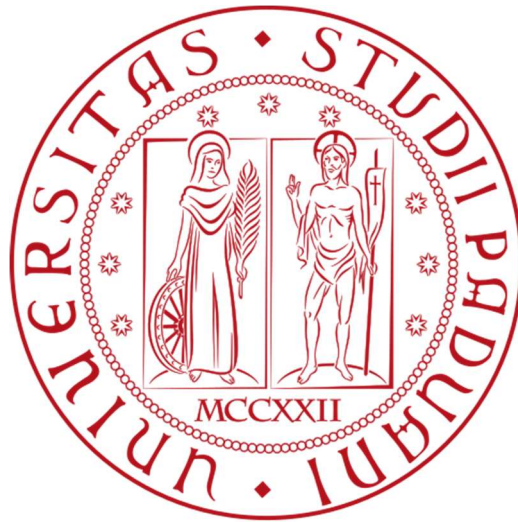


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA
**Vie di trasduzione del segnale coinvolte nella
degranolazione delle cellule morulari
nell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri***

Relatore: Prof. Lorian Ballarin
Dipartimento di Biologia

Laureando: Alessandro Berton

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. Introduzione:	
1.1. <i>Botryllus schlosseri</i> :	
1.1.1. La colonia di <i>B. schlosseri</i>	3
1.1.2. Emolinfa, emociti e siti emopoietici.....	3
1.2. Immunità in <i>B. schlosseri</i> :	
1.2.1. Fagocitosi.....	5
1.2.2. Infiammazione.....	6
1.3. Alloriconoscimento.....	6
1.4. Scopo della tesi.....	8
2. Materiali e metodi:	
2.1. Esperimenti in vitro:	
2.1.1. Animali.....	8
2.1.2. Preparazione del plasma eterologo.....	8
2.1.3. Prelievo degli emociti.....	9
2.1.4. Saggi di degranulazione.....	9
2.1.5. Analisi statistiche.....	9
2.2. Esperimenti in vivo:	
2.2.1. Allestimento delle parabiosi.....	9
2.2.2. Trattamento delle colonie.....	10
2.2.3. Fissazione ed inclusione delle parabiosi.....	10
2.2.4. Allestimento e colorazione dei vetrini.....	10
2.2.5. Analisi al microscopio e statistiche.....	10
3. Risultati:	
3.1. Esperimenti in vitro	
3.1.1. WM 1 μ M.....	10
3.1.2. WM 0.1 μ M.....	12
3.2. Esperimenti in vivo.....	13
4. Discussione.....	15
5. Ringraziamenti.....	17
6. Bibliografia.....	18

1. Introduzione.

1.1. *Botryllus schlosseri*.

1.1.1. La colonia di *B. schlosseri*.

Botryllus schlosseri è una ascidia coloniale appartenente al phylum dei cordati, subphylum urocordati o tunicati. Si tratta di specie cosmopolita, in grado di riprodursi per via sessuata o asessuata anche in laboratorio, caratterizzata da una rapida embriogenesi; da più di 70 anni viene utilizzata come organismo modello per lo studio di diversi fenomeni, tra cui riproduzione asessuata, rigenerazione, immunobiologia e alloriconoscimento [1]

Le colonie di *B. schlosseri* sono rivestite da una tunica composta da una matrice amorfa che accoglie fibre di collagene, proteoglicani, glicoproteine e cellulosa in cui sono immersi gli zoidi, raggruppati in sistemi di forma stellata e che condividono un sifone esalante comune [2]. I sistemi sono interconnessi da un sistema vascolare coloniale di origine epidermica, che si dirama tra zoidi e gemme, attraversa la tunica e converge in un grosso vaso marginale, lungo il perimetro della colonia formando una corona di terminazioni ovali a fondo cieco chiamate ampolle [3].

La colonia origina da una larva natante che, una volta adesa ad un substrato, metamorfosa in oozoide. La larva possiede le caratteristiche tipiche dei cordati, tra cui la notocorda, il tubo neurale dorsale, la faringe fessurata e la coda muscolare., inoltre origina da riproduzione sessuale e si sviluppa all'interno dello zoide prima di essere rilasciata. Con la formazione dell'oozoide inizia anche la riproduzione asessuale della colonia, per cui dall'oozoide si forma il blastozoide capace di formare più di ogni zoide sviluppa una gemma primaria, quest'ultima capace di sviluppare una gemma secondaria. Nella colonia, gli zoidi adulti vengono periodicamente riassorbiti e sostituiti dalle loro gemme in un processo definito regressione o take over (TO) che si ripete ad intervalli settimanali alla temperatura di 20°C [4]. Viene definito ciclo blastogenetico l'intervallo di tempo tra due TO successivi. Durante il TO si osserva un incremento dell'apoptosi nelle cellule dei tessuti degli zoidi adulti: le cellule apoptotiche vengono ingerite dai fagociti circolanti che sono pertanto responsabili del progressivo riassorbimento degli zoidi. Nel frattempo, le gemme primarie completano il loro sviluppo in zoidi funzionali e rimpiazzano i vecchi zoidi, mentre le gemme secondarie diventano gemme primarie e formano una nuova generazione di gemme secondarie [5,6]. Dal momento che, come già detto, in condizioni ottimali, uno zoide produce più di una gemma, la colonia si ingrandisce nel tempo.

1.1.2. Emolinfa, emociti e siti emopoietici.

Il sistema circolatorio delle ascidie è di tipo aperto. L'emolinfa di *B. schlosseri* è formata da plasma incolore nel quale sono immersi diversi tipi di emociti.

Gli emociti circolanti possono essere divisi in 4 categorie, in accordo con Ballarin et al. [8]:

1) EMOBLASTI o LIMPHOCYTE-LIKE CELLS (LLCs)

Hanno un diametro tra i 4 e 6 μm , un nucleo centrale contenente 1 o 2 nucleoli e un sottile strato di citoplasma attorno al nucleo. Rappresentano il 2-4% degli emociti circolanti nella colonia. Vengono riconosciuti da anticorpi anti-CD34 [8];

2) FAGOCITI

Includono gli amebociti ialini (HA) e le cellule macrofago-simili (MLC):

-Gli HA sono lunghi 6-12 μm e hanno una forma ameboide, ricca di pseudopodi. Possiedono un nucleo sferoidale; nel citoplasma si possono identificare lisosomi e, talvolta, piccoli vacuoli contenenti materiale ingerito. La loro percentuale varia dal 12-25% durante il TO al 23-42% nel resto del ciclo blastogenetico [8].

-Le MLC derivano da amebociti ialini che hanno ingerito materiale estraneo, hanno forma sferoidale, con un diametro di 10-15 μm e la maggior parte del volume è occupato da uno o alcuni grandi vacuoli. Compongono il 10-12% degli emociti durante le fasi intermedie del ciclo blastogenetico e il 20-30% durante il TO. Sono riconosciute da anticorpi anti-CD39 [8].

L'attivazione dei fagociti porta ad una cascata di reazioni che coinvolgono Ras, MAPk e NF-Kb. Queste molecole sono coinvolte anche nelle vie di trasduzione dei fagociti umani e questo supporta l'ipotesi che i principali pathways molecolari di attivazione dei fagociti si siano conservati tra urocordati e vertebrati [9].

3) CELLULE DI ACCUMULO

Comprendono i nefrociti e le cellule pigmentate (CP). Hanno un diametro di 10-15 μm e il citoplasma è quasi interamente occupato da vacuoli contenenti cristalli di diversa natura che, *in vivo*, appaiono arancioni o blu nelle CP e giallognoli nei nefrociti. Hanno una frequenza del 3-10 % [8];

4) CELLULE CITOTOSSICHE

Comprendono gli amebociti granulari e le cellule morulari (CM). Gli amebociti granulari misurano 7-10 μm in diametro, hanno forma ameboide, possiedono molti piccoli granuli di colore giallo pallido e compongono il 2,5-5% degli emociti. Si ritiene siano i precursori delle CM [8] dal momento che condividono con esse molte proprietà citochimiche e citoenzimatiche [2].

