



Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Scienze M.M.F.F.N.N

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche
e Farmaceutiche*

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE XXIV CICLO (S.S.D.: BIO/05)

Relazione finale di terzo anno

*Risposta infiammatoria all'inoculo di batteri ed isolamento di
peptidi antimicrobici in Anemonia sulcata (Cnidaria)*

Tutor:

Prof. Matteo Cammarata

Co-Tutor:

Dr. Philippe Roch

Dottoranda:

Maria Rosa Trapani

Coordinatore:

Prof. Nicolò Parrinello

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

Indice

1. Introduzione	4
1.1 Il phylum Cnidaria	4
1.2 Biotossine	6
1.3 Tossine degli cnidari	11
1.3.1 Nematocisti	11
1.3.2 Citolisine	13
1.3.3 Neurotossine specifiche per i canali sodici	16
1.3.4 Neurotossine specifiche per i canali potassio	19
1.3.5 Tossine non peptidiche	21
1.4 La risposta immunitaria	22
1.4.1 La risposta immunitaria negli invertebrati	22
1.4.2 L'immunità negli cnidari	25
1.4.2.1 Immunità cellulare	25
1.4.2.2 Immunità umorale	28
1.4.2.2.1 Alloriconoscimento e istocompatibilità	28
1.4.2.2.2 Recettori <i>Toll-like</i> e LRR	30
1.4.2.2.3 Integrine	33
1.4.2.2.4 Peptidi antimicrobici e metaboliti	33
1.4.2.2.5 Complemento e lectine	35
1.4.2.2.6 Rapporti simbiotici	36
1.4.2.2.7 Recettori immunitari intracellulari	38
2. Scopo della ricerca	41
3. Gli cnidari come modello di studio	43
3.1 Anthozoa	44
3.2 <i>Anemonia sulcata</i>	45
4. Materiali e Metodi	47

4.1 Raccolta e mantenimento animali	47
4.2 Inoculi	47
4.3 Preparazione dei campioni di <i>Anemonia sulcata</i>	47
4.4 Concentrazione proteica	48
4.5 Elettroforesi su gel SDS- PAGE	48
4.6 Colorazione con Blue di Comassie	49
4.7 Colorazione argentea	49
4.8 Valutazione dell'attività proteasica	50
4.9 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina	50
4.10 Valutazione dell'attività esterasica	51
4.11 Analisi statistica	51
4.12 Purificazioni e valutazione dell'attività antibatterica	51
4.12.1 Purificazione tramite SEP PAK	51
4.12.2 Concentrazione proteica	52
4.12.3 Attività antibatterica	52
4.12.4 Curva standard per gli antibiotici	53
4.12.5 Valutazione dell'attività batteriostatica (MIC)	53
4.12.6 Valutazione dell'attività battericida (MBC)	53
4.12.7 Cromatografia in fase inversa	54
4.12.8 Valutazione dell'attività antibatterica dei picchi	54
4.13 Spettrometria di massa e sequenziamento	55
4.14 Analisi <i>in silico</i>	56
4.15 Analisi istologiche	57
4.15.1 Inclusione in paraffina e taglio delle sezioni	57
4.15.2 Colorazione tricromica di Mallory	57
4.15.3 Colorazione tricromica di Gomori	58
5. Risultati e Discussione	59
5.1 Inoculi	59

5.2 Analisi elettroforetica	62
5.3 Attività enzimatiche	63
5.3.1 Valutazione dell'attività proteasica	63
5.3.2 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina	69
5.3.3 Valutazione dell'attività della esterasi	70
5.4 Analisi istologiche	71
5.4.1 Colorazione tricomica di Gomori	71
5.5 Purificazioni e valutazione dell'attività antibatterica	75
5.5.1 Attività antibatterica dei prodotti della SEP PAK	75
5.5.2 Confronto tra l'attività degli antibiotici e quella delle frazioni antibatteriche	77
5.5.3 Valutazione dell'attività batteriostatica (MIC) e battericida (MBC)	78
5.5.4 Cromatografia in fase inversa	80
5.5.5 Analisi spettrometrica di massa e sequenziamento	81
5.5.6 Analisi <i>in silico</i>	85
6. Considerazioni conclusive	91
Ringraziamenti	94
Appendice I	95
Appendice II	96
Bibliografia	100

1. Introduzione

1.1 Il phylum Cnidaria

Il phylum Cnidaria comprende più di 9000 specie; gli cnidari rappresentano i Metazoi primitivi, cioè i più semplici organismi pluricellulari che hanno raggiunto il livello di organizzazione tissutale. La caratteristica che li pone alla base della filogenesi dei metazoi, subito dopo i poriferi, è la presenza, in gran parte del phylum, di due strati cellulari, l'ectoderma e l'endoderma (o gastroderma). Si differenziano infatti da tutti gli altri metazoi per l'assenza di un mesoderma, anche se ormai diverse ricerche sostengono il contrario ed evidenze istologiche e dati sperimentali supportano l'esistenza di una differenziazione mesodermica in tutte le classi di cnidari (Seipel e Schmid, 2006; Boero et al., 2007). Le cellule di tutti gli cnidari sono immerse in una matrice extracellulare definita mesoglea (Argano et al., 2007). Alcune cellule, capaci di secernere muco, rivestono l'intero animale di uno strato protettivo mucillaginoso. Una singola apertura rappresenta l'ingresso alla cavità gastrovascolare, manca un ano e le sostanze indigeste vengono espulse direttamente tramite l'apertura orale. L'epidermide contiene diversi tipi di cellule; queste includono cellule epiteliomuscolari che si contraggono e permettono il movimento, cellule interstiziali che danno origine a molti altri tipi di cellule, come cellule uovo e spermatozoi, cnidociti ovvero cellule specializzate proprie degli cnidari, cellule che secernono muco, e cellule recettoriali e nervose che raccolgono e trasmettono informazioni sensoriali. Poiché le cellule sono a diretto contatto con l'acqua, gli cnidari sono sprovvisti di sistemi escretore, circolatorio e respiratorio specializzati; anche i sistemi nervoso e sensoriale sono presenti. La simmetria del corpo è tipicamente radiale o bilaterale.

Il phylum degli cnidari è caratterizzato per la presenza di due forme distinte: il polipo e la medusa. I polipi, generalmente sessili, sono cilindrici con i tentacoli solo ad una

estremità del corpo; le meduse sono planctoniche e la loro mesoglea è considerevolmente meno spessa che nei polipi. Gli cnidari comprendono sia forme solitarie che coloniali, sono prevalentemente carnivori grazie alla loro abilità di paralizzare e catturare le prede per mezzo delle nematocisti. La presenza di fossili di polipo e meduse è documentabile a partire dal Precambriano (Scrutton, 1979).

Le classi di cnidari attualmente riconosciute dalla maggior parte dei sistematici sono gli Anthozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa. L'unica classe probabilmente priva di tossine è quella dei Myxozoa, un gruppo di circa 2000 animali piccoli parassiti che solo recentemente sono stati mostrati appartenere a questo phylum.

Per molto tempo è stata discussa quale classe fosse alla base nell'evoluzione del phylum, tuttavia, con l'avvento delle metodologie molecolari filogenetiche e biologiche e sulla base del sequenziamento degli acidi nucleici, è stato possibile concludere con sicurezza che gli Anthozoi sono il gruppo base nell'albero filogenetico (Fig. 1) (Bridge et al., 1995; Collins et al., 2006; Turk & Kem 2009; Collins, 2009). Queste conclusioni sono basate su una considerazione sintetica della morfologia (Salvini-Plawen, 1978), poi supportata da dati di rDNA 18S (Wainwright et al., 1993; Collins, 1998), e più recentemente confermata dall'analisi di molte sequenze espresse da trascritti genici (expressed sequence tags, o EST) (Dunn et al., 2008).

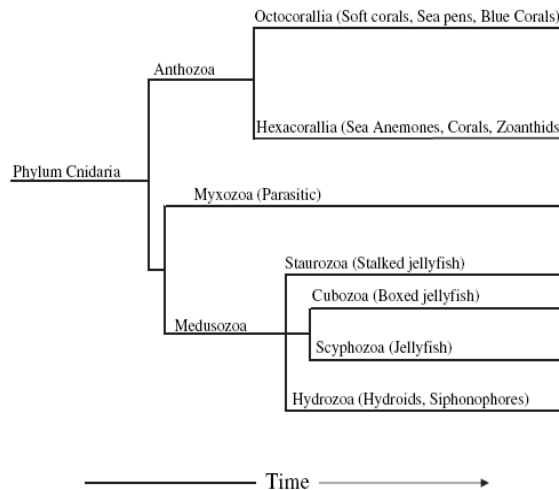


Fig. 1 Albero filogenetico semplificato del phylum Cnidaria (Collins 2009). Sono state considerate solo le relazioni tra le varie classi di cnidari

L'analisi filogenetica degli Cnidaria rappresentata in fig.1 ha confermato che gli Antozoi sono il sister clade dei Medusozoa, un'ipotesi che è sostenuta dalla morfologia (Salvini-Plawen, 1978; Bridge et al., 1995), dalla struttura genomica mitocondriale (Bridge et al., 1992), e da sequenze di rDNA (Berntson et al., 1999; Kim et al., 1999; Medina et al., 2001; Won et al., 2001; Collins, 2002). Gli Antozoi si ipotizzano composti da due sister cladi rappresentati da Octocoralli ed Esacoralli. I Medusozoa sono rappresentati da quattro classi: Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa e Staurozoa (Fig. 1).

1.2 Biotossine

L'utilizzo da parte degli animali di veleni per l'alimentazione, la difesa e altre interazioni interspecifiche sono il risultato di un lungo processo evolutivo che ha avuto luogo in e tra diversi taxa. Visto che l'uso di veleni è una strategia di diverse specie per sopravvivere in un ambiente specifico, non sorprende che i componenti di questi veleni spesso esercitino effetti specifici e potenti. Per questa stessa ragione i

veleni degli animali sono per gli scienziati una fonte interessante di molecole bioattive comunemente note come tossine (Aneiros and Garateix, 2004). Le biotossine sono sostanze organiche prodotte dagli organismi vegetali e animali che, quando vengono introdotte in altri organismi, esplicano su questi azioni biologiche diverse modificando profondamente alcune funzioni e causando la morte se la quantità somministrata raggiunge la dose letale (Ghiretti & Cariello 1984). L'ambiente marino è popolato da una moltitudine di organismi che, per sopravvivere all'accanita competizione hanno adottato diversi meccanismi di difesa ed offesa molto efficaci tramite l'utilizzo di biotossine. Lo studio di tali sostanze è sempre in continuo progresso, sia per ridurre i rischi diretti, ma soprattutto perché da queste è possibile trarre importanti applicazioni in campi che spaziano dalla biologia alla farmacologia. Si tratta infatti di molecole di origine biologica con ruolo attivo nello sviluppo e nell'esecuzione di svariate funzioni antivirali, antitumorali, antibatteriche utili anche nella sperimentazione clinica per il trattamento di specifiche patologie (Kumar et al., 2010). Attualmente circa il 45% degli agenti terapeutici riportati nelle farmacopee sono di origine naturale o derivano direttamente da molecole naturali (Blunt et al., 2004). L'ambiente marino è quindi un'enorme risorsa di prodotti bioattivi naturali per la scoperta di potenti agenti chemio terapeutici molti dei quali presentano caratteristiche strutturali/chimiche non trovate nei prodotti naturali terrestri. Il numero di prodotti naturali isolati da organismi marini è cresciuto rapidamente (Marinlit, 2007) e centinaia di nuovi composti vengono scoperti ogni anno (Proksch and Muller, 2006). Negli ultimi decenni, infatti, sono stati isolati 5000 prodotti del metabolismo secondario di organismi marini come nuovi composti chimici con potenziale terapeutico (Newman et al., 2000).

Non è possibile dare delle biotossine animali un quadro unitario dal punto di vista del loro significato fisiologico o della loro azione farmacologica né da quello della loro

natura chimica. A volte sono state elaborate nel corso dell'evoluzione come mezzi di cattura del cibo o come armi di difesa e di offesa. Alcune biotossine animali potrebbero essere composti intermedi di processi metabolici che casualmente risultano tossici per altri animali. Per quanto riguarda la natura chimica, le biotossine possono essere sostanze molto semplici che diffondono rapidamente dai tessuti che le hanno prodotte e passano nell'ambiente liquido esterno e lo avvelenano; in moltissimi casi sono invece sostanze di natura proteica o peptidica che esplicano la loro azione solo quando vengono introdotte nel corpo degli altri organismi. Alcune biotossine sono semplici derivati amminici e fenolici a basso peso molecolare; altri sono peptidi formati da pochi amminoacidi; altre, infine, proteine di peso molecolare elevato. Faulkner (Faulkner, 2000; Faulkner, 2001; Faulkner, 2002), Blunt (Blunt et al., 2008; Blunt et al., 2006), e Mayer (Mayer & Gustafson 2005; 2006; Mayer & Hamann 2005; Mayer & Lehmann, 2001; Mayer 1999; Mayer et al., 2009; Mayer & Lehmann, 2000) hanno fornito un ampio riesame del numero totale di prodotti naturali marini scoperti, e quelli con una significativa attività farmacologica preclinica e clinica per gli anni 1998-2006.

Durante il 2007-2008 sono stati studiati nuovi prodotti naturali marini antibatterici isolati da batteri marini, funghi, spugne, vermi e pesci (Tabella 1)(Mayer et al., 2011).

In tabella 2 sono riportate le attività farmacologiche, antibatteriche, antimicotiche, antiprotozoi, antitubercolari, e antivirali dei prodotti naturali marini del 2009-2011 (Mayer et al., 2013).

Tabella 1. Farmacologie Marine nel 2007–8: composti marini con attività antibatterica, anticoagulante, antimicotiche, antimalarica, antiprotozoa, antitubercolare, ed antivirale (Mayer et al., 2011)

Drug class	Compound/organism	Chemistry	Pharmacologic activity	MMOA	References
Antibacterial	Ascochyatin/fungus	Polyketide	<i>B. subtilis</i> inhibition	TCS (YycG and YycF) regulatory system	(Kano et al., 2008b)
Antibacterial	L-Amino acid oxidase SSAP/rockfish	Protein	<i>A. salmonicida</i> , <i>P. damsela subsp. piscida</i> and <i>V. parahaemolyticus</i> inhibition	H ₂ O ₂ mediates the antibacterial action	(Kitani et al., 2008)
Antibacterial	Arenicin-1/polychaete	Peptide	<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. aureus</i> inhibition	Binding and disruption of cell membrane	(Lee et al., 2007)
Antibacterial	Isoaaptamine/sponge	Alkaloid	<i>S. aureus</i> inhibition	Sortase A inhibition and fibronectin binding	(Jang et al., 2007c)
Antibacterial	Dysidea sp. Sesterterpenes/sponge	Terpenoid	<i>B. subtilis</i> inhibition	Isocitrate lyase inhibition	(Lee et al., 2008)
Antibacterial	Sulfoalkylresorcinol /fungus	Polyketide	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	FtsZ polymerization inhibition	(Kano et al., 2008a)
Antibacterial	Ambiguines H and I/bacterium	Alkaloid	<i>S. albus</i> and <i>B. subtilis</i> inhibition	Undetermined	(Raveh and Carmeli, 2007)
Antibacterial	Ariakemcins A and B/bacterium	Polyketide	<i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Oku et al., 2008)
Antibacterial	Ayamycin/bacterium	Polyketide	Gram-positive and -negative bacteria inhibition	Undetermined	(El-Gendy et al., 2008a)
Antibacterial	Batzelladine L and M/sponge	Alkaloid	<i>S. aureus</i> and methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Hua et al., 2007)
Antibacterial	L. herbaacea diphenyl ether/sponge	Polyketide	<i>B. subtilis</i> inhibition	Undetermined	(Hanif et al., 2007)
Antibacterial	Essramycin/bacterium	Alkaloid	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> and <i>M. luteus</i> inhibition	Undetermined	(El-Gendy et al., 2008b)
Antibacterial	(+)-Isojaspic acid/sponge	Terpenoid	<i>S. epidermis</i> inhibition	Undetermined	(Rubio et al., 2007)
Antibacterial	Lynamicins A–D/bacterium	Alkaloid	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(McArthur et al., 2008)
Antibacterial	Lipoxazolidinones A and B/bacterium	Polyketide	<i>Staphylococcus sp.</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> inhibition	Undetermined	(Macherla et al., 2007)
Antibacterial	Marinopyrrole A/bacterium	Alkaloid	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Hughes et al., 2008)
Antibacterial	(–)-Microcionin-1/sponge	Terpenoid	<i>M. luteus</i> inhibition	Undetermined	(Gaspar et al., 2008)
Antibacterial	Phomolide B/fungus	Polyketide	<i>E. coli</i> inhibition	Undetermined	(Du et al., 2008)
Antibacterial	Sargaquinoic acid derivative/alga	Terpenoid	<i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Horie et al., 2008)
Antibacterial	Tauramamide/bacterium	Peptide	<i>Enterococcus sp.</i> inhibition	Undetermined	(Desjardine et al., 2007)
Anticoagulant	Anticoagulant polypeptide (TGAP)/bivalve	Protein	Inhibition of factor II to IIa conversion	Specific binding to factor Va and factor II	(Jung et al., 2007b)
Antifungal	<i>Odonthalia corymbifera</i> bromophenols/alga	Polyketide	<i>Magnaporthe grisea</i> inhibition	Isocitrate lyase inhibition	(Lee et al., 2007)
Antifungal	Callipeltins J and K/sponge	Peptide	<i>C. albicans</i> inhibition	Undetermined	(D'Auria et al., 2007)
Antifungal	Holothurin B/sea cucumber	Triterpenoid glycoside	<i>T. mentagrophytes</i> and <i>S. schenckii</i> inhibition	Undetermined	(Kumar et al., 2007)
Antifungal	Neopeltolide/sponge	Polyketide	<i>C. albicans</i> inhibition	Undetermined	(Wright et al., 2007)
Antifungal	Pedein A/bacterium	Peptide	<i>R. glutinis</i> , <i>S. Cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i>	Undetermined	(Kunze et al., 2008)
Antifungal	Pseudoceratins A and B/sponge	PKS/NRPS	<i>C. albicans</i> and mutant <i>S. cerevisiae</i> inhibition	Undetermined	(Jang et al., 2007b)
Antimalarial	(E)-Oroidin and (E)-oroidin TFA salt/sponge	Alkaloid	<i>P. falciparum</i> K1 strain inhibition	FabI inhibition	(Tasdemir et al., 2007)
Antimalarial	Dragomabin/bacterium	Peptide	<i>P. falciparum</i> W2 strain inhibition	Undetermined	(McPhail et al., 2007)
Antimalarial	Venturamides A and B/bacterium	Peptide	<i>P. falciparum</i> W2 strain inhibition	Undetermined	(Linington et al., 2007)
Antimalarial	Nodulisporacid A/fungus	Polyketide	<i>P. falciparum</i> 94 strain inhibition	Undetermined	(Kasattrathat et al., 2008)
Antimalarial	Streptomyces sp. H668 polyether/bacterium	Polyketide	<i>P. falciparum</i> D6 and W2 strain inhibition	Undetermined	(Na et al., 2008)
Antimalarial	Tumonoic acid I/bacterium	Polyketide	<i>P. falciparum</i> D6 and W2 strain inhibition	Undetermined	(Clark et al., 2008)
Antimalarial	Chaetoxanthone B/fungus	Polyketide	<i>P. falciparum</i> K1 strain inhibition	Undetermined	(Pontius et al., 2008a)
Antiprotozoal	Plakortide P/sponge	Polyketide	Inhibition of <i>L. chagasi</i> and <i>T. cruzi</i>	Undetermined though not involving nitric oxide	(Kossuga et al., 2008)
Antiprotozoal	Viridamides A and B/bacterium	Peptide	Inhibition of <i>L. mexicana</i> and <i>T. cruzi</i>	Undetermined	(Simmons et al., 2008)
Antiprotozoal	Chaetoxanthone B/fungus	Polyketide	<i>T. cruzi</i> Tulahuen C4 strain inhibition	Undetermined	(Pontius et al., 2008a)
Antituberculosis	Bipinnapterolide B/coral	Terpenoid	<i>M. tuberculosis</i> inhibition	Undetermined	(Ospina et al., 2007)
Antituberculosis	8'-O-Demethylnigerone and 8'-O-demethylisonigerone/fungus	Polyketide	<i>M. tuberculosis</i> inhibition	Undetermined	(Zhang et al., 2008)
Antituberculosis	Caribenols A and B/soft coral	Terpenoid	<i>M. tuberculosis</i> inhibition	Undetermined	(Wei et al., 2007)
Antituberculosis	Parguosterols A and B/sponge	Triterpenoid	<i>M. tuberculosis</i> inhibition	Undetermined	(Wei et al., 2007)
Antituberculosis	Spiculoic acids/sponge	Polyketide	<i>M. tuberculosis</i> inhibition	Undetermined	(Berrue et al., 2007)
Antiviral	Esculetin ethyl ester/sponge	Polyketide	SARS-Corona virus viral protease 3CL inhibition	Undetermined	(de Lira et al., 2007)
Antiviral	Cryptonemia crenulata galactan/alga	Polysaccharide	Dengue type 2 inhibition	Inhibition of viral binding and cell	(Talarico et al., 2007)
Antiviral	6,6'-Bieckol/alga	Shikimate	Inhibition of HIV-1 infection	Viral p24 antigen production and reverse transcriptase inhibition	(Artan et al., 2008)
Antiviral	Dolabelladienetriol/alga	Terpenoid	Inhibition of HIV-1 replication	Noncompetitive inhibition of reverse transcriptase	(Cirne-Santos et al., 2008)
Antiviral	Mirabamides A, C and D/sponge	Peptide	Inhibition of HIV-1 fusion	Interaction with HIV-1 envelope glycoproteins	(Plaza et al., 2007)
Antiviral	Sulfated SPMG/alga	Polysaccharide	Inhibition of HIV-1 infection	Inhibition of HIV-1 Tat-induced angiogenesis	(Lu et al., 2007)

Tabella 2. Farmacologia Marine nel 2009–2011: composti marini con attività antibatterica, antimicotica, antitubercolare, antivirale ed antiprotozoa (Mayer et al., 2013)

