESSA

L'acquacoltura ha avuto in Europa, negli ultimi anni, un incremento notevole, e sembra che aumenterà ancora, dato che sta crescendo il consumo pro-capite e la richiesta di specie ittiche. Per far fronte a queste necessità, è pratica comune negli impianti allevare gli organismi in condizioni di sovraffollamento che, unitamente a temperature inadeguate e sbalzi di salinità, possono facilitare l'esplosione di patologie infettive, in particolare durante gli stadi larvali. Infatti, a differenza di altri Vertebrati, molte specie di pesci schiudono ad uno stadio di vita embrionale e, di conseguenza, già in questa fase, essi devono difendersi da una varietà di microrganismi che vivono nell'ambiente acquatico. Per limitare l'incidenza di patologie vengono applicati trattamenti chemioterapici, di vaccinazione o di immunostimolazione. Per quanto riguarda i chemioterapici, interventi di questo genere sono molto costosi ed inoltre responsabili della comparsa di batteri antibiotico-resistenti. Per ovviare a queste difficoltà ed evitare il ricorso all'uso di sostanze inibenti che sono poco compatibili con i principi di sostenibilità ambientale, recentemente nuovi spazi di ricerca e sperimentazione sono stati volti allo sviluppo di formulazioni dietetiche che si basano su principi di ecologia microbica, con l'obiettivo di potenziare i meccanismi endogeni di protezione o, nel migliore dei casi, essere sostitutive o integrative

all'impiego di antibiotici e chemioterapici. La vaccinazione e l'uso di immunostimolanti somministrati per immersione risultano l'approccio maggiormente sostenibile per la loro via d'ingresso poco stressante per l'animale. Gli immunostimolanti, come i  $\beta$ -glucani, i prodotti di origine batterica, i derivati fungini e algali, se aggiunti attraverso la dieta, possono migliorare i meccanismi di difesa innata, consentendo un aumento della resistenza ai patogeni durante periodi di alto stress, come la riproduzione e la vaccinazione. Infatti, l'immunomodulazione dei pesci allo stadio larvale è stata proposta come un metodo efficace per aumentare la sopravvivenza agendo sulla risposta innata dell'animale finché i meccanismi di difesa specifici non siano sufficientemente sviluppati all'effettiva risposta al patogeno.

Quindi, per facilitare una progettazione e selezione razionale di vaccini e immunostimolanti, che siano efficaci in stadi precoci di sviluppo, è necessario ampliare le conoscenze sull'ontogenesi del sistema immunitario dei Teleostei. Prima di tutto, si deve ottenere una maggiore conoscenza sulla presenza di fattori umorali di difesa. In secondo luogo, deve essere definita la cronologia di apparizione dei differenti leucociti per stabilire a quale stadio di sviluppo il sistema immunitario cellulare, incluse le risposte immunitarie acquisite, siano funzionalmente maturi e possano rispondere ai vaccini.

Attualmente, domande basilari quali l'identificazione dei primi siti linfo-ematopoietici, l'origine delle cellule B e T e l'acquisizione delle piene capacità immuni non hanno ancora avuto una risposta definitiva (Zapata et al., 2006).

In questo contesto si è inserito il mio progetto di dottorato di ricerca, volto ad ampliare le conoscenze relative all'ontogenesi del sistema immunitario della spigola (*Dicentrarchus labrax* L.), la specie più allevata negli impianti di produzione ittica presenti nel bacino del Mediterraneo. Il presente lavoro ha fornito un contributo alla conoscenza dello sviluppo maturativo e selettivo dell'immunità di tipo specifico e in particolar modo dei linfociti T nel timo e nell'intestino, importanti organi linfoidei nei Teleostei.

## 1. IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

Il sistema immunitario dei pesci Teleostei è in grado di difendere l'organismo contro agenti infettivi o patogeni mediante l'interazione di popolazioni leucocitarie e l'espressione di molecole specifiche come avviene in altri Vertebrati, tra cui l'uomo. Sono presenti organi e tessuti linfoidei: timo, rene, milza, tessuti mucosali associati alla pelle, branchie ed intestino (Tataner, 1996), che sembrano essere ricchi di leucociti e soprattutto di linfociti (Zapata et al., 1996; Abelli et al., 1996; Romano et al., 1997). Come nei Mammiferi, lo sviluppo e l'attivazione funzionale dei linfociti dei pesci sembra avvenire, in microambienti specializzati come gli organi linfatici primari e secondari, da cellule staminali progenitrici. Inoltre, sempre maggiori studi stanno indicando che molte delle componenti cellulari e molecolari del sistema immunitario sono comuni alla maggior parte dei Vertebrati. Queste similitudini sono state accertate mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici diretti contro sub popolazioni leucocitarie e tramite il clonaggio, nei pesci, di geni chiave nel sistema immunitario dei Mammiferi. Le sottopopolazioni leucocitarie comprendono le cellule B e le plasmacellule (Irwin et al., 1986; Miller et al., 1994; Koumas-van Diepen et al., 1994a; Romano et al., 1997a), le cellule T (Lin et al., 1992; Scapigliati et al., 1995; Abelli et al., 1996; Romano et al., 1997a, b), i granulociti (Ainsworth, 1992; Hine, 1992; Verbarg-van Kemenade et al., 1995), i monociti/macrofagi (Mesenguer et al., 1991; Hardie et al., 1994; Sveinbjornsson et al., 1994; Romano et al., 1998), le cellule citotossiche non specifiche (NCC) (Evans et al., 1992; Hogan et al., 1996) e i tromboцити (Esteban et al., 1989; Rombout et al., 1996).

Monociti-macrofagi, trombociti, granulociti neutrofili ed in parte le NCC, rappresentano il sistema immunitario che agisce in maniera aspecifica. In particolare, i monociti-macrofagi e i neutrofili sono deputati all'attività di fagocitosi (Mac Artur e Fletcher, 1985), mentre alle NCC è affidato il compito di svolgere attività cellulare tossica non specifica (Jaso-Friedman e Evans, 1999). I linfociti B e T sono, invece, le popolazioni cellulari che sono attivate in modo differenziato da specifici antigeni e rappresentano la linea di difesa immunitaria di tipo specifico. I linfociti T costituiscono, inoltre, la popolazione cellulare che riconosce componenti propri dell'organismo rispetto agli estranei, risultando importanti nella regolazione della risposta immunitaria di tutti i Vertebrati, compresi i pesci (Nakanishi et al., 2001; Nam et al., 2002).

## 1.1 Immunità' innata dei Teleostei

I Teleostei possiedono due tipi principali di immunità: l'immunità innata (non specifica) e l'immunità adattativa (risposte cellulari ed umorali indotte dall'antigene, con caratteristiche di specificità e memoria) (Scapigliati et al., 2000). Tale divisione tra i due sistemi immunitari non è così netta in quanto il sistema immunitario innato, oltre ad essere di primaria importanza nel combattere le infezioni nei pesci, è anche importante nell'attivazione della risposta immunitaria acquisita. Nei recenti anni, infatti, la stretta relazione tra sistema innato ed acquisito ha ricevuto una particolare attenzione nella ricerca sui Mammiferi. Alcuni studi condotti su topi "knock-out" e sulla fase acuta della risposta immunitaria hanno mostrato che il sistema innato è essenziale per il funzionamento dell'immunità acquisita e ne determina la natura della risposta (Fearon et al., 1997; Carroll et al., 1998; Vilmos et al., 1998). L'attivazione dei componenti del sistema di riconoscimento innato, come la stimolazione dei fagociti, la produzione di citochine, chemochine, l'attivazione del sistema di complemento e di vari recettori, stimolano le cellule T e B e le cellule presentanti l'antigene (Lo et al., 1999). Sebbene nei pesci vengano effettuati minori studi a riguardo, si pensa sia presente in essi una simile comunicazione tra sistema innato e acquisito (Dixon et al., 2001).

Per definizione il riconoscimento del non-self da parte del sistema immunitario innato è mediato da un pattern di proteine/recettori di riconoscimento, codificati dalla linea germinale, che identificano patterns molecolari caratteristici dei microbi. Queste molecole includono polisaccaridi, lipopolisaccaridi (LPS), peptidoglicani, DNA batterico, RNA virale a doppio filamento e altre molecole, collettivamente chiamate come patterns molecolari associati a patogeni (PAMP), e che sono altamente conservate e generalmente non espresse negli organismi multicellulari (Medzhitov et al., 2002; Elward et al., 2003). Questa caratteristica del sistema immunitario innato è fondamentalmente differente dal meccanismo di riconoscimento del sistema immunitario acquisito e ha origini antiche nella storia dell'evoluzione, bisogna tornare ai primi Metazoi (porifera), che si sono evoluti circa un miliardo di anni fa. L'origine del sistema immunitario acquisito si fa risalire alla comparsa dei primi Vertebrati mandibolati, circa 450 milioni di anni fa con l'avvento dei geni *RAG*. Questi ultimi hanno segnato l'inizio del riarrangiamento dei geni della superfamiglia delle Ig, dei recettori T e B e delle classi di *MHC*, portando al riconoscimento di un numero illimitato di epitopi antigenici (Cooper, 2000; Du Pasquier, 2001).

Nei pesci, il sistema immunitario innato consiste sia di componenti cellulari, sia di parametri umorali, che possono essere o recettori associati a cellule o molecole solubili del

plasma, o di altri fluidi del corpo. Le cellule coinvolte nella risposta innata sono i fagociti (granulociti neutrofili, monociti e macrofagi), le cellule natural-killer, e le cellule citotossiche non-specifiche (NCCs). Altre tipologie cellulari che producono molecole immunoregatorie coinvolte nell'immunità innata sono le cellule epiteliali dendritiche (Guery et al., 1995) e i fibroblasti (Elbe et al., 1995). Le molecole coinvolte nell'immunità innata sono i peptidi antibatterici, il lisozima, il complemento, gli inibitori di crescita come la transferrina, le chemochine e le citochine, l'interferone (IFN), le proteine della fase acuta, le lectine e i recettori Toll-like (Magor e Magor, 2001).

La fagocitosi di particelle estranee è un'innata attività fisiologica compiuta da alcune tipologie cellulari appartenenti a tutte le specie di Metazoi finora investigate (Randelli et al., 2008). Essa è di particolare importanza nell'immunità innata per l'eliminazione di particelle opsonizzate e non (Verho et al., 2005), inoltre gioca un ruolo nell'immunità acquisita nella presentazione di antigeni, derivati da patogeni fagocitati e processati, ad altre cellule del sistema immunitario (Savina et al., 2007).

Le risposte fagocitiche dei macrofagi sono state studiate con analisi morfologiche (Esteban e Meseguer, 1997) riguardanti l'influenza della sorgente di leucociti, la specie batterica, la presenza o assenza di una parete batterica, lo stato vitale del batterio (vivo o morto) e l'opsonizzazione del batterio. Questi studi hanno mostrato che i macrofagi peritoneali della spigola hanno maggiore capacità di fagocitare i batteri rispetto ai monociti isolati dal sangue, che a loro volta hanno maggiori capacità fagocitiche rispetto alle cellule isolate dal rene cefalico.

L'attività fagocitica delle cellule aderenti, a seguito della stimolazione con batteri (*Aeromonas salmonicida*) e funghi (*Candida albicans*), è stata studiata mediante microscopia ottica e misurando la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) (Benanni et al., 1995). E' stato dimostrato che il rapporto macrofagi/agenti patogeni e l'ampiezza della risposta ROI variano con il tipo di agenti patogeni ed inoltre che l'opsonizzazione con siero di pesce aumenta la risposta ROI dei macrofagi.

Parassiti quali i funghi, possono colpire la salute della spigola in acquacoltura e, sebbene sia stata riportata recentemente una risposta umorale specifica contro questi organismi (Muñoz et al., 2000), tali risultati evidenziano che l'immunizzazione con *S. dicentrarchi* è risultata principalmente nell'attivazione della risposta immunitaria non specifica, misurata attraverso l'attività del lisozima, un'aumentata fagocitosi dei macrofagi e un'attiva produzione di ROI.

Tra i markers cellulari per i monociti/macrofagi dei pesci, è stato descritto un anticorpo

monoclonale (mAB 45) che reagisce in maniera specifica con un peptide di 48 kDa dei monociti di trota (Köller et al., 2001). L'antigene riconosciuto da questo mAb è espresso nella membrana di larghi e non-granulati leucociti di trota che hanno la tipica morfologia dei monociti al citofluorimetro. Non è stata, inoltre, rilevata nessuna reazione del mAb 45 con i granulociti, linfociti e trombociti.

Più recentemente, per meglio comprendere il ruolo dei macrofagi nelle risposte immunitarie, è stato costruito un anticorpo policlonale contro il recettore del fattore stimolante-colonie dei macrofagi (Mcsfr) nell'orata (*Sparus aurata* L.) (Mulero et al., 2008). Questo anticorpo è stato utilizzato per lo studio della distribuzione e localizzazione delle cellule immunoreattive (Mcsfr<sup>+</sup>) in differenti organi e della loro distribuzione insieme alle cellule produttrici IL1 $\beta$ , in seguito all'infezione con il batterio *Vibrio anguillarum*.

Di particolare interesse è la recente scoperta che le cellule B dei pesci possono compiere fagocitosi, attribuendo un nuovo ruolo ai linfociti nell'immunità innata (Li et al., 2006). Di conseguenza, gli anticorpi contro le IgM prodotti per molte specie di pesci possono essere considerati come putativi markers per la fagocitosi compiuta dalle cellule B.

Anche i granulociti possono effettuare la fagocitosi e sono stati realizzati sia anticorpi monoclonali contro i granulociti neutrofili di trota (Hamdani et al., 1998) che antisieri per i granulociti del merluzzo atlantico (Rønneseth et al., 2007).

Le cellule non specifiche che presentano citotossicità (NCC) sono state analizzate a livello morfologico, indicando che i leucociti erano capaci di uccidere i loro bersagli inducendo necrosi e apoptosi in modo molto simile a come fanno le cellule citotossiche dei Mammiferi (Meseguer et al., 1996). Sia le natural killer (NK) di quest'ultimi che le NCC sono attivate da linfocine (Ruiz et al., 2001), necessitano del contatto diretto con la cellula bersaglio (Evans and Cooper, 1990) e, come conseguenza di questa interazione, presentano cambiamenti ultrastrutturali nell'area di contatto tra le cellule (Mulero et al., 1994). Una differenza tra le NK e le NCC è emersa da studi sulla cinetica della lisi di cellule tumorali condotti sull'orata, da cui si evince che la velocità d'azione delle NCC è inferiore a quella con cui agiscono le NK (Cuesta et al., 2002).

Studi *in vitro* dell'attività citotossica dei leucociti derivati dal rene cefalico, dal sangue e dalla cavità peritoneale della spigola (*Dicentrarchus labrax*) contro cellule tumorali di Mammifero, hanno permesso di separare le cellule che attuano una risposta citotossica non specifica in due sottopopolazioni: cellule monocita-simile e cellule linfocita-simile (Mulero et al., 1994). L'analisi ultrastrutturale ha evidenziato che le cellule monocita-simile presentano un'ampia area di contatto con la cellula target, hanno un nucleo ovale e

pochi granuli nel citoplasma, mentre le cellule linfocita-simile stabiliscono pochi contatti con le cellule target, possiedono un largo nucleo e occasionali granuli citoplasmatici. Simili popolazioni di leucociti, che mostrano una citotossicità non specifica contro cellule tumorali di Mammifero, sono state trovate in altri Teleostei, come l'orata (*Sparus aurata*) e la carpa (*Cyprinus carpio*) (Meseguer et al., 1994; Mulero et al., 1994; Nakayasu et al., 2005). Queste scoperte hanno suggerito che la risposta citotossica non specifica, nella spigola, è mediata da alcune popolazioni di leucociti che differiscono tra loro per i vari meccanismi di riconoscimento del target e di citolisi.

Nei Teleostei tutte le NCC hanno mostrato esprimere sulla loro superficie un recettore, NCCRP-1, che determina il contatto tra la cellula citotossica e il suo target (cellula tumorale o protozoo parassita) per indurre il ciclo litico dello stesso target (Jasofriedmann et al., 1997). Le cellule citotossiche non specifiche sono state studiate in maniera molto approfondita nel pesce gatto, dove sono state identificate usando l'anticorpo monoclonale mAb 5C6, specifico per il recettore NCCRP-1 (Evans et al., 1999). La caratterizzazione molecolare di questo recettore, nell'orata, ha rivelato una eterogeneità tra le NCC, mostrando, quindi, che differenti tipologie di leucociti (linfociti, monociti/macrofagi e granulociti acidofili) possono contribuire ad una risposta citotossica non specifica (Cuesta et al., 2005a). Inoltre, molto interessante è la scoperta che i neutrofili della trota siano responsabili di una risposta citotossica non specifica (Sasaki et al., 2002). In questo lavoro i neutrofili sono stati isolati dal rene cefalico usando il mAb 5E9, e le cellule isolate hanno mostrato una significativa attività citotossica contro le cellule target YAC-1.

Una fondamentale classe di molecole coinvolte nel sistema immunitario è quella delle citochine che svolgono un ruolo centrale nei sistemi di difesa sia innato che acquisito. L'elevato grado di conservazione delle loro proprietà tra i vari gruppi animali indica come tali proteine siano fattori altamente conservati nel corso dell'evoluzione. Nei Mammiferi, le cellule fagocitiche rispondono ad antigeni microbici rilevati nel sito d'infezione, con la secrezione di citochine, tra le quali il TNF- $\alpha$ , interleuchina-1 (IL-1), IL-6 ed una chemochina CXC, e l'IL-8. Il TNF- $\alpha$ , l'IL-1 e l'IL-6, mostrano ridondanti e pleiotropici effetti che prevedono, l'induzione della sintesi delle proteine della fase acuta (APP), l'attivazione dell'endotelio vascolare per permettere una maggiore permeabilità vascolare ed il potenziamento dell'extravasazione cellulare, la stimolazione dei macrofagi, la proliferazione dei fibroblasti e l'attivazione delle cellule B e T.

In questi ultimi anni il numero dei geni che codificano per le citochine è notevolmente

aumentato nei Teleostei, nonostante siano disponibili, al momento, pochi dati sulla loro attività biologica (Scapigliati et al., 2006), e siano presenti anticorpi solo per due citochine: l'IL-1 e il TNF.

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine inducibili pro-infiammatorie che dirigono la migrazione e l'attivazione di specifici tipi cellulari mediante l'interazione con i loro recettori. Le diverse classi di chemochine vengono divise in base alla disposizione lungo la sequenza dei residui di cisteina. Nella classe delle chemochine CXC (o chemochine  $\alpha$ ), il cui protipo è l'IL-8, le prime due cisteine nel tratto N-terminale sono separate da un singolo aminoacido, mentre non è presente nessun residuo intermedio tra le due cisteine nelle chemochine della classe CC (o chemochine  $\beta$ ). I recettori delle chemochine appartengono ad una classe ben nota di proteine transmembrana, definite anche "serpentine" o recettori multipasso, che presentano sette domini transmembrana e sono accoppiati a proteine G-intracellulari. Ci sono evidenze che mostrano che vi è una considerevole ridondanza nelle interazioni chemochina-recettore: la maggior parte dei recettori può legare più di una chemochina e viceversa. Nei pesci sono state clonate alcune chemochine e loro recettori: queste includono, omologhi delle chemochine CC nella trota (CK-1) (Dixon et al., 1998), e nella carpa (Fijiki et al., 2000), il recettore delle chemochine CC, CCR7 (Daniels et al., 1999) ed i recettori delle chemochine CXC, IL-8 (Nam et al., 2000), CXCR4 (Daniels et al., 1999) e CXCR1/CXCR2 (Fijiki et al., 2000) nella carpa.

Il complemento è una parte essenziale dell'immunità innata ed è responsabile della mediazione delle risposte infiammatorie, l'opsonizzazione delle particelle e la lisi della membrana cellulare. L'attivazione del complemento può avvenire secondo tre vie: la via classica (CCP), la via alternativa (ACP), e la via delle lectine (LCP). I Teleostei possiedono un efficiente sistema del complemento (Sunyer and Tort, 1994) capace di lisare, in alcune specie di pesci, una varietà di eritrociti (di pecora, di coniglio, di cane e di capra), attraverso la via alternativa (Sunyer e Tort, 1995). Una delle proprietà più interessanti del complemento dei Teleostei è che alcune delle sue componenti (C3 e fattore B) sono presenti in isoforme multiple, prodotte da geni differenti e che queste differiscono nella struttura e nella funzione, aumentando così il numero dei potenziali patogeni che può riconoscere (Zarkadis et al., 2001; Nakao et al., 2000).

Un altro parametro umorale importante del sistema innato è la transferrina, che agisce come un inibitore di crescita dei batteri legando il ferro libero nel sangue essenziale per la vita dei batteri (Langston et al., 2001). La transferrina è anche una proteina della fase acuta richiesta durante le risposte infiammatorie per rimuovere il ferro dai tessuti danneggiati

(Bayne et al., 2001) e un attivatore dei macrofagi dei pesci (Stafford et al., 2001). L'interferone è un altro inibitore di crescita che induce l'espressione del gene *Mx* e di altre proteine antivirali (Ellis, 2001; Leong et al., 1998). L'attività interferone-simile è stata dimostrata in alcune specie di pesci, e recentemente i geni sia per l'interferone che per l'*Mx* sono stati clonati in diverse specie (Randelli et al., 2008).

Vari enzimi litici, che possono agire singolarmente o a cascata, sono importanti elementi di difesa specialmente contro i batteri. Questi sono idrolisi, come il lisozima, la chitinasi, la catepsina, la via litica del sistema del complemento e altri enzimi batteriolitici/emolitici, trovati nei tessuti e nei fluidi del corpo dei pesci (Alexander et al., 1992). Il lisozima è un importante parametro nella difesa immunitaria sia degli invertebrati che dei Vertebrati. E' un battericida, ossia idrolizza il legame  $\beta$ -glicosidico dei peptidoglicani della parete cellulare dei batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi, provocandone la lisi (Medzhitov et al., 1998). Il lisozima attiva il sistema del complemento e i fagociti (Grinde, 1989). E' presente nel muco, nei tessuti linfoidei, nel plasma e negli altri fluidi del corpo della maggior parte delle specie di pesci (Grinde, 1989; Yousif et al., 1994).

Le lectine sono glicoproteine importanti per la neutralizzazione delle componenti batteriche. Esse partecipano all'agglutinazione dei microrganismi e alla precipitazione di sostanze solubili (Van Muiswinkel, 1995). Le lectine di tipo-C presentano una specificità di legame per differenti carboidrati come il mannosio, N-acetilglucosamina o il fucosio in presenza di ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). L'interazione di tali proteine con i carboidrati determinano l'opsonizzazione, la fagocitosi e l'attivazione del sistema del complemento (Arason, 1996). Le più studiate sono le lectine leganti il mannosio (MBL), che mostrano una specificità per il mannosio, N-acetilglucosamina, fucose e il glucosio. Nei Mammiferi le MBL mediano la via delle lectine del sistema del complemento in associazione con una serina proteasi (MASP) (Magor et al., 2001). Diverse tipologie di lectine sono state isolate dal siero di diverse specie di pesci; alcune mostrano un'affinità per i carboidrati, e struttura molecolare e funzione simili ai Mammiferi (Ottinger et al., 1999; Nagai et al., 2000), mentre altre presentano una differente specificità nel legame con i carboidrati e sequenze eterologhe (Fock et al., 2000; Honda et al., 2000). Le pentraxine (la proteina C-reattiva, CRP, e la proteina amiloide del siero, SAP) sono lectine presenti nei fluidi del corpo sia di invertebrati che di Vertebrati e sono comunemente associate con la risposta della fase acuta (Bayne et al., 2001; Wu et al., 2003). Come è mostrato dall'aumento significativo dei livelli nel siero a seguito traumi o infezioni (risposta della fase acuta), le pentraxine partecipano alla difesa di tipo innato (PRR) (Cook et al., 2003) attivando la via del

complemento (Jiang et al., 1991; De Haas et al., 2000) e giocando un ruolo nel riconoscimento e nell'eliminazione delle cellule apoptotiche (Nauta et al., 2003). La CRP lega le molecole di fosforilcolina presenti nella parete cellulare dei batteri in presenza di ioni calcio, mentre la SAP mostra affinità per le molecole di fosforiletanolamina e inoltre si lega allo strato lipopolisaccaridico (LPS) dei Gram-negativi (Lund et al., 1999). Alcune specie di pesci sembrano avere o la pentraxina CRP (come il merluzzo e il pesce gatto) o la SAP (come il salmone e l'halibut), mentre altre specie (come la trota) hanno entrambe le pentraxine come i Vertebrati più evoluti (Lund et al., 1998; White et al., 1981).

## **1.2 Immunità acquisita (o specifica) dei Teleostei**

L'immunità acquisita o adattativa consiste in una serie di meccanismi di difesa maggiormente evoluti rispetto a quelli dell'immunità innata, che vengono stimolati dall'esposizione agli agenti infettivi e che accrescono il loro potenziale difensivo ad ogni successiva esposizione ad un determinato agente patogeno. Le caratteristiche principali dell'immunità acquisita sono una specificità ristretta per le molecole antigeniche, una specializzazione somatica che consente risposte diverse ad antigeni diversi ed una "memoria", che permette una più intensa risposta ad esposizioni ripetute allo stesso agente patogeno ed una maggiore efficienza nell'espressione delle funzioni effettrici (Rocha B. e Tanchot C., 2004).

I componenti basilari dell'immunità acquisita sono i linfociti ed il loro prodotto principale: una molecola capace di riconoscere l'antigene che viene o secreta (linfociti B) o esposta sulla membrana (linfociti T). Nei Vertebrati mandibolati e nei Mammiferi, dove il funzionamento del sistema immunitario è maggiormente noto, le risposte adattative immunomodulatorie sono classificabili in due tipi: immunità umorale ed immunità cellulo-mediata.

Le cellule responsabili dell'immunità acquisita umorale sono i linfociti B e T helper (Th) produttori di citochine, molecole di tipo ormonale necessarie per la crescita e la differenziazione; invece, l'immunità cellulare consiste di cellule che presentano l'antigene (APC, quali macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali, fagociti mononucleati) e di linfociti Th produttori di citochine per l'attivazione dei macrofagi e di linfociti T citotossici (Tc) i quali, come suggerisce il loro nome, uccidono le cellule tumorali, infettate da virus o da altri patogeni endocellulari.

Nell'immunità di tipo cellulo-mediata la fase effettrice è avviata dal legame specifico dell'antigene ai linfociti T effettori di memoria, i quali sono quindi localizzati in

prossimità delle cellule che recano sulla loro superficie gli antigeni estranei; per questo motivo le reazioni cellulo-mediate sono le più importanti per eliminare batteri o virus che si replicano all'interno delle cellule.

### 1.2.1 Immunoglobuline e cellule B nei Teleostei

La cinetica della risposta umorale nei pesci ossei è stata ampiamente studiata (Sailendri and Muthukkaruppan, 1975; Rijkers, 1982). È importante notare che, a seguito di immunizzazione, la lunghezza della fase di latenza, esponenziale e di decremento, può essere influenzata da vari fattori, quali temperatura, modalità, formulazione e dose di somministrazione dell'antigene, ed età delle specie coinvolte. Dopo una seconda esposizione allo stesso antigene, la fase di latenza è più breve e la risposta è accelerata, inoltre si raggiunge un numero più alto di plasmacellule coinvolte. Tuttavia nelle risposte secondarie dei pesci, l'aumento dell'affinità anticorpale è molto limitato, paragonato a quello dei Mammiferi (Arkoosh e Kaattari 1991; Kaattari, 1992); è stata inoltre dimostrata l'assenza nei pesci ossei, rispetto ai Mammiferi, del caratteristico switch delle Ig a più basso peso molecolare (Kaattari, 1992). Le IgM sono considerate la sola classe di immunoglobuline universalmente presenti in tutti i Vertebrati mandibolati (Bengtén et al., 2000; Scapigliati et al., 1997). Studi molecolari e biochimici hanno evidenziato che le Ig dei Teleostei appartengono a una sola classe (Ig-M simile) con un singolo tipo di catena pesante ( $\mu$ ) (Warr, 1995). Tuttavia, recentemente nei pesci sono state trovate altri isotipi di IgM, nominate IgD (Wilson et al., 1997; Stenvik et al., 2000), IgT (Hansen et al., 2005) e IgZ (Danilova et al., 2005).

E' stato inoltre dimostrato che le IgM di superficie si associano ad altre molecole per formare il complesso del "recettore specifico per l'antigene dei linfociti B" (*BCR*). Il *BCR* ha la funzione di attivare i linfociti B che si trasformano in plasmacellule, iniziando la secrezione di interleuchine ed immunoglobuline. Nei Teleostei, la sequenza genica del *BCR* è stata evidenziata nel pesce gatto (MacDougall et al., 1999). La comparsa di IgM citoplasmatiche e di superficie sui linfociti varia in modo considerevole tra le varie specie di Teleostei. In generale la prima comparsa di linfociti B e di immunoglobuline avviene più tardi nelle specie marine rispetto a quelle di acqua dolce (Chantanachookhin et al., 1991).

La struttura del recettore di membrana delle Ig è capace di attivare un secondo messaggero intracellulare in risposta al cross-linking (Van Ginkel et al., 1994) con l'immunoglobulina e al legame con l'antigene (MacDougall et al., 1999).

L'eterogeneità delle catene pesanti e leggere delle Ig (i.e. differenze in taglia molecolare e determinanti antigenici) è stata descritta in molti Teleostei, mediante l'uso di anticorpi monoclonali (Mabs) e antisieri policlonali, ed è stato postulato che derivi da splicing alternativo o da differente glicosilazione di catene polipeptidiche (Scapigliati et al., 1999). La maggior parte di questi anticorpi monoclonali riconosce la catena pesante delle Ig, mentre solo pochi di essi sono stati sviluppati contro la catena leggera. Nella spigola, uno dei Mabs legato in maniera specifica alla catena leggera delle Ig (DLIg3), è stato usato al citofluorimetro per analisi della distribuzione delle cellule producenti l'anticorpo. L'analisi ha mostrato che il DLIg3 riconosce il 21% dei leucociti del sangue periferico, il 3% dei timociti, il 30% degli splenociti, il 33% dei leucociti del rene cefalico e il 2% dei leucociti del GALT (Romano et al., 1997).

È stata, inoltre, dimostrata la presenza delle Ig e di molecole Ig simili sia nelle uova che negli avannotti di alcune specie di pesci, e l'uptake delle Ig è stato studiato in dettaglio nelle uova dell'orata e della spigola (Picchietti et al., 2002; 2004; 2006).

### 1.2.2 I linfociti T nei Teleostei

Le cellule T sono le principali effettrici della difesa immunitaria mediata da cellule, che si esplica mediante il riconoscimento e la risposta al peptide associato all'antigene mediante le molecole di *MHC* di classe I e II. Differentemente dalle cellule B, le cellule T non rispondono ad antigeni solubili, acidi nucleici, polisaccaridi e lipidi (Babbitt et al., 1985).

La prima evidenza dell'esistenza delle cellule T nei Teleostei risale agli anni '70, con la dimostrazione "in vitro" della proliferazione indotta con mitogeni (Etlinger et al., 1976; Sizemore et al., 1984) e da antigeni non-self (Marsden et al., 1996), delle risposte nella reazione dei linfociti mescolati (Miller et al., 1985) e della funzione come cellule helper nella produzione di anticorpi contro antigeni timo-dipendenti (Miller et al., 1987).

Al momento, la spigola è la sola specie marina per la quale sia disponibile un anticorpo specifico per i timociti e le cellule T periferiche (DLT15), nonostante sia stato prodotto un anticorpo monoclonale contro le cellule T intestinali della carpa (WCL38).

L'anticorpo DLT15 è capace di riconoscere l'antigene sia in cellule vive che in sezioni di tessuto e l'analisi al citofluorimetro ha permesso per la prima volta di valutare il contenuto delle cellule T in un pesce, costituito del 3% di leucociti periferici del sangue (PBL), del 9% di splenociti, del 4% di cellule del rene cefalico, del 75% di timociti, del 51% di leucociti associati al GALT e del 60% di leucociti del tessuto linfoide associato alle branchie (Romano et al., 1997). Un importante uso del DLT15 è stato la purificazione di

cellule immunoreattive dagli organi della spigola, principalmente dal sangue e dal tessuto linfoide associato all'intestino, e le cellule purificate sono state impiegate per il clonaggio del recettore delle cellule T per l'antigene (*TcR $\beta$* ) (Scapigliati et al., 2000).

L'anticorpo monoclonale WCL38 è stato prodotto in seguito ad immunizzazione del topo con molecole di membrana isolate da cellule linfoide intraepiteliali dell'intestino della carpa. Analisi al citofluorimetro hanno mostrato che il WCL38 reagisce con il 50-70% delle cellule linfoide isolate dall'intestino, branchie e pelle, con meno del 6% delle cellule isolate dal timo, rene cefalico e milza, e con un numero trascurabile di PBL. Si è ipotizzato che i linfociti WCL38<sup>+</sup> fossero cellule T, poiché non reagiscono con le cellule B, i macrofagi e le cellule citotossiche non specifiche (Rombout et al., 1998).

Negli ultimi anni la conoscenza dei meccanismi di difesa immunitaria nei Teleostei si è approfondita grazie all'aumento dell'interesse nella scoperta e nel clonaggio, nei pesci, di geni codificanti peptidi immunoregolatori omologhi a quelli conosciuti nei Mammiferi.

Le catene  $\alpha$  e  $\beta$  del *TcR* sono state clonate in diverse specie di pesci (Partula et al., 1995; Hordvik et al., 1996; De Guerra and Charlemagne, 1997; Wilson et al., 1998; Miracle et al., 2001; Wermenstam and Pilstrom, 2001; Hordvik et al., 2004; Imai et al., 2005). Nella spigola è stata identificata sia la catena  $\beta$  (Scapigliati et al., 2000) che quella  $\alpha$  (accession number: AY831387), e il *TcR $\beta$*  è stato clonato nell'orata (*Sparus aurata*) (Randelli et al., 2007). Nel Teleosteo *Paralichthys olivaceus* sono stati isolati ed identificati i cDNA dei geni codificanti le quattro catene del *TcR* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Nam et al., 2000, 2003) e recentemente è stata clonata la catena  $\gamma$  del *TcR* nella carpa (*Cyprinus carpio*) (Shang et al., 2007).

Più recenti sono i dati che riportano la caratterizzazione del complesso *TcR/CD3* in alcune specie di Teleostei. Nei Mammiferi questo complesso è composto dall'eterodimero del *TcR $\alpha/\beta$*  o del *TcR $\gamma/\delta$*  in associazione alle catene del *CD3* ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ), e gioca un ruolo importante nel riconoscimento, nella maturazione e attivazione della cellule T (Ashwell, 1990). Attualmente è nota la sequenza delle catene  $\gamma/\delta$  del *CD3* nel fugu (Araki et al., 2005), e nella carpa (Shang et al., 2007), la sequenza della catena  $\epsilon$  in *Paralichthys olivaceus* (Park et al., 2005) e nel fugu (Araki et al., 2005).

Lo studio *in vitro* delle risposte proliferative ed anticorapali contro vari antigeni timo-dipendenti ha fornito l'evidenza che molecole *MHC*-simili governano la presentazione dell'antigene e che avviene una restrizione *MHC* delle risposte immunitarie dei Teleostei (Vallejo et al., 1992).

Attualmente le molecole di *MHC* I e II sono state identificate in diverse specie di Teleostei

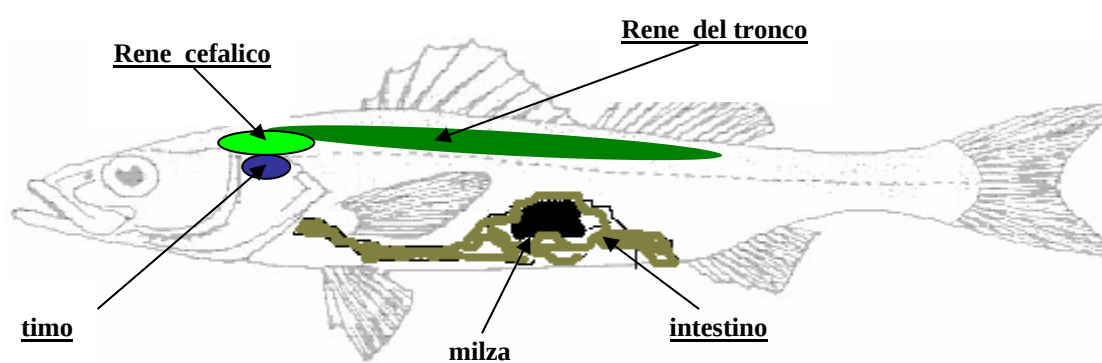
come la spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Buonocore et al., 2007), la spigola striata (*Morone saxatilis*) (Walker et al., 1994), l'orata rossa (*Chrysophrys major*) (Chen et al., 2006), vari ciclidi (Figueroa et al., 2000), alcuni salmonidi (Miller et al., 1996; Ristow et al., 1999; Stet et al., 2002) e differenti ciprinidi (Stet et al., 1998; Sultman et al., 1993; Dixon et al., 1996; Graser et al., 1996; Van Erp et al., 1996; Grimholt et al., 2003).

L'ipotesi che nei Teleostei esistano sottopopolazioni di cellule T è supportata da studi di attività biologica (Fischer et al., 2006), e da dati di biologia molecolare e cellulare. I corecettori *CD4* e *CD8* sono stati clonati in trota, fugu, carpa, salmone, orata e spigola (Hansen et al., 2000; Suetake et al., 2004; Samamoto et al., 2005; Moore et al., 2005; Randelli et al., 2006; Buonocore et al., 2006, 2008). Recentemente, nella trota sono stati identificati due differenti geni che rassomigliano al *CD4* dei Mammiferi (Laing et al., 2006). Il primo codifica per quattro domini Ig, mentre l'altro (*CD4REL*) codifica per due domini Ig.

In un recente lavoro viene riportata la produzione nel fugu di un antisiero specifico per il *CD8α* con l'utilizzo della tecnica di immunizzazione a DNA (Araki et al., 2007). Questo studio ha permesso di identificare popolazioni di leucociti *CD8α<sup>+</sup>* tra linfociti, trombociti e monociti, isolati dai leucociti periferici del sangue (PBL). Si è visto, inoltre, tramite analisi di RT-PCR che tali popolazioni leucocitarie esprimono i geni *CD8α*, *CD8β*, *CD3ε* e *TcRα* ma non il *CD4* e *IgL*, indicando che le cellule *CD8α<sup>+</sup>* e *CD4<sup>+</sup>* appartengono a due differenti popolazioni.

## 2. STRUTTURA E FUNZIONE DEGLI ORGANI LINFATICI

Nei Mammiferi gli organi linfoidei primari, timo e midollo osseo, sono responsabili rispettivamente del differenziamento dei linfociti T, deputati alla risposta specifica cellulare, e dei linfociti B, deputati alla risposta umorale specifica. Gli organi secondari, quali la milza, i linfonodi, e il tessuto associato alle mucose (MALT), rappresentano il microambiente in cui i linfociti interagiscono tra loro e con l'antigene. Quest'ultimi tessuti non sembrano essere organizzati nello stesso modo nei Teleostei, in quanto pur riconoscendo una divisione fisiologica per la produzione di cellule specifiche, gli organi possono essere considerati a funzione mista, in grado cioè di produrre sia le cellule linfocitarie che mielocitarie e per questo sono definiti organi linfomioidi (Fänge, 1982; Rombout et al., 1993a). Il differenziamento primario dei linfociti T sembra risiedere nel timo (Ritter e Crispe, 1992; Romano et al., 1998; Trede e Zom, 1998) anche se l'intestino potrebbe essere una sede alternativa di differenziamento (Picchiatti et al., 1997), come suggerito per i Mammiferi. Nei Teleostei sono però assenti il midollo osseo, i linfonodi e le placche di Peyer. Il rene cefalico è probabilmente l'analogo del midollo osseo (Zapata, 1979; Lamers, 1985), mentre la milza sembra essere maggiormente coinvolta nell'eritropoiesi nella maggioranza delle specie di pesci sinora studiate (Rowley et al., 1988; Van Muiswinkel et al., 1991). Gli organi linfomioidi più importanti nei Teleostei sono rappresentati in fig. 1.1.



**FIGURA 1.1:** rappresentazione schematica degli organi linfomioidi dei teleostei

## 2.1 Timo

Il ruolo principale del timo, nei Vertebrati più evoluti, è quello di fornire un appropriato microambiente in cui possano maturare le cellule T. Nei Mammiferi, le molecole *MHC* di classe I e II mediano l'acquisizione di un repertorio di cellule T partecipando alla selezione timica positiva e negativa dei linfociti *CD8* e *CD4* (Ladi et al., 2006).

Nei Teleostei, il timo si sviluppa nella lamina propria del tratto-gastrointestinale, nella tasca localizzata alla base degli archi branchiali e successivamente migra nel sottostante mesenchima durante l'ontogenesi. Nella maggior parte dei Teleostei il timo è localizzato vicino alla cavità branchiale e strettamente associato con l'epitelio faringeo (Zapata et al., 1996).

L'anatomia del timo è altamente variabile attraverso le varie specie di Teleostei (Bowden et al., 2005). Una zonazione timica è stata osservata nella spigola (Abelli et al., 1994), nel rombo (Fournier-Betz et al., 2000), in zebrafish (Danilova et al., 2004) nella trota (Fischer et al., 2005), in carpa (Huttenhuis et al., 2005) e nel salmone (Koppang et al., 2003), in cui è possibile, infatti, distinguere una regione timica esterna (cortex) ed una interna (medulla) e, spesso, una giunzione cortico-medullare. Sono state descritte anche differenze tra individui della stessa specie, probabilmente in dipendenza dall'età. Inoltre, è stato osservato nel timo della spigola e della carpa il processo di apoptosi, ad indicare lo svolgersi della selezione negativa delle cellule T nei pesci. Tale processo non è stato osservato durante lo sviluppo iniziale, mentre cellule apoptotiche sono state osservate sia nella cortex che nella medulla (Abelli et al., 1998; Romano et al., 1999).

Il timo dei pesci è composto soprattutto da cellule  $Ig^-$  (Scapigliati et al., 1995), inserite all'interno di un network di cellule epiteliali reticolari, e generalmente, con un organizzazione corteccia-medulla (Romano et al., 1997, 1999).

Le differenze nell'istologia del timo tra le specie di pesci sembra essere dovuta a tre ragioni (Romano et al., 1999a): la prima concerne l'estensione e la localizzazione della regione corticale e medullare, la seconda e la terza derivano rispettivamente dalla presenza di differenti tipi di cellule epiteliali e dalla presenza/assenza di cellule epiteliali limitanti (LECs), che appunto delimitano la ghiandola dall'epitelio faringeo. Sebbene la presenza di un network epiteliale timico sia stata definitivamente stabilita, manca ancora una classificazione univoca degli elementi epiteliali e dei loro possibili ruoli. Nella spigola, l'esistenza di sottopopolazioni epiteliali è stata dimostrata attraverso la presenza di tonofilamenti nel citoplasma con osservazioni ultrastrutturali, nella carpa tramite l'impiego di un anticorpo policlonale anti-cheratina (Froehly e Deshaux, 1986), e

attraverso reazioni istoenzimatiche (Castillo et al., 1990). Attraverso uno studio istologico ed ultrastrutturale sul timo del sarago (*Diplodus puntazzo* L.), è stata mostrata l'esistenza di un'eterogeneità di sottopopolazioni epiteliali in analogia con quanto era già stato dimostrato, tramite immunoistochimica, nell'uomo e nel pollo (Wijngaert et al., 1984; Romano et al. 1996). Tali sottopopolazioni cellulari sono state classificate in base alla diversa localizzazione e alle diverse caratteristiche citologiche in: cellule epiteliali limitanti (LECs), localizzate nella zona subcapsulare, perivascolare e trabecolare; cellule epiteliali reticolari (RECs), situate nella regione corticale e medullare; cellule timiche nutrici-simile, situate nel confine cortico-medullare; cellule cistiche, situate nel compartimento medullare; corpuscoli di Hassal, situati nella regione medullare. La precisa origine delle cellule epiteliali rimane una questione aperta ma sembra essere chiaro che esse giochino un ruolo importante nel creare un ambiente idoneo nel quale i linfociti T possano differenziarsi (Romano et al., 1998) come avviene nei Mammiferi (Ritter e Crispe, 1992) e negli uccelli (Kendall, 1991). Per far questo, esse devono esprimere tutta una serie di molecole, prime tra tutte quelle del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*MHC*), necessarie per il differenziamento delle cellule T: l'interazione del *TcR* con l'*MHC* ha, infatti, il ruolo di salvare i cloni di cellule T da inevitabile apoptosi dovuta al processo di selezione positiva (Jameson et al., 1994; Turka et al., 1991). Attualmente molte informazioni riguardo le funzioni del timo nei Teleostei sono state acquisite grazie all'identificazione di proteine e di markers genetici (Trede et al., 2001; Hansen et al., 1998). E' ora possibile confermare gli studi morfologici mediante l'uso di tecniche molecolari usando primers e sonde per alcuni geni come: i geni attivanti la ricombinazione *rag1* (Hansen-Kaattari, 1995; Greenhalgh-Steiner, 1995) e *rag2* (Hansen-Kaattari, 1996), il recettore per le cellule T *TcR* (Partula et al., 1995; 1996; Wilson et al., 1998), le molecole di *MHC* di classe I (Shum et al., 1999) e II (Glamann, 1995). Questi geni sono legati alla funzione immunitaria del timo come un altro gene d'interesse, il gene *ikaros*, generalmente richiesto per lo sviluppo delle cellule linfoidi ed espresso persino prima della comparsa del timo (Willet et al., 2001). Studi più recenti hanno permesso di identificare altri geni coinvolti nello sviluppo timico come il gene *foxn1*, che è il fattore di trascrizione espresso nelle cellule epiteliali prima dell'entrata nel timo dei progenitori linfoidi (Schorpp et al., 2002).

Tuttavia, sebbene siano stati fatti dei progressi nella comprensione del microambiente timico, nulla è noto nei Teleostei riguardo l'origine dei progenitori linfoidi che colonizzano il timo e il processo di selezione timica dei linfociti. L'espressione delle

molecole di *MHC* di classe I e II nel timo suggerisce la loro funzione nella selezione dei linfociti T. Nei Mammiferi, è noto che i progenitori delle cellule T entrano nel timo a livello della giunzione cortico-medullare e possono differenziarsi nella linea dei timociti, in cellule natural killer (NK) e in cellule dendritiche (Sacedón et al., 2003). Lo sviluppo delle cellule T subisce un processo di selezione timica e determina due scelte: la morte o la sopravvivenza (selezione positiva) e i due diversi destini sono determinati dal recettore delle cellule T (*TCR*) (Kisielow et al., 1995).

## 2.2 Rene

I Teleostei presentano la tipica organizzazione dei Vertebrati privi di midollo osseo, nei quali la formazione delle cellule del sangue avviene principalmente nel rene.

Il rene dei Teleostei è un importante organo linfatico, e consiste di due segmenti: il rene cefalico o anteriore e il rene del tronco, o medio-posteriore. Entrambe le regioni possono avere capacità emopoietica, in particolare il rene cefalico, le cui funzioni renali sono scomparse (Ellis e De Sousa, 1974, Zapata, 1979; 1981b). Sebbene nel rene dei Teleostei, dei clusters di linfociti sembrano occupare aree definite (Zapata, 1979), in generale le cellule linfo- ed emopoietiche sono sparse in uno stroma di cellule reticolari fibroblastiche (Quesada et al., 1990; Press et al., 1994) e nei vasi sanguigni sinusoidali (Zapata, 1979). Ogni linea cellulare emopoietica sembra essersi differenziata da progenitori cellulari (Al-Adhami e Kunz, 1976; Zapata, 1981a) con capacità linfo- e plasmacitopoietica (Smith et al., 1967; Zapata, 1979; 1981b). Nonostante alcuni autori abbiano notato somiglianze tra il rene dei Teleostei e i linfonodi dei Mammiferi (Smith et al., 1967), la caratteristica di essere sito di alloggio e di differenziamento dei precursori delle cellule del sangue, dà supporto all'ipotesi di una relazione filogenetica tra il rene e il midollo osseo degli altri Vertebrati (Zapata, 1979). In generale il rene è considerato una sorgente post-embrionale di cellule staminali emopoietiche (Al-Adhami e Kunz, 1976). Nel rene dei Teleostei si trovano APC e linfociti T e B (Zapata e Cooper, 1990) e la presenza di tali cellule riflette il ruolo di difesa del tessuto linfatico renale. Press et al., (1994) hanno mostrato la presenza di un più alto numero di cellule Ig positive nel rene e nella milza. Tali cellule sono sparse o formano piccoli gruppi pironinofilici (si colorano rosa con pironina), specialmente dopo la stimolazione antigenica (Van Muiswinkel et al., 1991; Press et al 1994). Studi condotti nella carpa dopo immunizzazione con siero albumina bovina (BSA) (Imagawa et al., 1991) hanno mostrato che le cellule dei gruppi pironinofilici corrispondono alla linea della plasma cellule aventi la capacità di produrre Ig.

