

NOTIZIARIO

DELLA

SOCIETÀ ITALIANA DI PROTOZOOLOGIA



o GENNAIO - DICEMBRE 2004 o

o ANNO 9, N. 1 o

o SOCIETÀ ITALIANA DI
PROTOZOOLOGIA o

o Anno di fondazione, 1965 o

o Affiliata dal 1983 alla Society of
Protozoologists (U.S.A.) o

Società Italiana di Protozoologia (S.I.P.)

Fondazione della Società Italiana di Protozoologia

La S.I.P. è stata costituita nel 1965 grazie all'impegno pionieristico del primo nucleo di soci sostenitori, i Professori Tina Franceschi, Renzo Nobili, Elsa Bottazzi Massera, Bruno Schreiber.

Motivo ispiratore

"Incrementare gli studi di Protozoologia, riunendo i cultori della materia e promuovendo il coordinamento delle loro attività".

Sede legale

Museo di Storia Naturale e del Territorio, Università di Pisa, Certosa, Calci, Pisa.

Consiglio Direttivo 2004-2006

| | |
|----------------------|------------------------|
| F. Verni, Pisa | Presidente |
| M.U. Corrado, Genova | Segretario - Tesoriere |
| C. Miceli, Camerino | Consigliere |
| P. Rappelli, Sassari | Consigliere |
| D. Savoia, Torino | Consigliere |

Collegio dei Revisori dei conti 2004-2006

| | |
|----------------------|------------------|
| F. Trielli, Genova | Membro effettivo |
| A. Vallesi, Camerino | Membro effettivo |

Segreteria

Prof.ssa Maria Umberta Corrado
Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse (DIP.TE.RIS.)
C.so Europa 26
I-16132 Genova
Tel.: 010/3538031 Fax: 010/3538209
e-mail: corrado@dipteris.unige.it

Notiziario S.I.P.

Comitato di Redazione: O. Coppellotti, M.U. Corrado, G. Dettori, F. Dini, M. Gramiccia, P. Luporini, P. Madoni, F. Trielli.

In questo numero

Il Punto (Comitato di Redazione)

Iniziativa della Società Italiana di Protozoologia a favore di giovani studiosi cultori della disciplina

- Premio Nobili-Franceschi 2004

- Compendio delle Tesi di Dottorato di Ricerca 2003/2004:

- Dott. Francesco Boldrin (Padova)
- Dott. Federico Buonanno (Camerino)
- Dott.ssa Claudia Vannini (Pisa)

- Invito per l'anno 2005 (M.U. Corrado, F. Dini)

Proposta di Borsa di Post-dottorato

Congressi di interesse protozoologico 2002: impressioni, riflessioni

- XXIII Convegno Nazionale S.I.P., Porto Conte, Ottobre 2002 (P.L. Fiori)

Indirizzi di posta elettronica dei Soci

Prossimi Convegni

- Presentazione dell'Embo-sponsored Faseb Summer Research Conference on "Molecular Biology of Ciliates" 'Il Ciocco' (Lucca), Agosto 2005 (C. Miceli)

Agenda

Selezione bibliografica

Il Punto

Il Notiziario 2004 della Società Italiana di Protozoologia ritorna in lingua italiana dopo l'edizione speciale del 2003 redatta in lingua inglese e dedicata ai colleghi stranieri riuniti a San Benedetto del Tronto per partecipare al '4th European Congress of Protistology and 10th European Conference on Ciliate Biology'. In occasione di tale evento, che ha riscosso ampio consenso dalla comunità scientifica internazionale, il XXIV Convegno della Società Italiana di Protozoologia è stato posticipato al 2004 e si terrà a Rapallo l'1 e il 2 Ottobre.

Un nuovo Consiglio Direttivo è stato eletto nell'Aprile scorso: dal Comitato di Redazione del Notiziario un grazie ai membri del precedente Consiglio per l'attività svolta e l'augurio di un proficuo lavoro ai nuovi eletti.

Nel corso del XXIV Convegno S.I.P. verrà assegnato dal Consiglio Direttivo il premio Nobili-Franceschi, istituito dalla Società Italiana di Protozoologia e giunto alla sua sesta edizione, alla migliore Tesi di Laurea di argomento protistologico discussa nel periodo da Ottobre 2001 ad Aprile 2004. Il vincitore del premio, di euro 500,00, terrà una breve relazione sull'argomento della sua Tesi che verrà presentata come compendio nel prossimo numero del Notiziario. E' significativa l'ampia partecipazione: l'elenco delle Tesi di Laurea candidate al premio, discusse in diversi Atenei italiani e anche all'estero, è riportato in questo numero del Notiziario.

Tra le altre iniziative promosse dalla Società a favore di giovani cultori della protozoologia, vengono presentati i compendi delle Tesi di Dottorato di Ricerca in 'Biologia Evoluzionistica' del Dott. Francesco Boldrin (Padova), in 'Scienze e Tecnologie per l'Ambiente, la Natura e la Salute' del Dott. Federico Buonanno (Camerino), in 'Biologia Evoluzionistica – Protisti, Animali, Uomo, Ecologia Marina' della Dott.ssa Claudia Vannini (Pisa). Inoltre, viene rinnovato l'invito ai tutori a far preparare dai propri dottorandi un breve compendio della loro Tesi per il prossimo numero del Notiziario.

Per quanto riguarda le proposte di Borse di Post-dottorato, viene presentata un'offerta della Prof.ssa Carolyn Price (Cincinnati, OH) per candidati che abbiano una consolidata preparazione in biologia molecolare e/o in biochimica.

Un resoconto del XXIII Convegno Nazionale S.I.P., Porto Conte, Ottobre 2002, viene presentato dall'organizzatore, Prof. Pier Luigi Fiori.

Nelle ultime pagine del Notiziario è riportato l'elenco degli indirizzi di posta elettronica dei Soci. I Soci che non avessero ancora fornito il proprio indirizzo e-mail, ovvero, che riscontrassero errori nell'indirizzo, sono invitati a comunicarli alla Segreteria della Società.

Come di consueto, vengono segnalati i prossimi Congressi di interesse per i protozoologi, con particolare riferimento all'Embo-sponsored Faseb Summer Research Conference on "Molecular Biology of Ciliates" che si terrà a 'Il Ciocco' (Lucca) nell'Agosto 2005 e che viene introdotto dalla Prof.ssa Cristina Miceli. Il Notiziario si chiude con l'agenda e una breve selezione bibliografica.

A tutti, il benvenuto a Rapallo e l'augurio di buon lavoro

Per il Comitato di Redazione

Maria Umberta Corrado

Iniziativa della Società Italiana di Protozoologia a favore di Giovani Studiosi Cultori della Disciplina

Premio Nobili-Franceschi 2004

Alla Segreteria della S.I.P. sono pervenute le seguenti Tesi di Laurea candidate al premio Nobili-Franceschi 2004 per la migliore Tesi di argomento protistologico discussa nel periodo tra Ottobre 2001 e Aprile 2004.

- Dott.ssa Stefania Borromeo, Laurea in Scienze Biologiche il 13/03/2003, Università degli Studi di Padova, titolo della tesi: "Sequenze geniche di metallotioneine in *Tetrahymena thermophila* e *Tetrahymena pigmentosa*". Relatore Prof. Vincenzo Albergoni.
- Dott.ssa Chiara Carrea, Laurea in Scienze Biologiche il 21/11/2002, Università degli Studi di Genova, titolo della tesi: "Individuazione delle attività di colinesterasi nel ciclo di sviluppo di *Dictyostelium discoideum*". Relatori Prof.ssa Maria Umberta Corrado e Dott. Andrea Amaroli.
- Dott.ssa Serena Celani, Laurea in Farmacia il 17/04/2004, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", titolo della tesi: "Modelling in vitro di nuovi approcci diagnostici e terapeutici della Toxoplasmosi". Relatore Prof. Paolo Aldo Audisio.
- Dott.ssa Manuela Hartmann, Laurea in Scienze Biologiche il 03/03/2004, Technical University of Munich, titolo della tesi: "Characterization of macronuclear tubulin genes in the marine, hypotrich ciliate *Euplotidium itoi* N20". Relatori Prof. Karl-Heinz Schleifer e Dott. Giulio Petroni.
- Dott. Samuele Lucchesi, Laurea in Scienze Biologiche il 13/10/2003, Università degli Studi di Pisa, titolo della tesi: "Significato funzionale del rapporto simbiotico tra il ciliato ipotrico *Euplotes harpa* e il suo simbionte β -proteobatterico". Relatore Dott.ssa Giovanna Rosati.
- Dott.ssa Francesca Marziale, Laurea in Scienze Naturali il 16/07/2003, Università degli Studi di Camerino, titolo della tesi: "Caratterizzazione della γ -tubulina ed adattamento a basse temperature del ciliato antartico *Euplotes focardii*". Relatori Prof.ssa Cristina Miceli, Dott.ssa Patrizia Ballerini e Dott.ssa Sandra Pucciarelli.
- Dott.ssa Barbara Melonaro, Laurea in Scienze Biologiche l'11/04/2002, Università degli Studi di Camerino, titolo della tesi: "Espressione in batteri e analisi *in vitro* del 'folding' della β -tubulina del ciliato antartico *Euplotes focardii*". Relatori Prof.ssa Cristina Miceli e Dott.ssa Sandra Pucciarelli.
- Dott.ssa Silvia Motta, Laurea in Scienze Biologiche il 25/07/2002, Università degli Studi di Genova, titolo della tesi: "Individuazione e caratterizzazione degli enzimi colinesterasi nel protista ciliato marino *Euplotes crassus*". Relatori Prof.ssa Maria Umberta Corrado e Dott.ssa Francesca Trielli.
- Dott.ssa Angela Schena, Laurea in Scienze Biologiche il 06/02/2003, Università degli Studi di Pisa, titolo della tesi: "Significato funzionale del rapporto simbiotico tra il ciliato marino *Euplotes magnicirratu*s e l' α -proteobatterio '*Candidatus Devosia euplotis*' sp. Nov". Relatore Dott.ssa Giovanna Rosati.
- Dott.ssa Sara Tamburrini, Laurea in Scienze Naturali il 11/04/2003, Università degli Studi di Camerino, titolo della tesi: "Studio del meccanismo di difesa di due specie di plattelminti del genere *Stenostomum* contro il ciliato predatore *Dileptus margaritifer*". Relatori Prof. Akio Miyake e Dott. Federico Buonanno.

