

SOCIETÀ DEI NATURALISTI E MATEMATICI DI MODENA



ATTI
Vol. CXLVII

2016



Ivan Cuoghi*, **Aurora Pederzoli***, **Mauro Mandrioli***,
Lucrezia Mola*

Molecole coinvolte nella regolazione ionica in due specie di anfiosso provenienti da mari diversi

Riassunto

È stata dimostrata, con metodiche immunocitochimiche, la presenza in alcuni organi di due molecole coinvolte nella regolazione ionica e nel controllo del pH (NHE e NKA) in due specie di anfiosso, Branchiostoma lanceolatum e Branchiostoma floridae, provenienti rispettivamente dal Mar Mediterraneo e dall'Oceano Atlantico. È stato ipotizzato che la diversa immunoreattività alle due molecole nelle due specie possa essere messa in relazione alla diversità dei parametri chimico-fisici dei mari di provenienza.

Abstract

Molecules involved in ionic regulation in two species of lancelets from different seas. The presence of two molecules involved in osmoregulation and pH control (NHE and NKA) was demonstrated by immunocytochemical studies in Branchiostoma lanceolatum and B. floridae, coming from the Mediterranean Sea and Atlantic Ocean, respectively. The different pattern of immunoreactivity to these molecules in the two species of lancelets was discussed and correlated to the variability of chemical-physical parameters of the two seas of origin.

Parole chiave: Branchiostoma, osmoregolazione, pH, Mar Mediterraneo, Oceano Atlantico

Key Words: Branchiostoma, osmoregulation, pH, Mediterranean Sea, Atlantic Ocean

* Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia (Italia), Via Campi 213/D, 41125 MODENA, e-mail: lucrezia.mola@unimore.it.

1. Introduzione

«Egli guardò all'anfiosso con una speciale venerazione, in quanto unico animale vivente che permetteva di avere un'idea approssimativa degli antecessori dei primi vertebrati». Queste parole, utilizzate da Alfred Russell Wallace nella sua recensione del libro "*Anthropogeny: or, the Evolutionary History of Man*" di Ernst Haeckel, fanno già intendere l'importanza che questo piccolo animale, apparentemente insignificante, ha avuto per gli studiosi di evoluzione.

Gli anfiossi, lunghi 3-5 cm, sono bentonici, e hanno una distribuzione ampia lungo tutte le coste degli oceani e di alcuni mari interni, come ad esempio il Mar Mediterraneo. Costituiscono il gruppo dei *Cephalocordata* (che comprende circa 45 specie in maggioranza appartenenti al genere *Branchiostoma*), il cui nome deriva dal fatto che la notocorda, sistema assile anche nell'adulto, si estende lungo tutta la regione dorsale fino all'estremità cefalica. Questa struttura sostiene l'animale e ne irrigidisce le due estremità, facilitandone la spinta nella sabbia nelle due direzioni.

L'anfiosso è un detritivoro filtratore e quando si alimenta sporge dalla sabbia con l'estremità anteriore dotata di bocca e cirri boccali che filtrano l'acqua contenente particelle alimentari.

Per quanto riguarda l'interesse filogenetico, l'anfiosso è stato tradizionalmente considerato il *sister group* dei Cranioti e, quindi, anche dei Vertebrati; tuttavia recenti analisi di filogenesi molecolare indicano i Tunicati come *sister group* dei Vertebrati e i Cefalocordati come il gruppo basale di tutti i Cordati (Holland *et al.*, 2008; Putman *et al.*, 2008).

Il completamento del progetto genoma di *Branchiostoma floridae* ha rinnovato l'interesse per questo modello animale dando notevole impulso a tutte le indagini di tipo molecolare. In particolare, l'anfiosso è stato un modello molto popolare in biologia dello sviluppo sino agli anni '90 del secolo scorso, per poi essere sostituito da altri modelli più facilmente allevabili. Al contrario, proprio la sua posizione basale di tutti i Cordati rende l'anfiosso un modello molto intrigante per capire l'evoluzione nei metazoi di diverse vie metaboliche e funzioni, tra cui, ad esempio, l'osmoregolazione.

Nei pesci la regolazione ionica e del pH viene svolta da cellule specializzate presenti nel rene, nelle branchie e nella pelle, e anche l'intestino riveste un ruolo importante in queste funzioni (Evans *et al.*, 2005; Grosell, 2006).