## 2.3 Milza

La milza è l'ultimo organo che si sviluppa durante l'ontogenesi del sistema linfatico dei pesci (Tatner e Manning 1983a; 1983b). L'istologia della milza dei Teleostei è stata oggetto di numerosi studi (Zapata, 1983; Zapata e Cooper, 1990), sebbene siano disponibili pochi dati strutturali (Zapata, 1982; Quesada et al., 1990; Zapata e Cooper, 1990; Press et al., 1994). Il tessuto linfatico della milza dei Teleostei non è particolarmente sviluppato. Esso circonda le piccole arterie, è diffuso nel parenchima splenico ed è in relazione con i centri melanomacrofagi. Dopo stimolazione antigenica, si osserva un incremento della quantità del tessuto linfatico della milza. Tale tessuto è costituito di cellule linfatiche, principalmente linfociti di dimensioni piccole, medie e grandi, sistemati in una maglia di cellule reticolari di supporto. Alcuni dati suggeriscono che le cellule reticolari stromali della milza sono una popolazione molto eterogenea. Quesada et al. (1990) hanno riscontrato alcune differenze ultrastrutturali tra le cellule reticolari della polpa rossa e quelle della polpa bianca nella milza della spigola, e Press et al. (1994) hanno osservato variazioni d'intensità di reattività per la fosfatasi alcalina e la 5'-nucleotidasi, riflettendo l'esistenza di differenze tra distinte popolazioni di cellule reticolari. I macrofagi sono presenti nella polpa rossa e bianca, ed in quest'ultima è stato dimostrato ultrastrutturalmente che sono presenti anche linfociti e plasmacellule. I vasi sanguigni ellipsoidali sono cospicui nella milza della maggior parte dei Teleostei, ma non in tutti (Yoffey, 1929). Gli ellissoidi sono capillari terminali costituiti da un sottile strato di cellule endoteliali circondate da una guaina di fibre reticolari e macrofagi. Da notare che, mentre le arteriole spleniche reagiscono con le esterasi non specifiche e le fosfatasi alcaline, tale reattività scompare non appena i vasi assumono l'organizzazione tipica degli ellissoidi, riflettendo la natura particolare del loro endotelio (Press et al., 1994). Questi autori hanno inoltre analizzato il corredo isoenzimatico dei macrofagi ellissoidali, evidenziando la loro somiglianza con i macrofagi marginali della milza dei Mammiferi, anche se nella milza dei Teleostei non è presente una zona marginale che limita la polpa bianca e la polpa rossa (Kita e Itazawa, 1990). Grandi gruppi di cellule Ig-positive sono stati osservati in *Salmo salar* 3 mesi dopo la vaccinazione (Press et al., 1994), e un numero di cellule pironinofile appaiono negli ellissoidi e nei centri melanomacrofagi dopo immunizzazione primaria e secondaria (Van Muiswinkel et al., 1991). Più recenti sono i dati che confermano la presenza di cellule B nella milza di alcune specie, come la spigola (Scapigliati et al., 1995, 2003; Romano et al., 1997), anche se diversi lavori riportano l'espressione nella milza di markers specifici per le cellule T, come le catene  $\alpha$  e  $\beta$  del *TcR*

(Wermenstam e Pilström, 2001), e del *CD4* (Laing et al., 2006), a suggerire il coinvolgimento di quest'organo in varie risposte immunitarie.

## 2.4 Immunità mucosale nei Teleostei

Le superfici mucosali della pelle, delle branchie e dell'intestino dei pesci sono protette da meccanismi umorali e cellulo-mediati (Peleteiro e Richards, 1985; Hart et al., 1988). Il muco stesso costituisce una barriera tra l'ambiente esterno ed interno, e pertanto rappresenta un'efficace linea di difesa contro l'attacco di batteri, funghi e parassiti in genere (Pickering e Richards, 1980); esso contiene vari parametri immunitari come le lectine, le pentraxine, il lisozima, le proteine del complemento, i peptidi antibatterici e le IgM (Alexander e Ingram, 1992; Rombout et al., 1993; Aranishi e Nakane, 1997). Le branchie, oltre ad essere un organo respiratorio per i pesci, come il muco, formano una barriera contro l'ambiente esterno, rappresentata dall'epitelio branchiale, da uno strato di glicocalice e da uno strato di muco (Powell et al., 1994). Alcuni studi hanno dimostrato la presenza nelle branchie di un sistema immunitario altamente sviluppato e attivo (Haugarvoll et al., 2008). Nella trota è stato rilevato che tali strutture sono coinvolte nell'uptake di antigeni, mentre l'epitelio faringeo, che ricopre il timo, costituisce un'effettiva barriera per l'entrata sia di materiali antigenici che non antigenici (Castello et al., 1998). Più recentemente, in alcune specie di Teleostei, indicazioni della presenza nelle branchie di risposte immunitarie innate e specifiche, sono state suggerite dall'identificazione dei trascritti genici per l'*Mx*, il recettore 9 Toll-like e per il T cell receptor (Jensen et al., 2002; Takano et al., 2004, 2007). Alcuni autori, Koppang et al., (1998 a,b), hanno trovato che il livello dei trascritti per le molecole di *MHC* nelle branchie del salmone atlantico (*Salmo salar* L.) era relativamente alto, comparato con quello rilevato in altri tessuti linfoidei, come la milza. Ancora più recentemente la molecola di *MHCII* è stata immunolocalizzata, sempre nel salmone atlantico e l'analisi di RT-PCR ha rivelato la presenza di trascritti per il *TcRa*, suggerendo quindi la presenza nelle branchie delle cellule T (Haugarvoll et al., 2008).

Il tessuto linfatico associato all'intestino (GALT) dei Teleostei è costituito da uno strato epiteliale, che oltre ad avere funzioni digestive, di assorbimento e secreteorie, è direttamente coinvolto nei processi immunitari umorali e cellulo-mediati (Sanderson e Walzer, 1994; Tlaskalova-Hogenova et al., 1995).

Sebbene i pesci siano privi di placche di Peyer, vari leucociti, sparsi o aggregati, sono presenti in tutto il tratto digerente, in particolare nell'intestino, dove linfociti, granulociti,

macrofagi e plasmacellule sono infiltrati nell'epitelio e nella lamina propria della mucosa (Bullock, 1963; Pontius and Ambrosius, 1972; Zapata, 1979; Davina et al., 1980; Temkin and McMillan, 1986; Hart et al., 1988; Abelli et al., 1997; Picchietti et al., 1997).

Nell'intestino dei Teleostei possono essere identificate due distinte regioni: il segmento anteriore e quello posteriore. Nella carpa, grandi macrofagi intraepiteliali sono stati trovati principalmente nel segmento posteriore, che è considerato un importante sito immunologico dei pesci Teleostei (Rombout et al., 1985). Nella carpa, numerosi e più grandi macrofagi intraepiteliali sono presenti nel secondo segmento (Rombout et al., 1989a). Gli enterociti possono trasportare gli antigeni dal lume alle cellule linfatiche e ai macrofagi del tessuto mucosale (carpa: Rombout et al., 1985; Rombout and Van den Berg, 1989; trota: Georgopolou et al., 1986; tilapia: Doggett and Harris, 1991). Cellule specializzate nella captazione degli antigeni dal lume intestinale, (Kato e Owen, 1994; Neutra and Kraehenbuhl, 1994) quali le cellule M, descritte nei Mammiferi, non sono state trovate nei pesci.

Studi sull'immunologia del tratto digerente dei pesci Teleostei hanno previsto l'uso di antigeni solubili (es. ferritina e HGG) e particolati (es. *Vibrio anguillarum*). In alcuni esperimenti l'antigene è stato somministrato oralmente, in altri, per intubazione anale. La seconda via ha il vantaggio di portare l'antigene direttamente in contatto con il secondo segmento dell'intestino senza subire degradazione nel tratto superiore del tubo digerente. Nella carpa e nella trota è stato dimostrato che gli antigeni arrivati nel secondo segmento analmente o oralmente sono trasportati, attraverso gli enterociti, dal lume a grandi macrofagi intraepiteliali (Rombout and Van den Berg, 1989; Rombout et al., 1989a) che hanno funzioni di fagocitosi (Secombs and Fletcher, 1992), di presentazione di antigeni (Vallejo et al., 1992), di produzione di citochine (Secombs, 1991), e di altri fattori immunomodulatori quali leucotrieni e lipoxine (Secombs and Fletcher, 1992). Anche i macrofagi intestinali della spigola hanno le caratteristiche ultrastrutturali di cellule fagocitiche (grossi lisosomi secondari, corpi multivescicolari e corpi residui) (Picchietti et al., 1997), dimostrate soprattutto dopo stimolazione con batteri (*Aeromonas salmonicida*) e agenti patogeni fungini (*Candida albicans*) (Bennani et al., 1995).

Il GALT dei Teleostei è stato inoltre studiato mediante l'impiego di anticorpi monoclonali contro le immunoglobuline (Ig) (carpa: Rombout et al., 1993; spigola: Abelli et al., 1997) e contro le cellule T (Scapigliati et al., 1995; Joosten et al., 1997). Tali studi hanno indicato che le putative cellule T sono di gran lunga la maggior parte della popolazione leucocitaria mucosale, facendo ipotizzare che il GALT dei Teleostei abbia un sistema di difesa

principalmente di tipo cellulo-mediata (Picchietti et al., 1997), anche se numerose cellule linfoidi Ig-positive sono state localizzate nella lamina propria, vicino alle cellule T e ai granulociti (Rombout et al., 1993; Abelli et al., 1997; Romano et al., 1997).

Nell'intestino del pesce zebra, l'espressione dei geni codificanti per il *TcR $\alpha$*  è stata utilizzata per analizzare la distribuzione delle cellule T nell'intestino. Le cellule TcR $\alpha$ -positive sono state localizzate tra le cellule epiteliali e nella lamina propria dei villi (Danilova et al., 2004), mentre le cellule B sono spesso trovate in aggregati nella lamina propria (Danilova et al., 2002). Ricerche condotte sul merluzzo (*Gadus morhua*, L.) da Wermenstam e Pilstrom (2001), invece, hanno dimostrato che non è possibile ritrovare un numero rilevante di linfociti T nell'intestino di questo pesce impiegando probes per il *TcR $\beta$* . Nell'intestino della spigola, l'uso di una sonda *TcR $\beta$*  (Romano et al., 2003) ha evidenziato la presenza di rare cellule TcR $\beta$ -positive nella lamina propria intestinale, suggerendo l'ipotesi della predominanza dei linfociti *TcR $\gamma/\delta$*  nella mucosa come evidenziato nei Mammiferi.

Nell'intestino dei pesci sono stati identificate diverse popolazioni di granulociti: neutrofili, eosinofili, e basofili (Zapata, 1979; Temkin and McMillan, 1986; Rombout et al., 1989a), alcune delle quali vengono coinvolte nelle reazioni infiammatorie in risposta a parassitosi, infezioni batteriche, virali o micotiche (Roberts, 1978; van Muiswinkel e Jagt, 1984). I neutrofili mediano le risposte infiammatorie acute (Hine, 1992), migrano nei siti di infiammazione, hanno attività fagocitica (Ainsworth, 1992; Steinhagen and Jendrysek, 1994) e mostrano burst respiratorio e attività microbica (Verburg-van Kemenade et al., 1989). Le cellule granulari eosinofile (EGC) sono state descritte nel tessuto intestinale dei salmonidi, suggerendo un ruolo nei meccanismi di infiammazione e di difesa dell'ospite (Lamas et al., 1984; Bruno et al., 1985). Degranulazione e migrazione delle EGC intestinali sono state osservate in risposta a iniezioni di varie sostanze di origine batterica (Vallejo and Ellis, 1989; Lamas et al., 1991) e alcuni studi propongono che queste cellule siano coinvolte nel rilascio di istamina durante le risposte infiammatorie nella trota arcobaleno e quindi analoghe alle "mast cells" dei Mammiferi (Ellis, 1985; Vallejo e Ellis, 1989; Powell et al., 1991, 1993; Reite e Evensen, 1994; Reite, 1996). I granulociti basofili dei pesci somigliano, per le caratteristiche istologiche, ai mastociti dei Mammiferi, ma non è ancora chiaro se tali cellule abbiano anche una funzione analoga nel rilascio di eparina ed istamina durante la degranulazione (Koumas-van Diepen et al., 1994a).

### 3. ONTOGENESI DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEI PESCI TELEOSTEI

Sebbene lo sviluppo degli organi linfatici nei pesci Teleostei sia stato già affrontato, sono state osservate molte differenze tra le specie, sia rispetto ai tempi di differenziamento degli organi, che nelle loro componenti linfatiche ed epiteliali (Tatner, 1996; Romano et al., 1998). Inoltre, domande basilari quali l'identificazione dei primi siti linfo-ematopoietici, l'origine delle cellule B e T e l'acquisizione delle piene capacità immuni non hanno ancora avuto una risposta definitiva (Zapata et al., 2006). Molte delle attuali conoscenze sull'ontogenesi del sistema immunitario dei Teleostei derivano da studi sul pesce zebra, che è considerato un modello di studio in questo settore per diverse ragioni: lo studio degli embrioni è relativamente semplice per la loro trasparenza, gli attuali mezzi della genetica consentono di ottenere mutanti e animali transgenici di questa specie, si hanno a disposizione molti marker molecolari e si conosce la sequenza genomica (Trede et al., 1998, 2001; Crowhurst et al., 2002; Lam et al., 2002; Detrich et al., 1995). Tuttavia il pesce zebra non può essere considerato un modello per studiare l'ontogenesi di tutti i pesci, infatti è noto che i primi stadi di sviluppo e l'organogenesi differiscono notevolmente tra le diverse specie.

#### 3.1 Ontogenesi dei leucociti nei Teleostei

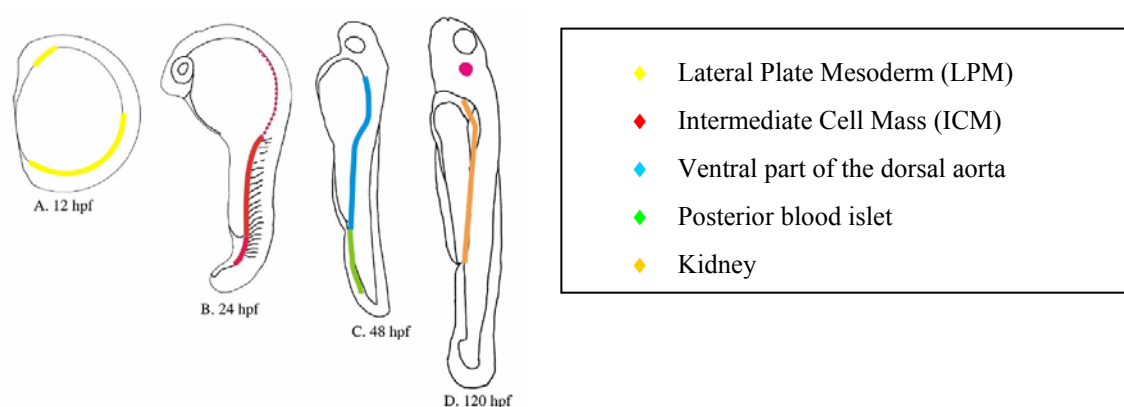
##### 3.1.1 Ematopoiesi embrionale nei Teleostei

L'ematopoiesi embrionale e definitiva sono processi separati e differenti nello sviluppo dei Teleostei, analogamente a quanto avviene nei Mammiferi. In tutti i vertebrati, il sangue si forma dal mesoderma ventrale in un processo che coinvolge la trasduzione del segnale da parte di proteine morfogeniche del sangue (BMP). Infatti, il blocco del segnale delle proteine BMP porta ad una riduzione o alla mancanza del mesoderma centrale che causa l'assenza delle cellule del sangue (Detrich et al., 1995; Kishimoto et al., 1997; Connors et al., 1999; Hild et al., 1999; Dick et al., 2000; Schmid et al., 2000). Il successivo sito ematopoietico deriva tuttavia, dal mesoderma dorsale e comprende la splancnopleura para-aortica e la regione correlata dell'aorta-gonade-mesonefro (AGM) nei Mammiferi, e il plate dorso-laterale negli anuri. Questi tessuti ematopoietici danno origine a tutte le linee cellulari ematopoietiche definitive, incluse le cellule linfoide dell'adulto.

Nei Teleostei sono stati descritti 3 modelli dell'ematopoiesi, grazie all'utilizzo di sonde molecolari o anticorpi monoclonali specifici per fattori di trascrizione quali *Runx-1*, *Runx-*

3, *hhex*, *cbfb*, *SCL*, *LMO-2*, *Gata-2*, *c-myb*, *Fli-1*, *Ikaros* e *Gata-1* *Runx-1*, *Run*, coinvolti nell'ematopoiesi nei Mammiferi (Trede et al., 2001). In alcune specie, come il pesce angelo (*Chaetodipterus faber*, L.), l'ematopoiesi inizia nelle isole sanguigne del sacco vitellino. In altre specie, come il pesce zebra e il killfish (*Crenichthys boiley* L.), il primo sito ematopoietico è la massa cellulare intermedia intraembrionale (ICM) e, ancora in altre specie, come la trota (*Oncorhynchus mykiss* L.), l'ematopoiesi inizia per un breve periodo nel sacco vitellino e poi continua nell'ICM.

L'origine delle cellule ematopoietiche è stata tracciata a partire dalla gastrula nel zebrafish (Crowhurst et al., 2002) (Fig.1.2). A questo stadio il mesoderma laterale è diviso in regioni che mostrano diverse capacità ematopoietiche. La regione rostrale genererà progenitori sia per i macrofagi che per i granulociti, mentre l'area caudale contiene progenitori eritroidi (Crowhurst et al., 2002).



**FIGURA 1.2:** tessuti ematopoietici durante lo sviluppo del zebrafish (Rombout et al., 2006).

La prima espressione di geni rilevanti per l'ematopoiesi è stata osservata, nel pesce zebra, a circa 12 ore pf nella placca laterale mesodermica, LPM (Thompson, 1998) (Fig. 1.2). Durante la migrazione delle cellule LPM, si forma la massa cellulare intermedia intraembrionica (ICM). Questa struttura converge progressivamente in direzione rostro-caudale fino a fermarsi in corrispondenza del futuro ano nella porzione caudale (Willett et al., 1999; Al-Adhami et al., 1977). L'ICM nella regione della coda è chiamata l'isola sanguigna posteriore, nel momento in cui si forma la vena caudale. A uno stato precoce, (18 somites; 20 ore dopo la fertilizzazione: pf) l'ICM è costituita da emato-angioblasti indifferenziati che hanno ancora il potenziale di formare precursori endoteliali, eritroidi, mieloidi, e linfoidi (Crowhurst et al., 2002; Al-Adami et al., 1977). Tra la 22° e la 33° ora dopo la fertilizzazione, sono espressi molti geni marker di cellule staminali. Essi sono

rappresentati in figura 1.3, ed indicano il differenziamento delle diverse linee cellulari ematopoietiche. L'isola sanguigna posteriore del zebrafish, compare intorno a 42 ore pf (Willett et al., 1999) e rimane ematopoietico fino a 96 ore pf (Amatruda et al., 1999). E' probabile che, l'ematopoiesi continui ancora nell'isola sanguigna posteriore, poiché sono state evidenziate molte cellule che esprimono il gene *mpx* a 6 giorni pf (Lieschke et al., 2001). Nella carpa è stato osservato un pattern di sviluppo simile, e, benché l'isola sanguigna posteriore sia stata osservata da 36 ore dopo la fecondazione, essa rimane ematopoietica molto più a lungo (fino a 2 settimane dopo la fecondazione). Sia attraverso l'immunoistochimica, con l'utilizzo di anticorpi monoclonali per specifiche popolazioni di leucociti, che attraverso la microscopia elettronica a trasmissione, si è visto che l'isola sanguigna posteriore degli embrioni di carpa è il tessuto mielopoietico più importante per il differenziamento dei fagociti (neutrofili, basofili, monociti/macrofagi) (Rombout et al., 2005). Inoltre, l'ICM sembra formare l'aorta e la vena cardinale. Infatti nella carpa, tra la 24° e la 30° ora dopo la fecondazione, l'ICM scompare e alcuni mieloblasti e mielociti compaiono tra il sincizio del sacco vitellino e le pareti del corpo. I neutrofili maturi sembrano migrare nel sistema circolatorio e possono essere ritrovati in molti tessuti. Anche gli eritroblasti compaiono in questa regione ma sono apparentemente sostituiti, in maniera graduale, dai progenitori mieloidi. Anche cellule simili ai macrofagi primitivi sono frequenti in questa area, che è considerata da alcuni autori (Thompson et al., 1998) funzionalmente equivalente alla regione AGM di altri Vertebrati. In accordo con questi risultati, Herbomel e colleghi hanno descritto il primo differenziamento dei macrofagi di zebrafish prima dell'inizio della circolazione sanguinea, nello spazio libero tra le cellule del tuorlo e la pelle. Inoltre, questi fagociti precoci invadono il mesenchima cefalico e possono fagocitare e uccidere batteri iniettati nell'embrione di zebrafish (Herbomel et al., 1999; 2001).

Tra il primo e il secondo giorno dopo la fecondazione, le cellule del sangue in via di sviluppo compaiono nella regione della vena ventrale della coda. Alcune di esse circolano nella vena assiale ma altre sembrano essere macrofagi primitivi e/o cellule mieloidi nel tessuto connettivo che circondano i vasi sanguigni. Così la regione della vena ventrale potrebbe essere un altro sito di ematopoiesi o, alternativamente, questi seni venosi possono semplicemente essere un'area favorevole per la residenza delle cellule mieloidi ed eritroidi immature (Herbomel et al., 2001).

### 3.1.2 Mielopoiesi nei Teleostei in sviluppo

Le cellule mieloidi si sviluppano da un progenitore mieloide-eritroide multipotente (MMP: Multipotent Myeloid-erythroid Progenitor), che ha anche la potenzialità di differenziarsi in trombociti, come mostrato in fig. 1.3. L'MMP è considerato un precursore della linea mieloide quando esprime *spi.* o *c/ebp* (Crowhurst et al., 2002).

#### 3.1.2.1 Monociti / macrofagi

I macrofagi si differenziano da questo precursore nel momento in cui iniziano ad esprimere *fms* e *L-plastin* (Crowhurst et al., 2002). Questo processo comincia tra la 12<sup>esima</sup> e la 20<sup>esima</sup> ora pf nei macrofagi di zebrafish derivanti dall'LPM della parte anteriore rispetto al cuore (Herbomel et al., 1999). Dal sacco vitellino molti di essi migrano nel mesenchima della testa e nel sistema circolatorio (Herbomel et al., 1999). Prima e durante la migrazione i primi macrofagi esprimono il gene *dra* che è poi rimpiazzato dalla *L-plastin*. Oltre a fagocitare le cellule apoptotiche questi macrofagi, circondano e distruggono batteri Gram positivi e Gram negativi iniettati intravena, e mostrano attivazione e migrazione verso i siti infetti (Herbomel et al., 1999). Questi dati indicano che i macrofagi di zebrafish operano come prima linea di difesa a questo stadio. Non ci sono ancora dati circa il tipo di molecole chemiotattiche che attraggono tali macrofagi, tuttavia si è visto che nella carpa, usando la PCR quantitativa, che l'IL-1 $\beta$  è espressa da un giorno pf e essa è up-regolata quando l'LPS è iniettato nel sacco vitellino di embrioni di carpa (Rombout et al., 2005). Quindi, sebbene non si è ancora dimostrato se queste molecole giocano un ruolo nella chemiotassi, si è certi che le citochine infiammatorie sono presenti molto precocemente nell'ontogenesi. Da 48 a 72 ore pf (nel zebrafish e nella carpa rispettivamente), l'isola sanguigna posteriore è il maggiore produttore di cellule mieloidi. Da 4 giorni pf (sia in carpa che in zebrafish) in poi, inizia a formarsi il rene che diviene il tessuto mieloide più importante. Nella carpa, l'ontogenesi è stata studiata usando un anticorpo monoclonale specifico per i macrofagi, WCL15. I primi macrofagi sono stati evidenziati a 2 giorni pf nella regione del rene sul sacco vitellino. A 4 giorni pf essi sono stati trovati nel timo e nell'epitelio intestinale e da 7 giorni pf anche nel rene e nella milza (Romano et al., 1997b; 1998).

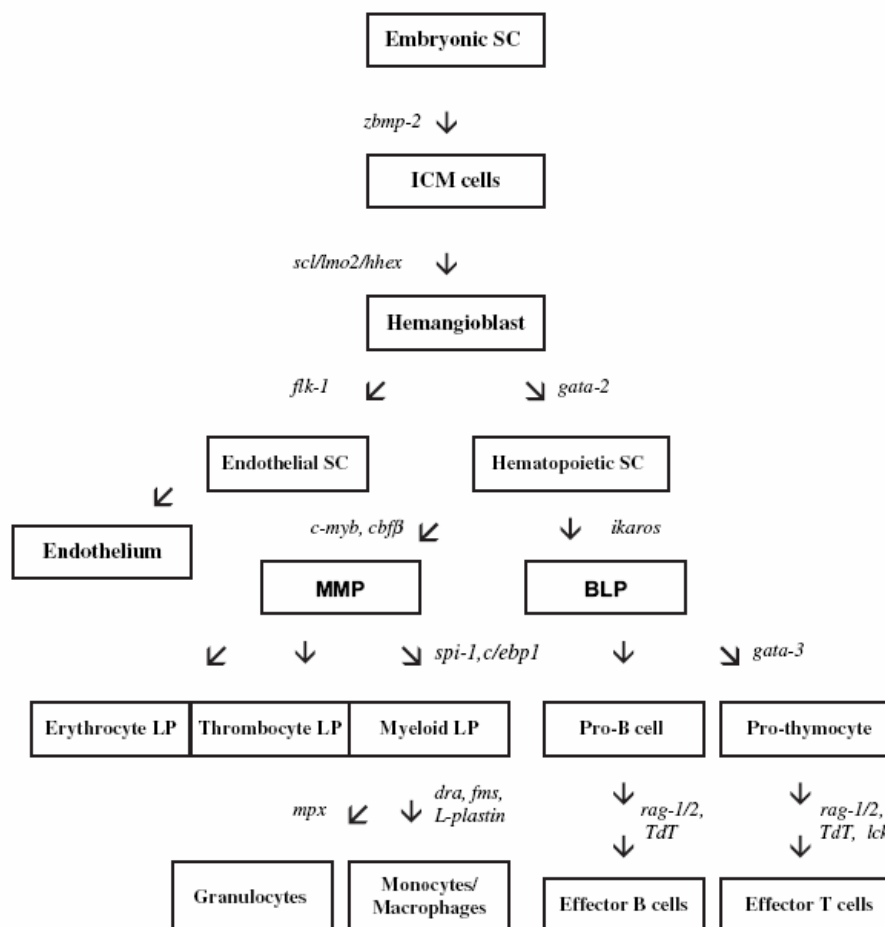


FIG. 1.3: rappresentazione schematica dei pathway coinvolti nell'ematopoiesi del zebrafish.

### 3.1.2.2 Granulociti

Come suggerisce il nome, i granulociti sono caratterizzati dalla presenza di molti granuli citoplasmatici (Roitt et al., 1993). Nei Mammiferi, questi leucociti costituiscono il 60-70% di tutti i leucociti circolanti, pur potendo risiedere anche nei tessuti (Roitt et al., 1993). Nei pesci, i granulociti non sono sempre differenziati in neutrofili, eosinofili e basofili, e costituiscono un'unica linea cellulare detta degli “eterofili”. Tali elementi cellulari, in maggioranza simili ai neutrofili dei Mammiferi, mostrano un ruolo di mediazione nelle risposte infiammatorie acute. I neutrofili dei pesci possono essere, infatti, opsonizzati da componenti del complemento, le quali ne attivano le capacità di fagocitosi (Ellis, 1981). Normalmente, l'atto della fagocitosi rappresenta il compito finale dei neutrofili, dopodiché questi linfociti vanno incontro a morte (Ellis, 1981). Nel pesce zebra i neutrofili hanno un'attività perossidasi molto forte, ed è facile distinguerli nei tessuti con una marcatura per la perossidasi. Inoltre, essi esprimono la mielo-perossidasi specifica dei neutrofili (*mpx*) molto presto durante lo sviluppo. La *mpx* è espressa per la prima volta nell'ICM del

pesce zebra a 18 ore pf (Lieschke et al., 2001; Bennet et al., 2001). Da 24 a 72 ore pf, le cellule che esprimono *mpx*, sono diffuse in tutto l'embrione, con una maggiore abbondanza nell'isola sanguigna posteriore (Crowhurst et al., 2002; Lieschke et al., 2001; Bennet et al., 2001). Nella carpa, i neutrofili non sono chiaramente perossidasi-positivi, ma è disponibile un anticorpo monoclonale per queste cellule (TCL-BE8). Attraverso l'immunoistochimica e la microscopia elettronica i neutrofili sono stati localizzati nelle stesse aree viste nel pesce zebra, confermando che l'isola sanguigna posteriore sia un importante tessuto granulopoietico. In modo simile ai macrofagi, anche i neutrofili migrano in un sito di infezione o infiammatorio, indicando il loro ruolo nella difesa innata (Crowhurst et al., 2002; Lieschke et al., 2001). Già durante il periodo ematopoietico dell'isola sanguigna posteriore, il rene cefalico si sviluppa come tessuto mielopoietico definitivo, ciò avviene nella carpa intorno al 5° giorno pf (Romano et al., 1998).

### **3.1.3 Istogenesi degli organi linfatici e linfopoiesi delle cellule T e B durante lo sviluppo**

Il timo, il rene (pro- e mesonefro) e la milza sono i più importanti organi linfoidei dei Teleostei. In questi ultimi anni sono state fatte descrizioni ontogenetiche dello sviluppo degli organi linfoidei in varie specie, quali la trota (*Oncorhynchus mykiss* L.; Grace e Manning, 1980), la carpa (*Cyprinus carpio* L.; Botham & Manning, 1981; Romano et al., 1999b) la passera di mare (*Hippoglossus hippoglossus* L. ; Chantanachookin et al., 1991), l'orata (*Sparus aurata* L.; Josefsson e Tatner, 1993), il salmone (*Salmon salar* ; Ellis, 1977), il sarago (*Diplodus puntazzo* L.; Romano et al. 1999a), varie specie di tilapia (Dogget and Harris, 1987; Fishelson, 1995), specie antartiche, come l'*Harpagifer antarticus* (O'Neill, 1989), e le differenze ritrovate sono numerose. In generale, si può dire che nei Teleostei di acqua dolce il timo è il primo organo a divenire linfoide, anche se il rene può contenere prima progenitori ematopoietici ma non linfociti; nei Teleostei marini, invece, l'ordine in cui i maggiori organi linfoidei si sviluppano è rene, milza e infine timo anche se la milza delle larve è più eritropoietica che linfopoietica (Zapata et al., 2006).

#### *3.1.3.1 Istogenesi del timo e formazione di un microambiente idoneo alla maturazione dei linfociti T*

Come in tutti i Vertebrati, il timo dei pesci gioca probabilmente un ruolo importante nello sviluppo di un sistema immune funzionale, come è stato dimostrato attraverso esperimenti di timectomia precoce (Botham e Manning 1981). Il timo, in molte specie di Teleostei, tra

i quali la spigola, deriva da un gruppo di cellule indifferenziate dalla tasca branchiale; solo dopo alcuni giorni esso acquisisce un'evidente apparenza linfoide (Abelli et al., 1996; Romano et al., 1998) e sebbene il rene cefalico compaia prima del timo (Zapata e Cooper, 1990) è in quest'ultimo organo che sono state osservate le prime cellule linfoidi (Botham e Manning, 1981; Grace et al., 1981; O'Neill, 1989). La migrazione di timociti nel rene cefalico è stata infatti dimostrata durante lo sviluppo dell'orata (Josefsson e Tatner, 1993) ed è stata ipotizzata nella carpa (Secombes et al., 1983) e nella spigola (Abelli et al., 1996; Romano et al. 1997). Nella carpa, l'espressione della molecola *MHC-I $\alpha$*  (usando l'RT-PCR) è stata determinata da 1 giorno pf, sebbene la  $\beta$ -2 mioglobina inizi ad essere espressa a 7 giorni pf, indicando che le molecole di *MHC-I* sono funzionali a partire da 7 giorni pf (Rodrigues et al., 1998). Anche nei Mammiferi è stata riportata una regolazione asincrona delle molecole dell'*MHC I* e della  $\beta_2$  mioglobina nei primi stadi di sviluppo (Morello et al., 1985). Tuttavia, nei Mammiferi, la trascrizione della  $\beta_2$  mioglobina precede quella dell'*MHC I $\alpha$*  durante l'ontogenesi precoce (Jaffe et al., 1991). Inoltre, sembra che nei pesci l'espressione delle molecole di classe I sia regolata dalla trascrizione della  $\beta_2$  mioglobina, e che non sia possibile l'espressione dell'*MHC I $\alpha$*  senza la  $\beta_2$  mioglobina (Townsend et al. 1990). Con anticorpi contro entrambi i componenti dell'*MHC-I*, l'espressione su timociti è stata osservata da 3 settimane in poi, ma è possibile che possa essere più precoce perché stadi più giovani non sono stati investigati (Rodrigues et al., 1998). Tuttavia la  $\beta$ -2 mioglobina è espressa sulla superficie di un maggior numero di timociti rispetto all'*MHC-I $\alpha$* , suggerendo un'associazione tra la  $\beta$ -2 mioglobina e un'altra molecola, forse una molecola di classe I non classica (Rodrigues et al., 1998). Nella milza e nel rene cefalico l'espressione di entrambe le molecole è simile, ma da 8 settimane in poi tutte le cellule esprimono entrambe le molecole, mentre nel timo la differenza di immuno reattività rimane. Una chiara indicazione dell'effettiva selezione dei timociti è la presenza di cellule apoptotiche. Le prime cellule apoptotiche nel timo di carpa sono state descritte a 7 giorni pf e il loro numero aumenta con la formazione delle aree corticale, cortico-medullare e medullare. Con l'aumentare dell'età, le cellule apoptotiche rimangono ristrette nella regione corticale indicando un attivo processo di selezione (Romano et al., 1999b). Questo è anche supportato dalla comparsa di cellule reticolari epiteliali, e cellule nutrici tra 1 e 4 settimane (Romano et al. 1999b). I trascritti per le catene  $\alpha$  e  $\beta$  dell'*MHC II* sono stati invece trovati in embrioni di carpa di 1 giorno pf (Rodrigues et al., 1998) e i livelli di trascrizione aumentano fino al momento della schiusa (terzo giorno pf). La possibilità che le molecole di classe II siano espresse prima delle molecole di classe I è in contrasto con

ciò che è stato riportato nei Mammiferi, in cui le molecole di classe II sono state ritrovate prima delle molecole di classe I. Nello *Xenopus* le proteine di classe II sono state trovate al settimo giorno pf nel timo, ma più tardi negli altri tessuti (Du Pasquier et al., 1990). La precoce espressione delle molecole di classe II suggerisce un precoce sviluppo del sistema immunitario; questo dato dovrà esser suffragato da altri esperimenti, anche se, dati sul rigetto dei trapianti sembrano supportare questa ipotesi (Botham et al., 1981).

### 3.1.3.2 Ontogenesi dei linfociti T ed espressione di markers specifici

Nel pesce zebra, il timo primordiale inizia ad essere visibile a 60 ore pf nella cavità della faringe. L'epitelio del timo è continuo con l'epitelio della faringe, una tipica caratteristica di tutti i Teleostei. I linfoblasti colonizzano il timo a 65-75 ore pf e al quarto giorno pf, l'organo è completamente sviluppato. A questo stadio le cellule epiteliali del timo già mostrano segni di differenziamento. Nei giorni seguenti il timo cresce rapidamente e, alla terza settimana, esso è organizzato in corteccia e medulla; questa differenziazione è stata messa in evidenza per la mancanza di espressione, nella medulla, del gene *rag* e della catena pesante del *TcR $\alpha$*  (Lam et al., 2002; Schroop et al., 2002). Nella carpa invece la regionalizzazione timica è stata evidenziata a 31 giorni pf (Romano et al., 1997) tramite un anticorpo monoclonale (mAb WCL9) che reagisce con i timociti immediatamente dopo la loro comparsa nel timo (Romano et al., 1999). La cosa interessante è che, le cellule linfoidi WCL9<sup>+</sup> sono state ritrovate nel sangue, nella milza, nel rene cefalico e nell'intestino, sebbene in proporzioni significativamente minori rispetto al timo (Romano et al., 1997). Tuttavia, dopo 5 settimane la loro presenza era ristretta al timo. Il significato di questi risultati dovrà essere ulteriormente approfondito, in particolare dovrà essere definita la funzione della molecola immuno-reattiva a WCL9 che non è ancora conosciuta (Rombout et al., 2006).

Poiché sono disponibili pochi marker specifici per i linfociti T dei pesci, la loro origine è ancora argomento di discussione. Sia nel pesce zebra che nella carpa i timociti precoci derivano probabilmente dall'ICM, come è indicato dall'espressione del gene *Ikaros* (Willet et al., 2001). *Ikaros* è una proteina zinc-finger legante il DNA, ed è considerato essere il più importante gene coinvolto nei primi commitment della cellula staminale ematopoietica verso la linea linfoide (Hansen et al., 1997; Georgopoulos et al., 1994). Attraverso la RT-PCR si è visto che la carpa e il pesce zebra esprimono 5-6 isoforme di *ikaros*, dei quali 4-5 sono espressi ad alti livelli e *ik-3* a bassi livelli. Nella trota sono state descritte 8 isoforme (Hansen et al., 1997). Assumendo che tutti gli isotipi siano necessari

per produrre cellule linfoidi progenitrici, è stato concluso che questo è possibile da 17 ore pf. Nel pesce zebra, l'espressione di *ikaros* è stata osservata a 16 ore pf nel mesoderma laterale, a 19 ore pf nell'ICM e a 72 ore pf nel timo. Anche nella trota, che sviluppa molto più lentamente, poiché vive a più basse temperature, *ikaros* è espresso precocemente nell'ontogenesi: a 3-4 giorni pf nel sacco vitellino e a 5-6 giorni pf nell'embrione vero e proprio (Hansen et al., 1997). A 84 ore pf è stata evidenziata l'espressione di *rag-1*, *gata-3* e *lck* nel timo del pesce zebra (Trede et al. 2001; Lame et al. 2004). Nella carpa, l'espressione di *rag-1* avviene ad un'età comparabile (Huttenhuis, 2005), mentre nella trota, l'espressione di *rag-1/2* è stata evidenziata a 10 giorni pf e l'espressione di TdT a 20 giorni pf (6 giorni dopo la schiusa), quando compaiono il timo e il rene cefalico (Hansen et al., 1997). Più recentemente, le tecniche di ibridazione *in situ* in Whole-mount e di PCR quantitativa hanno permesso di identificare, in esemplari transgenici di medaka (*Oryzias latipes*), i geni *ikaros* e *gata-1* a 2 giorni postfertilizzazione e i geni *ikaros* e *rag-1* leggermente più tardi, a 2.5 e 3 giorni dopo la fertilizzazione (Li et al., 2007). Tuttavia, i progenitori linfoidi che colonizzano il primo timo primordiale non si differenziano in cellule immunocompetenti T finché lo stroma timico non matura (Castillo et al., 1990). Infatti, Trede e colleghi (2004) non hanno evidenziato cellule T al di fuori del timo (questo dimostra che non sono immunocompetenti fino a 3 settimane) del pesce zebra per le prime 3 settimane di sviluppo e l'espressione della catena  $\alpha$  del *TcR* non raggiunge i livelli dell'adulto, nel pesce zebra, fino alla terza settimana.

Nei Perciformi, come la spigola, i risultati indicano chiaramente che le cellule T (positive al DLT15) sono le prime cellule linfoidi a comparire durante l'ontogenesi. Percentuali crescenti di cellule DLT 15<sup>+</sup> sono state ritrovate, attraverso analisi al citofluorimetro, da 5-12 giorni ph, mentre con tecniche di immunoistochimica, cellule DLT15<sup>+</sup> sono state evidenziate nel timo e nell'intestino di larve di spigola di 30 giorni pf, 3 giorni dopo che il timo diventa linfoide (Dos Santos et al., 2000; Abelli et al., 1996). La maggiore sensibilità delle analisi al citofluorimetro, può spiegare tale discrepanza nei risultati. Questo suggerisce che il DLT15 può reagire con un determinante antigenico già presente su cellule T (pre?) molto precoci situate in un compartimento differente dal timo, in quanto a questo stadio l'organo non è ancora linfoide, per poi maturare nel timo come avviene nei Mammiferi e negli uccelli (Dos Santos et al., 2000). Ulteriori studi con sonde per i geni *ikaros* e *rag1*, espressi in cellule linfoidi precoci, potranno aiutare a chiarire la reale natura di queste cellule DLT15<sup>+</sup> precoci. In un recente studio sulla spigola, tramite tecniche di ibridazione *in situ*, sono state trovate le prime cellule TcR $\beta$ <sup>+</sup> nel timo a 38 giorni pf: nel

progredire dello sviluppo le cellule positive per il *Tcr $\beta$*  sono confinate nella zona corticale, come è stato mostrato anche nel pesce zebra (Romano et al., 2007; Danilova et al 2004).

Uno studio recente sulla trota iridea ha mostrato, tramite RT-PCR, che il *CD8 $\alpha$*  così come l'*MHC I* iniziano ad essere espressi da una settimana dopo la fertilizzazione; poiché a questo stadio il timo deve ancora svilupparsi, è stato suggerito che entrambe le molecole possano avere una funzione nell'ontogenesi precoce della trota iridea, antecedente allo sviluppo degli organi linfoidi (Fischer et al., 2005).

### 3.1.3.3 Istogenesi del rene e maturazione delle cellule B

Il rene è un importante organo linfopoietico nei Teleostei. Esso appare come un sottile strato di tessuto, situato dorsalmente nella cavità peritoneale. Le aree linfopoietiche sono distinte in rene cefalico e rene del tronco. La struttura del tessuto linfopoietico è la stessa in entrambe le porzioni, anche se nel rene del tronco le aree linfoidi sono ristrette tra i tubuli renali, che non sono invece presenti nel rene cefalico.

Nei pesci, il rene sembra essere un organo multifunzionale: esso ha funzioni endocrine (Abelli et al., 1994), funzioni mielopoietiche (Zapata et al., 1996) e funzioni immuni. Molti autori ritengono che il rene cefalico sia, insieme con le aree ematopoietiche del mesonefro (rene del tronco), il sito più importante per il differenziamento dei granulociti, dei linfociti B e dei monoliti, anche se la presenza di macrofagi prima della comparsa del rene suggerisce l'esistenza di altri foci mielopoietici nell'embrione precoce (Manning, 1994; Romano et al., 1998).

La comparsa di tessuto ematopoietico nel rene del pesce zebra è un processo precoce (intorno a 4 giorni pf). Le prime cellule a comparire sono soprattutto eritroblasti, ma anche la mielopoiesi è evidente dal quarto giorno in poi. Al sesto giorno pf eosinofili maturi e in via di sviluppo compaiono nel rene del zebrafish, ma si è riusciti ad identificare linfociti solo alla 2-3 settimana pf, sia con il microscopio elettronico, sia con l'ibridazione *in situ* per trascritti del gene *rag* (Zapata et al., 2006). Infatti, l'origine e i tempi di comparsa delle cellule B nei Teleostei è ancora argomento di discussione, sebbene al contrario delle cellule T, ci siano molti reagenti specifici per evidenziare questa popolazione di linfociti.

Molti studi sui Teleostei sostengono che i linfociti B si originano e si differenziano nel rene e considerano questo l'analogo del midollo osseo dei Mammiferi.

Danilova e Steiners (2002) hanno descritto riarrangiamenti VDJ in pesci zebra di 4 giorni e trascritti per l'IgM a 7-13 giorni pf, ma le prime cellule Ig $\mu$ <sup>+</sup> possono essere evidenziate nel rene cefalico a 19 giorni pf. Anche Lam e colleghi (2004) hanno evidenziato una

debole espressione di isotipi di IgL con l'RT-PCR a 3 giorni pf, ma la loro espressione, valutata con l'ibridazione *in situ* su sezioni di rene, iniziava a 3 settimane dopo la fertilizzazione. Recentemente, Trede e colleghi (2004) hanno identificato, nel pesce zebra, un ortologo della citidina deamminasi inducibile (AID) che è espressa molto precocemente a 2 giorni pf, suggerendo la possibilità che le cellule B sviluppino molto prima di quanto precedentemente suggerito.

Inoltre, nel pesce zebra alcune cellule positive per la catena IgH compaiono intorno alla 1°-2° settimana pf, e aumentano di numero nelle settimane seguenti. D'altro canto, è difficile capire l'espressione dei geni *rag-1* e/o delle Ig prima della comparsa nel timo e nel pronefro di cellule linfoidi. Alcuni autori hanno rimarcato la presenza di trascritti sterili e aberranti nei Teleostei (Lame et al. 2004) e, d'altro canto, evidenze di riarrangiamenti del gene per il *TcR* o per il *BcR* prima che progenitori linfoidi colonizzino gli organi linfoidi sono stati trovati anche nei Mammiferi. Nella trota, il rene è un organo molto ben sviluppato prima della schiusa e produce soprattutto eritrociti e granulociti. Al momento della schiusa, quando i linfociti possono essere identificati a livello ultrastrutturale, studi di ibridazione *in situ* su criosezioni evidenziano cellule Rag-1<sup>+</sup> (Hansen et al., 1998) e, tramite l'immunoistochimica, sono identificabili i primi linfociti IgM<sup>+</sup> (Razquin et al. 1990). Tuttavia, Hansen (1997) ha descritto l'espressione di *rag-2* in trote di 10 giorni pf e ci sono dati di cellule linfoidi esprimenti IgM citoplasmatiche a 12-14 giorni pf (Castello et al., 1993), inoltre è stata dimostrata, tramite dosaggio ELISA, l'esistenza di due varianti delle catene IgL in embrioni di 8 giorni prima della schiusa (Sanchez et al., 1995), suggerendo l'esistenza di una fonte di linfociti B prima della schiusa, nel rene o nei siti ematopoietici precoci.

Nel rene cefalico di carpa, tramite RT-PCR si è visto che l'Igμ inizia ad essere espressa da 7 giorni pf (Rombout et al., 2005) mentre cellule esprimenti Ig di superficie sono state identificate per la prima volta a 2 settimane pf usando un anticorpo monoclonale (WCI12) contro la catena pesante dell'IgM (Romano et al. 1997).

Nei primi studi (Koumans et al., 1995) è stata rilevata un'eterogenicità nell'IgM di carpa usando un secondo anticorpo monoclonale (WCI4) contro la catena pesante dell'IgM di carpa. Con WCI4 è stata evidenziata un'ulteriore popolazione di cellule B; tale anticorpo reagisce con il 50% di tutte le cellule B trovate nel rene cefalico a 2 settimane pf, ma la proporzione scende fino al 20% nel rene cefalico nella milza e nel sangue da 4 settimane in poi. Questi dati indicano che, sebbene le cellule WCI4<sup>+</sup>12<sup>+</sup> sono la più importante popolazione di cellule B in animali adulti, le cellule WCI4<sup>+</sup>12<sup>-</sup> potrebbero avere un ruolo

centrale durante l'ontogenesi. Nella spigola, le cellule B compaiono più tardi delle cellule T (45 giorni dopo la schiusa). Le prime cellule IgM<sup>+</sup> nella spigola presentano positività nel citoplasma, dopo 1-2 settimane esprimono l'IgM in superficie (Dos Santos et al. 2000). Questa sequenza di comparsa è anche riportata per la trota (Castello et al. 1993), ed è paragonabile alla prima comparsa della catena  $\mu$  negli anfibi (Zettergren, 1982; Hadji-Azimi et al., 1982) e nei Mammiferi (Van Rees et al., 1990). In un recente lavoro le prime cellule IgM<sup>+</sup> sono state rilevate nel rene cefalico di spigola a 38 giorni dopo la fecondazione, sebbene la produzione di immunoglobuline autologhe inizi all'incirca 2 settimane prima (Breuil et al., 1997).