Nel corso del XXIV Convegno della Società Italiana di Protozoologia, che si terrà a Rapallo, 1-2 Ottobre 2004, verrà assegnato dalla Commissione esaminatrice costituita dal Consiglio Direttivo della S.I.P il premio Nobili-Franceschi, istituito in onore dei Proff. Renzo Nobili (Pisa) e Tina Crippa Franceschi (Genova), due dei fondatori della Società. Un compendio della Tesi vincitrice del premio, di euro 500,00, apparirà nel prossimo numero del Notiziario.

Invito per l'anno 2006

I relatori di Tesi di Laurea di argomento protistologico, discusse nel periodo tra Maggio 2004 e Aprile 2006, sono invitati a far pervenire entro il 30 Giugno 2006 una copia delle Tesi che intendono proporre per il premio Nobili-Franceschi 2006, alla Segreteria della Società. Le Tesi possono essere inviate sotto forma elettronica (.pdf/.doc o CDrom) oppure cartacea.

Dottorati di Ricerca

Come di consueto, vengono presentati i compendi delle Tesi di Dottorato di Ricerca di argomento protistologico. All'iniziativa hanno quest'anno aderito il Dott. Francesco Boldrin (Padova), il Dott. Federico Buonanno (Camerino) e la Dott.ssa Claudia Vannini (Pisa).

Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica (XVI ciclo)

Tesi di Dottorato

“Evoluzione molecolare e funzionale di metallotioneine nel protozoo ciliato

Tetrahymena”

(Tesi discussa il 13/02/04; tutore Prof.ssa Ester Piccinni)

Francesco Boldrin

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

Gli organismi viventi sono soggetti a molteplici fattori di stress ambientale, siano essi di carattere antropico che naturale, ed hanno quindi sviluppato capacità di risposta diverse utilizzando, a seconda dei gruppi, particolari strategie di difesa. Queste comprendono l'induzione di molecole chelanti e la compartimentazione subcellulare, con formazione di complessi inattivi e l'accumulo in strutture che evolvono in processi di escrezione (Viarengo e Nott, 1993). Un esempio è l'induzione delle metallotioneine (MT), proteine intracellulari leganti metallo, la cui sintesi viene indotta da molteplici condizioni di stress, come l'esposizione a metalli pesanti o l'incremento nella loro concentrazione. Queste proteine di 61-68 amminoacidi/molecola sono ricche di gruppi sulfidrilici e ampiamente distribuite in natura (Kägi, 1993). Esse sono caratterizzate dall'assenza di amminoacidi aromatici e da un alto contenuto in cisteine (circa il 30%) disposte per lo più a formare motivi quali Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-Y-Cys. A queste proteine è principalmente attribuito un ruolo chiave sia nell'omeostasi dei metalli traccia essenziali che nella protezione dalla tossicità dei metalli non essenziali. Esse sono ad ogni modo coinvolte anche in molti processi fisiologici, quali la crescita e il differenziamento cellulare (Albergoni e Piccinni, 1998; Miles *et al.*, 2000).

Le MT sono presenti nella maggior parte degli organismi in varie isoforme, la cui espressione può avvenire in modo differenziale a seconda dell'agente induttore, del tessuto e dell'organismo considerati (Sadhu e Gedamu, 1988; Miles *et al.*, 2000). Il controllo della sintesi delle MT avviene soprattutto a livello trascrizionale (Klaassen *et al.*, 1999; Saydam *et al.*, 2002). Sebbene, come accennato in precedenza, uno svariato numero di agenti e condizioni siano in grado di indurre la biosintesi delle MT, i metalli ne rappresentano i più comuni e potenti induttori (Kägi, 1991, 1993). La trascrizione metallo-indotta è mediata da particolari sequenze presenti nei promotori dei geni delle MT e chiamate MRE (Metal Responsive Elements) (Karin *et al.*, 1984; Samson e Gedamu, 1998) e dal fattore di trascrizione MTF-1 (Metal Transcription Factor-1). Gli MRE sono presenti in multiple copie in entrambi gli orientamenti (forward e reverse) e sono costituiti da sequenze consenso di 15 bp ricche in GC, caratterizzate da una regione *core* TGCRNC molto conservata (dai nematodi sino all'uomo) e da due porzioni fiancheggianti più variabili (Klaassen *et al.*, 1999; Ghoshal e Jacob, 2001). MTF-1 determina la trascrizione genica indotta dai metalli, legandosi specificamente agli MRE (Radtke *et al.*, 1993; Heuchel *et al.*, 1994). Questa proteina è un fattore di trascrizione “a sei dita” di zinco, ed è stato caratterizzato in

molte specie animali quali uomo, topo, *Fugu rubripes*, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* e *Drosophila melanogaster*. Per quanto riguarda i lieviti, in *Saccharomyces* e *Candida* sono stati identificati rispettivamente ACE1 e AMT1, fattori che, in presenza di un eccesso di Cu nelle cellule, si legano alle sequenze UAS (Winge, 1998).

La ricerca svolta ha avuto come oggetto lo studio delle MT nei protozoi ciliati del genere *Tetrahymena*, presso il laboratorio di Protistologia –Dipartimento di Biologia–responsabile Prof.ssa Piccinni, in cui sono state per la prima volta isolate MT di protozoi. In particolare, sono state esaminate la presenza, le caratteristiche molecolari e le modalità di induzione di diverse isoforme di MT in varie specie e ceppi di *Tetrahymena*. Le dimensioni relativamente grandi, la rapidità di crescita fino ad elevate densità e ben sviluppate tecniche di analisi genetica fanno di questo organismo un modello sperimentale eucariotico molto utile nello studio di processi molecolari, cellulari e dello sviluppo (Orias, 2002).

In *T. pyriformis* e *T. pigmentosa* era stata identificata una MT (MT-1) indotta da Cd (Piccinni *et al.*, 1994, 1999). Essa è insolitamente lunga dal momento che consta di 107 amminoacidi di cui 31 sono Cys (32%), 16 delle quali organizzate secondo due dei tipici motivi delle MT (14 residui Cys-Cys e 2 residui Cys-X-Y-Cys), mentre i restanti si presentano in un contesto atipico Cys-Cys-Cys. Il gene, presente in singola copia, codifica un trascritto di 487 bp con una *orf* di 324 bp che non ha introni. Sia le sequenze del cDNA che quella amminoacidica dedotta mostrano una limitata similarità con le MT degli eucarioti pluricellulari (Piccinni *et al.*, 1999). Lo studio dell'espressione di tale gene in colture cellulari inoculate con Cd per tempi diversi di esposizione, ha evidenziato una rapida e sostenuta attivazione del messaggero specifico. La fase di massima induzione, che viene raggiunta appena 30 minuti dall'inizio del trattamento, è transitoria come evidenziato per le MT di altri organismi, sia unicellulari che pluricellulari (Santovito *et al.*, 2000).

Da queste premesse è stato avviato lo studio su: "Evoluzione molecolare e funzionale di metallotioneine nel protozoo ciliato *Tetrahymena*", nell'ambito del Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica.