Obiettivo delle nostre ricerche è studiare nell'anfiosso i sistemi implicati nella regolazione ionica e del pH, mediante indagini bioinformatiche e immunocitochimiche. Una precedente ricerca (Pederzoli *et al.*, 2014) ha dimostrato la presenza di geni orologi per la pompa protonica vacuolare (V-H⁺-ATPasi), il regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) e l'anidrasi carbonica II (CAII) in *Branchiostoma lanceolatum*. Tali molecole, implicate nella regolazione ionica e del pH, risultano distribuite in diversi distretti corporei e, in particolare, in tutte le cellule epidermiche.

In questa sede presentiamo i risultati relativi alla ricerca di altre due molecole implicate in tali processi, lo scambiatore sodio-idrogeno (NHE) e la sodio-potassio ATPasi (Na^+/K^+ ATPasi o NKA) in due specie di anfiosso provenienti da mari diversi: *B. lanceolatum* proviene dal Mediterraneo (Mar Tirreno), mentre *B. floridae* dall'Oceano Atlantico (coste della Florida).

2. Materiali e metodi

Esemplari adulti di *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas, 1774) e *Branchiostoma floridae* Hubbs 1922 (lunghi circa 5 cm) sono stati gentilmente forniti dal prof. M. Pestarino (Università di Genova) già fissati in formalina 4%. Cinque esemplari per ogni specie sono stati disidratati in alcool, inclusi *in toto* in paraffina, tagliati in sezioni di 7 μm e processati sia con la metodica dell'immunofluorescenza sia con quella avidina-biotina (BAS). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi policlonali primari (Santa Cruz, USA): anti-NHE (1:50, 1:100) e anti- Na^+/K^+ ATPasi (1:50, 1:100). Per l'immunofluorescenza i vetrini sono stati lavati in tampone PBS 0.01M a pH 7,4 e incubati in *normal serum* 10% con l'aggiunta dello 0,3% di Triton per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente; dopo ulteriore lavaggio in PBS sono stati incubati con anticorpo primario (con lo 0,3% di Triton) in camera umida a 4 °C per una notte; successivamente sono stati lavati in PBS e incubati per 30 minuti in camera umida con anticorpo secondario biotinilato (4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ di PBS più lo 0,3% di Triton). Dopo altri lavaggi in PBS i preparati sono stati incubati con anticorpo secondario avidinato, coniugato con il fluorocromo TRITC (Sigma-Aldrich) e diluito 1:20 (più lo 0,3% di Triton), per un'ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in PBS i vetrini sono stati montati con DABCO e osservati al Microscopio Confocale Laser del "Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti" dell'Università di Modena e Reggio Emilia.

Per la metodica BAS i vetrini, dopo lavaggio in PBS, sono stati incubati in metanolo con lo 0,3% di perossido di idrogeno a 36 volumi per eliminare le perossidasi endogene, poi, dopo ulteriore lavaggio in PBS, sono stati incubati in *normal serum* 10% con l'aggiunta dello 0,3% di Triton per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente; dopo ulteriore lavaggio in PBS sono stati incubati con anticorpo primario (più lo 0,3% di Triton) in camera umida a 4 °C per una notte; successivamente sono stati lavati in PBS e incubati con anticorpo secondario biotinilato (4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ di PBS più lo 0,3% di Triton); dopo un lavaggio in PBS e due in tampone Tris 0.1M a pH 7,6 i vetrini sono stati incubati per 45 minuti in complesso Avidina-Biotina, lavati in Tris e incubati al buio per 10 minuti in una soluzione formata da 40 ml di Tris, una pastiglia di DAB (3,3-diaminobenzidina, Sigma) e 14 μl di acqua ossigenata a 36 volumi. Dopo un passaggio in Tris e un lavaggio in acqua corrente, i vetrini sono stati disidratati e chiusi con Eukitt. La specificità delle reazioni è stata verificata con controlli negativi incubando le sezioni con PBS anziché

con anticorpo primario o con *normal serum* anziché con anticorpo primario.

Data la disponibilità del progetto genoma di *B. floridae*, è stata verificata a livello bioinformatico la presenza dei geni codificanti NHE e NKA in modo da ottimizzare la scelta degli anticorpi da utilizzare e confermare l'esito delle indagini immunocitochimiche. La ricerca dei diversi geni è stata effettuata nel database *Metazome* (<http://www.metazome.net/>), nel sito dedicato al progetto genoma di *B. floridae* (<http://genome.jgi-psf.org>) e su *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ricorrendo anche ad allineamenti di sequenza condotti con *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) per identificare le porzioni maggiormente conservate.