#### 3.1.3.4 Istogenesi della milza

Nella maggior parte delle specie di Teleostei la milza sviluppa tardi e resta in gran parte eritroide (Rowley et al., 1988; van Muiswinkel et al., 1991), tuttavia, in alcune specie (ad es la spigola, Abelli et al., 1996) è possibile distinguere aree di polpa bianca e rossa. Pochi studi sono stati pubblicati sull'ontogenesi della milza (Quesada et al., 1995).

Nel zebrafish, l'espressione di trascritti di *Hox-11* in una piccola regione dell'intestino anteriore sinistro marca la comparsa di una milza primordiale dal 4° giorno dopo la fecondazione (Langenau et al., 2002). La milza primordiale cresce, ma anche al 30° giorno rimane un piccolo organo contenente in gran parte eritroblasti. Al terzo mese, quando i linfociti sono evidenti nella milza, in essa iniziano a comparire dei corpi ellissoidali che sono coinvolti nella cattura dell'antigene. Un simile modello di sviluppo è stato descritto nella milza di altri Teleostei, quali il salmone (Ellis et al., 1977), la spigola (Dos Santos et al., 2000) e il pesce cane (Petrie-Hanson et al., 2000).

In molte specie di Teleostei adulti, compresa la spigola (Abelli et al., 1996), la milza è suddivisa in polpa bianca immersa nella polpa rossa. La polpa rossa, così detta perché estremamente vascolarizzata, è costituita da un gran numero di eritrociti, macrofagi, cellule dendritiche, rari linfociti e plasmacellule, che occupano gli spazi tra i seni splenici (Romano et al., 1997b). La polpa bianca della milza è rappresentata dal tessuto linfoide addensato, costituito essenzialmente da accumuli di linfociti, plasmacellule e macrofagi liberi, immersi nelle maglie reticolari (Robetson e Wexler, 1960); è dunque questa regione ad essere responsabile delle proprietà linfoide della milza. Tuttavia, il suo ruolo fondamentale sembra essere la produzione di trombociti. Infatti, il differenziamento precoce dei trombociti è stato messo in evidenza nella milza della carpa già due settimane post-fecondazione, più precocemente che in qualsiasi altro organo (Romano et al., 1997).

### 3.1.3.5 Sviluppo del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT)

Attraverso il microscopio elettronico è stato dimostrato che i linfociti compaiono nel tessuto mucosale associato all'intestino (GALT) del zebrafish molto precocemente, a 8 giorni pf. La natura di queste cellule non è stata determinata, sebbene nei Teleostei si ritenga che i linfociti intraepiteliali siano cellule T, mentre le cellule linfoidi che occupano la lamina propria siano in parte cellule B (Schroder et al., 1998; Danilova e Steiner, 2002; Rombout et al., 1993b; Abelli et al., 1997; Fournier-Betz et al., 2000). Danilova e Steiner (2002) hanno messo in evidenza, tramite l'ibridazione *in situ*, alcune cellule *TcRα* positive nell'esofago e nell'intestino di pesci zebra di 9 giorni pf. Al contrario, Trede e colleghi (1990) non sono riusciti a trovare cellule T periferiche di pesci zebra fino a 3 settimane di vita. Nella carpa, è stato prodotto un anticorpo monoclonale (WCL38) che reagisce soprattutto con le cellule linfoidi della mucosa Ig<sup>-</sup> (cellule putative T). Esso reagisce con la maggior parte (circa il 60%) delle cellule linfoidi isolate dalle branchie, dall'intestino e dalla pelle di adulto (Rombout et al., 1998). Le cellule WCL38<sup>+</sup> sono state evidenziate nell'epitelio dell'intestino da 3 giorni pf e il loro numero aumenta notevolmente nell'intestino e nelle branchie nelle prime 5 settimane di sviluppo (Rombout et al., 2005). E' interessante che queste cellule compaiano negli organi mucosali prima che il timo sia popolato da timociti, e che siano molto abbondanti negli organi mucosali prima che sia stata evidenziata l'immunità acquisita. Infatti, da 8 settimane in poi, circa il 5-10% dei timociti sono WCL38<sup>+</sup>, ma prima di questa età queste cellule non popolano il timo, per cui è stato proposto che le cellule WCL38<sup>+</sup> siano cellule T  $\gamma\delta$  (Rombout et al. 1998), ma attualmente non si hanno ancora prove convincenti.

Per la trota, è stato anche suggerito che le cellule che mostrano l'espressione di *rag* e di *TdT* nell'intestino potrebbero essere omologhe delle cellule T  $\gamma\delta$  IEL (linfociti intraepiteliali) che sviluppano al di fuori del timo (Hansen et al., 1997). E' possibile che queste cellule, in stadi adulti, siano cellule "T" regolatorie del sistema immunitario acquisito, ma la loro funzione nel primo mese pf non è attualmente chiara.

Nella spigola, il DLT15 è stato utilizzato per uno studio di immuno-istochimica: la comparsa delle cellule T e B nei distinti organi linfoidi della spigola sono mostrati nella tabella 2. Le prime cellule T sono state ritrovate nell'intestino a 28 giorni ph (Picchietti et al., 1997). Questi risultati sono in accordo con le osservazioni precedenti (Abelli et al. 1993) e, di conseguenza è stato proposto che l'intestino possa rappresentare una sede alternativa di differenziamento per i linfociti T (Picchietti et al., 1997), come suggerito per i Mammiferi. Il confronto dei dati con la carpa è difficile, a causa della grande differenza

nella velocità di sviluppo, dovuta solo in parte alla differenza di temperatura, ma anche perché un pannello di marker per le cellule T di carpa non è disponibile. In entrambe le specie, comunque, le cellule T sono state evidenziate nell'intestino e nel timo prima che nella milza e nel rene.

**TABELLA 2: comparsa (in giorni dopo la schiusa) delle cellule T e B nella spigola (a 16° C) e nelle carpa (a 25° C); dati basati su studi di immunoistochimica (Rombout et al. 2006).**

| Tissue      | T cells (DLT15) sea bass | B cells (DLIg3) sea bass | Ig <sup>-</sup> lymphoid cells carp | B cells (WCI12) carp |
|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Thymus      | 28 ± 2                   | 90 ± 5                   | 4 <sup>a</sup>                      | negligible           |
| Head kidney | 35 ± 5                   | 45 ± 5                   | 7 <sup>a</sup>                      | 14                   |
| Spleen      | 45 ± 3                   | 45 ± 3                   | 7 <sup>a</sup>                      | 14                   |
| Intestine   | 28 ± 2                   | 90 ± 5                   | 3 <sup>b</sup>                      | 35                   |

The sea bass data are based on ±100 sections/organ, and in carp on immuno-histochemistry and flow cytometry.

<sup>a</sup> Based on WCL9 (cortical thymocytes in adult carp).

<sup>b</sup> Based on WCL38 (putative mucosal T cells).

## 3.2 Ontogenesi di parametri immunitari umorali nei pesci

### 3.2.1 IgM materne e autologhe

Le immunoglobuline sono il primo componente umorale del sistema immunitario acquisito. La comparsa di IgM citoplasmatiche e di superficie sui linfociti varia in modo considerevole tra le varie specie di Teleostei. In generale la prima comparsa di linfociti B e immunoglobuline avviene più tardi nelle specie marine rispetto a quelle di acqua dolce (Chantanachookhin et al., 1991). Per esempio, nella spigola, cellule B mature e IgM sono state rilevate, per la prima volta, a 38 giorni pf (Breuil et al., 1997; Dos Santos et al. 2000), nel merluzzo (*Gadus morhua* L.) tra l'ottava e la decima settimana pf, a seconda della temperatura di allevamento (Schroder et al. 1998), mentre nella carpa (*Cyprinus carpio* L.) cellule IgM<sup>+</sup> sono presenti nel pronefro già a 2 settimane (Koumans-Van Diepen et al., 1994; Romano et al., 1997). Le specie di acqua dolce, quali la trota (*Oncorhynchus mykiss* L.) e il pesce gatto, mostrano la prima comparsa di cellule IgM<sup>+</sup> a 1 settimana pf (Castello et al., 1993; Petrie-Hanson e Ainsworth, 2001). In generale, si può dire che le larve di pesce iniziano ad esprimere le IgM quando hanno raggiunto i 20-30 mm di lunghezza, considerando, quindi, che esso sia un processo che dipende più dalle dimensioni che non dall'età, anche se non è vero per tutte le specie analizzate (Dos Santos et al., 2000). Bisogna però dire che la capacità di dare una risposta anticorpale non è necessariamente

correlata con il primo rilevamento di cellule IgM<sup>+</sup>. Anche se questo aspetto non è stato studiato in molte specie, è stato visto che passa un certo lasso di tempo tra il rilevamento di cellule IgM<sup>+</sup> e lo sviluppo dell'immunocompetenza funzionale, sia nelle specie marine che in quelle di acqua dolce (Dos Santos et al., 2000; Petrie-Hanson et al., 1999).

E' stato proposto che il relativo ritardo nella produzione di IgM umorali autologhe possa essere compensato da Ig derivanti dalla madre. Immunoglobuline materne sono state trovate nelle uova di molte specie di pesce (Magnadottir et al., 2005) tra le quali la platessa *Pleuronectes platessa* (Bly et al., 1986), la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Mor e Avtalion, 1988), la carpa *Cyprinus carpio* (Suzuki et al., 1994), il salmone *Salmo salar* (Olsen et al., 1997) e la spigola *Dicentrarchus labrax* (Picchietti et al., 2004) e l'orata *Sparus aurata* (Picchietti et al., 2005) ma non nel merluzzo *Gadus morhua* (Magnadottir et al., 2004). In accordo con il trasferimento di IgM, si ha un trasferimento di un'attività anticorpale specifica dalla madre immunizzata agli embrioni, come dimostrato in diverse specie quali la platessa *Pleuronectes platessa* (Bly et al., 1986) la tilapia *Oreochromis aureus* (Mor et al., 1988; Mor et al., 1990; Takemura et al., 1997) e l'orata *Sparus aurata* (Kanlis et al., 1995). Tuttavia, in molte specie analizzate si è visto che il trasferimento di questi anticorpi materni specifici non è correlato da un aumento della sopravvivenza dopo un'infezione (Magnadottir et al., 2004). Ad esempio, nell'orata, il trasferimento di anticorpi dalla madre, immunizzata contro *Vibrio sp.*, non ha un valore protettivo per le larve (Lillehaug et al., 1996) e questo può essere spiegato con il fatto che la concentrazione delle IgM materne negli stadi larvali è generalmente molto ridotta rispetto a quella osservata negli stadi di uovo (Magnadottir et al. 2005). Nella spigola, ad esempio, le IgM materne sono depositate nell'ovario durante la vitellogenesi e raggiungono la concentrazione massima durante l'ovulazione. Al momento della schiusa il livello è ridotto di 100 volte e da 5 giorni dopo la schiusa non sono rilevabili IgM materne in larve di spigola (Breuil et al. 1997; Picchietti et al. 2004; Pepi et al. 1997). Una situazione simile è stata dimostrata nella tilapia (Takemura, 1993) e nel salmone (Olsen et al., 1997). Gli stadi prelarvali di tilapia, da 0 a 12 giorni ph, mostrano dei livelli di IgM materne relativamente elevati, che gradualmente decrescono fino a aggiungere un livello minimo a 12 giorni ph, appena prima della maturazione degli organi linfoidei larvali e la produzione autologa di IgM (Takemura, 1993). Nel salmone, i livelli di IgM materne si riducono velocemente dopo la schiusa raggiungendo dei livelli non rilevabili appena prima dell'ingestione del primo pasto (Olsen et al., 1997). Poiché le IgM materne non danno protezione nelle larve e giovanili, sono state proposte altre funzioni: probabilmente il ruolo principale di queste

molecole è quello di proteggere le uova dal trasferimento materno di certi patogeni, ma esse possono anche avere un ruolo nell'aiutare la fagocitosi e attivare il complemento, o ancora possono avere la funzione di proteine nutrizionali del vitello (Magnadottir et al., 2005). Il trasferimento delle Ig dalla madre alle uova è stato dunque dimostrato in diverse specie ma il meccanismo di *uptake* e di accumulo all'interno delle uova deve ancora essere chiarito. Mediante l'impiego dell'anticorpo policlonale PabOra per l'orata e dell'anticorpo monoclonale DLIg3 per la spigola, le Ig sono state localizzate mediante immunocitochimica a livello delle cellule follicolari primordiali (cellule tecali e della granulosa) degli oociti pre-vitellogenici, mentre a questo stadio di sviluppo l'ooplasma non presenta quantità apprezzabili di Ig (Picchietti et al., 2004). La presenza di Ig localizzate tra e all'interno delle cellule follicolari ha suggerito un ruolo attivo di queste ultime nell'uptake di tali molecole, ed un meccanismo di trasporto transcellulare di Ig attraverso le cellule follicolari, come descritto nelle cellule epiteliali polarizzate dei Mammiferi (Rojas e Apodaca, 2002) e degli uccelli (Wieland et al., 2004). Gli oociti vitellogenici precoci di orata e spigola, allo stato di vescicole lipidiche, mostrano invece una marcatura uniforme nella loro membrana plasmatica e gli oociti di maggiore dimensione presentano una immunoreattività diffusa/granulare della cortex più esterna, ricca in RNA e proteine, dove si estende l'impalcatura citoscheletrica dei microvilli dell'oocita. Pertanto, le Ig apparentemente sono accumulate nell'ooplasma in una fase precoce della vitellogenesi prima dell'entrata delle vitellogenine (Picchietti et al., 2004; 2005). Studi precedenti, relativi all'incremento della concentrazione di Ig negli oociti di *Pagrus major* durante la vitellogenesi (Kanlis et al., 1995) e all'immagazzinamento di Ig nell'ovario maturo di *Cyprinus carpio* (Suzuki et al., 1994), hanno invece suggerito che le IgM siano incorporate negli oociti insieme alle vitellogenine.

### **3.2.2 Complemento**

Il sistema del complemento è un sistema di difesa dei Vertebrati che comprende 20-30 proteine plasmatiche e molti recettori. Alcune di queste componenti sono delle serin – proteasi, che una volta attivate, vanno ad innescare in modo sequenziale altre componenti di tale sistema. I risultati più importanti di questa attivazione a cascata sono l'opsonizzazione, la lisi di microrganismi invasivi e cellule infettate e l'infiammazione. La proteina materna C3, che è la componente centrale del sistema del complemento è stata trovata nelle uova non fertilizzate di *Cyprinus Carpio* L. (Rombout et al., 2005) e di *Anarchichas minor* O. (Ellingsen et al., 2005). L'ontogenesi del componente C3 del

complemento è stata recentemente descritta nel merluzzo e nell'halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) usando tecniche immunoistochimiche (Lange et al., 2004a; Lange et al., 2004b). In entrambi i casi il C3 era presente in molti organi al momento della schiusa. Un recente studio sulle uova fertilizzate di merluzzo, usando il Western blotting e l'ibridazione *in situ*, ha dimostrato la presenza di C3 e dell'apolipoproteina A-I al momento dell'organogenesi, 7-9 giorni dopo la fertilizzazione (Magnadottir et al., 2005; 2006). Gli mRNA per il fattore C3, l' $\alpha_2$ -macroglobulina, il siero amiloide A (SAA) e il fattore C1/MAPS del complemento (factor 1 r/s-mannose binding lectin associated serine protease-like molecule) sono trascritti in embrioni di carpa a uno stadio molto precoce, 12 ore dopo la fertilizzazione.

Tutti questi dati indicano che questi fattori possono essere coinvolti nel processo di sviluppo dei Teleostei e che, molto probabilmente, possono rappresentare un meccanismo di difesa per il periodo immediatamente successivo alla schiusa. Infatti il C3, l' $\alpha_2$  mioglobina e il SAA sono tutti implicati nel sistema immunitario della carpa adulta: il C3 si è visto che è in grado di mediare l'uccisione del *Trypanoplasma borreli* (Saeij et al., 2003) e, sia l'espressione di C3 che dell' $\alpha_2$  mioglobina, che del SAA è indotta, *in vivo*, dall'infezione del *T. borreli*. Inoltre, l'iniezione di LPS nel sacco vitellino di carpe di 2 giorni dopo la fertilizzazione induce una up-regolazione dell'espressione di SAA, e una down-regolazione dell'espressione del C3 e dell' $\alpha_2$  mioglobina, suggerendo l'esistenza di un sistema di difesa innato embrionale (Huttenhuis, tesi dottorato 2005).

### 3.2.3 Lisozima ed altri enzimi coinvolti nella difesa innata

Il lisozima è un enzima battericida coinvolto principalmente nella difesa contro i batteri Gram positivi, ma anche in quella contro i Gram negativi, i parassiti e i virus (Ingram, 1980; Alexander et al., 1992). Il lisozima è presente nel muco, nel tessuto linfoide, nel siero e in altri liquidi corporei di molte specie di pesce, di cui il pesce cane e il merluzzo sono delle eccezioni (Grinde et al., 1988; Lie et al., 1989). Il lisozima è stato anche trovato in uova fertilizzate e in stadi larvali di molte specie di pesce, come la spigola (Cecchini et al. 2000), la tilapia (Takemura, 1996), e i salmonidi (Kudo, 1991; Yousif et al., 1994; Brown et al., 1997). Questi studi hanno mostrato che la presenza di lisozimi nelle uova e negli embrioni può prevenire il trasferimento dalla madre alla progenie (verticale) di batteri patogeni per i pesci (Yousif et al., 1994a; Brown et al., 1997).

### 3.2.4 Lectine

Le lectine sono proteine che interagiscono con il non-self e con la superficie di strutture patogene dando come risultato l'opsonizzazione, la fagocitosi o l'attivazione della cascata del complemento. Varie lectine sono state isolate dalle uova di pesce di differenti specie (Magnadottir et al., 2005). Per esempio la lectina legante il fucosio è stata isolata dalle uova della spigola (Topliss et al., 1985), la lectina per il galattosio nelle uova di salmone (Yousif et al., 1994b) e la lectina legante il ramnosio è stata rilevata in oociti, uova fertilizzate e cellule del sistema immunitario innato della trota (Bildfell et al., 1992; Sheid et al., 1989). Nelle uova di trota, una proteina lectino-simile si è visto essere in grado di legare specificamente tossine batteriche, dimostrando un suo coinvolgimento nei meccanismi di difesa di tipo innato (Kudo et al., 1991).

## 4. MATURAZIONE DELLA COMPETENZA IMMUNOLOGICA

L'immunocompetenza nel pesce è determinata dalla funzionalità dei linfociti oltre che dallo sviluppo degli organi linfoidi e dall'identificazione di cellule linfoidi.

Lo stadio esatto di maturazione dei linfociti varia da specie a specie ed è probabilmente correlato alla velocità di crescita e di sviluppo generale. Dunque, molti fattori influiscono sulla maturazione funzionale del sistema immunitario, ma si possono fare alcune considerazioni generali:

1. Sebbene si abbia una precoce comparsa sia degli organi linfoidi che dei linfociti, la piena maturazione delle competenze immunologiche si ha più tardi.
2. L'immunità cellulo-mediata sviluppa più precocemente della risposta immunitaria umorale, anche se il confronto tra le specie risulta difficile.

Sia la trota che la carpa non rigettano trapianti prima di 2 o 3 settimane di vita. Inoltre, in queste specie e nel pesce zebra, la maturazione della risposta immunitaria umorale avviene fino a 1 o 2 mesi più tardi rispetto alla risposta immunitaria cellulo-mediata. Tuttavia, nel *Salmo salar* la comparsa di mIgM sulla membrana dei linfociti e la capacità di rigettare trapianti si verificano contemporaneamente (Ellis, 1977). Nella carpa (allevata a 22°C), le prime “risposte citotossiche”, basate sulla scala di rigetto, sono state descritte a 19 giorni pf (Botham et al. 1981). Seguendo il

paradigma dei Mammiferi, questa risposta immunologica è causata o da una cooperazione di cellule T specifiche citotossiche/helper, o da cellule citotossiche non specifiche. La presenza di cellule T specifiche a questa età non è stata evidenziata con gli esperimenti di immunizzazione citati nel precedente paragrafo, così la seconda possibilità acquista maggiore credibilità. Sfortunatamente, la conoscenza circa l'ontogenesi di cellule citotossiche non specifiche sono limitate.

3. Infine, la produzione di anticorpi contro antigeni T-indipendenti negli avannotti precede quella scatenata da antigeni T-dipendenti.

Carpe transfettate con antigeni cellule T-indipendenti (LPS) danno risposte anticorpali e di memoria da 4 settimane pf, mentre esse rispondono contro antigeni cellule T-dipendenti da 8 settimane dopo la fertilizzazione (Mughal et al., 1986). Risultati simili sono stati ottenuti per la trota (Mughal et al., 1985; Tatner et al., 1986) e recentemente anche per il pesce zebra (Lam et al., 2004), riportando risposte anticorpali cellule T-indipendenti da 4 settimane pf e risposte anticorpali cellule T-dipendenti da 6 settimane pf. Così si può concludere che la funzione delle cellule T helper inizia tra la 6 e 8 settimane dopo la fertilizzazione, a seconda delle specie studiate, che è un tempo sorprendentemente posteriore alla prima comparsa di timociti corticali e medullari (Zapata et al., 2006).

TAB 1: Maturazione della competenza immunologica (Zapata et al. 2006)

| Species               | Lymphocytes in Lymphoid organs                                                 | Appearance of Ig+ cells      | Allograft rejection | Humoral immune response                                                                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rainbow trout (14 °C) | Thymus (8 d pre-hatching or 3 days)<br>Kidney (4–5 days)<br>Spleen (6–14 days) | 4 d (Kidney)<br>1 m (spleen) | 14 days             | 8 w (HGC + FCA)<br><i>A. salmonicida</i>                                                 |
| Carp (22 °C)          | Thymus (3 d–5 m)<br>Kidney (6 d–6 m)<br><br>Spleen (8 d–10 m)                  | 1 m (spleen)                 | 16 days             | 4 w (no response to SRBC)<br>8 w (response to both HGG + FCA and <i>A. salmonicida</i> ) |
| Zebrafish             | Thymus (3 dpf)<br>Kidney (1–2 w)<br>Spleen (more than one month)               | 2 w (kidney)                 |                     | Secreted Ig against <i>A. hydrophila</i><br>HGG (6 w onward)                             |

## CAPITOLO II

### MATERIALI E METODI

#### 1. ANALISI DI ESPRESSIONE TRAMITE RT-PCR

##### 1.1 Animali

Gli esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.) utilizzati per la sperimentazione sono stati allevati ad una temperatura di  $15 \pm 1^\circ \text{C}$  presso l'impianto d'acquacoltura "Nuova Azzurro" (Civitavecchia, Roma). Gli animali sono stati alimentati con *Artemia salina* nauplii per 3-4 settimane a partire dallo stadio di 8 giorni dopo la schiusa (ph), e in seguito con Proton pellets (INVE, Belgium). Quindi, sono state campionate: uova, larve (2, 4, 6, 8, 13, 16, 21, 25 e 32 giorni dopo la schiusa), post-larve (39, 51, 62, 75, e 92 giorni dopo la schiusa), e timo di spigole di un anno (ancora sessualmente immature). I pesci sono stati anestetizzati con tricaina metano solfato (0.03%) in acqua, prima del campionamento. Per i campionamenti comprendenti le uova e gli stadi fino a 92 giorni ph sono stati fatti 3 pools costituiti ognuno da circa 50 animali, mentre per gli esemplari giovanili sono stati utilizzati timo e intestino provenienti da tre animali. Ai campioni è stato aggiunto 1 ml di Tripure (sigma) e si è triturato il tutto in eppendorf con un pestello sterile, fino ad ottenere una soluzione omogenea (idealmente contenente singole cellule).

##### 1.2 Estrazione dell'RNA totale

Alle cellule in Tripure, sono stati aggiunti 0.2 ml di cloroformio per ogni ml di Tripure iniziale e la soluzione è stata agitata vigorosamente per 15 secondi. Il campione è stato incubato per 10 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugato a 12000 rpm per 15 minuti a  $4^\circ\text{C}$ . La fase acquosa incolore, presente nella parte superiore del tubo da centrifuga, è stata trasferita in un altro tubo per precipitare l'RNA. Per fare ciò sono stati aggiunti 0.5 ml di isopropanolo per ogni ml di Tripure iniziale; la soluzione ottenuta è stata quindi agitata invertendo il tubo varie volte per miscelare bene il tutto, incubata per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti a  $4^\circ\text{C}$ . Il supernatante è stato eliminato ed è stato aggiunto 1ml di etanolo 75% (v/v) per ogni ml di Tripure iniziale. Il tutto è stato agitato vigorosamente per lavare il pellet e poi centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti a  $4^\circ\text{C}$  eliminando il supernatante. L'eccesso di etanolo presente

sul pellet di RNA è stato rimosso facendolo evaporare ed il prodotto finale è stato poi risospeso in acqua con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1% pipettando più volte il campione e successivamente quantificato misurando l'assorbanza a 260 nm ( $A_{260}$ ) allo spettrofotometro (Jenway 6305 Uv/Vis, Spectrophotometer).

### 1.3 PCR

Negli esperimenti di PCR il cDNA è stato sintetizzato, a partire da 500 ng di RNA totale, utilizzando il kit Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech). Ciascun *bead* contiene la Trascrittasi Inversa del Virus della Leucemia Murina di Moloney (MMLV) e la Taq DNA polimerasi con l'apposito buffer. Dopo aver sciolto il *bead* in acqua 0.1% DEPC, sono stati aggiunti i primers forward e reverse (25  $\mu$ M ciascuno) e 0.5  $\mu$ g di primer pd(N)<sub>6</sub>.

Il campione è stato incubato a 42°C per 30 minuti e poi, per inattivare la trascrittasi inversa e denaturarlo completamente, a 95°C per 5 minuti.

Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando The Minicycler™ Model PTC-150-16 (MJ Reserch, USA).

I primers utilizzati per controllare la qualità e la quantità dell'RNA, specifici per il gene della  $\beta$ -actina, sono indicati di seguito:

ACT1F : 5'-ACTGTGGGGCGCCCCAGGCACC-3'

ACT1R : 5'-CTCCTTAATGTGACGCACGATTTC-3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 55°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- Estensione finale: 10 minuti a 72°

Sono stati poi utilizzati primers specifici per ciascun gene analizzato:

### *TcR $\beta$*

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante del *TCR $\beta$*  di *Dicentrarchus labrax*, disegnati in base alla sequenza depositata nella banca on line NBCI (AJ493441). La sequenza di tali primers, chiamati TR1 e TF1, è la seguente:

TF1     5'–AGATTACCGGACCATCAGTGAAAG–3'  
 TR1     5'–TCAGTAGTTCTGCTTCCCTTTGA–3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 58°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

### *CD8 $\alpha$*

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante del *CD8 $\alpha$*  di *Dicentrarchus labrax*, disegnati in base alla sequenza depositata nella banca on line NBCI (AJ846849). La sequenza di tali primers, chiamati SBASS-CD8 F1 e REV1-CD8, è la seguente:

SBASSCD8 F1     5'–TACAGAGGCAATGAACTAAGATTCGG–3'  
 SBASSCD8REV1   5'–AGCCATCGTCCGCGGCTT–3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 54°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

*CD4*

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la regione costante del *CD4* di *Dicentrarchus labrax*, disegnati in base alla sequenza depositata nella banca on line NBCI (AM849811).

La sequenza di tali primers, chiamati RQCD4FW e RQCD4RW, è la seguente:

RQCD4FW 5'-CTGACCATCACCCCACTC-3'

RQCD4RW 5'-CTGAGGTGTGTCATCTTCC-3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 54°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

*MHC II-β*

Sono stati utilizzati dei primers specifici per la catena β dell'*MHCII* di *Dicentrarchus labrax*, disegnati in base alla sequenza depositata nella banca on line NBCI (AY994059).

La sequenza di tali primers, chiamati MHCII-SBASR e MHCII-SBARV, è la seguente:

MHCII-SBASR: 5'-TCAGAGTGAGCTGGCTCAGA-3'

MHCII-SBARV: 5'-GGAACCAGAATCCTTCCTGG-3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 55°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

## 1.4 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio

La separazione e l'identificazione dei frammenti di DNA è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio, utilizzando un gel a diverse concentrazioni a seconda dei pesi molecolari delle bande da visualizzare.

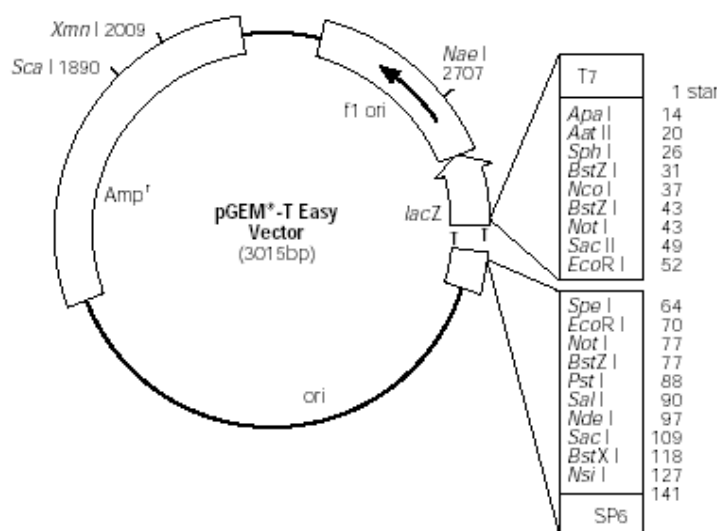
Per la preparazione di un gel al 1% (w/v) si è preso: 1 g d'agarosio, disciolto in 100 ml di tampone TBE (0,89 M Tris-Borato, 20 mM EDTA, pH 8.3), utilizzato anche come tampone della corsa elettroforetica. Le molecole di DNA sono state identificate aggiungendo al gel Bromuro d'Etidio (10 ng/μl), una sostanza in grado d'intercalarsi fra le basi della doppia elica di DNA, rendendolo così visibile in seguito ad esposizione alla luce ultravioletta. Le elettroforesi sono state eseguite ad un voltaggio costante di 100 V, utilizzando l'apparato per elettroforesi Power-Pac 300 (BIO-RAD).

## 1.5 Procedure di clonaggio

I prodotti amplificati tramite le serie di PCR sono stati clonati e sequenziati per verificare l'effettiva specificità dei primers utilizzati.

### 1.5.1 Vettore utilizzato

Per il clonaggio in *E. coli* è stato utilizzato il vettore pGEM-T Easy (Promega) che ci ha permesso l'identificazione diretta dei trasformanti mediante Red-White screening in MacCONKEY Agar (Sigma) .



**FIG. 1: MAPPA DEL VETTORE pGEM-T EASY:** ori- origine di replicazione batterica, lacZ- regione codificante l'α-peptide della β-galattosidasi, lacO- operatore lac, SP6- promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi SP6, MCS- sito multiplo di clonaggio, T7- promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi T7, f1 ori- origine di replicazione del fago f1, Amp- resistenza all'ampicillina.

### 1.5.2 Microrganismo utilizzato

Con i prodotti di ligazione sono state trasformate cellule competenti di *E. coli* JM109 (Promega) il cui genotipo è: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 ( $r_k^-, m_k^+$ ), relA1, supE44,  $\lambda^-$ ,  $\Delta$  (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$  15]. È un ceppo permissivo per vettori che portano doppie mutazioni e viene usato per lo screening di ricombinanti ottenuti in vettori che portano il gene lacZ (gene che codifica per la  $\beta$ -galattosidasi).

### 1.5.3 Terreni di coltura

#### SOC Medium

Composizione per litro di terreno

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Tryptone            | gr. 20 |
| Estratto di lievito | gr. 10 |
| NaCl 1M             | ml 10  |
| KCl 1M              | ml 2,5 |
| Mg <sup>2+</sup> 2M | ml 10  |
| Glucosio 1M         | ml 10  |

Acqua distillata fino a ml 1000

La soluzione stock di Mg<sup>2+</sup> 2M è composta di 20.33% (w/v) MgCl<sub>2</sub> e 24.65% (w/v) MgSO<sub>4</sub>, sterilizzata su filtri 0.2 $\mu$ m.

La sterilizzazione dei terreni di coltura è stata effettuata mediante trattamento in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121°C.

#### LB (Luria-Bertani)

Composizione per litro di terreno:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Tryptone            | gr. 10  |
| Estratto di lievito | gr. 5   |
| NaCl                | gr.10   |
| Acqua distillata    | ml 1000 |

#### 1.5.4 Purificazione del DNA da gel d'agarosio

Le bande relative ai frammenti d'interesse sono state purificate dal gel utilizzando il kit della QIAgen (QIAquick Gel Extraction) seguendo le informazioni fornite dalla casa produttrice. Questo protocollo può essere impiegato per la purificazione di frammenti di DNA di lunghezza compresa tra le 70 bp e le 10 kb.

I frammenti di DNA, dopo essere stati visualizzati con luce ultravioletta, sono stati ritagliati dal gel cercando di minimizzare la quantità d'agarosio prelevata. Le porzioni di gel sono state trasferite in un tubo da 1.5 ml e pesate; si è poi aggiunto un volume di Buffer QG pari a tre volte il volume del gel (considerando 100 mg~100 µl) e si è lasciato incubare il campione a 50°C per 10 minuti, per dissolvere il gel. A questo punto si è caricato il campione su una colonnina cromatografica, fornita dalla casa produttrice del kit, a cui si lega il DNA e si è centrifugato per 1 minuto a 13000 rpm.. Il lavaggio finale è stato effettuato aggiungendo 0.75 ml di Buffer PE contenente etanolo e centrifugando per 1 minuto a 13000 rpm. Poi è stata effettuata un'ulteriore centrifugazione per eliminare tutto il buffer PE e, per eluire il DNA, si è trasferita la colonnina cromatografica in un nuovo tubo da 1.5 ml, a cui sono stati aggiunti 50 µl di acqua Nuclease-free. Il purificato è stato poi caricato su un gel d'agarosio per determinarne la concentrazione.

#### 1.5.5 Ligazione di frammenti di DNA

Gli inserti sono stati miscelati con 50 ng del vettore di clonaggio pGEM-T Easy, con la T4 DNA Ligasi, 2X Rapid Ligation Buffer (Tris-HCl 60mM, pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 20mM, DTT 20mM, ATP 2mM, 10% polietilen glicole) specifico per questo enzima e con acqua sterile, fino ad un volume totale di 10 µl. La reazione è stata realizzata utilizzando un rapporto vettore:inserto di 1:3 e lasciando i campioni per 16 ore a 4°C.

Per calcolare la giusta quantità d'inserto da aggiungere nella reazione di ligazione è stata applicata la seguente equazione:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vettore}} \times \frac{3}{1} = \text{ng inserto}$$

### *1.5.6 Trasformazione delle cellule competenti*

Ad un'aliquota di 50  $\mu$ l di cellule competenti JM109 (Promega) sono stati aggiunti 3  $\mu$ l (5ng/ $\mu$ l) dei prodotti della reazione di ligazione descritta precedentemente. Il campione, dopo essere stato lasciato in ghiaccio per 20 minuti, è stato sottoposto ad uno "shock" termico a 42°C per 50 secondi e quindi, posto nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. A questo punto è stato aggiunto il terreno di crescita per i batteri, il SOC medium, fino ad un volume di 1ml ed il campione è stato incubato a 37°C per 1,5 ore. Le cellule presenti nel terreno sono state centrifugate per 1 minuto a 13500 rpm; del supernatante sono stati prelevati 800  $\mu$ l e nei rimanenti 200  $\mu$ l è stato risospeso il pellet.

Le cellule, infine, sono state piastrate su terreno selettivo (MacCONKEY) contenente ampicillina 100  $\mu$ g/ml, per isolare i trasformanti ricombinanti mediante il red-white screening.

### *1.5.7 Colture batteriche*

Una volta ottenute le piastre con i batteri ricombinanti, il passo successivo è stato quello di incubare le colonie batteriche, in un appropriato terreno di crescita (LB) con l'aggiunta di ampicillina e lasciarle a 37°C overnight.

### *1.5.8 Estrazione del DNA plasmidico*

Per l'estrazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il kit Miniprep DNA purification sistem (Promega). Le cellule batteriche sono state recuperate in dei tubi da 1,5 ml, mediante centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti.

Sono stati quindi aggiunti 250  $\mu$ l di Cell Resuspension Solution e il pellet è stato risospeso; poi alla sospensione sono stati aggiunti 250  $\mu$ l di Cell Lysis Solution, lasciando incubare per circa 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 10  $\mu$ l di Proteasi Alcalina e poi 350  $\mu$ l di Neutralization Solution, quindi la sospensione è stata centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti.

Tutto il supernatante è stato trasferito sulla colonnina fornita dal kit (800 $\mu$ l per volta) e centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto. Sono stati quindi effettuati due lavaggi, centrifugando a 14000 rpm per 1 minuto, dopo aver aggiunto la soluzione di lavaggio della colonnina e etanolo in base alle istruzioni fornite dal Kit. Infine è stato rimosso tutto l'etanolo mediante centrifugazione a vuoto a 14000 rpm per 1 minuto.

A questo punto la colonnina è stata messa su un tubo da 1,5 ml, a cui sono stati aggiunti 100 µl di acqua Nuclease free e, dopo un minuto di incubazione, il campione è stato centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto per eluire il DNA plasmidico.

#### 1.5.9 Analisi di sequenza

Le sequenze sono state inviate per il sequenziamento presso: MWG Biotech (Automated DNA Sequencing Service-Ebersberg, Germania); per l'analisi delle sequenze è stato impiegato l'apposito programma BLAST (Altschul et al., 1990).

## 2. ANALISI D'ESPRESSIONE DI TIPO QUANTITATIVO

La tecnica della PCR quantitativa (Q-PCR), che fornisce un'informazione reale sull'effettiva quantità di gene espresso, è stata utilizzata per lo studio dell'espressione del *TCRβ*, *CD8α*, *CD4* e *MHCII-β* durante l'ontogenesi della spigola e nel timo ed intestino di esemplari di un anno di età. In particolare l'analisi d'espressione del *TCRβ*, *CD8α*, *CD4*, durante lo sviluppo della spigola, è stata effettuata su 3 pool di circa 50 animali dallo stadio di 25 giorni a 92 giorni dopo la schiusa, quella per l'*MHCII-β* su 3 pool di circa 50 animali dallo stadio di 16 giorni a 92 giorni dopo la schiusa, e infine su timo e intestino di tre esemplari giovanili di spigola. L'esperimento di "comparative quantitation" è un metodo molto efficiente per paragonare livelli di DNA tra campioni, quando però non è importante sapere l'assoluta quantità del gene target (*Unknown*), ma il relativo incremento o decremento dell'espressione rispetto ad un campione di riferimento (*Calibrator*). La quantità del gene d'interesse in ogni campione può subire delle variazioni, causate ad esempio dall'introduzione di quantità diverse di cDNA, oppure da differenze nell'efficienza di estrazione dell'RNA, o della trascrittasi inversa. Per ridurre gli effetti di queste variazioni viene introdotto un secondo gene (*Normalizer*), che viene espresso in ogni cellula e che non viene né up né down-regolato in seguito ad alcun tipo di trattamento; nel nostro caso, questo gene è la *β-actina*.

Una volta estratto l'RNA, si è proceduto con la sintesi del cDNA, utilizzando il kit BioScript RNase H minus (Bioline): a 2 µg di RNA totale sono stati aggiunti 1 µl di random esameri (0.2 µg/µl - Amersham Pharmacia) ed acqua nucleasi-free fino ad un volume totale di 12 µl, ed il tutto è stato incubato a 70° C per 5 minuti e poi posto immediatamente in ghiaccio; successivamente, sono stati aggiunti 0.4 µl di 100 mM dNTPs (25 mM ciascuno - Promega), 4 µl di 5X reaction buffer ed acqua nucleasi-free, fino ad un volume totale di 19.75 µl, e 0.25 µl di BioScript (trascrittasi inversa 200 u/µl), incubando la

miscela a 25° C per 10 minuti, poi a 37° C per 60 minuti ed infine a 70° C per 10 minuti, per terminare la reazione.

I livelli d'espressione del *TCR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$*  sono stati determinati utilizzando il sistema Mx3000P™ real time PCR (Stratagene – software versione 2.02) e la Brilliant SYBR Green Q-PCR Master Mix (Stratagene), seguendo le istruzioni della casa produttrice ed introducendo il ROX come sonda interna di riferimento.

La sonda SYBR Green ha un'affinità maggiore per il DNA a doppio filamento (dsDNA) che per il DNA a singolo filamento (ssDNA) o per l'RNA ed è quindi l'ideale per monitorare l'accumularsi dell'amplificato. La fluorescenza emessa dal SYBR Green aumenta di circa 1000 volte quando è legato a dsDNA, rendendo questa sonda, in qualsiasi momento del saggio, un sensibile indicatore della quantità di dsDNA presente nella miscela di reazione.

Per distinguere la fluorescenza derivata da prodotti PCR specifici da quella di prodotti PCR aspecifici, le reazioni di Q-PCR con la sonda SYBR Green sono state associate alla curva di dissociazione, durante la quale i dsDNA vengono denaturati incrementando gradualmente la temperatura e raccogliendo ad ogni step i valori di fluorescenza. La riduzione dell'intensità di fluorescenza alla temperatura di melting del prodotto PCR specifico è un indice qualitativo della proporzione di dsDNA attribuibile realmente all'amplificato di interesse.

Sono stati quindi disegnati nuovamente primers specifici per i geni di interesse dal momento che è meglio lavorare su prodotti di amplificazione piccoli (circa 200 bp):

*CD8 $\alpha$* : RQ-SBASSCD8FW: 5'-CTAAGATTCGGCAAAATAACTCGAC-3'

RQ-SBASSCD8RW: 5'-GTAGAAGAAGAAGGCC-3'

*TCR $\beta$* : RQTCRSBAFW: 5'-GACGGACGAAGCTGCCCA-3'

RQTCRSBARW: 5'-TGGCAGCCTGTGTGATCTTCA-3'

*CD4*: RQCD4SBAFW2: 5'-GTGATAACGCTGAAGATCGAG-3';

RQCD4SBARW2: 5'-GAGGTGTCATCTTCCGTTG-3'

*MHCII- $\beta$* : RTMHCFR: 5'-CAGAGACGGACAGGAAG-3'

RTMHCRV2: 5'-CAAGATCAGACCCAGGA-3'

*β-actina*: RQ-ACTFW: 5'-ATGTACGTTGCCATCC-3';

RQ-ACTRW: 5'-GAGATGCCACGCTCTC-3'

Approssimativamente 10 ng di cDNA (in triplicato) sono stati usati in ogni reazione di PCR e per ogni coppia di primers è stato effettuato il controllo negativo (in duplicato), aggiungendo acqua al posto del template.

Il programma utilizzato per tutte le coppie di primers è:

- denaturazione iniziale per 10 minuti a 95° C
  - denaturazione per 45 secondi a 95° C
  - annealing per 45 secondi a 52° C
  - estensione per 45 secondi a 72° C
- } 35 cicli
- analisi della curva di melting a 52° C (metodo “all points”): quest’ultimo passaggio è utile per verificare la specificità del picco d’amplificazione, che viene comunque esaminato con l’elettroforesi su gel d’agarosio.

I valori di fluorescenza vengono raccolti durante la fase di estensione dell’amplificazione e per l’analisi dei dati viene utilizzato il metodo “endpoints” del software Mx3000P™.

## 2.1 Quantificazione del cDNA

In ogni esperimento la quantificazione relativa è stata eseguita comparando i livelli dei trascritti d’interesse con quello di riferimento definito come calibratore e il cui valore è stato posto uguale a 1.0. Nell’analisi d’espressione dei geni *TcRβ*, *CD8α*, *CD4* e *MHCII-β* durante l’ontogenesi della spigola è stato preso come calibratore, per i primi tre geni, l’espressione del *TcRβ* allo stadio di 25 giorni dopo la schiusa, mentre per l’*MHCII-β* il livello del trascritto a 16 giorni dopo la schiusa. Per quanto riguarda l’analisi d’espressione effettuata su timo e intestino di spigole di un anno di età, per i geni *TcRβ*, *CD8α* e *CD4* è stato considerato come calibratore dell’esperimento l’espressione del *CD8α* nel cervello, mentre per l’*MHCII-β* è stato preso come calibratore l’espressione dello stesso gene nel muscolo. Lo stesso gene normalizzatore (*β-actina*) è stato incluso nell’analisi di tutti i campioni per correggere le differenze di cDNA tra i campioni. La quantità del trascritto è stata stabilita sulla base della determinazione del ciclo threshold (Ct), definito come il ciclo in cui è stato rilevato un’incremento di fluorescenza statisticamente significativo al di sopra di un segnale di background.

La specificità e la lunghezza in bp dei prodotti di real-time PCR sono state controllate con l'elettroforesi in gel d'agarosio.

### 3. ISTOLOGIA E IMMUNOISTOCIMICA

#### 3.1 Istologia

Alcune sezioni di timo, intestino e larve a 51 e 75 giorni ph sono state colorate con May-Grünwald/Giemsa (MGG) per indagini di istologia generale, mentre su altre sono state effettuate delle reazioni di immunoistochimica.

#### 3.2 Immunoistochimica

Alcune sezioni di timo di spigola di un anno adiacenti alle sezioni raccolte per l'indagine di ibridazione *in situ* (come descritto nel paragrafo 3.4) sono state sparaffinate, reidratate, lavate in tampone fosfato salino (PBS) (0.1 M, pH 7.3), e infine incubate 20 minuti con PBS contenente 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per inibire l'attività perossidasi endogena. Le sezioni sono state incubate per 18 h a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale AE1/AE3 di topo contro le citocheratine umane (Dako, Italia) (diluito 1:10 in PBS 0.1 M, pH 7.3 contenente 5% siero normale di cavallo, 5% siero normale di spigola e 0.1% sodio azide).

L'anticorpo monoclonale AE1/AE3 riconosce le citocheratine appartenenti alla sottofamiglia A (10,13,14-16,19) e alla sottofamiglia B (1-8) e permette di localizzare le componenti epiteliali timiche. Il controllo negativo degli esperimenti è stato effettuato sostituendo l'anticorpo primario con DMEM.

Dopo 3 lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 1 h con siero biotinilato di cavallo anti-Ig di topo diluito 1:1000 con PBS contenente 0.1% sodio azide e 1% BSA ed in seguito incubate per 1 h con il complesso avidina-perossidasi biotinilata (ABC, Vector) con le soluzioni di avidina e perossidasi di rafano biotinilata diluite 1:2000 in TBS 0.05 M, pH 7.6. Dopo lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate in TRIS 0.05 M contenente 0.4% nickel ammonio solfato, 0.02% diaminobenzidina e 0.015% perossido di idrogeno. Dopo lavaggi in TRIS, le sezioni sono state disidratate, montate ed esaminate al microscopio ottico a campo chiaro (AxioSkop 2 plus, Germany), equipaggiato con videocamera a colori (AxioCam-Zeiss, Germany) collegato ad un sistema computerizzato (AxioVision, KS300).

### 3.3 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Per l'indagine al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) sono stati campionati intestini posteriori di spigola provenienti da 3 esemplari giovanili. I campioni sono stati fissati in una miscela al 4% paraformaldeide e 2.5% glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7,2 (Karnovsky, 1965). Successivamente, il materiale è stato lavato in tampone cacodilato 0,1 M, dove è stato lasciato per una notte; è seguita poi una post fissazione con tetrossido di osmio 1 % in tampone cacodilato 0,1 M per un'ora, poi di nuovo lavato in tampone cacodilato 0,1 M per 1 ora. E' stata effettuata, successivamente, una fase di disidratazione del materiale, attraverso una serie di passaggi in alcool etilico a concentrazioni progressivamente crescenti (dal 50% al 100%) e in seguito i campioni sono stati infiltrati in resina Spurr (TAAB, England). Le ultrasottili (dello spessore di 60-80 nm) sono state raccolte su appositi retini di rame e sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo: queste soluzioni saline contengono atomi pesanti, i quali, legandosi in modo selettivo a specifiche strutture cellulari, ne aumentano statisticamente la possibilità di interazione con il fascio elettronico primario, permettendo, durante l'osservazione, la formazione di un' immagine ad elevato contrasto. Infine, i campioni sono stati osservati al microscopio elettronico a trasmissione Jeol JEM EX II , a 120 kV.

### 3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Anche per l'indagine al SEM sono stati campionati intestini posteriori di spigola provenienti da 3 esemplari giovanili. Le fasi di fissazione e disidratazione sono state eseguite esattamente come per la preparazione al TEM. Dopo queste fasi, il materiale è stato disseccato con anidride carbonica liquida mediante il Critical point dryer (Balzer Union CPD 020), fissato su appositi porta-campioni e metallizzato con una lega d'oro nell'evaporatore Balzer Union MD 010. Così trattati, i campioni sono stati osservati al microscopio Jeol JSM 5200.