Le CM hanno forma sferoidale, con un diametro di 10-15 μm e contengono al loro interno granuli di 2 μm di diametro il contenuto dei quali acquista una colorazione giallo-verde dopo fissazione con aldeidi [8]. Devono il loro nome all'aspetto bitorzolato che assumono dopo fissazione. Formano oltre il 50% degli emociti circolanti [2]. Sono coinvolte nel riparo dei vasi danneggiati e nella sintesi della tunica [13]. Inoltre, giocano un ruolo fondamentale nelle risposte immunitarie: esse infatti sono le prime cellule a percepire il nonself e, in conseguenza di ciò, rilasciano citochine ad attività immunomodulatoria e degranulano rilasciando sostanze citotossiche. Questo fenomeno si osserva in seguito al riconoscimento di fattori contenuti nel plasma eterologo, di batteri e di cellule di lievito [14].

Le CM di *B. schlosseri* trascrivono il gene *bsc3* per il fattore C3 del complemento, i geni *bsmbl*, *bsfcn* e *bsmasp1* della via lectinica del complemento [22] e il gene *bsbf* della alternativa [15]. Le lectine leganti mannosio (MBLs) e le ficoline (FCNs) sono deputate al riconoscimento di zuccheri della parete dei patogeni e all'innescamento della via lectinica mediante l'attivazione delle serin proteasi associate a MBL (MASP), che scindono C3 in C3a e C3b [15]. Nella via alternativa, invece, il fattore B (BF) può essere scisso in Bb, quest'ultimo può legare una molecola di C3b e formare la convertasi di C3.

I centri di ematopoiesi di *B. schlosseri* ad oggi conosciuti sono: i) la nicchia endostilare: situata nel seno subendostilare, in cui sono state identificate cellule staminali somatiche [7]; ii) le "cell islands": siti di accumulo di emociti ai lati dell'endostilo, in numero variabile, più abbondante negli zoidi adulti. All'interno di queste ultime si trovano cellule diverse per dimensione, morfologia e numero di nuclei, tra le quali sono state identificate cellule staminali somatiche e germinali [6].

Il numero di emociti aumenta gradualmente durante l'embriogenesi insieme allo sviluppo del sistema circolatorio. I primi tipi cellulari ad essere prodotti sono gli emoblasti e le CM, identificabili già nella larva precoce. Negli stadi medio tardivi invece si possono rilevare gli HA e durante la metamorfosi sono riscontrabili le MLC. Solo dall'oozoide in poi compaiono nefrociti e cellule pigmentate [5].

La tunica infine possiede numerose cellule del sistema circolatorio e la cui forma ricorda quella amebociti ialini [2].

1.2. Immunità in *B. schlosseri*.

Come tutti gli invertebrati, *B. schlosseri* è dotato di sola immunità innata. Le principali risposte immunitarie sono pertanto la fagocitosi e l'infiammazione.

1.2.1. Fagocitosi.

La fagocitosi richiede l'interazione con le particelle nonself mediante integrine in grado di riconoscere il peptide RGD (Arginina–Glicina–Aspartato) [10].

La fagocitosi è favorita da opsonine; ad oggi in *Botryllus* ne sono state identificate due: il fattore C3b del complemento e la lectina legante ramnosio (BsRBL). C3b deriva dal taglio di C3; quest'ultimo è secreto dalle CM in risposta al riconoscimento del nonself. BsRBL è una lectina Ca²⁺-indipendente, di 118 aa, prodotta dai fagociti in risposta a citochine secrete dalle CM. Le funzioni di BsRBL sono molteplici e sembrano dipendere dalla sua concentrazione nel mezzo: a livelli più bassi (<10 µg/ml) esercita un effetto chemiotattico sui fagociti; a livelli medi (30 µg/ml) funge da opsonina e intensifica il *burst* respiratorio, aumentando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dei fagociti; a livelli alti (>60 µg/ml) induce la degranolazione delle CM e incrementa il loro rilascio di citochine riconosciute da anticorpi anti-citochine pro-infiammatorie. BsRBL inoltre facilita l'individuazione dei target da parte dei fagociti in quanto causa l'agglutinazione di cellule nonself quali eritrociti di coniglio, lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) e alcuni batteri [11]. Il legame con il nonself avviene in seguito al riconoscimento da parte di recettori ad oggi ancora in fase di studio.

In *Botryllus*, inoltre, è stato identificato un gene codificante per un Toll-like receptor (TLR) putativo, chiamato *bstlr1*. La proteina, bsTRL1, viene trascritta sia dai fagociti sia dalle CM e la sua espressione aumenta dopo incubazione degli emociti con lipopolisaccaride (LPS) di *Escherichia coli* o con zymosan. BsTLR1 condivide il 21% della sequenza con TLR6 e il 20% con TLR5 umani [12].

Il riconoscimento del nonself innesca una cascata di reazioni mediata da protein-chinasi A (PKA) e protein-chinasi C (PKC). Queste attivano una proteina G trimerica che, a sua volta, attiva la produzione di inositolo 3 fosfato (IP3) da parte di una

fosfolipasi C. L'aumento di IP3 porta ad un incremento di Ca^{2+} citosolico limitato nel tempo, indispensabile affinché avvenga la fagocitosi [2].

1.2.2. Infiammazione.

L'infiammazione è indotta dal riconoscimento del nonself da parte delle CM. Come nei vertebrati, comporta un reclutamento selettivo di cellule pro-infiammatorie indotto dalla secrezione di citochine da parte delle CM stesse e dalla produzione di C3a derivante dal taglio di C3. Il reclutamento porta alla fuoriuscita delle CM dai vasi, nei tessuti, verso il sito d'infezione, dove avviene la degranolazione con il conseguente aumento della citotossicità. Un particolare tipo di infiammazione si osserva nel fenomeno dell'alloriconoscimento.

1.3. Alloriconoscimento.

Con alloriconoscimento si intende la capacità di discriminazione intraspecifica del nonself. In *B. schlosseri*, esso si manifesta come specificità coloniale che porta alla fusione o al rigetto di due colonie giunte a contatto, a seconda che siano o meno geneticamente compatibili.

Analogamente alle cellule *natural killer* (NK) umane, l'alloriconoscimento in botrillo sembrerebbe seguire la "missing self-hypotesis", per cui la mancanza del segnale inibitorio dato dal riconoscimento di fattori umorali compatibili porterebbe all'attivazione delle CM stesse [4, 7]. In *B. schlosseri* è stata identificata la presenza di un gene putativo per un ortologo di CD94, un recettore che nell'uomo è presente sotto forma di eterodimero con la proteina NKG2 sulla membrana delle NK e di alcuni linfociti CD8. L'espressione della corrispondente proteina, bsCD94, è stata rilevata in alcuni emociti [17]. Nell'uomo, i ligandi di questo recettore sono rappresentati da HLA-E [16] e l'interazione ligando-recettore rappresenterebbe un segnale di inibizione dell'attività citotossica precedentemente attivata dal legame con una cellula target: in questo modo NK e CD8 possono distinguere cellule self sane da cellule infettate da virus, tumorali o non self [17].

La fusibilità coloniale è determinata dalla condivisione o meno di almeno un allele ad un locus di istocompatibilità altamente polimorfico. Nel primo caso, si ha la formazione di un'unica colonia chimerica nella quale tunica e sistema vascolare sono condivisi. Nella colonia chimerica avvengono generalmente 2 fenomeni: i) il progressivo riassorbimento degli zoidi di una delle due colonie (riassorbimento allogenico); ii) l'instaurarsi di una competizione tra le cellule staminali delle due colonie. Qualora le cellule staminali "vincitrici" si infiltrino nelle gonadi della colonia chimerica, verrà trasmesso alla progenie in misura maggiore il genotipo "vincente" (parassitismo germinale); anche a livello somatico può instaurarsi una competizione tra linee cellulari che sfocia in parassitismo somatico [4].