3. Risultati

La ricerca di orologi per lo scambiatore sodio-idrogeno (NHE) e la sodio-potassio ATPasi (Na^+/K^+ ATPasi o NKA) ha permesso di evidenziare nel genoma di *B. floridae* la presenza dei geni BRAFLDRAFT_217402 e BRAFLDRAFT_122237 che codificano per proteine con elevati livelli di identità (60%) e similarità (oltre il 70%) con le proteine NHE e NKA umane e murine, oltre che presentare gli stessi domini funzionali. Il fatto che *B. floridae* presenti orologi molto conservati ha rappresentato un ottimo dato di partenza per scegliere gli anticorpi da utilizzare in anfiosso (Fig. 1), data l'assenza di anticorpi commerciali specificatamente dedicati all'anfiosso.

L'esame microscopico dei preparati istologici di *B. floridae* ha mostrato che l'immunoreattività ad anticorpi anti-NHE e NKA è osservabile, sia con la metodica BAS sia con l'immunofluorescenza, in tutti i distretti corporei esaminati: sistema digerente compreso il cieco (Fig. 2a), epidermide ventrale e dorso-laterale (Fig. 2c), epitelio celomatico, protonefridi (Fig. 2a) e papille renali.

I preparati ottenuti da *B. lanceolatum* e trattati con le stesse modalità hanno mostrato un'immunoreattività a entrambe le molecole distribuita negli stessi organi, ma in generale meno intensa (Figg. 2b, 2d). In particolare nell'epidermide le cellule presentano un'immunopositività ben evidente sul bordo apicale (Fig. 2d).