Drug class	Compound/organism	Chemistry	Pharmacologic activity	MMOA	References
Antibacterial	chrysohaentin A/alga	Shikimate	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Inhibit GTPase activity of FtsZ	(Plaza et al., 2010)
Antibacterial	<i>H. salinus</i> phenethylamine/bacterium	Shikimate	Quorum sensing inhibition	Inhibit homoserine lactone receptor binding	(Teasdale et al., 2009)
Antibacterial	lyngbyoic acid/cyanobacterium	Fatty acid	Quorum sensing inhibition	Inhibit homoserine lactone receptor LasR	(Kwan et al., 2013)
Antibacterial	(-)-discorhabdin Z/sponge	Alkaloid	<i>M. luteus</i> inhibition	Sortase A inhibition	(Jeon et al., 2010)
Antibacterial	agelasin D/sponge	Terpene	<i>S. epidermis</i> inhibition	Undetermined	(Hertiani et al., 2010)
Antibacterial	aqabamycin E/bacterium	Alkaloid	<i>P. vulgaris</i> inhibition	Undetermined	(Al-Zereini et al., 2010)
Antibacterial	bacillistatins 1–2/bacterium	Peptide	<i>S. pneumoniae</i> inhibition	Undetermined	(Pettit et al., 2009)
Antibacterial	bromophycolides/alga	Terpene	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Lane et al., 2009)
Antibacterial	caboxamycin/bacterium	Alkaloid	<i>B. subtilis</i> inhibition	Undetermined	(Hohmann et al., 2009)
Antibacterial	crossbyanol B/cyanobacterium	Polyketide	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Choi et al., 2010)
Antibacterial	<i>C. dellechiaiei</i> alkaloids/ascidian	Alkaloid	<i>E. coli</i> & <i>M. luteus</i> inhibition	Undetermined	(Bontemps et al., 2010)
Antibacterial	7,20-diisocyanoadociane/sponge	Terpene	<i>E. coli</i> & <i>V. harvey</i> inhibition	Undetermined	(Wright et al., 2011)
Antibacterial	eusynstyelamide F/bryozoa	Peptide	<i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Tadesse et al., 2011)
Antibacterial	knightol/coral	Terpene	Marine Gram + bacteria inhibition	Undetermined	(Tello et al., 2009)
Antibacterial	MC21-B/bacterium	Shikimate	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Isnansetyo e Kamei, 2009)
Antibacterial	mutualevic acid F/sponge	Fatty acid	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Keffer et al., 2009)
Antibacterial	<i>Nacardiopsis</i> thiopeptide/bacterium	Peptide	Vancomycin-resistant <i>E. faecium</i> inhibition	Undetermined	(Engelhardt et al., 2010)
Antibacterial	neurymenolides A–B/alga	Polyketide	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Stout et al., 2009)
Antibacterial	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. metabolites/bacterium	Polyketide	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Feher et al., 2010)
Antibacterial	pseudopteroin U/coral	Terpene	<i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Correa et al., 2011)
Antibacterial	<i>P. vesiculosa</i> β -carboline/bryozoa	Alkaloid	<i>B. subtilis</i> inhibition	Undetermined	(Till e Prinsep, 2009)
Antibacterial	salinisporamycin/bacterium	Polyketide	<i>S. aureus</i> inhibition	Undetermined	(Matsuda et al., 2009)
Antibacterial	synoxazolidinone A/ascidian	Peptide	<i>C. glutamicum</i> inhibition	Undetermined	(Tadesse et al., 2010)
Antifungal	geodisterol sulfates h/sponge	Steroid	<i>C. albicans</i> & <i>S. cerevisiae</i> inhibition	MDR1 efflux pump inhibition	(Di Girolamo et al., 2009)
Antifungal	theonellamide F/sponge	Peptide	ND	Activate 1,3- β -D-glucan synthesis	(Nishimura et al., 2010)
Antifungal	<i>P. vesiculosa</i> β -carboline/bryozoa	Alkaloid	<i>B. subtilis</i> inhibition	Undetermined	(Till e Prinsep, 2009)
Antifungal	citronamide A/sponge	Peptide	<i>S. cerevisiae</i> inhibition	Undetermined	(Carroll et al., 2009)
Antifungal	marmoratose A & 17-hydroxympatienside A/sea cucumber	Steroid glycoside	<i>C. albicans</i> inhibition	Undetermined	(Yuan et al., 2009)
Antifungal	saadamycin/bacterium	Polyketide	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus</i> & <i>Cryptococcus</i> inhibition	Undetermined	(El-Gendy e El-Bondkly, 2010)
Antifungal	theopapuamides B & C/sponge	Peptide	<i>C. albicans</i> inhibition	Undetermined	(Plaza et al., 2009)
Antimalarial	plakortin/sponge	Polyketide	<i>P. falciparum</i> D10 & W2 strain inhibition	Toxic carbon-radical	(Tagliatalata-Scafati et al., 2010)
Antimalarial	homogentisic acid/sponge	Shikimate	<i>P. falciparum</i> FcB1 strain inhibition	Pfnek-1 enzyme inhibition	(Lebouvier et al., 2009)
Antimalarial	batzelladine alkaloids/sponge	Alkaloid	<i>P. falciparum</i> FcB1 strain inhibition	Undetermined	(Laville et al., 2009)
Antimalarial	bromophycolides/alga	Terpene	<i>P. falciparum</i> 3D7 strain inhibition	Undetermined	(Lane et al., 2009)
Antimalarial	Bromophycolides R, S, U/alga	Terpene	<i>P. falciparum</i> 3D7 strain inhibition	Undetermined	(Lin et al., 2010)
Antimalarial	(+)-7-bromotryptargine/sponge	Alkaloid	<i>P. falciparum</i> Dd2 & 3D7 strain inhibition	Undetermined	(Davis et al., 2010)
Antimalarial	<i>C. hooperi</i> diterpene/sponge	Terpene	<i>P. falciparum</i> F85, D6, W2 strain inhibition	Undetermined	(Wright et al., 2011; Wright et al., 2009)
Antimalarial	epilakinidic acid/sponge	Polyketide	<i>P. falciparum</i> W2 strain inhibition	Undetermined	(Jiménez-Romero et al., 2010)
Antimalarial	gallinamide A/bacterium	Peptide	<i>P. falciparum</i> W2 strain inhibition	Undetermined	(Linington et al., 2009)
Antimalarial	gracilioether B/sponge	Polyketide	<i>P. falciparum</i> IgG strain inhibition	Undetermined	(Ueoka et al., 2009)
Antimalarial	8-isocyanoadophilecta-11, 15-diene/sponge	Terpene	<i>P. falciparum</i> K1 strain inhibition	Undetermined	(Wattanapromsakul et al., 2009)
Antimalarial	lagunamides A & B/bacterium	Peptide	<i>P. falciparum</i> NF54 strain inhibition	Undetermined	(Tripathi et al., 2010)
Antimalarial	manadoperoxide C/sponge	Polyketide	<i>P. falciparum</i> W2 strain inhibition	Undetermined	(Fattorusso et al., 2010)
Antimalarial	3,4-dihydro-manzamine J N-oxide/sponge	Alkaloid	<i>P. falciparum</i> K1 strain inhibition	Undetermined	(Yamada et al., 2009)
Antimalarial	neopetrosiamine A/sponge	Alkaloid	<i>P. falciparum</i> inhibition	Undetermined	(Wei et al., 2010)
Antimalarial	psammaphysin F/sponge	Peptide	<i>P. falciparum</i> 3D7 strain inhibition	Undetermined	(Yang et al., 2010)
Antiprotozoal	<i>C. cervicornis</i> diterpene/alga	Terpene	<i>L. amazonensis</i> inhibition	Mitochondrial swelling & damage	(Dos Santos et al., 2011)
Antiprotozoal	agelasin analogs/synthetic	Terpene	<i>L. infantum</i> , <i>T. brucei brucei</i> & <i>T. cruzi</i> inhibition	Undetermined	(Vik et al., 2009)
Antiprotozoal	almiramides B & C/bacterium	Peptide	<i>L. donovani</i> inhibition	Undetermined	(Sanchez et al., 2010)
Antiprotozoal	convolutamine I/bryozoa	Alkaloid	<i>T. brucei brucei</i> inhibition	Undetermined	(Davis et al., 2011)
Antiprotozoal	longamide B & dibromopalau'amine/sponge	Alkaloid	<i>L. donovani</i> & <i>T. brucei rhodesiense</i> inhibition	Undetermined	(Scala et al., 2010)
Antiprotozoal	<i>L. variegata</i> SQDG's/alga	Glycolipid	<i>E. histolytica</i> & <i>T. vaginalis</i> inhibition	Undetermined	(Cantillo-Ciau et al., 2010)
Antiprotozoal	3,4-dihydro-manzamine J N-oxide/sponge	Alkaloid	<i>T. brucei brucei</i> inhibition	Undetermined	(Yamada et al., 2009)
Antiprotozoal	(+)-muqubiline B/sponge	Terpene	<i>T. brucei brucei</i> inhibition	Undetermined	(Rubio et al., 2009)
Antiprotozoal	norselic acids A–E/sponge	Steroid	<i>Leishmania</i> sp. inhibition	Undetermined	(Ma et al., 2009)
Antiprotozoal	pandaroide G & methyl ester/sponge	Steroid glycoside	<i>L. donovani</i> & <i>T. brucei rhodesiense</i> inhibition	Undetermined	(Regalado et al., 2010)
Antiprotozoal	<i>Plakortis</i> sp. polyketide/sponge	Polyketide	<i>T. brucei brucei</i> inhibition	Undetermined	(Feng et al., 2010)
Antiprotozoal	valinomycin/bacterium	Peptide	<i>L. major</i> & <i>T. brucei brucei</i> inhibition	Undetermined	(Pimentel-Elardo et al., 2010)
Antituberculosis	hymenidin/sponge	Alkaloid	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv inhibition	Undetermined	(Vicente et al., 2009)
Antituberculosis	trichoderins A, A1, B/fungus	Peptide	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv strain inhibition	Undetermined	(Pruksakorn et al., 2010)
Antituberculosis	neopetrosiamine A/sponge	Alkaloid	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv inhibition	Undetermined	(Wei et al., 2010)
Antiviral	gyrosanols A & B/soft coral	Terpene	Human cytomegalovirus inhibition	Undetermined	(Cheng et al., 2010)
Antiviral	lobophylin C & ehrenberoxide B/coral	Terpene	Human cytomegalovirus inhibition	Undetermined	(Cheng et al., 2010)
Antiviral	manzamine A/sponge	Alkaloid	Human herpes simplex virus-1 inhibition	Early ICPO gene transcription inhibited	(Palem et al., 2011)
Antiviral	xiamycin/bacterium	Alkaloid	Inhibition of HIV-1 infection	Selective inhibition of CCR5 tropic HIV	(Ding et al., 2010)
Antiviral	baculiferins/sponge	Alkaloid	Inhibition of HIV-1 IIB replication	Binding to Vif, APOBEC3G & gp41	(Fan et al., 2010)
Antiviral	celebesides A & C/sponge	Peptide	Inhibition of HIV-1 infectivity assay	Undetermined	(Plaza et al., 2009)

1.3 Tossine degli cnidari

Molti organismi si sono evoluti in maniera tale da essere in grado di produrre prodotti chimici velenosi o tossici che gli garantiscono la sopravvivenza in un ambiente ostile e pieno di competitori quali i mari e gli oceani. Gli cnidari sono il phylum animale da cui sono stati isolati il maggior numero di composti tossici. Le tossine sono delle vere e proprie armi di difesa che in alcuni casi vengono elaborate dagli stessi animali, mentre in altri casi o vengono prodotte da organismi simbiotici o vengono assunte attraverso l'alimentazione. Fino a qualche tempo fa l'interesse da parte della comunità scientifica era volto solo ad animali velenosi per l'uomo di origine terrestre (Cartè 1996); nell'ultimo decennio, invece, è cresciuta l'attenzione, soprattutto nei confronti degli cnidari, rivolta alle biotossine isolate da organismi marini. Le tossine di questi animali possono essere utilizzate come sonde molecolari per l'analisi di canali ionici coinvolti nella segnalazione elettrica, nelle risposte immunitarie e in altri processi di trasduzione del segnale di interesse biomedico.

I tessuti ed il muco prodotto dagli cnidari possono avere un ruolo nella difesa immunitaria (Hessinger and Lenhoff, 1988) e contengono una grande varietà di peptidi che agiscono come neurotossine o citolisine. Nei tessuti degli cnidari sono presenti speciali cellule mucipare che rilasciano una secrezione mucosa che svolge una potente azione antimicrobica. Per gli idrozoi, scifozoi e antozoi è dimostrato un ruolo centrale dalle tossine rilasciate dalle nematocisti.

1.3.1 Nematocisti

Gli cnidari posseggono un vero armamentario costituito da una miriade di organuli microscopici su tutta la superficie del corpo e dei tentacoli che vengono "sparati" contro il nemico. Questi organuli si chiamano nematocisti, ovvero cnidocisti che

vengono utilizzate per catturare prede, solitamente iniettando un veleno e che vengono elaborate all'interno dell'apparato di Golgi. Mentre ci sono circa 30 tipologie di cnidocisti morfologicamente distinte, la maggior parte degli cnidari contiene solo alcuni di tutti i tipi possibili; le classi medusozoa presentano la più grande diversità di tipi di nematocisti.

Le nematocisti sono costituite da una capsula dotata di un filamento sensorio detto cnidociglio, e da un filamento urticante che, allo stato di riposo, è invaginato a spirale entro la capsula. Lo cnidociglio possiede una terminazione sensitiva che, se stimolata, provoca l'aumento della pressione nella capsula urticante, quindi l'estroflessione del filamento come una molla e la secrezione delle tossine attraverso un piccolo orifizio posto all'estremità del filamento stesso. Sembra che il sistema nervoso dell'animale non sia coinvolto in questa reazione, ma piuttosto che ogni cnidociglio agisca indipendentemente, in seguito ad una specifica reazione chimica che avviene tra la superficie che entra in contatto con la cisti e la cellule urticante. Infatti, se lo cnidociglio viene sfiorato con materiale chimicamente inerte, non si provoca alcuna reazione. Le cellule che contengono queste complesse capsule sono chiamate cnidociti o nematociti, e sono derivati da cellule staminali chiamate cnidoblasti o nematoblasti.

Il contenuto delle nematocisti è una miscela di sostanze attive a basso e ad alto peso molecolare; a livello molecolare, queste tossine agiscono su alcuni dei meccanismi fondamentali per la vita cellulare, tra i quali i canali ionici, la permeabilità di membrana e le pompe di membrana. Ad esempio, le tossine di alcuni anemoni di mare hanno come sito bersaglio i canali del sodio mentre le tossine di alcune meduse determinano la formazione di propri canali. L'attenzione sulla ricerca del veleno degli cnidari inizialmente si è concentrata sulle nematocisti, che sono state riconosciute come l'apparato velenoso degli anemoni di mare e delle meduse da diversi zoologi

entro la metà del 19th secolo (Lenhoff e Lenhoff, 1988). Da tessuti ricchi di nematocisti, o da diversi parti del corpo sono stati ottenuti diversi composti di natura proteica comprese tossine formanti pori o citolisine (Wang et al., 2000; Lanio et al., 2011; Anderluh e Macek, 2002, Maisano et al., 2013), fosfolipasi (Grotendorst e Hessinger, 1999), tossine per i canale Na^+ (Béress e Meeresforsch 1971; Hessinger e Lenho 1988; Norton 1991), inibitori dei canale K^+ (Aneiros et al., 1993; Castañeda et al., 1995; Schweitz et al., 1995; Gendeh, et al., 1997; Minagawa et al., 1998), altre neurotossine (Garateix et al.,1992) e anche inibitori delle proteasi (Antuch et al., 1993; Delfin et al., 1994). Diversi autori hanno suggerito che è possibile che le citolisine e le tossine che colpiscono i canali ionici agiscano insieme in modo sinergico (Kem et al., 1999). Tuttavia, l'esatta origine di tutte le neurotossine e delle citolisine non è del tutto chiara e altre fonti oltre alle nematocisti sembrano contribuire alla tossicità degli anemoni di mare (Anderluh e Macek, 2002).

1.3.2 Citolisine

Si tratta di molecole in grado di provocare direttamente o indirettamente la distruzione di una cellula mediante lisi. Un considerevole interesse per questo genere di tossine nacque negli anni 70 quando Hessinger e Lenhoff (1973) scoprirono attività citolitiche nel veleno delle nematocisti dell'anemone di mare *Aiptasia pallida*. La tossina più rappresentativa di questa classe è l'equinotossina, una molecola prodotta da *A. equina* (Fig. 2), dal peso di 20 kDa. E' stato dimostrato che l'equinotossina è in realtà una miscela di tre isotossine di cui l'equinotossina II è la più abbondante (Macek e Lebez, 1988).

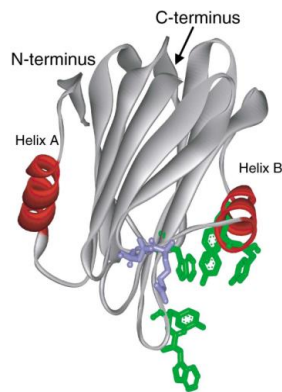


Fig 2. Struttura tridimensionale di Equinotoxina II da *Actinia equina*

Il meccanismo di azione di queste tossine consiste nella formazione di pori sulla membrana cellulare della cellula bersaglio in seguito al legame con lipidi di membrana. Questo meccanismo richiede la presenza di ioni Ca^{2+} che provoca tra gli altri effetti l'aggregazione dei monomeri per la formazione dei pori. I veleni degli scifozoi, cubozoi e idrozoi mostrano spesso attività citolitica (a volte anche emolitica) e/o proprietà di depolarizzazione delle membrane (Keen, 1969; Kleinhaus et al., 1973; Burnett e Calton, 1977; Walker, 1977; Kihara et al., 1988). Tuttavia, il loro isolamento, in particolare dall'estratto tentacolare, è risultato essere estremamente difficile, e dunque ha ritardato questo tipo di indagine scientifica.

La tabella 3 riassume tutte le citolisine degli anemone di mare con la sequenza aminoacidica descritta (Frazão et al., 2012).

Tabella 3. Citolisine degli anemoni di mare (Frazão et al., 2012)

Species	Toxin	UniProt/GenBank Accession Number	Toxin family	References
<i>Actinera villosa</i>	Avt-I	Q5R231/ AB175824	II	(Uechi et al., 2005)
<i>Actinera villosa</i>	Avt-II	D2YZQ3/ AB512460	II	(Uechi et al., 2010)
<i>Actinera villosa</i>	AvTX-60A	Q76DT2/ AB107916	MACPF	(Oshiro et al., 2004)
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin-I	P0C1H0/ -	II	(Macek e Lebez, 1988)
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin-Ia	P0C1H1/ -	II	(Macek e Lebez, 1988)
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin-II	P61914/ U41661	II	(Macek e Lebez, 1988; Anderluh et al., 1988)
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin-III	P0C1H2/ -	II	(Macek e Lebez, 1988)
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin-IV	Q9Y1U9/ AF057028	II	(Anderluh et al., 1999)
<i>Actinia equina</i>	Equinatoxin-V	Q93109/ U51900	II	(Pungercar et al., 1997)
<i>Actinia fragacea</i>	Fragaceatoxin C	B9W5G6/ FM958450	II	(Bellomio et al., 2009)
<i>Actinia tenebrosa</i>	Tenebrosin-A	P30833/ -	II	(Norton et al., 1990)
<i>Actinia tenebrosa</i>	Tenebrosin-B	P30834/ -	II	(Norton et al., 1990)
<i>Actinia tenebrosa</i>	Tenebrosin-C	P61915/ -	II	(Simpson et al., 1990)
<i>Anthopleura asiatica</i>	Bandaporin	C5NSL2/ AB479475	II	
<i>Heteractis crispa</i>	Cytolysin RTX-A	P58691/ AY855350	I	(Il'ina et al., 2006)
<i>Heteractis crispa</i>	Cytolysin RTX-S-II	P0C1F8/ -	I	(Klyshko et al., 2004)
<i>Oulactis orientalis</i>	Actinoporin Or-A	Q5I4B8/ AY856481	II	(Il'ina et al., 2005)
<i>Oulactis orientalis</i>	Actinoporin Or-G	Q5I2B1/ AY861662	II	(Il'ina et al., 2005)
<i>Phyllo-discus semoni</i>	Pstx-20A	Q8IAE2/ AB063314	II	(Nagai et al., 2002)
<i>Phyllo-discus semoni</i>	PsTX-60A	P58911/ AB063315	MACPF	(Nagai et al., 2002)
<i>Phyllo-discus semoni</i>	PsTX-60B	P58912/ AB201429	MACPF	(Nagai et al., 2002)
<i>Radianthus magnifica</i>	HMgI	P58689/ -	II	(Khoo et al., 1993)
<i>Radianthus magnifica</i>	HMgII	P58690/ -	II	(Khoo et al., 1993)
<i>Radianthus magnifica</i>	HMgIII	Q9U6X1/ AF170706	II	(Wang et al., 2000)
<i>Radianthus magnifica</i>	Hemolytic toxin	P39088/ -	II	(Kristan et al., 2009)
<i>Sagartia rosea</i>	Cytolysin Src-I	Q86FQ0/ AY247033	II	(Jiang et al., 2002)
<i>Stichodactyla helianthus</i>	Sticholysin-I	P81662/ AJ009931	II	(Huerta et al., 2001)
<i>Stichodactyla helianthus</i>	Sticholysin-II	P07845/ AJ005038	II	(Huerta et al., 2001)
<i>Urticina crassicornis</i>	Uc-I	P0CG44/ -	III	(Razpotnik et al., 2009)
<i>Urticina crassicornis</i>	Urticinatoxin	C9EIC7/ GQ848199	III	(Razpotnik et al., 2010)
<i>Urticina piscivora</i>	Up-1	P0C1G1/ -	III	(Cline et al., 1995)

1.3.3 Neurotossine specifiche per i canali sodici

I canali ionici sono un obiettivo comune per molte tossine peptidiche e rappresentano un importante target terapeutico per la scoperta di nuovi farmaci. Le neurotossine interferiscono con la normale trasmissione di impulsi nervosi influenzando l'apertura o la chiusura dei canali ionici.

Le tossine specifiche per i canali sodici (Fig. 3) sono classificate in tre tipologie sulla base della sequenza aminoacidica (Homma e Shiomi, 2006). Le tipologie 1 e 2 sono composte da un numero di residui aminoacidici compreso tra 46 e 49 (eccetto per la tossina definita AeI di 54 residui aminoacidici e isolata da *Actinia equina*) (Li et al., 1996; Homma e Shiomi, 2005); tra le due tipologie esistono inoltre porzioni di sequenze conservate nel corso dell'evoluzione che lasciano spazio all'idea di un possibile gene ancestrale originario. La tipologia 3 è invece caratterizzata da catene polipeptidiche che vanno da un minimo di 27 ad un massimo di 32 residui aminoacidi (Homma e Shiomi, 2005). Per quanto riguarda le modalità di azione sui mammiferi inerenti alla struttura della molecola, sono stati individuati sei siti differenti di legame tossina-canale di cui il sito 3 è il più ricorrente grazie ad un loop all'altezza dell'arginina 14 che facilita l'ancoraggio al canale con un successivo prolungamento dello stato aperto del canale stesso durante la fase di depolarizzazione di membrana.

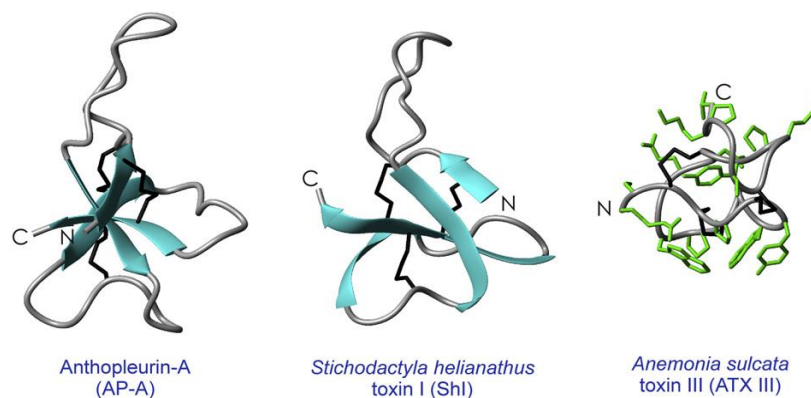


Fig. 3 Strutture di varie classi di tossine specifiche per i canali del sodio di anemoni di mare (Norton 2009).

La tabella 4 riassume tutte le tossine specifiche per i canali sodici degli anemone di mare con la sequenza aminoacidica descritta (Frazão et al., 2012).

Tabella 4. Tossine specifiche per i canali del sodio degli anemoni di mare (Frazão et al., 2012)

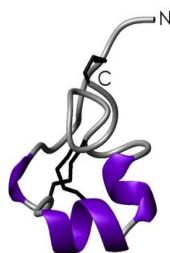
Species	Toxin	UniProt/GenBank Accession Number	Toxin family	Target	References
<i>Actinia equina</i>	Ae I	Q9NJQ2/ AF130344	Type I	-	(Lin et al., 1996)
<i>Anemonia erythraea</i>	AETX-I	P69943/ -	Type I	-	(Shiomi et al., 1997)
<i>Anemonia viridis</i>	ATX-I	P01533/ -	Type I	Na _v 1	(Wunderer e Eulitz 1978)
<i>Anemonia viridis</i>	ATX-II	P01528/ -	Type I	Binds to site 3. DmNa _v , SCN2A and SCN5A	(Wunderer et al., 1976)
<i>Anemonia viridis</i>	ATX-III	P01535/ -	Sea anemone short toxin	Na _v 1	(Martinez e Kopeyan et al., 1982)
<i>Anemonia viridis</i>	ATX-V	P01529/ -	Type I	-	(Scheffler et al., 1982)
<i>Antheopsis maculata</i>	Am-3	P69928/ AB180687	Type I	-	(Honma et al., 2005)
<i>Anthopleura</i>	Anthopleurin- C	P01532/ -	Type I	-	(Norton, 1981)
<i>Anthopleura</i>	APE 1-1	P0C1F0/ -	Type I	-	(Bruhn et al., 2001)
<i>Anthopleura</i>	APE 1-2	P0C1F1/ -	Type I	-	(Bruhn et al., 2001)
<i>Anthopleura</i>	APE 2-1	P0C1F2/ -	Type I	-	(Bruhn et al., 2001)
<i>Anthopleura</i>	APE 2-2	P0C1F3/ -	Type I	-	(Bruhn et al., 2001)
<i>Anthopleura</i>	AFT-I	P10453/ -	Type I	-	(Sunahara et al., 1987)
<i>Anthopleura</i>	AFT-II	P10454/ -	Type I	-	(Sunahara et al., 1987)
<i>Anthopleura sp.</i>	Toxin Hk16	P0C5F7/ -	Type I	-	(Wang et al., 2004)
<i>Anthopleura sp.</i>	Toxin Hk2	P0C5F4/ -	Type I	-	(Wang et al., 2004)
<i>Anthopleura sp.</i>	Toxin Hk7	P0C5F5/ -	Type I	-	(Wang et al., 2004)
<i>Anthopleura sp.</i>	Toxin Hk8	P0C5F6/ -	Type I	-	(Wang et al., 2004)
<i>Anthopleura</i>	Anthopleurin- A	P01530/ -	Type I	Na _v 1	(Tanaka et al., 1977)
<i>Anthopleura</i>	Anthopleurin- B	P01531/ -	Type I	Na _v 1	(Reimer et al., 1985)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR1	P0C5F8/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR2	P0C5F9/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR3	P0C5G0/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR4	P0C5G1/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR5	P0C5G2/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR6	P0C5G3/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Anthopleura</i>	Toxin PCR7	P0C5G4/ -	Type I	-	(Kelso e Blumenthal, 1998)
<i>Bunodosoma</i>	Bc-III	Q7M425/ -	Type I	Na _v 1.5	(Malpezzi et al., 1993)
<i>Bunodosoma</i>	Cangitoxin	P82803/ -	Type I	-	(Cunha et al., 2005)
<i>Bunodosoma cangicum</i>	Cangitoxin-2	P0C7P9/ -	Type I	Na _v 1.1/SCN1A, Na _v 1.5/SCN5A and Na _v 1.6/SCN8A	(Zaharenko et al., 2008)
<i>Bunodosoma cangicum</i>	Cangitoxin-3	P0C7Q0/ -	Type I	SCN1A/Na _v 1.1	(Zaharenko et al., 2008)

Tabella 4 Cont.