Se, invece, ad incontrarsi sono colonie geneticamente incompatibili, si innesca una reazione di repulsione con conseguente formazione di zone necrotiche lungo i margini di contatto [4], che appaiono come macchie pigmentate scure [13]. In questo caso, il contatto porta ad una iniziale fusione parziale della tunica, un accumulo di CM all'apice delle ampolle dei margini coloniali contrapposti [13] e un aumento di permeabilità dell'epitelio ampollare [18], con conseguente fuoriuscita

delle CM nella tunica [19]. Il tutto sarebbe mediato dal riconoscimento di fattori solubili non self provenienti dall'altra colonia, che indurrebbero sia la chemiotassi delle CM verso la regione di contatto, sia la loro degranulazione con conseguente rilascio del contenuto dei granuli, tra cui l'enzima fenolossidasi (PO) che, agendo su substrati polifenolici, pure rilasciati dalle CM, induce la formazione di melanina e ROS [14].

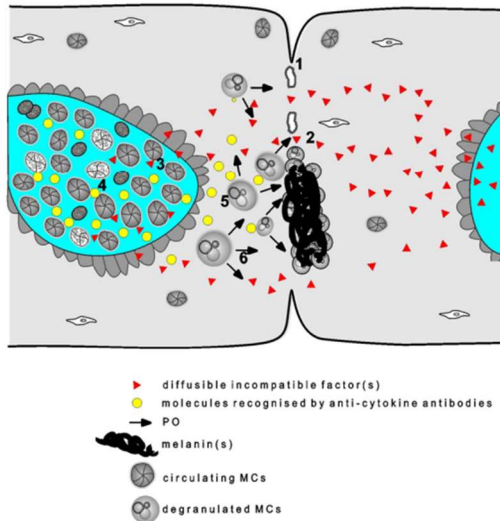


Figura 1 | rappresentazione schematica di una repulsione in *B. schlosseri*. Per semplicità i principali eventi sono indicati solo nella colonia di sinistra. 1: parziale fusione delle tuniche; 2: diffusione dei fattori attraverso fusione; 3: riconoscimento dei fattori eterologhi dalle CM all'interno delle ampolle; 4: rilascio di citochine dalle CM attivate; 5: fuoriuscita delle CM e la loro degranulazione nella tunica; 6: rilascio di PO; 7: citotossicità e formazione di melanina nei punti di rigetto. Modificata da [2].

L'istocompatibilità è governata dal locus genico altamente polimorfico fusibility/histocompatibility (*fuhc*) [19, 20]. Negli anni sono stati identificati diversi geni potenzialmente implicati nell'alloriconoscimento. Inizialmente i più accreditati erano i due geni *fuhc^{sec}* e *fuhctm*, codificanti rispettivamente per la forma secreta e transmembrana della proteina. Questi non vengono espressi in egual modo nell'organismo, ad esempio nell'epitelio ampollare parrebbe che la forma secreta venga codificata in quantità ampiamente maggiore della forma transmembrana. Si ritiene che entrambe le proteine abbiano come ligando la famiglia di recettori Fester, espresse nell'epitelio ampollare e da alcuni emociti come le MLC ma non dalle MC; il gene altamente polimorfico *fester* apparterrebbe anch'esso al locus *fuhc*. È probabile che *fester* e *fuhc* siano coinvolti nell'alloriconoscimento, tuttavia i meccanismi biochimici e molecolari non sono ancora ben definiti [10].

Più recentemente è stato identificato un altro gene di per un *Botryllus histocompatibility factor* (BHF), composto da 3 esoni codificanti per una catena di 252 aa. È altamente polimorfico e la sua variabilità intercoloniale si è dimostrata perfettamente in linea con il comportamento delle colonie analizzate nei saggi di istocompatibilità. La sua espressione è piuttosto diffusa nell'organismo ed è stata riscontrata, tra l'altro, negli epitelii di vasi e ampolle e nelle CM [20]. Due colonie per essere compatibili dovrebbero condividere almeno un allele al locus di BHF [4]. L'enzima PO è fondamentale nella formazione delle zone di necrosi, perché agisce ossidando i polifenoli, presenti nelle CM, a chinoni, i quali causerebbero la morte localizzata delle cellule migrate nella tunica e polimerizzerebbero formando melanina che dà il caratteristico colore scuro delle zone di necrosi. Si pensa che, nelle CM inattive, la PO sia contenuta nei granuli in forma inattiva e che i polifenoli

siano mascherati dal legame con dei solfuri, nel momento dell'attivazione i polifenoli verrebbero resi disponibili mediante l'azione di un altro enzima contenuto all'interno dei granuli delle CM, la arilsulfatasi [13].

Assieme alle molecole citotossiche vengono secrete dalle CM anche citochine riconosciute da anticorpi anti-IL1 α e anti-TNF α [14, 21]. Si ipotizza che questi mediatori abbiano il ruolo di richiamare e attivare altre CM e fagociti [14].

1.4. Scopo della tesi.

Recenti studi nei mammiferi hanno fatto emergere il coinvolgimento della PI3K nelle vie di trasduzione legate all'interazione delle cellule immunitarie con integrine della matrice [32]. Si è osservato inoltre che l'attivazione dei linfociti mediata dal legame con integrine viene bloccata dalla wortmannina (WM), uno specifico inibitore della PI3K [10]. Questo ha portato Ballarin et al. [10] a studiare l'effetto della WM sulla attività fagocitica e sulla diffusione dei fagociti: l'effetto inibitorio riportato lascia intuire che la PI3K sia coinvolta nelle vie di trasduzione che mediano l'attivazione dei fagociti. L'ipotesi che fagociti e CM possano avere vie di attivazione comune mi ha portato ad indagare l'effetto della WM sulle CM. Ho pertanto studiato *in primis* l'effetto sulla degranolazione, mediante esposizione degli emociti *in vitro* con WM alle concentrazioni di 1 μ M e di 0.1 μ M. Ho poi analizzato gli effetti della somministrazione *in vivo* di WM 0.05 μ M in termini di reclutamento cellulare, fuoriuscita dai vasi e formazione di aree necrotiche.

2. Materiali e metodi.

2.1. Esperimenti *in vitro*.

2.1.1. Animali.

Sono state utilizzate colonie di *B. schlosseri* provenienti dalla Laguna di Venezia, fatte aderire su vetrini da 5 cm x 5 cm e allevate in vasche contenenti acqua di mare filtrata (filtered sea water; FSW) all'interno di stanze termostate a 18°C. L'acqua delle vasche veniva ossigenata mediante appositi aeratori e sostituita ogni quattro giorni. Le colonie sono state alimentate ogni due giorni con alghe (*Dunaliella* sp.) e lievito (*Saccharomyces cerevisiae*).

2.1.2. Preparazione del plasma eterologo.

Il plasma eterologo è stato prelevato da porzioni di grosse colonie a pendaglio. Queste sono state disposte in una capsula Petri, asciugate con carta assorbente e ripetutamente lacerate con una lametta. L'emolinfa fuoriuscita è stata raccolta in provette da 1,5 ml tenute in ghiaccio e centrifugata a 3000 rpm per 10 min. Il surnatante ottenuto, rappresentante il plasma eterologo (PE) utilizzato, è stato trasferito in altre provette e congelato a -20°C. Il plasma perde la sua efficacia nell'induzione della degranolazione già dopo 1 giorno dallo scongelamento, perciò, è consigliabile conservarlo in aliquote in modo da scongelarne solo il necessario, evitandone lo spreco. A rigore la scelta della colonia dalla quale prelevare il plasma dovrebbe essere preceduta da un saggio di istocompatibilità, come ad esempio in [21], per evitare che la colonia donatrice del plasma non sia

istocompatibile con le colonie utilizzate per gli esperimenti. Ciononostante, abbiamo tralasciato questa fase preliminare sapendo che è altamente improbabile che due colonie diverse scelte casualmente siano compatibili e che l'interazione tra colonie raccolte in natura si risolve quasi sempre con un rigetto [18].