In *T. pigmentosa* è stata purificata ed è stato clonato il cDNA corrispondente di una seconda MT (MT-2), che risulta invece

inducibile dal Cu (Santovito *et al.*, 2001). Anche questa proteina risulta insolitamente lunga, dal momento che consta di 96 amminoacidi con 30 cisteine (30%), ed il gene che la codifica non presenta introni. L'analisi delle sequenze amminoacidiche e geniche ha messo in evidenza una scarsa similarità con MT-1 (circa il 25%). La valutazione dell'espressione genica di questa isoforma ha dimostrato che essa viene rapidamente indotta in seguito al trattamento delle cellule con Cu, per poi subire una successiva down-regulation. Il rapido accumulo di Cu all'interno delle cellule promuoverebbe un'immediata attivazione della trascrizione di MT-2; quest'ultima, a sua volta, determina un incremento della sintesi delle MT. Successivamente la concentrazione di Cu si stabilizza, mentre si assiste ad un abbassamento dei livelli del messaggero; probabilmente le MT indotte dal Cu vanno a legare il metallo in eccesso che quindi non è più disponibile per l'attivazione della trascrizione genica di altra proteina. Tale ipotesi sarebbe confermata dal fatto che si stabilizzano anche i livelli di MT.

La presenza dei metalli nell'ambiente è soggetta a cambiamenti, in relazione a molteplici fattori. Gli organismi, quindi, debbono essere in grado non solo di discriminare tra metalli non essenziali ed essenziali, ma altresì di mantenere un delicato equilibrio tra i livelli fisiologici e tossici di questi ultimi. In quest'ottica si è voluta studiare l'interazione tra metalli essenziali come il Cu e non essenziali quale il Cd sull'espressione genica di MT-1 e MT-2 in *T. pigmentosa*. È stato visto che la miscela di Cu e Cd, rispetto al trattamento con le stesse concentrazioni dei singoli metalli, agisce in modo sinergico nell'espressione di entrambe le isoforme, anche se in maniera differenziale (Boldrin *et al.*, 2002). È stato inoltre verificato che lo Zn, uno dei più comuni induttori di MT, risulta inefficace nell'attivare la trascrizione genica di entrambe le isoforme.

Negli ultimi anni la specie *Tetrahymena thermophila* è stata oggetto di un notevole sviluppo di "tools" di genetica molecolare che hanno reso accessibile il potenziale di tale organismo per ricerche in varie aree, quali la genomica funzionale *in vivo*, le scienze biomediche, ambientali e biotecnologiche. Inoltre ne è stato completato il sequenziamento dell'intero genoma macronucleare. La ricerca quindi si è concentrata in *T. thermophila*, in cui era stata precedentemente identificata MTT1, una MT costituita da 168 amminoacidi che viene indotta dal Cd (Shang *et al.*, 2002). MT-1 e MT-

2 sono state quindi clonate anche in questa specie ed è stata successivamente identificata un'altra isoforma: *MTT2*, di 108 amminoacidi. Essa risulta inducibile dal Cu come evidenziato da esperimenti di espressione mediante RT-PCR semiquantitativa.

Dal momento che è stato quindi possibile implementare il database delle sequenze di MT disponibili, sono state avviate analisi di tipo filogenetico per chiarire la storia evolutiva di queste proteine nel genere *Tetrahymena*. Da queste analisi è stato possibile ipotizzare che MT-1/*MTT1* e MT-2/*MTT2* si siano evolute attraverso due eventi indipendenti di duplicazione di un comune segmento ancestrale. Tale processo spiegherebbe inoltre l'inusuale dimensione di queste MT, le cui sequenze primarie sono in assoluto le più lunghe di tutte le MT studiate finora (Boldrin *et al.*, 2003).

Recentemente, la comunità scientifica ha posto particolare attenzione alle potenzialità di *Tetrahymena* in campo biotecnologico, quale modello ideale per l'espressione di proteine eterologhe, dal momento che nessun sistema di espressione (*E. coli*, lieviti, linee cellulari di insetto e mammifero) è universalmente utilizzabile. *T. thermophila* appare un buon sistema per la produzione di antigeni di superficie e di proteine di protozoi parassiti, quali *Ichthyophthirius multifiliis* (parassita di pesci d'acqua dolce) e *Plasmodium falciparum* (l'agente eziologico della malaria), poiché questi parassiti condividono con *T. thermophila* il codice genetico (Gaertig *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2002). Inoltre, molti organismi patogeni per l'uomo (quali i plasmodi ed i micoplasmi) presentano, al pari di *T. thermophila*, genomi con tratti particolarmente ricchi di AT, instabili nei sistemi di espressione convenzionali. *T. thermophila* è stata quindi proposta come sistema sperimentale di elezione per la caratterizzazione delle funzioni di proteine, per studi strutturali e per la produzione di vaccini. In quest'ottica è stata utilizzata l'isoforma

MTT2, al fine di iniziare una caratterizzazione funzionale dei promotori delle MT in *Tetrahymena*. Questa fase della ricerca è stata condotta durante il mio soggiorno nel laboratorio del Dr. Gaertig (University of Georgia, USA), con il quale è stata avviata una collaborazione. Una porzione del promotore di *MTT2* è stata clonata in un vettore di espressione, a monte di un gene chimero utilizzato come *reporter* e dato dalla fusione della regione codificante di *NRK2* (Nima Related Kinase) con la *GFP* (Green Fluorescence Protein). Il vettore è stato costruito in modo tale da consentire l'inserimento del gene esogeno nel locus della *β -tubulina 1* (*BTU1*) per ricombinazione omologa, mediante bombardamento biolistico. Per la trasformazione è stata utilizzata *T. thermophila* CU522. Questo ceppo presenta una mutazione nel gene *BTU1* che conferisce alle cellule la sensibilità al paclitaxel, un agente stabilizzante dei microtubuli, che è stato quindi utilizzato quale agente selezionante delle cellule trasformate (cioè di quelle che hanno perso la mutazione a seguito della ricombinazione omologa). I trasformanti sono stati poi trattati con Cu ed osservati *in vivo* al microscopio a fluorescenza, al fine di verificare la funzionalità del promotore di *MTT2*. La proteina chimera si localizza in corrispondenza dell'estremità delle ciglia, sia orali che somatiche, e dei corpi basali; l'intensità della marcatura è risultata intensa soprattutto nelle cellule in divisione, dal momento che *NRK2* è attivo soprattutto all'inizio della fase M. Per contro, nelle cellule di controllo non trattate con Cu, si assiste a fenomeni di debole autofluorescenza presentati dai granuli e vacuoli citoplasmatici.

Da questi dati preliminari è emerso che il promotore di *MTT2* risulta un buon candidato quale sistema inducibile/reprimibile in grado di facilitare l'espressione di geni omologhi ed eterologhi, che può quindi trovare applicazioni in campo biotecnologico.

Riferimenti bibliografici

- Albergoni V, Piccinni E (1998). In Rainsford KD, Milanino R, Sorenson JRI, Velo GP (ed.). Kluwer Academic Publishers, London, pp 61-78
Boldrin F, Santovito G, Irato P, Piccinni E (2002). Protist 153: 283-291
Boldrin F, Santovito G, Negrisolò E, Piccinni E (2003). Protist 154: 431-442
Gaertig J, Gao Y, Tishgarten T, Clark TG, Dickerson HW (1999). Nat Biotechnol 17: 462-465
Ghoshal K, Jacob ST (2001). Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 66: 357-384
Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W (1994). EMBO J 13: 2870-2875
Kägi JHR (1991). Methods Enzymol 205: 613-626
Kägi JHR (1993). In Suzuki KT, Imura N, Kimura M (ed.). Metallothionein III. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 29-55
Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M (1984). Nature 308: 513-519

Klaassen CD, Liu JE, Choudhuri S (1999). *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 39: 267-294
Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V (2000). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 35-70
Orias E (2002). <http://www.lifesci.ucsb.edu/~genome/Tetrahymena/SeqInitiative/WhitePaper.htm>
Peterson DS, Gao Y, Asokan K, Gaertig J (2002). *Mol Biochem Parasitol* 122: 119-126
Piccinni E, Bertaggia D, Santovito G, Miceli C, Kraev A (1999). *Gene* 234: 51-59
Piccinni E, Staudenmann W, Albergoni V, De Gabrieli R, James P (1994). *Eur J Biochem* 226: 853-859
Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Hergersberg M, Gariglio M, Dembic Z, Schaffner W (1993). *EMBO J* 12: 1355-1362
Sadhu C, Gedamu L (1988). *J Biol Chem* 263: 2679-2684
Samson SLA, Gedamu L (1998). *Progr Nucleic Acid Res* 59: 257-288
Santovito G, Irato P, Piccinni E (2000). *Eur J Protistol* 36: 437-442
Santovito G, Irato P, Palermo S, Boldrin F, Sack R, Hunziker P, Piccinni EL (2001). *Protist* 152: 219-229
Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH (2002). *J Biol Chem* 277: 20438-20445
Shang Y, Song X, Bowen J, Corstanje R, Gao Y, Gaertig J, Gorovsky MA (2002). *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3734-3739
Viarengo A, Nott JA (1993). *Comp Biochem Physiol* 104C: 355-372
Winge DR (1998). *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* 58: 165-195

Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente, la Natura e la Salute dell'Uomo (XVI ciclo)

Tesi di Dottorato

“Interazione cellulare predatore-preda nei protozoi ciliati mediata dalle sostanze tossiche estrusomali”

(Tesi discussa il 20/02/04; tutore Prof. Akio Miyake)

Federico Buonanno

Dipartimento di Biologia Molecolare, Cellulare e Animale, Università degli Studi di Camerino