<i>Bunodosoma granulifera</i>	Neurotoxin Bg-2	P0C1F4/ -	Type I	Site 3. SCN2A/SCN1B, SCN4A/SCN1B, SCN5A/SCN1B and para/tipE	(Loret et al., 1994)
<i>Bunodosoma granulifera</i>	Neurotoxin Bg-3	P0C1F5/ -	Type I	Site 3. SCN4A/SCN1B, SCN5A/SCN1B, and para/tipE	(Loret et al., 1994)
<i>Calliactis parasitica</i>	Calitoxin 1	P14531/ S69403	Others		(Cariello et al., 1989)
<i>Calliactis parasitica</i>	Calitoxin 2	P49127/ S69399	Others		(Spagnuolo et al., 1994)
<i>Condylactis gigantea</i>	CgNa	P0C20/ -	Type I	Na _v 1 TTX-sensitive Na _v	(Standker et al., 2006)
<i>Condylactis passiflora</i>	Cp I	P0CH42/ -	Type I	Site 3	(Wanke et al., 2009)
<i>Cryptodendrum</i>	Ca I	D2KX90/ AB512761	Type II	-	(Maeda et al., 2010)
<i>Halcurias carlgreni</i>	Halcurin	P0C5G6/ -	Type II	-	(Ishida et al., 1997)
<i>Heteractis crispa</i>	Rm1	P30831/ -	Type II	-	(Zykova e Kozlovskaja, 1989)
<i>Heteractis crispa</i>	Rm2	P30783/ -	Type II	-	(Zykova et al., 1988)
<i>Heteractis crispa</i>	Rm3	P30832/ -	Type II	-	(Zykova e Kozlovskaja, 1989)
<i>Heteractis crispa</i>	Rm4	P30784/ -	Type II	-	(Zykova et al., 1988)
<i>Heteractis crispa</i>	Rm5	P30785/ -	Type II	-	(Zykova et al., 1988)
<i>Heteractis crispa</i>	Toxin Rc-1	P0C5G5/ -	Type I	-	(Shiomi et al., 1996)
<i>Heterodactyla hemprichi</i>	Hh x	D2KX91/ AB512762	Type II	-	(Maeda et al., 2010)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.25.1	B1NWS4/ EU124461	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Moran et al., 2008)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.27.1	B1NWS6/ EU124463	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Moran et al., 2008)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.28.1	B1NWS7/ EU124464	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Moran et al., 2008)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.37.1	B1NWS5/ EU124462	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Moran et al., 2008)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.39.1	P0CH46/ DS469622	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Putnam et al., 2007)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.40.1	B1NWS8/ EU124465	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Moran et al., 2008)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.41.1	A7SCE5/ DS469622	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Putnam et al., 2007)
<i>Nematostella vectensis</i>	Neurotoxin Nv1-116.45.1	B1NWR7/ EU124454	Type II	Binds to site 3 of voltage-gated sodium channels. DmNa _v 1/TipE	(Moran et al., 2008)
<i>Parasicyonis</i>	PA-TX	P09949/ -	Sea anemone	-	(Nishida et al., 1985)
<i>Radianthus paumotensis</i>	Rp-II	P01534/ -	Type II	-	(Schweitz et al., 1985)
<i>Radianthus paumotensis</i>	Rp-III	P08380/ -	Type II	-	(Metrione et al., 1987)
<i>Stichodactyla helianthus</i>	Sh1	P19651/ -	Type II	NaV1	(Kem et al., 1989)
<i>Stichodactyla gigantea</i>	Gigantoxin-2	Q76CA3/ AB110012	Type I	-	(Shiomi et al., 2003)
<i>Stichodactyla gigantea</i>	Gigantoxin-3	Q76CA0/ AB110015	Type II	-	(Shiomi et al., 2003)
<i>Stichodactyla haddoni</i>	SHTX-4	B1B519/ AB362570	Type II	-	(Honma et al., 2008)
<i>Thalassianthus aster</i>	Ta I	D2KX92/ AB512763	Type II	-	(Maeda et al., 2010)

1.3.4 Neurotossine specifiche per i canali potassio

Le prime molecole furono scoperte intorno alla metà degli anni 90 anche se la gran parte dei dati sulle loro strutture e funzioni è stata raccolta negli ultimi anni (Diochot et al., 1998; Minigawa et al., 1998). Le neurotossine per i canali potassio (Fig. 4) si possono suddividere in 3 tipologie sulla base di differenze strutturali e funzionali. La tipologia 1 comprende tossine che bloccano i canali potassio kv1 come le Kaliseptine (AsKS) isolate da *Anemonia sulcata* (Homma e Shiomi, 2005) con una composizione aminoacidica compresa tra 35 e 37 residui aminoacidici. La tipologia 2 comprende tossine composte da circa 58 residui aminoacidici che bloccano i canali kv1 ma con minore efficacia rispetto alla prima categoria. L'ultimo gruppo include tossine come BDS-1 e BDS-2 purificate con *Anemonia sulcata*; rappresentano i maggiori effettori del blocco dei canali kv3.4 e sono invece sostanzialmente inefficaci nei confronti dei kv3. Benché abbiano il 25% di sequenze in comune con le tossine di tipo 1 dei canali sodio, non causano effetti sui canali del sodio anche se hanno solo un debole effetto sui canali sodio presenti in cellule neuro-blastomiche (Homma e Shiomi, 2005).



Stichodactyla helianthus
K⁺ channel toxin (ShK toxin)

Fig. 4 Strutture di una tossina specifica per i canali del potassio (Norton 2009).

La tabella 5 riassume tutte le tossine specifiche per i canali del potassio degli anemone di mare con la sequenza aminoacidica descritta (Frazão et al., 2012).

Tabella 5. Tossine specifiche per i canali del potassio degli anemoni di mare (Frazão et al., 2012)

Species	Toxin	UniProt/GenBank Accession Number	Toxin family	Target	References
<i>Actinia equina</i>	AeK	P81897/ -	Type I	K _v 1	(Minagawa et al., 1998)
<i>Anemonia viridis</i>	SA5 II	P10280/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	-	(Wunderer et al., 1976)
<i>Anemonia viridis</i>	kalicludin-1	Q9TWG0/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	K _v 1.2	(Schweitz et al., 1995)
<i>Anemonia viridis</i>	kalicludin-2	Q9TWF9/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	K _v 1.2	(Schweitz et al., 1995)
<i>Anemonia viridis</i>	kalicludin-3	Q9TWF8/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	K _v 1.2	(Schweitz et al., 1995)
<i>Anemonia viridis</i>	BDS-I	P11494/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	K _v 3.1, 3.2, 3.4	(Diochot et al., 1998)
<i>Anemonia erythraea</i>	AETX-K	Q0EAE5/ AB259113	Type I	K _v 1	(Hasegawa et al., 2006)
<i>Anemonia viridis</i>	kaliseptin	Q9TWG1/ -	Type I	K _v 1.2	(Schweitz et al., 1995)
<i>Anemonia viridis</i>	BDS-II	P59084/ -	Type III	K _v 3.1, 3.2, 3.4	(Diochot et al., 1998)
<i>Antheopsis maculata</i>	Am-2	P69930/ AB180686	Type III	-	(Honma et al., 2005)
<i>Anthopleura elegantissima</i>	APET x1	P61541/ -	Type III	KCNH2 (HERG1), KCNH6 (HERG2), KCNH7 (HERG3)	(Diochot et al., 2003)
<i>Anthopleura elegantissima</i>	APET x2	P61542/ -	Type III	H(+)-gated Na _v ASIC3	(Diochot et al., 2004)
<i>Anthopleura aff. xanthogrammica</i>	AXPI-I	P81547/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase	-	(Minagawa et al., 1997)
<i>Bunodosoma granulifera</i>	Bgk	P29186/ -	Type I	K _v 1.1, K _v 1.2, K _v 1.3, K _v 1.6, K _v 3.2	(Aneiros et al., 1993)
<i>Bunodosoma caissarum</i>	BcIV	P84919/ -	Type III	-	(Oliveira et al., 2006)
<i>Bunodosoma caissarum</i>	Bc-V	P86470/ -	Type III	-	(Zaharenko et al., 2008)
<i>Bunodosoma canzicum</i>	Toxin Bcg III 31.16	P86461/ -	Type III	-	(Zaharenko et al., 2008)
<i>Heteractis crispa</i>	Analgesic Polypeptide HC1	B2G331/ AM933240	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	Polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1)	(Andreev et al., 2008)
<i>Heteractis crispa</i>	Kunitz-type Trypsin inhibitor IV	P16344/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	-	(Zykova et al., 1985)
<i>Metridium senile</i>	Metridin	P11495/ -	Type I	-	(Krebs e Habermehl, 1987)
<i>Radianthus magnifica</i>	HmK	O16846/ U58107	Type I	K _v 1.2	(Gendeh et al., 1997)
<i>Stichodactyla helianthus</i>	SHPI-1	P31713/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase	-	(Delfin et al., 1996)
<i>Stichodactyla helianthus</i>	SHPI-2	P81129/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	-	(Diaz et al., 1998)
<i>Stichodactyla haddoni</i>	SHTX-3	B1B518/ AB362569	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	-	(Honma et al., 2008)
<i>Stichodactyla helianthus</i>	ShK	P29187/ -	Type I	K _v 1.1, K _v 1.2, K _v 1.3, K _v 1.4, K _v 1.6	(Castaneda et al., 1995)
<i>Stichodactyla haddoni</i>	SHTX-1/ SHTX-2	P0C7W7/ -	Type IV	-	(Honma et al., 2008)

1.3.5 Tossine non peptidiche

Oltre a tossine proteiche e peptidiche, in alcuni antozoi sono state identificate alcune tossine non peptidiche molto interessanti. Queste includono un grande gruppo di diterpeni ciclici presenti negli ottocoralli. Il primo composto ad essere identificato è stato la sarcopina (Neeman et al. 1974). Uno dei più interessanti a livello farmacologico è la lofotossina (Fig. 5), un diterpene isolato da una gorgonia del Pacifico (Fenical et al., 1981).

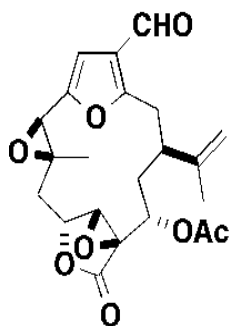


Fig. 5 Lofotossina

Questo composto ciclico blocca irreversibilmente i recettori nicotinici neuromuscolari formando un legame covalente tra uno dei suoi due gruppi epossido ed una importante catena laterale tirosilica nel sito di legame dell'acetilcolina (Abramson et al., 1988). Altri tipi di composti trovati negli ottocoralli includono prostaglandine (Weinheimer e Spraggins, 1969), muricine e saponine (Bandurraga e Fenical, 1985) e pseudopterosine (Guarda et al., 1986), gli ultimi due gruppi contengono porzioni di carboidrati. La tossina marina più potente, la palitossina, è un complesso composto polietere che è stato originariamente isolato da zoantidi (Antozoi) del genere *Palythoa* (Moore e Scheuer, 1971; Turk e Kem, 2009)

1.4 La risposta immunitaria

Per molti anni si è pensato che gli invertebrati non avessero un sistema immunitario per la mancanza di immunoglobuline, ma gli invertebrati hanno comunque la capacità di riconoscere il self dal non self. Tutti gli organismi, infatti, dal più semplice al più complesso, hanno evoluto sofisticati sistemi di difesa contro l'invasione da parte di virus, batteri e parassiti o persino da cellule appartenenti ad individui della stessa specie. In questo senso, tutti i metazoi possiedono un "sistema immunitario" (Du Pasquier, 2000).

La capacità di riconoscere i corpi estranei costituisce la specificità immunologica di un organismo. Nel corso degli anni il processo di riconoscimento del non self si è evoluto in relazione all'aumentare della complessità degli organismi, per resistere agli attacchi di corpi estranei. Alcune caratteristiche possono essere conservate, molte altre invece risultano specifiche di un determinato phylum o addirittura di una classe all'interno di un phylum (Du Pasquier & Flajnik, 2004).

1.4.1 La risposta immunitaria negli invertebrati

La risposta immunitaria negli invertebrati può essere di tipo cellulare o umorale. Negli invertebrati le principali risposte cellulari sono la citotossicità, la fagocitosi e il processo di incapsulamento. Gli emociti esprimono recettori per sostanze presenti su microbi e parassiti e la stimolazione induce l'attivazione dei fagociti. Le cellule in grado di fagocitare sono presenti in tutti gli invertebrati e, insieme ai fattori umorali naturali, formano la prima linea di difesa contro le invasioni dei microbi. In generale, ma con una significativa differenza tra i diversi taxa, negli invertebrati intervengono due tipi di cellule: quelle granulari e semigranulari, deputate all'incapsulazione e alla citotossicità, e le cellule fusiformi o ialine che intervengono nella fagocitosi.

Negli invertebrati la risposta cellulare comprende la chemiotassi, l'ingestione e l'uccisione dei patogeni; tuttavia, la fagocitosi nei molluschi, negli artropodi e nei tunicati viene potenziata dalle lectine plasmatiche e da componenti della cascata della profenolossidasi (Ratcliffe et al., 1985). Quindi negli invertebrati più semplici la difesa contro microrganismi è garantita dalla fagocitosi, ma come nei vertebrati la presenza di grossi aggregati di cellule batteriche, determina la copertura del corpo estraneo da parte di uno strato di cellule che alla fine formano una vera e propria capsula che isola il materiale estraneo.

La risposta umorale negli invertebrati presenta come differenza più rilevante rispetto ai vertebrati la mancanza di immunoglobuline ed è costituita da fattori di difesa umorali che comprendono diversi tipi di molecole tra queste troviamo le lectine e i peptidi antimicrobici.

Le lectine sono proteine che hanno la capacità di riconoscere i residui di carboidrati presenti sulle membrane cellulari e sono capaci di legarsi, ai carboidrati presenti nei microrganismi. Il processo di fagocitosi avviene più velocemente grazie alla presenza delle lectine che svolgono anche la funzione di "marcatori". Queste proteine sono state ampiamente studiate e costituiscono la forma più antica di riconoscimento del non-self (Vasta et al., 1994). Le lectine sono costituite da uno o più domini di riconoscimento dei carboidrati (CRD) (Weiss et al., 1992). Il dominio delle lectine riconosce e lega il ligando carboidratico attraverso un meccanismo di tipo chiave serratura (Quioco, 1986). Le lectine sono molecole in grado di attivare numerose funzioni quali la fagocitosi, l'incapsulamento, la coagulazione dell'emolinfa, la citotossicità, il rilascio della fenolossidasi, e la melanizzazione (Ratcliffe et al., 1985; Söderhäll & Smith, 1986).

I peptidi antimicrobici sono fra le armi più efficaci del sistema innato. Si tratta di molecole proteiche solubili, presenti in tutte le specie viventi (Iwanaga & Lee, 2005).

I peptidi antimicrobici rappresentano una componente essenziale nell'immunità innata degli invertebrati, infatti, nell'ultima decade sono stati identificati molti peptidi antimicrobici in numerosi phyla di invertebrati (Beutler et al., 2004). I peptidi antimicrobici possono essere espressi costitutivamente, come per esempio negli emociti del gambero *Litopenaeus setiferus*, dell'ostrica *Crassostrea gigas* e del limulo *Limulus polyphemus* (Bachere et al., 2004), oppure possono essere indotti dalla presenza di patogeni. In presenza di patogeni, infatti, gli emociti circolanti degli invertebrati migrano attraverso il processo di chemiotassi nel sito di infezione, dove possono rilasciare peptidi antimicrobici, provocando risposte che modulano l'infiammazione, così da creare uno scenario simile a quello che si osserva nella risposta innata nei mammiferi (Hancock et al., 2006).

L'immunità di tipo umorale implica anche la generazione di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) e intermedi reattivi del nitrogeno (RNI), l'attivazione di meccanismi ossigeno/indipendenti che includono la sintesi del lisozima, enzimi proteolitici ed idrolitici e peptici antimicrobici, e l'induzione di cascate proteolitiche che causano la coagulazione dell'emolinfa e le reazioni di melanizzazione (Nappi & Ottaviani, 2000).

1.4.2 L'immunità negli cnidari

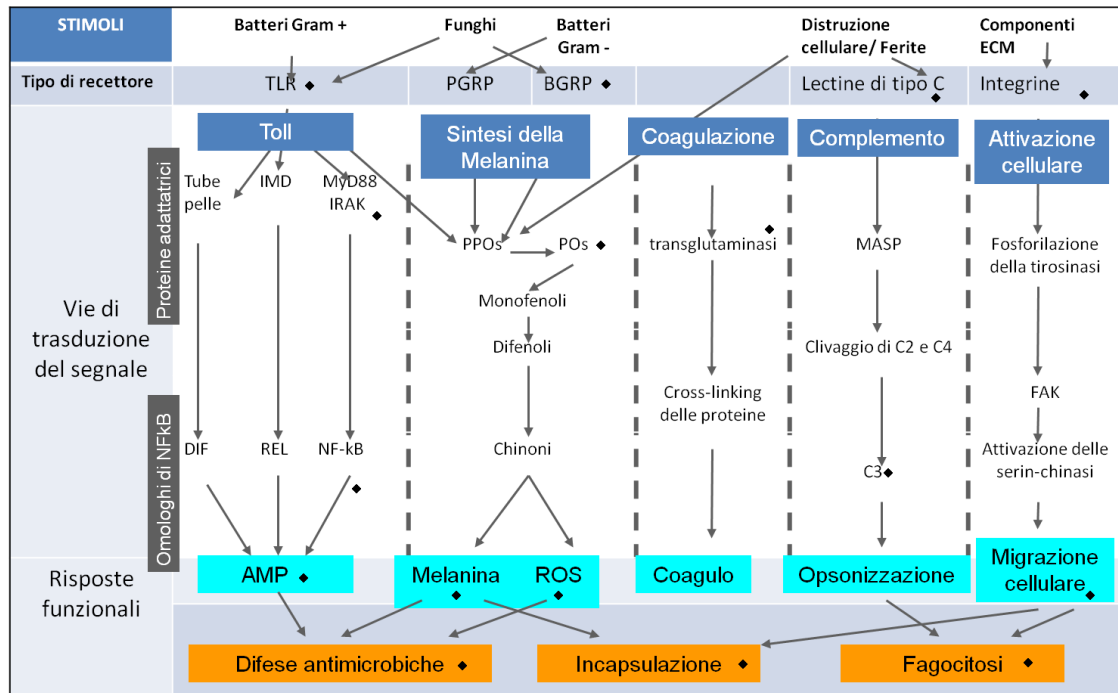


Fig. 6 Rappresentazione semplificata delle principali componenti dell'immunità degli invertebrati. Sono evidenziati i componenti identificati negli Cnidari (♦). TLR, Toll like receptor; PGRP, Proteine di riconoscimento dei peptidoglicani; BGRP, Proteine di riconoscimento dei beta glucani; IMD, Immunodeficienza; MyD88, Proteina adattatrice per il TLR; PPOs, profenolossidasi; POs, fenolossidasi; MASP, serin-proteasi associata alle proteine leganti il mannosio; FAK, Chinasi di adesione focale; AMPs, peptidi antimicrobici; ROS, specie reattive dell'ossigeno.

1.4.2.1 Immunità cellulare

Il phylum degli cnidari, essendo uno dei più antichi lignaggi filici conosciuti e sister taxon dei bilateri è uno dei primi rami nell'albero della vita animale a fornire chiarimenti fondamentali sull'evoluzione dell'immunità (Fig. 7) (Putnam et al., 2007; Dunn et al., 2008; Schierwater et al., 2009; Philippe et al., 2009)

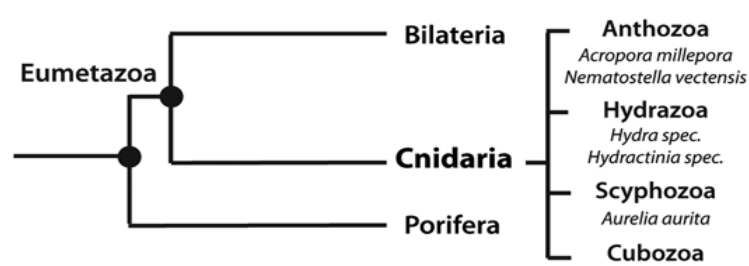


Fig. 7 Schema della posizione filogenetica degli cnidari

Gli cnidari possiedono la maggior parte delle famiglie dei geni che si trovano nei bilateri (Kusserow et al., 2005; Miller et al., 2005) ed hanno mantenuto molti geni ancestrali che sono stati invece persi in *Drosophila melanogaster* e in *Caenorhabditis elegans* (Miller et al., 2005; Technau et al., 2005); poiché l'organizzazione ed il contenuto del loro genoma è molto simile a quello dei bilateri morfologicamente più complessi, essi potrebbero fornire informazioni sull'antenato cnidari-bilateri. Le quattro classi di cnidari (Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Anthozoa) comprendono organismi modello per l'immunologia comparata, come il polipo d'acqua dolce *Hydra* o l'idrozoa coloniale *Hydractinia*.

Gli cnidari hanno una mesoglea ricca di cellule interstiziali che possono agire come fagociti (Fautin & Mariscal, 1991). In assenza di specifiche cellule del sistema immunitario, gli cnidari devono disporre di meccanismi efficaci per la difesa contro gli agenti patogeni microbici, devono inoltre, in relazione alla loro organizzazione multicellulare organizzata, discriminare rapidamente il self dal non self per mantenere l'integrità dei tessuti nelle forme coloniali e, dal momento che sono colonizzati da comunità batteriche complesse e in molti casi ospitano alghe simbiotiche, il successo di crescita implica l'essere in grado di distinguere tra simbiotici e intrusi potenzialmente patogeni.

E' stato dimostrato che in questi animali diblastici, le cellule epiteliali sono in grado di mediare tutte le risposte immunitarie innate. L'epitelio endodermico appare come una barriera chimica che utilizza peptidi antimicrobici mentre l'epitelio ectodermico è una barriera fisica di protezione contro gli invasori provenienti dall'ambiente esterno. In entrambe le barriere, le cellule epiteliali multifunzionali servono anche per il riconoscimento e la difesa dal patogeno.

Oltre 10 anni fa, cellule con potenziale attività fagocitica sono stati identificati nell'anemone di mare *Actinia equina* e nel corallo molle *Swiftia exserta* (Hutton e Smith, 1996; Olano e Bigger, 2000). Un'indagine sulla gorgonia *Plexaurella fusifera* ha inoltre fornito indicazioni preliminari sui processi e le cellule coinvolte nella risposta alle ferite. Di contro, nei coralli duri le indagini sulle cellule sono state ostacolate dal fatto che esse sono piccole e confinate alla mesoglea acellulare. Tuttavia, le cellule del sistema immunitario e le fasi coinvolte nella guarigione delle ferite sono state recentemente documentate nel il corallo duro *Porites cylindrica* (Palmer et al., 2011; Palmer e Traylor-Knowles, 2012). La descrizione completa delle cellule immunitarie degli cnidari e il loro repertorio funzionale, in particolare in risposta all'invasione patogeni, deve ancora essere compreso.

Nel polipo di acqua dolce *Hydra*, le cellule epiteliali di entrambi gli strati, sono multifunzionali, infatti hanno attività secretiva volta alla digestione e all'assorbimento dei cibi, e sono anche in grado di fagocitare e distruggere batteri presenti nella cavità gastrica (Bosch & David, 1986; Bosch et al., 2009). Un approccio combinato di analisi biochimiche e dello studio del trascrittoma ha rivelato che in *Hydra* molte risposte immunitarie innate sono mediate da cellule epiteliali (Bosch et al., 2009; Jung et al., 2009).

Nel corallo di mare *Gorgonia ventalina* è stato dimostrato un aumento degli amebociti granulari dopo il contatto con un patogeno fungino (*Aspergillus sydowii*). Nel sito di infezione, è inoltre evidente una elevata attività fenolossidasi che sembra avere origine intorno agli amebociti stessi (Mydlarz et al., 2008).

Alcuni cnidari hanno una notevole capacità di rigenerazione. In *Hydra*, ad esempio, un danno grave al tessuto viene rapidamente riparato mediante la presenza di un continuo proliferare di cellule staminali (Bosch, 2007). Quindi, le cellule infettate o danneggiate da agenti patogeni come batteri o funghi vengono rapidamente eliminate per apoptosi (Bosch & David, 1986) e sostituite da cellule non infette. Questa enorme capacità di rigenerazione può essere considerata una ulteriore arma di difesa immunitaria innata.

1.4.2.2 Immunità umorale

1.4.2.2.1 Alloriconoscimento e istocompatibilità

Lo spazio in cui vivere è una risorsa molto limitante nell'ambiente marino. Molti substrati in mare sono dominati da incrostazioni coloniali o da cnidari solitari che devono competere per lo spazio. I meccanismi effettori evitano il contatto mediante il rilevamento a distanza, la formazione di barriere, la crescita eccessiva degli stoloni, o la distribuzione dei tentacoli (Raftos, 1996). Gli cnidari possono anche usare le nematocisti come meccanismi effettori nella competizione spaziale. Le nematocisti possono scaricare neurotossine, miotossine, fattori emolitici e necrotici che danneggiano il tessuto del competitore (Raftos, 1996). Negli antozoi *Stylophora pistillata* e *Montipora verrucosa*, rami all'interno di una colonia possono facilmente unirsi, mentre rami di individui diversi geneticamente non subiscono la fusione (Hildemann et al., 1980. Müller et al., 1984; Chadwick-Furman e Rinkevich, 1994).

La fusione di due individui conspecifici è talvolta indicata come "trapianto naturale". Osservazioni effettuate sugli anemoni di mare (*Anthopectura elegantissima*, *Phymactis clematide*) e gorgonie (*Eunicella stricta*) indicano che gli individui coloniali posseggono una serie unica di elementi di istocompatibilità, che sono riconosciuti come non self da tutte le altre colonie conspecifiche (Lubbock, 1980. Meinardi et al., 1995).

La specificità alloimmune e l'istocompatibilità, guidati da polimorfismo genetico, sono determinanti antichi del riconoscimento self/nonself (Dishaw et al., 2009). Più di 50 anni fa *Hauenschild* propose un modello secondo cui l'alloriconoscimento e la capacità di fondersi tra stoloni di diverse colonie sono sotto il controllo di un locus polimorfico (Hauenschild, 1954; Hauenschild et al., 1956; Ivker, 1972). Dopo i risultati pionieristici di *Hauenschild* (1954), esperimenti di inincrocio (Mokady & Buss, 1996) hanno dimostrato che l'alloriconoscimento è segregato in una singola regione cromosomica, ma contiene due loci strettamente legati, ALR1 e ALR2 (Cadavid, 2004; Powell et al., 2007, Rosa et al., 2010).

In *Hidractinia*, la fusione caratterizzata da una completa continuità dell'ectoderma e della cavità gastrovascolare, avviene quando le colonie mostrano uno o entrambi gli alleli in comune tra i due loci, mentre la reazione di rigetto, caratterizzata dalla mancata adesione e dal scarico delle nematocisti avviene quando non mostrano loci uguali per i due alleli.

L'analisi della regione del genoma di *Hydractinia* corrispondente al locus ALR2 ha portato recentemente all'identificazione di una proteina transmembrana, CDS7, che ha tre domini polimorfici nella regione extracellulare. Il polimorfismo nel primo dominio di CDS7 è un elemento obbligatorio di istocompatibilità. Queste

osservazioni per la prima volta hanno consentito di ipotizzare un probabile candidato per l'alloriconoscimento nei metazoi basali.

Dal momento che questo recettore non è correlato ai recettori di alloriconoscimento di tunicati (Nyholm et al., 2006) o dei vertebrati (MHC), è ipotizzabile che i meccanismi utilizzati per il riconoscimento del self dal non self si sono evoluti in modo indipendente nei diversi organismi (Khalturin et al., 2004). Ricerche per l'identificazione di molecole coinvolte nell'alloriconoscimento negli cnidari solitari come *Hydra* non hanno fino a ora avuto successo (Kuznetsov et al., 2002; Kuznetsov et al., 2003).

1.4.2.2.2 Recettori *Toll-like* e LRR

Gli cnidari riconoscono sistemi molecolari associati ai microbi tramite insiemi di recettori di riconoscimento. Questo ancestrale ma efficace tipo di sistema di difesa innato si basa sulla mediazione di recettori di riconoscimento dei componenti superficiali del patogeno che non sono presenti nell'ospitante (Beutler, 2004). Questi motivi molecolari conservati e caratteristici dei microrganismi vengono riconosciuti grazie alla presenza di un sistema di recettori e di molecole che permettono di discriminare tra ciò che è proprio (self) e ciò che è estraneo (non-self) all'organismo.