2.1.3. Prelievo degli emociti.

L'emolinfa è stata prelevata con una micropipetta di vetro, previa rottura con un ago di tungsteno dei vasi di colonie precedentemente immerse in una soluzione di citrato di sodio al 38% in FSW a pH 7,5, per impedire l'aggregazione delle cellule a chiudere la ferita. Cento μ l di emolinfa sono stati depositati su vetrini coprioggetto precedentemente sgrassati con acetone. Gli emociti sono stati lasciati aderire al vetro per 30 min e lavati poi con FSW per 5 min all'interno di capsule Petri per impedire l'evaporazione del liquido.

2.1.4. Saggi di degranolazione.

Gli emociti, preparati come sopra descritto, sono stati preincubati con WM alle concentrazioni di 0,1 e 1 μ M in FSW. Nei controlli, gli emociti sono stati preincubati con dimetilsolfossido (DMSO) 0.1% (per preparare la soluzione madre (1 mM), la WM è stata sciolta in DMSO). Successivamente, gli emociti sono stati incubati per 60 min in PE diluito 1:1 in FSW. I vetrini coprioggetto con gli emociti adesi sono poi stati gentilmente deposti sopra vetrini portaoggetto tenuti leggermente sollevati da questi ultimi da un sottile strato di plastilina deposto agli angoli dei vetrini coprioggetto in modo da non danneggiare gli emociti; i vetrini così preparati sono stati osservati al microscopio ottico (MO). Per ogni vetrino sono state contate le CM totali e le CM degranulate in 10 campi visivi ad ingrandimento 40x. La degranolazione è facilmente distinguibile in quanto comporta una modificazione nella morfologia delle CM con l'acquisizione della tipica forma a mora e la riduzione dimensionale dei granuli.

2.1.5. Analisi statistiche.

Gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte ($n = 3$) con colonie diverse. Le percentuali di CM degranulate sulle CM totali sono state espresse come media e deviazione standard e le diverse condizioni sperimentali sono state confrontate con il test del χ^2 .

2.2. Esperimenti *in vivo*.

2.2.1. Allestimento delle parabiosi.

Per ogni saggio, con l'utilizzo di una lametta, due sistemi eterologhi sono stati staccati dalle rispettive colonie di appartenenza e appoggiati su di un vetrino 5 cm x 5 cm. I sistemi sono stati posizionati in modo da avere le ampolle del lato di avanzamento della colonia, particolarmente sporgenti verso l'esterno, affrontate e separate da uno spazio di 1-2 mm. Sono poi stati lasciati aderire per 30 min all'interno di una capsula Petri chiusa prima di essere riportati in acquario.

2.2.2. Trattamento delle colonie.

Le colonie sono state a tenute in una vasca in FSW aereata e alimentate ogni 2 giorni fino al momento del contatto tra le ampolle. Poi:

- I trattati sono stati immersi in WM 0,05 μM in FSW per 24 h e poi mantenute in FSW per 4 giorni.
- I controlli sono stati mantenuti in FSW per 5 giorni.

2.2.3. Fissazione ed inclusione delle parabiosi.

Le parabiosi sono state staccate dal vetrino e immerse in una soluzione di Etil3-aminobenzoato sulfonato per 10 min per anestetzizzare le colonie e successivamente sono state fissate per 2 ore in soluzione di Karnovsky (paraformaldeide 4%, glutaraldeide 0.1% in 0.2 M tampone cacodilato contenente 1.7% di NaCl, pH 7.4). Sono poi state disidratate sequenzialmente per 90 min in etanolo al 50%, 70%, 95% e 100% e poi immerse in xilene per 45 min. Dopodiché sono state incubate a 55°C per una notte in una miscela di xilene e Paraplast Plus 1:1, a cui sono seguiti 90 min in 100% Paraplast Plus, in stufa. Le inclusioni sono state lasciate poi raffreddare a 4°C per 24 ore. Con un microtomo si sono poi ottenute sezioni di 7 μm utilizzate per le analisi.

2.2.4. Allestimento e colorazione dei vetrini.

Le sezioni sono state sparaffinate in xilene per 15 min e idratate in soluzioni decrescenti di etanolo. Sono state in seguito colorate in Emallume di Mayer per 3 min e poi immerse in acqua corrente per 15 min, per permettere al colorante di virare di colore. Dopodiché le sezioni sono state lavate in acqua distillata per 10 min, disidratate in concentrazioni crescenti di etanolo, incubate per 15 min in xilene e montate con Eukitt.

2.2.5. Analisi al microscopio e statistiche.

Le analisi al microscopio sono state effettuate sia su colonie vive con lo stereomicroscopio, sia su sezioni istologiche. Per quest'ultima parte ho usato due colonie trattate con WM 0,05 μM e una di controllo lasciata in FSW. Sono state analizzate e confrontate tra i diversi campioni le zone di contatto delle parabiosi ed è stata valutata la presenza di zone di fuoriuscita delle CM dai vasi ed eventualmente la presenza di necrosi. È stata calcolato inoltre il rapporto tra la quantità di emociti all'interno delle ampolle nelle zone di contatto e l'area di queste ampolle sia per le colonie tenute in FSW che per quelle in WM. I risultati sono stati confrontati con il test *t* di Student a due code.

3. Risultati.

3.1. Esperimenti *in vitro*.

3.1.1. WM 1 μM .

Le percentuali di cellule degranulate nei vetrini trattati con WM 1 μ M e PE non solo risultano significativamente ($p < 0,001$) inferiori rispetto ai vetrini trattati solamente con PE ma risultano anche significativamente ($p < 0,001$) inferiori rispetto ai vetrini di controllo (CTRL). In ogni saggio la degranulazione in CTRL è stata inferiore a PE. La *tabella 1* mostra, per ogni categoria di trattamenti, il numero totale di CM e il numero totale di CM degranulate raccolte nei diversi saggi, nonché la media delle percentuali di degranulazione.

Tabella 1	CTRL	WM-PE	PE
CM totali	673	392	448
CM degranulate	152	11	281
Degran. media	24,73%	2,95%	58,92%

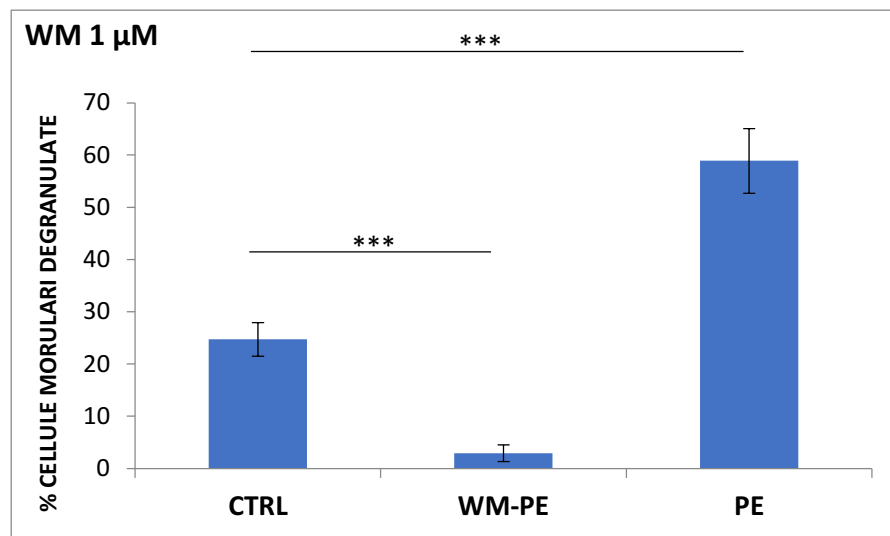


Figura 2 | Percentuali di degranulazione delle CM nei campioni di controllo (CTRL), trattati con WM 1 μ M e plasma eterologo (WM-PE), trattati con plasma eterologo (PE). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo. ***: $p < 0,001$

La *figura 3* mostra come appaiono le CM al microscopio ottico. Nel controllo (*fig. 3A*) le CM risultano per la maggior parte intatte, la superficie appare liscia e si intravedono i contorni dei grossi granuli che occupano l'intero volume delle cellule; nel campione trattato con WM e PE (*fig. 3B*) l'integrità delle CM è elevata ma appaiono cellule a superficie bitorzoluta; nel campione trattato con PE (*fig. 3C*) la degranulazione è molto spinta e la quasi totalità delle cellule appare contenere piccole granulazioni che sporgono dalla superficie irregolare.