#### 4. IBRIDAZIONE *IN SITU*

La tecnica dell'ibridazione *in situ* su sezioni istologiche utilizza una sonda di RNA “antisenso”, cioè complementare all'mRNA codificante un determinato prodotto genico, allo scopo di evidenziare l'espressione del gene codificante tale mRNA. Come controllo negativo dell'esperimento si utilizza una sonda “senso” cioè con la stessa sequenza dell'mRNA bersaglio, con cui, pertanto, non dovrebbe appaiarsi. Per evitare l'utilizzo di marcatori radioattivi, le sonde sono state prodotte *in vitro* per trascrizione con RNA polimerasi in presenza del nucleotide modificato DIG<sup>11</sup>-UTP. Infatti, quest'ultimo è un analogo dell'UTP a cui è legata la digossigenina, molecola riconosciuta da un anticorpo specifico. Tale anticorpo, nel nostro caso, è coniugato ad un enzima la fosfatasi alcalina che in presenza di un opportuno substrato colorimetrico produce un precipitato colorato che si deposita stabilmente.

In questo lavoro di dottorato di ricerca, tale tecnica ha permesso di localizzare cellule trascrizionalmente attive per il *TcRβ*, *CD8α*, *CD4*, *MHCII-β* su sezioni istologiche di timo e intestino provenienti da esemplari di un anno di spigola e durante lo sviluppo timico. Come controllo negativo dell'esperimento alcune sezioni sono state incubate con la sonda senso.

##### 4.1 Preparazione del template per la trascrizione *in vitro*

Per la preparazione della sonde per il *TcRβ*, *CD8α*, *CD4* e *MHCII-β* sono stati impiegati esemplari di spigola di 20-30 g allevati presso l'impianto d'acquacoltura “Nuova Azzurro” (Civitavecchia, Roma) da cui è stato prelevato il timo. Ai campioni è stato aggiunto 1 ml di Tripure e poi si è estratto l'RNA nel modo precedentemente descritto. Quindi, è stata effettuata una reazione di RT-PCR (kit Ready-To-Go RT-PCR Beads; Amersham Pharmacia Biotech) utilizzando le seguenti coppie di primers:

*CD8α* : CD8IBFR: 5'-CCATTGTCAGTCTGGCAC-3'

CD8IBRV: 5'-GTTTTCCAGGAGCCATCG-3'

*CD4*: 5'CD4FW: 5'- TGGAGAGTGGACCTGTGTG-3'

5'CD4RW1: 5'- GAGTGGGGTGATGGTCAG-3'

*TcRβ*: TF1: 5'-AGATTACCGGACCATCAGTGAAAG-3'

TR1: 5'-TCAGTAGTTCTGCTTTCCTTTGA-3'

*MHCII-β*: MHCISHFW :5'-CATCCCTCCATGTTGGTCTG-3'

MHCISHRW: 5'-GGATTCTGGTTCCTCAGTAAC-3'

Tali primers sono stati disegnati per amplificare la regione codificante il *CD8α*, *CD4*, *TcRβ* e *MHCII-β* e danno un prodotto di circa 500 bp, tranne che per il gene *MHCII*, la cui sonda è stata sintetizzata a partire da una sequenza di 373 bp.

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 55°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

Gli amplificati sono stati corsi su gel d'agarosio e le bande corrispondenti ai nostri prodotti sono state purificate e clonate come precedentemente descritto (Paragrafo 1). Il vettore di clonaggio utilizzato è il pGEM-T easy poiché esso contiene i siti di inizio trascrizione T7 e Sp6, necessari successivamente nella sintesi delle riboprobe. Le sequenze sono state inviate per il sequenziamento presso la MWG Biotech (Automated DNA Sequencing Service-Ebersberg, Germania); si è poi verificato, tramite l'apposito programma BLAST (Altschul et al., 1990) che le sequenze clonate corrispondessero a quelle del *TcRβ*, *CD8α*, *CD4* e *MHCII-β* di *Dicentrarchus labrax* depositate in banca dati, e il verso in cui la nostra sequenza si fosse inserita nel vettore di clonaggio.

Il plasmide, contenente la nostra sequenza, è stato poi utilizzato sia per amplificare lo stampo per la sonda senso, sia per quella antisense, di ogni gene:

1. Nel primo caso è stato utilizzato un primer per la regione T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (forward) e il primer reverse specifico del nostro gene (CD8 IBRV, 5'CD4RW1, TR1, MHCISHRW).

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione per 45 secondi a 94°C
  - annealing per 45 secondi a 54°C
  - estensione per 45 secondi a 72°C
- } 35 cicli
- 61

- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

2. Nel secondo caso è stato utilizzato un primer per la regione SP6 5'-GCATTTAGGTGACACTATAGAATAG-3' (reverse) e il primer forward specifico del nostro gene (CD8IBFR, 5'CD4FW, TF1, MHCISHFW).

Il programma utilizzato in questo caso è:

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| - denaturazione per 45 secondi a 94°C | } 35 cicli |
| - annealing per 45 secondi a 48°C     |            |
| - estensione per 45 secondi a 72°C    |            |

- Estensione finale: 10 minuti a 72°C

Gli amplificati ottenuti sono stati purificati tramite il kit Quick clean (Bioline) seguendo le informazioni fornite dalla casa produttrice. La concentrazione degli amplificati è stata stimata tramite corsa elettroforetica con markers a concentrazioni predefinite.

#### 4.2 Trascrizione e marcatura *in vitro*

Le reazioni di trascrizione in vitro, per ogni gene, sono state effettuate in due diverse eppendorf a partire dai due diversi promotori T7 (senso) e SP6 (antisenso). A questo scopo, è stato utilizzato il Roche DIG RNA Labeling kit.

Tale kit prevede di aver a disposizione 1 µg di DNA stampo in un volume massimo di 12 µl. Quindi, è stato preso un volume tale da contenere 1µg di DNA ed è stato portato ad un volume finale di 12 µl aggiungendo H<sub>2</sub>O-0,1% DEPC

Ad ogni eppendorf sono poi stati aggiunti:

- 2 µl di 10x NTP labeling mixture. E' una miscela costituita da 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG11-UTP, cioè i 4 nucleotidi + l'uracile marcato mediante digossigenina. Le polimerasi inseriscono un nucleotide marcato circa ogni 10-15 basi.
- 2 µl di 10x transcription buffer
- 1 µl di RNase inhibitor.
- 2 µl di RNA Polimerasi T7 nella Eppendorf per la sintesi della sonda senso e 2 µl di RNA Polimerasi SP6 nella Eppendorf per la sintesi della sonda antisenso.

La miscela di reazione è stata incubata per 2h a 37° C e in seguito, la reazione di trascrizione è stata arrestata introducendo nelle 2 Eppendorf 1µl di DNAasi I (idrolizza il DNA a doppia elica) per 15' a 37°C.

La sonda è stata poi precipitata in etanolo e risospesa in 30 µl di 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O, ottenendo, in base alle indicazioni del kit, la concentrazione teorica pari a 330 ng/µl.

### 4.3 DOT-BLOT

Il DOT-BLOT è un metodo, più efficiente della classica elettroforesi, per quantificare l'RNA marcato con digossigenina. Il kit utilizzato è Roche DIG RNA Labeling kit.

Sia il DNA di controllo, a concentrazione nota di 100ng/µl, che la nostra sonda, con una concentrazione teorica di 330 ng/ µl, sono stati portati ad una concentrazione di 1ng/µl. Poi sono state effettuate 4 diluizioni successive 1:10 sia della nostra sonda che del controllo, ottenendo delle concentrazioni equivalenti di 100, 10, 1 e 0,1 pg/µl.

1 µl di ciascuna diluizione è stato seminato su un filtro di Nylon Hybond e sottoposto a raggi UV per fissare l'RNA su di esso. Si è proceduto poi con le stesse operazioni di rivelamento immunologico e di colorazione, successivamente effettuate sul tessuto, con l'indicazione che tutti i reagenti utilizzati per la rilevazione dell'ibrido sonda-bersaglio fossero funzionali.

- Il filtro è stato lavato in agitazione con il Buffer 1 contenente 10% Tris-HCl 1M pH 7,5, 3% NaCl 5M e 87% MQ-H<sub>2</sub>O e poi con il Buffer 2 composto da Buffer 1 e Blocking Reagent ad una concentrazione di 0,01g/ml.
- Quindi il filtro è stato incubato con il Buffer 2 + l'anticorpo anti-DIG. La concentrazione dello stock di anticorpo è di 0,75U/µl e il rapporto anticorpo/Buffer 2 utilizzato è stato pari ad 1µl per ml.
- La reazione dell'anticorpo è stata arrestata tramite 2 lavaggi con il Buffer 3 composto da 10% di Tris HCl 1M (pH 9,5), 2,5% di NaCl 4M, 5% di MgCl<sub>2</sub> 1M e da 82,5% di MQ-H<sub>2</sub>O.
- Il filtro è stato infine incubato con la soluzione colorante costituita da Buffer 3 a cui è stato aggiunto il 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e l'NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride) a una concentrazione rispettivamente di 3,5µl/ml (da uno stock 50mg/ml) e 4,5 µl/ml (da uno stock di 100mg/ml).
- La reazione è stata interrotta con H<sub>2</sub>O + TE e l'intensità di colorazione della sonda è stata confrontata con quella del controllo, stimando la concentrazione reale delle sonde.

#### 4.4 Procedura di detezione colorimetrica

Sia le larve e post-larve che il timo e intestino di spigole di un anno di età sono stati fissati overnight a temperatura ambiente in paraformaldeide 4% in PBS (0.01 M, pH 7.4) e gradualmente idratati prima di essere inclusi in paraffina. Successivamente sono state raccolte sezioni seriali (5µm) su vetrini portaoggetto precedentemente trattati con L-polysina; le sezioni sono state fatte asciugare overnight a 37 °C e conservate a temperatura ambiente per le successive analisi.

Affinché la sonda potesse penetrare nelle cellule ed ibridare con il suo eventuale bersaglio, le sezioni sono state sottoposte a tutta una serie di trattamenti riportati di seguito.

Innanzitutto le sezioni sono state sparaffinate in xilene, reidratate in etanolo e trattate con acqua DEPC e poi lavate in 0,05M Tris HCl (pH 7,6) prima della digestione con la proteinasi K che ha la funzione di rompere le membrane cellulari e consentire così alla sonda di penetrare nelle cellule. La concentrazione della proteinasi K (compresa tra 0.5 e 2.0 µg/ml) è stata titolata per i tessuti da analizzare e il migliore risultato è stato ottenuto con 1 µg/ml. La reazione è stata poi arrestata in acqua DEPC fredda ed è seguita la reazione di acetilazione incubando le sezioni in 0,25% di anidride acetica in TAE Buffer (85 mM Tris-HCl, 0.2% di acido acetico e 0.02 M di EDTA). Le sezioni sono state poi lavate in acqua DEPC e gradualmente disidratate.

Successivamente è stata effettuata la reazione di ibridazione.

Dapprima è stato eseguito un profilo di diluizione della sonda variandone la concentrazione da 0.3 a 0.6 ng/µl e la concentrazione ottimale è stata di 0.45 ng/µl. Le sonde sono state diluite in modo da avere una concentrazione finale di 450 ng/ml in un mix di ibridazione costituita da 50% formammide, 4% di NaCl 2,5 M, 1% di Tris-HCl 1 M (pH7,5), 0,2% di EDTA 0,5 M, 2% di Denharts 50X, 10% di Destransolfato 50% (Pharmacia 17-0340-02), 1% DTT 1 M, 0,01% di tRNA, 0,5% di poly(A) e da 35% di MQ-H<sub>2</sub>O.

In seguito ad una incubazione overnight a 45 °C, le sezioni sono state lavate con 2x SSC per 15 min a 37°C, poi 3 volte con 0,2X SCC per 25min a 55°C. La concentrazione dell'SSC e la temperatura di incubazione determinano la stringenza del lavaggio e quindi sono dei parametri fondamentali per la riuscita dell'esperimento. Le sezioni sono quindi state incubate per 30 minuti a 37°C in tampone NTE (costituito da 0.01 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl e 1 mM EDTA) con RNAsi ad una concentrazione pari a 20µg/ml. Le RNAsi hanno la funzione di idrolizzare tutto l'RNA a singolo filamento in eccesso e in seguito a questo trattamento, le RNAsi sono state rimosse con 3 lavaggi in MQ-H<sub>2</sub>O.

Successivamente le sezioni sono state trasferite nel Buffer 1 (composto da 0.1 M Tris 0.15 M NaCl e 1% blocking reagent) per 1 ora e poi nel Buffer 2 (contenente 0.1 M Tris 0.15 M NaCl, 0.5% BSA and 0.3% Triton X-100) per 30 minuti. Di seguito è stata effettuata la reazione con l'anticorpo anti-DIG coniugato con la fosfatasi alcalina (Fab fragment; Roche Diagnostic, Germany), diluito 1:1000 in Buffer 2. Dopo un'incubazione di 2 h a temperatura ambiente con l'anticorpo le sezioni sono state lavate con una soluzione contenente 0.1 M Tris e 0.15 M NaCl, e poi nel Buffer 3 (composto da 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl e 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Infine l'anticorpo anti-DIG è stato localizzato utilizzando il 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato e l'NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride) ad una concentrazione rispettivamente di 3,5 µl/ml (da uno stock a concentrazione 50 mg/ml) e 4,5 µl/ml (da uno stock a concentrazione 100 mg/ml). In seguito ad un'incubazione overnight a temperatura ambiente i vetrini sono stati lavati in acqua distillata e montati con 50% glicerolo.

Per la conta delle cellule positive in 1 mm<sup>2</sup> dell'area del timo di esemplari giovanili di spigola, è stato utilizzato un sistema di analisi d'immagine computerizzato, che include un microscopio Zeiss (Axiophot), equipaggiato con una video camera a colori (Axio Cam MRC, Arese, Milano Italy) e un software (KS 300 and AxioVision).

## 5. ANALISI STATISTICA

I risultati numerici sono stati espressi come la media  $\pm$  SD. I dati ottenuti in seguito all'analisi d'espressione quantitativa, e alla conta delle cellule positive all'analisi d'immagine, sono stati analizzati attraverso l'analisi di varianza ad una coda o a due code (ANOVA), seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni, per determinare le differenze d'espressione tra i gruppi. Inoltre, l'analisi dei dati è stata compiuta utilizzando il software GraphPad Prism 3.0. Il livello di significatività accettato è stato  $p < 0.05$ .

## CAPITOLO III

### RISULTATI

#### 1. SVILUPPO DELL'ESPRESSIONE DEL *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* NELLA SPIGOLA

L'attività di ricerca svolta durante il dottorato ha previsto come primo obiettivo di effettuare un'analisi dell'espressione di alcuni geni chiave coinvolti nello sviluppo di un sistema immunitario funzionale nella spigola, quali il *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* .

Per far questo, è stato estratto l'RNA totale da uova fertilizzate, da 3 pools (ciascuno di 50 animali) di larve (2, 4, 6, 8, 13, 16, 21, 25, 32 giorni post schiusa, ph), e post-larve (39, 51, 62, 75, 92 ph), e da timi di esemplari giovanili (1 anno di età) di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.). La concentrazione dell'RNA totale proveniente da ogni stadio è stata stimata misurando l'assorbanza a 260 nm ( $A_{260}$ ) allo spettrofotometro (Jenway 6305 Uv/Vis, Spectrophotometer). L'RNA estratto è stato utilizzato nella quantità di 0,5 $\mu$ g per la sintesi di molecole di cDNA per effettuare un'analisi d'espressione mediante RT-PCR. Infatti un parametro fondamentale per il confronto dei risultati della PCR semi quantitativa è la quantità di stampo presente in ciascuna reazione. Inoltre, al fine di standardizzare i risultati, in ogni reazione di PCR è stata utilizzata la stessa quantità di primers forward e reverse e sono stati effettuati lo stesso numero di cicli (35).

Per controllare la qualità e la concentrazione dell'RNA ottenuto, è stata fatta una serie di reazioni di RT-PCR, utilizzando primers specifici per il gene della  *$\beta$ -actina*, che è costitutivamente espresso in tutte le cellule. Il prodotto ottenuto, di 550 bp, è risultato delle dimensioni attese (Fig. 3.1); questo passaggio è fondamentale per la normalizzazione dell'intensità delle bande e per evidenziare le reali differenze, dovute ad una variazione nell'espressione e non alla presenza di maggiore RNA.

Sono poi state fatte delle serie di reazioni di PCR utilizzando primers specifici per i singoli geni analizzati.

I primers utilizzati per il *TCR $\beta$*  sono stati disegnati per amplificare una regione di 550 bp della regione codificante il *TcR $\beta$*  di spigola. Come mostrato in figura 3.2A il *TcR $\beta$*  inizia ad essere rilevabile in larve di 25 giorni ph. Livelli crescenti di mRNA per il *TcR $\beta$*  sono stati osservati nei successivi stadi campionati, fino a raggiungere, in esemplari di 92 giorni ph, un'espressione paragonabile a quella del timo giovanile di spigola, utilizzato come

controllo positivo dell'esperimento. Per assicurarci della reale specificità dei nostri primers, la banda corrispondente al campione 25 giorni ph è stata purificata, clonata e sequenziata (Fig.3.2B). Tramite il programma "Expasy traslate" la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispettiva sequenza amminoacidica (Fig.3.2C). Attraverso i programmi "BLAST" e "ClustalW" si è confrontata la sua sequenza nucleotidica e amminoacidica con quelle presenti in banca dati provando, in modo definitivo, che si trattava di *TcRβ* di spigola (Fig.3.2D).

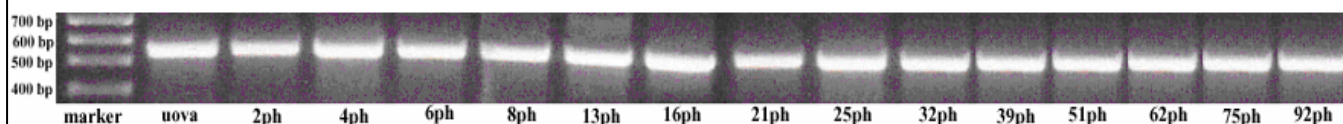
I primers utilizzati per il *CD8α* di spigola sono stati disegnati per amplificare una regione di circa 300 bp della sequenza codificante. Come si vede dalla Fig. 3.3A, il *CD8α* inizia ad essere rilevabile allo stadio di 51 giorni ph e la sua espressione aumenta fino allo stadio di 92 giorni ph. Il timo giovanile di spigola, che esprime il *CD8α*, è stato utilizzato come controllo positivo dell'esperimento. La specificità dei primers utilizzati è stata dimostrata mediante il clonaggio e il sequenziamento della banda corrispondente a 51 giorni ph (Fig.3.3B). Tramite il programma "Expasy traslate" la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispettiva sequenza amminoacidica (Fig.3.3C). Attraverso i programmi "BLAST" e "ClustalW" si è confrontata la sua sequenza nucleotidica e amminoacidica con quelle presenti in banca dati provando, in modo definitivo, che si trattava di *CD8α* (Fig.3.3D).

I primers utilizzati per lo studio dell'espressione del *CD4* durante l'ontogenesi della spigola, amplificano una regione di circa 250 bp della sequenza codificante. La Fig.3.4A evidenzia che il trascritto, in maniera paragonabile all'espressione del *CD8α*, inizia ad essere rilevabile allo stadio di 51 giorni ph, per poi aumentare negli stadi successivi fino a quello di 92 giorni ph. Anche in questo caso il timo giovanile, che esprime il *CD4*, è stato utilizzato come controllo positivo dell'esperimento. Il successivo clonaggio e sequenziamento della banda a 51 ph ha permesso di verificare la specificità dei primers usati (Fig.3.4B). Tramite il programma "Expasy traslate" la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispettiva sequenza amminoacidica (Fig.3.4C). Attraverso i programmi "BLAST" e "ClustalW" si è confrontata la sua sequenza nucleotidica e amminoacidica con quelle presenti in banca dati provando, in modo definitivo, che si trattava di *CD4* (Fig.3.4D).

I primers utilizzati per l'*MHCII-β* di spigola sono stati disegnati per amplificare una regione di 310 bp della sequenza codificante.

Come si vede dal gel (Fig.3.5A), l'mRNA per l'*MHCII-β* inizia ad essere rilevabile in animali di 4 giorni ph e livelli crescenti di mRNA sono stati osservati nei successivi stadi

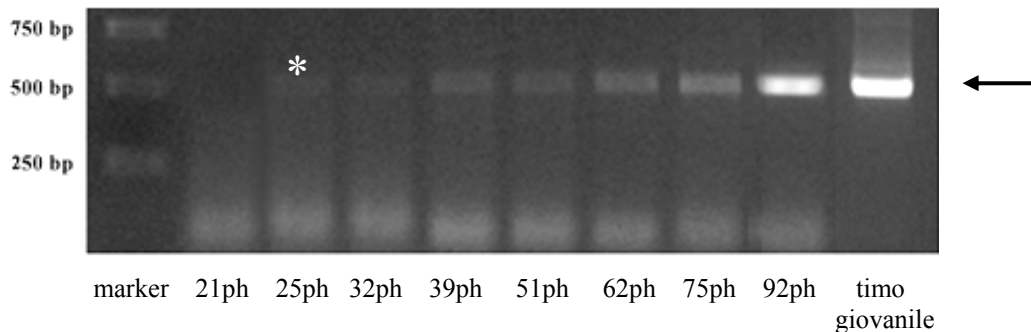
campionati. Il timo giovanile di spigola, che esprime l'*MHCII-β*, è stato utilizzato come controllo positivo dell'esperimento. Per assicurarci della reale specificità dei nostri primers, la banda corrispondente a larve di 4 giorni ph è stata purificata clonata e sequenziata (Fig.3.5B). Tramite il programma "Expasy traslate" la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispettiva sequenza amminoacidica (Fig.3.5C). Attraverso i programmi "BLAST" e "ClustalW" si è confrontata la sua sequenza nucleotidica e amminoacidica con quelle presenti in banca dati provando, in modo definitivo, che si trattava di *MHCII-β* di spigola (Fig.3.5D).



**Figura 3.1 Espressione del gene della  $\beta$ -actina durante lo sviluppo.**

Esperimenti di RT-PCR con i primers specifici per il gene della  $\beta$ -actina sono stati compiuti su uova, larve e post larve di spigola campionate a diversi tempi dopo la schiusa. ph = post hatching

A)



B)

GATTACCGGACCATCAGTGAAAGTGCTTCAACCTTCGCCAAAGGAGTGCAAAAATGAAAAAGAC  
 AAACAAAGGAAGAAGACCTTGGTTTGTGTGGCCAAAGACTTCTACCCAGACCATGTCAGTGTAT  
 CCTGGGAGATCAATGGGCAAAATGTCATAATGGTGTGGCGACGGACGAAGCTGCCCAGCTGAT  
 GCCGAAAAGAAGTTTTACCAAATCACCAGCAGGTTGAGGGTACCTGCCAAAGACTGGGAAAAC  
 TCAGATAATGAATTCAAGTGCATTGTCAATTTCTTCAATAAAACCCATACTGTCCCTTACACAG  
 ATTCATCTATGGTGAAGCTGTGACAACAGCAAATGTCATGACAAGAGAGAAATATGTGAAGAT  
 CACACAGGCTGCCAAACTCACATACAGTGTTCATCGCCAAGAGCTGCATTTACGGGGCCTTT  
 GTGGTGTCTTGGTGTGGAAGCTTCAGGGTTCAAAGGGAAAGCAGAACTACTGA

C)

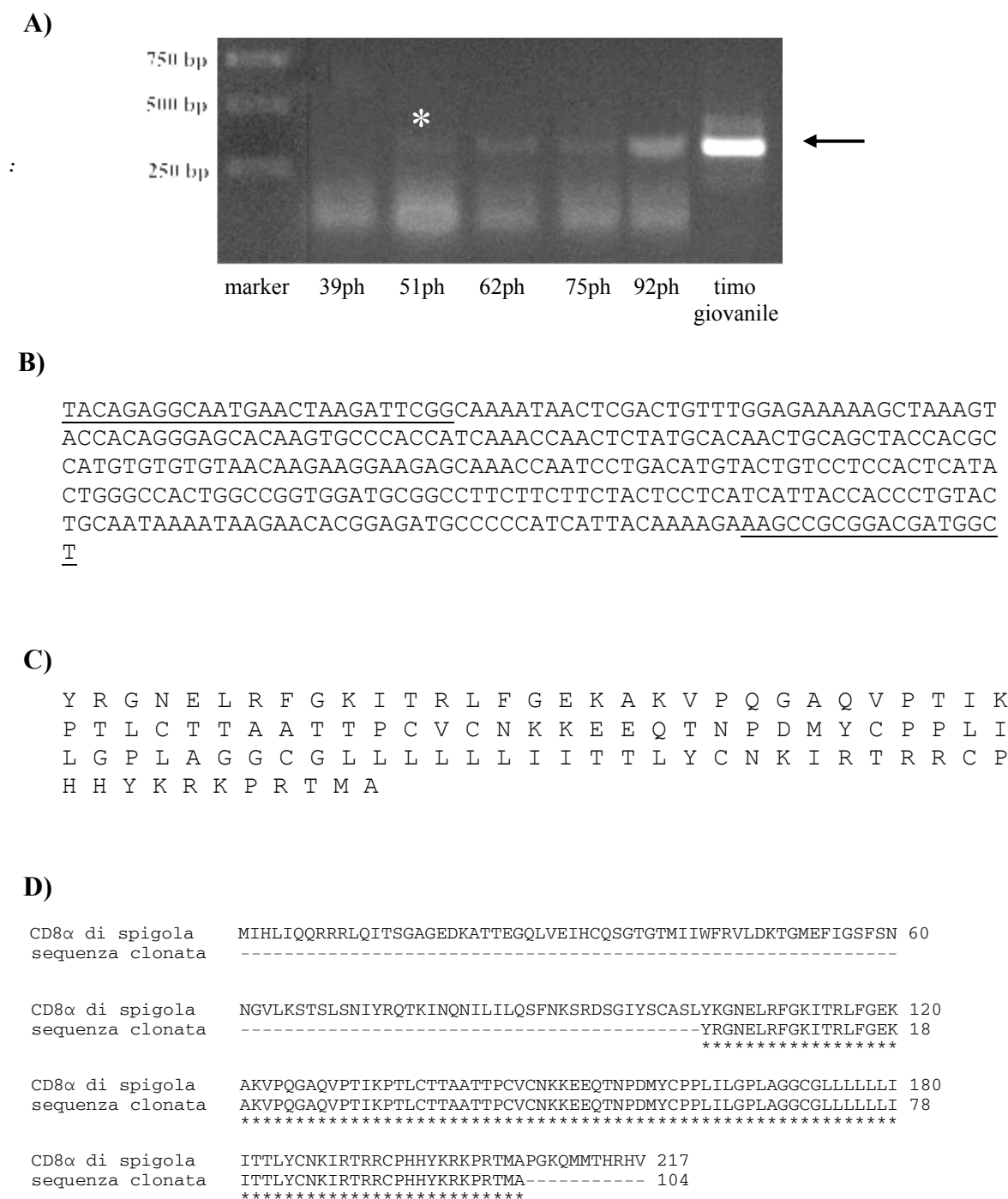
I T G P S V K V L Q P S P K E C K N E K D K Q R K K T L V C V A K  
 D F Y P D H V S V S W E I N G Q N V T N G V A T D E A A Q L M P E  
 K K F Y Q I T S R L R V P A K D W E N S D N E F K C I V N F F N K  
 T H T V P Y T D S I Y G E A V T T A N V M T R E K Y V K I T Q A A  
 K L T Y S V F I A K S C I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

D)

|                  |                                                              |     |
|------------------|--------------------------------------------------------------|-----|
| sequenza clonata | -----ITGPSVKVLQPSPECKNEKDKQRKKTLCVAKDFYDPHVSVSWEINGQNVNTNGV  | 55  |
| TcRβ di spigola  | EKDKEITGPSVKVLQPSPECKNEKDKQRKKTLCVAKDFYDPHVSVSWEINGQNVNTNGV  | 60  |
|                  | *****                                                        |     |
| sequenza clonata | ATDEAAQLMPEKKFYQITSRLRVPKDWENSDFEFCIVNFFNKHTHTVPYTDSTIYGEAVT | 115 |
| TcRβ di spigola  | ATDEAAQLMPEKKFYQITSRLRVPKDWENSDFEFCIVNFFNKHTHTVPYTDSTIYGEAVT | 120 |
|                  | *****                                                        |     |
| sequenza clonata | TANVMTREKYVKITQAAKLTVSVFIKSCYAFVFLVWKLQSGKQNY                | 166 |
| TcRβ di spigola  | TANVMTREKYVKITQAAKLTVSVFIKSCYAFVFLVWKLQSGKQNY                | 171 |
|                  | *****                                                        |     |

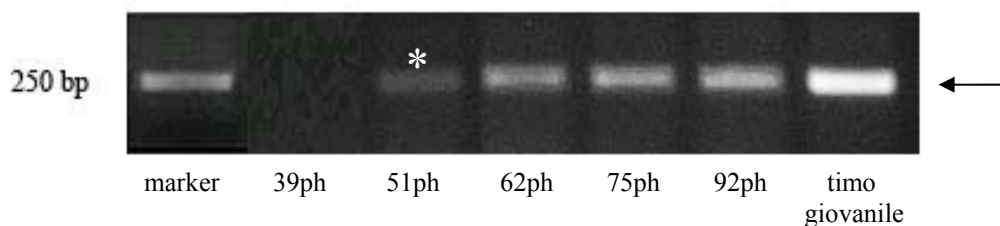
**Figura 3.2: Espressione del *TcRβ* durante lo sviluppo.**

(A) Uova, larve e post larve di spigola sono state campionate a diversi tempi dopo la schiusa. Gli esperimenti di RT-PCR sono stati effettuati utilizzando primers specifici per il *TcRβ* (sottolineati in B) di spigola. Il timo di esemplari di spigola di 1 anno di età è stato utilizzato come controllo positivo. Nella figura A è indicata la banda da 500 bp (freccia) che corrisponde al peso molecolare del *TcRβ*. Ph = post hatching (dopo la schiusa). La prima espressione del *TcRβ* è stata trovata a 25 giorni ph (\*) (B) La banda di 500 bp nel pozzetto “25 ph” (\*) è stata purificata, clonata e sequenziata. (C) Tramite il programma “ExPASy translate” la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispettiva sequenza amminoacidica, (D) Tramite il programma clustalW la sequenza amminoacidica ottenuta è stata allineata con la sequenza del *TcRβ* di spigola presente in banca dati.



**Figura 3.3: Espressione del *CD8α* durante lo sviluppo.**

(A) Uova, larve e post larve di spigola sono state campionate a diversi tempi dopo la schiusa. In B sono sottolineati i primers specifici per il *CD8α* di spigola, utilizzati per l'RT-PCR. L'RNA proveniente da timo di spigole di 1 anno di età è stato utilizzato come controllo positivo dell'esperimento. Nella figura A è indicata la banda da 310 bp (freccia) che corrisponde al peso molecolare del *CD8α*. Ph = dopo la schiusa. La prima espressione del *CD8α* è stata trovata a 51 giorni ph (\*) (B) La banda di 310 basi nel pozzetto "51 ph" (\*) (freccia) è stata purificata, clonata e sequenziata. (C) Tramite il programma "ExPASy translate" la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispondente sequenza amminoacidica, (D) Tramite il programma "ClustalW" la sequenza amminoacidica ottenuta è stata allineata con la sequenza del *CD8α* di spigola presente in banca dati



B)

CTGACCATCACCCCACTCATCTCATCATCCCGGAAGTGGGTATGGGAGATGGCGGAAAGTGG  
 AGGTGTGAGCTGTGGCGGAACAGCACATGGCTTACGTCAGCTGTGATAACGCTGAAGATCGA  
 GCCCAAGATTACTGTGTGGATGATAGTGCTCATATGCAGTGTACAGTCATTGCAATCCTCC  
 TCCTCCTCGTCGTTTTTCATCCTCTACCGACGCAGACAACGGAAGATGACACACCTCAG

C)

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

D)

```

sequenza clonata -----
CD4 di spigola      MSCVLGTLCTQQLLHVTEMKNFIQSVLILITVVM SAGEELIYAEEGQMVTLNPPAVTNP 60

sequenza clonata -----
CD4 di spigola      QTHYSYWVFNGNQIAWRNPFSGKGVNDKDSLSDTSGSVLVITNIQQNLFGTFTCQIYTSG 120

sequenza clonata -----
CD4 di spigola      NRDTPVDTTTYKILKLSVTMDPPSPLLPGEDLSLNCNAGRNP KIHWNLPQGQKINSQRIQ 180

sequenza clonata -----
CD4 di spigola      QKATGQDKGEWTCVVVTSYNKESKAKISVTLVDLTTAPSHLQYTSKSSPLTIPCSTTATWD 240

sequenza clonata -----
CD4 di spigola      TIKTRDIEGGKWEFFAKPGASLKSNAQMLFSLSLDPLKWT PDQDNELRYDPKLNQNGILS 300

sequenza clonata -----
CD4 di spigola      LKRNQKGKDGSDGYVCSLKFKSGVTNLNRTVTVHVLQITSSPGIELISGQQVNLTCDLGSP 360

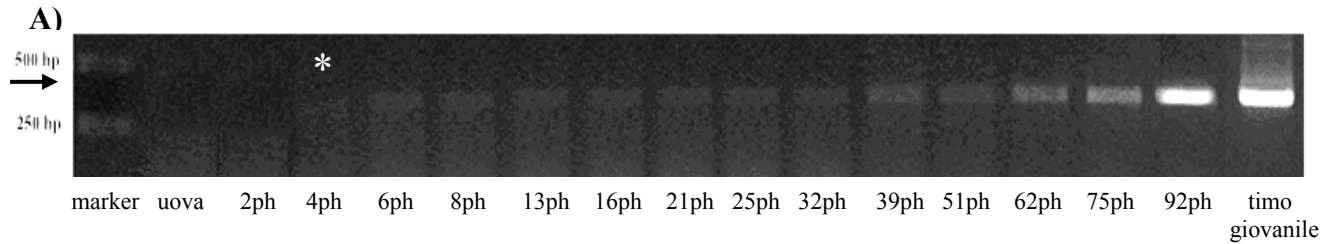
sequenza clonata -----DHHPTHLIIPEVGMGDGGKWRCELWRNSTWLTSAVITL 38
CD4 di spigola      LPSDLQLKWFPFGQSSLP SLKSDHHPHTHLIIPEVGMGDGGKWRCELWRNSTRLTSAVITL 420
                      *****

sequenza clonata      KIEPKITVMMIVLICSVTVIAILLLLVVFILYRRRQRKMTHL----- 80
CD4 di spigola      KIEPKITVMMIVLICSVTVIAILLLVAFILYRRRQRKMTHLRHRLCRCKNPQPRGFYRS 480
                      *****;*.*****

```

**Figura 3.4: Espressione del *CD4* durante lo sviluppo.**

(A) Uova, larve e post larve di spigola sono state campionate a diversi tempi dopo la schiusa e utilizzate in RT-PCR con primers specifici per il *CD4* (sottolineati in B) di spigola. Nella figura è indicata la banda da 250 bp che corrisponde al peso molecolare atteso (freccia). (B) La banda del pozzetto “51ph” che corrisponde alla prima espressione del *CD4* è stata purificata, clonata e sequenziata. (C) Tramite il programma “ExPASy translate” la sequenza nucleotidica (che era la stessa per entrambe le bande; dato non mostrato) è stata tradotta nella corrispondente sequenza amminoacidica, (D) Tramite il programma “ClustalW” la sequenza amminoacidica ottenuta è stata allineata con la sequenza del *CD4* di spigola presente in banca dati



**B)**

TCAGAGTGAGCTGGCTCAGAGACGGACAGGAAGTCACCTCTGATGTCACTTCCACTGATGAG  
CTGGCAGACGCTGATTGGTTCTACCAGATCCACTCTCACCTGGAGTACACGCCCAGGTCTGG  
 AGAGAAGATCTCCTGTGTGGTGGAGCACGCCAGCCTGAGAGAACCTCTGGTTACTGACTGGG  
 ACCCCTCCATGCCTGAGTCTGAGAGAAACAAGATCGCCATCGGAGCCTCCGGACTGATCCTG  
 GGTCTGATCTTGTCTCTGGCTGGATTCTACTACAAGAGGAAGGCCCGAGGAAGGATTCT

**C)**

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

**D)**

|                                        |                                                                                                                                              |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MHCII-β di spigola<br>sequenza clonata | MASEFLSFLSLFIISLYTADGFLSYTTNVCDFNSTDPKDIEYIFSYYNKLLELRFSSSV 60<br>-----                                                                      |
| MHCII-β di spigola<br>sequenza clonata | GEFVGYTELGVKNAERFNKDPSELAMRRAQKETVCLNNVNIDYQAALDKSVKPYVRLRSV 120<br>-----                                                                    |
| MHCII-β di spigola<br>sequenza clonata | APPAGKHPSMLVCSVYGFPKHIRVSWLRDQGQEVTSQVTSDELADADWFYQIHSLEYT 180<br>-----RVSWLRDQGQEVTSQVTSDELADADWFYQIHSLEYT 37<br>*****                      |
| MHCII-β di spigola<br>sequenza clonata | PRSGEKISCVVEHASLREPLVTDWDPSMPESERNKIAIGASGLILGLILSLAGFIYYKRR 240<br>PRSGEKISCVVEHASLREPLVTDWDPSMPESERNKIAIGASGLILGLILSLAGFIYYKRR 97<br>***** |
| MHCII-β di spigola<br>sequenza clonata | ARGRILVPSN 250<br>ARGRILV--- 104<br>*****                                                                                                    |

**Figura 3.5: espressione dell'*MHCII-β* durante lo sviluppo.**

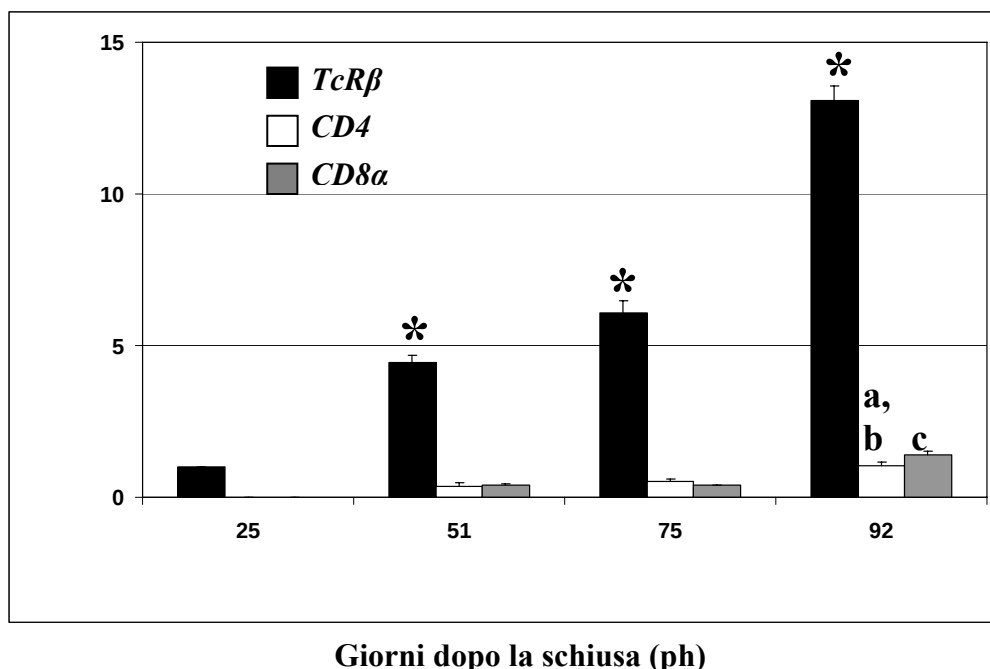
(A) Uova, larve e post larve di spigola sono state campionate a diversi tempi dopo la schiusa, e utilizzate in RT-PCR con primers specifici per l'*MHCII-β* (sottolineati in B) di spigola. Il timo adulto di spigola, esprimendo l'*MHCII* è stato utilizzato come controllo dell'esperimento. Nella figura è indicata la banda da 316 bp (freccia) che corrisponde al peso molecolare della banda attesa. La prima espressione dell'*MHCII-β* è stata trovata a 4 giorni ph (\*) (B) La banda pozzetto "4 ph" (\*) è stata purificata clonata e sequenziata. (C) Tramite il programma "ExPASy translate" la sequenza nucleotidica è stata tradotta nella corrispondente sequenza amminoacidica, (D) Tramite il programma "ClustalW" la sequenza amminoacidica ottenuta è stata allineata con la sequenza dell' *MHCII-β* di spigola presente in banca dati

## 2. Q-PCR DEI TRASCRITTI DEL *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* DURANTE LO SVILUPPO DELLA SPIGOLA

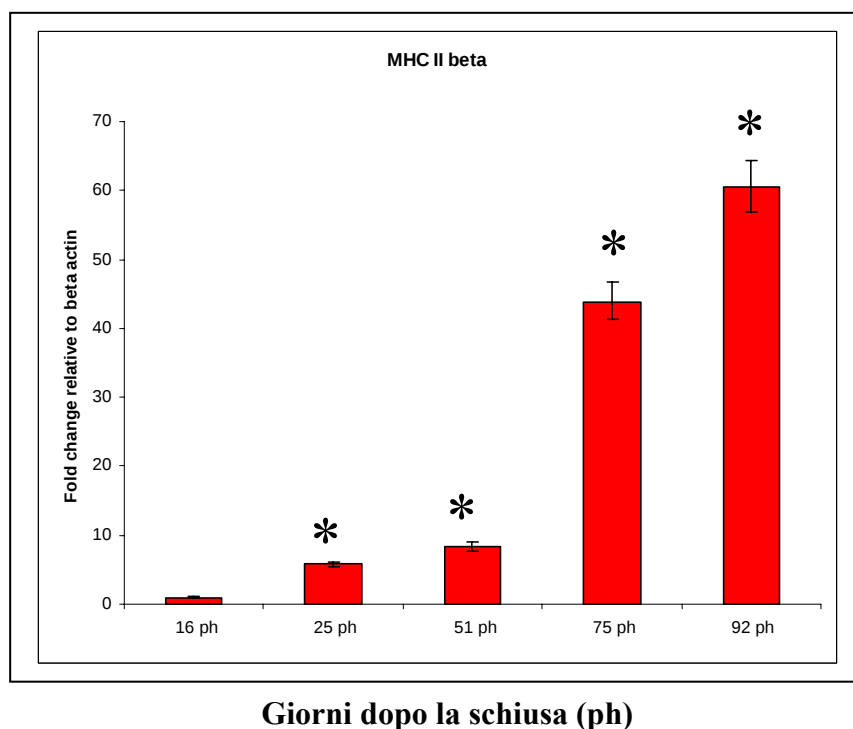
Sulla base dei dati ottenuti mediante RT-PCR relativi alla prima espressione dei quattro geni considerati, per quantificare il livello dei loro trascritti durante lo sviluppo sono state effettuate delle PCR quantitative in larve e post-larve di spigola.

Tale tecnica fornisce in tempo reale l'esatta quantità di amplificato rispetto ad un gene normalizzatore, nel nostro caso la  *$\beta$ -actina*, che serve per correggere le differenze d'espressione tra i campioni, e rispetto ad un calibratore che serve come trascritto di riferimento.

Nella figura 3.6 e 3.7 sono riportati rispettivamente i grafici dell'espressione dei geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$*  durante l'ontogenesi, ottenuti utilizzando come calibratore il *TCR $\beta$*  a 25 giorni ph per il primo grafico e l'*MHCII- $\beta$*  a 16 ph per il secondo. Per tutti i geni analizzati è possibile osservare un andamento crescente dell'espressione durante lo sviluppo e l'analisi statistica effettuata mediante il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza a due code e a una coda rispettivamente (ANOVA), ha rivelato per il *TcR $\beta$*  un aumento significativo dell'espressione dallo stadio di 25 giorni ph fino allo stadio di 92 giorni ph ( $P < 0.001$ ). Per quanto riguarda i trascritti del *CD4*, essi raggiungono a 92 giorni ph un livello di espressione significativamente differente dallo stadio di 25 e 51 ph ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$  rispettivamente) mentre l'espressione del *CD8 $\alpha$*  a 92 giorni ph è significativamente differente da tutti i precedenti stadi analizzati ( $P < 0.001$ ). Infine, l'analisi statistica dei trascritti per l'*MHCII- $\beta$*  ha rivelato un aumento significativo dell'espressione dallo stadio di 16 giorni ph fino allo stadio di 92 giorni ph ( $P < 0.001$ ).



**Figura 3.6** Q-PCR dei trascritti dei geni *TCRβ*, *CD8α* e *CD4* durante lo sviluppo della spigola relativa ai trascritti della *B-actina*. L'analisi d'espressione quantitativa è stata effettuata, su 3 pools (N=50) di larve e post larve di spigola da 25 a 92 giorni ph. I risultati numerici sono riportati come media  $\pm$  SD. Come test di significatività è stato scelto il Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza a due code (ANOVA). **Legenda:** Significativamente differente da: \**TCR-b* vs precedenti stadi ( $p < 0.001$ ); <sup>a</sup>*CD4* vs 25 dph ( $p < 0.001$ ), vs <sup>b</sup>51 dph ( $p < 0.01$ ); <sup>c</sup>*CD8α* vs precedenti stadi ( $p < 0.001$ ).



**Figura 3.7** Q-PCR del trascritti dell' *MHCII-β* durante lo sviluppo della spigola relativa ai trascritti della *B-actina*. L'analisi di espressione quantitativa è stata compiuta su 3 pools (N=50) di larve e post larve di spigola da 16 a 92 giorni ph. I risultati numerici sono riportati come media  $\pm$  SD. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza a una coda (ANOVA). **Legenda:** Significativamente differente da: \**MHCII-β* vs precedenti stadi ( $P < 0.001$ ).

### 3. Q-PCR DEI TRASCRITTI DEL *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* NEL TIMO DI PESCI DI UN ANNO

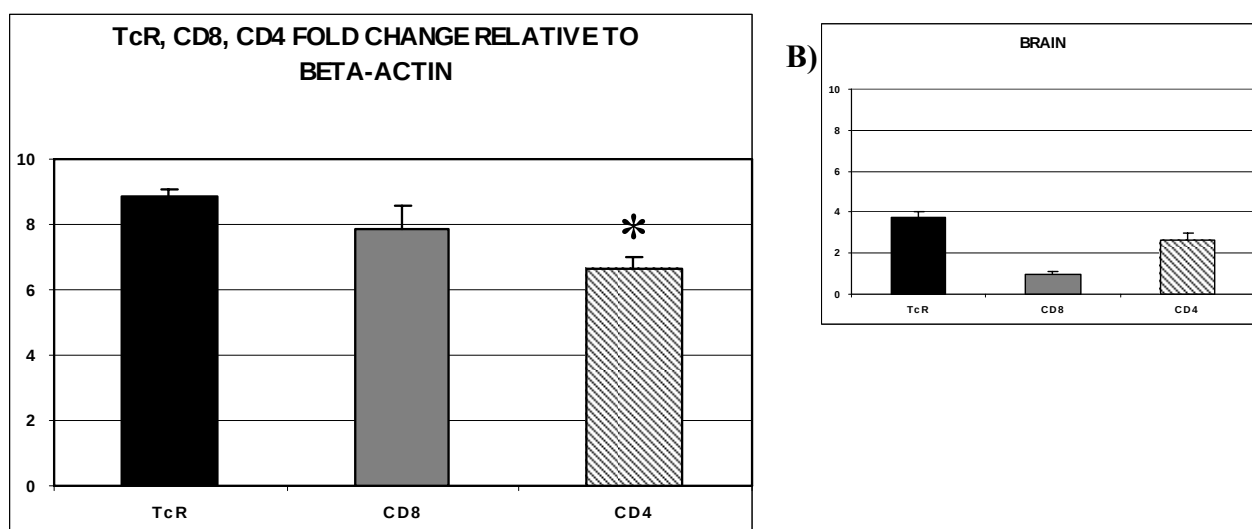
Al fine di ampliare le conoscenze relative alla maturazione e selezione dei timociti nei Teleostei è stato prelevato il timo da tre esemplari di spigola di un anno, per effettuare un'analisi dell'espressione dei suddetti geni mediante Q-PCR.

Per i geni *TcR $\beta$* , *CD8  $\alpha$*  e *CD4* la quantificazione è stata realizzata comparando i livelli dei trascritti con il livello del trascritto di riferimento (calibratore), in questo caso il *CD8 $\alpha$*  del cervello (Fig 3.8B). E' stato introdotto un gene normalizzatore ( *$\beta$ -actina*) per correggere le differenze d'espressione tra i campioni e per il test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA).