Tra i recettori cellulari di superficie per i "Pattern molecolari associati ai patogeni" (PAMPs) vi sono i recettori simili al Toll (TLRs). Mentre il riconoscimento di PAMPs da parte di un TLR è mediato da regioni ricche di leucina (LRRs) nella parte extracellulare, la trasduzione del segnale richiede il dominio del recettore Toll/IL-1 (TIR) nella regione citosolica del recettore.

Lo screening del trascrittoma e del genoma di *Hydra* ha portato alla scoperta inattesa dell'assenza di un gene TLR completo (Miller et al., 2007). Tuttavia, ricerche nei data bank hanno rivelato che in *Hydra* ci sono due proteine transmembrana con LRRs simili ai LRRs presenti nei TLR dei vertebrati. Queste proteine, HyLRR-1 e HyLRR-2, sono prive di qualsiasi dominio intracellulare e, quindi, non contengono nemmeno il tipico dominio TIR. Sono stati anche scoperti due geni, HyTRR-1 e HyTRR-2, che codificano per proteine transmembrana con un dominio TIR canonico ma privo di tutti i cospicui domini extracellulari. Entrambe le proteine transmembrana funzionano insieme per riconoscere e trasdurre la componente batterica dei flagelli, la flagellina (Fig. 8) (Bosch et al., 2009). Pertanto, in *Hydra*, la funzione del TLR è presente ma allocata su due geni diversi (complesso recettoriale HyTRR-1 e HyLRR-2).

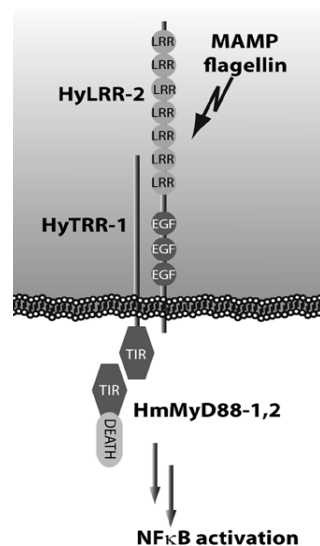


Fig. 8 Sistema molecolare di riconoscimento associato ai microbi in *Hydra* (Dunn 2009).

Dal momento che l'antozoo *Nematostella vectensis* contiene un singolo canonico prototipo di TLR (Fig. 9) (Miller et al., 2007), il riconoscimento dei PAMPs da parte

dei TLR sembra essere una caratteristica ancestrale. Questo è supportato dalla constatazione che, oltre ai recettori TLR transmembrana sono presenti anche componenti specifici della via del segnale di trasduzione dei TLR, come MyD88 e NFκB. Questi risultati implicano che le risposte innate del sistema immunitario mediate da TLR sono antiche, originarie dell'antenato comune degli animali bilateri. Oltre la flagellina che viene rilevata dal complesso recettoriale HyTRR-1 e HyLRR-2, anche LPS è in grado di indurre una reazione nell'immunità innata (Bosch et al., 2009).

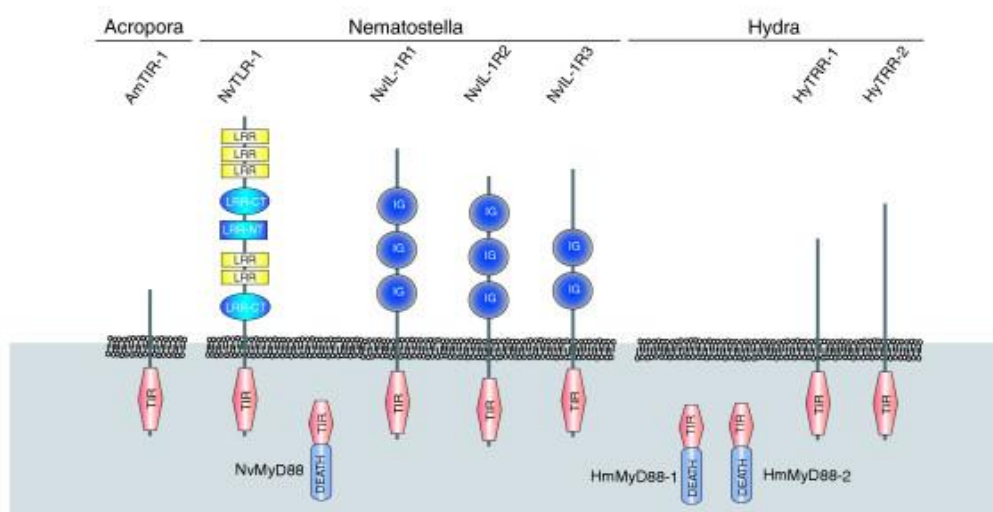


Fig. 9 Sintesi delle strutture di dominio TIR contenenti proteine identificate negli cnidari (Miller et al 2007)

E' interessante notare che non solo i PAMPs sono in grado di indurre una reazione di difesa negli cnidari. Un gruppo molto più ampio è costituito dai "pattern molecolari associati al pericolo" (DAMPs). Queste sostanze sono normalmente conservate all'interno della cellula e quindi non rilevabili dalle cellule vicine. In caso di danno cellulare e/o morte cellulare, queste sostanze vengono rilasciate e suggeriscono il pericolo per le altre cellule intatte all'interno del tessuto (Augustin & Bosch, 2010)

1.4.2.2.3 Integrine

Le integrine sono proteine eterodimeriche trans-membranarie che mediano interazioni tra cellule e matrice extra cellulare (Johnson et al., 2009). Oltre ai ruoli fondamentali nello sviluppo, le integrine sono coinvolti in diversi processi cellulari che riguardano le risposte immunologiche, come la migrazione e differenziazione cellulare, la formazione della matrice fibrillare e la trasduzione del segnale (Takada et al., 2007).

Le integrine sono state identificate in diversi invertebrati, come nelle Ascidie (Ewan et al., 2005) in *Drosophila melanogaster* (Homblad et al., 1997) e nella spugna *Suberites domuncula* (Wimmer et al., 1999). Negli Cnidari, sono stati identificati almeno tre integrine complete in *Nematostella vectensis* (Putnam et al., 2007; Reitzel et al., 2008). Almeno una integrina in *Idra magnipapillata* (Chapman et al., 2010), due subunità di tipo beta sono state identificate infine identificate nel corallo *A. millepora* (Brower et al., 1997; Knack et al., 2008). Nonostante lo scenario sulla diversità delle integrine degli Cnidaria diventi sempre più complesso (Knack et al., 2008), gli studi funzionali sono ancora carenti e necessitano di approfondimenti.

1.4.2.2.4 Peptidi antimicrobici e metaboliti

Un importante contributo alla risposta immunitaria degli cnidari è l'insieme dei peptidi antimicrobici. Negli cnidari, come in altri organismi, l'attivazione dei recettori PAMPs induce la produzione di una moltitudine di diversi peptidi antimicrobici (AMPs). I peptidi sono piccole molecole segnale che controllano una varietà di processi quali, lo sviluppo, la contrazione muscolare e il controllo dell'espressione del gene target (Bosch e Fujisawa, 2001). I peptidi antimicrobici secreti dai microbi all'interno del muco dei coralli sono noti per essere un potente

regolatore microbico interspecifico della comunità epifita microbica del corallo (Ritchie, 2006). La composizione della struttura della comunità microbica degli cnidari è importante per la salute dell'ospite (Ritchie, 2006; Fraune e Bosch, 2007), ma il ruolo dei peptidi antimicrobici nell'immunità dell'ospite fino a poco tempo fa era sconosciuto. I peptidi dell'ospite hanno una struttura stabile che permette la loro traslocazione in differenti aree intorno alla struttura diblastica del corpo degli cnidari attraverso lo spazio interepiteliale o mesoglea (Fraune e Bosch, 2007).

Una dettagliata caratterizzazione biochimica dell'attività antimicrobica in *Hydra* ha rivelato che sia la presenza di AMPs conservati come Hydramacina-1, sia di nuovi o AMPs taxon-specifici come Arminina-1a e Periculina-1, sono assenti in trascrittomi di altri organismi. Un esempio interessante di tale limitazione tassonomica dei peptidi antimicrobici è la Periculina-1, definita per la sua risposta rapida ad una vasta gamma di batteri e segnali di pericolo ai tessuti (Bosch et al., 2009). L'analisi della sequenza aminoacidica di Periculina-1 e la distribuzione di carica all'interno della molecola, hanno rivelato una regione anionica N-terminale ed una regione cationica C-terminale contenente 8 residui di cisteina (Bosch et al., 2009). Non sono stati trovati geni ortologi di questa molecola al di fuori del genere *Hydra*.

Il tessuto degli cnidari non è solo ricco di efficaci molecole antimicrobiche, ma anche di inibitori delle serin proteasi con una forte attività antimicrobica. Curiosamente tutti i peptidi o gli inibitori delle proteasi isolati finora in *Hydra*, Hydramacina-1, Arminina 1a, Periculina-1, così come Kazal 2, sono espressi nello strato endodermale (Bosch et al., 2009; Augustin et al., 2009). Pertanto, è possibile desumere che contribuiscano alle proprietà chimiche di difesa di questo strato.

Il ruolo di molti peptidi e metaboliti secondari come parte del sistema immunitario innato degli cnidari è stato recentemente esplorato ed è stato dimostrato che queste

sostanze funzionano come antiossidanti e come composti antimicrobici (Mydlarz e Jacobs, 2004, Shapo et al., 2007). Tuttavia, le modalità di sintesi e funzionamento del recettore di questi metaboliti rimangono sconosciute.

1.4.2.2.5 Complemento e lectine

La cascata di attivazione del complemento è una parte importante del sistema immunitario innato dei vertebrati, in cui i microbi e le cellule estranee che sono stati rilevati vengono eliminati tramite opsonizzazione, fagocitosi e lisi. Tre dei quattro percorsi del sistema di attivazione del complemento coinvolgono un componente C3 tiolostere, che conduce al quarto complesso di attacco alla membrana (MAC) del pathway litico (Murphy et al., 2008).

Ci sono precursori delle vie del complemento come C3 o proteine contenenti un dominio per il gruppo tiolostere simile al C3 (TEP) identificate negli cnidari (Dishaw et al, 2005; Miller et al, 2007). Il primo TEP, identificato nel corallo *Swiftia exserta*, presenta un alto grado di conservazione con il C3 dei vertebrati con una regione caratteristica alle anafilotossine ed un sito di taglio di C4. Questa proteina così articolata in domini è presente quindi negli Cnidari, così come la caspasi e i membri della famiglia Bcl-2 della via apoptotica (Dunn et al., 2006).

Una proteina simile a TEP è stata inoltre individuata negli antozoi, *Acropora* e *Nematostella*. È interessante notare che tutte le forme sono limitate rispettivamente ai tessuti endoderma/gastroderma (Miller et al., 2007) ed anche se hanno strutture differenti, possono giocare un ruolo nell'opsonizzazione e quindi, essere implicate nella selezione e nell'assorbimento di cellule associate con particelle di cibo/microbo. Inoltre, Miller et al. (2007) hanno descritto una serie di proteine simili alle proteine del complesso di attacco alla membrana (MAC) e domini delle

perforine associate con la fase finale della cascata del complemento, indicando che negli cnidari possono esistere più componenti delle diverse fasi della via della cascata del complemento.

L'attivazione del pathway del complemento e l'opsonizzazione attraverso la formazione di un complesso mediato dal legame lectinico è stato indicato negli cnidari durante l'inizio della cascata complemento-simile. Il complesso mediato dal legame lectinico può anche essere di particolare rilevanza nella insorgenza e la specificità della simbiosi con i dinoflagellati del genere *Symbiodinium sp.*, presente in molti cnidari. Il ruolo delle lectine come molecole di riconoscimento della superficie cellulare di potenziali patogeni o simbionti, è il primo importante passo nel riconoscimento della superficie cellulare negli cnidari. Allo stato attuale, negli cnidari è stata caratterizzata solamente una lectina, denominata millectina dall'antozoo, *A. millepora* (Kvennefors et al., 2008). La millectina ha omologia di sequenza con il dominio delle lectine di tipo-C ed è simile alla lectina legante mannosio (MBL) ed alla proteina A del surfattante polmonare (Sp-A). Inoltre, la millectina ha la caratteristica particolare di avere un'estesa variabilità nella regione del legame del substrato, indicando un potenziale ampio intervallo di PAMPs che possono essere riconosciuti e legati dalle millectine. Questo in parte, può essere dovuto ad un doppio ruolo di riconoscimento patogeno/potenziale simbionte di recettore questa molecola (Kvennefors et al., 2008).

1.4.2.2.6 Rapporti simbiotici

Gli cnidari sono il phylum di Eumetazoa filogeneticamente più antico noto per formare rapporti simbiotici con alghe unicellulari. E' stato accertato che le vie di segnalazione inter-partner coinvolte nell'insorgenza delle simbiosi sono omologhe a

quelle che guidano le interazioni animale ospitante/patogeno. In entrambi i tipi di relazioni ci sono meccanismi comuni e, i segnali di rilascio sulla superficie molecolare sia del patogeno che del simbiote, probabilmente sono i principali determinanti per l'interazione con l'ospite. La riduzione delle risposte di difesa dell'ospite sono necessarie per il successo di interazioni simbiotiche di lungo termine o nel caso di infezioni persistenti. La maggior parte dei coralli e degli anemoni che vivono in acque poco profonde formano simbiosi mutualistiche con microalghe fotosintetiche. Le microalghe sono dinoflagellati, di solito del genere *Symbiodinium*, e sono conosciuti come zooxantelle. Le simbiosi intracellulari tra cnidari e dinoflagellati sono uno dei più importanti mutualismi per l'ambiente marino e sono soggette a stress abiotici. Se vengono esposti a irraggiamento e a temperature elevate, i coralli sbiancano, di solito a causa dell'espulsione delle loro zooxantelle. Le interazioni cellulari e molecolari alla base di queste interazioni sono attualmente oggetto di studio con particolare attenzione alla creazione, al mantenimento, ed alla composizione di tali partenariati di cooperazione. La maggior parte delle specie deve acquisire nuovamente simbionti ad ogni generazione e quindi deve impegnarsi in un complesso processo di riconoscimento e specificità che risultino nella creazione di una simbiosi stabile.

Per identificare i geni che attivano, regolano e mantengono questa interazione ospite/simbiote, è stata condotta un'analisi comparativa del trascrittoma nell'anemone di mare *A. elegantissima* utilizzando una piattaforma cDNA microarray (Rodriguez-Lanetty et al., 2006). Anche se sono state rilevate differenze statisticamente significative nei profili di espressione genica dell'ospite tra individui di *A. elegantissima* in uno stato simbiotico e non simbiotico, il gruppo dei geni la cui espressione risulta alterata è vario, suggerendo che la regolazione molecolare della simbiosi è regolata da cambiamenti di più processi cellulari, incluso il metabolismo

lipidico, l'adesione cellulare, la proliferazione cellulare, l'apoptosi, e lo stress ossidativo (Rodriguez-Lanetty et al., 2006).

Un aspetto curioso e irrisolto che riguarda in particolare i coralli è relativo alla funzione delle proteine fluorescenti (FP).

Le FP sono spesso utilizzate per valutare lo stress termico a causa delle loro capacità di risposta rapide ai cambiamenti ambientali (Smith-Keune & Dove, 2008; Yuyama et al., 2012). Sono state proposte molte ipotesi per il ruolo di queste proteine, per esempio, per la fotoprotezione dei simbionti *Symbiodinium* (Salih et al., 2001), e più recentemente come componenti di una risposta immunitaria, potenzialmente con funzione antiossidante. Quest'ultima ipotesi deriva dalla osservazione di un incremento di PF in prossimità di ferite (Palmer et al., 2008) o tessuto infetto (Palmer et al., 2009a) e dalla prova che eliminano i radicali di ossigeno in modo più efficiente rispetto ad altre proteine (Palmer et al., 2009b). Anche se questi ultimi risultati non chiariscono definitivamente la funzione delle FP, supportano l'ipotesi che le FP sono parte di una risposta immunitaria, che induce spesso lo stress ossidativo (Sadd et al., 2006).

1.4.2.2.7 Recettori immunitari intracellulari

L'immunoriconoscimento degli cnidari non è limitato alla superficie cellulare esterna o interna della cellula. Le cellule degli cnidari, infatti, sono ben attrezzate con recettori intracellulari e pathway che agiscono come una seconda linea di difesa nel riconoscere e rimuovere i patogeni che sono riusciti ad entrare attraverso la prima linea di difesa e sono ora all'interno della cellula. Questo approccio multilivello alla rilevazione microbica per la rimozione del microbo/patogeno è la chiave per l'insorgenza e la specificità della simbiosi. Uno dei riconoscimenti intracellulari della risposta immunitaria trovato negli cnidari è la produzione di enzimi che portano alla

produzione di melanina (Petes et al., 2003; Mydlarz et al., 2008; Palmer et al., 2008). La cascata enzimatica della fenolossidasi (PO), che porta alla produzione di melanina, è nota per svolgere un ruolo attivo associato all'aggregazione dei fagociti e alla rimozione di microbi/patogeni in molti altri invertebrati (Johansson e Söderhäll, 1996). L'inizio della cascata della PO tramite un taglio nella PRO-forma in altri sistemi di invertebrati può variare a seconda del substrato, suggerendo un ruolo funzionale nel riconoscimento. Negli Artropodi, l'attivazione avviene tramite il contatto con polisaccaridi specifici come β -1,3-glucano (β 13g), LPS e peptidoglicano, negli urocordati gli induttori sono LPS e β 13g, e negli echinodermi solo il β 13g ha dimostrato attivare la cascata (Johansson e Söderhäll, 1996). Negli cnidari, sono state dimostrate differenti attività PO.

Solo di recente sono stati identificati i recettori intracellulari con cui le cellule immunitarie degli cnidari rilevano i precedentemente “non rilevabili” o persistenti microbi invasori e possono anche operare per rimuovere simbionti disfunzionali sotto stress (Weis, 2008).

Due componenti fondamentali del repertorio dell'immunitaria innata intracellulare possono portare all'attivazione della morte cellulare: in primo luogo, l'incremento di ossido nitrico (NO) nell'antozoo, *Aiptasia pallida* in risposta a LPS e a stress ipertermico (Perez e Weis, 2006); l'incremento dell'ossido nitrico svolge un ruolo attivo nella rimozione del simbionte *Symbiodinium sp.* sotto stress simbiotico attraverso l'attivazione del pathway apoptotico (Trapido-Rosenthal et al., 2001; Perez e Weis, 2006). In secondo luogo, l'espressione di un membro della famiglia CD36, il recettore SR-B1, è attivato nell'antozoo simbiotico, *Anthopleura elegantissima* rispetto agli individui aposimbiotici, (Rodriguez-Lanetty et al., 2006). I membri della famiglia CD36 tra cui SR-B1, agiscono nella difesa dell'ospite mediante il metabolismo lipidico.

In tutti i metazoi la distruzione o l'eliminazione dei microbi/agenti patogeni attraverso l'apoptosi della cellula ospite, l'autofagia o la morte cellulare programmata indotta da microbi (PCD) può verificarsi nella fase di contatto iniziale per prevenire l'infezione, o ad un livello intracellulare per limitare i danni (James e Green, 2004). L'immunoriconoscimento innato degli cnidari è tutt'altro che semplice ed i membri di tutte le classi mostrano un arsenale diversificato di recettori del sistema immunitario innato che operano sia a livello inter-cellulare che intracellulare. L'interazione tra le proteine di dominio-TIR e dominio-LRR e la produzione di peptidi (eventualmente con l'aggiunta di metaboliti secondari) è completata con la secrezione di una lectina che può interagire con il fattore C3 della cascata fagocitica del complemento (Fig.10). Questo sistema multiplo e principale di difesa che porta a una risposta immunitaria, offre un elemento chiave per la funzione base dei più complessi percorsi di immunità innata trovata nei vertebrati.

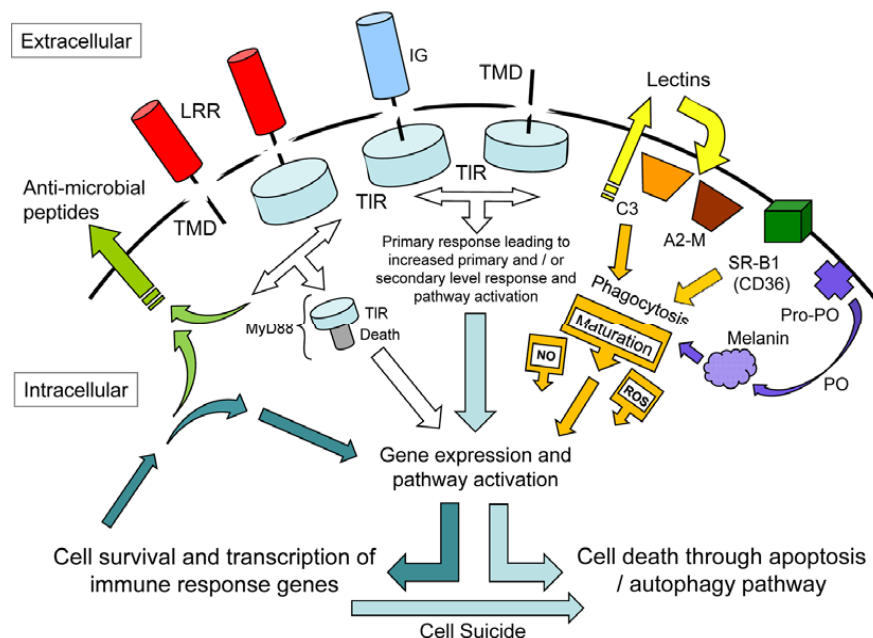


Fig. 10 Rappresentazione schematica degli immunorecettori e dei domini proteici associati e dei peptidi trovati negli cnidari (Dunn 2009)

2. Scopo della ricerca

La biodiversità dell'ambiente marino associata alla diversità chimica costituiscono una risorsa praticamente illimitata di nuove sostanze attive nel campo dello sviluppo di prodotti bioattivi (Aneiros & Garateix, 2004).

Il mare rappresenta quindi una preziosa fonte di nuovi composti (De Vries e Beart, 1995), ed è stato classificato come il più grande serbatoio di molecole naturali che possono essere valutate per l'attività farmaceutica (Gerwick, 1987). La scoperta del ruolo bioregolatorio di diversi peptidi endogeni nell'organismo così come lo studio dei meccanismi molecolari d'azione di alcuni nuovi peptidi bioattivi ottenuti da fonti naturali su specifici target cellulari, hanno contribuito a considerare i peptidi come farmaci promettenti. Recentemente, quindi, i peptidi di origine marina hanno aperto una nuova prospettiva di sviluppo farmaceutico (Miljanich, 1997).

In medicina umana, infatti, la crescente prevalenza di microbi resistenti agli antibiotici ha richiesto lo sviluppo di nuovi composti antimicrobici. I peptidi antimicrobici di origine animale possono quindi essere una valida alternativa o un additivo agli antibiotici convenzionali per l'uso terapeutico. La caratterizzazione recente di peptidi antimicrobici altamente attivi in *Hydra* e *Aurelia* mostrano che i peptidi antimicrobici isolati da cnidari marini e di acqua dolce possono rappresentare una risorsa in gran parte non sfruttata per la progettazione di nuovi antibiotici ad ampio spettro ad attività antimicrobica.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di identificare e fare chiarezza sull'origine, sulla distribuzione e sul significato biologico di alcune delle tossine presenti in *Anemonia sulcata* un antozoo caratteristico del Mediterraneo, al fine di isolare, localizzare e valutare la modulazione di queste molecole e di peptidi antimicrobici. Infatti, anche se la presenza di alcune tossine nelle nematocisti è ben documentata in

letteratura, la presenza di peptidi antimicrobici e la precisa localizzazione delle tossine nell'animale non è sempre chiara e non si può escludere un'origine non associata alle nematocisti.

Ulteriore obiettivo è stato quello di studiare l'immunobiologia a partire dalla risposta infiammatoria negli cnidari in seguito ad inoculo di varie sostanze come LPS e batteri per comprendere i meccanismi effettori implicati in questo processo.

Le funzioni dei geni e le vie cellulari nei vertebrati superiori, inclusi gli esseri umani, si sono altamente conservate durante l'evoluzione dei metazoi dalla scoperta di omologhi nei metazoi base, come spugne e cnidari (Kortschak et al., 2003;. Kuo et al., 2004, Kusserow et al., 2005;. Dunn et al., 2006; Hemmerich et al., 2007). L'uso recente degli cnidari come sistema modello dei metazoi (Weis et al., 2008), ha portato una ricchezza di nuove informazioni svelando i processi cellulari coinvolti nella simbiosi, nella regolazione dell'immunità, nella morte cellulare e nella longevità dell'organismo.

L'accumulo recente di dati genomici, filogenetici e funzionali su componenti dell'immunità innata negli cnidari può quindi dare informazioni riguardanti il repertorio immunitario innato nell'antenato eumetazoo.

3. Gli cnidari come modello di studio

Gli Cnidari, costituiscono un phylum di animali a simmetria raggiata, diblastici ed acquatici; essi rappresentano i Metazoi primitivi, cioè i più semplici organismi pluricellulari che hanno raggiunto il livello di organizzazione tissutale.

Essendo uno dei più antichi lignaggi filologici conosciuti e sister taxon dei bilateri, il phylum degli cnidari è uno dei primi rami nell'albero della vita animale a fornire chiarimenti fondamentali sull'evoluzione dell'immunità (Putnam et al., 2007; Dunn et al., 2008; Schierwater et al., 2009; Philippe et al., 2009)

Il loro corpo può essere schematizzato come un sacco, con una sola apertura, circondata da tentacoli, che funge da bocca ma serve anche per espellere il materiale non digerito. I tentacoli servono per afferrare le prede. La cavità interna, detta celenteron, è una vera cavità gastrovascolare, che si prolunga in parte anche nei tentacoli.

Oltre 9000 specie di cnidari sono presenti in tutti i mari; la maggior parte delle forme sessili vive in acque costiere, ma vi sono anche specie abissali, mentre le meduse vivono in mare aperto.