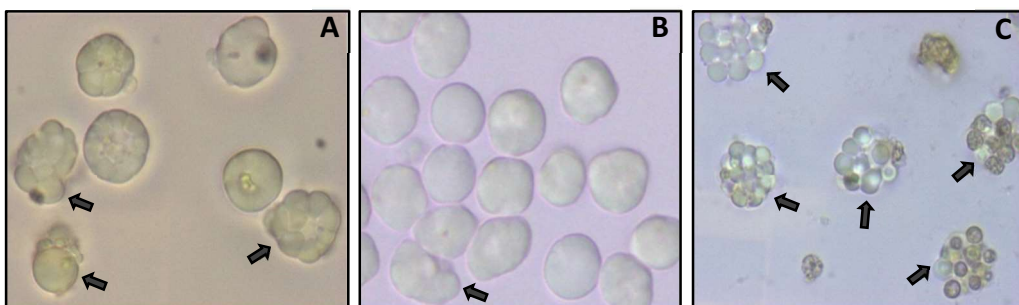


Figura 3 | Fotografie scattate a ingrandimento 40x o 100x di CM intatte e degranulate, queste ultime indicate con una freccia. **A)** CTRL; **B)** WM-PE; **C)** PE.

3.1.2. WM 0.1 μ M.

I campioni trattati con WM 0,1 μ M e PE presentano una degranulazione lievemente minore dei vetrini trattati solo con PE. Sia PE che WM-PE hanno mostrato in ogni saggio una degranulazione significativamente ($p < 0.001$) maggiore del controllo. Analogamente alla *tabella 1*, la *tabella 2* mostra per ogni categoria di vetrini le CM totali, le CM totali degranulate e le medie delle percentuali di degranulazione di ogni saggio.

Tabella 2	CTRL	WM-PE	PE
CM totali	977	543	683
CM degranulate	314	289	394
Degran. media	30,40%	54,53%	59,51%

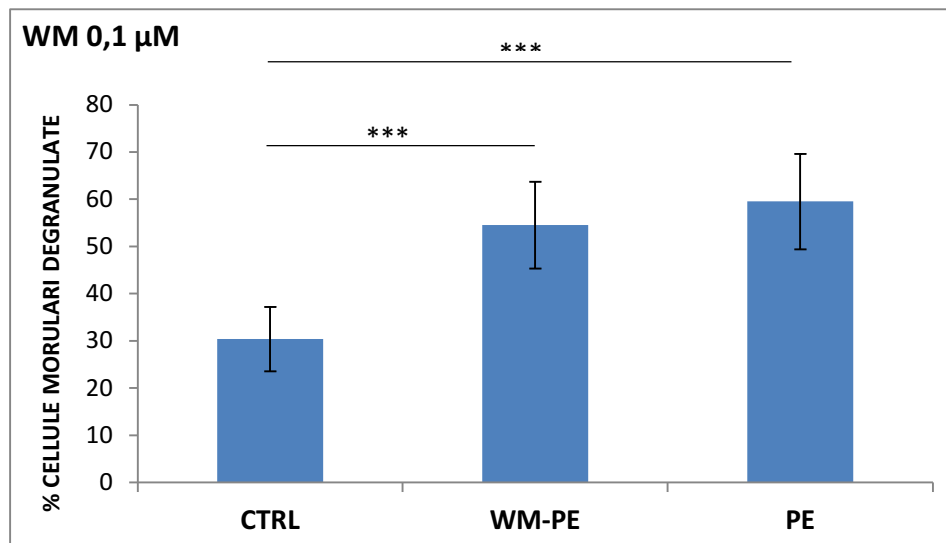


Figura 4 | Percentuali di degranulazione delle CM nei campioni di controllo (CTRL), trattati con inibitore WM 0,1 μ M e plasma eterologo (WM-PE), trattati con plasma eterologo (PE). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo. ***: $p < 0,001$

Come la *figura 3*, la *figura 5* mostra come appaiono le CM al microscopio ottico. Nel controllo (*fig. 5A*) le CM risultano per la maggior parte intatte; nel campione trattato con WM e PE (*fig. 5B*) le CM appaiono per lo più degranulate ma nel campione trattato solo con PE (*fig. 5C*) la degranulazione è più diffusa.

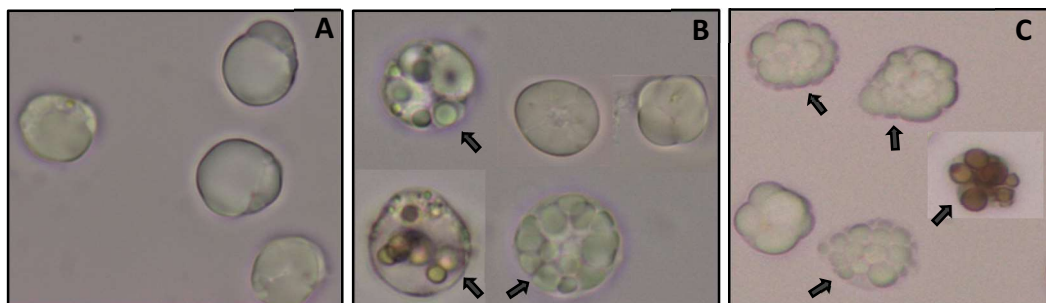


Figura 5 | Fotografie scattate a ingrandimento 40x o 100x di CM intatte e degranulate, queste ultime indicate con una freccia. A) CTRL; B) WM-PE; C) PE.

3.2. Esperimenti *in vivo*.

In principio, il mio obiettivo era di analizzare se l'interazione di due colonie incompatibili giunte a contatto potesse essere alterata dall'immersione in una soluzione di WM. La concentrazione 1 μM è risultata tossica per le colonie, che sono morte già dopo un giorno dall'incubazione. Ho quindi provato ad utilizzare una soluzione di WM 0,1 μM . A questa concentrazione la WM non risultava mortale ma era comunque abbastanza tossica da indurre in alcune colonie una sorta di regressione forzata e in altre una forte produzione di cellule pigmentate che rimanevano accumulati nelle ampolle anche per settimane, indice che le colonie non erano in buona salute. Per quanto riguarda gli emociti, prima che le parabiosi venissero trattate con WM, negli apici delle ampolle contrapposte si verificava l'usuale accumulo di CM, in seguito al trattamento, però, si è vista una significativa ($p < 0,05$) riduzione di tali cellule. La WM a queste concentrazioni, di fatto, causava l'allontanamento delle ampolle contrapposte e impediva lo sviluppo di punti di rigetto, tuttavia, riteniamo che questo fosse dovuto più alla sua tossicità piuttosto che al suo effetto inibitorio.

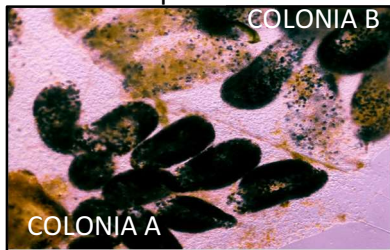


Figura 6 | esempio del forte accumulo di cellule pigmentate indotto dallo stress causato dalla WM 0.1 μM , da cui dipende il colore scuro di alcune ampolle.