Studi recenti hanno mostrato che un ruolo importante nell'ambito dell'interazione predatore-preda nei protozoi ciliati è dato dagli estrusomi, organelli estrusibili tipici dei protisti, delimitati da una membrana. Gli estrusomi sono generalmente collocati subito sotto la superficie cellulare ed hanno la caratteristica di scaricare il loro contenuto al di fuori della cellula in seguito a vari stimoli esterni. Probabilmente tutti i ciliati a vita libera posseggono gli estrusomi, ma la loro funzione è ancora poco conosciuta. E' noto che le pigmentocisti (granuli di pigmento estrusivi) di due ciliati eterotrichi pigmentati, *Blepharisma japonicum* e *Stentor coeruleus*, funzionano come organelli di difesa chimica contro il ciliato predatore *Dileptus margaritifer* (Miyake et al., 1990, 2001; Harumoto et al., 1998). La base chimica per la difesa è costituita dai pigmenti tossici, la blefarismina per *B. japonicum* e la stentorina per *S. coeruleus*, entrambi contenuti nelle loro rispettive pigmentocisti. Prima di questi studi si conosceva poco riguardo la difesa chimica per

mezzo di estrusomi, eccetto che le toxicisti venissero usate non solo per catturare le prede, ma anche per difesa contro i predatori (Hausmann & Hülsmann, 1996). Queste scoperte hanno suggerito che eventuali tossine utilizzate per difesa chimica possano trovarsi anche in altre categorie di estrusomi.

E' noto che alcuni ciliati eterotrichi possiedono dei granuli corticali senza colore. Questi organelli sono morfologicamente simili alle pigmentocisti in *B. japonicum* ed in *S. coeruleus*, suggerendo la possibilità che anche essi siano estrusomi, ma, fino ad ora, nulla si sa sulla loro funzione. Uno di questi eterotrichi è il *Climacostomum virens* (Peck et al., 1975). Di recente è stata isolata, da un estratto di cellule di *C. virens* in etanolo al 70%, una tossina resorcinolica incolore identificata come 1,3-diidrossi-5-[(Z)-2'-nonenil]benzene e chiamata climacostol (Masaki et al., 1999, 2004). Gli autori suggeriscono che questa tossina venga utilizzata dal ciliato per difesa contro i predatori.

La prima parte del mio lavoro di ricerca durante il dottorato è, infatti, dedicato allo studio dei granuli corticali incolori di *C. virens* come estrusomi utilizzati per difesa chimica e ad una prima analisi del meccanismo di citotossicità del climacostol.

Si è osservato che cellule di *C. virens* attaccate dal ciliato predatore Haptorida *Dileptus margaritifer* rilasciano dalla zona colpita una sostanza torbida, individuabile tramite microscopia a campo scuro e nuotano via dal predatore che, nel frattempo, nuota all'indietro. Questa osservazione suggerisce che *C. virens* sfugge all'attacco di *D. margaritifer* utilizzando una sostanza tossica scaricata da estrusomi. Le osservazioni seguenti sono a sostegno di questa ipotesi. (1) Esposizioni al freddo o all'enzima lisozima, metodiche già utilizzate per indurre una scarica massiva di estrusomi in altri ciliati, causano una riduzione in numero dei granuli corticali per cellula ed il rilascio di una sostanza tossica. (2) Cellule di *C. virens* così trattate (con il freddo o con il lisozima) sono vitali e si dividono come quelle non trattate, ma sono molto più vulnerabili all'azione predatoria di *D. margaritifer*. (3) La sostanza rilasciata da cellule esposte al freddo o al lisozima risulta essere molto tossica per *D. margaritifer* e per alcuni altri ciliati ma molto meno tossica per *C. virens*. (4) La presenza della tossina climacostol nella scarica dei granuli corticali è stata rigorosamente verificata con metodiche di HPLC (high pressure liquid chromatography) e di LC/ESI-MS (liquid chromatography – electrospray ionization mass spectroscopy). (5) Il climacostol sintetizzato chimicamente induce in *D. margaritifer* reazioni comportamentali e patologiche del tutto simili a quelle osservate durante l'interazione con *C. virens*.

In conclusione, possiamo affermare che i granuli corticali incolori di *C. virens* sono estrusomi utilizzati per la difesa chimica contro i predatori e che questa difesa è operata scaricando delle tossine incolori che includono il climacostol.

Per compiere un'analisi preliminare sul meccanismo di citotossicità del climacostol (C2) si è osservato se il doppio legame presente lungo la catena laterale di questa tossina sia implicato nel meccanismo di tossicità. Per fare questo abbiamo utilizzato due analoghi del climacostol sintetizzati chimicamente: 1,3-diidrossi-5-nonilbenzene (C1) e 1,3-diidrossi-5-(2'nonil)benzene (C3), nei quali il doppio legame della catena laterale è stato sostituito,

rispettivamente, con un legame singolo e con un triplo legame. Abbiamo ottenuto il valore di LD₅₀ (dose letale mediana) dei tre composti su *D. margaritifer* e su altre sette specie di ciliati dopo 1 ora e dopo 1 giorno. La tossicità (1/LD₅₀) su tutti i ciliati esaminati mostra la proporzione C1>C2>C3. Diversamente, il *C. virens* (il ciliato che secerne il climacostol) mostra, sia dopo 1 ora che dopo un giorno, la proporzione: C1>C3>C2 poiché risulta essere molto più resistente alla propria tossina.

I risultati suggeriscono che il doppio legame presente nella catena laterale del climacostol partecipa al meccanismo di citotossicità di questa tossina e che il *C. virens* possiede un meccanismo per resistere alla tossicità del climacostol dovuto alla presenza del doppio legame. Studi recenti mostrano, inoltre, che il climacostol inibisce la respirazione mitocondriale, suggerendo che questo potrebbe essere il meccanismo di citotossicità attuato contro i predatori eucarioti (Muto et al., 2003).

Gli eterotrici insieme con i karyorelictidi vengono oggi considerati i gruppi più primitivi tra i ciliati (Lynn, 1996; Schlegel & Eisler, 1996). Data questa affinità filogenetica è auspicabile ritenere che anche tra i karyorelictidi esistano specie che posseggono un meccanismo di difesa chimica tramite estrusomi. Nella seconda parte del mio lavoro è stato preso in esame un ciliato Karyorelictida di acqua dolce, *Loxodes striatus*, che presenta dei granuli di pigmento che conferiscono al ciliato una colorazione marrone chiaro. È stato esaminato se questi granuli di pigmento siano estrusomi, al pari delle pigmentocisti degli eterotrici colorati, e se essi vengano utilizzati per difesa chimica.

Su *L. striatus* abbiamo ottenuto i seguenti risultati: (1) i granuli di pigmento di questo ciliato sono estrusomi contenenti un pigmento tossico; (2) cellule decolorate di *L. striatus* prodotte inducendo una scarica massiva di granuli di pigmento sono più vulnerabili delle cellule pigmentate verso il ciliato predatore *D. margaritifer* e verso il catenulide turbellario *Stenostomum sphagnetorum*, mentre sono indistinguibili dalle normali cellule in morfologia e nella crescita; (3) il cell-free fluid che contiene il pigmento scaricato dai granuli di pigmento di *L. striatus* induce in *D. margaritifer* le stesse reazioni comportamentali e patologiche osservate durante l'interazione con *L. striatus*, e questo effetto del cell-free fluid scompare quando il pigmento viene

decolorato con la luce.

In conclusione, si può affermare che i granuli di pigmento di *L. striatus* sono estrusomi per la difesa chimica contro i predatori e che la difesa è basata sul pigmento tossico contenuto nei granuli di pigmento.

Lo studio di queste tossine può essere anche particolarmente interessante per future applicazioni in campo medico e ambientale. Infatti, generalmente, l'azione delle tossine rilasciate da funghi e batteri per contrastare gli organismi patogeni è, il più delle volte, specifica contro i procarioti e può essere usata per eliminare batteri patogeni da un organismo eucariota infetto. Tuttavia, l'uso di antibiotici contro patogeni eucarioti ha avuto, fino ad ora, pochi successi; questo perché la tossina usata contro l'agente patogeno è tossica anche per l'ospite eucariota. Un fattore importante per l'uso efficace in medicina degli antibiotici

contro gli organismi patogeni eucarioti è, quindi, la specificità della tossicità per gli eucarioti. Per questi motivi è promettente la ricerca di nuovi antibiotici nei gruppi di microrganismi eucarioti fino ad ora inesplorati come i protozoi. In tal senso abbiamo iniziato alcune ricerche allo scopo di utilizzare queste sostanze come antibiotici contro patogeni eucarioti (come *Plasmodium*, *Toxoplasma*, ecc.) in collaborazione con il Prof. Luigi Gradoni (Istituto Superiore di Sanità, Roma) e per applicazioni in agricoltura in collaborazione con il Prof. Hideo Iio (Department of Material Science, Osaka City University, Osaka, Japan).