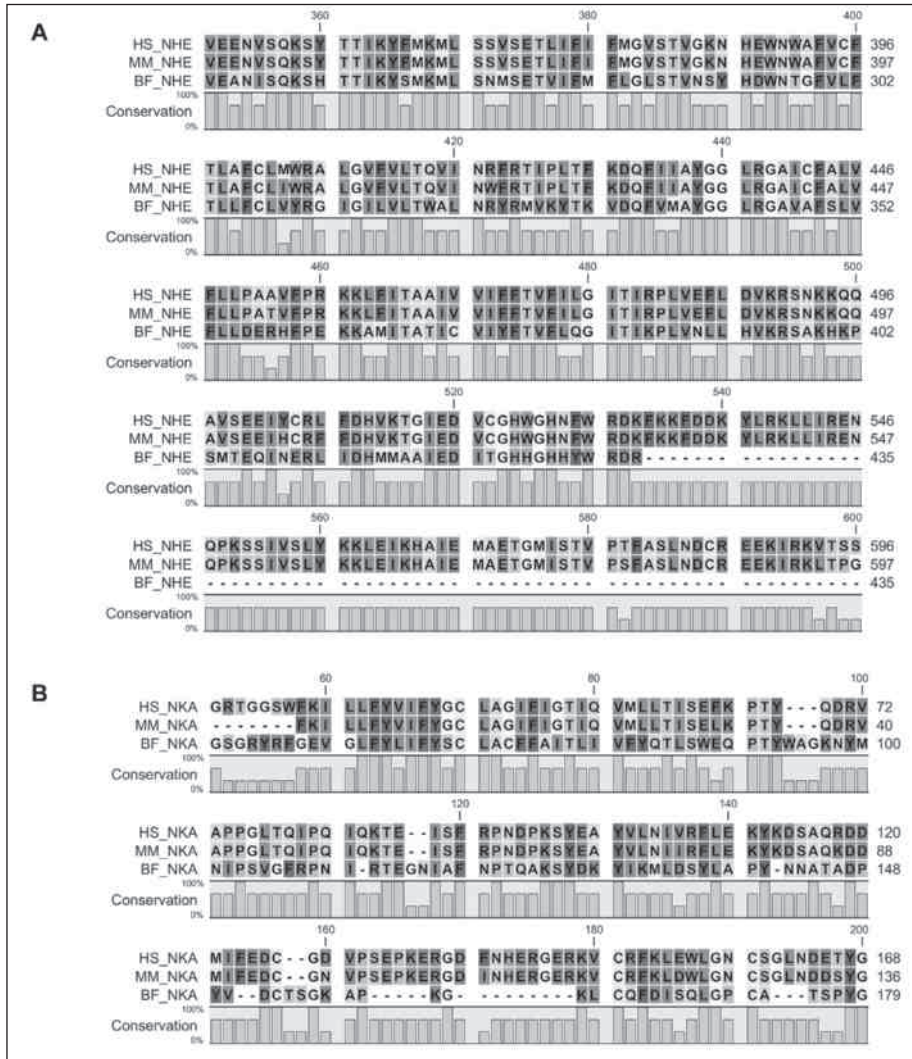


Fig. 1 – Allineamento delle sequenze aminoacidiche delle proteine NHE (A) e NKA (B) nelle porzioni riconosciute dagli anticorpi utilizzati per le reazioni immunostochimiche. In entrambi i casi si evidenziano tratti con elevata similarità.

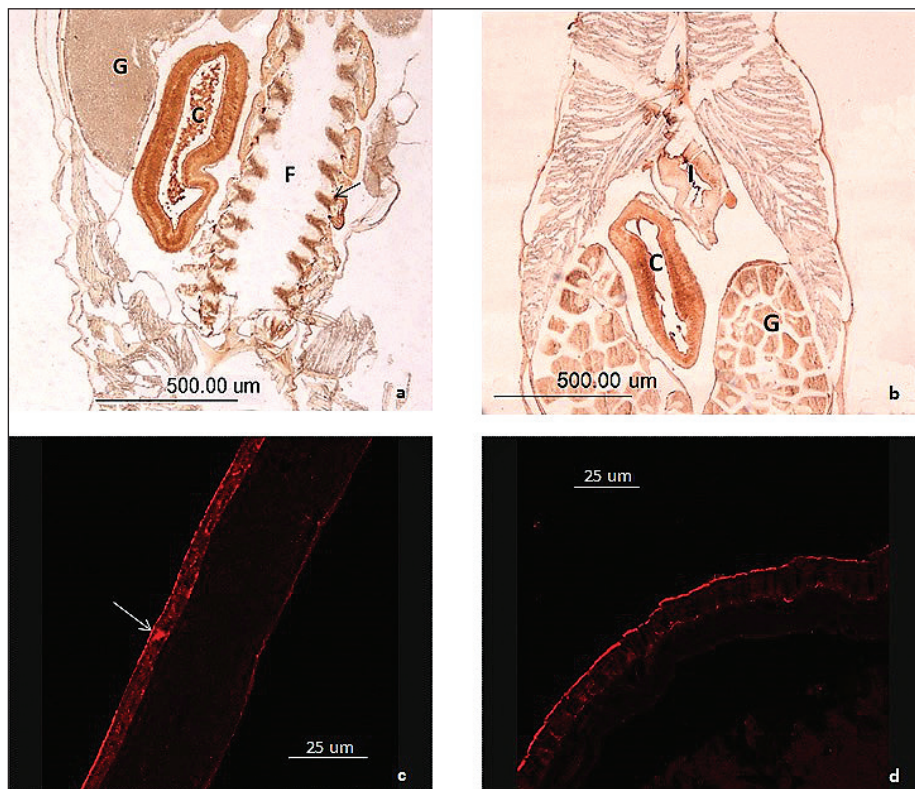


Fig. 2 – a) Sezione trasversale di *Branchiostoma floridae* trattata (metodo BAS) con anticorpi anti-NHE (1:100): immunoreattività intensa nelle cellule del cieco (C) e nei protonefridi (freccia). F = faringe, G = gonade; b) sezione trasversale di *Branchiostoma lanceolatum* trattata (metodo BAS) con anticorpi anti-NHE (1:100): immunoreattività non intensa nelle cellule del cieco (C) e debole in quelle intestinali (I). G = gonade; c) sezione trasversale di *Branchiostoma floridae* trattata (metodo immunofluorescenza) con anticorpi anti-NKA (1.50): immunoreattività intensa nelle cellule dell'epidermide dorso-laterale, la freccia indica una cellule particolarmente immunopositiva; d) sezione trasversale di *Branchiostoma lanceolatum* trattata (metodo immunofluorescenza) con anticorpi anti-NKA (1:50): immunoreattività debole nelle cellule dell'epidermide dorso-laterale, più spiccata sul bordo apicale delle cellule.