Ho dunque immerso le colonie in una soluzione di WM 0,05 μM e, sebbene in alcune colonie ci sia stato un discreto accumulo di cellule pigmentate, la tossicità non è sempre stata tale da causare un allontanamento importante delle ampolle. La diminuzione delle CM all'interno degli apici delle ampolle si è verificata anche con questa concentrazione, ma in quantità minore rispetto a WM 0,1 μM e comunque in alcune colonie c'è stato un incremento nei giorni successivi. La *figura 7* mostra la stessa parabiosi appena prima (*fig. 7A*) e quattro giorni dopo (*fig. 7B*) il trattamento con WM 0.05 μM . Si può notare l'allontanamento delle ampolle, l'accumulo di cellule pigmentate all'interno delle ampolle nella COLONIA α e la diminuzione delle CM.

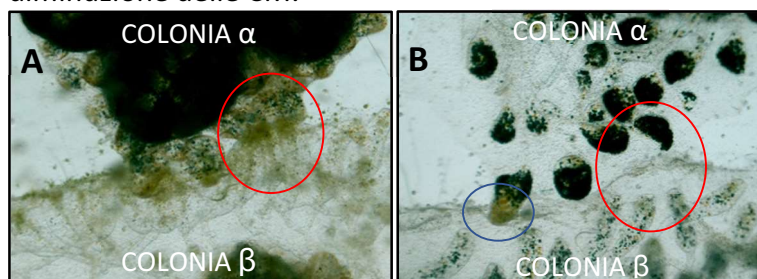


Figura 7 | Zona di incontro tra 2 colonie incompatibili. Si può notare l'allontanamento delle ampolle, cerchiato in rosso. È evidente anche che le CM, che in *fig. 7A* sono bene ammassate nella punta delle ampolle, sono nettamente diminuite in *fig. 7B*, dove permane solo un accumulo cerchiato in azzurro. **A)** Prima del trattamento con WM 0,05 μM ; **B)** 4 giorni dopo il trattamento.

Con lo scopo di capire se le CM, nei trattati con WM, siano in grado anche di fuoriuscire dalle ampolle ed eventualmente generare necrosi, abbiamo confrontato le sezioni istologiche di parabiosi trattate con WM 0,05 μM con parabiosi di controllo lasciate in FSW. Di seguito si possono osservare le zone di fuoriuscita delle CM dalle ampolle: la *figura 8* raccoglie le sezioni delle colonie trattate con WM, la *figura 9*, invece, quelle di controllo. Non si notano particolari differenze tra i due trattamenti.

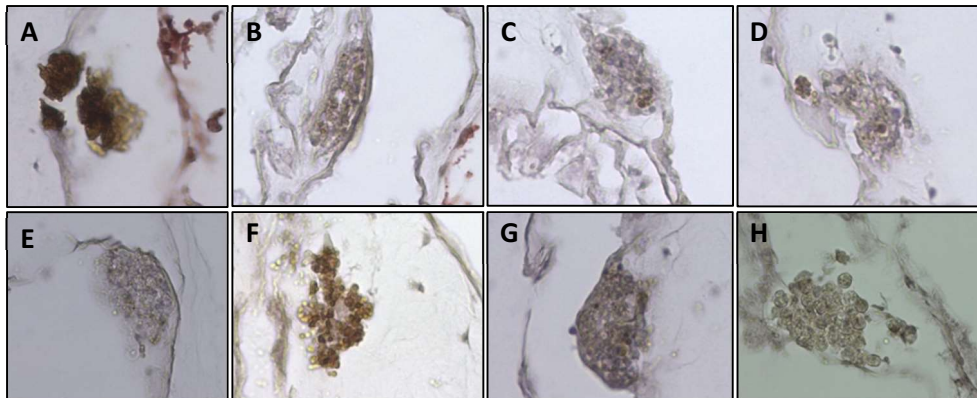


Figura 8 | Accumuli di CM fuoriuscite dai vasi nei campioni trattati con WM 0,05 μM . Si nota la presenza di necrosi soprattutto in *fig. 7A* e in *fig. 7F*.

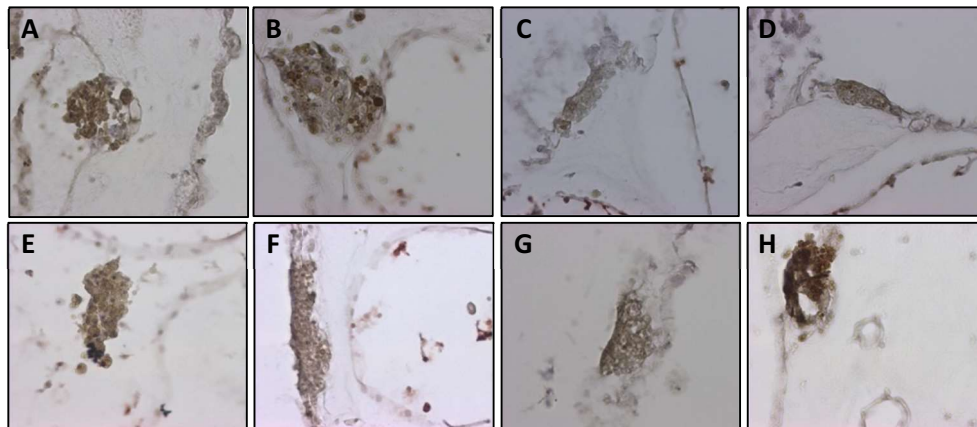


Figura 9 | Accumuli di CM fuoriuscite dai vasi nel campione di controllo. Si nota la presenza di necrosi soprattutto in *fig. 8H* e degli accenni di necrosi in *fig. 8A*, *fig. 8B*, *fig. 8E*.

Aver appurato che la WM a quella concentrazione non impedisce né fuoriuscita dai vasi né la degranulazione ci ha portato a calcolare e confrontare il reclutamento cellulare nei punti di contatto tra le ampolle. Abbiamo quindi calcolato il numero di CM presenti nelle ampolle contrapposte, da sezioni di zone di contatto tra colonie osservate al MO. I grafici seguenti mostrano come la quantità di CM e di emociti per unità di superficie all'interno delle ampolle contrapposte di colonie esposte a WM sia significativamente ($p < 0,05$) minore di quanto osservato nei controlli (*figure 10 e 11*).

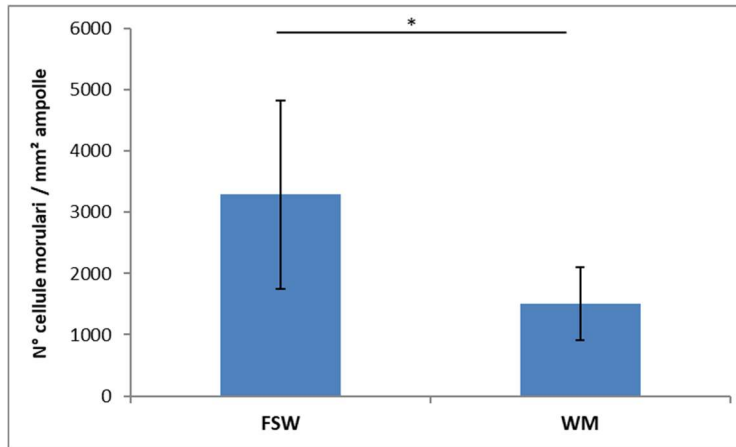


Figura 10 | Quantità di CM per unità di superficie all'interno delle ampolle contrapposte nei campioni di controllo (CTRL) e in quelli trattati con WM 0.05 μ M (WM). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo. *: $p < 0.05$.