Il rinnovato interesse per lo studio dei geni dell'immunità negli cnidari come sistemi modello dei metazoi, ha portato informazioni aggiuntive allo scenario delle prime tappe dell'evoluzione dell'immunità svelando i processi cellulari coinvolti nella simbiosi, nella regolazione dell'immunità, nella lotta alle infezioni e nel mantenimento dell'omeostasi.

Gli cnidari possiedono componenti delle principali vie dell'immunità degli invertebrati. I recettori e le vie già individuate indicano che questi invertebrati basali sono tutt'altro che "semplici" nella gamma di metodi di cui dispongono per affrontare

potenziali microbi invasori e agenti patogeni. Tuttavia, sono numerose le lacune nelle conoscenze attuali, con una grave carenza di studi funzionali delle componenti che possono avere un ruolo cruciale nelle risposte immunitarie.

La conoscenza riguardo sia l'immunità innata che gli altri processi cellulari degli cnidari è lungi dall'essere completa. Tuttavia, le prove acquisite finora, suggeriscono che componenti altamente conservate di questi processi cellulari sono strettamente correlate ai più complessi agli omologhi dei vertebrati rispetto a quelli di altri invertebrati.

3.1 Anthozoa

Gli antozoi sono cnidari caratterizzati dall'assenza dello stadio medusoide. Il polipo è attaccato al substrato mediante un disco pedale che può permettere anche piccoli spostamenti. L'estremità superiore del polipo è costituita da un disco orale attorno al quale si trovano i tentacoli muniti di cnidocisti. Gli antozoi presentano una vera e propria bocca, costituita da uno stomodeo che si apre all'interno della cavità gastrovascolare. Lungo le pareti dello stomodeo ci sono dei solchi verticali ("sifonoglifo") attraverso i quali l'acqua entra nella cavità gastrovascolare (Fig.11).

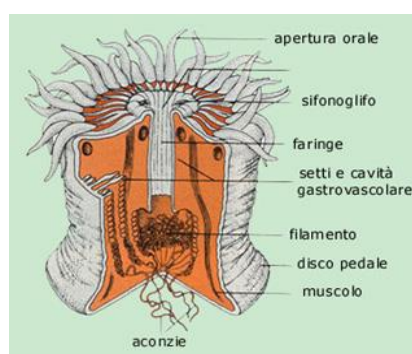


Fig. 11 Sezione longitudinale della struttura interna di un antozoo

L' interno del corpo è suddiviso in camere mediante quattro (tetracoralli; estinti), sei (esacoralli) o otto (ottocoralli) coppie di setti (sarcosetti) che si estendono verticalmente dalle pareti del corpo fino allo stomodeo; a questi si possono intercalare altri setti incompleti che non raggiungono lo stomodeo. Lungo i margini interni dei setti decorrono verticalmente filamenti mesenterici che si continuano inferiormente con le cosiddette aconzie, che sono sottili filamenti fittamente armate di nematocisti che vengono emesse dall'apertura boccale o dai pori del corpo quando l'animale si difende. Sui margini interni dei setti sono presenti anche le gonadi. Tutte le camerette sono internamente riempite da mesoglea; la parte esterna è rivestita da un'epidermide spessa. I fasci muscolari decorrono lungo i setti e la parete gastrovascolare. Gli Antozoi si riproducono per via asessuale e sessuale.

3.2 *Anemonia sulcata*



Fig. 12 *Anemonia sulcata*

Anemonia sulcata (Fig. 12) è uno cnidario appartenente alla classe degli *Anthozoa*, sottoclasse *Zoantharia*, ordine *Actiniaria*, famiglia *Actiniidae*.

E' una specie caratterizzata da lunghi tentacoli (fino ad alcune centinaia) flessibili e poco retrattili disposti su sei file concentriche, che di norma nascondono la colonna. La base del piede è larga. La colorazione varia dal verde al bruno giallastro. E' il più

grande e frequente anemone del Mediterraneo, potendo raggiungere i 20 cm di diametro. Vive su fondali rocciosi da pochi metri fino a più di 20 m di profondità, preferendo le zone maggiormente illuminate per agevolare la fotosintesi da parte delle alghe simbiotiche presenti nei suoi tentacoli. Si riproduce sia per via sessuata che per scissione. I sessi sono separati e le uova vengono rilasciate nel periodo primaverile-estivo.

4. Materiali e Metodi

4.1 Raccolta e mantenimento animali

Individui adulti di *Anemonia sulcata* sono stati prelevati nelle aree di Capo Gallo (Pa); gli animali sono stati quindi trasferiti presso l'acquario del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, dove sono stati posti in vasche contenenti acqua di mare ossigenata ad una temperatura di 18°C.

4.2 Inoculi

Gli esemplari sono stati inoculati nella zona del disco pedale per mezzo di una siringa sterile con 200 µl di una soluzione di Lipopolisaccaridi (LPS) di *Escherichia coli* (sierotipo 055:B5, Sigma Chemicals) in Marine Solution (12 mM CaCl₂; 11 mM KCl; 26 mM MgCl₂; 43 mM Tris; 38 mM HCl; 0,4 M NaCl, pH 7,4), alla concentrazione di 2 mg/ml. Alcuni animali sono stati inoculati con Phenyl sepharose 0,05g/ml, con DEAE cellulosa 0,05 g/ml e con eritrociti di coniglio all'1%. Altri animali sono stati inoculati con 200 µl di sospensione di batteri uccisi al calore dei ceppi *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio proteolyticus* e *Shigella putrefaciens* alla concentrazione di $1 \cdot 10^8$ /ml. Gli individui controllo sono stati inoculati con un pari volume di MS.

4.3 Preparazione dei campioni di *Anemonia sulcata*

In laboratorio, sono state condotte le estrazioni dai tentacoli e dal corpo dell'animale.

Estrazione dai tentacoli e dal corpo: i tentacoli ed il corpo sono stati prelevati ed è stata aggiunta TBS (NaCl 150 mM, TRIS HCl 10mM pH 7,4). Dopo

un'omogenizzazione in ghiaccio con Ultra – Turrax per 5 minuti il campione è stato centrifugato a 21000 g per 20 minuti ed infine è stato recuperato il supernatante.

Per l'estrazione acida dopo l'omogenizzazione è stato aggiunto il 10% di acido acetico (CH_3COOH), sono state effettuate tre sonicazioni (sonicatore Branson, Model B15, Danbury, CT) di 30 secondi ciascuna, il campione è stato centrifugato a 21000 g per 20 minuti ed infine è stato recuperato il supernatante.

4.4 Concentrazione proteica

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata mediante il metodo Bradford (1976), e la albumina bovina (BSA, Sigma Chemicals) è stata usata come standard. La lettura allo spettrofotometro (595 nm) di ciascun campione (100 μl + 1ml del reattivo di Bradford) è stata effettuata, dopo azzeramento col bianco (100 μl del tampone in cui si trova ciascun campione con 1 ml di reattivo di Bradford). A questo punto il valore di assorbanza di ciascun campione è stato riportato sulla curva ottenuta con lo standard e per interpolazione è stata ricavata la concentrazione proteica.

4.5 Elettroforesi su gel SDS- PAGE

Tutti i campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilammide a varie percentuali eseguita secondo il metodo Laemmli (1970) utilizzando un apparecchiatura “mini protean II cell” (Bio-Rad), in condizioni riducenti. La migrazione è avvenuta in *Running buffer* (Tris Base 25 mM; Glicina 192 mM, 1 % p/v SDS, pH 8,3) a 60 volts per i primi 10 minuti e a 190 volts per il restante tempo, come indicato dal manuale BIORAD. I gel sono stati calibrati con standard proteici a peso molecolare noto (Sigma-Aldrich). In relazione alla curva di regressione ottenuta

mediante il programma AlfaEaserFC sono stati calcolati i pesi molecolari delle bande ottenute.

4.6 Colorazione con Blue di Coomassie

Al termine della migrazione elettroforetica, il gel è stato colorato con il colorante Blue di Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G250 0,1%; Metanolo 40%; Acido acetico 1%) e posto in agitazione, overnight a temperatura ambiente. Il giorno seguente, il gel è stato decolorato con la *soluzione decolorante* (Acido acetico 0,1%; Metanolo 0,4%; acqua distillata) in due passaggi successivi della durata di 1 ora ciascuno, in agitazione e a temperatura ambiente. Quindi, il gel è stato sciacquato in acqua distillata.

4.7 Colorazione argantica

Al termine della decolorazione, il gel è stato lavato con acqua distillata e posto in agitazione; in seguito è stato lasciato in agitazione 30 minuti con una soluzione di fissatore (20 ml di DW, 25 ml di metanolo e 5 ml di acido acetico). Dopo un ulteriore lavaggio con acqua distillata per 30 minuti è stata aggiunta una soluzione di ditiotreitolo (DTT) 1mg/ml e lasciata in agitazione per 30 minuti. Dopo l'aggiunta di una soluzione di nitrato di argento 100mg/ml per ulteriori 30 minuti è stato aggiunto il rivelatore (80 µl di formaldeide al 35%, 3,75g di Na₂CO₃ e 125 ml di acqua distillata) fino all'apparizione di un colore marrone chiaro ed alla comparsa delle bande. La colorazione è stata stoppata con la soluzione d'arresto (90 ml di DW e 10 ml di CH₃COOH).

4.8 Valutazione dell'attività proteasica

I campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilammide al 7,5% eseguita secondo il metodo Laemmli (1970) utilizzando un mini protean II cell (Bio-Rad) in condizioni non riducenti, usando come substrato gelatina (2mg/ml) e fibrinogeno (0,5mg/ml). La migrazione è avvenuta in *Running buffer* (Tris Base 25 mM; Glicina 192 mM, 1 % p/v SDS, pH 8,3) a 60 volts per i primi 10 minuti e a 130 volts per il restante tempo, come indicato dal manuale BIORAD. Dopo la migrazione sono stati effettuati 3 lavaggi da 3 minuti ciascuno con TBS Ca 10mM (NaCl 150 mM, TRIS HCl 10mM, CaCl₂ 10mM pH 8) con Triton X-100 al 2%. Dopo un'incubazione overnight con TBS Ca 10mM pH 8 il gel è stato lavato per 4 minuti in metanolo al 50% e colorato in Blue di Comassie.

Per valutare l'inibizione dell'attività proteasica è stato aggiunto 1,10-phenanthroline nel tampone di incubazione ed il gel è stato in seguito colorato in Blue di Comassie. 1,10-phenanthroline è stata preparata come una soluzione stock 300mM in metanolo ed aggiunta fresca al buffer di incubazione per ottenere una concentrazione finale di 10mM.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi densitometrica utilizzando il programma AlphaEaseFC.

4.9 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina

Per valutare l'attività della fosfatasi alcalina i campioni sono stati incubati in un volume uguale di 4 mM p-nitrofenil fosfato liquido in 100 mM di bicarbonato di ammonio contenente 1 mM di MgCl₂ (pH 7.8) come descritto da Ross et al. (2000). L'aumento della densità ottica è stata misurata ad intervalli regolari di 5 minuti per 3h a 405nm con un lettore per micro piastre (LABSYSTEM UNISKAN I). Una unità (U)

di attività è stata definita come la quantità di enzima necessaria per liberare 1 micromole di p-nitrofenolo prodotto in 1 min.

4.10 Valutazione dell'attività esterasica

L'attività esterasica è stata determinata secondo il metodo di Ross et al., (2000). Un volume uguale di campione è stato incubato con 0,4 mM p-nitrophenyl myristate substrate in 100 mM di ammonio bicarbonato contenente 0,5% di Triton X-100 (pH 7,8, 30 °C). L'aumento della densità ottica è stata misurata ad intervalli regolari di 5 minuti per 3h a 405nm con un lettore per micro piastre (LABSYSTEM UNISKAN I). L'attività è stata determinata come per la fosfatasi alcalina.

4.11 Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante analisi della varianza (ANOVA) per determinare le differenze tra i gruppi. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando SPSS 15.0 e le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0,05$.

4.12 Purificazioni e valutazione dell'attività antibatterica

4.12.1 Purificazione tramite SEP PAK

Gli estratti acidi dei tentacoli e del corpo di *Anemonia sulcata* sono stati purificati tramite una colonna cromatografica a base di silice SEP PAK C8 Vac 12cc. Questa tecnica permette di separare le molecole in base alla polarità; la fase stazionaria apolare è di natura idrofobica non solubile in acqua, mentre la fase mobile polare è

una miscela di acqua e acetonitrile. Sono state preparate due colonne, una per il corpo ed una per i tentacoli che sono state inizialmente reidratate con 50 ml di metanolo. Le colonne sono state successivamente lavate prima con 25ml di acqua Milli Q e dopo con 25ml di acqua contenente 0,05% di acido trifluoroacetico (TFA). Dopo avere fatto passare i campioni all'interno delle colonne sono stati ripetuti i lavaggi con 25ml di acqua Milli Q e 25 ml di acqua con TFA. Successivamente sono stati eluiti 50ml di acetonitrile al 10% con 0,05% di TFA, 50 ml di acetonitrile al 40% con 0,05% di TFA e 50ml di acetonitrile all'80% con 0,05% di TFA. Ogni frazione è stata recuperata, liofilizzata e risospesa in acqua Milli Q.

4.12.2 Concentrazione proteica

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata mediante NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. La lettura allo spettrofotometro (280 nm) di ciascun campione è stata effettuata, dopo azzeramento col bianco (acqua Milli Q).

4.12.3 Attività antibatterica

Per valutare l'attività antibatterica dei campioni separati tramite SEP PAK, sono state preparate delle capsule Petri contenenti 10ml di Trypticase soy agar (TSA). In ogni capsula è stata depositata una sospensione batterica alla concentrazione misurata come 0,5 McFarland di torbidità ed è stato tolto l'eccesso di surnatante. Sono stati creati dei pozzetti e dentro ogni pozzetto sono stati depositati 10 µl di campione. Le capsule sono state conservate overnight a 37°C. I batteri testati sono stati: *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli*, *Vibrio proteolyticus* ed *Staphylococcus aureus*.

4.12.4 Curva standard per gli antibiotici

Per preparare le curve standard, sono state fatte delle diluizioni per i cinque antibiotici utilizzati (Kanamicina, Spectinomicina, Ampicillina, Streptomina e Tetraciclina). Queste diluizioni sono state depositate in delle capsule Petri contenenti 10ml di Trypticase soy agar (TSA) e una sospensione batterica di 0,5 McFarland. Le curve standard degli antibiotici sono state preparate per *Micrococcus lysodeikticus* ed *Escherichia coli*.

4.12.5 Valutazione dell'attività batteriostatica (MIC)

I campioni sono stati saggiati verso *Micrococcus lysodeikticus* su piastra a 96 pozzetti. I batteri sono stati preparati alla concentrazione di 5×10^6 batteri/ml in Trypticase soy broth (TSB). Per valutare l'attività batteriostatica 25 μ l di TSB sono stati posti in una piastra sterile a 96 pozzetti dal secondo pozzetto in poi. Nel primo e nel secondo pozzetto sono stati posti 25 μ l di campione da testare, eseguendo dal secondo pozzetto in poi delle diluizioni seriali. Di seguito sono stati aggiunti 80 μ l di sospensione batterica in tutti i pozzetti. E' stato preparato un controllo (100 μ l di TSB) grazie al quale, per comparazione, é possibile verificare l'attività del campione sui batteri. La piastra è stata inserita nel microplate reader TECAN (INFINITE M 200) per 16 ore alla temperatura di 37°C.

4.12.6 Valutazione dell'attività battericida (MBC)

Per la valutazione dell'attività battericida sono stati analizzati i campioni presenti nei pozzetti della piastra incubata per 16 ore nel microplate reader TECAN. Il contenuto dei pozzetti (il primo in cui si evidenzia la crescita batterica e i precedenti

cinque) sono stati depositati in capsule petri contenenti 20ml di TSA e lasciati overnight a 37°C.

4.12.7 Cromatografia in fase inversa

La cromatografia in fase inversa permette di separare le molecole in base alla polarità; la fase stazionaria apolare è di natura idrofobica non solubile in acqua, mentre la fase mobile polare è una miscela di acqua e acetonitrile. I profili di separazione dei campioni sono stati ottenuti utilizzando una colonna di silice C18 INTERCHROM UP5ODB-25QS 250x4,6mm; con una catena idrofobica di 18 atomi di carbonio è adatta alla separazione di piccole proteine o peptidi. Sono stati caricati 50µl di campione per ogni analisi con un iniettore manuale reodine e la lettura è stata effettuata a 225 nm (mAU) con un gradiente di acetonitrile da 0 a 60 % per 60 minuti. I diversi picchi sono stati raccolti, liofilizzati tramite uno SpeedVac Concentrator SAVANT SC 210A e analizzati per valutarne l'attività antibatterica.

4.12.8 Valutazione dell'attività antibatterica dei picchi

Per valutare l'attività antibatterica dei picchi separati tramite cromatografia in fase inversa, i campioni sono stati saggiati su piastra a 96 pozzetti verso *Micrococcus lysodeikticus*. I batteri sono stati preparati alla concentrazione di 5×10^6 cellule/ml in Trypticase soy broth (TSB). Per valutare l'attività antibatterica 20 µl di sospensione batterica sono stati posti in una piastra sterile a 96 pozzetti; di seguito sono stati aggiunti 20 µl di campione. La piastra è stata conservata overnight a 37°C.

4.13 Spettrometria di massa e sequenziamento

La massa molecolare dei peptidi purificati è stata determinata tramite spettrometria di ionizzazione di massa (ultraflex TOF/TOF). Questa tecnica utilizza due canali (TOF); il primo separa gli ioni generati dal fascio laser sulla base dei loro pesi molecolari dando un'impronta digitale di massa. Il secondo TOF risolve le specie frammentate generate da una camera di collisione.

Il microsequenziamento dei peptidi è stato effettuato presso la Plate-forme de Protéomique «PISSARO» (Francia) responsabile “Laurent Coquet”, utilizzando il metodo della Degradazione di Edman. La sequenza aminoacidica N-terminale è stata determinata usando il Microsequenziatore Perkin Elmer Applied Biosystem Model 494. La degradazione di Edman, dal nome di Pehr Edman che la sviluppò, è un metodo che permette di sequenziare gli amminoacidi presenti all'interno dei peptidi. Questa consente di tagliare un solo residuo, quello N-terminale, il quale con l'isotiocianato di fenile (PITC) va a formare una feniltioantoina facilmente identificabile con semplici tecniche analitiche. Il feniltioisocianato reagisce con il gruppo amminico del residuo amminoacidico N-terminale convertendolo in un addotto feniltiocarbammilico; il legame successivo vicino al PTC viene rotto mediante trattamento con acido trifluoroacetico in ambiente anidro con liberazione dell'amminoacido N-terminale come derivato anilintioazolinico. Il derivato amminoacidico viene estratto mediante trattamento con solventi organici. La catena polipeptidica rimanente presenterà ora all'estremità ammino terminale il secondo amminoacido della catena polipeptidica iniziale. Ripetendo il ciclo si possono identificare i successivi amminoacidi; mediante specializzati moderni sequenziatori si possono sequenziare fino a 50 residui in modo del tutto automatico.

4.14 Analisi *in silico*

L'analisi *in silico* è stata utilizzata per determinare la probabilità antimicrobica delle molecole purificate. Sono stati utilizzati tre siti di predizione per la determinazione del potere antimicrobico delle neurotossine purificate: The Antimicrobial Peptide Database, CAMP: Collection of Antimicrobial Peptides ed AMPA.

APD: The Antimicrobial Peptide Database è un sito di predizione basato su due indici caratteristici per la determinazione del potere antimicrobico: Wimley-White hydrophobicities e Boman Index (Wang and Wang, 2004).

Wimley-White hydrophobicities (Kcal/mol) è una scala di idrofobicità che definisce la relativa idrofobicità dei residui amminoacidici, più positivo è il valore di tale indice, più idrofobi sono gli amminoacidi situati in tale regione della proteina. Questa scala è comunemente usata per prevedere la alfa-eliche transmembrana di proteine di membrana (White and Wimley, 1999).

Il Boman Index (potenziale di legame delle proteine) è definito come la somma delle energie libere dei residui amminoacidici delle catene laterali diviso per il numero totale di residui amminoacidici. Un valore basso (≤ 1) indica che il peptide ha una più alta attività antibatterica senza molti effetti collaterali, mentre un valore più elevato (2,50-3,00) indica che il peptide è multifunzionale con attività simile agli ormoni (Boman, 2003).

CAMP:Collection of Antimicrobial Peptides utilizza un algoritmo di predizione, Support Vector Machine (SVM), incorporato nel database, che dà anche un punteggio di probabilità (0-1) per la predizione. Maggiore è la probabilità, maggiore è la possibilità che la predizione possa essere corretta (Shaini et al., 2009).

AMPA utilizza dei grafici che mostrano il profilo antimicrobico per la sequenza di entrata (s) e calcola la probabilità di trovare tratti di sequenza in proteine non antimicrobiche (Torrent et al., 2009; Torrent et al., 2012).

La possibilità di un allineamento (ClustalW2) per l'omologia di struttura è stata verificata utilizzando SWISS-MODEL.

L'analisi filogenetica è stata effettuata con il metodo Neighbor-Joining (NJ) analizzata con 1000 interazioni bootstrap con il software CLC workbench 6.4.

4.15 Analisi istologiche

4.15.1 Inclusione in paraffina e taglio delle sezioni

I campioni fissati in Bouin sono stati disidratati attraverso una serie crescente di concentrazioni di etanolo (35%-100%), poi trasferiti in metilbenzoato per due volte fino all'affondamento del campione. Infine i campioni sono stati inclusi in paraffina (MERCK) e dopo 24h sono state tagliate al microtomo sezioni di 6-7 μm , che sono state incubate a 37°C overnight.

4.15.2 Colorazione tricomatica di Mallory

Le sezioni ottenute al microtomo sono state deparaffinate in xilolo, reidratate attraverso una serie decrescente di concentrazioni di etanolo (100%-35%), sciacquate con acqua distillata e colorate con soluzione acquosa all'1% di fucsina acida (sciolta a caldo) per circa un minuto a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in acqua distillata, sono state decolorate velocemente in etanolo 95° contenente una goccia di olio di anilina, quindi, rilavate in acqua distillata e colorate per 30 minuti, a temperatura ambiente, in soluzione acquosa all'1% di acido fosfomolibdico (sciolta a

caldo); a questo punto è stato effettuato un ulteriore lavaggio con acqua distillata, prima di essere colorate con la soluzione Mallory (0,005 gr/ml di azzurro di anilina; 0,02 gr/ml di orange G; 0,02 gr/ml di acido ossalico) per 45 minuti a temperatura ambiente. Quindi, le sezioni sono state lavate in acqua distillata e deidratate in alcool etilico. I vetrini, infine, sono stati sigillati con EUKITT (Bioptica) per le osservazioni al microscopio.

4.15.3 Colorazione tricromica di Gomori

Le sezioni ottenute al microtomo sono state deparaffinate in xilolo, reidratate attraverso una serie decrescente di concentrazioni di etanolo (100%-35%), sciacquate con acqua distillata e colorate con emallume di Carazzi (per 200 ml: 10 g $KAl(SO_4)_2$, 0,2 g Ematossilina, 0,04 g KIO_3 , 40ml glicerina) per circa 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in acqua distillata, sono state colorate per circa 15 minuti con la soluzione tricromica di Gomori pH 3,4 (per 100 ml: 0,6 g Cromotropo 2R, 0,3 g Fast green FCF, 0,6 g acido fosfotungstico, 1 ml acido acetico) quindi, rilavate in acqua distillata e sciacquate in acqua acidulata (0,2% acido acetico). Le sezioni sono state lavate in acqua distillata e deidratate in alcool etilico. I vetrini, infine, sono stati sigillati con EUKITT (Bioptica) per le osservazioni al microscopio.

5. Risultati e Discussione

5.1 Inoculi

L'attività infiammatoria è stata esaminata in seguito all'inoculo di diverse sostanze, quali LPS di *Escherichia coli*, *Phenyl sepharose*, *DEAE cellulose*, eritrociti di coniglio ed una sospensione di batteri uccisi al calore dei ceppi *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio proteolyticus* e *Shigella putrefaciens* nel disco pedale di *Anemonia sulcata* (Fig. 13).



Fig. 13. Inoculo nel disco pedale di *Anemonia sulcata*

Dopo l'inoculo di LPS di *Escherichia coli*, *Phenyl sepharose* e *DEAE cellulose* non è stata evidenziata nessuna reazione mentre dopo l'inoculo di eritrociti di coniglio e delle sospensioni dei vari ceppi batterici uccisi al calore sono state osservate le reazioni a partire dalle 24h dall'inoculo. Tali reazioni mostravano un gonfiore crescente nella colonna del corpo e sulla base del piede, fino ad arrivare, in alcuni casi, alla comparsa di una zona di rigetto (Fig. 14). Le reazioni sono state seguite per otto giorni, in seguito la zona di rigetto diminuiva le sue dimensioni fino a scomparire completamente.

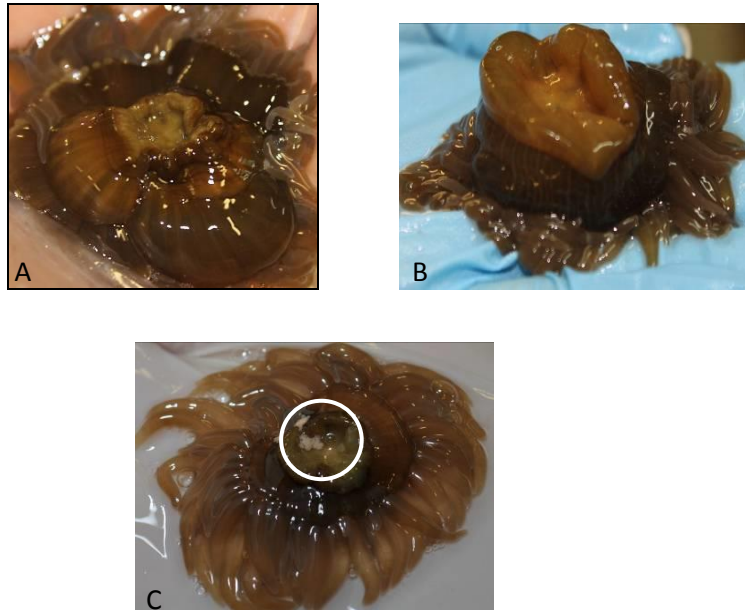


Fig. 14 Reazione di gonfiore (A e B) e comparsa della zona di rigetto (C) in *Anemonia sulcata* in seguito ad inoculi

Le maggiori risposte, caratterizzate dalla comparsa di una evidente area di rigetto, sono avvenute in seguito all'inoculo di *E. coli*, ed in maniera ridotta in seguito all'inoculo di *Vibrio alginolyticus*. L'inoculo di *Vibrio proteolyticus* non ha causato nessuna reazione mentre quello di *Shigella putrefaciens* ha provocato solamente la presenza di un gonfiore che è scomparso all'ottavo giorno dall'inoculo (Tabella 6).