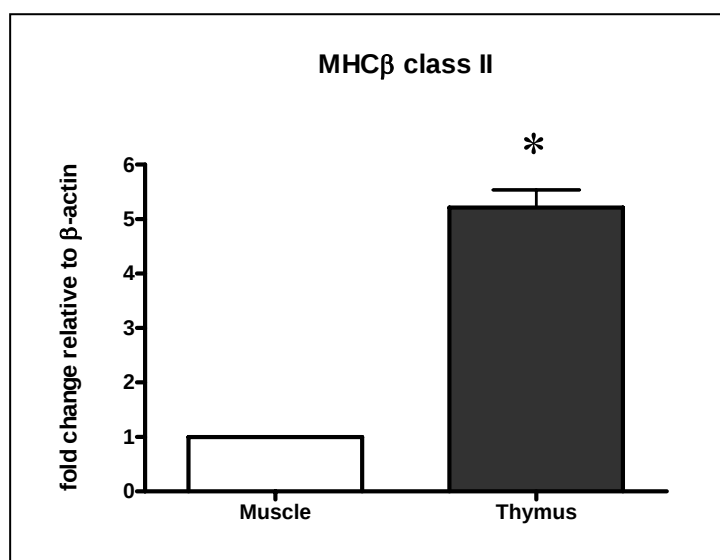
L'analisi statistica ha rivelato che i trascritti del *CD4* e del *CD8 $\alpha$*  nel timo non sono tra loro significativamente differenti mentre l'espressione del *TCR $\beta$*  è significativamente maggiore rispetto a quella del *CD4* ( $P < 0.05$ ) (Fig.3.8A).

La figura 3.9 mostra l'analisi d'espressione quantitativa dell'*MHCII- $\beta$*  nel timo di spigola di un anno. L'esperimento è stato effettuato comparando il livello del trascritto di questo gene nel timo con quello del muscolo (calibratore). Anche in questo caso la  *$\beta$ -actina* è stata introdotta per correggere le differenze tra i campioni e il test di significatività utilizzato è stato il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA). Il risultato ha evidenziato un'elevata espressione dell'*MHCII- $\beta$*  nel timo rispetto al muscolo ( $P < 0.001$ ).

Il livello d'espressione dell' *MHCII- $\beta$*  del timo sarà più avanti confrontato con quello dell'intestino (Fig.3.24), altro importante organo linfatico analizzato in questa tesi di dottorato.



**Figura 3.8** Q-PCR dei trascritti dei geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  e *CD4* nel timo di spigola di un anno relativa ai trascritti della  *$\beta$ -actina*. L'analisi d'espressione quantitativa è stata effettuata su timo e cervello di 3 esemplari giovanili di spigola. I risultati numerici sono riportati come media  $\pm$  SD. Per il test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA). **Legenda:** \*Significativamente differente da *TcR $\beta$*  ( $P < 0.05$ ).



**Figura 3.9** Q-PCR dei trascritti del gene *MHCII- $\beta$*  nel timo di spigola di un anno relativa ai trascritti della  *$\beta$ -actina*. L'analisi d'espressione quantitativa è stata effettuata su timo e muscolo provenienti da 3 esemplari giovanili di spigola. I risultati numerici sono riportati come media  $\pm$  SD. Come test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA). **Legenda:** \*significativamente differente dal muscolo  $P < 0.001$

#### 4. LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE $TcR\beta^+$ , $CD8\alpha^+$ E $MHCII-\beta^+$ NEL TIMO IN SVILUPPO

Per approfondire la conoscenza dei processi di differenziamento e selezione dei timociti si è proceduto con la localizzazione, tramite ibridazione *in situ*, delle cellule che esprimono i trascritti del *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  e *MHCII- $\beta$*  in post-larve di 51, 75 e 92 giorni ph. Il sequenziamento dei plasmidi pGEM-T Easy (Promega) in cui sono stati clonati il *TcR $\beta$* , il *CD8 $\alpha$*  e *MHCII- $\beta$*  della spigola ha confermato l'inserimento della corretta sequenza nucleotidica (Figg. 3.10; 3.11; 3.12). Questi plasmidi sono stati utilizzati per preparare le sonde senso e antisense marcate con digossigenina per gli esperimenti di ibridazione *in situ*.

AGATTACCGGACCATCAGTGAAAGTGCTTCAACCTTCGCCAAAGGAGTGCAAAAATGAAAA  
AGACAAACAAAGGAAGAAGACCTTGGTTTGTGTGGCCAAAGACTTCTACCCAGACCATGTC  
AGTGTATCCTGGGAGATCAATGGGCAAAATGTCATAATGGTGTGGCGACGGACGAAGCTG  
CCCAGCTGATGCCGGAAGAAGTTTTACCAAATCACCAGCAGGTTGAGGGTACCTGCCAA  
AGACTGGGAAAACCTCAGATAATGAATTCAAGTGCATTGTCAATTTCTTCAATAAAACCCAT  
ACTGTCCCTTACACAGATTCAATCTATGGTGAAGCTGTGACAACAGCAAATGTCATGACAA  
GAGAGAAATATGTGAAGATCACACAGGCTGCCAACTCACATACAGTGTTCATCGCCAA  
GAGCTGCATTTACGGGGCCTTTGTGGTGTTCCTGGTGTGGAAGCTTCAGGGTTCAAAGGGA  
AAGCAGAACTACTGA

**Figura 3.10:** Sequenza del *TcR $\beta$*  utilizzata per la sintesi della sonda per l'ibridazione *in situ*. Sono sottolineati i primers utilizzati per l'amplificazione in PCR.

CCATTGTCAGTCTGGCACAGGCACCATGATCATCTGGTTTCGAGTGTGGACAAAACCTGG  
CATGGAATTCATTGGGTCTTTCAGCAACAATGGCGTTCTAAAGTCAACCTCATTATCTAA  
CATCTACAGGCAACAAAGATTAATCAGAACATCCTGATACTGCAGTCATTCAACAAAAG  
CCGTGACAGCGGCATTTACAGCTGTGCGTCTCTTTACAAAGGCAATGAACTAAGATTCGG  
CAAAATAACTCGACTGTTTGGAGAAAAAGCTAAAGTACCACAGGGAGCACAAAGTGCCAC  
CATCAAACCAACTCTATGCACAACTGCAGCTACCACGCCATGTGTGTGTAACAAGAAGGA  
AGAGCAAACCAATCCTGACATGTACTGTCTCCGCTCATACTGGGCCCCACTGGCCGGTGG  
ATGCGGCCTTCTTCTTCTACTCCTCATCATTACCACCCTGTACTGCAATAAAATAAGAAC  
ACGGAGATGCCCCCATCATTACAAAAGAAAGCCGCGGACGATGGCTCCTGGAAAAC

**Figura 3.11:** Sequenza del *CD8 $\alpha$*  utilizzata per la sintesi della sonda per l'ibridazione *in situ*. Sono sottolineati i primers utilizzati per l'amplificazione in PCR.

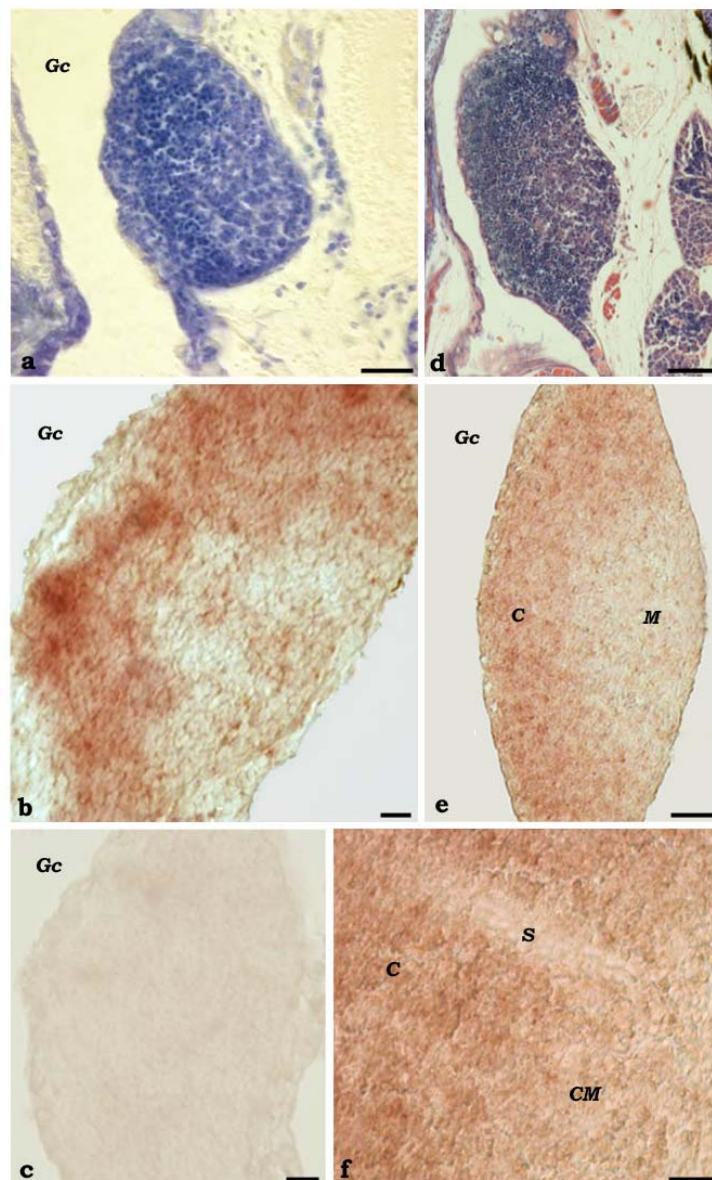
```

CATCCCTCCATGTTGGTCTGCAGCGTCTACGACTTCTTCCCCAAACACATCAGAGTGAGC
TGGCTCAGAGACGGACAGGAAGTCACCTCTGATGTCACTTCCACTGATGAGCTGGCAGAC
GCTGATTGGTTCTACCAGATCCACTCTCACCTGGAGTACACGCCAGGTCTGGAGAGAAG
ATCTCCTGTGTGGTGGAGCACGCCAGCCTGAGAGAACCTCTGGTTACTGACTGGGACCCC
TCCATGCCTGAGTCTGAGAGAAACAAGATCGCCATCGGAGCCTCCGGACTGATCCTGGGT
CTGATCTTGTCTCTGGCTGGATTTCATCTACTACAAGAGGAAGGCCCGAGGAAGGATTCTG
GTTCCCAGTAAC

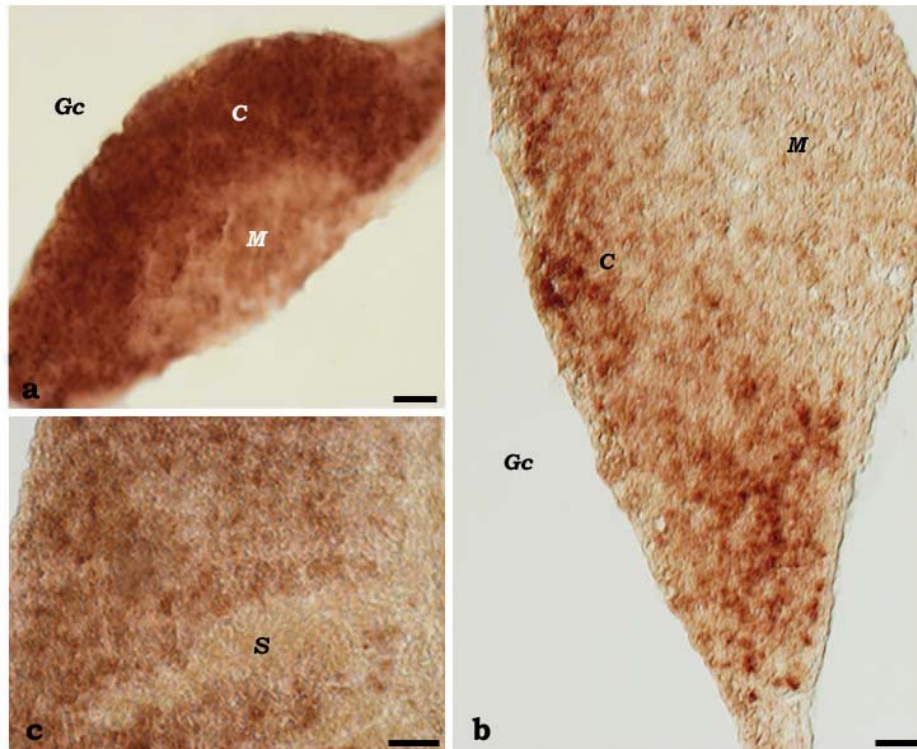
```

**Figura 3.12:** Sequenza del gene *MHCII-β* utilizzata per la sintesi della sonda per l'ibridazione *in situ*. Sono sottolineati i primers utilizzati per l'amplificazione in PCR.

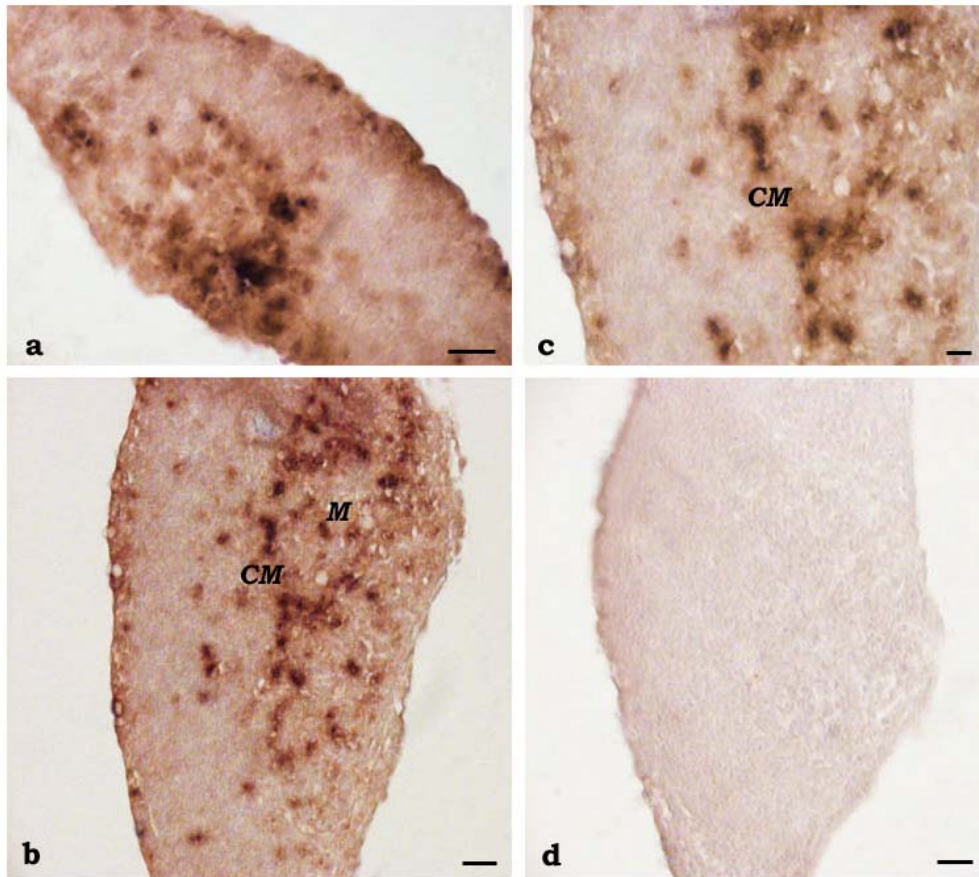
Alla tecnica di ibridazione *in situ* è stata associata un'analisi istologica che ha permesso di osservare che in larve di 51 giorni ph il timo è già ben evidente nella zona dorsale all'interno della cavità branchiale (Fig. 3.13a). Inoltre, a questo stadio, l'organo non presenta evidenti lobature ma il parenchima timico inizia ad essere regionalizzato, infatti la regione timica interna è meno densa di elementi linfoidi rispetto a quella esterna (Fig. 3.13a). Mediante la tecnica di ibridazione *in situ* su sezioni trasversali di larva intera, si osservano, già a questo stadio, diversi gruppi di cellule  $CD8\alpha^+$  e  $TcR\beta^+$  concentrate per lo più nella regione esterna dell'organo (Figg. 3.13b, 3.14a), mentre le cellule  $MHCII-\beta^+$  (Fig. 3.15a) sono principalmente localizzate nel bordo cortico medullare e nella medulla. Al giorno 75 ph, la colorazione Pappenheim mostra che il timo presenta una evidente regionalizzazione tra la regione corticale, rivolta verso la camera branchiale, e la porzione medullare, rivolta verso lo strato connettivale disegnando la suddivisione in cortex e medulla (Fig. 3.13d). A questo stadio le cellule  $CD8\alpha^+$  e  $TcR\beta^+$  sono localizzate nella superficie esterna e laterale dell'organo (Figg. 3.13e, 3.14b), mentre le cellule  $MHCII-\beta^+$  risultano localizzate nella cortex ma principalmente nel bordo cortico medullare e nella medulla (Figg. 3.15b,c). A 92 giorni ph, le numerose cellule  $CD8\alpha^+$  e  $TcR\beta^+$  sono localizzate esclusivamente nella regione corticale e nel bordo cortico-medullare, inoltre il parenchima timico è incapsulato e diviso in lobi da trabecole che risultano prive di marcatura (Figg. 3.13f, 3.14c). I controlli negativi delle reazioni sono stati effettuati utilizzando le sonde senso sia per il *TcRβ* (dato non mostrato), il *CD8α* (Fig. 3.13 c) e per l'*MHCII-β* (Fig. 3.15d).



**Figura 3.13:** Istologia e ibridazione *in situ* del  $CD8\alpha$  durante lo sviluppo timico: 51ph (a-c), 75ph (d-e) e 92 ph (f). a) la colorazione con May-Grünwald/Giemsa (MGG) mostra una prima regionalizzazione del parenchima timico. Barra= 20 $\mu$ m. b) l'espressione del  $CD8\alpha$  è presente nella regione esterna e laterale dell'organo. Barra= 10 $\mu$ m. c) il controllo negativo è stato effettuato con la sonda senso. Barra= 10 $\mu$ m. d) la colorazione MGG mostra una suddivisione del timo in cortex/medulla. Barra= 50 $\mu$ m. e) l'espressione del  $CD8\alpha$  è principalmente concentrata nella regione corticale. Barra= 40 $\mu$ m. f) l'espressione del  $CD8\alpha$  è localizzata nella cortex e nel bordo cortico-medullare (CM). Barra= 20 $\mu$ m. Gc= camera branchiale C= cortex M= medulla CM= bordo cortico-medullare S=setto



**Figura 3.14:** Ibridazione *in situ* del *TcRβ* durante lo sviluppo timico: 51ph (a), 75ph (b) e 92 ph (c). a) l'espressione del *TcRβ* è presente principalmente nella regione esterna e laterale del timo. Barra= 20μm. b) le cellule  $TcR\beta^+$  sono concentrate nella regione corticale. Barra= 20μm. c) le cellule  $TcR\beta^+$  sono localizzate nella cortex e nel bordo cortico-medullare, mentre il setto risulta negativo. Barra= 20μm.  
 GC= camera branchiale C= cortex M= medulla S=setto



**Figura 3.15:** Ibridazione *in situ* dell'*MHCII-β* durante lo sviluppo timico: 51ph (a), 75ph (b-d). a) le cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> sono principalmente localizzate nella regione interna del timo. Barra= 20μm. b) l'espressione dell'*MHCII-β* è presente nella cortex timica e principalmente a livello del bordo cortico-medullare e nella medulla. Barra= 20μm. c) l'ingrandimento evidenzia le cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> localizzate nella giunzione cortico-medullare e nella medulla. Barra= 10μm. d) il controllo negativo è stato effettuato con la sonda senso. Barra= 20μm. C= cortex M= medulla CM= bordo cortico-medullare

## 5. LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE $TcR\beta^+$ , $CD8\alpha^+$ , $CD4^+$ e $MHCII-\beta^+$ E IMMUNONOLocalizzazione DELLE CELLULE EPITELIALI NEL TIMO DI SPIGOLA DI UN ANNO

L'analisi istologica, in spigole di un anno di età, mostra che il timo è incapsulato e diviso in lobi dal tessuto connettivo. Ogni lobulo è suddiviso in una zona periferica, la cortex, nella quale predominano i linfociti e le cellule epiteliali che rappresentano la componente stromale più comune del timo, ed una zona interna, la midollare, caratterizzata da un minor numero di timociti (Fig. 3.16a). I linfociti  $CD8\alpha^+$  sono localizzati nella porzione corticale e cortico-medullare, mentre sono assenti nella regione interna; la marcatura disegna la tipica suddivisione cortex-medulla di ciascun lobulo (Figg. 3.16b,c). In prossimità dei setti che delimitano i lobuli timici si osserva una evidente zona timica che risulta  $CD8\alpha^-$  a cui fa seguito una zona corticale  $CD8\alpha^+$  (Fig. 3.16d). Si osservano inoltre dei cordoni di cellule  $CD8\alpha^+$  che si approfondano nella medullare (Fig. 3.16d). Le cellule epiteliali reticolari presenti nella corticale risultano  $CD8\alpha^-$ , tali cellule si dispongono in lunghi cordoni che si intrecciano ed anastomizzano tra loro formando una rete cellulare tridimensionale nei cui interstizi giacciono i linfociti  $CD8\alpha^+$  (Fig. 3.16d). Anche lo strato di cellule epiteliali limitanti addossate al tessuto connettivo dei setti e della capsula, assenti nella porzione di parenchima timico in diretto contatto con l'epitelio faringeo, risultano  $CD8\alpha^-$  (Fig. 3.16f). L'espressione del  $TcR\beta$  a confronto con quella del  $CD8\alpha$  è in parte sovrapponibile. Infatti le cellule  $TcR\beta^+$  sono principalmente localizzate nella cortex e nella giunzione cortico-medullare (Figg. 3.17a,b), mentre il parenchima corticale in contatto con l'epitelio faringeo e la regione linfoide subcapsulare sono  $TCR\beta^+$  (Figg. 3.17c,e). Inoltre le cellule epiteliali corticali e subcapsulari risultano prive di marcatura come indicano le frecce nella figura 3.17d. Il controllo negativo effettuato utilizzando la sonda senso è mostrato nella figura 3.17f. Come per lo studio di localizzazione degli altri geni, anche la sonda per il  $CD4$  è stata clonata nel plasmide pGEM-T Easy (Promega) e sequenziata per verificare il corretto inserimento della sequenza nucleotidica (Fig. 3.18). Il plasmide è stato utilizzato poi per sintetizzare le sonde senso e antisenso marcate con digossigenina per gli esperimenti di ibridazione *in situ*.

```

GAGAGTGGACCTGTGTGGTGACATATTCTAATAAAGAGAGCAAAGCCAAAATTTCTGT
CACACTTGTGGACCTCACCACAGCTCCTTCACATCTTCAATATACGTCTAAATCCTCGCC
TCTCACCATCCCCTGTTCCACTACCGCCACCTGGGACACAATCAAACTAGGGACATTGA
GGGAGGAAAGTGGGAATTCTTTGCTAAGCCAGGCGGAGTCTAAAATCTAATGCTCCACA
GATGCTCTTCTCCCTCTCTCTGGATCCGCTAAAGTGGACGCCAGACCAAGACAATGAACT
GCGTTATGACCCTAAACTTCAAAATGGAATTCTGTCTTTGAAGAGAAATCAAGGGAAAGA
TGGAGACAGTGGAGACTATGTATGCTCTCTCAAATTTAAAAGTGGTGTAACCTCTGAACAG
GACAGTAACAGTACATGTGCTGCAAAATCACCTCCTCCCCGGGAATAGAGTTAATTTTCAGG
CCAACAGGTCAACCTGACTTGTGATTTGGGCAGTCCGCTGCCCTCTGACCTGCAGCTGAA
ATGGTTCCACCTGGACAATCGTCCCTGCCGTCTCTGAAATCTGACCATCACCCCACTCTG

```

**Figura 3.18:** Sequenza del *CD4* utilizzata per la sintesi della sonda per l'ibridazione *in situ*. Sono sottolineati i primers utilizzati per l'amplificazione in PCR.

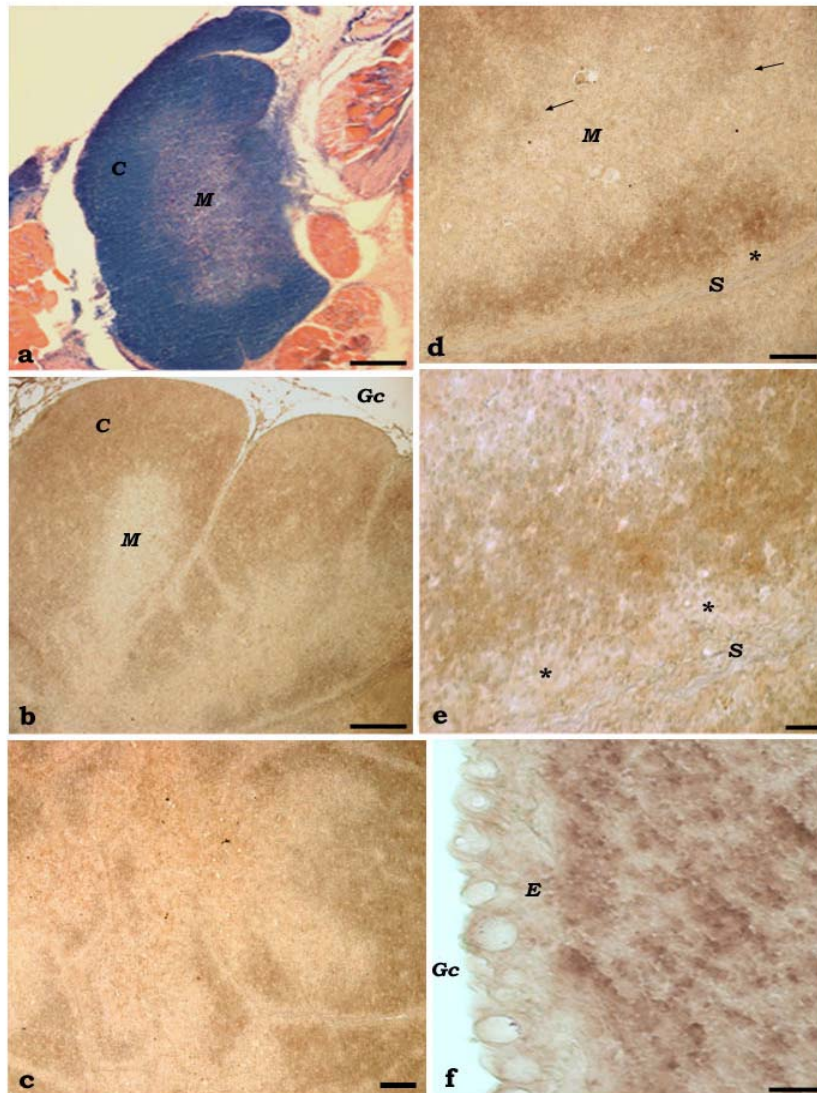
Gli esperimenti con la sonda per il *CD4* hanno evidenziato la presenza di cellule  $CD4^+$  nella regione corticale e cortico-medullare, a delineare una compartimentalizzazione del parenchima (Fig. 3.19a). In prossimità dei setti di tessuto connettivo che delimitano i lobuli timici è possibile osservare una zona subcapsulare  $CD4^-$ , seguita da una regione corticale  $CD4^+$ , (Fig. 3.19b). Il parenchima timico corticale in contatto con l'epitelio faringeo è privo di una regione  $CD4^-$ , mentre le cellule epiteliali reticolari presenti nella corticale risultano  $CD4^-$ . Il controllo negativo ottenuto utilizzando la sonda senso è mostrato in Fig. 3.19c. Come è possibile osservare nella Fig. 3.20 (a,d-b,e), l'espressione del *CD4* è largamente sovrapponibile a quella del *CD8 $\alpha$* ; infatti le cellule  $CD8\alpha^+$  e  $CD4^+$  sono principalmente localizzate nella cortex e nella regione cortico-medullare (Figg. 3.20b,e). Nella cortex, l'analisi quantitativa delle cellule che esprimono il *CD8 $\alpha$*  e il *CD4* ha rivelato una densità significativamente non differente tra le due sottopopolazioni ( $35100 \pm 4413$  e  $31330 \pm 2940$  cells/mm<sup>2</sup>, rispettivamente).

Possiamo, inoltre, osservare che la regione medullare è caratterizzata da una differente distribuzione dei timociti  $CD4^+$  e  $CD8\alpha^+$ : i trascritti per il *CD4* sono presenti come timociti isolati (Fig. 3.20c), mentre i trascritti per il *CD8 $\alpha$*  sono principalmente localizzati in cordoni cellulari che si approfondano nella medulla (Fig. 3.20f). L'analisi quantitativa delle cellule che esprimono il *CD8 $\alpha$*  e il *CD4* non ha rivelato, nella medulla differenze significative ( $3500 \pm 1190$  e  $4200 \pm 804$  cells/mm<sup>2</sup>, rispettivamente).

A questo punto per approfondire lo studio dei meccanismi di selezione dei linfociti T nel timo della spigola e definire il possibile coinvolgimento in tale processo della componente stromale timica, si è proceduto con la localizzazione, mediante ibridazione *in situ* delle

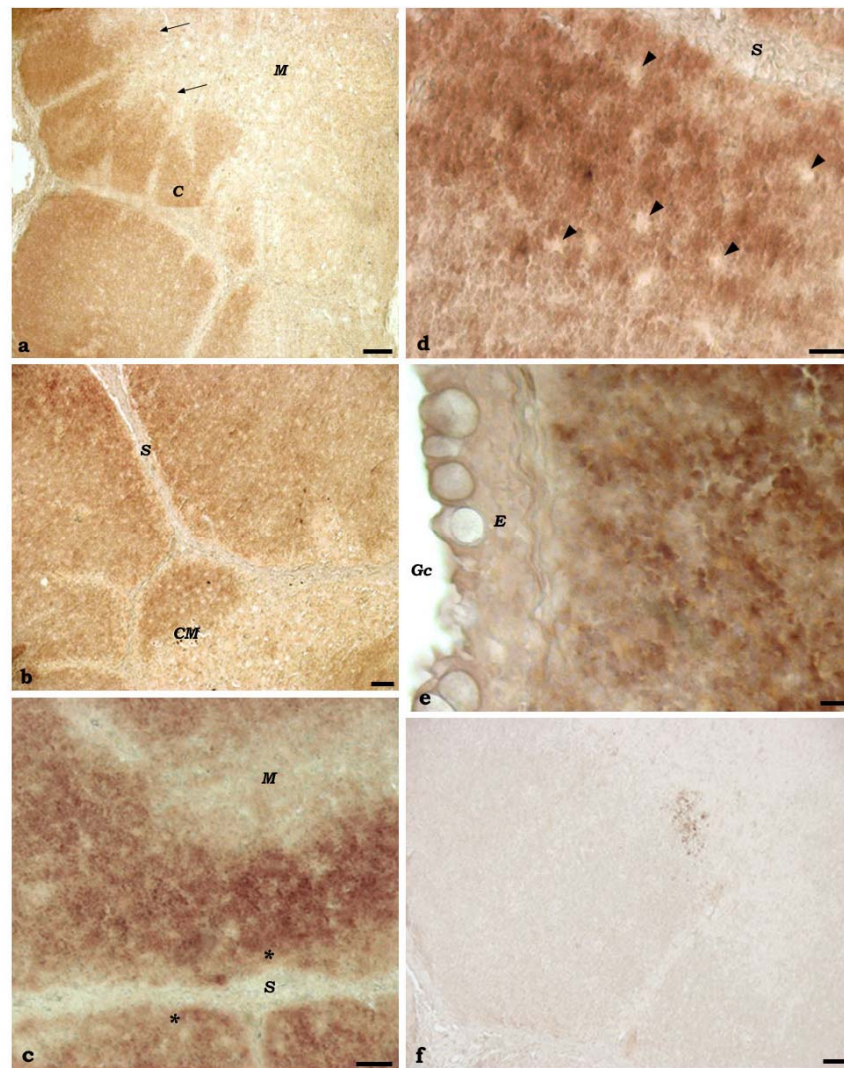
cellule MHCII- $\beta^+$  nel timo di spigola di un anno. I risultati hanno evidenziato la presenza di sparse cellule MHCII- $\beta^+$  localizzate nella cortex timica (Fig. 3.21b). Una maggiore concentrazione di cellule MHCII- $\beta^+$  è stata osservata a livello della giunzione cortico-medullare e nella medulla (Fig. 3.21a,b). Tali cellule mostrano prolungamenti citoplasmatici e un elevato livello di espressione del gene (Figg. 3.22f,l). Il controllo negativo effettuato con la sonda senso è mostrato nella figura 3.21c.

Successivamente, su sezioni di timo adiacenti a quelle utilizzate per l'ibridazione *in situ* con la sonda ad RNA per l'*MHCII- $\beta$*  è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale AE1/AE3 anti-citocheratine umane che marca le cellule epiteliali timiche e cross reagisce con le citocheratine di spigola. I risultati ottenuti hanno permesso di confrontare la distribuzione delle cellule MHCII- $\beta^+$  con quelle CK $^+$  dando una indicazione di quali cellule epiteliali timiche esprimono l'MHCII- $\beta$  e quindi partecipano al processo di selezione timica. L'anticorpo monoclonale anti-citocheratine ha riconosciuto numerose cellule epiteliali reticolari localizzate nella cortex timica alcune delle quali sono risultate MHCII- $\beta^+$  (Figg. 3.22a,f). In aggiunta l'anticorpo ha marcato elementi stromali chiaramente riconducibili a cellule subcapsulari e perivascolari, le quali sono risultati MHCII- $\beta^+$  (Figg. 3.22b,g-c,h). Al contrario le cellule limitanti peritrabecolari chiaramente marcate dal mAb anti-citocheratine sono risultate MHCII-  $\beta^-$  (Figg. 3.22d,i). Una maggiore concentrazione di cellule CK $^+$  è stata osservata nella regione medullare timica la cui localizzazione è risultata in parte sovrapponibile con quella delle cellule MHCII- $\beta^+$  (Figg. 3.22e,l).



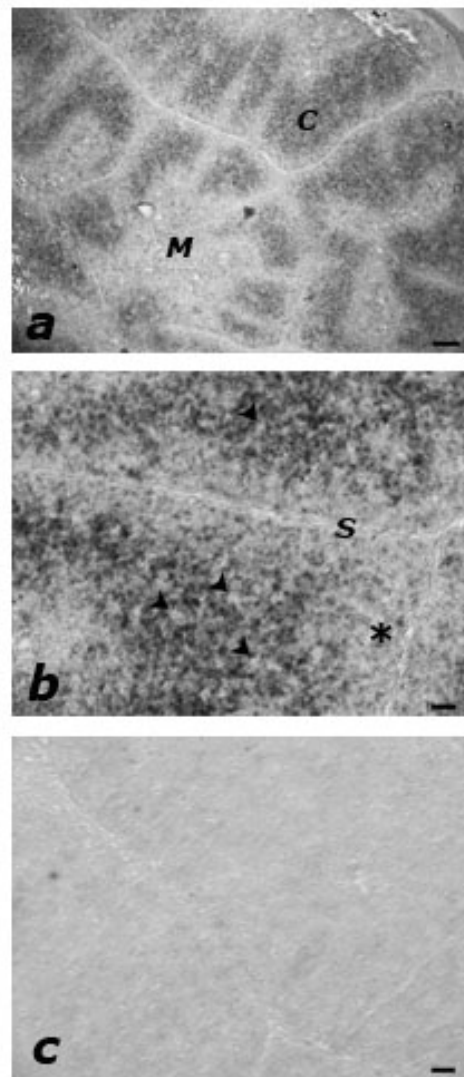
**Figura 3.16:** Istologia e ibridazione in situ del CD8 $\alpha$  nel timo di spigola di 1 anno. a) la colorazione con May-Grünwald/Giemsa (MGG) mostra una chiara regionalizzazione del timo. Barra= 200 $\mu$ m. b) le cellule CD8 $\alpha^+$  sono localizzate nella cortex e nel bordo cortico-medullare di ogni lobo. Barra = 200 $\mu$ m. c) i differenti lobi della porzione centrale del timo mostrano un evidente compartimentalizzazione delle cellule che esprimono il CD8 $\alpha$ . Barra = 100 $\mu$ m. d) larghi cordoni di cellule CD8 $\alpha^+$  si estendono nella medulla, mentre la zona subcapsulare (\*), vicino al setto di tessuto connettivo, è CD8 $\alpha^-$ . Barra= 100 $\mu$ m (S). e) l'ingrandimento mostra un dettaglio della regione subcapsulare (\*) CD8 $\alpha^-$  e la cortex CD8 $\alpha^+$ . Barra = 20 $\mu$ m. f) il parenchima timico corticale in contatto con l'epitelio faringeo è CD8 $\alpha^+$ . Barra = 20 $\mu$ m.

Gc= camera branchiale C= cortex M= medulla S= setto E= epitelio faringeo



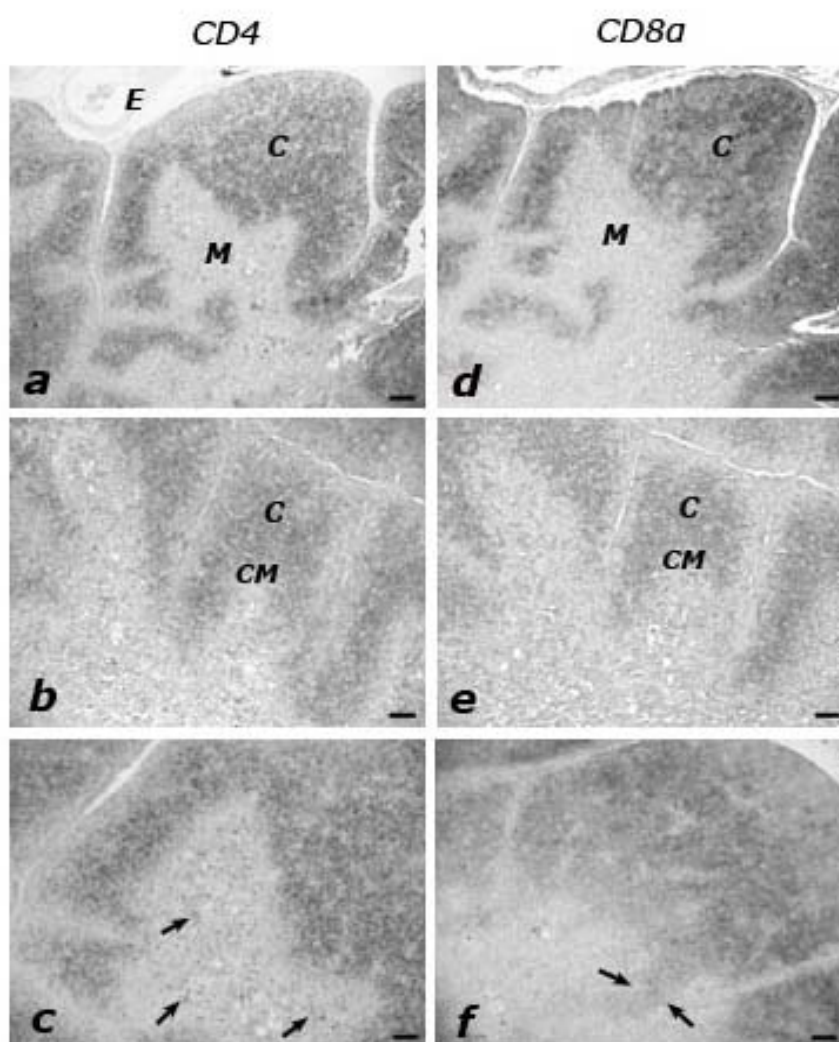
**Figura 3.17:** Ibridazione *in situ* del  $TCR\beta$  nel timo della spigola di 1 anno. a) le cellule  $TCR\beta^+$  sono maggiormente localizzate nella cortex. Barra= 100 $\mu$ m. b) in ogni lobo le cellule  $TCR\beta^+$  sono localizzate nella cortex e nel bordo cortico-medullare (CM). Barra= 50 $\mu$ m. c) l'ingrandimento mostra la zona subcapsulare (\*)  $TCR\beta^+$  vicino al setto di tessuto connettivo (S). Barra = 40 $\mu$ m. d) le cellule epiteliali corticali, indicate con le teste di freccia, sono negative. Barra = 20 $\mu$ m. e) Il parenchima timico a contatto con l'epitelio faringeo è  $TCR\beta^+$  Barra= 10 $\mu$ m. f) controllo negativo effettuato con la sonda senso. Barra = 50 $\mu$ m.

C= cortex M= medulla S= setto E= epitelio faringeo



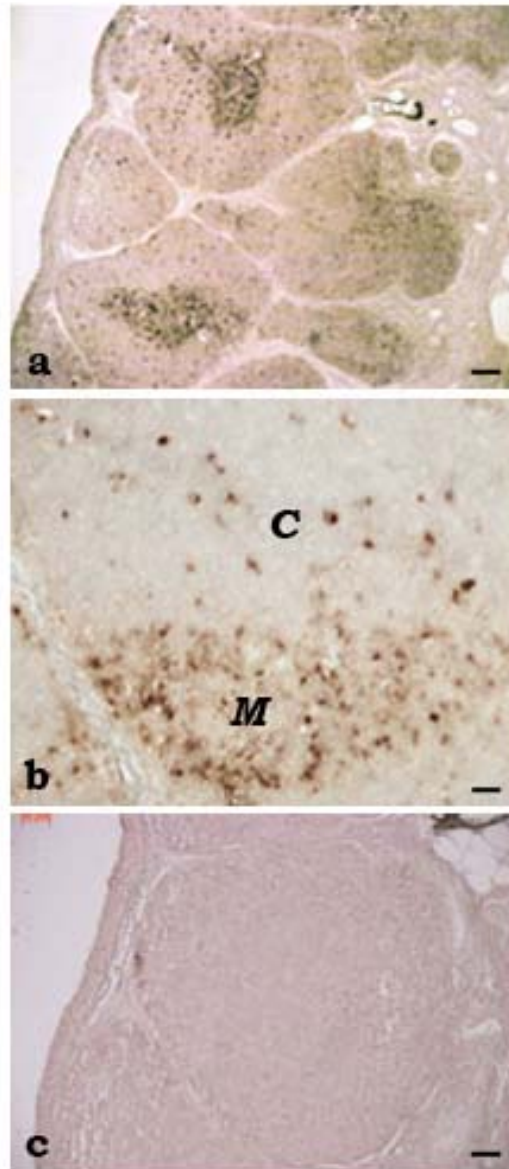
**Figura 3.19:** Ibridazione in situ del CD4 nel timo di spigola di 1 anno. a) le cellule CD4<sup>+</sup> sono localizzate nella cortex e nel bordo cortico medullare. Barra= 100µm. b) vicino al setto (S) di tessuto connettivo è presente una zona subcapsulare (\*) CD4<sup>-</sup>, le frecce indicano le cellule epiteliali corticali negative. Barra= 20µm. c) il controllo negativo è stato effettuato con la sonda senso. Barra= 20µm.

C=cortex M=medulla S=setto

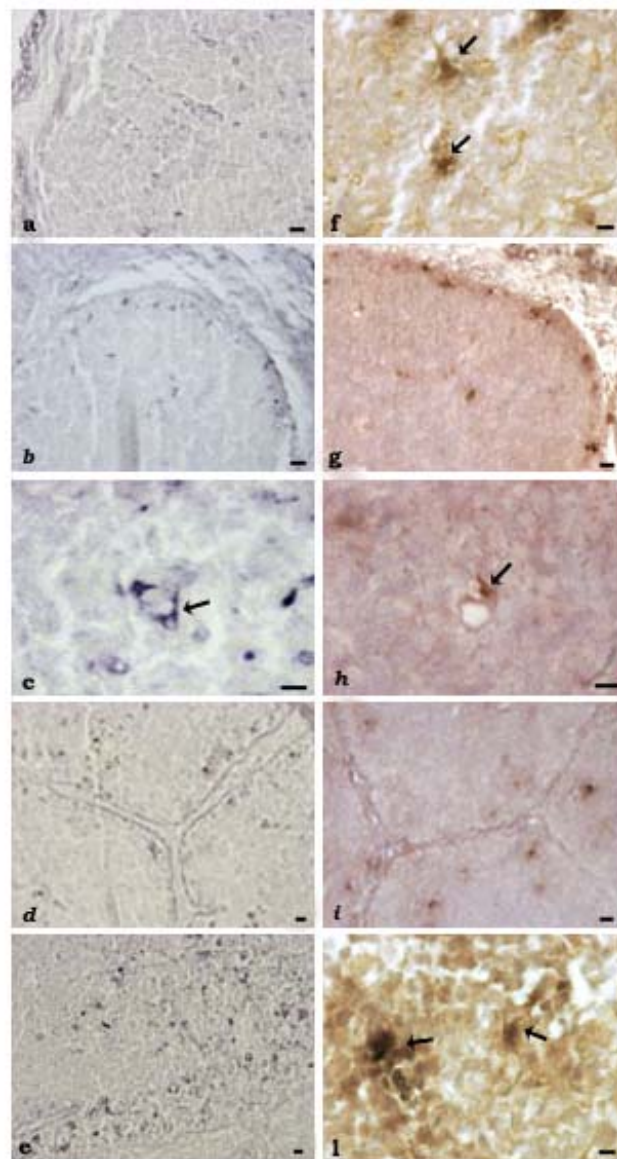


**Figura 3.20:** Ibridazione *in situ* del *CD4* e *CD8a* nel timo di spigola di 1 anno. a) l'immagine mostra una compartimentalizzazione in ogni lobo delle cellule che esprimono il *CD4*. Barra=100 $\mu$ m. b) le cellule *CD4*<sup>+</sup> sono localizzate nella cortex e nel bordo cortico-medullare (CM). Barra= 50 $\mu$ m. c) i timociti *CD4*<sup>+</sup> sono isolati nella medulla. Barra= 50 $\mu$ m. d-e) l'espressione del *CD8a* è sovrapponibile con quella del *CD4*. Barra= 100-50 $\mu$ m. f) i timociti *CD8a*<sup>+</sup> sono arrangiati in cordoni cellulari nella medulla. Barra= 50 $\mu$ m.

*C*= cortex *M*= medulla *S*= setto *E*= epitelio faringeo



**Figura 3.21:** Ibridazione *in situ* dell'*MHCII-β* nel timo di spigola di 1 anno. a) in ogni lobo sono presenti cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> principalmente concentrate nel bordo cortico-medullare e nella medulla. Barra= 100μm. b) dettaglio delle cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> localizzate a livello della giunzione cortico-medullare e nella medulla. Barra= 20μm. c) il controllo negativo è stato effettuato con la sonda senso. Barra= 50μm  
C= cortex M= medulla



**Figura 3.22:** confronto della distribuzione delle cellule MHCII- $\beta^+$  con quelle CK $^+$  su sezioni adiacenti di timo di spigola di 1 anno. a,f) l'anticorpo ha riconosciuto numerose cellule epiteliali reticolari localizzate nella cortex timica, alcune delle quali sono risultate MHCII- $\beta^+$  (freccie in figura f). Barra= 20-5 $\mu$ m . b,g) le cellule subcapsulari e c,h) le cellule perivascolari sono risultate CK $^+$  e MHCII- $\beta^+$ . Barra= 10-10 $\mu$ m; 10-10 $\mu$ m. d,i) mentre le cellule limitanti peritrabecolari, positive al mAb anti-citocheratine, sono risultate MHCII-  $\beta^-$ . Barra=10-5 $\mu$ m. e,l) una maggiore concentrazione di cellule CK $^+$  è stata osservata nella medulla timica la cui distribuzione è risultata in parte sovrapponibile con quella delle cellule MHCII- $\beta^+$  medullari. Barra= 10-5 $\mu$ m.

## 6. STUDIO DELL'ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELL'ACQUISIZIONE DI UN SISTEMA IMMUNITARIO FUNZIONALE NELL'INTESTINO DELLA SPIGOLA

Il tratto gastrointestinale rappresenta il maggior sito d'interfaccia tra l'organismo e l'ambiente esterno e in particolare, nella maggior parte dei Vertebrati, il tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) contiene circa il 60% di tutti i linfociti periferici con lo scopo di difendere la mucosa intestinale dai patogeni esterni.