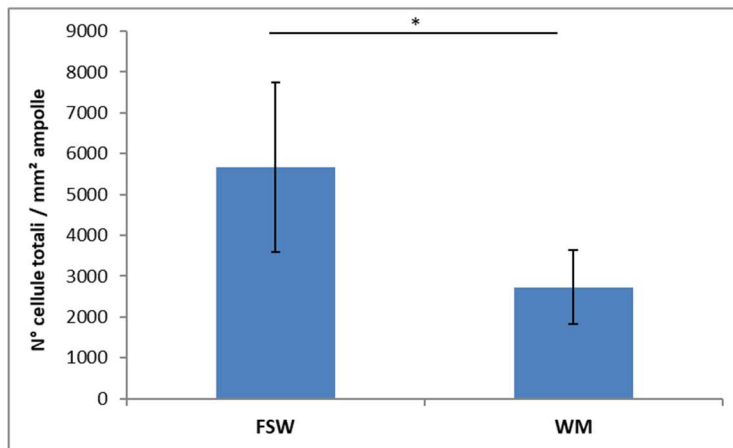


Figura 11 | Quantità di emociti per unità di superficie all'interno delle ampolle nei campioni di controllo (CTRL) e in quelli trattati con WM 0,05 μ M (WM). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo. *: $p < 0,05$.

4. Discussione.

Negli anni l'ascidia coloniale *B. schlosseri* si è affermata come un buon organismo modello per lo studio della biologia dei tunicati per alcune sue caratteristiche come la trasparenza della tunica, la capacità di riprodursi sessualmente e asessualmente, la possibilità di allevamento e la notevole capacità di rigenerazione [2]. Il crescente interesse verso tale specie è anche motivato dal fatto che le ascidie appartengono al subphylum degli urocordati, che rappresentano il *sister group* dei vertebrati [23]. Per quanto riguarda e conoscere appieno i meccanismi e le cellule che mediano le risposte immunitarie negli urocordati ci consente di comprendere meglio l'evoluzione del sistema immunitario dei vertebrati. In questo lavoro di tesi abbiamo voluto approfondire il ruolo della CM nell'induzione di citotossicità conseguente al riconoscimento del

nonsel. Le CM delle ascidie, infatti, sono i primi emociti a riconoscere cellule o molecole estranee [28]. In risposta a tale riconoscimento, le CM inducono una risposta infiammatoria caratterizzata da reclutamento selettivo di altri immunociti nel sito di infezione, mediato da citochine rilasciate dalle CM attivate, degranolazione con rilascio dell'enzima PO e dei substrati polifenolici sui quali agisce, e induzione di citotossicità legata alla condizione di stress ossidativo associato legato alla produzione di ROS [29]. Le CM sono anche importanti perché in grado di modulare l'attività dei fagociti mediante il rilascio di opsonine (fattore C3b del complemento). In questo lavoro di tesi abbiamo voluto continuare lo studio sulle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella degranolazione delle CM di *B. schlosseri*. Risultati preliminari ottenuti nel laboratorio da me frequentato, hanno dimostrato il coinvolgimento di PKA, PKC e MAPK nel fenomeno [30, 31]. L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di verificare il coinvolgimento dell'enzima PI3K nelle vie di trasduzione sopracitate mediante l'utilizzo di WM, noto inibitore dell'enzima.

Gli esperimenti *in vitro* hanno evidenziato una significativa diminuzione della degranolazione alle concentrazioni di 1 μM e 0,1 μM supportando l'idea che l'enzima PI3K sia coinvolto nel processo. Poco si sa sul coinvolgimento di PI3K nei processi cellulari degli urocordati, tuttavia nei vertebrati è nota la sua partecipazione a molteplici vie di trasduzione tra cui divisione cellulare, autofagia, sopravvivenza cellulare e differenziamento [24]. L'enzima agisce convertendo il fosfoinositolo-bifosfato (PIP2) in fosfoinositolo-trifosfato (PIP3) [25]. Nei vertebrati, ad esempio, l'attivazione di PI3K e la conseguente produzione di PIP3 sono due segnali critici nella attivazione dei mastociti mediata dalle IgE e una sua diminuzione è concomitante ad una inibizione della degranolazione [26]. Vista la vicinanza filogenetica tra tunicati e vertebrati, non è da escludere che meccanismi simili possano essere presenti nelle CM.

Apparentemente non sembrano esserci grandi differenze tra le sezioni istologiche dei controlli e dei campioni trattati con WM 0,05 μM ad indicare che, malgrado il trattamento con l'inibitore, le CM sono comunque in grado di fuoriuscire dai vasi e di degranulare a sufficienza da generare necrosi. Questo risultato è in linea con quanto osservato *in vitro*, ossia che in presenza di WM alla concentrazione 0,1 μM l'inibizione della degranolazione risultava minima. Tuttavia, la PI3K sembra essere coinvolta anche nel processo di migrazione delle CM all'interno degli apici ampollari, richiamate da fattori umorali provenienti dall'altra colonia, prima del successivo passaggio nella tunica. In effetti, in presenza di WM 0,05 μM si osserva una diminuzione significativa delle CM all'interno degli apici ampollari. Tuttavia, una volta fuoriuscite nella tunica, le CM sono comunque in grado di degranulare e indurre la formazione di masse necrotiche.

Nei neutrofili dei Vertebrati PIP2 e PIP3 sono coinvolte anche nella modificazione citoscheletrica e nella formazione di pseudopodi: PIP2 sembrerebbe avere la funzione di circoscrivere la polimerizzazione di actina alla periferia più esterna della cellula mentre PIP3 sembrerebbe controllare in quali zone della periferia avvenga la polimerizzazione. A supporto di ciò, in molte cellule un aumento della produzione di PIP3 è concomitante ad un aumento della polimerizzazione di actina. La distribuzione delle due molecole, come schematizzato in *figura 12*, mostra come PIP2 sia omogeneamente distribuita lungo la cortex cellulare, mentre PIP3 verrebbe prodotta solo nelle zone della cellula soggette a stimolazione, ad esempio da parte di chemioattraenti [27].

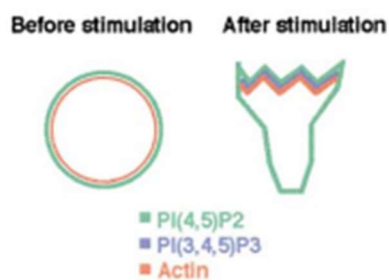


Figura 12 | Distribuzione di PIP2, PIP3 e actina polimerizzata in un neutrofilo prima e dopo la sua stimolazione. Modificata da [27].

Sarebbe interessante capire se meccanismi simili siano coinvolti anche nelle cellule degli urocordati. L'alterazione citoscheletrica in seguito ad esposizione a WM è stata riscontrata nei fagociti di *B. schlosseri*. Nello specifico questa: i) induce l'actina a concentrarsi in fibre da stress; ii) relega la tubulina attorno al nucleo e blocca la distensione dei microtubuli fino alla periferia cellulare. Come conseguenza, viene impedita la produzione di pseudopodi e a causa di ciò vengono compromesse la fagocitosi e la motilità dei fagociti [10]. Quest'ultimo effetto potrebbe in parte spiegare perché avvenga un minor reclutamento cellulare nelle colonie trattate con WM. Un altro fattore influente potrebbe essere quello di una minore degranolazione correlata ad una minor secrezione di citochine: occorreranno però ulteriori studi per avere una panoramica più completa del ruolo di WM nelle risposte umorali cellulo-mediate di *B. schlosseri*.

5. Ringraziamenti.

Vorrei spendere due parole per ringraziare tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questo elaborato.

Un ringraziamento particolare va al mio relatore Ballarin Lorianò per la pazienza e la disponibilità con cui mi ha seguito e per la dedizione con cui si è interessato al mio progetto, malgrado i suoi innumerevoli impegni, concedendomi anche di restare in laboratorio per più tempo del previsto e permettendomi così di acquisire un maggior numero di competenze e di arricchire la mia tesi di laurea.