Tab. 6 Tabella riassuntiva delle reazioni di *Anemonia sulcata* in seguito ad inoculo dei vari ceppi batterici. NR nessuna reazione; ○ livello di gonfiore, *area di rigetto. Gli individui controllo sono stati inoculati con Marine Solution e non hanno mostrato nessuna reazione.

INOCULI	Giorni e Reazioni					
	1°	2°	3°	4°	7°	8°
<i>LPS Escherichia coli</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Phenyl sepharose</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>DEAE cellulose</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Rabbit Red Blood Cells</i>	○○	○○	○○	○	○	○
<i>Escherichia coli</i>	○	○○	○*	**	**	**
<i>Vibrio alginolyticus</i>	○○	○	○	○○	○*	**
<i>Vibrio proteoliticus</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Shigella putrefaciens</i>	○	○	○○	○○	○	NR

Brown et al. (2013) hanno studiato la risposta di *Acropora millepora* al trattamento con batteri del ceppo *Vibrio coralliilyticus* e *Alteromonas sp.* Frammenti di corallo trattati con *V. coralliilyticus* apparivano in buona salute mentre frammenti trattati con *Alteromonas sp.* mostravano lesioni tissutali. Lo studio della risposta trascrizionale di due geni immunitari (il fattore del complemento C3 e una lectina di tipo C) e di un gene di risposta allo stress (hsp 70) ha mostrato che i profili trascrizionali di C3 e hsp70 aumentano e sono correlati con i segni della malattia nel trattamento con *Alteromonas sp.* L'espressione di hsp70 ha anche mostrato un aumento significativo nei coralli inoculati con *V. coralliilyticus* suggerendo che, anche in assenza di segni di malattia, l'inoculo microbico attivava una risposta allo stress. La lectina di tipo C non ha mostrato una risposta a nessuno dei trattamenti batterici.

5.2 Analisi elettroforetica

I campioni di corpo e tentacoli non inoculati ed inoculati con i diversi batteri sono stati inizialmente caratterizzati tramite analisi elettroforetica in condizioni non riducenti per evidenziare il pattern proteico e le eventuali variazioni in seguito alla stimolazione.

Negli estratti del corpo si osservano differenze tra gli individui non trattati e quelli trattati, vi è infatti, negli individui inoculati con i batteri, la comparsa di una banda a 100 kDa che risulta essere assente sia nell'estratto non inoculato che in quello inoculato con Marine Solution (Fig. 15).

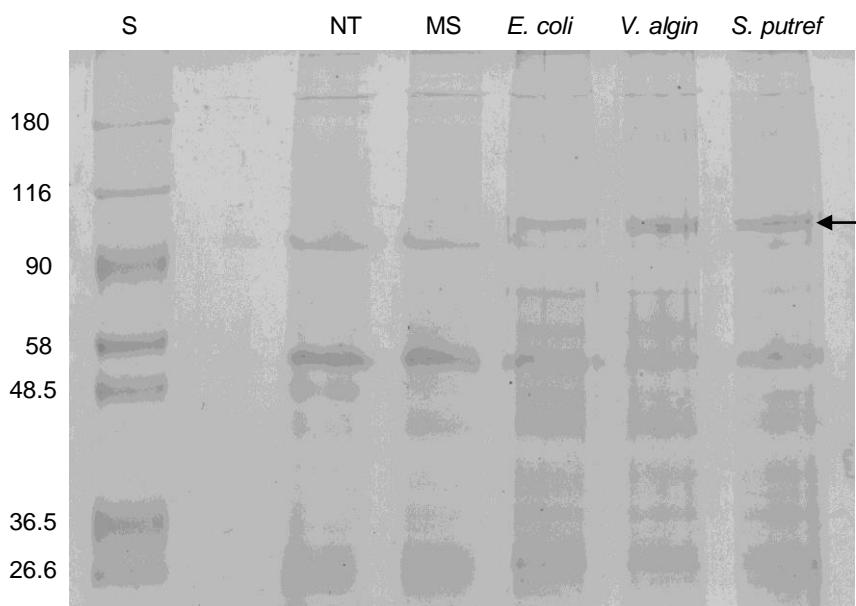


Fig. 15 SDS PAGE al 7,5% degli estratti non acidi del corpo di *Anemonia sulcata* Standard (lane 1), estratto non inoculato (lane 2), estratto inoculato con MS (lane 3), estratto inoculato con *E. coli* (lane 4), estratto inoculato con *V. alginolitycus* (lane 5) ed estratto inoculato con *S. putrefaciens* (lane 6)

Per quanto riguarda gli estratti tentacolari l'analisi elettroforetica non ha mostrato differenze di pattern proteici negli individui inoculati e non inoculati (Fig. 16).

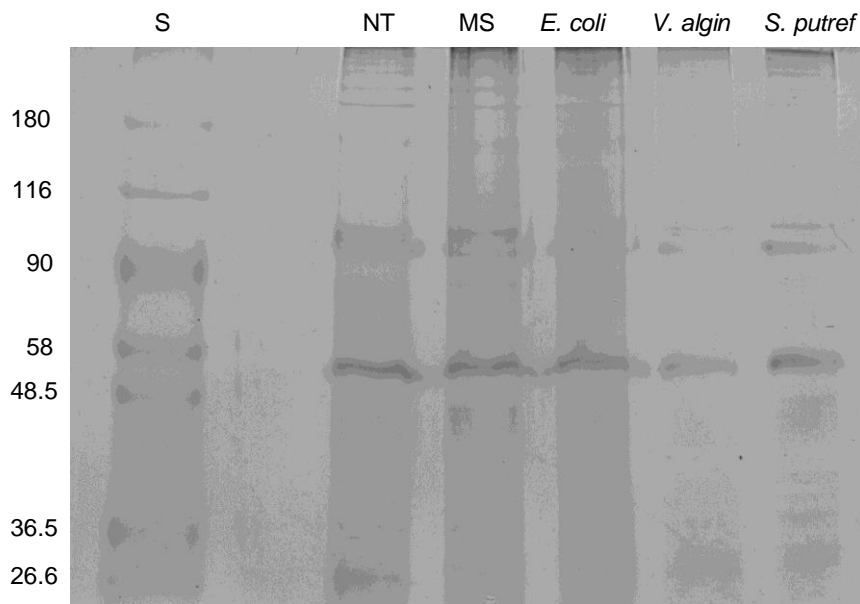


Fig. 16. SDS PAGE al 7,5% degli estratti non acidi dei tentacoli di *Anemonia sulcata*. Standard (lane 1), estratto non inoculato (lane 2), estratto inoculato con MS (lane 3), estratto inoculato con *E. coli* (lane 4), estratto inoculato con *V. alginolitycus* (lane 5) ed estratto inoculato con *S. putrefaciens* (lane 6)

5.3 Attività enzimatiche

5.3.1 Valutazione dell'attività proteasica

L'analisi SDS-PAGE con gelatina e fibrinogeno ed il trattamento dei gel per valutare l'attività proteasica colorati con blue di coomassie ha permesso di osservare il pattern proteasico degli estratti non acidi dei tentacoli e del corpo degli individui di *Anemonia sulcata* inoculati e non inoculati.

Le proteasi sono un gruppo di enzimi la cui funzione catalitica è quella di idrolizzare le proteine; vengono chiamati anche enzimi proteolitici o proteinasi.

Gli enzimi proteolitici sono molto importanti nella digestione, essi idrolizzano infatti i legami peptidici negli alimenti proteici per liberare gli aminoacidi necessari per il

corpo. Inoltre, gli enzimi proteolitici sono stati utilizzati per un lungo periodo di tempo in varie forme di terapia. Il loro uso in medicina è degno di nota in base a diversi studi clinici che indicano i loro benefici in oncologia, patologie infiammatorie, controllo e regolazione immunitaria. Le proteasi hanno anche la capacità di digerire i residui indesiderati nel sangue tra cui alcuni batteri e virus, risparmiando questo compito al sistema immunitario.

Le attività proteolitiche degli estratti del corpo e dei tentacoli non trattati ed inoculati con vari ceppi batterici, sono stati quindi studiati tramite zimogrammi utilizzando come substrato la gelatina ed il fibrinogeno.

Il profilo elettroforetico degli estratti non acidi del corpo ha messo in evidenza una forte attività gelatinolitica caratterizzata da un pattern di bande attive, suggerendo la presenza di varie forme molecolari dell'enzima nel range tra 200 e 40 kDa (Fig 15).

L'analisi densitometrica dei gel mostra una banda di 157 kDa più attiva nei campioni inoculati con batteri rispetto ai non inoculati ed ai campioni controllo ed una banda meno attiva di 43,5 kDa (Fig. 18); si osserva inoltre la presenza di una banda attiva di 109 kDa solo nel campione non trattato (Fig. 17). Aggiungendo 1,10-fenantrolina (inibitore delle metalloproteinasi ad ampio spettro), la maggior parte delle attività gelatinolitiche scomparivano, suggerendo che si tratta di enzimi simili alle metalloproteinasi (Dunn, 1989).

Il profilo elettroforetico degli estratti non acidi dei tentacoli mostra invece una bassissima attività nel campione non trattato che scompare completamente negli animali inoculati (Fig. 17).

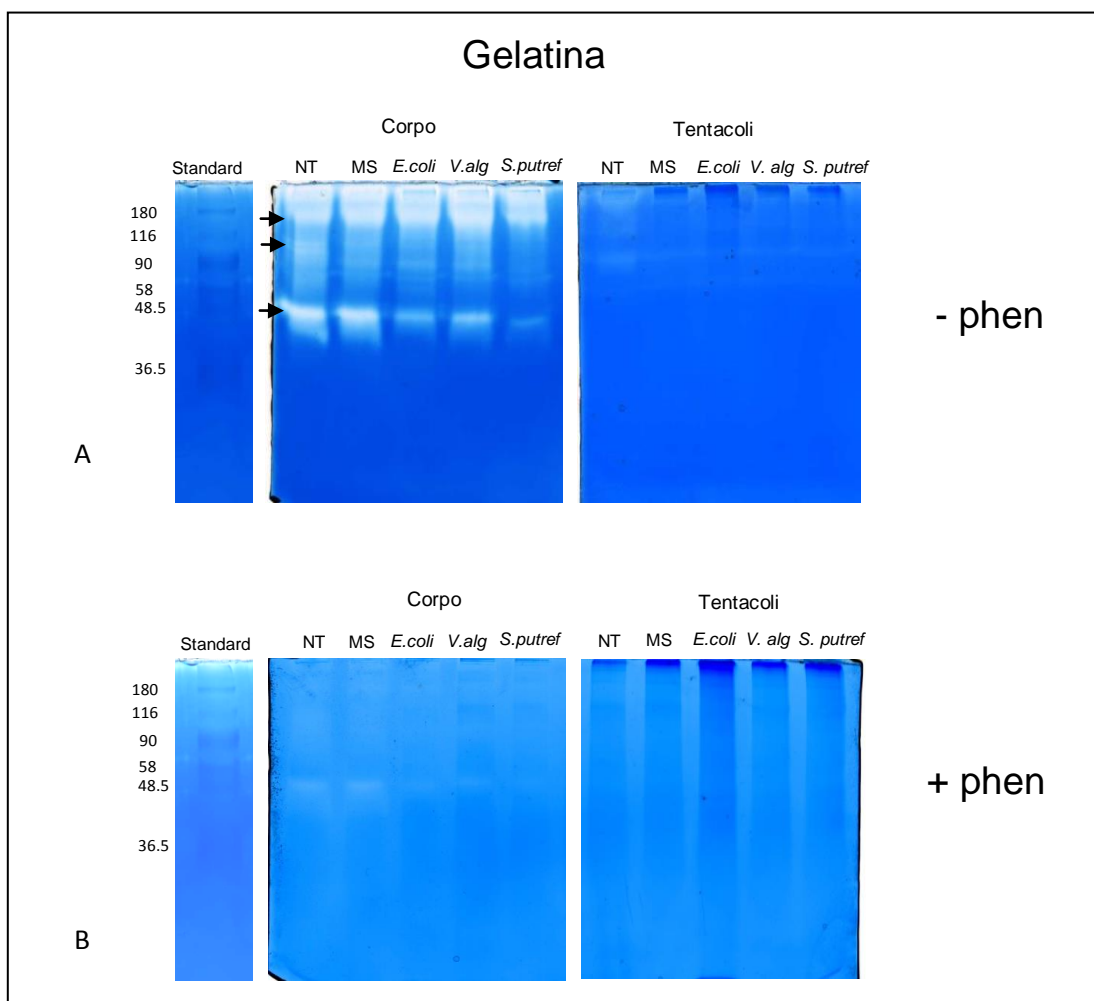


Fig.17 SDS PAGE al 7,5% con gelatina degli estratti non acidi del corpo e dei tentacoli di *Anemonia sulcata* (A) e degli estratti non acidi del corpo e dei tentacoli di *Anemonia sulcata* trattati con 1-10 fenantrolina (B)

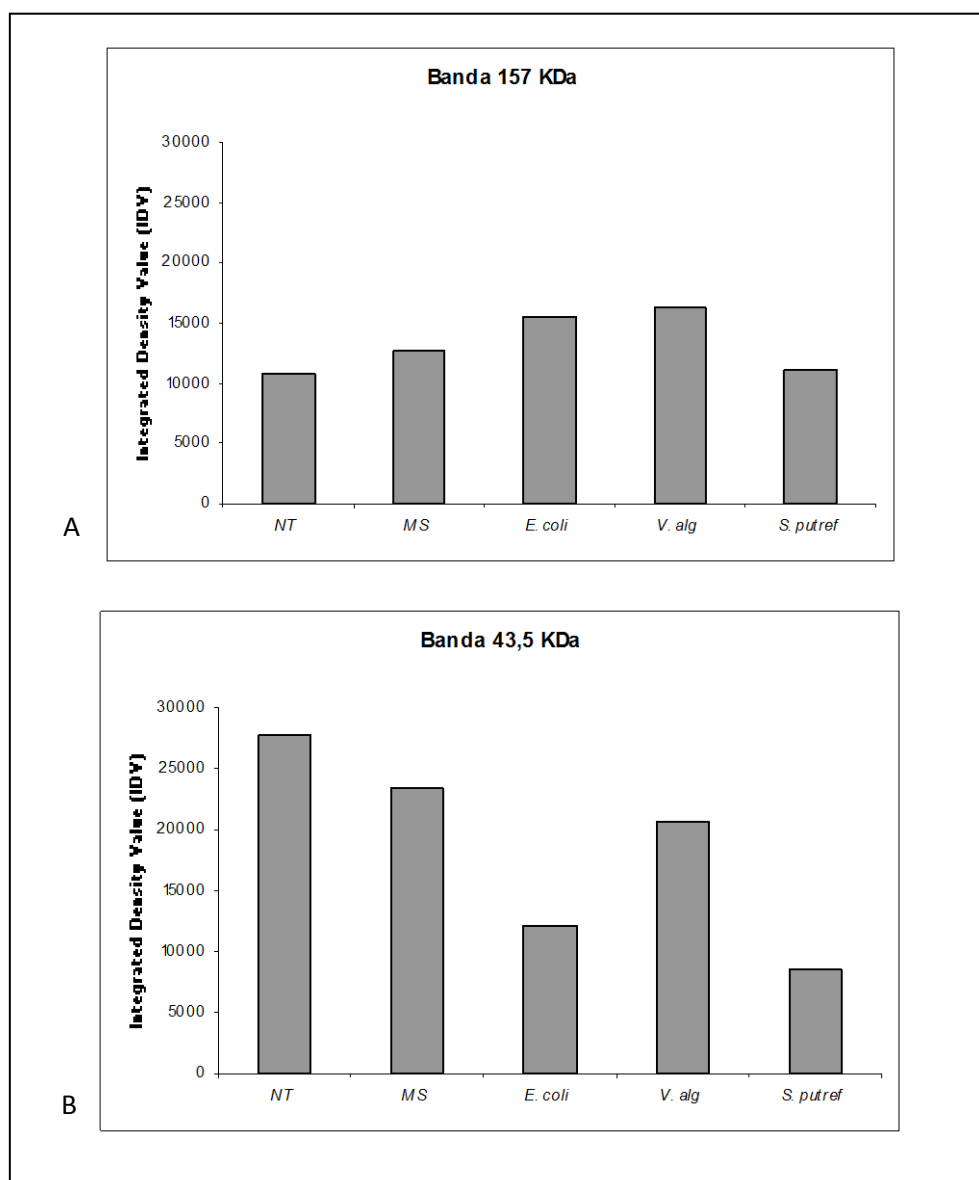


Fig.18 Analisi densitometrica tramite AlphaEaseFC delle bande con attività gelatinolitica di 157 kDa (A) e di 43,5 kDa (B) degli estratti non acidi del corpo di *Anemonia sulcata*

Anche l'attività fibrinolitica è stata rilevata negli estratti del corpo evidenziando una maggiore espressione negli estratti non inoculati ed in quelli inoculati con Marine Solution rispetto a quelli inoculati con i batteri; i gel mostrano infatti la scomparsa della banda di 200 kDa negli animali inoculati rispetto ai non trattati ed una diminuzione dell'attività fibrinolitica in tutto il pattern proteico come conferma

l'analisi densitometrica (Fig. 20). L'aggiunta di 1,10- fenantrolina determina anche in questo caso la scomparsa delle bande (Fig. 19).

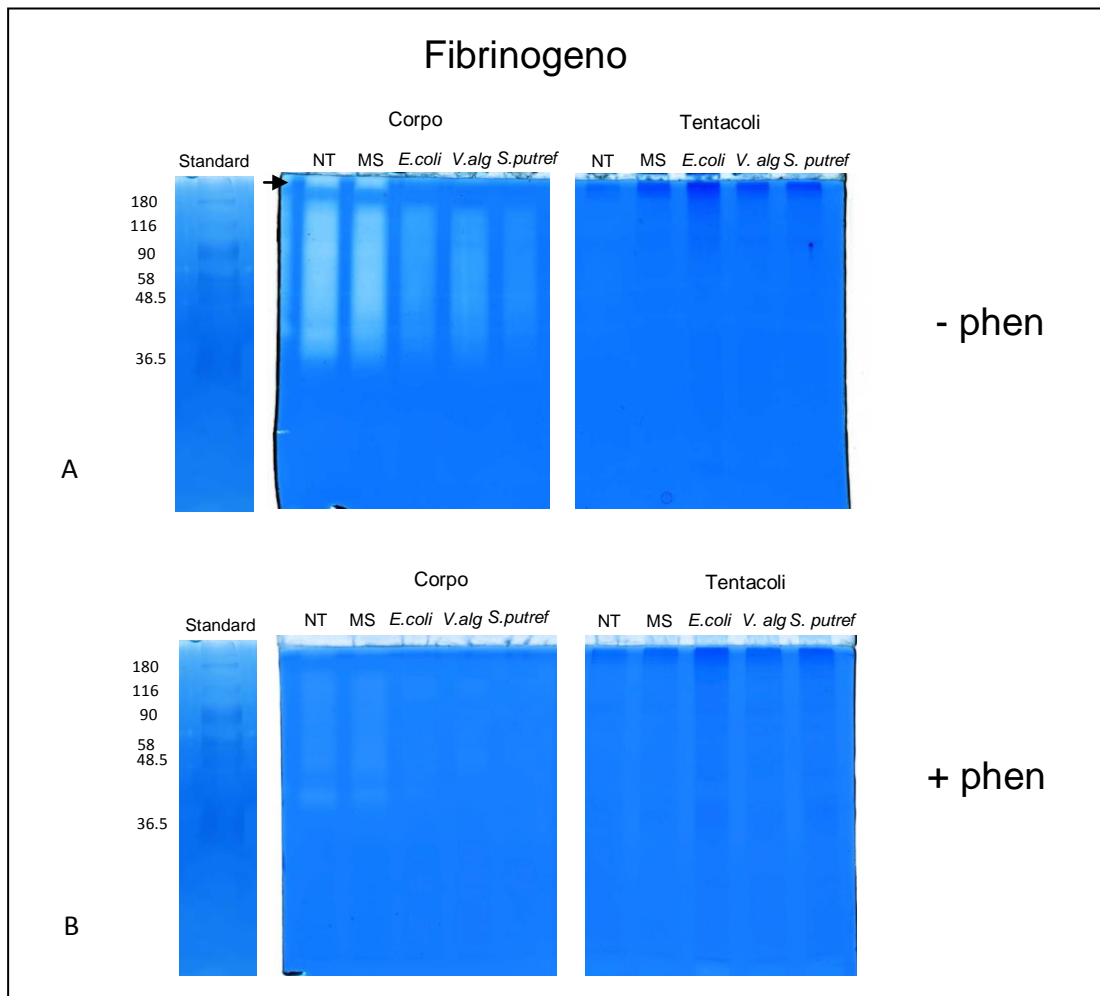


Fig. 19 SDS PAGE al 7,5% con fibrinogeno degli estratti non acidi del corpo e dei tentacoli di *Anemonia sulcata* (A) e degli estratti non acidi del corpo e dei tentacoli di *Anemonia sulcata* trattati con 1-10 fenantrolina (B)

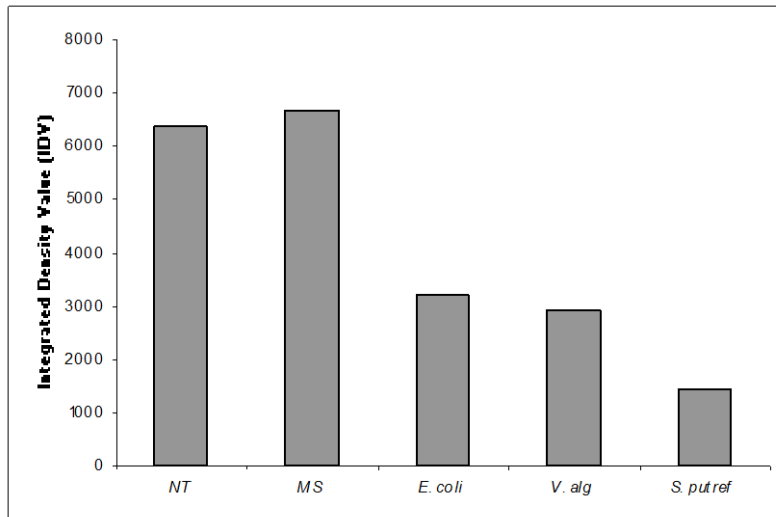


Fig.20 Analisi densitometrica tramite AlphaEaseFC delle bande con attività fibrinolitica degli estratti non acidi del corpo di *Anemonia sulcata*

Lee et al., (2011) hanno studiato comparativamente le attività enzimatiche nei veleni di quattro specie di meduse; questi veleni hanno mostrato attività gelatinolitica, caseinolitica e fibrinolitica. La citotossicità del veleno di queste meduse mostrava una correlazione positiva con la sua complessiva attività proteolitica. Le metalloproteinasi sembrano svolgere infatti un ruolo importante nell'induzione della tossicità del veleno di meduse.

Gli enzimi proteolitici rappresentano uno dei maggiori contributi delle tossine nel veleno, inducendo diversi effetti tossicologici, tra cui emorragia, edema e necrosi (Takeya et al.,1990). I danni tissutali locali mediati dalle proteasi coinvolgono la degradazione della matrice extracellulare e del tessuto connettivo circostante ai vasi sanguigni (Dunn, 1989).

5.3.2 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina

Gli estratti del corpo e dei tentacoli di *Anemonia sulcata* sono stati saggiati per valutare l'attività della fosfatasi alcalina sia nei campioni non trattati che in quelli inoculati con diversi ceppi batterici. L'analisi statistica dei dati ha messo in evidenza una presenza maggiore dell'enzima nei tentacoli rispetto al corpo.

La fosfatasi alcalina è un enzima appartenente alla famiglia delle fosfatasi, in grado di rimuovere un gruppo fosfato da una molecola mediante una reazione denominata defosforilazione.

Le fosfatasi sono enzimi idrolitici che intervengono insieme al processo di fagocitosi ed alla produzione di fattori umorali, nella risposta immunitaria degli invertebrati.

Negli estratti del corpo ci sono leggere variazioni dell'attività fosfataseica nei campioni inoculati rispetto al non trattato (animali non inoculati) ed al controllo (animali inoculati con Marine Solution) mentre negli estratti tentacolari vi è un forte aumento dell'attività nei campioni inoculati con *E. coli* e piccole variazioni nei campioni inoculati con gli altri ceppi batterici (Fig 21).

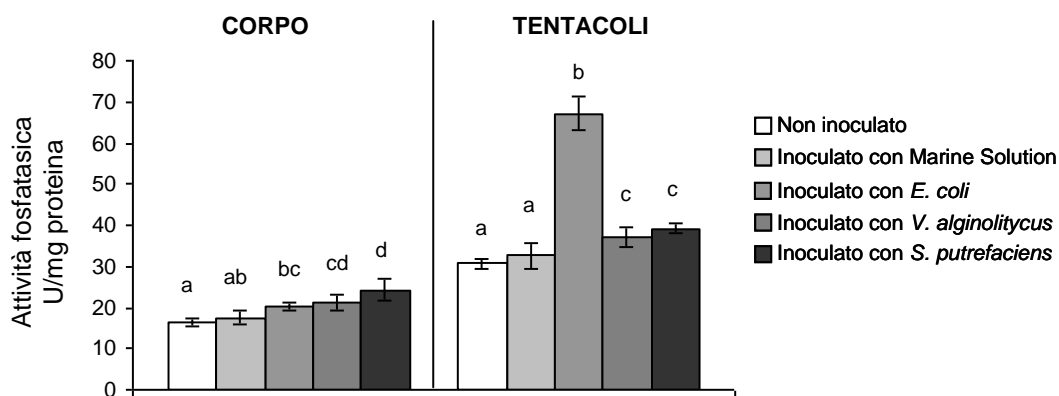


Fig. 21 Analisi comparativa dell'attività fosfataseica nel corpo e nei tentacoli di *Anemonia sulcata* e tra campioni inoculati e non inoculati. le linee rappresentano la media \pm deviazione standard. Le lettere indicano le differenze significative tra organismi inoculati e non inoculati ($p \leq 0.05$)

In Hydra le fosfatasi sono state descritte come marcatori di rigenerazione, infatti in seguito allo studio degli effetti *in vivo* di kellethin A, un composto naturale isolato dalla gasteropode marino *Buccinulum corneum*, è stato osservato un marcato incremento del numero di tentacoli rigenerati (ATN), l'aumento della transdifferenziazione di cellule epiteliali e la differenziazione di nematociti, correlati ai cambiamenti dei livelli della fosfatasi acida ed alcalina (De Petrocellis et al., 1999).