In conclusione, lo studio delle sostanze tossiche coinvolte nell'interazione predatore-preda nei protozoi ciliati può contribuire, sia dal punto di vista teorico, che applicativo, alle discipline che si occupano di ecologia, di ambiente e della salute dell'uomo.

Riferimenti bibliografici

- Harumoto T., Miyake A., Ishikawa N., Sugibayashi R., Zenfuku K. & Iio H. *Europ. J. Protistol.*, 34: 458-470, 1998.
Hausmann K. & Hülsmann N. "Protozoology". Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1996.
Lynn D. H. In: Hausmann K. & Bradbury P. H. (ed.) "Ciliates - Cells as Organisms". Gustav Fischer, Stuttgart, 51-62, 1996.
Masaki M. E., Harumoto T., Terazima M. N., Miyake A., Usuki Y. & Iio H. *Tetrahedron Letters*, 40: 8227-8229, 1999.
Masaki M. E., Hiro S., Usuki Y., Harumoto T., Terazima M. N., Buonanno F., Miyake A. & Iio H. *Tetrahedron*, 2004, in corso di stampa.
Miyake A., Harumoto T., Salvi B. & Rivola V. *Europ. J. Protistol.*, 25: 310-315, 1990.
Miyake A., Harumoto T., & Iio H. *Europ. J. Protistol.*, 37: 77-88, 2001.
Muto Y., Tanabe Y., Kawai K. & Iio H. *Jpn. J. Protozool.*, 36, No. 1., 2003.
Peck R., Pelvat B., Bolivar I. & De Haller G. J. *Protozool.*, 22: 368-385, 1975.
Schlegel M. & Eisler K. In: Hausmann K. & Bradbury P. H. (ed.) "Ciliates - Cells as Organisms". Gustav Fischer, Stuttgart, 73-91, 1996.

Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica (Protisti-Animali-Uomo-Ecologia Marina) (XVI ciclo)

Tesi di Dottorato

"Studio di endosimbionti batterici in alcune specie dell'ordine Euplotida: caratterizzazione, ruolo funzionale e possibile coevoluzione"

(Tesi discussa il 16/01/04; tutore Dott.ssa Giovanna Rosati)

Claudia Vannini

Dipartimento Etologia, Ecologia, Evoluzione, Università degli Studi di Pisa

Il fenomeno delle associazioni tra protozoi ciliati e organismi procarioti è conosciuto e studiato da molto tempo (per una rassegna

vedere Görtz, 2002). Le ricerche in questo campo sono state finora sviluppate principalmente in due direzioni: la

caratterizzazione delle specie batteriche coinvolte e la comprensione del significato biologico della relazione tra i due *partners*. I casi in cui entrambi gli aspetti sono stati analizzati sono un numero piuttosto esiguo, ed il privilegio dell'uno o dell'altro approccio ha portato ad una conoscenza solo parziale delle simbiosi studiate. Inoltre, le specie di protozoi ciliati indagate da questo punto di vista sono un numero piuttosto ristretto.

Oggetto della ricerca è lo studio di alcune simbiosi stabili e costanti tra simbionti batterici e tre specie di protozoi ciliati (*Euplotes magnicirratu*s, *E. harpa*, *Diophrys appendiculata*) appartenenti all'ordine Euplotida, un gruppo tassonomico finora scarsamente studiato per quanto riguarda quest'aspetto. Il lavoro si è concentrato principalmente su due obiettivi. Da un lato, i simbionti batterici sono stati identificati tramite analisi morfologiche e l'approccio del "ciclo completo dell'RNA ribosomale", comprendente la caratterizzazione dei geni per l'RNA ribosomale 16S e l'utilizzo di sonde oligonucleotidiche specificamente disegnate per la rilevazione *in situ* (Amann et al. 1995). Dall'altro, si è investigato il significato biologico dell'associazione, tramite esperimenti *in vivo* con antibiotici e prove di isolamento e coltura degli endosimbionti al di fuori dell'ospite. Per queste indagini, sono stati applicati diversi tipi di metodologie, come la microscopia elettronica a trasmissione (Transmission Electron Microscopy, TEM), tecniche di citochimica ed enzimo-citochimica, ma anche amplificazione del DNA e sequenziamento diretto seguita da ibridazione *in situ* a fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) e analisi filogenetica. Le prove di coltura dei simbionti batterici sono state eseguite utilizzando diversi metodi di isolamento per procarioti difficilmente coltivabili. La microscopia ottica ed elettronica a scansione, unita alla caratterizzazione dei geni per l'RNA ribosomale 18S è stata utilizzata per la determinazione tassonomica dei ciliati.

I tre ceppi di *E. magnicirratu*s studiati, nonostante la diversa provenienza geografica, ospitano un'unica specie di simbionte batterico (Vannini et al. 2004a). Infatti, la morfologia dei batteri è risultata identica nei tre ceppi. La loro forma è bastoncellare (0,5 µm in larghezza e 2,5 µm di lunghezza), possiedono due membrane e sono contenuti in vacuoli citoplasmatici (simbiosomi) probabilmente originati dal reticolo endoplasmatico ruvido dell'ospite. Le

sequenze del gene per l'RNA ribosomale 16S dei simbionti dei tre ceppi sono pressoché identiche (una delle tre sequenze differisce dalle altre due per una singola inserzione nucleotidica). L'analisi filogenetica ha poi chiarito che gli endosimbionti rappresentano una nuova specie batterica appartenente al genere *Devosia*, ordine *Rhizobiales* (classe *Alpha-Proteobacteria*). Poiché i tentativi di coltura dei simbionti fuori dall'ospite hanno dato esito negativo, la specie è stata proposta come candidata nuova specie (Murray & Schleifer 1994, Murray & Stackebrandt 1995) con il nome di "*Candidatus Devosia euplotis*" (Vannini et al. 2004a). Una sonda oligonucleotidica specifica per i membri del genere *Devosia* (Dev_819), ed una specie-specifica per il simbionte caratterizzato (DevEup_993) sono state disegnate e testate per rilevare la presenza nell'ambiente di questi batteri. Gli esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che l'associazione è vantaggiosa per l'ospite ciliato. Infatti, *E. magnicirratu*s aposimbionti perdono la capacità di digerire l'alga *Dunaliella tertiolecta* con cui sono abitualmente nutriti in laboratorio, andando incontro a morte nell'arco di poche settimane (Vannini et al. 2004b). Sono state quindi confrontate le diverse fasi del processo digestivo nei ciliati aposimbionti e nei "wild-type". Test eseguiti con Acridina Orange hanno chiarito che l'acidificazione del vacuolo digestivo avviene regolarmente nelle popolazioni aposimbiontiche, mentre studi di enzimo-citochimica hanno mostrato la totale assenza di attività della fosfatasi acida, il principale enzima litico coinvolto nella digestione. I tentativi di coltura dei simbionti al di fuori dell'ospite hanno dato esito negativo sia su normali terreni di coltura, sia su omogenato di ciliato. I risultati ottenuti dimostrano come questa particolare associazione sia caratterizzata da un'alta specificità e da una forte interdipendenza reciproca.

Anche nel caso di *E. harpa* l'analisi è stata effettuata su tre ceppi provenienti da regioni geografiche diverse. Tutti e tre i ceppi ospitano uno stesso batterio di forma bastoncellare, largo 0,4 µm e lungo 4-6 µm. Anche in questo caso, i simbionti sono circondati da due membrane e contenuti in vacuoli citoplasmatici. La loro caratteristica morfologica principale è la presenza di almeno 4 nucleoidi elettrondensi. Tale morfologia è del tutto somigliante a quella di *Polynucleobacter necessarius*, simbionte essenziale di un'altra specie di *Euplotes*, *E.*

aediculatus (Heckmann 1975, Heckmann & Schmidt 1987). Batteri appartenenti al genere *Polynucleobacter* erano stati precedentemente descritti come simbionti citoplasmatici di un gruppo di specie dulciacquicole di *Euplotes* con *pattern* cirrale 9 tipo I. Tutti questi simbionti sono essenziali per il processo di divisione delle cellule ospiti (Heckmann et al. 1983). Caratterizzazione ed analisi delle sequenze del gene per l'RNA ribosomale hanno confermato che i simbionti di *E. harpa*, specie di *habitat* salmastro con *pattern* cirrale di tipo 10, appartengono al genere *Polynucleobacter* (similarità di sequenze tra 98,4% e 98,5%), ordine *Burkholderiales*, classe *Beta-Proteobacteria*. L'analisi filogenetica comparativa è stata condotta, in questo caso, a due livelli diversi. Una analisi effettuata considerando una selezione di sequenze di specie rappresentative dell'ordine *Burkholderiales* ha mostrato che i batteri di *E. harpa* sono filogeneticamente strettamente correlati a *P. necessarius*. Una seconda analisi è stata eseguita considerando una diversa selezione di sequenze, tutte aventi un'alta similarità (>95%) con la sequenza ottenuta dal simbiote. Tale selezione comprende sequenze di procarioti a vita libera e dei simbionti di *Euplotes*, che insieme costituiscono un clade monofiletico conosciuto come *Polynucleobacter necessarius-cluster* (Hirons et al. 1997, Hahn 2003). A causa di un alto grado di conservazione delle sequenze, quest'analisi non ha chiarito i rapporti filogenetici e tassonomici tra i membri di questo *cluster*. Studi filogenetici basati sul gene per l'RNA ribosomale 18S mostrano che le specie di *Euplotes* ospitanti simbionti *Polynucleobacter*-simili, incluso *E. harpa*, costituiscono un gruppo monofiletico (Petroni et al. 2002). La simbiosi con batteri di tipo *Polynucleobacter* potrebbe, dunque, essere stata instaurata come singolo evento evolutivo da un comune antenore degli ospiti ciliati, o in seguito ad acquisizione multipla di batteri diversi da parte delle diverse specie di *Euplotes*. I risultati ambigui dell'analisi filogenetica basata sull'RNA ribosomale 16S dei membri simbiotici e a vita libera del *P. necessarius-cluster* non hanno permesso di confermare o rigettare definitivamente alcuna ipotesi sull'origine di quest'associazione. Ulteriori indagini, basate su sequenze a più alto tasso evolutivo, sono dunque necessarie per testare efficacemente le due ipotesi. Anche in questo caso è stata disegnata sulla base delle sequenze