Ringrazio infinitamente i miei genitori, che fin da piccolo hanno sempre assecondato le mie scelte, spronandomi ogni volta a dare il massimo.

Grazie anche a tutti i miei colleghi di corso, per avermi dato un gruppo con cui superare le avversità di questi anni di studio e per tutte le mani che mi hanno teso nei momenti di difficoltà.

6. Bibliografia.

1. Manni L, Zaniolo G, Cima F, Burighel P, Ballarin L. 2007. *Botryllus schlosseri*: a model ascidian for the study of asexual reproduction. Dev Dyn. ;236: 335-52. doi: 10.1002/dvdy.21037.
2. Ballarin L. Immunobiology of compound ascidians, with particular reference to *Botryllus schlosseri*: state of art. ISJ-Invertebr. Surviv. J. 2008;5:54.
3. Manni L, Gasparini F, Hotta K, Ishizuka KJ, Ricci L, Tiozzo S, Voskoboynik A, Dauga D. 2014. Ontology for the asexual development and anatomy of the colonial chordate *Botryllus schlosseri*. PLoS One. 9: e96434. doi: 10.1371/journal.pone.0096434.
4. Goldstein O, Mandujano-Tinoco EA, Levy T, Talice S, Raveh T, Gershoni-Yahalom O, Voskoboynik A, Rosental B. 2021. *Botryllus schlosseri* as a unique colonial chordate model for the study and modulation of innate immune activity. Mar Drugs 19(8): 454. doi: 10.3390/md19080454.
5. Kowarsky M, Anselmi C, Hotta K, Burighel P, Zaniolo G, Caicci F, Rosental B, Neff NF, Ishizuka KJ, Palmeri KJ, et al. 2021. Sexual and asexual development: two distinct programs producing the same tunicate. Cell Rep, 34: 108681.
6. Rinkevich Y, Voskoboynik A, Rosner A, Rabinowitz C, Paz G, Oren M, Douek J, Alfassi G, Moiseeva E, Ishizuka KJ, Palmeri KJ, Weissman IL, Rinkevich B. 2013. Repeated, long-term cycling of putative stem cells between niches in a basal chordate. Dev Cell. 24: 76-88. doi: 10.1016/j.devcel.2012.11.010.
7. Rosental B, Kowarsky M, Seita J, Corey DM, Ishizuka KJ, Palmeri KJ, Chen SY, Sinha R, Okamoto J, Mantalas G, Manni L, Raveh T, Clarke DN, Tsai JM, Newman AM, Neff NF, Nolan GP, Quake SR, Weissman IL, Voskoboynik A. 2018. Complex mammalian-like haematopoietic system found in a colonial chordate. Nature 564: 425-429. doi: 10.1038/s41586-018-0783-x.
8. Ballarin L, Cima F. 2005. Cytochemical properties of *Botryllus schlosseri* haemocytes: indications for morpho-functional characterisation. Eur J Histochem. 49: 255-64.
9. Franchi N, Schiavon F, Betti M, Canesi L, Ballarin L. 2013. Insight on signal transduction pathways involved in phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. J Invertebr Pathol 112: 260-6. doi: 10.1016/j.jip.2012.12.001.
10. Ballarin L, Scanferla M, Cima F, Sabbadin A. 2002. Phagocyte spreading and phagocytosis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*: evidence for an integrin-like, RGD-dependent recognition mechanism. Dev Comp Immunol 26 39-48. doi: 10.1016/s0145-305x(01)00082-9.

11. Franchi N, Schiavon F, Carletto M, Gasparini F, Bertoloni G, Tosatto SC, Ballarin L. 2011. Immune roles of a rhamnose-binding lectin in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Immunobiology*. 216: 725-36. doi: 10.1016/j.imbio.2010.10.011.
12. Peronato A, Franchi N, Loriani B. 2020. BsTLR1: A new member of the TLR family of recognition proteins from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Fish Shellfish Immunol* 106: 967-974. doi: 10.1016/j.fsi.2020.09.006.
13. Ballarin F, Cima F, Sabbadin A. 1995. Morula cells and histocompatibility in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Zool Sci* 12.
14. Ballarin L, Menin A, Franchi N, Bertoloni G, Cima F. 2005. Morula cells and non-self recognition in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *ISJ-Invertebr Surviv J* 2: 1-5.
15. Franchi N, Ballarin L. 2014. Preliminary characterization of complement in a colonial tunicate: C3, Bf and inhibition of C3 opsonic activity by compstatin. *Dev Comp Immunol* 46: 430-438. doi: 10.1016/j.dci.2014.05.014.
16. Gunturi A, Berg RE, Forman J. 2004. The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 30: 29-34. doi: 10.1385/IR:30:1:029.
17. Khalturin K, Becker M, Rinkevich B, Bosch TC. 2003. Urochordates and the origin of natural killer cells: Identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 622–627. doi: 10.1073/pnas.0234104100.
18. Sabbadin A, Zaniolo G, Ballarin L. 1992. Genetic and cytological aspects of histocompatibility in ascidians. *Boll. Zool.* 59: 167-173. doi: 10.1080/11250009209386665.
19. Taketa DA, De Tomaso AW. 2015. *Botryllus schlosseri* allorecognition: tackling the enigma *Dev Comp Immunol* 48: 254-265.
20. Voskoboinik A, Newman AM, Corey DM, Sahoo D, Pushkarev D, Neff NF, Passarelli B, Koh W, Ishizuka KJ, Palmeri KJ, et al. 2013. Identification of a colonial chordate histocompatibility gene. *Science*. 341: 384-387. doi: 10.1126/science.1238036.
21. Cima F, Sabbadin A, Ballarin L. 2004. Cellular aspects of allorecognition in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* 28: 881-9. doi: 10.1016/j.dci.2004.02.001.
22. Franchi N, Ballarin L. 2017. Morula cells as key hemocytes of the lectin pathway of complement activation in the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. *Fish Shellfish Immunol*. 63: 157-164. doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.003.
23. Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439:965-8. doi: 10.1038/nature04336.

24. Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, Akhavan-Niaki H. 2019. PI3k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond. *J Cell Physiol* 234:2373-2385. doi: 10.1002/jcp.27262.
25. Wendan X, Philipp B, Georg L. 2021. Targeting B-cell receptor and PI3K signaling in diffuse large B-cell lymphoma, *Blood*. 138:1110-1119.
26. Shenker BJ, Boesze-Battaglia K, Zekavat A, Walker L, Besack D, Ali H. 2010. Inhibition of mast cell degranulation by a chimeric toxin containing a novel phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate phosphatase. *Mol Immunol*. 48:203-10. doi: 10.1016/j.molimm.2010.08.009.
27. Insall R, Orion DW. 2001. PIP3, PIP2, and cell movement—similar messages, different meanings? *Developmental Cell*. 1:743-747.
28. Ballarin L, Franchini A, Ottaviani E, Sabbadin A. 2001. Morula cells as the major immunomodulatory hemocytes in ascidians: evidences from the colonial species *Botryllus schlosseri*. *Biol Bull* 201: 59-64
29. Ballarin L, Cima F, Floreani M, Sabbadin A. 2002. Oxidative stress induces cytotoxicity during rejection reaction in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comp Biochem Physiol* 133C: 411-418.
30. Meneghetti C, Ballarin L. 2019. Elaborato di laurea: Vie di trasduzione del segnale coinvolte nella degranolazione degli emociti nell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri*. Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Biologia.
31. Bempensato F, Ballarin L, Peronato A. 2020. Elaborato di laurea: Vie di trasduzione del segnale coinvolte nella degranolazione nel corso dei processi infiammatori dell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri*. Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Biologia.
32. Koyasu, S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4, 313–319 (2003). <https://doi.org/10.1038/ni0403-313>