4. Discussione

Regolazione del pH e mantenimento dell'omeostasi ionica sono sfide fisiologiche comuni a tutti gli animali: il pH è un parametro biochimico il cui range deve essere mantenuto entro limiti definiti, all'interno dei quali la maggior parte delle reazioni enzimatiche avviene in modo ottimale. Le reazioni metaboliche producono CO_2 come prodotto di scarto, che viene trasformata in H_2CO_3 , a sua volta scisso in protoni e ioni bicarbonato; l'accumulo di pro-

toni, se non controllato, porterebbe ad un rapido aumento dell'acidità citoplasmatica con conseguenze drammatiche per la funzionalità cellulare, da cui deriva la necessità di meccanismi che mantengano il pH in equilibrio. Anche la regolazione della concentrazione ionica dei fluidi organici è un parametro fondamentale per la sopravvivenza degli organismi; tuttavia i meccanismi attivati nel controllo di questo parametro sono diversi in relazione all'ambiente in cui l'animale vive. Gli animali marini possono essere osmoconformi, come le mixine, o osmoregolatori, come i teleostei. Nonostante il nome, anche gli osmoconformi regolano gli ioni, almeno da un punto di vista qualitativo, poiché i loro fluidi interni contengono in parte ioni diversi da quelli presenti in acqua di mare.

Nei pesci la regolazione ionica e del pH viene svolta da cellule specializzate presenti nel rene, nelle branchie e nella pelle (Catches *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2005; Gilmour & Perry, 2009; Tresguerres *et al.*, 2006, 2007); in queste funzioni è anche coinvolto l'apparato digerente (Evans 2010; Grosell 2006; Grosell *et al.*, 2009; Sardella *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2010). L'anfiosso, avendo un'anatomia molto più semplice dei pesci, non possiede reni (ma solo piccole papille renali e protonefridi a solenociti), né branchie specializzate; anche il tratto digerente è molto più basilare, in quanto è lineare e comprende un voluminoso cieco digerente che assume contemporaneamente le funzioni di stomaco, fegato e pancreas.

Per quanto riguarda le molecole testate in questa ricerca l'NHE svolge un importante ruolo nel controllo del pH intracellulare: gli ioni H^+ vengono trasportati al di fuori della cellula, mentre gli ioni Na^+ entrano nella cellula; la localizzazione di questo trasportatore all'interno della cellula determina il microambiente di destinazione dei protoni in uscita. La Na^+/K^+ ATPasi è localizzata sulla membrana cellulare ed agisce mediante un meccanismo di antiporto: infatti permette il trasporto contro il gradiente di concentrazione di tre ioni Na^+ verso l'ambiente extracellulare e due ioni K^+ verso l'ambiente intracellulare, sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP.

I risultati ottenuti nella presente ricerca indicano che pelle, epitelio celomatico, papille renali e protonefridi e cieco intestinale, mostrando immunoreattività alle due molecole, sono coinvolti nella regolazione del pH e/o ionica. Per l'anfiosso sono molto scarsi i dati relativi alla composizione dei fluidi interni; *B. floridae*, allevato a diverse concentrazioni saline, non mostra alterazioni degli organi escretori e questo ha fatto ipotizzare che possa essere isosmotico, o eventualmente che osmoregoli con organi diversi da quelli escretori (Moller & Ellis, 1974).

Confrontando i risultati ottenuti in *B. floridae* con quelli ottenuti in *B. lanceolatum* per le due molecole testate si può osservare in generale una minore immunoreattività in tutti i distretti corporei per quest'ultima specie. Ciò potrebbe essere attribuito all'adattamento a due mari che presentano caratteri-

stiche ecologiche non perfettamente sovrapponibili, dovute a una diversa variabilità dei parametri chimico-fisici: in particolare il Mediterraneo (ambiente di provenienza del *B. lanceolatum*) è un bacino chiuso, di conseguenza meno soggetto a variazioni brusche di salinità e di altri parametri rispetto all'Oceano Atlantico (ambiente di provenienza del *B. floridae*); da ciò potrebbe derivare una maggior necessità di regolare il pH e gli equilibri ionici in *B. floridae* rispetto a *B. lanceolatum*.

Recenti pubblicazioni (Holland *et al.*, 2008; Putman *et al.*, 2008) suggeriscono che i primi Cordati dovevano essere molto simili all'anfioso, cioè dovevano possedere ridotte dimensioni, muscoli segmentali derivati dai somiti, una notocorda, un cordone nervoso dorsale, una serie di fessure faringee, un set base di funzioni endocrine e una robusta immunità innata.