caratterizzate, una nuova sonda oligonucleotidica (Poly), specifica per tutti i membri del *P. necessarius-cluster*.

I risultati degli esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che anche il simbiote di *E. harpa* è essenziale per il suo ospite: i ciliati aposimbionti cessano di dividersi e muoiono inesorabilmente. Indagini successive hanno rivelato che i batteri sono necessari per il processo di glicogenolisi della cellula ospite (Vannini et al. 2003). Infatti, *E. harpa* privati dei simbionti mostrano un incremento anomalo della quantità di glicogeno intracellulare, anche se mantenuti in condizioni di digiuno. Inoltre, nelle cellule aposimbiontiche si è rilevata una forte attività dell'enzima glucosio-6-fosfatasi, non riscontrata nei controlli. Questo fa pensare che le cellule private dei batteri, non essendo più in grado di scindere il glicogeno, attivino una via metabolica alternativa per la produzione di glucosio da precursori non saccaridici. L'insieme di queste evidenze suggerisce che i simbionti *Polynucleobacter*-simili siano coinvolti nel metabolismo del glicogeno dell'ospite. Essi avrebbero quindi un ruolo nel suo metabolismo energetico, influenzando, quindi, indirettamente, la divisione della cellula, che è uno dei processi cellulari energeticamente più dispendiosi.

In due dei tre ceppi di *E. harpa* è stata evidenziata anche la presenza di simbionti di tipo diverso. Si tratta di batteri larghi 1 µm e lunghi 2-3 µm, con citoplasma più rarefatto. La presenza di nucleoidi elettrondensi non è mai stata rilevata. Ibridazioni *in situ* eseguite con sonde oligonucleotidiche classe-specifiche hanno chiarito che si tratta di alphaproteobatteri. Una parziale caratterizzazione del gene per l'RNA ribosomale 16S è stata ottenuta, in questo caso, con un approccio di tipo diverso. Il genoma batterico è stato separato da quello dell'ospite ciliato tramite PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) e successivamente eluito. Il DNA così purificato è stato amplificato e sequenziato. Sulla base della sequenza è stata disegnata una sonda specifica (Alphabod) che ha confermato la validità del dato. Risultati di ibridazioni doppie eseguite utilizzando la sonda Alphabod insieme ad una sonda specifica per l'intera classe degli *Alpha-Proteobacteria* ha poi chiarito che cellule di *E. harpa* possono ospitare contemporaneamente più tipi di batteri diversi, tutti appartenenti alla stessa classe. Il ruolo di questo gruppo di simbionti non è ancora chiaro; la presenza di endosimbionti

secondari era stata precedentemente rilevata anche in altre specie di *Euplotes* ospitanti batteri *Polynucleobacter* (Heckmann et al. 1983).

Per quanto riguarda *D. appendiculata*, lo studio è stato condotto su un unico ceppo e su una coltura policlonale proveniente dallo stesso sito di campionamento. I suoi simbionti batterici hanno forma bastoncellare e presentano due diversi morfotipi. Quello più comune misura 0,4 µm in larghezza e 1,6 µm in lunghezza, possiede un citoplasma rarefatto e l'organizzazione delle membrane tipica dei batteri Gram-negativi. Il secondo morfotipo si distingue per le dimensioni leggermente più piccole (0,3 µm in larghezza e 1,5 µm in lunghezza), ed è caratterizzato da un citoplasma fortemente elettrondenso. Entrambi i morfotipi si trovano liberi nel citoplasma e sono circondati da un alone chiaro non delimitato da membrana. Questi caratteri morfologici sono tipici dei membri della famiglia delle *Rickettsiaceae*, tanto da essere stati recentemente inclusi nella descrizione ufficiale di questo gruppo tassonomico (Dumler et al. 2001). La sequenza relativa al gene per l'rRNA ribosomale 16S ha un'alta similarità (>92%) con quelle delle specie appartenenti al genere *Rickettsia*. Infatti, l'analisi filogenetica ha confermato che questi nuovi simbionti sono chiaramente inclusi nel clade della famiglia delle *Rickettsiaceae* (*Alpha-Proteobacteria*), pur occupando una posizione indipendente rispetto ai membri del genere *Rickettsia*. Il simbionte di *D. appendiculata* potrebbe, dunque, rappresentare non solo una nuova specie, ma addirittura un nuovo genere di questa famiglia (Vannini et al. 2004c). Membri delle *Rickettsiaceae* erano fino ad ora conosciuti

esclusivamente come simbionti obbligati di artropodi. Si ipotizzava, quindi, che il loro ospite primario ancestrale appartenesse a questo gruppo di animali, e che la loro persistenza in natura dipendesse strettamente dalla presenza di artropodi. La recente descrizione di due nuove specie del genere *Rickettsia* come simbionti di sanguisughe (Kikuchi et al. 2002) e la caratterizzazione, qui riportata, di una nuova specie della stessa famiglia come simbionte di un protozoo ciliato, indicano che questo gruppo di procarioti è più diversificato e diffuso di quanto finora supposto, e che la sua rilevanza ecologica potrebbe essere pari a quella medica. Le due sonde oligonucleotidiche messe a punto (Rick_527 e Rick_1442), specifiche per i membri delle *Rickettsiaceae*, potranno essere convenientemente utilizzate per ulteriori ricerche in questo campo. Riguardo agli esperimenti *in vivo*, i trattamenti antibiotici utilizzati allo scopo di ottenere ciliati privi di batteri sono risultati inefficaci o dannosi anche per la cellula ospite. La relazione esistente tra *D. appendiculata* ed il suo endosimbionte non è stata, purtroppo, ancora chiarita. Un rapporto di tipo parassitario non può essere escluso, vista la natura patogena di quasi tutti i membri delle *Rickettsiaceae*. Tuttavia, l'associazione è stabile e duratura ed il ciliato ospite è comunque in grado di sopravvivere e riprodursi normalmente.

Le associazioni tra protozoi ciliati e batteri, analizzate in questa tesi, hanno contribuito ad ampliare le conoscenze acquisite in questo campo, soprattutto per quanto riguarda la diversificazione sia delle specie coinvolte, sia del tipo di rapporto tra i due *partners*. I dati emersi, inoltre, dimostrano la diffusione e la varietà delle simbiosi presenti all'interno dell'ordine Euplotida.

Riferimenti bibliografici

- Amann R., Ludwig W. & Schleifer K.H. (1995). *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dash G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. (2001). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 2145-2165.
- Görtz H.-D. (2002). *The prokaryotes*, electronic edition. Release 3.11. <http://link.springer-ny.com:6335/contents/index.html>
- Hahn M.W. (2003). *Appl. Environm. Microbiol.*, 69: 5248-5254.
- Heckmann K. (1975). *J. Protozool.*, 22: 97-104.
- Heckmann K., ten Hagen R. & Görtz H.-D. (1983). *J. Protozool.*, 30: 284-289.
- Heckmann K. & Schmidt H.J. (1987). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 456-457.
- Hirons W.D., Methè E.A., Nierzwickbauer S.A. & Zehr J.P. (1997). *Appl. Environm. Microbiol.*, 63: 2957-2960.
- Kikuchi Y., Sameshima S., Kitade O., Kojima J. & Fukatsu T. (2002). *Appl. Environm. Microbiol.*, 68: 999-1004.
- Murray R.G.E. & Schleifer K.H. (1994). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:174-176.
- Murray R.G.E. & Stackebrandt E. (1995). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 186-187.
- Petroni G., Dini F., Verni F. & Rosati G. (2002). *Mol. Phyl. Evol.*, 22: 118-130.
- Vannini C., Petroni G., Schena A., Verni F. & Rosati G. (2003). *Europ. J. Protistol.*, 39: 481-485.
- Vannini C., Rosati G., Verni F. & Petroni G. (2004a). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1151-1156.
- Vannini C., Schena, A., Verni F. & Rosati G. (2004b). *12 Aq. Microb. Ecol.*, 36: 19-28.