Tuttavia, mentre nei Mammiferi è stato dimostrato che GALT svolge una funzione primordiale di linfopoiesi e ospita precursori con la potenzialità di differenziarsi in cellule T mucosali, nei pesci non si hanno informazioni precise su origine, selezione e localizzazione delle cellule T intestinali.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti durante il dottorato di ricerca che hanno definito, per la prima volta, nell'intestino di esemplari giovanili di spigola i livelli d'espressione dei geni *TCR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$*  e la localizzazione delle cellule che li esprimono.

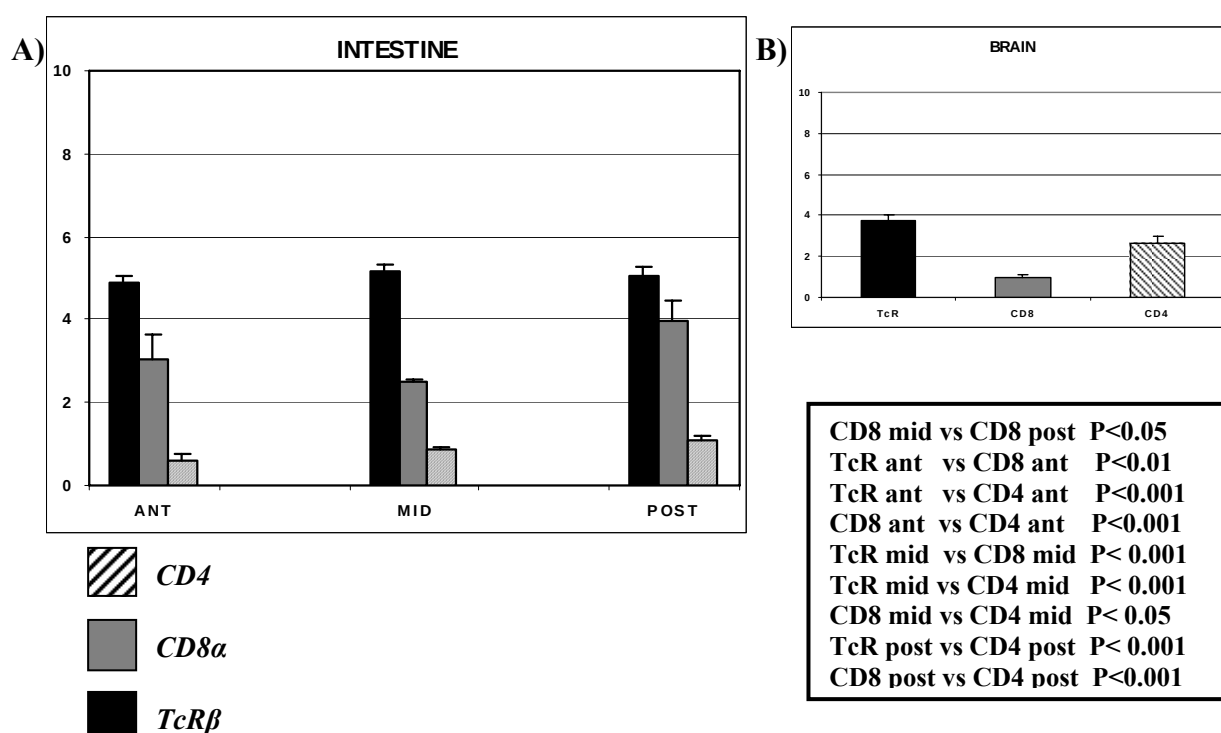
### 6.1 Q-PCR dei trascritti dei geni *Tcr $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* nel GALT di spigola di un anno

Intestini anteriori, medi e posteriori sono stati prelevati da tre esemplari di spigola di 1 anno di età, per effettuare un'analisi dell'espressione genica mediante Q-PCR. La quantificazione è stata realizzata comparando i livelli dei trascritti d'interesse (*TCR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4*) con il livello del trascritto di riferimento (calibratore), in questo caso il *CD8 $\alpha$*  del cervello (Fig. 3.23B). E' stato introdotto un gene normalizzatore ( $\beta$ -actina) per correggere le differenze d'espressione tra i campioni. Per il test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA).

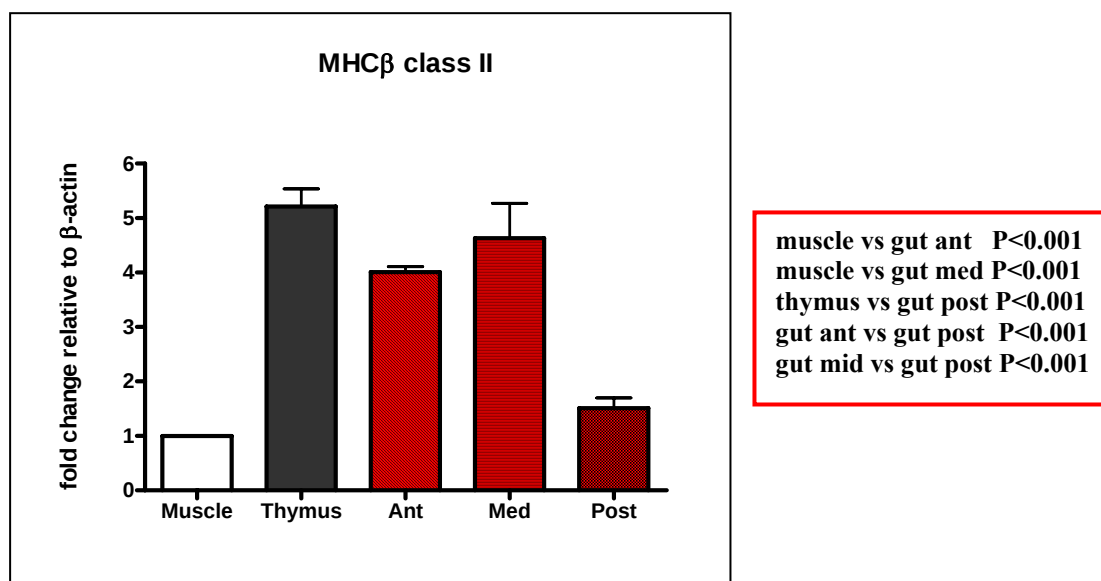
I risultati ottenuti hanno evidenziato che i livelli di espressione del *TCR $\beta$*  e *CD4* non differiscono nelle tre porzioni di intestino, mentre i trascritti per il *CD8 $\alpha$*  aumentano nel segmento posteriore ( $p < 0.05$ ) rispetto al medio (Fig 3.23A). Inoltre, in tutto l'intestino il livello di espressione del *TCR $\beta$*  e del *CD8 $\alpha$*  è risultato significativamente maggiore rispetto al *CD4* (Fig. 3.23A).

Il grafico nella figura 3.24 mostra l'analisi d'espressione dei trascritti per la molecola di *MHCII- $\beta$*  nel timo e nelle tre porzioni di intestino. In questo caso la quantificazione è stata effettuata comparando i livelli dei trascritti dell'*MHCII- $\beta$*  in timo e intestino con quelli nel

muscolo (calibratore). Anche in questo caso per il test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA). L'analisi statistica ha rivelato che l'espressione dell'*MHCII- $\beta$*  nel timo è significativamente maggiore che nell'intestino posteriore ( $P < 0.001$ ), mentre non si hanno differenze significative tra l'espressione nel timo e le porzioni anteriore e medio dell'intestino. Inoltre, l'espressione dell'*MHCII- $\beta$*  è risultata significativamente maggiore nelle porzioni anteriore e medio dell'intestino rispetto all'intestino posteriore ( $P < 0.001$ ).



**Figura 3.23: Q-PCR dei trascritti dei geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  e *CD4* nell'intestino anteriore, medio e posteriore di spigola di un anno relativa ai trascritti della  $\beta$ -actina** L'analisi d'espressione è stata effettuata, per ciascun gene, nelle porzioni anteriore, medio e posteriore di 3 esemplari giovanili di spigola. I risultati numerici sono riportati come media  $\pm$  SD. Per il test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA).



**Figura 3.24:** Q-PCR dei trascritti del gene *MHCII-β* nell'intestino anteriore, medio e posteriore di spigola di un anno relativa ai trascritti della *β-actina*. L'analisi d'espressione è stata effettuata nelle porzioni anteriore, medio e posteriore di 3 esemplari giovanili di spigola. I risultati numerici sono riportati come media  $\pm$  SD. Per il test di significatività è stato scelto il test di Bonferroni, preceduto dall'analisi della varianza ad una coda (ANOVA).

## 6.2 Localizzazione delle cellule $TcR\beta^+$ , $CD8\alpha^+$ , $CD4^+$ e $MHCII-B^+$ nel GALT di spigola di un anno

Esperimenti di ibridazione *in situ* effettuati con le sonde ad RNA per il *CD8α*, *CD4*, *TCRβ* e *MHCII-β* hanno permesso di localizzare l'espressione di questi geni nella mucosa intestinale. La localizzazione è stata effettuata su sezioni di intestino posteriore di esemplari adulti di spigola.

A questo stadio la mucosa intestinale della spigola *Dicentrarchus labrax* (L.), presenta uno strato epiteliale (E) esposto all'ambiente esterno attraverso il lume intestinale (\*) e una lamina propria (LM) a cui fa seguito uno strato muscolare. Tra le cellule epiteliali (Figg. 3.25a,b,e) e nella lamina propria si trovano molti linfociti (freccie in Fig. 3.25b). I linfociti intraepiteliali sono localizzati principalmente in posizione basolaterale e in alcuni casi sopra i nuclei degli enterociti, hanno una forma variabile (quasi regolare, allungata, con corti processi citoplasmatici) (Fig. 3.25c) e presentano un nucleo eterocromatico e un sottile strato di citoplasma (Fig. 3.25d).

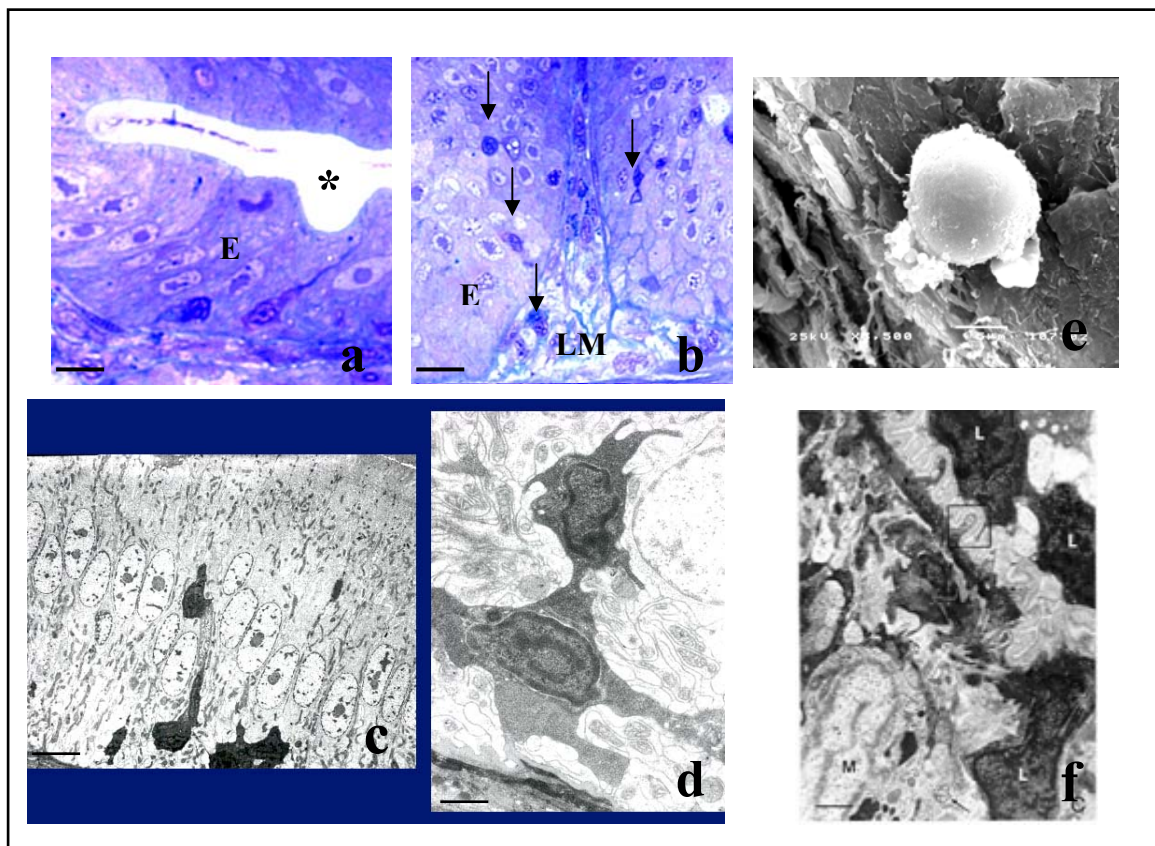
I linfociti nella lamina propria hanno un'ultrastruttura simile a quella dei linfociti intraepiteliali, ma la loro forma è più regolare (rotonda/ovoidale) e alcuni linfociti aderiscono alla lamina basale (Fig. 3.25f).

L'ibridazione *in situ* effettuata con la sonda per il *TCR $\beta$*  ha rivelato la presenza di cellule positive a livello intraepiteliale e nella lamina propria intestinale (Figg. 3.26a,b). Nella figura 3.26f è mostrato il controllo negativo effettuato con la sonda senso.

Ancora più evidente è risultata l'espressione della sonda ad RNA per il *CD8 $\alpha$*  in tutta la mucosa intestinale della spigola (Fig. 3.27a,b). Infatti, sia nell'epitelio che nella lamina propria intestinale è riscontrabile una abbondante marcatura con la presenza di molte cellule *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>* (Fig. 3.27a,b). Inoltre, nella lamina propria si possono osservare alcuni aggregati di cellule *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>* (freccie) (Fig 3.27c). Il controllo negativo, utilizzando la sonda senso, è mostrato nella figura 3.27d.

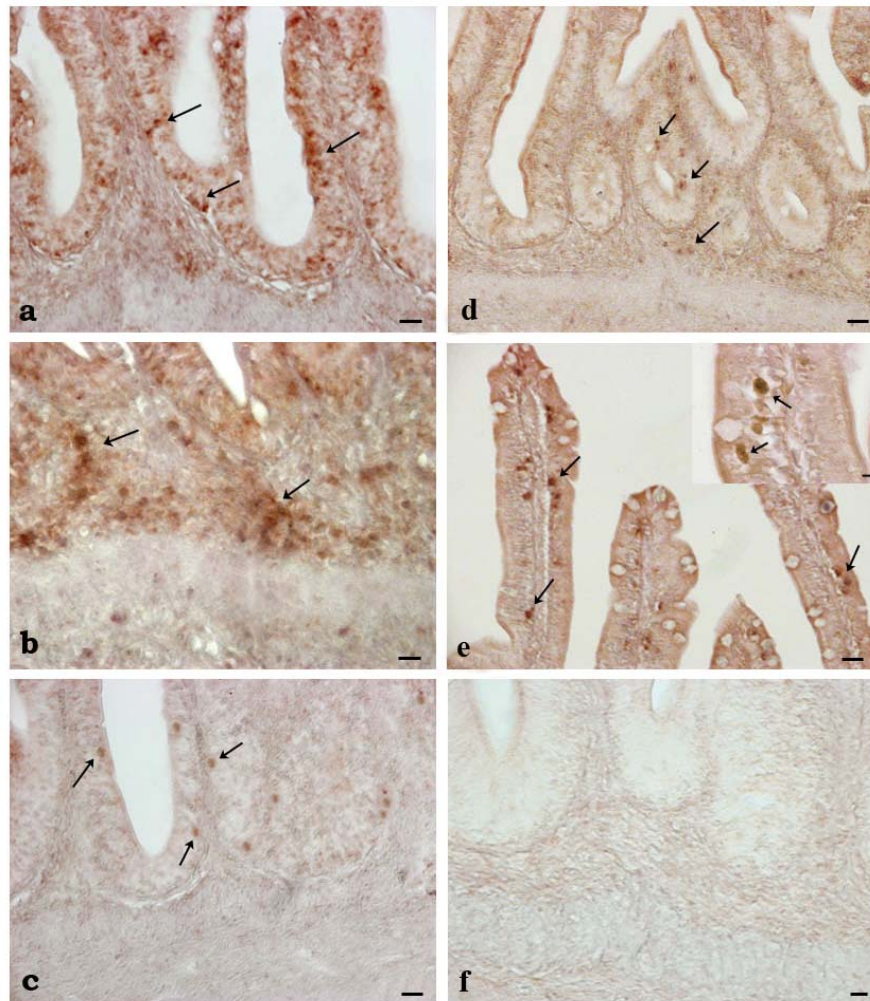
L'ibridazione *in situ* effettuata con la sonda ad RNA per il *CD4* ha mostrato invece la presenza di rare cellule *CD4<sup>+</sup>* sia nell'epitelio che nella lamina propria (Fig. 3.26c).

Infine, gli esperimenti di ibridazione *in situ* effettuati con la sonda per l'*MHCII- $\beta$*  hanno evidenziato la localizzazione di cellule *MHCII- $\beta$ <sup>+</sup>* principalmente nella regione apicale dell'epitelio intestinale (Fig. 3.26e), sebbene nella lamina propria sia possibile osservare una debole marcatura con la presenza di rarissime cellule *MHCII- $\beta$ <sup>+</sup>* (Fig. 3.26d). Inoltre, un maggior ingrandimento, mostrato nella figura 3.26e, evidenzia alcune cellule, risultate positive alla sonda per l'*MHCII- $\beta$* , con caratteristiche morfologiche riconducibili ai granulociti, per la presenza di piccoli granuli citoplasmatici. Le sezioni utilizzate con le sonde senso dei geni *CD4* e *MHCII- $\beta$*  sono risultate prive di marcatura (dato non mostrato).

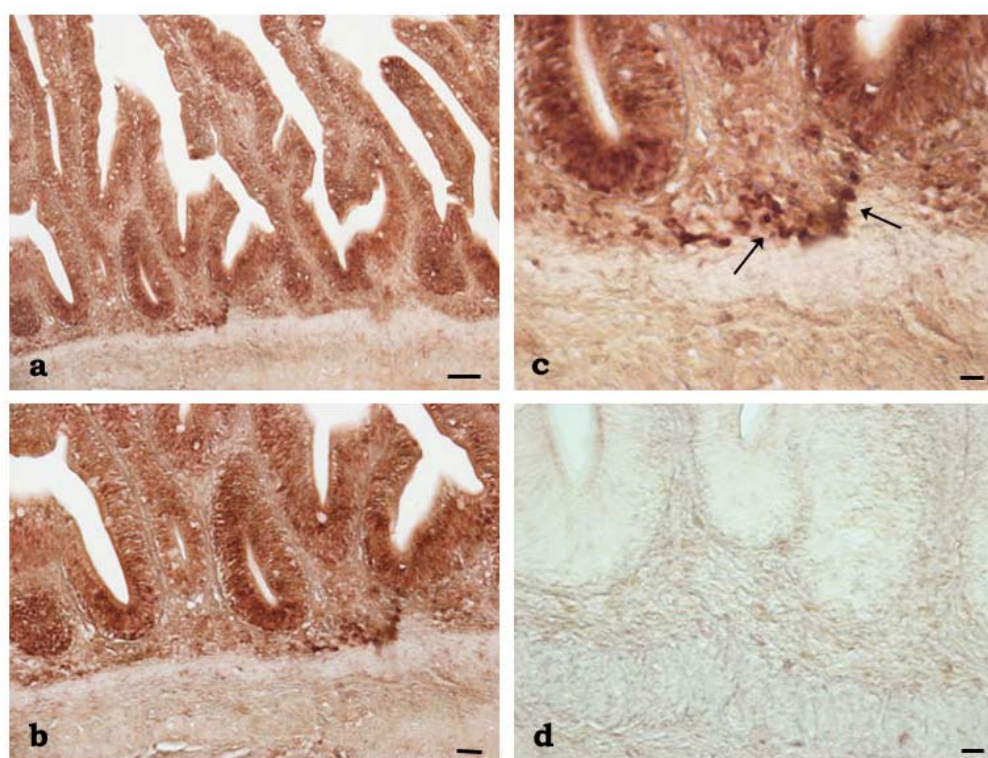


**Figura 3.25: Linfociti del GALT nell'intestino di spigola giovanile.**

(a-b): la mucosa intestinale della spigola presenta uno strato epiteliale (E) esposto all'ambiente esterno attraverso il lume intestinale (\*) e una lamina propria (LM). Tra le cellule epiteliali e nella lamina propria si trovano molti linfociti (freccie). Barra=5-5 $\mu$ m; (c-d): i linfociti intraepiteliali sono localizzati principalmente in posizione basolaterale e in alcuni casi sopra i nuclei degli enterociti, hanno una forma variabile e presentano un nucleo eterocromatico e un sottile strato di citoplasma. Barra= 6-1 $\mu$ m; e): l'immagine al SEM mostra un linfocita infiltrato nell'epitelio. Barra=5 $\mu$ m; f): i linfociti nella lamina propria hanno una forma piú regolare (rotonda/ovoidale) dei linfociti intraepiteliali e alcuni di essi aderiscono alla lamina basale. Barra=1 $\mu$ m



**Figura 3.26:** Ibridazione *in situ* del *TcRβ*, *CD4* e *MHCII-β* nell'intestino posteriore di spigola di 1 anno. a,b) la sonda per il *TcRβ* ha marcato numerose cellule sia nell'epitelio che nella lamina propria. Barra= 20-20μm. c) le cellule *CD4*<sup>+</sup> sono risultate piuttosto rare in tutta la mucosa intestinale. Barra= 20μm. d) anche le cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> sono rare, ma principalmente localizzate nella parte apicale dell'epitelio. e) cellule *MHCII-β*<sup>+</sup>, alcune delle quali presentano caratteristiche morfologiche tipiche dei granulociti. Barra= 20-20μm. f) controllo negativo effettuato con la sonda senso per il *TcRβ*.



**Figura 3.27:** Ibridazione *in situ* del *CD8α* nell'intestino posteriore di spigola di 1 anno. a) la sonda per il *CD8α* ha marcato numerose cellule infiltrate nella mucosa intestinale. Barra= 50μm. b) le cellule *CD8α*<sup>+</sup> sono localizzate sia nell'epitelio che nella lamina propria. Barra= 20μm. c) in particolare nella lamina propria sono presenti aggregati di cellule *CD8α*<sup>+</sup>. Barra= 10μm. d) il controllo negativo è stato effettuato con la sonda senso. Barra= 10μm

## CAPITOLO IV

### DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni, gli studi riguardanti l'immunologia dei pesci hanno avuto un notevole sviluppo, derivato sia dall'interesse per l'analisi di filogenesi sia per il controllo delle patologie, considerata l'importanza crescente assunta dalle pratiche di acquicoltura e l'elevato valore economico di alcune specie allevate. In particolare, lo studio dell'ontogenesi del sistema immunitario dei pesci ha permesso di acquisire nuove conoscenze sullo sviluppo di un sistema immunitario funzionale. Infatti, la conoscenza della sequenza di sviluppo delle funzioni immunitarie è fondamentale per progettare misure preventive per combattere le malattie infettive che colpiscono l'acquicoltura. Diversamente da altri Vertebrati, la maggior parte dei pesci schiude ad uno stadio di vita embrionale e, di conseguenza, già in questa fase, essi devono difendersi da una varietà di microrganismi che vivono nell'ambiente acquatico. E' ormai diffusamente accettato che l'immunità acquisita, nei pesci, non è ancora funzionale al momento della schiusa, per cui, per un periodo piuttosto lungo le larve sono facilmente esposte a malattie infettive poiché protette solo dal sistema immunitario innato. Molte delle attuali conoscenze sull'ontogenesi del sistema immunitario dei Teleostei derivano da studi sul pesce zebra, che è considerato un eccellente modello di studio in questo settore per la semplice manipolazione dei suoi embrioni, per la disposizione di molti markers genetici e per la conoscenza della sua sequenza genomica.

Tuttavia, nonostante i numerosi studi compiuti anche in altri Teleostei, al momento domande basilari quali l'identificazione dei primi siti linfo-ematopoietici, l'origine delle cellule B e T e l'acquisizione delle piene capacità immuni non hanno ancora avuto una risposta definitiva (Zapata et al., 2006).

La specie usata in questa tesi di dottorato come modello sperimentale è stata la spigola, *Dicentrarchus labrax* (L.), che rappresenta una delle specie più allevate in Italia e nei paesi del Mediterraneo (Francia, Spagna, Portogallo, Turchia, Grecia) e quindi lo studio del suo sistema immunitario riveste un particolare interesse economico. Il sistema immunitario della spigola riflette l'organizzazione generalmente descritta in altre specie di pesci Teleostei (Zapata et al., 1996). Anticorpi monoclonali (Mabs) che riconoscono i determinanti antigenici espressi dalle cellule T e i Mabs anti-Ig (Scapigliati et al., 1996) sono stati impiegati per analizzare l'ontogenesi, la distribuzione tissutale e la citologia fine

dei linfociti (Abelli et al., 1996, 1997, 1999; Romano et al., 1997; Scapigliati et al., 1999) e hanno indicato la comparsa precoce di cellule T nel timo e nella mucosa intestinale della spigola (Picchietti et al., 1997), suggerendo l'ipotesi che anche nei Teleostei possano esistere sedi di differenziamento extratimico delle cellule T (Poussier et al., 1993; Lefrancois e Puddington, 1995; Rocha et al., 1995). Inoltre tre Mabs anti-Ig, selezionati (WDI 1-3) in base a criteri quali ELISA, Wester blot, IIF e analisi citometrica (Dos Santos et al., 1997), sono stati impiegati in tecniche di immunogold ed hanno mostrato specificità per sottopopolazioni di cellule linfatiche (cellule B, plasmacellule e macrofagi) sia nel PBL che nei tessuti linfatici (Dos Santo set al., 1997; Romano et al., 1997). Solo recentemente è stata definita la distribuzione di linfociti T  $TcR\beta^+$  in spigole adulte attraverso tecniche di ibridazione *in situ* consentendo un approfondimento della conoscenza dei rapporti esistenti tra le diverse sottopopolazioni linfocitarie (Romano et al., 2007).

L'attività di ricerca svolta durante il mio dottorato ha permesso di ampliare le conoscenze relative all'ontogenesi del sistema immunitario della spigola, definendo per la prima volta, in questa specie, la prima espressione di geni coinvolti nello sviluppo di un sistema immunitario funzionale. Inoltre, questo lavoro ha fornito un contributo alla conoscenza dello sviluppo maturativo e selettivo dei linfociti T nel timo e nell'intestino, importanti organi linfoidi nei Teleostei.

### ***Il sistema immunitario nella spigola in sviluppo: analisi d'espressione genica e studi di ibridazione in situ.***

Gli esperimenti di RT-PCR condotti durante lo sviluppo della spigola hanno definito per la prima volta, in questa specie, l'espressione del *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* . Tali geni, come è noto nei Mammiferi, e rispettivamente il recettore dei linfociti T per l'antigene (*TcR $\beta$* ), il corecettore dei linfociti T citotossici (*CD8 $\alpha$* ), il corecettore dei linfociti T helper (*CD4*), e il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe II (*MHCII*), sono dei geni chiave per lo sviluppo e la selezione dei timociti.

La formazione di un *TcR* funzionale (specifico e non autoreattivo) è l'evento centrale nello sviluppo dei linfociti T (Marrak e Kappler, 1998). Nei Mammiferi il *TcR* è un eterodimero costituito da catene  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$  che sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF) ed è presente in tutti i Vertebrati mandibolati, mentre appare assente nei pesci privi di mandibola (Klausner et al., 1990). Ogni catena possiede un dominio variabile (V) ed uno costante (C) (Lefranc e Lefranc, 2001).

Le cellule T sono attivate quando il *TcR* ( $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$ ), in combinazione con il complesso CD3, riconosce in maniera specifica un antigene esterno (Ag). Il *TcR*  $\alpha/\beta$  riconosce un Ag processato come un peptide presentato dall'MHC che è espresso sulle cellule presentanti l'antigene (APC), mentre il *TcR*  $\gamma/\delta$  non è ristretto per le molecole di MHC e sembra che riconosca l'antigene con un processo diretto, in maniera simile alle *Ig* (Chien et al., 1996). Il *TcR* dei Mammiferi non potrebbe funzionare se non associato con uno dei suoi due corecettori: il *CD4*, presente sui linfociti T helper, il cui ruolo è quello di stabilizzare il legame *TcR-MHCII*; il *CD8*, presente sui linfociti T citotossici, che ha la funzione di stabilizzare il legame *TcR-MHCI* (Roitt et al., 1993).

Attualmente, nella spigola è nota la sequenza sia della catena  $\beta$  del *TcR* (Scapigliati et al., 2000) che quella  $\alpha$  (accession number: AY831387). I risultati ottenuti dalla PCR semiquantitativa hanno evidenziato una precoce espressione del *TcR $\beta$*  durante l'ontogenesi della spigola, ossia a 25 giorni dopo la schiusa (ph), a conferma dei dati ottenuti in altre specie di Teleostei. Nelle larve di trota (*Oncorhynchus mykiss*), in cui il timo sviluppa più velocemente rispetto alla spigola, l'RT-PCR ha rivelato l'espressione del *TcR $\beta$*  da 2 settimane post-fertilizzazione (pf) (Fischer et al., 2005). Hansen e Zapata (1998) hanno riportato la presenza nella trota di trascritti da circa 15 giorni dopo la fertilizzazione, in accordo con il precoce sviluppo del timo. Uno studio recente ha mostrato che il timo è il primo organo nei Teleostei a diventare linfoide (Botham e Manning 1981; Padros e Crespo 1996; Schroder et al., 1998; Lam et al., 2002), mentre il rene può contenere precursori ematopoietici prima del timo ma non linfociti (Zapata et al., 2006). Nel presente lavoro si è potuto osservare la colonizzazione linfoide del timo a 25 giorni ph, quindi ad uno stadio di sviluppo coincidente con la prima espressione del *TcR $\beta$* . Un precedente studio, condotto su spigole allevate a  $14 \pm 1$  °C, ha mostrato che il timo inizia ad essere evidenziabile come abbozzo pari sulla porzione dorso-caudale di entrambe le camere branchiali al di sopra del II-IV arco branchiale, intorno al 27° giorno dopo la schiusa. A questo stadio il timo è per lo più costituito da cellule linfoidi raggruppate in intima associazione con l'epitelio faringeo, che come un sottile monostrato separa l'abbozzo del timo dall'ambiente esterno (Abelli et al., 1994).

Sia la sequenza della catena  $\alpha$  del *CD8* che quella del *CD4* sono state caratterizzate più recentemente nella spigola (Buonocore et al., 2006; 2008) e la loro prima espressione durante l'ontogenesi è stata rilevata, nel presente lavoro, a 51 giorni ph, quando il timo è già ben sviluppato e caratterizzato da una distinta composizione linfoide, il cui sviluppo, differenziamento e selezione è dipendente dall'interazione con lo stroma timico e con

molecole secrete (Zapata et al., 1997). A differenza di questi risultati, un recente studio condotto in larve di trota ha evidenziato la presenza di trascritti per il *CD8 $\alpha$*  ad 1 settimana pf, quindi sette giorni prima dell'inizio dello sviluppo timico e dell'espressione del *TcR $\beta$*  (Fischer et al., 2005). La precoce espressione durante l'ontogenesi sia del *TcR $\beta$*  che del *CD8 $\alpha$*  può essere spiegata considerando la presenza di trascritti sterili e aberranti, come viene riportato in molti casi tra i Teleostei (Lam et al., 2004) o ipotizzando che entrambe le molecole possano avere una funzione nell'ontogenesi precoce, antecedente alla formazione degli organi linfoidei (Fischer et al., 2005). Non ci sono comunque studi relativi ad altre specie che mostrino l'espressione del *CD8* e del *CD4* antecedente la formazione del timo. Studi sui Mammiferi mostrano, infatti, che entrambe i geni non sono espressi fino al momento della comparsa del timo (Maddox et al., 1987). Nel topo, è stato dimostrato che dal 15° giorno di sviluppo fetale inizia la vascolarizzazione del timo, evento che segna l'ingresso dei precursori linfoidei che andranno incontro ad un successivo differenziamento (Fairchild e Waldmann, 2000) in linfociti *CD8<sup>+</sup>* e *CD4<sup>+</sup>*, i quali aumentano numericamente nei giorni immediatamente seguenti, sebbene con diverse cinetiche di sviluppo (Xiao et al., 2003). Anche nello *Xenopus* le prime cellule *CD8<sup>+</sup>*, evidenziate mediante analisi citofluorimetrica, sono timociti di larve di 12 giorni pf (Gravenor et al., 1995).

La tecnica della PCR semiquantitativa è stata utilizzata per lo studio dell'espressione di un altro gene importante coinvolto nel meccanismo di risposta immunitaria agli antigeni proteici, ossia la catena  $\beta$  dell'*MHCII*. Nei Mammiferi, le proteine del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*MHCI* e *II*) sono codificate da una regione di geni altamente polimorfici i cui prodotti sono presenti sulla membrana di una grande varietà di cellule (Rodrigues, 1995). Il ruolo principale dell'*MHC* è quello di presentare l'antigene ai linfociti T (Campbell e Trodwaile, 1993). Inoltre nei Mammiferi le molecole *MHC* giocano un ruolo centrale nel processo di selezione e maturazione timica: l'interazione del *TcR* con l'*MHC* ha il ruolo di salvare i cloni di cellule T da inevitabile apoptosi, dovuta al processo di selezione positiva (Jameson et al., 1994; Turka et al., 1991). Da tempo i geni *MHC* sono stati completamente o parzialmente clonati e sequenziati in più di trenta specie di pesci Teleostei, dimostrando il loro polimorfismo e la variabilità del numero di copie geniche (fino a 17 in alcune specie) (Persson et al., 1999; Dixon e Stet, 2001). In particolare l'*MHC* di classe II è un eterodimero costituito da una catena  $\alpha$  e una catena  $\beta$ , espresse sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APCs) ed è responsabile della presentazione di antigeni esogeni ai linfociti T *CD4<sup>+</sup>* (Cuesta et al., 2005b). Nella spigola è stata

recentemente clonata la catena  $\beta$  dell'*MHCII* e in particolare sono presenti in banca dati sei sequenze di cDNA (definite come Dila-DAB) (Buonocore et al., 2007).

In questo studio, la prima espressione della catena  $\beta$  dell'*MHCII* è stata rilevata molto precocemente nella spigola, a 4 giorni ph. La precoce espressione delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  dell'*MHCII* è stata trovata anche in embrioni di carpa (1 giorno pf), in cui i livelli dei trascritti aumentano fino al momento della schiusa (terzo giorno pf) (Rodrigues et al., 1998) e nella trota, in cui i primi trascritti compaiono ad una settimana ph (Fischer et al., 2005). La presenza di trascritti per l'*MHCII* in larve ancora prive di organi linfomieloidi può far supporre un ruolo di questa molecola nei precoci meccanismi ontogenetici.

Livelli crescenti di mRNA per i geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$*  sono stati osservati in RT-PCR nei successivi stadi campionati, fino a raggiungere, in esemplari di 92 giorni ph, un'espressione paragonabile a quella del timo dell'adulto. Questi risultati sono stati avvalorati da quelli ottenuti con la PCR quantitativa, che hanno mostrato, per tutti i geni studiati, un andamento crescente dell'espressione durante lo sviluppo della spigola. In particolare, il livello dei trascritti per il *TcR $\beta$*  e *MHCII- $\beta$*  aumentano significativamente dallo stadio di 16 e 25 giorni ph rispettivamente fino allo stadio di 92 giorni ph, i trascritti per il *CD4* raggiungono a 92 giorni ph un livello di espressione significativamente differente dallo stadio di 25 e 51 ph, mentre l'espressione del *CD8 $\alpha$*  a 92 giorni ph è significativamente differente da tutti i precedenti stadi analizzati. Tali risultati suggeriscono che gli eventi chiave coinvolti nella maturazione e selezione di linfociti T possano avvenire, quindi, entro una finestra temporale compresa tra i 51 e 92 giorni ph.

Gli esperimenti di ibridazione *in situ* effettuati con l'mRNA per il *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  e *MHCII- $\beta$*  in sezioni di timo di esemplari di 51, 75 e 92 giorni ph hanno permesso di approfondire la conoscenza dei processi di maturazione e selezione dei linfociti T durante lo sviluppo timico.

In larve di 51 giorni ph, il primo stadio in cui è stata individuata l'espressione del *CD8 $\alpha$*  tramite RT-PCR, il timo non presenta evidenti lobature ma il parenchima timico inizia ad essere regionalizzato, infatti, la regione interna è meno densa di elementi linfoidei rispetto a quella esterna. A questo stadio, le cellule *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>* e *TcR $\beta$ <sup>+</sup>* sono localizzate per lo più nella regione esterna dell'organo in accordo con i dati ottenuti in un precedente lavoro (Romano et al., 2007), in cui già dal giorno 41 pf nel parenchima timico sono evidenziabili cellule *TcR $\beta$ <sup>+</sup>* concentrate per lo più nella regione esterna dell'organo. La distribuzione delle cellule *MHCII- $\beta$ <sup>+</sup>*, principalmente localizzate nel bordo cortico medullare e nella medulla, ha ulteriormente confermato la presenza di una regionalizzazione timica avvalorando

l'ipotesi che già a questo stadio possano svolgersi i processi selettivi e maturativi dei linfociti T.

A 75 giorni ph il timo presenta un'evidente distinzione tra la regione corticale, rivolta verso la camera branchiale, e la porzione medullare, rivolta verso lo strato connettivale.

Le cellule  $CD8\alpha^+$  e  $TcR\beta^+$  sono localizzate nella cortex e nella giunzione cortico-medullare, mentre alcune cellule  $MHCII-\beta^+$  sono presenti nella cortex e principalmente nel bordo cortico medullare e nella medulla. Questa distribuzione definisce una suddivisione dell'organo tipo cortex-medulla, che diventa sempre più evidente da questo stadio fino al successivo di 92 giorni ph, in cui l'organizzazione del parenchima timico riflette quella del timo adulto. Una precedente ricerca in spigola ha evidenziato distinzioni tra cortex e medulla mediante, sia studi istologici (differente densità e grandezza delle cellule linfoidi), sia d'immunoistochimica con l'anticorpo monoclonale DLT15 (Abelli et al., 1996). Inoltre, una organizzazione funzionale simile del timo è supportata da studi effettuati in altri Teleostei. Nella carpa, l'ibridazione *in situ* del gene *rag* e l'analisi in immunoistochimica dei timociti (con l'anticorpo monoclonale WCL9) hanno distinto nel timo, da approssimativamente 7 giorni pf, un'area  $rag-1^+/WCL9^+$  e un'area  $rag-1^-/WCL9^-$ , il che riflette la presenza di una organizzazione di tipo cortex-medulla (Huttenhues et al., 2005). Anche in zebrafish iniziano a stabilirsi durante lo sviluppo timico una cortex  $rag-1^+$  e una medulla  $rag-1^-$  (Danilova et al., 2004). La regionalizzazione timica osservata in queste diverse specie di Teleostei può essere associata, probabilmente, ad una compartimentalizzazione funzionale. Questa ipotesi è supportata anche da studi di localizzazione di *MHC* di classe I e II nel timo della trota, in cui la distribuzione di queste molecole, durante l'ontogenesi, è risultata simile a quella dei Mammiferi, avvalorando quindi una funzione di questi geni nella selezione timica delle cellule T (Fischer et al., 2005). Nei Mammiferi, infatti, durante la migrazione dalla zona subcapsulare alla medulla, i timociti doppio positivi sono indotti dall'*MHC* I e II a differenziarsi rispettivamente in CD8 e CD4 singoli positivi (Ladi et al 2006). Nella spigola, le uniche evidenze di selezione timica precedenti a questo studio emergono da un lavoro di Abelli et al. (1998) in cui è stato mostrato che il processo di selezione negativa inizia a 35 giorni ph ed è localizzato sotto l'epitelio faringeo e successivamente si concentra nel bordo cortico-medullare (Abelli et al., 1998).

***Differenziamento dei timociti nella spigola: ipotesi di selezione positiva.***

Nei Mammiferi, durante lo sviluppo timico, i progenitori delle cellule T entrano nel timo dal torrente circolatorio e vanno incontro ad una serie di eventi di migrazione, proliferazione e differenziamento per poi tornare in circolazione come cellule T mature. Ogni fase di maturazione avviene in una precisa regione del timo e comporta delle interazioni con cellule timiche specializzate (Ladi et al 2006). Nei Teleostei, nonostante siano stati fatti dei progressi nella comprensione del microambiente timico, non si hanno informazioni riguardo al processo di selezione positiva dei timociti, un evento cruciale nello sviluppo di un sistema immunitario funzionale in tutti i Vertebrati.

L'analisi d'espressione quantitativa dei geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$*  e *CD4*, effettuata nel timo di spigole di un anno, ha fornito un primo contributo alla comprensione dei processi di differenziamento dei timociti nei Teleostei. L'analisi ha rivelato un elevato livello dei trascritti del *TcR $\beta$*  e *CD8 $\alpha$* , il cui confronto non è risultato significativamente differente, mentre il livello d'espressione del *CD4* è risultato significativamente minore rispetto al livello di espressione del *TcR  $\beta$*  ( $p < 0.05$ ).

Questi risultati possono essere interpretati considerando che: 1) a livello timico ci sia un maggior numero di timociti *TcR $\beta$ <sup>+</sup>*, che includono i doppio negativi (DN), doppio positivi (DP) e linfociti singolo positivi (SP), rispetto alla sottopopolazione dei *CD4<sup>+</sup>* 2) una frazione dei timociti *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>* possa esprimere differenti catene di *TcR* (probabilmente  $\gamma\delta$ ) 3) nel timo ci sia un più elevato numero di molecole di mRNA del *CD8 $\alpha$*  in ogni cellula rispetto ai trascritti per il *CD4*.

I successivi esperimenti di ibridazione *in situ* hanno fornito nuove informazioni riguardo alla compartimentalizzazione funzionale del timo della spigola, evidenziata dall'elevata espressione dei geni *CD4* e *CD8 $\alpha$*  nella cortex e nel bordo cortico-medullare.

Il timo di spigole di un anno si presenta avvolto da una capsula connettivale fibrosa dalla quale si staccano sepimenti che lo suddividono in lobi. Le molte lobature rendono impossibile la semplice divisione in medulla interna e cortex esterna, le quali si organizzano all'interno di ciascun lobo. I linfociti positivi per il *CD8 $\alpha$* , il *CD4* e il *TcR $\beta$*  sono localizzati prevalentemente nella porzione corticale e cortico-medullare. La prevalenza nella cortex delle cellule doppio positive (DP) *CD4<sup>+</sup>* e *CD8<sup>+</sup>* è stata dimostrata dalla presenza in questa regione di una densità quasi uguale delle cellule che esprimono il *CD4* e il *CD8 $\alpha$* . Inoltre, i timociti *CD4<sup>+</sup>* e *CD8<sup>+</sup>* sono risultati significativamente meno numerosi nella medulla rispetto alla cortex ( $P < 0.001$ ). Nella medulla, il numero dei timociti *CD4<sup>+</sup>* e *CD8<sup>+</sup>* è risultato significativamente non differente, tuttavia è stata osservata una

differente distribuzione tra le due popolazioni, infatti, mentre i timociti  $CD4^+$  sono presenti come cellule isolate nella medulla, i timociti  $CD8\alpha^+$  sono arrangiati in cordoni cellulari. Un'altra importante osservazione riguarda la presenza, in prossimità dei setti che delimitano i lobi timici, di una zona subcapsulare risultata  $CD8\alpha^-$  e  $CD4^-$  ma  $TcR\beta$  positiva. Questa distribuzione appare particolarmente interessante poiché suggerisce che la modalità di selezione timica, ormai nota nei Mammiferi, potrebbe essere valida anche nei Teleostei. Nei Mammiferi, la maturazione dei timociti è un processo dinamico che coinvolge il lavoro coordinato di diverse molecole, tra cui le chemochine, che guidano il movimento dei timociti durante le fasi di sviluppo. Le cellule che migrano nel timo sono completamente immature e per questo vengono definite pro-T: esse non esprimono né il  $TcR$ , né il  $CD4$  né il  $CD8$  (Ladi et al., 2006). Migrando verso l'interno, le cellule pro-T iniziano ad esprimere il  $TcR\beta$  e per questo sono definite “doppio negative” (DN) ( $TcR\beta^+$ ,  $CD8^-$   $CD4^-$ ; stadio pre-T); esse sono ritrovabili a livello del seno subcapsulare del timo (Ladi et al., 2006). Dalla regione subcapsulare, i timociti migrano nella zona corticale e l'attraversano. E' in tale percorso che, nei Mammiferi, si verifica la maggior parte dei fenomeni successivi di maturazione: i timociti ( $TcR\beta$ ) diventano prima sia  $CD4^+$  che  $CD8^+$  (timociti doppio positivi), poi vanno incontro a selezione positiva nella zona corticale, differenziandosi in singoli positivi  $CD8^+$  o  $CD4^+$ . Inoltre, la selezione negativa è confinata nella zona medullare (Ladi et al., 2006). Confrontando i risultati ottenuti con quelli nei Mammiferi si può supporre che le cellule pre-T (DN) siano localizzate nella spigola nella striscia di parenchima timico subcapsulare, risultata positiva alla sonda per il  $TcR\beta$  ma negativa alla sonda per il  $CD8\alpha$  e per il  $CD4$ . Tali cellule migrando in profondità nella corticale maturano in cellule  $TcR\beta^+$ ,  $CD8\alpha^+$  e  $CD4^+$ . Infatti la forte reattività della zona corticale, sia alla sonda molecolare per il  $CD8\alpha$  e  $CD4$ , sia a quella per il  $TcR\beta$ , suggerisce che tale regione sia la sede delle cellule doppio positive ( $CD8^+$  e  $CD4^+$ ). Tali cellule, migrando in profondità nella corticale, potrebbero maturare in singoli positivi, come descritto nei Mammiferi (Ladi et al., 2006). La presenza di cordoni cellulari  $CD8\alpha^+$  e di linfociti isolati  $CD4^+$  nella medulla supporta questa ipotesi, suggerendo che il bordo cortico-medullare sia un'area di attiva selezione mentre la cortex un'area di differenziamento.

Inoltre, la distribuzione dei timociti  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , oltre a riflettere il loro percorso di differenziamento e selezione dalla cortex verso la medulla, suggerisce che tali timociti possano stabilire rapporti con le diverse tipologie cellulari che esprimono le molecole di *MHCI* e *II*. Infatti, è noto dai Mammiferi, che durante lo sviluppo timico, i linfociti T sono selezionati in modo tale che, solo quelli capaci di legare le molecole self-MHC con

un'appropriata affinità, lasceranno il timo per colonizzare gli organi linfoidei periferici. Invece, quei timociti che non legano le molecole self-MHC o si legano con troppa affinità saranno eliminati per apoptosi (Ramsdell e Fowlkes, 1990). Il processo di selezione positiva che prevede la restrizione per le molecole di *MHC*, permette ai timociti di proseguire nella maturazione, mentre l'induzione alla tolleranza, o la selezione negativa, è responsabile dell'eliminazione funzionale di potenziali cellule autoreattive. In entrambe i processi, le cellule stromali timiche hanno un ruolo cruciale (Blackman et al., 1990).

E' ben documentato che il normale sviluppo dei linfociti T è dipendente dall'interazione con le cellule stromali del timo e dalla secrezione di molecole specifiche. Inoltre, è noto, ma non è completamente definito neanche nei Mammiferi, che durante il "crosstalk" tra i timociti e le cellule che mediano queste fasi, anche queste ultime completino il loro sviluppo (Manley et al., 2003; Gray et al., 2005).

Ulteriori studi potranno essere effettuati per comprendere più a fondo, nella spigola, i meccanismi di migrazione in tempo reale dei timociti, durante i quali avvengono i processi di maturazione. A tal proposito, studi recenti compiuti nei Mammiferi mediante microscopia a due fotoni, hanno dimostrato che i timociti corticali si muovono casualmente prima della selezione positiva, successivamente si fermano, prendono contatti con le cellule epiteliali timiche all'inizio della selezione e quindi rapidamente migrano nella medulla come singoli positivi (Witt et al., 2005). Ancora più recentemente la tecnica della microscopia a due fotoni, è stata applicata al pesce Teleosteo medaka (*Oryzias latipes*), durante lo sviluppo timico. Il fenomeno del "random walk motility" è stato osservato in questa specie ed è in accordo con i risultati ottenuti nel topo (Li et al., 2007). In particolare, si è osservato che la motilità dei timociti corticali viene acquisita durante l'ontogenesi e precisamente ad 1 settimana post-schiusa (2wpf) per aumentare al successivo stadio esaminato di adulto (6wpf). Un interessante risultato proveniente sempre dallo stesso studio è che l'acquisizione della motilità da parte dei timociti è coincisa con la prima espressione del *TcRβ*, *CD8α* e *CD4* a suggerire l'ipotesi che questa motilità rappresenti il meccanismo attraverso il quale si realizza la ricerca da parte dei linfociti T dell'interazione con le molecole di *MHC*, verso quindi la selezione positiva o negativa (Li et al., 2007).