5.3.3 Valutazione dell'attività della esterasi

Gli estratti del corpo e dei tentacoli di *Anemonia sulcata* sono stati inoltre saggiati per valutare l'attività esterasica sia nei campioni non trattati che in quelli inoculati con diversi ceppi batterici. L'analisi statistica dei dati ha messo in evidenza una presenza maggiore dell'enzima nel corpo rispetto ai tentacoli.

Gli estratti del corpo non trattati e quelli controllo presentano la più bassa attività esterasica che aumenta negli animali inoculati con *S. putrefaciens* e raggiunge la massima espressione negli animali inoculati con *V. alginolitycus* ed *E. coli*. Una situazione analoga si riscontra negli estratti tentacolari dove anche in questo caso, il non trattato ed il controllo presentano la più bassa attività che aumenta negli animali inoculati con *V. alginolitycus* e *S. putrefaciens* e raggiunge la massima espressione negli animali inoculati con *E. coli* (Fig. 22).

Sia nel corpo che nei tentacoli, quindi, l'inoculo di *E. coli* determina la più alta variazione dell'attività dell'enzima esterasi, risultato che è in accordo con l'analisi dell'attività fosfataseica e con lo sviluppo della zona di rigetto nello studio dell'infiammazione.

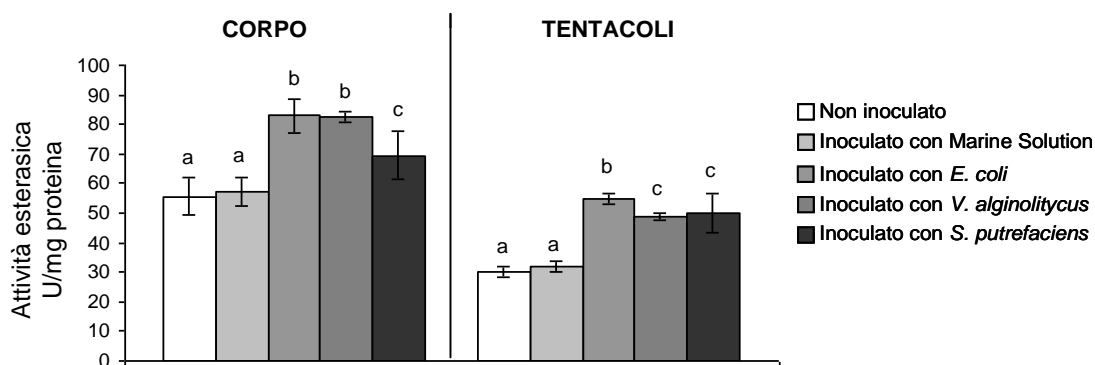


Fig. 22 Analisi comparativa dell'attività esterasica nel corpo e nei tentacoli di *Anemonia sulcata* e tra campioni inoculati e non inoculati. le linee rappresentano la media \pm deviazione standard. Le lettere indicano le differenze significative tra organismi inoculati e non inoculati ($p \leq 0.05$)

Una esterasi è un idrolasi che scinde un estere in un acido e un alcool attraverso una reazione chimica con l'acqua chiamata idrolisi. Esiste una vasta gamma di differenti esterasi che differiscono nella loro specificità di substrato, la loro struttura proteica e la loro funzione biologica.

Lo studio delle esterasi in *A. equina* ha rivelato che questi enzimi sono forme anfifiliche con domini idrofobici che potrebbero essere debolmente attaccate alla membrana cellulare attraverso interazioni ionica o mediante domini idrofobici (Talesa et al., 1996).

5.4 Analisi istologiche

5.4.1 Colorazione tricomatica di Gomori

L'analisi istologica del corpo di *Anemonia sulcata* ha permesso di effettuare una analisi preliminare sulla caratterizzazione dei tessuti presenti in questo animale

tramite la colorazione tricromica di Gomori. Questa colorazione permette di mettere in evidenza una colorazione differente dei tessuti infatti, l'ectoderma si colora di viola scuro, la mesoglea di grigio-azzurro e l'endoderma di viola chiaro (Fig.23).

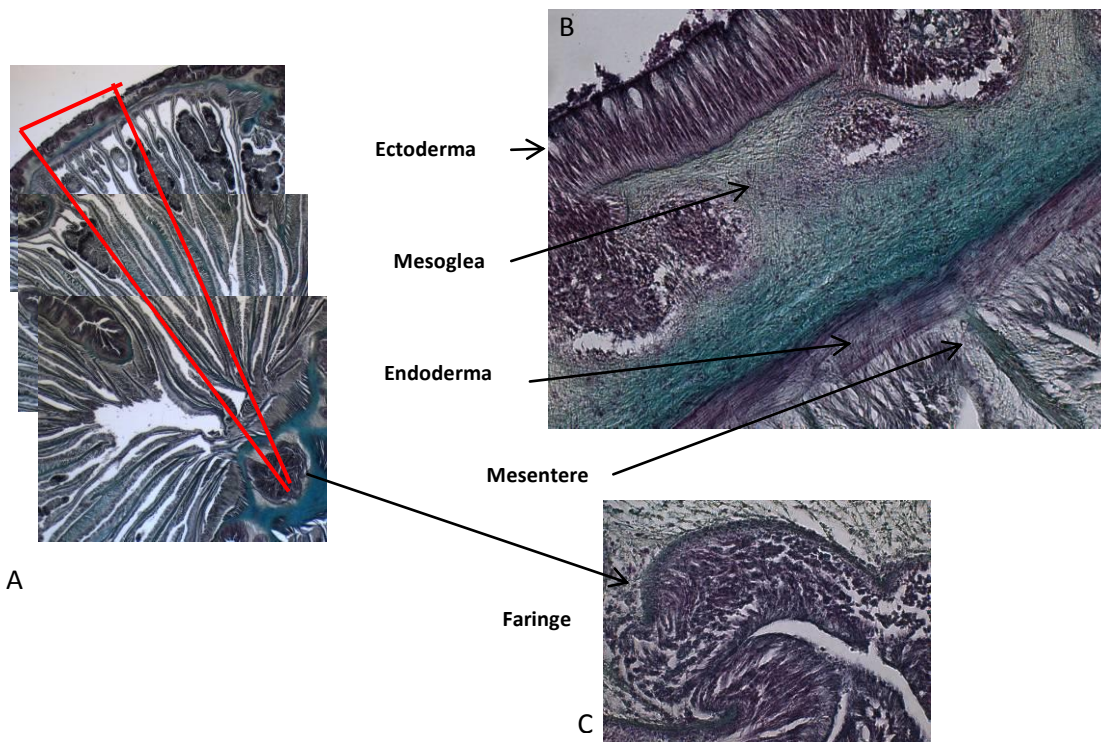


Fig.23 Sezione del corpo di *Anemonia sulcata* colorata con la tricromia di Gomori (A) e diversi ingrandimenti (B e C)

E' stata effettuata anche l'analisi istologica degli animali inoculati con *E. coli* che mostravano una zona di rigetto ben definita (Fig. 24).

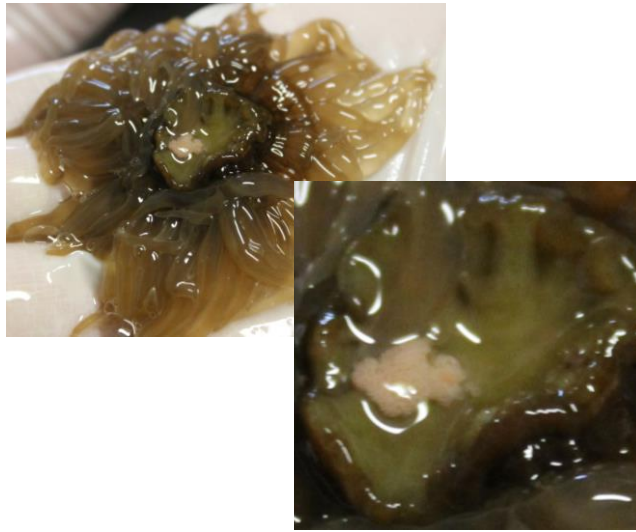


Fig. 24 Comparsa della zona di rigetto in Anemonia sulcata inoculata con E. coli

L'osservazione di questa zona inizialmente tramite microscopia ottica (Fig 25A) e successivamente mediante analisi istologica (Fig 25B e C) ha mostrato la presenza di filamenti mesenterici ed ovociti all'interno dei mesenterici facendo ipotizzare un'estrusione del materiale danneggiato da parte dell'animale probabilmente dai pori di estrusione delle aconzie presenti nel disco pedale.

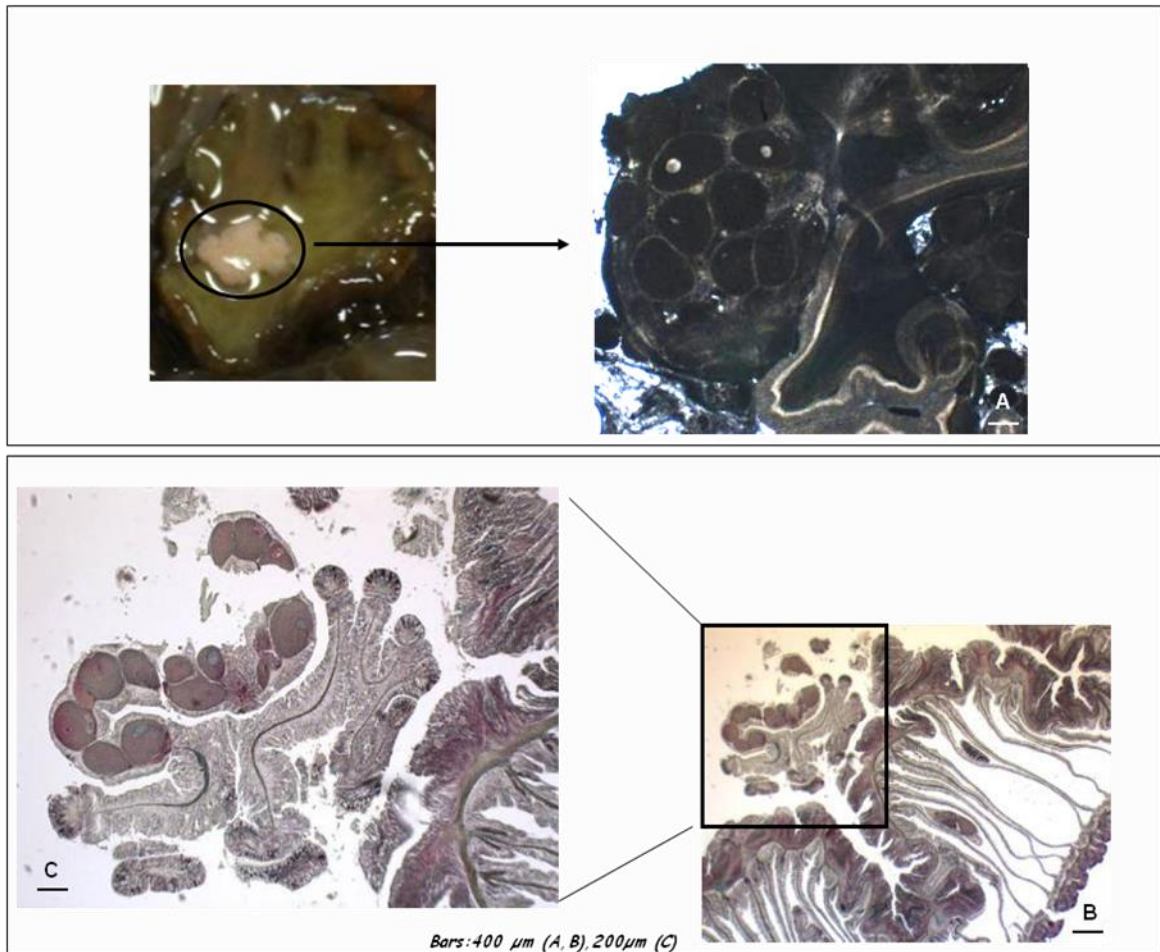


Fig.25 A Osservazione in vivo mediante microscopia ottica della zona di rigetto del corpo di *Anemonia sulcata* inoculata con *E. coli*; B sezione trasversale del corpo di *Anemonia sulcata* inoculata con *E. coli* colorata con la tricromia di Gomori; C. ingrandimenti della zona di rigetto.

In tutti gli animali inoculati la zona di rigetto diminuisce le sue dimensioni nel tempo fino a scomparire completamente.

La guarigione delle lesioni è una risposta fondamentale dei metazoi ed è stata caratterizzata a livello cellulare per una varietà di cnidari quali coralli molli (Meszaros e Bigger, 1999), anemoni (Young, 1974; Patterson e Landolt, 1979), e per *Hydra* (Tardent, 1963). Nei coralli molli e anemoni, caratterizzati da una mesoglea spessa, la guarigione è in genere caratterizzata da un gonfiore della mesoglea

accompagnato da prominenti infiltrazioni cellulari dalla mesoglea stessa al sito di lesione e la riepitelizzazione dal bordo della lesione (Work e Aeby, 2010).

Nell'anemone *Anthopleura elegantissima* infiltrazioni cellulari sono evidenti a 48 h dalla lesione. Entro le 72 ore, viene formata una zona di riparazione contenente distintamente cellule morfologicamente atipiche adatte per la produzione e la secrezione di sostanze sconosciute (Patterson e Landolt, 1979).

Nel corallo molle *Plexaurella fusifera*, la riepitelizzazione di ferite aperte si è verificata un giorno dopo la lesione ed è stata seguita da un fronte assiale di amebociti e zooxantelle che migrano al sito della ferita e si diffondono radialmente per incontrarsi con le cellule epiteliali periferiche; gli amebociti possono essere responsabili dell'estrusione delle fibre connettivali della mesoglea necessari per la rigenerazione dei tessuti e le zooxantelle possono fornire l'energia per la riparazione (Meszaros e Bigger, 1999).

In contrasto, il corallo *Montipora capitata* mostra poco o nessuna risposta infiammatoria o migrazione di cellule della mesoglea al sito di lesioni, probabilmente in parte perché la mesoglea in questa specie è molto sottile, ed i minuscoli amebociti possono essere difficili da rilevare (Vargas - Ángel et al., 2007).

5.5 Purificazioni e valutazione dell'attività antibatterica

5.5.1 Attività antibatterica dei prodotti della SEP PAK

Le frazioni al 10, 40 e 80% di acetonitrile dei due comparti tissutali ottenute tramite SEP PAK sono state saggiate per valutarne l'attività antibatterica. Preliminarmente è stata determinata la concentrazione proteica delle stesse frazioni, che ha evidenziato una maggiore quantità di proteine nella frazione al 40% rispetto alla frazione al 10% ed una quantità proteica minima nella frazione all'80% (Tab. 7).

Tab. 7 Concentrazioni proteiche delle diverse frazioni di acetonitrile per corpo e tentacoli

	10%	40%	80%
Tentacoli mg/ml	0,98	7,83	0,2
Corpo mg/ml	1,29	3,49	0,13

Le frazioni sono state saggiate verso differenti ceppi batterici (*Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli*, *Vibrio proteoliticus* e *Staphylococcus aureus*), evidenziando un'attività antibatterica specifica solamente verso *Micrococcus lysodeikticus*. Sia per i campioni riguardanti i tentacoli ed il corpo l'attività è stata riscontrata solamente nella frazione al 40% di acetonitrile; per i tentacoli inoltre, è stata evidenziata una notevole attività fino alle diluizione di 1/10 (Fig. 26).

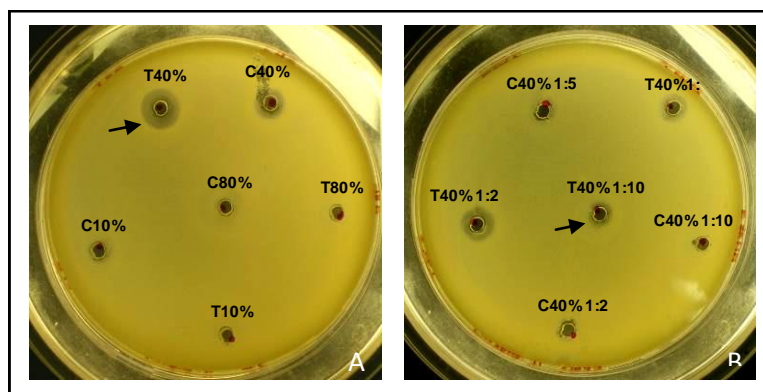


Fig. 26 Saggio antibatterico delle frazioni al 10, 40 e 80% di acetonitrile di corpo e tentacoli di *Anemonia sulcata* (A) e delle stesse frazioni diluite 1:2, 1:5 ed 1:10 (B) verso *Micrococcus lysodeikticus*.

5.5.2 Confronto tra l'attività degli antibiotici e quella delle frazioni antibatteriche

Per caratterizzare le molecole antibatteriche presenti nelle frazioni al 40% di acetonitrile dei tentacoli e del corpo di *Anemonia sulcata*, sono state determinate le attività antibatteriche di diversi antibiotici verso *Micrococcus lysodeikticus* mediante delle diluizioni degli antibiotici stessi (Fig. 27).

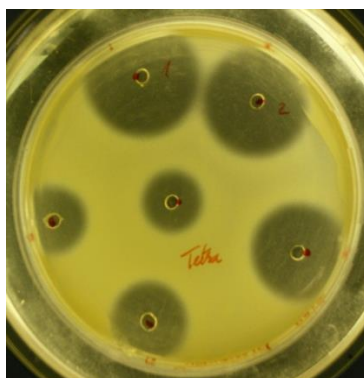


Fig. 27 Saggio antibatterico delle diluizioni della Tetraciclina verso *Micrococcus lysodeikticus*.

Comparando il diametro dell'alone di inibizione dei campioni e degli antibiotici è possibile valutare similitudini e differenze tra gli stessi. Dai dati raccolti emerge soprattutto che l'attività del corpo e dei tentacoli è paragonabile a quella della tetraciclina alle più basse concentrazioni (Tab. 8 - 9).

Tab. 8 Comparazione dell'alone di lisi tra gli antibiotici e la frazione al 40% di acetonitrile dei tentacoli

Antibiotico	Classe	Specificità	<i>M. lysodeikticus</i> ng/ml
Kanamicina	aminoglicoside	Gram + Gram -	0,400
Streptomicina	aminoglicoside	Gram + Gram -	0,200
Ampicillina	<u>β-lattamici</u>	Gram + Gram-	0,022
Spectinomocina	aminociclitolo	Gram -	0,5
Tetraciclina	tetracicine	Gram + Gram -	0,015

Tab. 9 Comparazione dell'alone di lisi tra gli antibiotici e la frazione al 40% di acetonitrile del **corpo**

Antibiotico	Classe	Specificità	<i>M. lysodeikticus</i> ng/ml
Kanamicina	aminoglicosidi	Gram + Gram -	0,234
Streptomicina	aminoglicoside	Gram + Gram -	0,156
Ampicillina	<u>β-lattamici</u>	Gram + Gram-	0,015
Spectinomicina	aminociclitolo	Gram –	0,25
Tetraciclina	tetracicine	Gram + Gram -	0,011

5.5.3 Valutazione dell'attività batteriostatica (MIC) e battericida (MBC)

In seguito ai saggi dei campioni su piastra a 96 pozzetti verso *Micrococcus lysodeikticus* e successiva incubazione nel microplate reader TECAN per 16 ore alla temperatura di 37°C, i dati ottenuti mostrano una attività antibatterica fino alla concentrazione di 0,244 mg/ml per i tentacoli ed una attività antibatterica fino alla concentrazione di 0,436 mg/ml per il corpo, evidenziando una maggiore potenza dell'estratto tentacolare rispetto al corpo (Fig. 28-29). Alle concentrazioni più basse si ha una crescita batterica esponenziale confermata anche dai successivi test degli stessi campioni su capsule Petri. Infatti, la capsula Petri con il contenuto del primo pozzetto in cui si evidenziava la crescita batterica presentava una quantità di colonie batteriche impossibili da contare, mentre le capsule seminate con i pozzetti precedenti mostravano un'assenza di batteri.

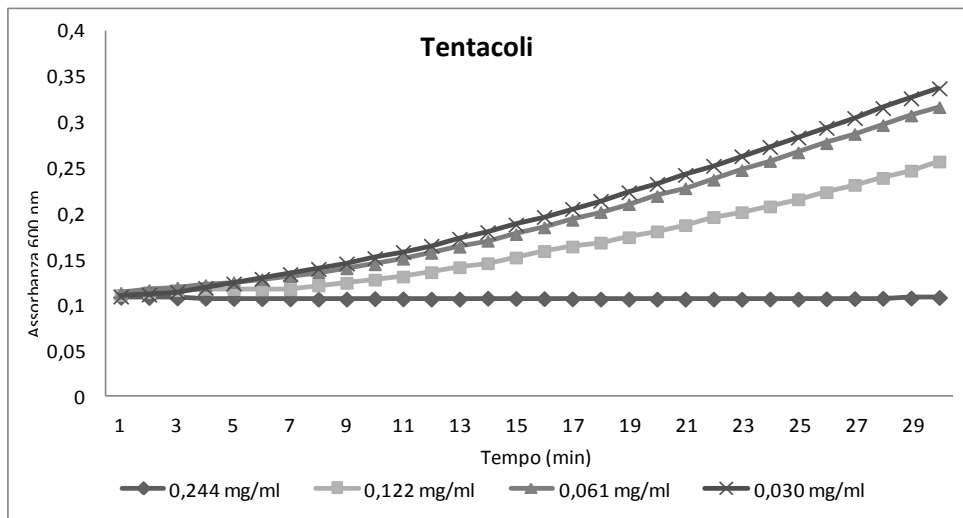


Fig. 28 Grafico sulla concentrazione minima di inibizione della frazione al 40% di acetonitrile dei tentacoli di *Anemonia sulcata* verso *Micrococcus lysodeikticus*. I risultati ottenuti mostrano attività antibatterica fino alla concentrazione di 0,244 mg/ml.

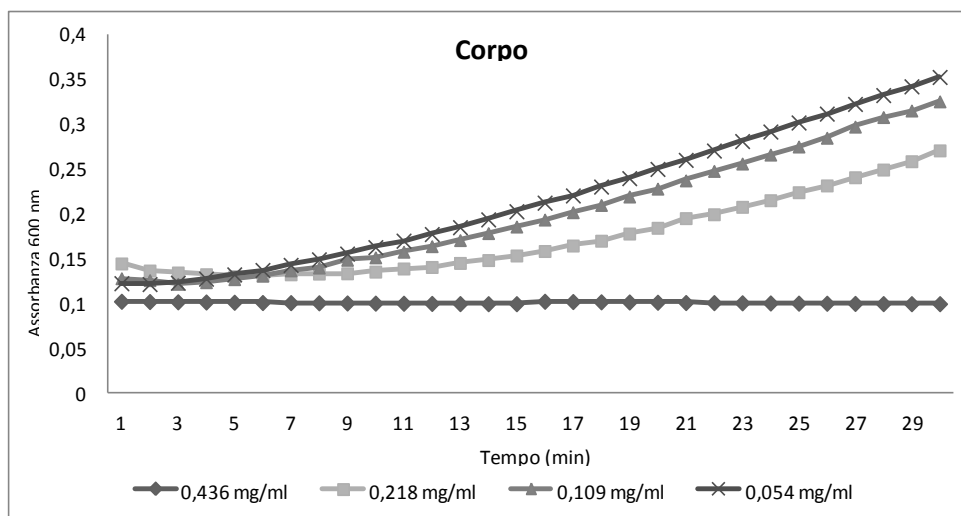


Fig. 29 Grafico sulla concentrazione minima di inibizione della frazione al 40% di acetonitrile del corpo di *Anemonia sulcata* verso *Micrococcus lysodeikticus*. I risultati ottenuti mostrano attività antibatterica fino alla concentrazione di 0,436 mg/ml.

5.5.4 Cromatografia in fase inversa

In seguito all'analisi della frazione al 40% di ACN dei tentacoli di *Anemonia sulcata* tramite cromatografia a fase inversa ed un gradiente di acetonitrile da 0 a 60, è stato ottenuto il profilo di separazione. Dai grafici si evidenziano una serie di picchi confluenti a partire da 30 minuti dall'immissione dei campioni; tutti i picchi sono stati raccolti e saggiati verso *Micrococcus lysodeikticus* per cercare di individuare i potenziali fattori antimicrobici. I saggi mostrano una elevata attività antibatterica nei picchi raccolti tra 32 e 46 minuti denominate frazione 1,2, 3, 4, 5 e 6 (Fig. 30).