Vannini C., Petroni G., Verni F. & Rosati G. (2004c). *Microb. Ecol.*, in corso di stampa.

Invito per l'anno 2005

I docenti tutori dei dottorandi che discuteranno nel 2005 una Tesi di Dottorato di Ricerca di argomento protistologico sono invitati a far preparare dai propri dottorandi un breve compendio della loro Tesi che dovrà essere inviato insieme con i dati essenziali (nome del dottorando, nome del tutore, titolo e data di discussione della Tesi) alla Segreteria della Società.

Prof.ssa Maria Umberta Corrado, DIP.TE.RIS., Corso Europa 26, 16132 Genova.

Tel.: 010/3538031 Fax: 010/3538209

e-mail: corrado@dipteris.unige.it

Maria Umberta Corrado, Fernando Dini

Proposta di Borsa di Post-dottorato

In data 29 Giugno 2004 abbiamo ricevuto il seguente messaggio e-mail di interesse per i Soci.

Dear Colleagues,

I am writing to solicit your help in finding a postdoctoral fellow to participate in our studies of telomere replication and telomere capping in *Tetrahymena*. I am attaching an advertisement for the position and I would be most grateful if you could post it in your Department and forward it to people who you think might be interested in the position. Interested candidates can learn more about the lab and our projects at <http://homepages.uc.edu/~pricecm/index.htm> The position is funded by the National Institutes of Health and funds are available for 3-4 years.

Thanks very much for your help.

Carolyn

POSTDOCTORAL POSITION IN TELOMERE BIOLOGY

A position is available immediately to study telomere replication and capping in the ciliate *Tetrahymena*. Telomeric DNA is packaged into a protective complex that acts as a cap over the chromosome end. The first goal of the project is to learn more about the composition and architecture of this protective cap. We will achieve this by examining the role of telomerase, telomere proteins and repair proteins in cap formation. The second goal is to characterize the DNA processing steps that take place at the telomere following DNA replication. These processing steps are required to generate the terminal DNA structure needed for telomere protein binding and end protection. *Tetrahymena* provides a unique opportunity to address these fundamental aspects of telomere biology because it has thousands of telomeres, excellent genetics and is biochemically tractable. Candidates should have a strong background in biochemistry and/or molecular biology. The University of Cincinnati Medical School is part of a large medical center complex that provides an outstanding scientific environment and superior research facilities.

Cincinnati offers a high standard of living with excellent access to both the arts and outdoor activities. For further information about the University of Cincinnati and the Price Lab see:

<http://homepages.uc.edu/~pricecm/index.htm>

Interested individuals should send a description of research interests, CV and the names and addresses of three references to:

Carolyn Price (Associate Professor)

Department of Molecular Genetics, Biochemistry and Microbiology, College of Medicine

University of Cincinnati ML 524

231 Albert Sabin Way

Cincinnati, OH 45267

Phone (513) 558 0450

Fax (513) 558 8474

Congressi di interesse protozoologico 2002: impressioni, riflessioni

XXIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Protozoologia

Porto Conte, 4-5 Ottobre 2002

Il 23° Convegno Nazionale della Società Italiana di Protozoologia si è tenuto a Porto Conte (Alghero) nei giorni 4 e 5 Ottobre 2002 ed ha visto l'intervento dei principali esperti del settore italiani (sia docenti universitari che ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità), oltre che una serie di letture magistrali tenute da colleghi stranieri (Svizzera). Il numero dei partecipanti è stato di circa 60 ricercatori.

Come da tradizione, sono stati affrontati argomenti riguardanti sia protozoi a vita libera che parassiti; sono state infatti toccate tematiche riguardanti la biologia di base dei protozoi e le implicazioni mediche delle infezioni determinate da questi microorganismi. In particolare sono state presentate 22 comunicazioni orali e 7 poster.

Grande enfasi è stata posta nei confronti dello studio della Leishmaniosi, una infezione protozoaria di grande interesse, vista la diffusione sia fra gli uomini che gli animali. A questo tema è stata dedicata la lettura inaugurale, tenuta dal Prof. Jaques Mauel dell'Università di Losanna, Svizzera, oltre alcune comunicazioni orali e poster (Marina Gramiccia, Antonio Prodi). Nel caso degli altri protozoi di interesse parassitario, sono stati affrontate tematiche riguardanti la diagnosi, la fisiologia, la biologia molecolare e il controllo farmacologico di *Entamoeba histolytica* (Luigi Gradoni), *Dictyostelium discoideum* (Dianella Savoia), *Trichomonas vaginalis* (Paola Rappelli, Daniele Dessì, Laura Mammarella, Antonella Mattana), *Toxoplasma* (Maria Cristina Angelici), malaria (Ivana Persico, Andrea Angius), e *Acanthamoeba* (Luisa Alberti).

Per quanto invece riguarda i protozoi a vita libera, sono stati presentati molti interessanti modelli sperimentali, approfondendo aspetti fisiologici e biochimici di protozoi, come nel caso dello studio del pigmento di *Loxodes striatus* (Federico Buonanno), dei recettori GABA_B in *Paramecium* (Paola Fronte), dello studio del simbionte di *Euplotes magnicirratu*s (Claudia Vannini), di kinasi di *Euplotes raikovi* (Barbara Di Pretorio), delle attività colinesterasiche di *Dictyostelium discoideum* (Andrea Amaroli). *Colpoda inflata* ed *Euplotes* sono anche stati oggetto di studi di carattere ecologico ed ambientale (Maria Giovanna Chessa, Laura Guidolin, Olimpia Coppellotti). Un gruppo di comunicazioni si è focalizzato nella caratterizzazione di vari aspetti di ciliati psicrofili (Sandra Pucciarelli, Piero Luporini). Sono state caratterizzate alcune interessanti proteine come nel caso di *Paramecium primaurelia* (Marzia Ognibene, Francesca Trielli). Studi molecolari sono stati presentati da Antonietta La Terza e Cristina Miceli per valutare la risposta a stress ambientali. Sono state affrontate anche tematiche tassonomiche (Letizia Modeo).

Il livello scientifico delle varie comunicazioni e poster è stato in elevato ed ha sviluppato l'interesse dei ricercatori presenti, stimolando lo scambio di informazioni e la creazione di nuove collaborazioni. Le discussioni e gli scambi di opinioni, scientifiche e non, sono continuati anche durante la cena sociale, basata su vari piatti della cucina marinara del Nord Sardegna, accompagnati da buon vino.

Pier Luigi Fiori

INDIRIZZI DI POSTA ELETTRONICA DEI SOCI

| | | | |
|-------------------|-------------|-------------------------------|----------|
| Amaroli | Andrea | amaroli@dipteris.unige.it | Genova |
| Albergoni | Vincenzo | vincenzo.albergoni@unipd.it | Padova |
| Andreoli | Ilaria | i.andreoli@dee.unipi.it | Pisa |
| Angelici | M. Cristina | angelici@iss.it | Roma |
| Banchetti | Rosalba | rbanchetti@deee.unipi.it | Pisa |
| Barbanera | Filippo | barbanera@deee.unipi.it | Pisa |
| Beran | Alfredo | beran@univ.trieste.it | Trieste |
| Brandonisio | Olga | brandonisio@midim.uniba.it | Bari |
| Buonanno | Federico | buonanno@unicam.it | Camerino |
| Calderaro | Adriana | adriana.calderaro@unipr.it | Parma |
| Caleffi | Alberta | acaleffi@ao.pr.it | Parma |
| Campisi | Enza | enza.campisi@unifi.it | Firenze |
| Cappuccinelli | Piero | pcappuc@uniss.it | Sassari |
| Chessa | M. Giovanna | gchessa@dipteris.unige.it | Genova |
| Coppellotti | Olimpia | olimpia.coppellotti@unipd.it | Padova |
| Corrado | M. Umberta | corrado@dipteris.unige.it | Genova |
| Dettori | Giuseppe | giuseppe.dettori@unipr.it | Parma |
| Di Giuseppe | Graziano | g.digiuseppe@deee.unipi.it | Pisa |
| Dini | Fernando | f.dini@deee.unipi.it | Pisa |
| Falugi | Carla | falugi@unige.it | Genova |
| Fiori | Luigi | fioripl@uniss.it | Sassari |
| Galati | Lucia | micromed@ipruniv.cce.unipr.it | Parma |
| Gradoni | Luigi | gradoni@iss.it | Roma |
| Gramiccia | Marina | gramicci@iss.it | Roma |
| Guidolin | Laura | laura.guidolin@unipd.it | Padova |
| Irato | Paola | paola.irato@unipd.it | Padova |
| La Terza | Antonella | antonietta.laterza@unicam.it | Camerino |
| Lattes | Aldo | lattes@dipteris.unige.it | Genova |
| Leonardi Cigada | Marisa | | Milano |
| Luporini | Pierangelo | piero.luporini@unicam.it | Camerino |
| Madoni | Paolo | paolo.madoni@unipr.it | Parma |
| Majori | Giancarlo | majori@iss.it | Roma |
| Mattana | Antonella | dsfanto@uniss.it | Sassari |
| Menegon | Michela | gradoni@iss.it | Roma |
| Miceli | Cristina | cristina.miceli@unicam.it | Camerino |
| Milani | Luisella | milanilu@univ.trieste.it | Trieste |
| Miyake | Akio | akio.miyake@unicam.it | Camerino |
| Modeo | Letizia | modeo@deee.unipi.it | Pisa |
| Monti | Marina | monti@univ.trieste.it | Trieste |
| Moretti | Annabella | rprof2f2@unipg.it | Perugia |
| Navarra | Elisabetta | elisabetta.navarra@unipd.it | Padova |
| Ortenzi | Claudio | claudio.ortenzi@unicam.it | Camerino |
| Petroni | Giulio | g.petroni@deee.unipi.it | Pisa |
| Piccinni | Ester | ester.piccinni@unipd.it | Padova |
| Piergili Fioretti | Daniela | rprof2f2@unipg.it | Perugia |
| Politi | Huguette | huguettep@hotmail.com | Genova |
| Ramoino | Paola | ramoino@dipteris.unige.it | Genova |
| Rappelli | Paola | rappelli@uniss.it | Sassari |
| Rosati | Giovanna | rosatig@deee.unipi.it | Pisa |
| Sacchi | Luciano | lsacchi@unipv.it | Pavia |
| Santangelo | Giovanni | sant@deee.unipi.it | Pisa |
| Savoia | Dianella | dianella.savoia@unito.it | Torino |