Sulla base dei dati qui riportati si può ipotizzare che anche i sistemi per l'osmoregolazione (oggi ben caratterizzati nei vertebrati) fossero già presenti nei primi Cordati al pari dell'anfioso, andando poi a localizzarsi in specifiche strutture anatomiche nel corso dell'evoluzione dei vertebrati.

Bibliografia

- CATCHES J.S., BURNS J.U. M., EDWARDS S.L., CLAIBORNE J.B., 2006 – *Na⁺/H⁺ natiprotet, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization in a marine teleost (Myoxocephalus octodecempinosus)*. J. Exp. Biol., **209**, pp. 3440-3447.
- EVANS D.H., 2010 – *A brief history of the study of fish osmoregulation: the central role of the Mt. Desert Island Biological Laboratory*. Front. Physiol., **13**, pp. 1-10.
- EVANS D.H., PIERMARINI P.M., CHOE K.P., 2005 – *The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste*. Physiol. Rev., **85**, pp. 97-177.
- GILMOUR K.M., PERRY S.F., 2009 – *Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish*. J. Exp. Biol., **212**, pp. 1647-1661.
- GROSELL M., 2006 – *Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation*. J. Exp. Biol., **209**, pp. 2813-2827.
- GROSELL M., MAGER E.M., WILLIAMS C., TAYLOR J.R., 2009 – *High rates of HCO₃⁻ secretion and Cl⁻ adsorption against adverse gradients in the marine teleost intestine: the involvement of an electrogenic anion exchanger and H⁺ pump metabolon?* J. Exp. Biol., **212**, pp. 1684-1696.
- HOLLAND L.Z., ALBALAT R., AZUMI K., BENITO-GUTIERREZ E., BLOW M.J., BRONNER-FRASER M., 2008 – *The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalocordate biology*. Genome Res., **18**, pp. 1100-1111.
- MOLLER P.C., ELLIS R.A., 1974 – *Fine structure of the excretory system of Amphioxus (Branchiostoma floridae) and its response to osmotic stress*. Cell Tissue Res., **148**, pp. 1-9.
- PEDERZOLI A., MANDRIOLI M., MOLA L., 2014 – *Expression of carbonic anhydrase, cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) and V-H⁺-ATPase in the lancelet Branchiostoma lanceolatum (Pallas, 1774)*. Acta Histochem., **116**, pp. 487-492.
- PUTNAM N.H., BUTTS T., FERRIER D.E., FULONG R.F., HELLSTEN U., KAWASHIMA T., ROBINSON-RECHAVI M., SHOGUCHI E., TERRY A., YU J.K., BENITO-GUTIÉRREZ E.L., DUBCHAK I., GARCIA-FERNÁNDEZ J., GIBSON-BROWN J.J., GRIGORIEV I.V., HORTON A.C., DE JONG P.J., JURKA J., KAPITONOV V.V., KOHARA Y., KUROKI Y., LINDQUIST E., LUCAS S., OSOEGAWA K., PENNACCHIO L.A., SALAMOV A.A., SATOU Y., SAUKA-SPENGLER T., SCHMUTZ J., SHIN-I T., TOYODA A., BRONNER-FRASER M., FUJIYAMA A., HOLLAND L.Z., HOLLAND P.W., SATOH N., ROKHSAR D.S., 2008 – *The amphioxus genome and the evolution of the Chordate karyotype*. Nature, **453**, pp. 1064-1072.
- SARDELLA B.A., BAKER D.V., BRAUNER C.J., 2009 – *The effects of variable water salinity and ionic compo-*

- sition on the plasma status of the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). *J. Comp. Physiol., Part B*, **179**, pp. 721-728.
- TRESGUERRES M., PARKS S.K., GOSS G.G., 2006 – *V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase and NHE2 immunoreactivity in the gill epithelium of the Pacific hagfish (*Epatretus stoutii*)*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, **145**, pp. 312-321.
- TRESGUERRES M., PARKS S.K., GOSS G.G., 2007 – *Recovery from blood alkalosis in the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*): involvement of gill V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, **148**, pp. 133-141.
- WOOD C.M., BUCKING C., GROSELL M., 2010 – *Acid-base response to feeding and intestinal Cl⁻ uptake in freshwater and seawater acclimated killifish, *Fundulus heteroclitus*, an agastric euryaline teleost*. *J. Exp. Biol.*, **213**, pp. 2681-2692.