Nel presente studio, l'impiego della sonda ad RNA per l'*MHCII-β* ha permesso di approfondire la conoscenza del coinvolgimento della componente stromale timica nei processi di selezione dei linfociti T nel timo della spigola. Gli esperimenti di ibridazione *in situ* per questo gene hanno evidenziato la presenza di sparse cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> nella cortex, comprese in un network di cellule epiteliali corticali *MHCII-β*<sup>-</sup>; mentre nella giunzione

cortico-medullare e nella medulla si è potuta osservare una maggiore concentrazione di cellule  $MHCII-\beta^+$  che mostravano prolungamenti citoplasmatici e un elevato livello di espressione del gene. Inoltre, è stato possibile approfondire questo studio grazie all'impiego dell'anticorpo monoclonale anti-citocheratine (AE1/AE3), che ha permesso di localizzare nel timo di esemplari di spigola di un anno le diverse sottopopolazioni di cellule epiteliali timiche, quali le reticolari corticali, le subcapsulari, le perivascolari, le peritrabecolari e le medullari. Tali popolazioni cellulari, tranne le cellule epiteliali peritrabecolari, hanno mostrato una positività anche per la sonda per l' $MHCII-\beta$ , a suggerire un loro possibile ruolo nella selezione timica.

In particolare, nel timo dei Mammiferi, mentre le molecole di *MHC* di classe I sono presenti in tutte le cellule stromali, le molecole di *MHCII*, che sono di cruciale importanza nella selezione del repertorio dei linfociti T, sono espresse dalle cellule epiteliali corticali, dalle cellule dendritiche medullari, da alcune cellule epiteliali medullari e da alcuni macrofagi (solo il 50-75%) (Ritter e Crispe, 1992). Da tempo, diversi studi hanno suggerito che sia i macrofagi, le cellule epiteliali, le cellule dendritiche-like, che i linfociti B e T attivati, rappresentino le APCs nei pesci, sebbene ulteriori studi siano necessari per aumentare la conoscenza relativa alle molecole di *MHC* e al loro ruolo nelle risposte immunitarie. Recentemente, l'espressione dell'*MHCII* è stata osservata nei granulociti acidofili di orata (*Sparus aurata*), facendo ipotizzare che queste cellule presentino l'antigene ai linfociti  $CD4^+$ , sebbene ulteriori studi molecolari e funzionali saranno necessari per confermare questa ipotesi (Cuesta et al., 2005b).

In base a quanto noto nei Mammiferi, la presenza di una ricca ma differente distribuzione di cellule  $MHCII-\beta^+$  nella cortex e nella medulla della spigola giovanile e in sviluppo, suggerisce il coinvolgimento di diverse tipologie di cellule nei processi di selezione timica. In particolare, nella cortex, la sonda per l' $MHCII-\beta$  ha marcato in maniera sovrapponibile all'anticorpo anti-citocheratine alcune cellule che presentano prolungamenti citoplasmatici, una caratteristica morfologica riconducibile alle cellule epiteliali reticolari corticali. Nella medulla, l'abbondante marcatura osservata si potrebbe attribuire oltre che a cellule epiteliali medullari, a cellule dendritiche-like o interdigitanti, e anche ai macrofagi, come noto nei Mammiferi. In quest'ultimi, le cellule dendritiche circolanti (DCs) e le dendritiche interdigitanti (IDCs), presenti negli organi linfoidi, sono state studiate in maniera approfondita e numerosi dati hanno rivelato che tali popolazioni cellulari possono essere coinvolte nella presentazione dell'antigene, nel fenomeno dell'induzione alla tolleranza (Janossy et al., 1989; Kyewski et al., 1988; Landry et al., 1989; Matzinger e Guerder 1989;

Pereira et al., 1986; Ramsdell e Fowlkes, 1990; Sprent et al., 1990) e nella proliferazione *in vivo* dei timociti maturi (Landry et al., 1990). Inoltre, è stato più volte dimostrato che sia le DCs che le IDCs presentano una forte positività per la molecola di *MHC* di classe II, diversamente dai macrofagi, scarsamente positivi per l'*MHCII* (Landry et al., 1988; Pelletier et al., 1986). Tuttavia, non si può escludere che la forte positività per l'*MHCII-β* osservata nella medulla del timo della spigola, possa essere attribuibile in parte ad alcuni macrofagi.

Ulteriori studi, mediante l'impiego di marcatori specifici per le cellule interdigitanti, potranno contribuire alla comprensione dei processi di selezione che avvengono nel microambiente timico dei Teleostei. In quest'ultimi, attualmente, si hanno poche informazioni che documentino la presenza delle cellule dendritiche e/o interdigitanti. Ad esempio, nel timo della spigola è stata compiuta un'analisi ultrastrutturale (Avilés-Trigueros e Quesada, 1995) relativamente a cellule con morfologia simile alle IDCs dei Vertebrati più evoluti. Queste cellule, presenti nel bordo cortico-medullare e nella medulla, sono apparse al TEM e SEM voluminose e elettrone-trasparenti, di forma irregolare, isolate o in gruppi di 2/3 cellule e con numerose interdigitazioni. Più recentemente, in alcune specie di Teleostei, quali la trota (*Oncorhynchus mykiss*), lo squalo nurse (*Ginglymostoma cirratum*) (Ohta et al., 2004), il salmone atlantico (*Salmo salar*) (Haugarvoll et al., 2006), la passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) (Aoki e Hirono, 2006) e lo zebrafish (*Danio rerio*) (sequenza non pubblicata), è stato sequenziato il gene *CD83*, comunemente usato nei Mammiferi come marker per le cellule dendritiche, e la cui espressione è stata trovata sulle cellule dendritiche circolanti, sulle cellule interdigitanti, presenti negli organi linfoidi e sulle cellule di Langherans (Zhou et al., 1992; 1995). L'espressione del gene *CD83* è stata anche dimostrata nei monociti, linfociti B attivati e linfociti T (Kozlow et al., 1993). Nei Mammiferi, esperimenti condotti con la proteina ricombinate *CD83* hanno rivelato diverse funzioni di questo gene, inclusi il legame e l'attivazione delle cellule T  $CD8^+$  (Hirano et al., 2006). Nel topo si è osservato che la mancata espressione del *CD83* provoca anche una riduzione nella generazione delle cellule T  $CD4^+$  (Fujimoto et al., 2002). Inoltre, il ruolo funzionale di questo gene per le DCs è quello di inibire la loro maturazione e la proliferazione delle cellule T mediata dalle stesse cellule dendritiche (Lechmann et al., 2001). Questi risultati hanno suggerito un importante ruolo funzionale del gene *CD83* nell'induzione e nella regolazione delle risposte immunitarie (Doñate et al., 2007). Nei Teleostei, la funzione del gene *CD83* è ancora scarsamente conosciuta. I dati attualmente disponibili riguardano principalmente la caratterizzazione molecolare del gene, nonostante

nella trota (*Oncorhynchus mykiss*), un'analisi d'espressione del *CD83* abbia rivelato la presenza del gene in tutti i più importanti tessuti immunologici e una sovraespressione in seguito ad infezione virale. Comunque, questi risultati preliminari rappresentano un punto di partenza fondamentale per lo studio della biologia delle cellule dendritiche-like nei Teleostei, e più in generale, per lo studio dell'evoluzione dell'immunità adattativa e del processo di presentazione dell'antigene, in quanto le cellule dendritiche sono considerate uno dei più importanti anelli di congiunzione tra l'immunità innata e adattativa (Ohta et al., 2004).

***Studio dell'espressione di geni coinvolti nell'acquisizione di un sistema immunitario funzionale nell'intestino della spigola.***

L'interazione continua e reciproca tra l'organismo e l'ambiente è una caratteristica fondamentale della vita. L'interfaccia può essere selettivamente permeabile e allo stesso tempo può costituire una barriera fisica con meccanismi di difesa locali contro le minacce ambientali (invasioni di patogeni) (Roitt et al., 1993). Il tratto gastrointestinale rappresenta il maggior sito d'interfaccia tra l'organismo e l'ambiente esterno (Bernard et al. 2006), la cui funzione immunitaria iniziale consisteva probabilmente in un meccanismo di protezione basato sull'autoriconoscimento, che aveva molto in comune con il riconoscimento effettuato dalle cellule natural killer (NK). Questo ramo del sistema immunitario innato si è mantenuto attraverso l'evoluzione, ed ha marcato il suo successo divenendo un effettivo meccanismo di protezione immunitaria. Tuttavia, l'aumento della complessità degli organismi, i drastici cambiamenti ambientali, e la costante evoluzione dei patogeni e del loro meccanismo per sfuggire al sistema immunitario, sono stati probabilmente i principali eventi che hanno determinato il differenziamento di un'immunità adattativa antigene-specifica (Lamboleze et al., 2007).

In particolare, l'idea che l'immunità adattativa mucosale sia più primitiva di quella sistemica, guidata dal timo e dagli altri tessuti linfopoietici (Janeway et al., 1988; Lefrancois, 1991), si basa sul fatto che i linfociti TcR $\gamma/\delta$  sono prevalentemente localizzati nell'epitelio mucosale del tratto gastrointestinale (Haas et al., 1993) e che essi siano comparsi più precocemente nell'evoluzione rispetto ai linfociti TcR $\alpha/\beta$  per ragioni riguardanti l'ontogenesi, la struttura e la specificità per l'antigene (Raulet et al., 1985; Chien et al., 1987; Hein, 1994; Tanaka et al., 1995).

Per quanto riguarda i Teleostei, in diversi lavori si è osservato che lo strato dell'epitelio intestinale, oltre ad avere funzioni digestive, di assorbimento e secretorie, è direttamente coinvolto nei processi immunitari umorali e cellulo-mediati (Sanderson e Walzer, 1994; Tlaskalova-Hogenova et al., 1995). In particolare, anche se i pesci sono privi di placche di Peyer, vari leucociti sparsi o aggregati sono presenti in tutto il tratto digerente, e precisamente nell'intestino, dove linfociti, granulociti, macrofagi e plasmacellule sono infiltrati nell'epitelio e nella lamina propria della mucosa (Bullock, 1963; Pontius e Ambrosius, 1972; Zapata, 1979; Davina et al., 1980; Temkin e McMillan, 1986; Hart et al., 1988; Abelli et al., 1997; Picchietti et al., 1997).

Inoltre, cellule che risiedono nell'epitelio intestinale con una morfologia simile a quella osservata per i linfociti intraepiteliali (IELs) dell'intestino dei Mammiferi, sono state descritte nella carpa (*Cyprinus carpio*) (Rombout et al., 1993), nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Picchietti et al., 1997) e in altre specie di Teleostei.

Più recentemente, nella trota, sono stati condotti studi di tipo morfologico e di espressione di markers specifici per la caratterizzazione degli IELs (Bernard et al., 2006). Le analisi ultrastrutturali e i risultati ottenuti al citofluorimetro hanno evidenziato che i linfociti, purificati dall'epitelio intestinale, costituiscono una popolazione piuttosto omogenea di piccole cellule di forma rotonda, con un largo nucleo, simili ai linfociti intraepiteliali dei Mammiferi, e sono localizzati tra gli enterociti dell'epitelio intestinale. Le analisi di RT-PCR hanno inoltre dimostrato che gli IELs nell'intestino della trota esprimono markers per le cellule T, come il *CD8*, *CD4*, *CD28*, *CD3ε*, *TcRζ*, *TcRγ* e il *TcRβ* ma non esprimono trascritti per le Ig, in particolare le *Igμ/Igδ*, a conferma che questa popolazione linfocitaria sia costituita soprattutto da cellule T.

Nonostante questi studi, nei pesci non si hanno ancora informazioni precise su origine, selezione e localizzazione delle cellule T intestinali e il presente lavoro ha avuto lo scopo di fornire un contributo alla comprensione della funzione immunitaria del GALT dei Teleostei, definendo, nell'intestino di esemplari giovanili di spigola, i livelli d'espressione dei geni *TcRβ*, *CD8α*, *CD4* e *MHCII-β* e la localizzazione dei loro trascritti genici.

Come primo obiettivo sono stati effettuati esperimenti di PCR quantitativa per i geni *TcRβ*, *CD8α* e *CD4* nelle tre porzioni, anteriore, medio e posteriore dell'intestino della spigola. I risultati hanno mostrato che i livelli di espressione del *TcRβ* e *CD4* non differiscono nelle tre porzioni di intestino, diversamente da quanto osservato in un recente lavoro sulla spigola, che ha evidenziato la presenza di un maggior numero di cellule *TcRβ*<sup>+</sup> nella porzione anteriore dell'intestino (Romano et al., 2007). Questo risultato, in realtà è

apparentemente discordante con quello ottenuto durante il mio dottorato di ricerca, ed è probabilmente attribuibile ai diversi approcci metodologici utilizzati; infatti, mentre nel lavoro sopra menzionato, è stata effettuata una conta delle cellule  $TcR\beta^+$  rilevate mediante ibridazione *in situ*, in questo lavoro di tesi, la real time PCR ha permesso di compiere un'analisi quantitativa del livello di espressione dei trascritti del  $TcR\beta$ , che pur non essendo significativamente differente nelle tre porzioni dell'intestino non può essere escluso che sia a carico di un maggior numero di linfociti nell'intestino anteriore rispetto al medio e/o al posteriore. Inoltre, l'analisi di Q-PCR ha rivelato che i trascritti per il  $CD8\alpha$  aumentano nel segmento posteriore ( $p < 0.05$ ) rispetto al medio. Questi risultati sono in accordo con alcuni dati precedenti ottenuti nella spigola, in cui si è osservato che con il procedere dello sviluppo, il numero delle cellule T-like aumenta nella mucosa intestinale e si stabilisce un gradiente che cresce procedendo verso l'ano (Picchietti et al., 1997).

Inoltre, in tutto l'intestino il livello di espressione del  $TcR\beta$  e del  $CD8\alpha$  è risultato significativamente maggiore rispetto al  $CD4$  ( $P < 0.001$ ), suggerendo che il GALT della spigola sia costituito principalmente da cellule T con probabile funzione citotossica. All'analisi di RQ-PCR è stato associato uno studio di ibridazione *in situ* con le sonde ad RNA per il  $TcR\beta$ ,  $CD8\alpha$  e  $CD4$  che hanno permesso di localizzare le cellule che esprimono questi geni nella mucosa intestinale dell'intestino posteriore. La scelta di concentrare gli studi di ibridazione *in situ* proprio sull'intestino posteriore è stata dettata dal fatto che quest'ultimo presenta il più alto livello di espressione del  $CD8\alpha$ , quindi una probabile funzione immunologica specializzata. Infatti, questa differente distribuzione regionale delle cellule  $CD8\alpha^+$  in spigole giovanili richiama quanto precedentemente descritto in altre specie di pesci, in cui l'intestino posteriore acquisisce importanti funzioni immunologiche (Ida e Yamamoto, 1985; Georgopoulou e Venier, 1986; Fujino et al., 1987; Rombout e Van de Berg, 1989).

L'ibridazione *in situ* ha rivelato la presenza di numerose cellule  $TcR\beta$  e  $CD8\alpha$  positive a livello intraepiteliale e nella lamina propria intestinale, mentre rare cellule  $CD4^+$  sono state localizzate sia nell'epitelio che nella lamina propria, confermando i dati ottenuti con la PCR quantitativa che mostravano un'espressione significativamente minore del  $CD4$  rispetto al  $TcR\beta$  e al  $CD8\alpha$  nella porzione posteriore dell'intestino. In particolare, l'espressione del  $CD8\alpha$  è risultata principalmente localizzata nell'epitelio e nella lamina propria dove è stato possibile osservare degli aggregati di cellule  $CD8\alpha^+$ . Quest'ultimo risultato appare molto interessante se confrontato con alcuni dati sperimentali ottenuti recentemente sui Mammiferi, riguardo al differente fenotipo dei linfociti intraepiteliali

dell'intestino. Infatti, è stato dimostrato nel topo, che i linfociti intraepiteliali appartengono a due maggiori sottogruppi. Il primo, è rappresentato da cellule  $CD4^+$  o  $CD8\alpha\beta^+$  che esprimono il  $TcR\alpha\beta$  e che sono specifiche per gli antigeni presentati dall'*MHC* rispettivamente di classe II e I (Das et al., 1999). Questi linfociti intraepiteliali rappresentano la progenie di cellule T “convenzionali” che sono selezionate positivamente nel timo in risposta al complesso self-MHC/self antigene, e che in seguito vengono innescate nella periferia in risposta agli antigeni non-self (Arstila et al., 2000). Il secondo gruppo, invece, è rappresentato da un consistente numero di cellule che esprime l'omodimero del  $CD8\alpha$  ( $CD8\alpha\alpha^+$ ) come corecettore del  $TcR$ ; queste cellule T non “convenzionali”, sono generate principalmente a livello extratimico da piccoli ma numerosi aggregati linfoidi, le criptoplacche, localizzate nella lamina propria (Kamamori et al., 1996). Inoltre, è stata dimostrata, nel topo, la presenza di precursori linfoidi nelle criptoplacche, ad indicare un coinvolgimento di queste strutture nello sviluppo dei linfociti intraepiteliali. Questi ultimi si sviluppano anche in assenza di un timo funzionale, e vanno incontro ad una maturazione extratimica, come dimostrato dall'espressione di *RAG-I* nelle cellule pre-T intestinali (Lundqvist et al., 1995). In base a questi risultati, le cellule T nel GALT dei Mammiferi deriverebbero, pertanto, principalmente da due sorgenti: il timo e il GALT stesso, suggerendo che questi due tessuti possano essere evolutivamente relazionati. Considerando questi risultati ottenuti nei Mammiferi e la presenza di aggregati di cellule del  $CD8\alpha^+$  nella lamina propria dell'intestino della spigola, si può ipotizzare che probabilmente anche nel GALT dei pesci possano avvenire dei processi di differenziamento e selezione di elementi linfoidi. Chiaramente altri studi dovranno essere compiuti per approfondire la conoscenza del fenotipo e dei meccanismi di sviluppo dei linfociti nell'intestino dei Teleostei, vista la scarsità di informazioni disponibili anche nei Mammiferi riguardo a questo complesso argomento.

Infatti, anche nei Mammiferi il processo di selezione positiva nel GALT è ancora oggetto di discussione e alcuni autori (Matsunaga e Rahman, 2001) sostengono che, probabilmente, la stessa anatomia del GALT influenzi l'efficienza della selezione positiva, in questo distretto; infatti, diversamente dal timo, dove il reticolo epiteliale forma un network tridimensionale nell'interazione con i linfociti in differenziamento, l'epitelio intestinale forma una struttura bidimensionale che è adattata essenzialmente per l'assorbimento e la digestione del cibo ed è apparentemente più disorganizzata rispetto al microambiente timico. Infatti, i linfociti intraepiteliali che si originano dalle criptoplacche, localizzate nella lamina propria, dovrebbero attraversare la membrana basale per raggiungere l'epitelio,

dove avviene la selezione positiva (Saito et al., 1988), che, come suggerito da studi effettuati in topi transgenici, è influenzata per le sottopopolazioni  $CD8\alpha/\alpha$  e  $\alpha/\beta$  da una loro differente affinità per la molecola di *MHC* di classe I (Poussier et al., 1993; Levelt et al., 1999). Al contrario, per quanto riguarda la selezione positiva delle sottopopolazioni  $CD4$ , sebbene sia stata rilevata nell'intestino del topo la presenza di molecole di *MHC* di classe II e di linfociti intraepiteliali con fenotipo  $CD4 TcR\alpha/\beta$ , alcuni dati non hanno evidenziato la capacità da parte della molecola dell'*MHC* di classe II di operare una selezione positiva (Bland, 1988). Inoltre, alcuni dati sperimentali ottenuti più recentemente sui Mammiferi mostrano che i linfociti intraepiteliali intestinali  $CD8\alpha\alpha^+$ , sopra descritti, possono esprimere sia il  $TcR\alpha\beta$  che il  $TcR\gamma\delta$ , con differenze significative tra le due popolazioni. Infatti, mentre i recettori  $TcR\gamma\delta$  non riconoscono i peptidi presentati dalle molecole di *MHC* di classe I o II, e per loro non è stata descritta una vera e propria selezione positiva, i linfociti intraepiteliali  $TcR\alpha\beta^+ CD8\alpha\alpha^+$  richiedono un processo di selezione positiva e possono essere ristretti sia per l'*MHC* di classe I o II (Guehler et al., 1996; Leishman et al., 2001).

Sulla base di questi studi effettuati nei Mammiferi è stato interessante, durante il mio dottorato di ricerca poter approfondire la conoscenza dei meccanismi immunitari del GALT della spigola analizzando l'espressione della molecola di *MHCII-β*, coinvolta nella presentazione dell'antigene ai linfociti T  $CD4^+$  e, probabilmente, anche nella eventuale selezione positiva dei linfociti T intestinali. Alcuni studi documentano anche nei pesci, come nei Mammiferi, l'espressione sia della catena  $\alpha$  che  $\beta$  dell'*MHCII* nei tessuti linfomieloidi (Juul-Madsen et al., 1992; Sultmann et al., 1993; Rodrigues et al., 1995; Hansen et al., 1999; Koppang et al., 1998, 2003), e questo lavoro di tesi, in particolare, ha permesso di analizzare l'espressione dell'*MHCII-β* nell'intestino della spigola e di localizzarne i trascritti genici.

Innanzitutto, la tecnica di Q-PCR è stata impiegata per l'analisi dei livelli dei trascritti per l'*MHCII-β* nelle tre porzioni, anteriore, medio e posteriore dell'intestino e nel timo di esemplari giovanili di spigola. L'analisi quantitativa ha evidenziato che l'espressione dell'*MHCII-β* è significativamente minore nella porzione posteriore dell'intestino rispetto al timo e all'intestino anteriore e medio ( $P < 0.001$ ) e questo risultato è stato avvalorato dai dati ottenuti successivamente dagli esperimenti di ibridazione *in situ* compiuti con la sonda per l'*MHCII-β* nell'intestino posteriore della spigola. La sonda, infatti, ha marcato rare cellule  $MHCII-\beta^+$  presenti in tutta la mucosa intestinale, ma principalmente localizzate nella regione apicale dell'epitelio intestinale. Questi risultati sono apparsi molto

interessanti in quanto hanno permesso di riflettere su quali tipologie cellulari esprimessero l'*MHCII-β* nell'intestino della spigola. A tal proposito, sappiamo da studi compiuti nei Mammiferi, che mentre l'*MHC* di classe I è espresso in tutte le cellule e tessuti, l'*MHCII* è presente solo nelle cellule presentanti l'antigene (APCs), rappresentate da macrofagi, cellule dendritiche, cellule epiteliali, linfociti B e T attivati e granulociti (Glimcher e Kara, 1992; Cuesta et al., 2005b). In base a queste informazioni, l'espressione dell'*MHCII-β*, rilevata nell'intestino posteriore della spigola, potrebbe essere attribuita a macrofagi e/o granulociti presenti nella mucosa intestinale. Infatti, risultati precedenti ottenuti sempre nella spigola (Abelli et al., 1997), hanno evidenziato l'esistenza di un gradiente decrescente di granulociti che procede verso l'ano a cui può essere associata una diminuzione del livello di espressione dei trascritti dell'*MHCII-β*. Tale ipotesi è avvalorata dalla presenza di rare cellule *MHCII-β*<sup>+</sup> localizzate proprio nell'intestino posteriore della spigola, le quali presentano le caratteristiche morfologiche tipiche dei granulociti dei pesci. Tuttavia, ulteriori studi che prevedano l'impiego di marcatori specifici per i macrofagi saranno necessari per verificare il possibile coinvolgimento di queste cellule nella presentazione dell'antigene.

Concludendo quindi, i risultati ottenuti riguardo all'elevata espressione del *CD8α* e alla bassa espressione dell'*MHCII-β*, rilevate sia tramite Q-PCR che con gli esperimenti di localizzazione dei trascritti, suggeriscono l'ipotesi che l'elevato numero di linfociti *CD8α*<sup>+</sup> presenti nell'intestino posteriore della spigola possano rappresentare, almeno in gran parte, una popolazione di linfociti *CD8αα*<sup>+</sup> che esprime il *TcRγδ*, che, come si è visto nei Mammiferi, non riconosce i peptidi presentati dalle molecole di *MHC* di classe I o II.

Studi futuri, effettuati mediante l'impiego di sonde per l'*MHC* di classe I e/o per il *TcRγδ*, potranno essere determinanti per approfondire la conoscenza dei processi immunitari nell'intestino della spigola.

Attualmente nei Teleostei la funzione immunitaria dei linfociti intestinali è ancora ampiamente sconosciuta. Tuttavia, i risultati ottenuti in questo lavoro di dottorato di ricerca avvalorano l'ipotesi che le cellule *CD8*<sup>+</sup> del GALT della spigola esplicino essenzialmente una funzione citotossica. E' noto, infatti, dai Mammiferi, che i linfociti T citotossici *CD8*<sup>+</sup> sono di cruciale importanza in alcune risposte immunitarie contro le infezioni e, il coinvolgimento di questa popolazione linfocitaria nell'attacco contro agenti virali è stato descritto anche nei pesci (Utke et al., 2007).

Ulteriori studi funzionali saranno necessari per definire se i linfociti intestinali della spigola siano in grado di attuare delle risposte citotossiche, valutando l'azione di queste cellule verso target allogenici o xenogenici.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha permesso di definire, durante lo sviluppo del Teleosteo marino *Dicentrarchus labrax* L., la prima espressione dei geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* . Tali geni, come è noto nei Mammiferi, e rispettivamente il recettore dei linfociti T per l'antigene (*TcR $\beta$* ), il corecettore dei linfociti T citotossici (*CD8 $\alpha$* ), il corecettore dei linfociti T helper (*CD4*), e il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe II (*MHCII*), sono geni coinvolti nello sviluppo e nella selezione dei timociti.

Gli esperimenti di Q-PCR hanno consentito di quantificare i livelli d'espressione dei trascritti per i quattro geni, durante lo sviluppo della spigola, dimostrando che gli eventi chiave per la maturazione e la selezione dei timociti avvengono in una finestra temporale ben precisa, compresa tra i 51 e i 92 giorni ph.

La tecnica di ibridazione *in situ* ha permesso di localizzare l'espressione dei trascritti dei geni *TcR $\beta$* , *CD8 $\alpha$* , *CD4* e *MHCII- $\beta$* , nel timo della spigola in sviluppo e in esemplari giovanili e i risultati hanno fornito nuove informazioni circa la compartimentalizzazione del timo nei Teleostei, permettendo di proporre ipotesi relative ai processi di differenziamento e di selezione positiva dei timociti, come descritto nei Mammiferi.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti nel GALT giovanile della spigola, l'analisi Q-PCR ha evidenziato un aumento significativo dell'espressione del *CD8 $\alpha$*  dal segmento medio dell'intestino verso quello posteriore ( $p < 0.05$ ). Gli esperimenti di ibridazione *in situ* hanno localizzato numerose cellule *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>*, isolate e in aggregati cellulari, nell'intestino posteriore della spigola e questi risultati, associati alla bassa espressione del *CD4* e dell'*MHCII- $\beta$*  rilevate nello stesso distretto, hanno suggerito che il GALT della spigola sia costituito principalmente di linfociti T con probabile funzione citotossica.

Ulteriori studi saranno necessari per definire se i linfociti intestinali della spigola siano in grado di attuare delle risposte citotossiche, valutando l'azione di queste cellule verso target allogenici o xenogenici.

## BIBLIOGRAFIA

- Abelli L, Romano N, Mastrolia L. Histology of developing thymus in sea bass *Dicentrarchus labrax*. In: Argano R. et al. editors. Contributions to Animal Biology. Halocynthia Association Press Italy, 1994; p.9-15.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L, and Scapigliati G. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish and Shellfish Immunology 1996; 6:493-505.
- Abelli L, Picchietti S, Romano N, Mastrolia L and Scapigliati G. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish and Shellfish Immunol. 1997; 7:235-246.
- Abelli L, Baldassini MR, Meschini R, Mastrolia L. Apoptosis of thymocytes in developing sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol. 1998; 8:13-24.
- Abelli L, Baldassini M R, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a Teleost, *Dicentrarchus labrax*. Cellular Immunology 1999; 191:152-160.
- Ainsworth A J. Fish granulocytes: morphology, distribution and function. Ann. Rev. Fish Dis. 1992; 2:123.
- Al-Adhami MA and Kunz YW. Hemopoietic centers in the developing angelfish *Pterophyllum scalare* (Curier and Valenciennes). Wilhelm Roux's Arch. 1976; 179:393-401.
- Al-Adhami MA and Kunz YW. Ontogenesis haematopoietic sites in *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). Dev. Growth Diff. 1977; 19:171-9.
- Alexander JB, Ingram GA. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish. Dis. 1992; 2:249-79.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ. 1990 Best local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-10.
- Amatruda JF, Zon LI. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. Dev. Biol. 1999; 216:1-15.
- Aoki T, Hirono I. Immune relevant genes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Comp. Biochem. Physiol. 2006; 1(1):115-21.
- Araki K, Suetake H, Kikuchi K and Suzuki Y, Characterization and expression analysis of CD3 $\epsilon$  and CD3 $\gamma/\delta$  in fugu, *Takifugu rubripes*. Immunogenetics 2005; 57:158–163.
- Araki K, Akatsua K, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. Characterization of CD8<sup>+</sup> leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8 $\alpha$ . Dev. Comp. Immunol. 2008; 32:850-858.
- Aranishi F, Nakane M. Epidermal proteases of the Japanese eel. Fish Physiol. Biochem. 1997; 16:471-8.
- Arkoosh MR and Kaattari SL Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. Dev.Comp. Immunol. 1991; 15:279-93
- Arstila T, et al. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the toracic duct lymph. J. Exp. Med. 2000; 191:823-834.
- Ashwell JD, Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor, Annu Rev Immunol 8 1990, pp. 139–167.
- Avilés-Trigueros M and Quesada JA. Presence of interdigitating cells in thymus of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleost). J. of Morphology 1995; 224:199-203.
- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. Nature 1985; 317:359-61.
- Bayne CJ, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish. Dev. Comp. Immunol. 2001; 25:725-43.

- Benanni N, Schmid-Alliana A, and Lafaurie M. Evaluation of phagocytic activity in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. Fish Shellfish Immunol. 1995; 5:273-246.
- Bengtén E., Wilson M., Miller N., Clem LW., Pilstrom L., Warr GW. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. Curr Top Microbiol. immunol. 2000; 248:189-219
- Bennet CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, et al. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. Blood 2001; 98:643-51.
- Benz C, Heinzl K, Bleul CC. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. Eur. J. Immunol. 2004; 34(12):3652-3663.
- Bernard D, Six A, Rigottier-Gois L, Messiaen S, Chilmonczyk S, Quillet E, Boudinot P, and Benmansour A. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and Systemic T cell in a teleost fish. The Journal of Immunology 2006; 176:3942-3949.
- Bildfell RJ, Markham RJF, Johnson GR. Purification and partial characterization of rainbow trout egg lectin. J Aquat Anim Health. 1992; 4:97-105.
- Blackman M, Kappler J, Marrack P. The role of T cell receptor in positive and in negative selection of developing T cell. Science 1990; 248:1335-41.
- Bland P. MHC class II expression by the gut epithelium. Immunol Today 1988; 9:174-8.
- Bly JE, Grimm AS, Morris IG. Transfer 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. 1986; 84:309-13.
- Botham J W and Manning M J. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. J. Fish Biol. 1981; 19:403-414.
- Bowden TJ, Cook P, Rombout JHWM. Development and function of the thymus in teleosts. Fish Shellfish Immunol. 2005; 19:413-427.
- Breuil G, Vassiloglou B, Pepin JF, Romestand B. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Shellfish Immunol. 1997; 7:29-43.
- Brown LL, Cox WT, Levine RP. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. Dis. Aquat. Org. 1997; 29:213-8.
- Bruno DW, Hastings TS, Ellis AE, and Wootton R, . Outbreak of cold water vibriosis in Atlantic salmon in Scotland. Bulletin of the European Association of fish Pathologists. 1985; 5:62-63.
- Bullock WC . Intestinal Histology of some salmonid fishes with particular to the histopathology of acanthocephalan infection. J. Morphol. 1963; 112:23-44.
- Buonocore F, Randelli E, Bird S, Secombes CJ, Costantini S, Facchiano A, Mazzini M, Scapigliati G. The CD8 $\alpha$  from sea bass (*Dicentrarchus labrax*): cloning expression and 3D modelling. Fish Shellfish Immunol 2006; 4:637-646.
- Buonocore F, Randelli E, Casani D, Costantini S, Facchiano A, Scapigliati G, Stet R. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II  $\beta$  chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Fish Shellfish Immunol. 2007; 23:853-866.
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Guerra L., Picchietti S., Costantini S., Facchiano A.M., Zou J., Secombes C. J, Scapigliati G. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterisation and structural analysis. Molecular Immunology 2008; 45 (11):3168-3177.
- Carroll MC, Prodeus AP. Linkages of innate and adaptive immunity. Curr. Opin. Immunol. 1998; 10:36-40.
- Castillo A, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena AJ. Enzyme and immunohistochemical study of the thymic stroma in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson 1990; 15:153-66.

- Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, Kaattari SL, Villena AJ. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1993; 17:419-24.
- Cecchini S, Terova G, Caricato G, Saroglia M. Lysosome activity in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spawned by broodstocks fed with vitamin C enriched diets. *Bull Eur. Assoc. Fish Pathol.* 2000; 20:120-4.
- Cenini P. The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of zoology.* 1984; 204:509-20.
- Chantanachookhin C, Seikai T and Tanaka M. Comparative study on the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Acquaculture* 1991; 99:143-156.
- Chen S-L, Zhang Y-X, Xu M-Y, Ji X-S, Yu G-C, Dong C-F. Molecular polymorphism and expression analysis of MHC class II B gene from red sea bream (*Chrysophrys major*). *Dev Comp Immunol* 2006; 30:407-18.
- Cheroutre H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:217-246.
- Chien YH, Iwashima M, Wettstein DA et al. T cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 1987; 330:722-7.
- Chien, YH, Jores, R, Crowley, MP,. Recognition by  $\gamma/\delta$  T cells. *Annu. 55 Rev. Immunol.* 1996; 14:511–532
- Connors SA, Trout J, Ekker M, Mullins MC. The role of tolloid/mini fin in dorsoventral pattern formation of the zebrafish embryo. *Development* 1999; 126:3110-30.
- Cook MT, Hayball PJ, Birdseye L, Bagley C, Nowak BF, Hayball JD. Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:579-88.
- Cooper EL. Immune response: evolution. In: *Nature encyclopedia of life sciences*. London: Nature Publishing Group; 2000.
- Crowhurst MO, Layton JE, Lieschke GJ. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int J. Dev. Biol.* 2000; 46:483-492.
- Cuesta A, Esteban MA and Meseguer J. Natural cytotoxic cells of gilthead seabream: maximum percentage of lysis. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 12:111-118.
- Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J. Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity. *Dev. Comp. Immunol.* 2005a; 29:637–650.
- Cuesta A., Esteban MA., Meseguer J. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular Immunology* 2005b; 43:1275-1285.
- Daniels G.D., Zou J., Charlemagne J., Partula S., Cunningham C., Secombes C.J.. Cloning of two chemokine receptor homologs (CXCR4 and CC-R7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65(5):684-690
- Danilova N, Steiner LA. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13711-6.
- Danilova N, Hohman VS, Sacher F, Ota T, Willett CE, Steiner LA. T cells and thymus in developing zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 2004; 28:755-67.
- Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Szeiner LA. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* 2005; 6:295-302.
- Das G., Janeway CA Jr. Developmental of CD8alpha/alpha and CD8alpha/beta T cells in major histocompatibility complex class I deficient mice. *J. Exp. Med.* 1999; 190:881-884.
- Davina JHM, Rijkers GT, Rombout J, Timmermans L, Van Muiswinkel WB. Lymphoid and non lymphoid cells in the intestine of cyprinid fish. In: *Development and differentiation of the vertebrate lymphocytes*. Horton JD Ed, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980; pp.129-140.

- De Guerra A Charlemagne J. Genomic organisation of the TcR $\beta$ -chain diversity (D $\beta$ ) and joining (J $\beta$ ) segments in the rainbow trout: presence of many repeated sequences. *Mol. Immunol.* 1997; 34, 653–662.
- De Haas CJC, van Leeuwen EMM, van Bommel T, Verhoef J, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infect Immun.* 2000; 68:1753-9.
- Detrich 3<sup>rd</sup> HW, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10713-7.
- Dick A, Hild M, Bauer H, Imai Y, Maifeld H, Schier AF et al. Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 2000; 127:343-354.
- Dijkstra M J, Somamoto T, Moore L, Hordvik L, Ototake M, Fischer U. Identofocation and characterization of a second CD-4-like gene in teleost fish. *Molecular Immunology* 2005; 5:410-419
- Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Mol. Immunol.* 2006; 43(5):410-9.
- Dixon B, Nagelkerke LAJ, Sibbing FA, Egberts E, Stet RJM. Evolution of MHC class II b chain-encoding genes in the Lake Tana barbell species flock (*Barbus intermedius* complex). *Immunogenetics* 1996; 44:419-31.
- Dixon B., Shum B., Adams E.J., Magor K.E., Hedrick R.P., Muir D.G., Parham P. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.* 1998; 166(1-2):341-348
- Dixon B, Stet RJM. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleostean fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:683-699.
- Dogget TA and Harris JE. The ontogeny of gut-associated lymphoid tissue in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of fish biology* 1987; 31:23-27.
- Dogget TA and Harris JE. Morphology of the gut associated lymphoid tissue of *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption.. *Fish Shellfish Immunol.* 1991; 1:213-227.
- Donate C, Roher N, Balasch JC, Ribas L, Goetz FW, Planas JV, Tort L, MacKenzie S. CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol.* 2007; 23:877-885
- Dos Santos NM, Romano N, de Sousa M, Ellis AE, Rombout JH. Ontogeny of the B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:583-596.
- Du Pasquier L Flajnik M. Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev. Immunol.* 1990; 1:85-95.
- Du Pasquier L. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2001; 129:1-15.
- Elbe A, Stingl G. Dendritic cells as stimulator cells of MHC class I-restricted immune responses. *Adv Exp. Med. Biol.* 1995; 378:341-5.
- Ellingsen T, Strand C, Monsen E, Bogwald J and Dalmo RA. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarchichas minor* Olafsen). *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 18: 351-358.
- Ellis AE and De Sousa m. Phylogeny of the lymphoid system. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.* 1974; 4:338-343.
- Ellis AE. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity . *Development Immunobiology* 1977; 225-31
- Ellis AE. Non specific defence mechanisms in fish and their rule in disease processes. *Dev in Biological standardization* 1981; 49:337-52.
- Ellis AE. Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine response to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1985; 9:251-260.

- Ellis AE. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:827-39.
- Elward K, Gasque P. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.* 2003; 40:85-94.
- Ericsson A, Svensson M, Arya A, Agace WW. CCL25ccR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2004; 34:2720-2729.
- Esteban MA, Meseguer J, Garcia Ayala A, Agulleiro B. Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 1989; 52: 407.
- Esteban MA and Meseguer J. Factors influencing phagocytic response of macrophages from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): an ultrastructural and quantitative study. *Anatomical record* 1997; 248:533-41.
- Etlinger HM, Hodgins HO, Chiller JM. Evolution of the lymphoid system. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.* 1976; 116:1547-53.
- Evans DL and Jaso-Friedman L. Non specific cells as effectors of immunity in fish. *Annual review of fish disease* 1992; 2:109-121.
- Evans DL and Cooper EL. Natural killer cells in ectothermic vertebrates. *Biol. Science.* 1990; 40:745-749.
- Fange R. A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 1982; 2: 23.
- Fairchild PJ and Waldmann H. Extrathymic signals regulate the onset of T cell repertoire selection. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30(7):1948-56.
- Fearon DT. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 1997;388:323-4.
- Figuerola F, Mayer WE, Sultmann H, O'Uigin C, Tichy H, Satta Y, et al. MHC class II B gene evolution in East African cichlid fishes. *Immunogenetics* 2000; 51:556-75.
- Fischer U, Utke K, Ototake M, Dijkstra JM, Kollner B. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:323-37.
- Fischer U, Dijkstra J M, Kollner B, Kiryu I, Koppang E O, Horvik I, Sawamoto Y, Ototake M. The ontogeny of MHC I class I expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* 2005; 18:49-60.
- Fishelson L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei). *Journal of morphology.* 1995; 228:175-190.
- Fletcher TC, Grant P T. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem J.* 1969 ; 115: 65-9
- Fletcher TC, White A, Baldo BA. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. *Comp Biochem Physiol B.* 1981; 57:353-7.
- Fletcher TC, Secombes CJ. Immunology of fish. In: *Nature encyclopedia of life sciences.* London: Nature Publishing Group;1999.
- Fock WL, Chen CL, Lam TJ, Sin YM. Isolation and characterization of a serum lectin from blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish Shellfish Immunol.* 2000;10:489-504.
- Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, LeVen A. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:187-202.
- Frohely M F, DesChaux P A. Presence of tonofilaments thymic serum factors (FTS) in thymic epithelial cells of a fresh water fish (*Cyprinus carpio*) and sea water fish (*Dicentrarchus labrax*). *Thymus* 1986; 8:235-244.

- Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T.. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta high affinity immunoglobulin E Fc receptor  $\gamma$  subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:229-242
- Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C, et al. CD83 expression influences CD4  $\beta$  T cell development in the thymus. *Cell.* 2002; 108(6):755-67.
- Fujino Y, Ono S and Nagai A. Studies on the uptake of rabbit's immunoglobulin into columnar epithelial cells in the gut of the trout *Salmo gairdneri*. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 1987; 53: 367-370.
- Fujiura Y, et al. Development of CD8 alpha alpha + intestinal intraepithelial T cells in beta 2 microglobulin and/or TAP1 deficient mice. *J Immunol.* 1996;156:2710-2715.
- Fullop G M I, Mc Millan D B. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. *Journal of morphology* 1984; 179:175-95.
- Gallagher PF, Miller JFAP.). Immunoglobulin gene expression is a normal differentiation event in embryonic thymocytes. *Eur. Immunol.* 1988; 18:183-6.
- Georgopoulou V and Venier JM. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Dev. Comp. Immunol.* 1986; 10: 529-573.
- Glamann J. Complete coding sequence of rainbow trout Mhc II beta chain. *Scand. J. Immunol.* 1995; 41:365-72.
- Glimcher LH, Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 1992; 10:13-49.
- Grace M F and Manning M J. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dev. Comp. Immunol.* 1980; 4:255-264.
- Gravenor I, Horton T L, Ritchie P, Flint E, Horton J D. Ontogeny and thymus- dependence of T cell surface antigens in *Xenopus*: flow cytometric studies on monoclonal antibody-stained thymus and spleen. *Dev. and Comp. Immunol.* 1995; 19:507-523.
- Gray DHD, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y, Boyd R. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Op Immunol.* 2005; 17:137-143.
- Graser R, O'hUigin C, Vincek V, Meyer A, Klein J. Transspecies polymorphism of class II MHC loci in danio fishes. *Immunogenetics* 1996; 44:36-48.
- Greenhalgh P, Steiner LA. Recombination activating gene 1 (Rag1) in zebrafish and shark. *Immunogenetics* 1995; 41:54-5.
- Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, Midtlyng P, Kjoeglum S, Storset A, et al. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* 2003; 55:210-9.
- Grinde B, Lie Ø, Poppe T, Salte R. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture.* 1988; 68:299-304.
- Grinde B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish. Dis.* 1989; 12:95-104.
- Grontvedt RN, Espelid S. Immunoglobulin producing cells in the spotted wrasse (*Anarchichas minor* Olafsen): localization in adults and during juvenile development. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27: 569-78.
- Gross GG, Schwartz VL, Stevens C, Ebert EC, Blumberg RS, Balk SP. Distribution of dominant T cell receptor beta chains in human intestinal mucosa. *J. Exp. Med.* 1994; 180:1337-44.
- Guehler SR, Bluestone JA , Barrett TA. Immune deviation of 2C transgenic in traepithelial lymphocytes in antigen-bearing hosts. *J. Exp. Med.* 1996; 184:493-503.
- Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol.* 1995; 154:536-44.
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1993; 11: 637-85.
- Hadji-Azimi I, Schwager J, Thiebaud C. B-lymphocyte differentiation in *Xenopus laevis* larvae. *Dev. Biol.* 1982; 90:253-8.

- Haire RN, Rast JP, Litman RT, Litman GW. Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor alpha in zebrafish. *Immunogenetics*; 2000; 51(11):915–23.
- Hamdani SH, McMillan DN, Pettersen EF, Wergeland H, Endresen C, Ellis AE, et al. Isolation of rainbow trout neutrophils with an anti-granulocyte monoclonal antibody. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998; 63:369-80.
- Hansen JD, Kaattari SL. The recombination activation gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics* 1995; 42:188-95.
- Hansen JD, Kaattari SL. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics* 1996; 44:203-11.
- Hansen JD, Strassburger P, Du Pasquier L. Conservation of a master hematopoietic switch gene during vertebrate evolution: isolation and characterization of Ikaros from teleost and amphibian species. *Eur J Immunol.* 1997 ; 27:3049-58.
- Hansen JD. Characterization of the rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues. *Immunogenetics* 1997; 46:367-75.
- Hansen JD and Zapata AG. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews* 1998; 166:199-220.
- Hansen JD, Strassburger P, Thorgaard GH, Young WP, Du Pasquier L. Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Immunol.* 1999; 163:774:786.
- Hansen LD, Strassburger P. Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8alpha, in rainbow trout. *J. Immunol.* 2000; 164:3132-3139.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102:6919-24.
- Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 1994 ; 41:113.
- Hart S, Wrathmell AB, Harris JE, and Grayson TH. Gut immunology in fish: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 1988; 12:453-480.
- Haugarvoll E, Thorsen J, Laane M, Huang Q, Koppang EO. Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83 $\beta$  teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res.* 2006; 19:214-25.
- Haugarvoll E, Bjerkas I, Nowak BF, Hordvik I, and Koppang O. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J. Anat.* 2008; 213 pp 202-209.
- Hein WR. Structural and functional evolution of the extracellular regions of the T cell receptors. *Seminar Immunol* 1994, 6:361-72.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 1999; 126:3735-45.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev. Biol.* 2001; 238:274-88.
- Hild M, Dick A, Rauch GJ, Meier A, Bouwmeester T, Haffter P, et al. The smad 5 mutation somitabun blocks Bmp2b signaling during early dorsoventral patterning of zebrafish embryo. *Development* 1999; 126:2149-59.
- Hine P M. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 1992; 2:79.
- Hogan R J, Stuge T B, Clem L W, Miller N, Chinchar V G. Anti viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 1996; 20:115.