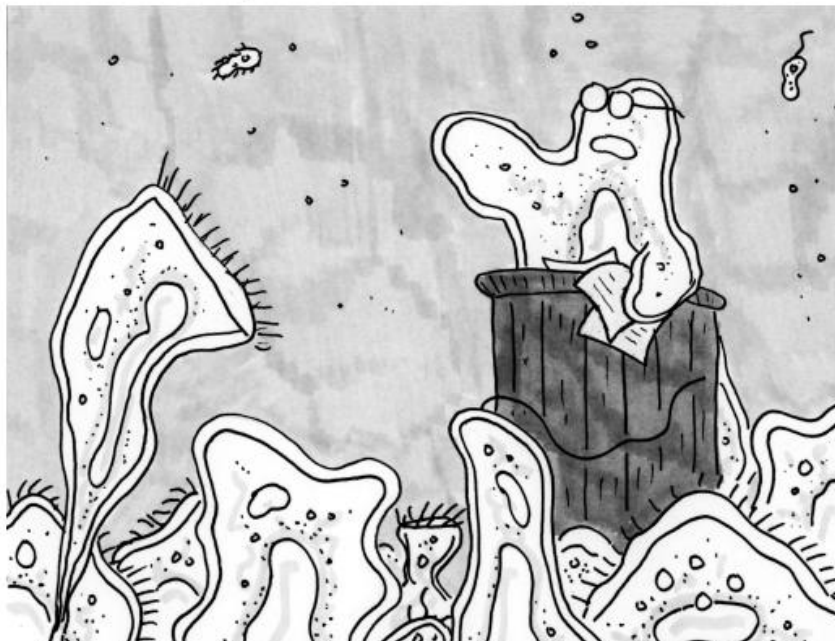
Severini
Trielli
Valbonesi
Vallesi
Vannini
Verni
Viarengo

Carlo
Francesca
Alessandro
Adriana
Claudia
Franco
Aldo

severini@iss.it
trielli@dipteris.unige.it
alessandro.valbonesi@unicam.it
adriana.vallesi@unicam.it
c.vannini@deee.unipi.it
f.verni@deee.unipi.it
aldo.viarengo@mf.n.unipmn.it

Roma
Genova
Camerino
Camerino
Pisa
Pisa
Alessandria

DOCTOR FUN presents BLOBS



Copyright © 2001 David Farley, d-farley@ibiblio.org

“We were nothing. Then came Antony van Leeuwenhoek.”

Prossimi Convegni

Presentazione dell'Embo-sponsored Faseb Summer Research Conference on "Molecular Biology of Ciliates" 'Il Ciocco' (Lucca), 3-8 Agosto 2005

Il prossimo convegno dal titolo "Molecular Biology of Ciliates", che ormai ha una lunga tradizione negli Stati Uniti, si svolgerà in Italia, dal 3 all'8 agosto 2005, presso Il Ciocco, Castelvecchio Pascoli (Lucca). La lunga serie di questi convegni, generalmente biennali, è iniziata nel 1981 al Pengree Park, Colorado, con l'organizzazione di Tom Cech (Nobel Prize per la chimica nel 1989) ed è seguita regolarmente con convegni organizzati come Gordon Conferences o FASEB Summer Conferences, alternativamente nella East o West Coast degli Stati Uniti. Il gruppo europeo del convegno, con una partecipazione italiana limitata ma costante, è andato sempre crescendo negli anni, e finalmente per il prossimo anno tutta la comunità scientifica di riferimento ha accolto unanime la proposta di svolgere l'evento in Italia. Secondo la tradizione, l'organizzazione è affidata a due ricercatori degli Stati Uniti ed uno europeo, che per questo evento saranno Judith Van Houten (University of Vermont Dept. of Biology, 109 Carrigan Dr., Burlington, VT, USA, Judith.Vanhouten@uvm.edu), Ted G. Clark (Cornell University, Microbiology and Immunology Department, Ithaca NY, USA, tgc3@cornell.edu) e Cristina Miceli (Dipartimento di Biologia Molecolare, Cellulare, Animale, Università di Camerino, cristina.miceli@unicam.it). L'organizzazione sarà affidata al FASEB sul cui sito (<http://src.faseb.org/>) appariranno nei prossimi mesi tutte le informazioni per la registrazione. La sponsorizzazione per il momento certa è fornita dall'EMBO, ma si attendono risposte anche da fonti di finanziamento statunitensi. Si prevede un costo di circa 700 Euro per persona includendo completamente accomodation, registrazione e partecipazione ad eventi sociali.

Il convegno prevede simposi con speaker ad invito e comunicazioni scelte dagli abstract inviati ed anche sessioni di poster e brevi workshop. Il convegno avrà tematiche generali affrontabili con approcci molecolari e particolare attenzione sarà rivolta a problemi di genomica.

Il programma preliminare dei simposi è qui sotto indicato e per il momento sembra certa la conferenza di apertura di David Allis:

- | | |
|------------|---|
| Day One: | Opening Reception Keynote speaker: David Allis, The Rockefeller University, Possible title: The Histone Code |
| Day Two: | Session 1: Title of session: Genome Organization and Re-organization Session 2: Title of session: Evolution and Population Biology |
| Day Three: | Session 3: Title of session: Bioinformatics and Functional Genomics Session 4: Title of session: Cytoskeleton and Cell Motility |
| Day Four: | Session 5: Title of session: Membrane Proteins, Regulated Secretion Session 6: Title of session: Morphogenesis and Development |
| Day Five: | Session 7: Title of session: DNA Replication, Repair and Telomeres Session 8: Title of session: Environmental Sensing and behavior |
| Day Six: | Session 9 – Morning: Title of session: Regulation of Gene Expression |

E' auspicabile una ampia partecipazione di ciliatologi italiani ed un invito è rivolto anche a parassitologi che prevedano possibili argomenti di confronto con la biologia molecolare di ciliati.

Cristina Miceli

Agenda

| ANNO | MESE | Promemoria dei Soci |
|------|------|--|
| 2005 | 2 | I Soci sono tenuti a versare la quota sociale di euro 31,00 entro il primo bimestre di ogni esercizio finanziario. Termine ultimo: 28-2. |
| | 9-10 | XXV Convegno Nazionale SIP |
| | 12 | 31-12 - Chiusura Esercizio Finanziario 2005 - Preparazione Bilancio Consuntivo 2005 - Preparazione Bilancio Preventivo 2006 |

Selezione bibliografica

Chemotherapeutic Targets in Parasites. T. E. Mansour, Cambridge University Press, 2002, pp 226. \$ 70.00.

De Carneri - Parassitologia Generale e Umana. C. Genchi, E. Pozio, XIII edizione, C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana div. Zanichelli, 2004, pp 576. Euro 48,00.

Guide to the Identification of Soil Protozoa – Testate Amoebae. K. J. Clarke, The Freshwater Biological Association, 2003, pp 40. £ 40.

Protistology. K. Hausmann, N. Hülsmann, R. Radek, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 2003, pp 379. Euro 64,00.

Protozoa Microbiology and Guide to Microscopic Identification. E. A. Minchin, Wexford College Press, 2003, pp 536. \$ 79.00.

The Pathogenic Enteric Protozoa: Giardia, Entamoeba, Cryptosporidium and Cyclospora. C. R. Sterling, D. A. Rodney, Kluwer Academic Publishers, 2004, pp 169. \$ 125.00.

The Trypanosomiases. I. Maudlin, Oxford University Press, 2004, pp 608. \$ 170.00.