- Honda S, Kashiwagi M, Miyamoto K, Takei Y, Hirose S. Multiplicity, structures and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:33151-7.
- Hordvik, I., Jacob, A.L.J., Charlemagne, J., Endresen, C., Cloning of Tcell antigen receptot beta chain cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 1996; 45, 9–14.
- Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Bastani N, Krossoy B. Molecular cloning nad phylogentic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.* 1999; 50:202-210.
- Hordvik, I., Torvund, J., Moore, L., Endresen, C., 2004. Structure and organisation of the T cell receptor alpha chain genes in Atlantic salmon. *Mol. Immunol.* 41, 553–559.
- Huttenhius HBT. Development of the immune system of the common carp (*Cyprinus carpio*). 2005) Wageningen, the Netherlands: University of Wageningen.
- Huttenhuis HB, Huising MO, van der Meulen T, van Oosterhoud CN, Sanchez NA, Taverne-Thiele AJ, Stroband HW, Rombout JH. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 2005; 29(12):1033-47.
- Ingram GA. Substances involved in the natural resistance of fish to infection e a review. *J Fish Biol.* 11980; 6:23-60.
- Irwin M J and Kaattari S L. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 12:39-45.
- Jaffe L, Robertson J, Bikoff E K. Distinct patterns of expression of MHC class I and B2-microglobulin transcripts at early stages of mouse development. *J. Immunol* 1991; 147:2740-2750.
- Jameson SC, Bevan M. T-cell selection. *Curr. Opinion Immunol.* 1998; 10:214-219.
- Janeway CA, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cell bearing receptors. *Immunol. Today* 1988; 9:73-6.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. The immune system in health and disease. *Immunology.* 2002; pp. 239.
- Janossy G, Campana D, and Akbar A. Kinetics of T lymphocytes development. in: Iversen, OH (ed.) *Current Topics in Pathology.* 1988; Vol 79. Berlin: Springer-Verlag.
- Jaso-Friedmann L, Leary 3rd JH, Evans DL. NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells. *Mol. Immunol.* 1997; 34:955–965.
- Jaso-Friedman L, Evans D L. Mechanisms of cellular cytototoxic innate resistance in tilapia. (*Oreochromis nilotica*). *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23(1): 27-35.
- Jensen I, Albuquerque A, Sommer AI, Robertsen B. Effect of poly I: C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 13:311-326.
- Jiang H, Siegel JN, Gewurz H. Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q. *J. Immunol.* 1991; 146:2324-30.
- Joosten PHM, Aviles-Trigueros M, Sorgeloos P, Rombout JHWM. Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsuled *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish Shellfish Immunol.* 1995; 5:289-99.
- Joosten PHM. Immunological aspects of oral vaccination in fish. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands. 1997.
- Josefsson S, Tatner MF. Histogenesis of the lymphoid organs in sea brea, *Sparus auratus* L. *Fish Shellfish Immunol* 1993; 3:35-50.
- Juul-Madsen HR, Glamann J, Madsen HO, Simonsen M. MHC class II beta chain expression in the rainbow trout. *Scand. J. Immunol.* 1992; 35:687-694.
- Kaattari S.L. Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annual Review Fish Dis.* 1992; 161-80

- Kaattari SL, Zhang HL, Khor IW, Kaattari IM and Shapiro DA. Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 2002; 26: 202-10.
- Kamamori Y, Ishimaru K, Nanno M. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit<sup>+</sup> IL-7R<sup>+</sup> Thy1<sup>+</sup> lympho-hematopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.* 1996; 184:1449-59.
- Kanlis G, Suzuki Y, Tauchi M, Numata T, Shirojo Y, Takashima F. Immunoglobulin in oocytes, fertilized eggs and yolk sac larvae of red sea bream. *Fish Sci.* 1995; 61:787-90.
- Karnovsky M. J., A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1965; 27: 137A-138A.
- Kato T and Owen RL. Structure and function of intestinal mucosal epithelium in Ogra et al. 1994; pp.1-26.
- Kendall M D Functional anatomy of the thymic microenvironment. *Journal of anatomy.* 1991; 177:1-29.
- Kilshaw PJ, Murant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20:2201-2207
- Kishimoto Y, Lee KH, Zon L, Hammersmidt M, Schulte-Merker S. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP1 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* 1997; 124:4457-66.
- Kisielow P, von Boehmer H. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol.* 1995; 58:87-209.
- Kita J and Itazawa Y. Microcirculatory pathways in the spleen of the rainbow trout *Oncorhynchus mikiss*. *Jpn. J. Ichthyol.* 1990; 37. 265-272.
- Klausner, R.D., Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J.S., The T-cell 620 antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990; 6, 621: 403–431.
- Kollner B, Blohm U, Kotterba G, Fischer U. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11:127-42.
- Koppang EO, Lundin M, Press C.McL, Ronningen K, Lie O. Differing levels of MHC class II beta chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 1998a; 8:183-196.
- Koppang EO, Press CM, Ronningen K, Lie O. Expression of MHC class I mRNA in tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 1998b; 8: 577-587.
- Koppang EO, Hordvik I, Bjerkaas I, Torvund J, Aune L, Thevarajan J, Endresen C. Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II  $\beta$  chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 14:115-132.
- Koumans-van Diepen JCE, van Lisdonk M H M, Taverne-Thiele J J, Verburg-van Kemenade B M L, Rombout JHWM. Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L). *Dev. Comp. Immunol.* 1994a; 18:45-56.
- Koumans-van Diepen JCE, Taverne Thiele JJ, van Rens Bttm, Rombout JHWM. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B-cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio*): an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.* 1994b; 4:19-28.
- Koumans-van Diepen JCE, Egberts E, Peixoto BR, Tavrne N, Rombout JH. B cell and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.): an immuno(cyto)chemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19: 97-108.
- Kozlow EJ, Wilson GL, Fox CH, Kehrl JH. Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood* 1993; 81(2):454-61.

- Kudo S. Further investigation on enzyme activities and antifungal action of fertilization extract from fish eggs. *Zool Sci.* 1991; 8:1079.
- Kyewski B. Unravelling the complexity of intrathymic cell-cell interactions. *APMIS* 1988; 96: 1049-1060.
- Ida H and Yamamoto T. Intracellular transport of horseradish peroxidase in the absorptive cells of goldfish hindgut in vitro, with special reference to the cytoplasmic tubules. *Cell Tissues res.* 1985; 240:553-560.
- Imagawa T, Hashimoto Y, Kon Y, Sugimura M. Immunoglobulin-containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection. *Fish Shellfish Immunol.* 1991; 1:173-185.
- Imai, E., Ishikawa, J., Moritomo, T., Tomana, M., Characterisation of T cell antigenreceptor  $\alpha$  chain isotypes in the common carp. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19, 205–216.
- Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature Immunol.* 2006; 7:338-343.
- Laing KJ, Zou JJ, Purcell MK, Phillips R, Secombes C, Hansen JD. Evolution of the CD4 family: teleost fish posses two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *J Immunol.* 2006; 177(6):3939-51.
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Wen Z, Lam TJ, Sim YM. Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. *Dev. Dyn.* 2002; 225:87-94.
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM.. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 2004; 28:9-28.
- Lamas J, Bruno DW, Santos Y, Anaton R, and Ellis AE. Eosinophilic granular cell response to intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunol.* 1991; 1:187-194.
- Lamas J, Santos Y, Bruno DW, Toranzo AE, and Anadon R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *Journal of fish Biology.* 1984; 25:839-854.
- Lambolez F, Kronenberg M, Cheroutre H. Thymic differentiation of  $TcR\alpha\beta^+$   $CD8\alpha\alpha^+$  IELs. *Immunological Reviews* 2007; Vol 215:178-188.
- Lamers C H J. The reaction of the immune system of fish to vaccination. Tesi di Dottorato, Agricultural University Wageningen Olanda 1985.
- Lamers C H J. Histophysiology of a primary immune response against *Aeromonas Hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Experimental Zoology* 1986; 238: 71-80.
- Landry D, Lafontaine M, Barthélémy H, Paquette N, Chartrand C, Pelletier M and Montplaisir S. Human thymic dendritic cells. Characterization, isolation and functional assays. *Immunology* 1988; 65:135-142.
- Landry D, Lafontaine M, Barthelemy H, Paquette N, Chartrand C, Pelletier M, Montplaisir S. Human thymic dendritic cell-thymocyte association: ultrastructural cell phenotype analysis. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19:1855-1860
- Landry D, Doyon L, Poudrier J, Lafontaine M, Pelletier M, Montplaisir S. Accessory function of human thymic dendritic cells in Con A-induced proliferation of autologous thymocytes subsets. *The J. Immunol.* 1990;144: 836-843.
- Lange S, Bambir S, Dodds AW, Magnadottir B The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) – an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 2004a ;16:359-67.
- Lange S, Bambir S, Dodds AW, Magnadottir B The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Hippoglossus hippoglossus* L.) – an immunohistochemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 2004b; 28:593-601.

- Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, Kutok JL, Hezel JP, et al. In vivo tracking of T cells development, ablation and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 99:13711-6.
- Langenau DM, Palomero T, Kanki JP, Ferrando AA, Zhou Y, Zon LI, et al. Molecular cloning and development expression of Tlx (Hox11) genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Mech. Dev.* 2002; 117: 243-8.
- Langston AL, Johnstone R, Ellis AE. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11:333-45.
- Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, et al. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194(12):1813-21.
- Lefranc, M.-P., Lefranc, G. The T Cell Receptor FactsBook. Academic 629 Press Burlington, USA. 2001.
- Lefrancois L. Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unique T cell repertoire? *Immunol Today.* 1991; 12:436-8.
- Lefrancois L, Puddington L. Extratymic intestinal T cell development: virtual reality ? *Immunology today.* 1995; 16:16-21.
- Leishman AJ, et al. T cell responses modulated through interaction between CD8 $\alpha\alpha$  and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science* 2001; 294:1936-1939.
- Leong J-AC, Trobridge GD, Kim CHY, Johnson M, Simon B. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol. Rev.* 1998; 166:349-63.
- Levelt CN, De yong YP, Mizoguchi E, et al. High- and low-affinity single-peptide /MHC ligands have a distinct effects on the development of mucosal CD8 and CD8 T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96:5628-33.
- Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat. Immunol.* 2006; 7:1116-24.
- Li J, Iwanami N, Hoa VQ, Seiki MF, Takahama Y. Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in Medaka. *The Journal of Immunol.* 2007; 179:1605-1615.
- Lie Ø, Evensen Ø, Sørensen A, Frøysadal E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Org.* 1989; 6:1-5.
- Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Lyton JE. Morfologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish . *Blood* 2001; 98:3087-96.
- Lillehaug A, Sevatdal S, Endal T. Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis. *Fish Shellfish Immunol.* 1996; 6:521-35.
- Lin G L, Ellsaesser C F, Clem L W, Miller N W. Phorbol ester/ calcium ionophore activate fish leucocytes and induce long-term cultures. *Dev. Comp. Immunol.* 1992; 16:153.
- Littman DR, Thomas Y, Maddon PJ, Chess L, Axel R. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 1985; 40:237-46.
- Lo D, Feng L, Carson MJ, Crowley M, Pauza M, Nguyen A, et al. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol. Rev.* 1999; 169:225-39.
- Lund V, Olafsen JA. A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. *Dev Comp Immunol* 1998; 22:185-94.
- Lund V, Olafsen JA. Changes in serum concentration of a serum amyloid P-like pentraxin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during infection and inflammation. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23:61-70.

- Lundqvist C, Baranov V, Hammarstrom S, Athlin L, Hammarstrom ML. Intraepithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *Int Immunol* 1995; 7:1473-87.
- Mac Artur J I, Fletcher T C. Phagocytosis in fish. In *Fish Immunology*, M J Manning and M F Tatner (eds). Academic Press, London, 1985; pp. 29-46.
- MacDougall KC, Mericko PA, Burnett KG. Antigen receptor-mediated activation of extracellular related kinase (ERK) in B lymphocytes of teleost fishes. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23:221-30.
- Maddox JF, Mackay CR, Brandon MR. Ontogeny of ovine lymphocytes. I. An immunohistological study on the development of T lymphocytes in the sheep embryo and fetal thymus. *Immunology* 1987; 62: 97-105.
- Magnadottir B, Lange S, Steinarrsson A and Gudmundsdottir S. The ontogenic development of immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 2004; 139:217-224.
- Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bowald J and Dalmo RA. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19: 429-439.
- Magnadottir B. Innate immunity of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20: 137-151.
- Magor BG, Magor KE. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:651-82.
- Manley NR, Blackburn CC. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:225-32.
- Manning M J. *Fishes. Immunology: a comparative approach* (R J Turner ed) 1994; pp.69-100. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. (UK).
- Marchalonis JJ., Schluter SF., Yang HY., Hohman VS., McGee K., Yeaton L. Antigenic cross-reaction among immunoglobulin of diverse vertebrates (elasmobranchs to man) detected using xenoantisera. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; 101A. 675-87
- Marrak P, Kappler J. I linfociti T e il loro recettore. *Le scienze.* 1998; 165:28-37.
- Marsden MJ, Vaughan LM, Foster TJ, Secombes CJ. A live (Delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Infect Immun.* 1996; 64:3863-9.
- Matsunaga T, Rahman A. In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related. *Scand J. Immunol.* 2001; 53:1-6.
- Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen- presenting cell? *Nature* 1989; 338:74-76.
- McCormick MI, Molony BW. Influence of water temperature during larval stage on size, age and body condition of a tropical reef fish at settlement. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 1995; 118:59-68.
- Medzhitov R, Janeway Jr CA. An ancient system of host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:12-5.
- Medzhitov R, Janeway Jr CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296:298-300.
- Meseguer J, Esteban M A, Agulleiro B. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) an ultrastructural study. *Arch Histol. Cytol.* 1991; 54:299-309.
- Meseguer J, Esteban MA, Lopez-Ruiz A, Bielek E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L. and carp: *Cyprinus carpio* L.). *Anat. Rec.* 1994; 244:468-474.
- Meseguer J, Esteban MA, and Mulero V. The non specific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanism. *Anat. Rec.* 1996; 64:5403-5.

- Miller NW, Sizemore RC, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 1985; 134:2884-8.
- Miller NW, Van Ginkel JE, Ellsaesser F, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 1987; 11:739-48.
- Miller KM, Withler RE. Sequence analysis of a polymorphic MHC class II gene in Pacific salmon. *Immunogenetics* 1996; 43:337-51.
- Miracle, A.L., Anderson, M.K., Litman, R.T., Walsh, C.J., Luer, C.A., Rothenberg, E.V., Litman, G.W., Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *Int. Immunol.* 2001;13, 567-580.
- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Forster R. Thimic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med.* 2004; 200(4):481-91.
- Moore L J, Somamoto T, Lie K K, Dijkstra J M, Hordvik I. Characterization of salmon and trout CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$ . *Molecular immunology.* 2005; 42:1225-1234.
- Mor A, Avtalion RR. Evidence of transfer of immunity from mother to eggs in tilapias. *Isr J Aquacult / Bamidgeh* 1988; 40:22-8.
- Mor A, Avtalion RP. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapias. *J. Fish. Biol.* 1990; 37:249-55.
- Morello D, Duprey P, Babinet C. Asynchronous regulation of mouse H-2D and Beta-2 microglobulin RNA transcripts . *Immunogenetics* 1985; 22:441-452.
- Mughal MS, Manning MJ. Antibody reponses of young carp, *Cyprinus carpio*, and grey mullet, *Chelon labrosus*, immunized with soluble antigen by various routes. In: Manning MJ, Tatner MF, editors. *Fish Immunology*. London: Academic Press. 1985; P. 313-325.
- Mughal MS, Farley-Ewens EK, Manning MJ. Effects of direct in antigen on immunological memory in young carp, *Cyprinus carpio*. *Vet. Immunopathol.* 1986; 12:181-92.
- Mulero V, Meseguer J, Esteban MA, Mulero V. The nonspecific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 1994; 57:351-358.
- Mulero I, Sepulcre MP, Roca FJ, Meseguer J, Garcí'a-Ayala A, Mulero V. Characterization of macrophages from the bony fishgilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Dev. Comp. Immunol.* 2008; 32:1151-1159.
- Muñoz P, Sitja-Bobadilla A, and Alvarez-Pellitero P. Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parassitology* 2000; 120:465-77.
- Nagarajan UM, O'Connell C, Rank RG. Molecular characterisation of guinea-pig (*Cavia porcellus*) CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  cDNA. *Tissue Antigens* 2004; 63:184-9.
- Nakanishi T. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of marine teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 26:151-60.
- Nakanishi T, Fisher U, Dijkstra J M, Hasegawa S, Somamoto T, Okamoto N, Ototake M., Cytotoxic T cell function in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 26(2):131-9.
- Nakao M, Mutsyro J, Obo R, Fujiki K, Nonaka M, and Yano T. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30(3):858-866.
- Nakao M, Musturo J, Nakahara M, Kato Y, and Yano T. Expansion of genes encoding complement components in bony fish: biological implications of the complement diversity. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:749-62.

- Nakayasu C, Somammoto T, Hasegawa S, Yoshitomi T, Okamoto N. Differential spontaneous killing of human and murine tumour cell lines by leucocyte subpopulations from carp peripheral blood leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:115–126.
- Nagai T, Mutsuro J, Kimura M, Kato Y, Fujiki K, Yano T, et al. A novel truncated isoform of the mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Immunogenetics* 2000; 51:193-200.
- Nam BH, Yamamoto E, Aoki T. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hirame rhabdovirus*. *Dev. Comp. Immunol.* 2000; 24(1):13-24.
- Nam BH, Hirono I, Aoki T. The four TcR genes of Teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) TcR alpha-, beta, and delta-chains. *Journal of Immunology.* 2002; 170:3081-90.
- Nam B H, Hirono I, Aoki T. Bulk isolation of immune response-related genes by expressed sequenced tags of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) leukocytes stimulated with Con A/PMA. *Fish and Shellfish Immunol.* 2003; 14(5): 467-76.
- Nauta AJ, Daha M, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* 2003; 24:148-54.
- Nelson KJ, Kelley DE, Perry RP. Inducible transcription of the unrearranged k constant region locus is a common feature of pre-B cells and does not require DNA or protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:5305–9.
- Neutra MR and Kraehenbuhl J. Cellular and molecular basis for antigen transport in the intestinal epithelium. In Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, (Eds.): *Handbook of mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego-New York. 1994; pp27-39.
- Norment AM, Bevan M. Role of chemokines in thymocyte development. *Immunol* 2000; 12:445-455.
- O' Neill J G. Ontogeny of the lymphoid organs in an Antarctic teleost *Harpagifer antarcticus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1989; 13:25-33.
- Ohmura K, Kawamoto H, Fulimoto S, Ozaki S, Nakao K, Katsura Y. Emergence of T,B, and myeloid lineage-committed as well as multipotent hemopoietic progenitors in aorta–gonad–mesonephros region of day 10 fetuses of the mouse. *J Immunol.* 1999; 163:4788–95.
- Ohta Y, Landis E, Boulay T, Phillips RB, Collet B, Secombs CJ, Flajnik MF, Hansen JD. Homologs of CD83 from Elasmobranch and Teleost Fish. *The Journal of Immunol.* 2004; 173: 4553-4560.
- Olsen YA, Press CMcL. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmon salar* L., and the localisation of immunoglobulin in the egg. *Fish Shellfish Immunol.* 1997; 7:81-91.
- Ottinger CA, Johnson SC, Ewart KV, Brown LL, Ross NW. Enhancement of anti-Aeromonas salmonicida activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by mannose-binding lectin. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1999; 123:53-9.
- Ourth D D. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1980; 4: 65-74.
- Padros F, Crespo S. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture* 1996; 144:1-16.
- Park CI, Hirono I and Aoki T. Molecular characterization of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* CD3 $\epsilon$  and evolution of the CD3 cluster. *Dev. Comp. Immunol.* 2005 ;29: 123–133.
- Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* 1989; 44:265-311.
- Parrott DM, Tait C, MacKenzie S, Mowat AM, Davies MD, Miklem HS. Analysis of the effector functions of different populations of mucosal lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1983; 409:307-320.

- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 1995; 155:699-706.
- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. *J Immunol.* 1996; 157:207-12.
- Peleiteiro MC and Richards RH. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of fish Disease.* 1985; 8:161-172.
- Pelletier M, tautu C, Landry D, Montplaisir S, Chartrand C and Perreault C. Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology* 1986; 58:263-270.
- Pepin JF, Brueil G, Rigobert P, Romestand B. Detection and characterization of immunoglobulin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Ichthyophysiol. Acta* 1997 ; 20:77-85.
- Pereira RA, King NJC, Blanden RV. Comparison of functional properties of thymic and splenic dendritic cells. *Cell. Immunol.* 1986; 102:152-167.
- Persson AC, Stet RJM, Pilstrom L. Characterisation of MHC class I and beta-2-microglobulin sequences in Atlantic cod revealing an usually high number of expressed class I genes. *Immunogenetics* 1999; 50:49-59.
- Petrie-Hanson L, Ainsworth AJ. Humoral immune responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fry and fingerlings exposed to *Edwardsiella ictaluri*. *Fish Shellfish Immunol.* 1999; 9: 579-89.
- Petrie-Hanson L, Ainsworth AJ. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; 81:113-27.
- Pickering AD and Richards RH. Factors influencing the structure, function and biota of the salmoid epidermis. *Proceedings of the Royal Society, Edinburgh* 1980; 79B: 93-104.
- Picchiatti S, Terribili FR, Mastrolia L, Scapigliati G and a Abelli L. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embriol.* 1997; 196(6): 457-463.
- Picchiatti S, Taddei AR, Scapigliati G, Buonocore F, Fausto AM, Romano N, et al. Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell. Tissue Res.* 2004; 315:259-70.
- Picchiatti S, Abelli L, Buonocore F, Randelli E, Fausto AM, Scapigliati G, Mazzini M. Immunoglobulin protein and gene transcripts in sea bream (*Sparus aurata*) oocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 5:398-404.
- Picchiatti S, Abelli L, Buonocore F, Randelli E, Fausto AM, Scapigliati G, et al. Immunoglobulin protein and gene transcripts in sea bream (*Sparus aurata* L.) oocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20:398-404.
- Pontius H and Ambrosius H. Beitrage zur Immunobiologie poikilothermer Wirbelter. IX Untersuchungen zur zellularen Grundlage Humoraler Immunoreaktionen der Knochenfische am Beispiel des Flussbarsches (*Perca fluviatilis* L.). *Acta Biol. Med. Gem.* 1972; 29:319-339.
- Poussier P, Teh HS, Julius M. Thymus- independent positive and negative selection of T cells expressing a major histocompatibility complex class I restricted transgenic T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium . *J. Exp. Med.* 1993; 178:1947-57.
- Powell MD, Wright GM and Burka JF. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Cell and Tissue Res.* 1991; 266: 469- 474.
- Powell MD, Briand HA, Wright GM and Burka JF. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cells (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* extracellular products. *Fish Shellfish Immunol.* 1993; 3:279-289.
- Powell MD, Speare DJ, Wright GM. Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucus cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. *J. Fish Biol.* 1994; 44:725-730.

- Press CML, Dannevig BH and Iansdverk T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 1994; 4:79-93.
- Pulsford A, Fange R, Zapata A G. The thymic microenvironment of the common sole (*Solea soea*). *Acta Zoologica.* 1991; 72:209-216.
- Pulsford A, Tomlinson MG, Lemaire-gony S, Glynn PJ. Development and immunocompetence of juvenile flounders, *Platichthys flesus* L. *Fish Shellfish Immunol.* 1994; 4:63-78.
- Quesada J, Villena ML and Anguillero B. Structure of the spleen of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopic study. *J. Morph.* 1990; 206:273-281.
- Quesada J, Villena ML, Navarro V. Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopy study. *Journal of morphology.* 1995; 221:161-76.
- Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal elimination versus clonal anergy: The role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990; 248:1342-48.
- Randelli E, Foglietta A, Mazzini M, Buonocore F, Scapigliati G. Cloning and expression analysis of the co-receptor CD8 $\alpha$  in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 2006; 256(1-4): 631-7.
- Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25(4):326-40.
- Raulet DH, Barman RD, Saito HY, Tonegawa S. Developmental regulation of T cell receptor gene expression. *Nature.* 1985; 314: 103-7.
- Razquin BE, Castillo A, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena A. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immunological and enzyme-histochemical study. *J. Fish. Biol.* 1990; 36:159-73.
- Reite OB, and Evensen O. Mast cells in the swimbladder of Atlantic salmon *Salmo salar*, histochemistry and responses to compound 48/80 and formalin -inactivated *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms* 1994; 20:95-100.
- Reite OB. The mast cell nature of granule cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*: similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 1996; 6:363-369.
- Reite OB. Mast cells/eosinophilic granulocyte cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish shellfish Immunol.* 1998; 8:489-513.
- Rijkers G.T. Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 1982; 2:93-100.
- Ristow SS, Grabowski LD, Thompson SM, Warr GW, Kaattari SL, de Avila JM, et al. Coding sequences of the MHC II b chain of homozygous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 1999;23:51e60.
- Ritter M A, Crispe I N. The thymus. 1992 (Richwood D and Male D, eds), pp 1-85. Oxford Univ. Press, Oxford (UK).
- Rocha B. and Tanchot C. CD8 T cell memory. *Seminars in immunology.* 2004; 16: 305-314
- Roberts RJ. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In *Fish Pathology* (Roberts RJ ed.), London: Baillière Tindall. 1978; pp. 55-91.
- Robertson O H, Wexler B C,. Histological changes in the organs and tissue of migrating and spawning salmon (Genus: *Oncorhynch*). *Endocrinology* 1960; pp 66-222.
- Rocha B, von Boemher H, Guy-Grand D. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5336-5340.
- Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha /beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 1991; 173:483-486.
- Rodrigues PN., Hermensen TT., Rombout JH., Egberts E., Stet RJ. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19:483-496.

- Rodrigues PNS, Hermesen TT, van Maanen A, Taverne-Thiele AJ, Rombout JHWM, Dixon B, et al. Expression of MhcCyca class I and class II molecules in the early life history of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Dev. Comp. Immunol. 1998; 22:493-506.
- Rodrigues PNS, Hermesen TT, van Maanen A, Taverne-Thiele AJ, Rombout JHWM, Dixon B, et al. Expression of MhcCyca class I and class II molecules in the early life history of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Dev. Comp. Immunol. 1998; 22:493-506.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 1993 Gower Med. Publ., London.
- Rojas R. e Apodaca G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. Mol. Cell. Biol. Nature Reviews 2002; 3: 1-12.
- Romano N, Abelli L, Mastrolia L, and Scapigliati G. Immunocytochemical detection and cytology of lymphocyte subpopulations in a teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). Cell Tissue Res. 1997; 289:163-171.
- Romano N, Abelli L, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunocytochemical detection and cytology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L.). Cell Tissue Res. 1997a ; 289:163-171.
- Romano N, Taverne-Thiele AJ, van Maanen A, Rombout JHWM. Distribution of leucocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.); immunocytochemical studies. Fish Shellfish Immunol. 1997b; 7:439-53.
- Romano N, Picchietti S, Taverne-Thiele JJ, Taverne N, Abelli L, Mastrolia L, et al. Distribution of macrophages during fish development; an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio* L.). Anat. Embryol. (Berl) 1998; 31-41.
- Romano N, Fanelli M, Maria Del Papa G, Scapigliati G, Mastrolia L. Histological and cytological studies on the developing thymus of sharpshout seabram, *Diplodus puntazzo*. J. Anat. 1999a; 194(Pt 1): 39-50.
- Romano N, Taverne-Thiele AJ, Fanelli M, Baldassini MR, Abelli L, Mastrolia L, et al. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. Dev. Comp. Immunol. 1999b; 23:123-37
- Romano N, Buonocore F, Moschetti A, Abelli L, Baldassini MR, Picchietti S, Scapigliati G, and Mastrolia L. T-cell receptor expression in lymphomyeloid organs of juveniles in sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) 2003.
- Romano N, Rossi F, Abelli L, Caccia E, Piergentili R, Mastrolia L, Randelli E, Buonocore F. Majority of TCRbeta+ T-lymphocytes located in thymus and midgut of the bony fish, *Dicentrarchus labrax* Cell Tissue Res. 2007; 329:479-489
- Rombout J, Lamers CHJ, Helfrich MH, Dekker A, Taverne-Thiele JJ. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implication. Cell Tissue Res. 1985; 239:519-530.
- Rombout J and Van den Berg AA. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. J. Fish Biol. 1989; 35:13-22.
- Rombout J, Bot HE and Taverne-Thiele JJ. Immunological importance of the second gut segment of carp. II. Characterization of mucosal leucocytes. J. Fish Biol. 1989a; 35:167-178.
- Rombout J, Taverne-Thiele AJ and Villena MI. The gut associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. Dev. Comp. Immunol. 1993; 17: 55-66.
- Rombout JHWN, Taverne N, Kamp Mvd, Taverne-Thiele AJ. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). Dev. Comp. Immunol. 1993b; 17: 309-17.
- Rombout J H W M, Koumans-van Diepen J C E K, Emmer P M, Tavernethiele J J, Taverne N. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. J Fish. Biol. 1996; 49:521.
- Rombout J, Joosten PHM, Engelsma MY, Vos N, Tavrne-Thiele A. Indication of a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp. Dev. Comp. Immunol. 1998; 22:63-77.

- Rombout JHWM, Huttenhuis H B T, Picchietti S, Scapigliati G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:442-455.
- Rønneseth A, Wergeland HI, Pettersen EF. Neutrophils and Bcells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2007; 23:493-503.
- Rowley A F, Hunt T C, Page M & Mainwaring G. Vertebrate blood cells. A F Rowley & N A Ratcliffe Eds., Cambridge University press, 1988;18-127.
- Ruiz J, Leary JH and Jaso-Friedman L. Phosphorylation-induced activation of thilapia non-specific cytotoxic cells by serum cytokines. *Dis. Aquat. Organ.* 2001; 46(2):129-137.
- Sacedón R, Varas A, Hernández-López C, Gutiérrez-de Frías C, Crompton T, Zapata AG et al. Expression of hedgehog proteins in the human thymus. *J. Histochem. Cytochem.* 2003; 51:1557-66.
- Saeij JP, de Vries BJ, Wieegertjes Gf. The immune reponse of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation. *Dev. Comp. Immunol.* 2003; 27:859-874.
- Sailendri k. and Muthukkaruppan V. The immune response of the teleost, *Tilapia mossambica* to soluble and cellular antigens. *J. of Exp. Zool.* 1975; 191:371-81
- Saito H, Kamamori Y, Takemori T et al. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 1988; 280:275-8.
- Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TP, Clayberger C et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990; 345:41-6.
- Sanchez C, Alvarez A, Castillo A, Zapata A, Villena A, Domiguez J. Two different subpopulations of Ig-bearing cells in lymphoid organs of rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19:79-86.
- Sanderson JR, and Walker WA Mucosal barrier, in Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J (Eds): *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego-New York. 1994; Pp.41-51.
- Sasaki Y, Maita M, Okamoto N. Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 12:243e52.
- Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* 2007; 219:143-56.
- Santos NMSD, Romano N, Sousa Md, Ellis AE, Rombout JWHM. Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:583-96.
- Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L. Production and characterization of a monoclonal antibody against thymocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percithydae). *Fish Shallfish Immunol.* 1995; 5:393.
- Scapigliati G, Romano N, Picchietti S, Mazzini M, Mastrolia L, Scalia D, Abelli L.. Monoclonal antibodies against sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immuniassay. *Fish and Shellfish Immunol.* 1996; 6:383-401.
- Scapigliati G., Chausson F., Cooper EL., Scalia D., Mazzini M. Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four antarctic fish species. *Polar. Biol.* 1997; 18:209-13
- Scapigliati G., Romano N., and Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B- lymphocytes. *Aquaculture* 1999; 172:3-28
- Scapigliati G, Meloni S, Mazzini M. A monoclonal antibody against corion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax*: studies of corion precursors and applicability in immunoassays. *Biol. Reprod.* 1999; 60(4):783-9.
- Scapigliati G, Romano N, Abelli L, Meloni S, Ficca AG, Buonocore F, Bird S, Secombes CJ. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarcus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2000; 10:329-341.

- Scapigliati G, Romano N, Buonocore F, Picchietti S, Baldassini MR, Prugnoli D, et al. The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. Dev. Comp. Immunol. 2002; 26:151-160.
- Scapigliati G, Buonocore F, Mazzini M. Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective. Curr. Pharm. Design. 2006; 12:3071-81.
- Schmidt B, Furthauer M, Connors SA, Trout J, Thisse B, Thisse C et al. Equivalent genetic roles for bmp 7 /snailhouse and bmp2b/swirl in dorsoventral pattern formation. Development 2000; 127:957-967.
- Schorpp M, Leicht M, Nold E, Hammerschmidt M, Haas-Assembaum A, Wiest W, et al. A zebrafish orthologue (whnb) of the mouse nude gene is expressed in the epithelial compartment of the embryonic thymic rudiment. Mech. Dev. 2002; 118:179-85.
- Schroder MB, Villena AJ, Jorgensen TO. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Dev. Comp. Immunol. 1998; 22: 507-17.
- Secombes C, Van Groningen J J M, Van Muiswinkel W B, Egberts E. Ontogeny of the immune system carp (*Cyprinus Carpio*): the appearance of antigenic determinants on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. Dev Comp Immunol. 1983; 7: 455-464.
- Secombs CJ. The phylogeny of cytokines. In: The cytokine handbook, Thomson A. Ed., Academic press Ltd, London. 1991; pp.387-412.
- Secombs CJ and Fletcher TC. The role of Phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annual Review Fish Dis. 1992; 2: 53-71.
- Shang NA, Xiao-Feng S, Hu W, Wang YP, Guo QL. Molecular cloning and characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) TcR $\gamma$  and CD3 $\gamma/\delta$  chains. Dev. Comp. Immunol. 2008; 24:412-425.
- Sheid B, Prat JC, Gaetjens E. A tumor growth inhibitory factor and a tumor growth promoting factor isolated from unfertilised ova of shad (*Alosa sapidissima*). Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989; 149:713-9.
- Shum BP, Rajalingam R, Magor KE, Azumi K, Carr WH, Dixon B, et al. A divergent non classical class I gene conserved in salmonids. Immunogenetics 1999; 49:479e90
- Smith AM, Potter M and Merchant EB. Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost *Leponis macrochirus*. J. Immunol. 1967; 99: 876-882.
- Sizemore RG, Miller NW, Cuchens MA, Lobb CJ, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. J. Immunol. 1984; 133:2920-4
- Somamoto T, Yoshimura Y, Nakanishi T, Ototake M. Molecular cloning and characterization of two types of CD8 $\alpha$  from gibel carp, *Carassius auratus langdortii*. Dev. Comp. Immunol. 2005; 29: 693-702.
- Sprent J, Gao EK, Webb SR. T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. Science 1990; 248:1357-1363.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. Dev. Comp. Immunol. 2001; 25:101-15.
- St. Luise Cormier E A, Osterland C K, Anderson P D. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmon Gairdneri*). Dev. Comp. Immunol. 1984; 8:71-80.
- Staudt LM, Lenardo MJ. Immunoglobulin gene transcription. Annu. Rev. Immunol. 1991; 9:373-8.
- Steinhagen D and Jendrysek S. Phagocytosis by carp granulocytes; in vivo and in vitro observations. Fish Shellfish immunol. 1994, 4: 521-525.
- Stenvik J, Jorgensen TO. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. Immunogenetics 2000; 51: 452-61.
- Stet RJM, Kruiswijk CP, Saeij JPJ, Wiegertjes GF. Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice. Immunol. Rev. 1998; 166:301-16.

- Stet RJM, de Vries B, Mudde K, Hermesen T, van Heerwaarden J, Shump BP, et al. Unique haplotypes of cosegregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes. *Immunogenetics* 2002; 54:320-31.
- Suetake H, Araki K, Suzuki Y. Cloning expression and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics* 2004; 5:368-364.
- Sultmann H, Mayer WE, Figueroa F, O'hUigin C, Klein J. Zebrafish MHC class II alpha chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function. *Immunogenetics* 1993; 38:408-420.
- Sun J, Leahy DJ, Kavathas PB. Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domain of MHC class I. *J. Exp. Med.* 1995; 182:1275-80.
- Sunyer JO and Tort L. The complement system of the teleost fish *Sparus aurata*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 712:371-373.
- Sunyer JO, Tort L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* are effected by the alternative complement pathway. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:333-45
- Suzuki Y, Orito M, Furukawa K, Aida K. Existence of low molecular weight immunoglobulin M in carp eggs. *Fish Sci.* 1994; 60:159-62.
- Sveinbjørsson B, Seljelid R. Aminated (b)-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 41:113.
- Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic nonpeptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells. *Nature.* 1995; 375:155-8.
- Takano T, Iwahori A, Hirono I, Aoki T. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 2004; 17:367-374.
- Takano T, Kondo H, Hirono I, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Mol. Immunol.* 2007; 44:1845-1853.
- Takemura A, Takano K. Transfer of maternally-derived immunoglobulin (IgM) to larvae in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 1997; 7:355-63.
- Takemura A. Immunoistochemical localization of lysozyme in the prelarvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 1996; 6:75-7.
- Tatner MF and Manning MJ. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev. Comp. Immunol.* 1983a; 7:69-75.
- Tatner MF and Manning MJ. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1983b; 12:93-105.
- Tatner MF. The ontogeny of humoral immunity of in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol Immunopathol.* 1986; 12:93-105.
- Tatner, MF. Natural changes in the immune system of fish. In *The fish immune system: organism, pathogen, & environment (series: fish physiology)* (Iwana, G. & Nakanishi, T. eds.) 1996; pp. 255-287. Academic Press. Inc. S. Diego (CA, USA).
- Temkin RJ and McMillan B. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus* J. *morphol.* 1986; 190:9-26
- Temmink J H M, Bayne C J. Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 1987; 11:125-37.
- Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, Macleman H, Kieran MW, Detrich 3<sup>rd</sup> HW, et al. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 1998; 196: 248-69.
- Tlaskalová-hogenová H, Farré-Castany MA, Stepánková R, Kozáková H, Tucková L, Funda DP, Barrot R, Cukrowska B, Sinkora J, Mandel L, Karská K, and Kolinská J. The gut as a

- lymphoepithelial organ: the role of intestine epithelial cells in mucosal immunity. *Folia Microbiol.* 1995; 40(4):385-91.
- Topliss JA, Rongers DJ. An anti-fucose agglutinin in the ova of *Dicentrarchus labrax*. *Med. Libr. Sci.* 1985; 42:199-200.
- Townsend A, Elliot T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. Assembly of MHC class I molecules analysed in vitro. *Cell* 1990; 62: 285-295.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 2004; 20:367-79.
- Trede NS, Zapata A, Zon LI. Fishing for lymphoid genes. *Trends Immunol* 2001; 22:302-307.
- Trede NS, Zon LI. Development of T-cells during fish embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 1998; 22:253-263.
- Turka LA, Schatz DG, Oettinger MA, Chun JJ, Gorka C, Lee K, McCormack WT and Thompson CB. Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 1991; 253:778-781.
- Turley SJ. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14:765.
- Utke K, Kock H, Schuetze H, Bergmann SM, Lorenzen N, Einer-jensen K, Koller B, Dalmo RA, Velsey T, Ototake M, Fischer U. Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2008; 32:239-52.
- Vallejo AN, and Ellis AE. Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cell to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.* 1989; 13:133-148.
- Vallejo AN, Miller NW, and Clem LW. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annual Review of fish Dis.* 1992; 2:73-89.
- Van Erp SHM, Egberts E, Stet RJM. Characterization of major histocompatibility complex class II A and B genes in a gynogenetic carp clone. *Immunogenetics* 1996; 44:192-202.
- Van Ginkel FW, Miller NW, Cuchens MA, Clem LW. Activation of channel catfish B cells by membrane immunoglobulin cross-linking. *Dev. Comp. Immunol.* 1994; 18:97-107.
- Van Muiswinkel WB and Jagt LP. Host-parasite relationships in fish and other ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 1984; 3205-208.
- Van Muiswinkel WB, Lamers CHJ & Rombout JHW. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Research Immunol.* 1991; 142:362-366.
- Van Muiswinkel W B. The piscine immune system: innate and acquired immunity. In: Woo PTK, editor. *Fish diseases and disorders. Volume I: protozoan and metazoan infections.* Canada: Department of Zoology, University of Guelph. 1995; p.729-49.
- Van Muiswinkel WB and Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish. In: Woo PTK (ed). *Fish Diseases and Disorders, second edition.* CAB International, Wellingford. 2005.
- Van Muiswinkel WB, Anderson DP, Lamers CHJ, Egberts E, van Loon JJA, Ijssel JP. Fish immunology and fish health. In: Manning MJ, Tatner MF, editors. *Fish Immunology.* London: Academic Press; 1985; p 1-8.
- Van Rees EP, Dijkstra CD, Sminia T. Ontogeny of the rat immune system: an immunohistochemical approach. *Dev. Comp. Immunol.* 1990; 14:9-18.
- Verburg van Kemenade L, Groeneveld A, hermsen S and Nagelkere L. Role of phagocytic on the immune response of carp (*Cyprinus carpio* L.). *International Conference of Phylogeny of Immunity.* 1989; July 23-28, Roscoff France. pp 44.
- Verburg van Kemenade B M L, Weyts F A A, Debets R & Flik G. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19: 59-70.

- Verho S, Järvinen S, Nikoskelainen S, Lilius EM. Biological effect of vaccination can be assessed directly from diluted whole blood of rainbow trout using homologous blood phagocytes as immunosensors. *Fish Shellfish Immunol.* 2005; 19:175-83.
- Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 1998; 62:59-66.
- Walker RB, McConnell TJ, Walker RA. Variability in a MHC Mosa class II beta chain-encoding gene in striped bass (*Morone saxatilis*). *Dev. Comp. Immunol.* 1994; 18:325e42.
- Warr G.W. The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 1995; 19:1-12.
- Wermestam NE and Pilstrom L. T-cell antigen receptors in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): structure, organization and expression of TcR alpha and beta genes. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:117-35.
- White A, Fletcher TC, Pepys MB, Baldo BA. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-Component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1981; 69:325-9.
- Wieland W H, Orzaez D, Lammers A, Parmentier H K, Verstegen M W A, Shots A. A functional polymeric immunoglobulin receptors in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochem. Journal.* 2004; 380: 669-676.
- Willett CE, Cortes A, Zuasti A, Zapata AG. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1999; 214:323-326.
- Willet CE, Kawasaki H, Amemiya CT, Lin S, Steiner RA. Ikaros expression as a marker for lymphoid progenitors during zebrafish development: *Dev Dyn* 2001; 222: 694-8.
- 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 Ig D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 453-7.
- Wilson MR, Zhou H, Bengten E, Clem LW, Stuge TB, Warr GW, et al. T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR alpha and beta genes. *Mol. Immunol.* 1998; 35:545-57.
- Witt CM, Raychaudhuri S, Schaefer B, Chakraborty AK, Robey EA. Directed migration of positive selected thymocytes visualized in real time. *PloS Biol* 2005; 3:1062-9.
- Wu Y, Wang S, Peng X. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 16:381-9.
- Xiao SY, Li Y, Chen WF. Kinetics of thymocyte developmental process in fetal and neonatal mice. *Cell Research* 2003; 13(4):265-273.
- Yoffey m. A contribution to the study of the comparative histology and physiology of the spleen, with reference chiefly to its cellular constituents. *J. Anat.* 1929; 63:314-344.
- Yousif AN, Albright LJ, Evelyn TPT. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* 1994a; 19:15-9.
- Yousif AN, Albright LJ, Evelyn TPT. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and its interaction with bacterial fish pathogens. *Dis Aquat Org.* 1994b; 20:127-36.
- Zarkadis IK, Sarrias MR, Sfyroera G, Sunyer JO and Iambris JD. Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25(1):11-24.
- Zapata A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 1979; 3: 55-65.
- Zapata AG. Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 1981a; 5:685-690.
- Zapata AG. Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of *Rutilus rutilus*. *Dev. Comp. Immunol.* 1981b; 5:427-436.
- Zapata AG. Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 1982; 6:87-94.
- Zapata AG. Phylogeny of the fish immune system. *Bull. Inst. Pasteur.* 1983; 81:165-186.

- Zapata AG, Cooper E L.. Cells of the immune system. The immune system: comparative histophyology. Pp 1990; 15-30.
- Zapata AG, Chibà A, Varas A. Cell and tissues of the immune system of fish (1). In The fish immune system: organism, pathogen, and environment (series: fish fisiology), (Iwama G, and Nakanishi T, eds) pp. 1996; 225-287. Academic Press. Inc. S.Diego (CA, USA).
- Zapata AG, Torroba M, Varas A, Jimenez AV. Immunity in fish larvae. Dev. Biol. Stand. 1997; 90: 23-32
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de Frias C, Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. Fish Shellfish Immunol. 2006; 20:126-136.
- Zettergren LD. Ontogeny and distribution of cells in B lineage in the American leopard frog, *Rana pipiens*. Dev. Comp. Immunol. 1982; 6:311-20.
- Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. J Immunol 1992; 149(2):735-42.
- Zhou LJ, Tedder TF. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83<sup>+</sup> blood dendritic cells. Blood 1995; 86(9):3295-301.

**Pubblicazioni durante il triennio (novembre 2005/novembre 2008) di  
Dottorato di Ricerca:**

1. Fochetti R., Belardinelli M., **Guerra L.**, Buonocore F., Fausto A.M., Caporale C., 2006. "Cloning and structural analysis of a haemocyanin from the stonefly *Perla grandis*". The Protein Journal, 25 (7-8): 443-454
2. Belardinelli M., **Guerra L.**, Gambellini G., Maroli M., Mazzini M., Fausto A.M., 2007. "Immunolocalization of a lipase-like protein in the female reproductive apparatus of *Phlebotomus papatasi* during the gonotrophic cycle". Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 101 (7): 611-619
3. Picchietti S., **Guerra L.**, Selleri L., Buonocore F., Abelli L., Scapigliati G., Mazzini M., Fausto A.M., 2008. "Compartmentalisation of T cells expressing CD8 $\alpha$  and TCR $\beta$  in developing thymus of sea bass *Dicentrarchus labrax*". Developmental & Comparative Immunology, 32 (2): 92-9
4. Buonocore F., Randelli E., Casani D., **Guerra L.**, Picchietti S., Costantini S., Facchiano A.M., Zou J., Secombes C. J., Scapigliati G.: 2008. "A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterisation and structural analysis". Molecular Immunology, 45 (11): 3168-3177
5. Amore V., Belardinelli M., **Guerra L.**, Buonocore F., Fausto A. M., Pascal N. U., Fochetti R.: "Do really all stoneflies nymphs have respiratory proteins? Further data on the presence of haemocyanin in the larval stages of plecoptera species". Insect Molecular Immunology, in press.
6. Picchietti S., **Guerra L.**, Buonocore F., Randelli E., Fausto A.M., Abelli L.: "Thymocyte differentiation in sea bass thymus: CD4 and CD8 $\alpha$  gene expression profiling and *in situ* hybridisation studies". Fish and Shellfish Immunology. In revisione.

### Abstract di congressi nazionali:

1. Fausto A. M., Belardinelli M., **Guerra L.**, Gambellini G., Maroli M., Mazzini M.: Immunolocalization of a lipase-like protein in the female reproductive apparatus of a sand fly. 52° Convegno GEI (Gruppo Embriologico Italiano), Otranto (Le), 6-9 Giugno 2006
2. Picchietti S., **Guerra L.**, Selleri L., Abelli L., Buonocore F. , Fausto A. M., Scapigliati G., Mazzini M.: Espressione del CD8 $\alpha$  nello sviluppo timico della spigola *Dicentrarchus labrax* L. 67° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana, Napoli 12-16 Settembre 2006
3. Picchietti S., **Guerra L.**, Selleri L., Abelli L., Buonocore F. , Fausto A. M., Scapigliati G., Mazzini M.: Espressione del CD8 $\alpha$  nello sviluppo timico della spigola *Dicentrarchus labrax* L. 67° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana, Napoli 12-16 Settembre 2006
4. Picchietti S., **Guerra L.**, Buonocore Francesco., Fausto A. M., Mazzini M., Abelli L.,: Localization of CD8 $\alpha$  expressing T-cells in developing sea bass thymus: an hypothesis of positive selection. VIII Incontro della Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo, Napoli 1-2 Marzo 2007
5. **Guerra L.**, Fausto A. M., Randelli E., Abelli L., Buonocore F., Mazzini M., Picchietti S.: Espressione di geni coinvolti nello sviluppo di un sistema immunitario funzionale nel GALT della spigola *Dicentrarchus labrax* (L.). 68° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana, Lecce, 24-27 Settembre 2007
6. Amore V., Fochetti R., Belardinelli M., **Guerra L.**, Buonocore F., Fausto A.M.: Indagine sulla presenza di emocianine in specie di plecoteri (Insecta; Plecoptera). 68° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana, Lecce, 24-27 Settembre 2007

7. **Guerra L.**, Buonocore F., Randelli E., Fausto A.M., Abelli L., Picchietti S.: Thymocyte decisions in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): CD4 or CD8? Gene expression profiling and *in situ* hybridisation studies. IX Incontro della Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo, Varese 26-29 Febbraio 200
8. Picchietti S., **Guerra L.**, Randelli E., Bertoni F., Fausto A.M., Buonocore F., Abelli L.: Gene expression and functional studies on gut immune system of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). IX Incontro della Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo, Varese 26-29 Febbraio 2008
9. **Guerra L.**, Fausto A.M., Randelli E., Abelli L., Buonocore F., Mazzini M., Picchietti S.: Espressione di *CD4* e *CD8-α* nello sviluppo timico del teleosteo *Dicentrarchus labrax* (L.). 69° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana, Senigallia, 22-25 Settembre 2008

#### **Attività svolte durante il dottorato di ricerca:**

Luglio 2007: attività di studio e ricerca presso il laboratorio del Professor John Stoffolano dell'Università di Ahmerst, Massachussetts. Il lavoro è consistito nel campionamento e nella preparazione di alcuni campioni appartenenti a due specie di insetti: "*Phormia regina*" e "*Tabanus nigrovittatus*" per lo studio della morfologia e elettrofisiologia di alcuni apparati. E' attualmente in corso una collaborazione con il Prof. Stoffolano.

22-27 Giugno 2008: partecipazione al Workshop dal titolo: "(Shell) Fish Immunology" presso l'Università di Wageningen, Olanda.