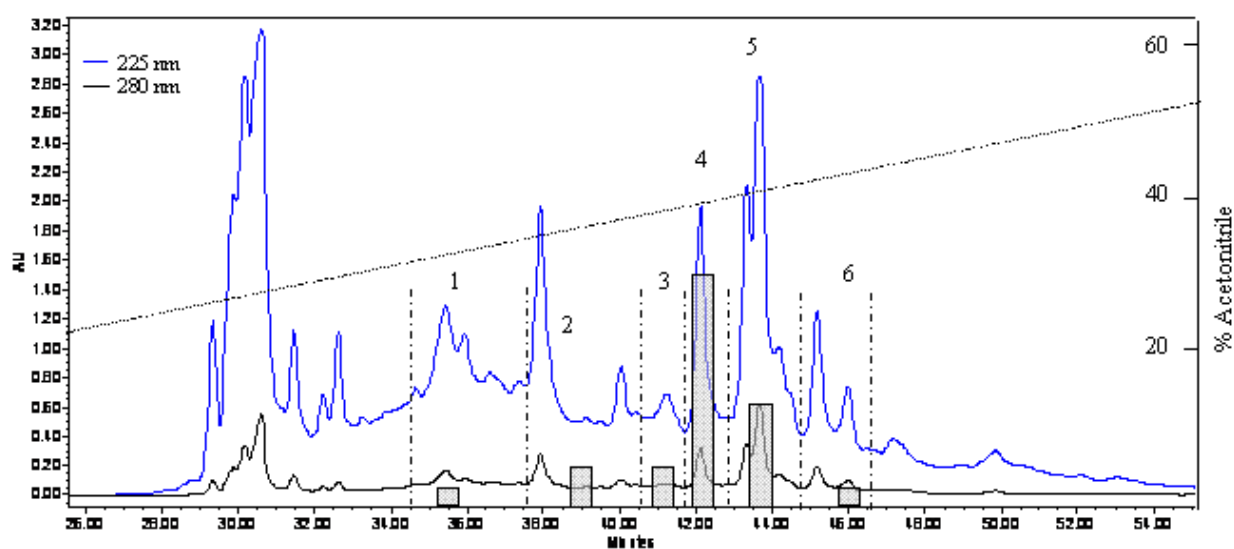


Fig. 30 Profili di separazione della frazione al 40% ACN dei tentacoli di *Anemonia sulcata* ottenuti tramite cromatografia a fase inversa con un gradiente di acetonitrile da 0 a 60%. Gli istogrammi mostrano l'attività antibatterica dei picchi verso *Micrococcus lysodeikticus*

Tutte le frazioni che mostrano un'elevata attività antibatterica sono state ulteriormente purificate tramite cromatografia a fase inversa con un gradiente di acetonitrile dal 20 al 60%.

Le frazioni 1, 2 e 3 ulteriormente purificate non mostrano picchi considerevoli, mentre le frazioni 4 e 5 mostrano diversi picchi ed in entrambe le frazioni vi è un picco con attività antimicrobica specifica verso *Micrococcus lysodeikticus* (Fig. 31).

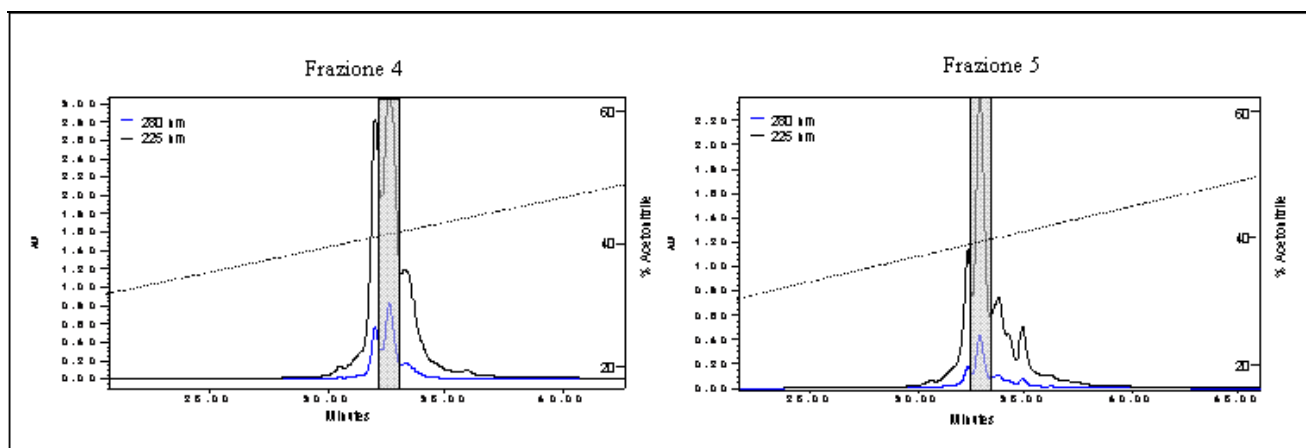


Fig. 31 Profili di separazione della frazione 4 e della frazione 5 dei tentacoli di *Anemonia sulcata* ottenuti tramite cromatografia a fase inversa con un gradiente di aceto nitrile da 20 a 60%. Gli istogrammi mostrano i picchi attivi verso *Micrococcus lysodeikticus*

5.5.5 Analisi spettrometrica di massa e sequenziamento

Il picco della frazione 5, che è risultato essere quello più puro, è stato analizzato tramite spettrometria di massa e successivo sequenziamento.

L'analisi allo spettrometro di massa ha evidenziato la presenza di due peptidi, il primo dal peso molecolare di 4.947,4 Da presente in maniera preponderante ed il secondo, presente in tracce, dal peso molecolare di 4.794,2 Da (Fig. 32).

Fig. 30 Profili di separazione della frazione al 40% ACN dei tentacoli di Anemonia sulcata ottenuti tramite cromatografia a fase inversa con un gradiente di acetonitrile da 0 a 60%. Gli istogrammi mostrano l'attività antibatterica dei picchi verso Micrococcus lysodeikticus

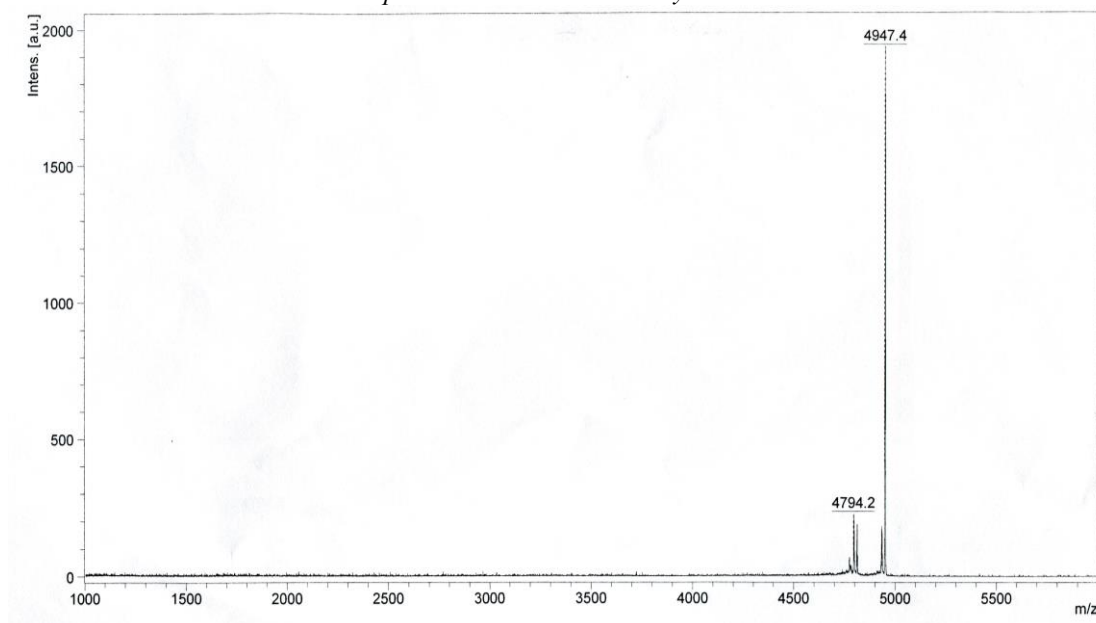


Fig.32 Analisi spettrometrica della frazione 5 dei tentacoli di Anemonia sulcata

Il sequenziamento mediante il metodo di Edman ha rilevato la presenza di due neurotossine: Neurotoxin 2 (ATX-II) (Wunderer et al., 1976) specifica per i canali sodici dal peso molecolare di 4941 Da costituente la parte fondamentale del picco ed una piccola contaminazione di una neurotossina Blood depressing substance (BDS II) (Doppelfeld et al., 1985; Diochot et al., 1998) specifica per i canali potassio dal PM di 4782 Da (Fig.33). Questi risultati sono in accordo con i risultati della spettrometria di massa.

Depôt Royal sur les 15 pil du peptide - Cart A

RDCH_5_4 22.05.2013

RESIDUS	A.A.	RES.	A.A.	RES.	A.A.	RES.	A.A.
1	G A	16	N W	31	N W	46	- (K)
2	I K N	17	T E	32	H (N W)	47	- (R)
3	F	18	L F	33	S N H	48	-
4	Q	19	S R	34	K G	49	-
5	L P	20	G	35	K W	50	
6	- G	21	I T	36	K E	51	
7	D P K I	22	I (N W)	37	N H	52	
8	S G	23	W E	38	G H I	53	
9	D K W	24	L E	39	G (P)	54	
10	G B	25	A G	40	P T (N W)	55	
11	P (D) V R	26	G Y	41	S T	56	
12	S R N	27	Q G	42	Y (N W)	57	
13	V G W	28	P Y	43	- W	58	
14	R D F	29	S T	44	- (G)	59	
15	G L	30	G S	45	- (G)	60	

** Acide Aminé majoritaire
* Acide Aminé minoritaire

Remarques :



 Neurotoxin 2 d'Anemonia sulcata (P01528) - Le résidu 41 est le I m'a pas pu être identifié
 Antihypertensive protein BDS-2 d'Anemonia sulcata (P59084) - Le résidu 43 est le H m'a pas pu être identifié
 Version du 15/03/2013

Fig.33 Sequenziamento mediante il metodo di Edman della frazione 5 dei tentacoli di Anemonia sulcata

Le neurotossine interferiscono con la normale trasmissione di impulsi nervosi influenzando l'apertura o la chiusura dei canali ionici.

La neurotossina ATX II è una tossina specifica per i canali sodici di tipo 1 ed è costituita da 47 residui aminoacidici (Fig. 34) collegati da tre ponti disolfuro. ATX II si lega specificamente al canale del sodio (sito 3), ritardando così la sua inattivazione

durante la trasduzione del segnale; ha un forte effetto nei crostacei e insetti e un effetto più debole nei mammiferi.

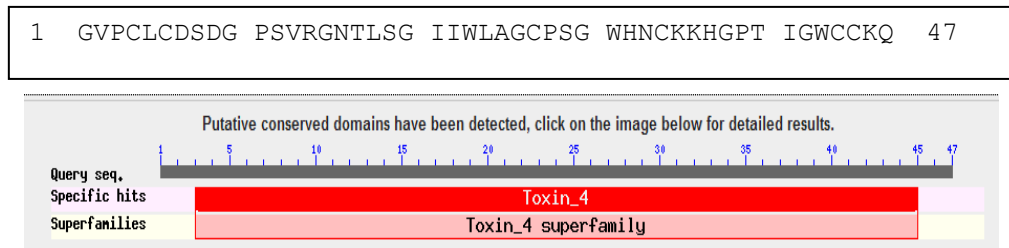


Fig. 34 Sequenza aminoacidica di ATX II (P01528)

I primi rappresentanti delle proteine leganti i canali sodici sono stati isolati nel 1970 e da tutte le tossine degli anemoni di mare studiati; queste tossine specifiche per i canali del sodio sono state studiate a fondo anche perché costituiscono una frazione importante del veleno (Moran et al., 2009).

Si conoscono più di cinquanta tossine specifiche per i canali sodici classificate sulla base della sequenza aminoacidica (Homma e Shiomi, 2006). Le tipologie 1 e 2 sono composte da un numero di residui aminoacidici compreso tra 46 e 49, la tipologia 3 è invece caratterizzata da catene polipeptidiche che vanno da un minimo di 27 ad un massimo di 32 residui aminoacidi (Homma e Shiomi, 2005). A parte questi gruppi, c'è un altro tipo di tossine, classificate come "altri", che assomigliano al tipo I e II nella lunghezza della lunga catena lunghezza e nel numero di ponti disolfuro, ma non nella sequenza aminoacidica ed agiscono sui canali del sodio voltaggio-dipendenti in un modo simile a quello delle tossine del tipo I-III (Homma e Shiomi, 2006; Frazão et al., 2012)

5.5.6 Analisi *in silico*

L'analisi *in silico* ha permesso di determinare il potenziale antimicrobico di ATX II.

I siti di predizione utilizzati sono stati APD: The Antimicrobial Peptide Database, CAMP: Collection of Antimicrobial Peptides ed AMPA (Wang and Wang, 2004; Shaini et al., 2009; Torrent et al., 2009; Torrent et al., 2012).

APD: The Antimicrobial Peptide Database si basa su due indici caratteristici per la determinazione del potere antimicrobico: Wimley-White hydrophobicities e Boman Index (Wang and Wang, 2004).

L'indice di idrofobicità è positivo per ATX II e negativo per BDS II indicando che per la prima molecola gli amminoacidi situati in tale regione della proteina sono più idrofobi e quindi c'è un maggiore potenzialità che possa svolgere una funzione antimicrobica.

Anche il Boman Index attribuisce un maggiore potenziale antimicrobico ad ATX II, infatti un valore più basso di questo indice (≤ 1) indica che il peptide ha una più alta attività antibatterica.

Inoltre, allineando le nostre sequenze con quelle presenti in questo database, ATX II ha mostrato una similarità del 35% con peptidi attivi verso Gram+, Gram- e funghi, mentre BDS II ha mostrato una similarità del 35% verso Gram+ e Gram-.

CAMP: Collection of Antimicrobial Peptides fornisce un valore di probabilità (0-1) per la predizione. Maggiore è la probabilità, maggiore è la possibilità che la predizione possa essere corretta (Shaini et al., 2009). Secondo questo database entrambe le molecole, ATX II e BDS II, hanno la potenzialità di essere peptidi antimicrobici indicando anche in questo caso una probabilità superiore per ATX II.

AMPA utilizza dei grafici che mostrano il profilo antimicrobico per la sequenza di entrata (s) e calcola la probabilità di trovare tratti della sequenza analizzata in proteine non antimicrobiche (Torrent et al., 2009; Torrent et al., 2012).

Solamente per BDS II è previsto un valore di probabilità dell' 1% di trovare il tratto previsto in una proteina non antimicrobica.

In seguito a queste analisi possiamo dedurre che ATX II risulta possedere tutte le caratteristiche che ci consentono di ipotizzare che questa molecola si comporti come tossina e fattore antimicrobico (Tab. 10).

Tab. 10 Tabella riassuntiva delle caratteristiche delle due neurotossine ATX II e BDS II.

		ATX II	BDS II
APD	Peso misurato (Da)	4947,4	4794,2
	Peso teorico (Da)	4941	4782
	Wimley-White hydrophobicities (Kcal/mol)	1,39	-1,19
	Boman Index (Kcal/mol)	0,72	0,95
CAMP	AMP probability	0,983	0,928
AMPA	NO-AMP Stretch (%)	0	1

Successivamente, tutte le tossine di *Anemonia sulcata* sono state analizzate mediante i siti di predizione evidenziando che le neurotossine specifiche per i canali sodici hanno una maggiore probabilità di essere fattori antimicrobici rispetto alle neurotossine specifiche per i canali potassio (Tab. 11) e, confermando, che ATX-II presenta tutte le caratteristiche idonee per essere un fattore antimicrobico insieme ad ATX-V, un'altra neurotossina specifica per i canali sodici.

Toxin	Uniprot/Genbank Accession number	Toxin family	Target	Wimley-White hydrophobicities (Kcal/mol) <i>APD</i>	Total hydrophobic ratio(%) <i>APD</i>	Net charge <i>APD</i>	Boman Index (Kcal/mol) <i>APD</i>	AMP probability <i>CAMP</i>	No-AMP stretch (%) <i>AMPA</i>
ATX-I	P01533/ -	Type I	Nav1	2.54	39	+2	1.15	0.988	0
ATX-II	P01528/ -	Type I	Binds to site 3. DmNav, SCN2A and SCN5A	1.39	38	+2	0.72	0.983	0
ATX-III	P01535/ -	Sea anemone short toxin family	Nav1	-0.02	33	+1	0.94	0.984	18
ATX-V	P01529/ -	Type I	Nav	1.54	39	+3	0.76	0.979	0
SA5 II	P10280/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	-	14.87	32	+4	2.28	0.889	10
kalicludin-1	Q9TWG0/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	Kv1.2	13.97	32	+4	2.66	0.579	14
kalicludin-2	Q9TWF9/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	Kv1.2	14.51	32	+8	3.01	0.827	5
kalicludin-3	Q9TWF8/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	Kv1.2	13.47	33	+4	2.49	0.860	3
BDS-I	P11494/ -	Cnidaria kunitz-type proteinase inhibitor/Type II	Kv3.1, 3.2, 3.4	-2.73	34	+3	0.81	0.969	1
kaliseptin	Q9TWG1/ -	Type I	Kv1.2	10.76	38	+5	2.08	0.918	16
BDS-II	P59084/ -	Type III	Kv3.1, 3.2, 3.4	-1.19	34	+2	0.95	0.928	1

Tab. 11 Tabella riassuntiva delle caratteristiche delle neurotossine di *Anemonia sulcata*

Utilizzando SWISS-MODEL è stata verificata la possibilità di un allineamento (ClustalW2) per l'omologia di struttura tra ATX II (target) e la catena A della Beta-Defensina 2 Umana (1fd3A) (Template). La qualità del modello è stata verificata mediante due programmi: Anolea ed Qmean (Fig. 35).

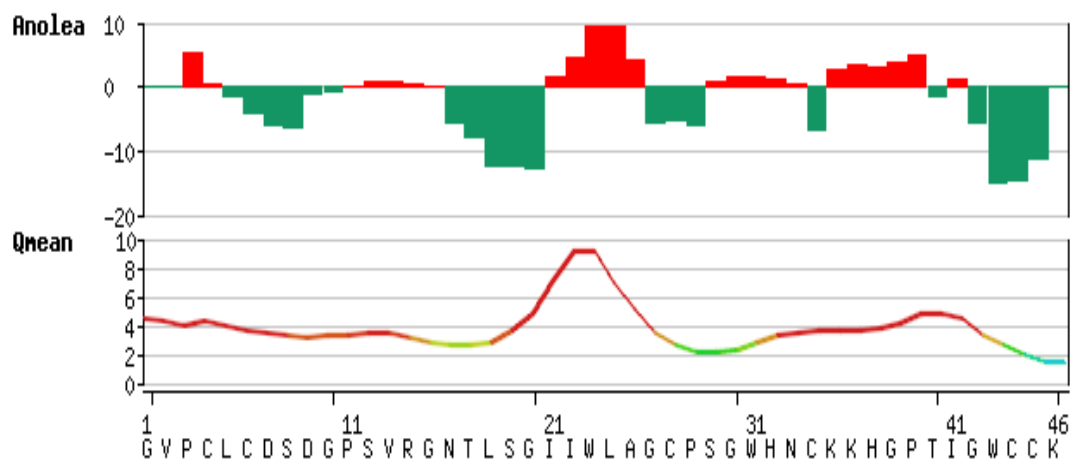


Fig.

Fig. 35 Analisi della qualità del modello dell'allineamento per l'omologia di struttura tra ATX II (target) e la catena A della beta defensina 2 umana (1fd3A) (template) mediante l'utilizzo di due programmi: Anolea e Anolea esegue calcoli di energia su una catena proteica valutando " l'ambiente non favorevole" di ciascun atomo nella molecola; l'asse delle y del grafico rappresenta l'energia per ogni amminoacido della catena proteica, i valori energetici negativi (in verde) rappresentano l'energia dell'ambiente favorevole mentre i valori positivi (in rosso) l'energia dell'ambiente sfavorevole per un determinato aminoacido. QMEAN è una funzione di punteggio globale di tutto il modello che riflette l'affidabilità del modello previsto e varia da 0 a 1.

L'allineamento delle due sequenze è stato inoltre analizzato con il programma DSSP che ne definisce la struttura secondaria, le caratteristiche geometriche e l'orientamento delle proteine, evidenziando la presenza di alfa eliche (h) e di ripiegamenti (s) comuni alle due molecole (Fig. 36).

TARGET	1	GVPCLC	DSDGPSVRGN	TLSGIIWLAG	CPSGWHNCKK	HGPTIGWCKK
TEMPLATE	1	gi--gdpvtc	lksg-----	aichpvf---	cprrykqigt	cglpgtkckk
TARGET		hhhh	hh	sss	sss	ssss
TEMPLATE		hhhh	hh	sss	sss	ssss

Fig. 36 Allineamento tra ATX II (target) e la catena A della beta defensina 2 umana (Ifd3A) (template) ed analisi con il programma DSSP che evidenzia la presenza di alfa eliche (h) e ripiegamenti comuni alle due molecole.

Nonostante il modello strutturale derivante mostri delle regioni di incompatibilità ci sono tra le due molecole ampie regioni compatibili con una struttura comune sia in termini energetici (Anolea ed Qmean) sia come possibile presenza di strutture secondarie comuni.

L'analisi filogenetica evidenzia infine che mettendo insieme ATX II con altre neurotossine ed AMP con similarità di sequenza, si forma un cluster che contiene ATX II, il suo precursore e gli AMP piuttosto che le altre neurotossine (Fig. 37).

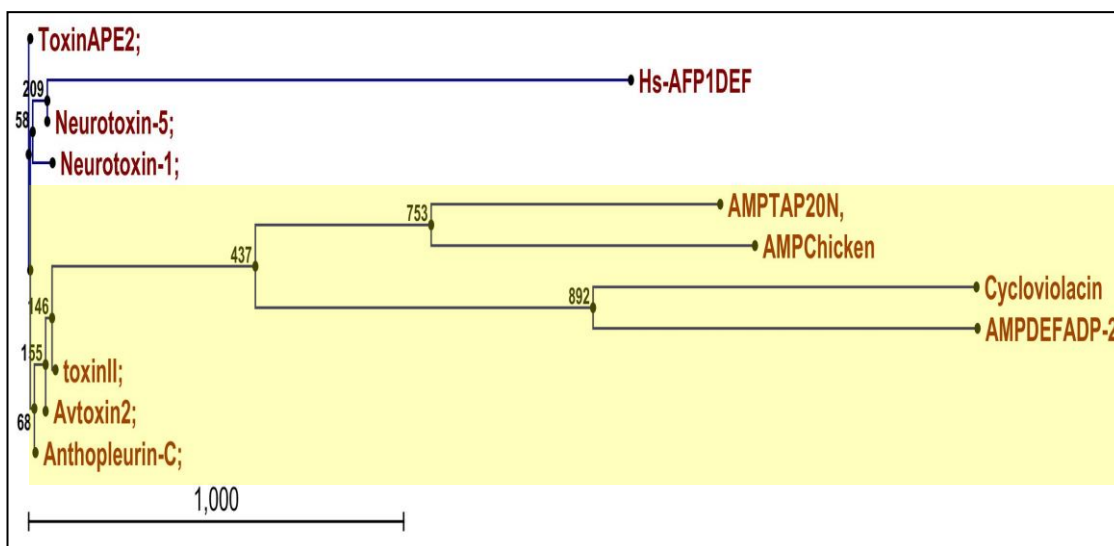


Fig.37 Analisi filogenetica effettuata con il metodo Neighbor-Joining (NJ) analizzata con 1000 interazioni bootstrap con il software CLC workbench 6.4. Anthopleurin-C (*Anthopleura elegantissima*); Avtoxin2 (*Anemonia viridis*); ToxinII (*Anemonia viridis*); AMPDEFADP-2 (*Amblyomma hebraeum*); Cycloviolacin (*Viola odorata*); AMPChicken (*Gallus gallus*); AMPTAP20N (*Bos Taurus*); Neurotoxin-1 (*Anthopleura fuscoviridis*); Neurotoxin-5 (*Anemonia sulcata*); Hs-AFP1DEF (*Heuchera sdanguinea*); ToxinAPE2 (*Anthopleura elegantissima*)

Una origine comune di AMPs e tossine animali sembra essere un espediente biologico. Nonostante la differenza dei loro target, la membrane di micro o macrorganismi, le condizioni di funzionamento di entrambi i gruppi peptidici impongono requisiti spesso analoghi nella struttura della molecola e nelle sue caratteristiche fisico-chimiche, come cationicità, spesso accoppiata con la anfipaticità, la resistenza alla idrolisi enzimatica, e una compattezza complessiva. Il modo in cui queste molecole sono impegnate nei meccanismi di difesa e di aggressione comprende l'accumulo temporaneo in serbatoi di cellule specializzate seguito da eventuale rilascio nell'ambiente extracellulare.

Ovchinnikova et al. (2006) hanno isolato dalla mesoglea dello scifozoo *Aurelia aurita* un peptide antimicrobico, denominato Aurelina, che non ha omologia strutturale con nessun peptide antimicrobico precedentemente identificato ma presenta una parziale similarità sia con le defensine che con le neurotossine specifiche per i canali potassio presenti negli anemoni di mare.

6. Considerazioni conclusive

Come anticipato nello stato dell'arte, dagli cnidari sono state isolate sia neurotossine che citolisine, classificate in seguito a studi biochimici e farmacologici in base ad una serie di parametri di tipo funzionale, molecolare e strutturale.

Di recente è stato descritto il primo genoma completo dell'anemone di mare *Nematostella vectensis* ed il suo complemento di tossine. Questo genoma è stato oggetto di diverse analisi che mettono in luce come potrebbero essere sintetizzate delle molecole bioattive in grado di interagire con i canali del sodio o del potassio. Tali molecole potrebbero essere utilizzate come nuova alternativa terapeutica dirette contro una serie di bersagli biologici (Norton, 2012).

Gli anemoni di mare sono quindi una fonte di neurotossine che agiscono sui canali ionici del potassio e del sodio (Yamaguchi et al., 2010). *A. sulcata*, è esposta agli attacchi dei predatori ma è incapace di ritrarre i tentacoli, inoltre, catturando attivamente un ampio spettro di prede (Chintiroglou e Koukouras, 1992) è soggetta alla frequente rottura dei tentacoli con conseguente infezione batterica.

L'arsenale chimico di *A. sulcata* rappresenta la strategia ottimale per la sopravvivenza, prevalentemente attraverso la produzione di neurotossine ma anche con l'utilizzo di molecole antimicrobiche di difesa (Moran et al., 2008).

Questo lavoro si è proposto di ampliare le conoscenze relative non soltanto alla caratterizzazione ed alle diverse e molteplici attività delle tossine e peptidi antimicrobici degli cnidari, ma anche di analizzare la risposta infiammatoria negli cnidari in quanto sistemi modello dei metazoi, che possono portare informazioni aggiuntive allo scenario delle prime tappe dell'evoluzione dell'immunità.

Gli cnidari possiedono componenti delle principali vie dell'immunità degli invertebrati. I recettori e le vie già individuate indicano che questi invertebrati basali sono tutt'altro che "semplici" nella gamma di metodi di cui dispongono per affrontare potenziali microbi invasori e agenti patogeni. Tuttavia, sono numerose le lacune nelle conoscenze attuali, con una grave carenza di studi funzionali delle componenti che possono avere un ruolo cruciale nelle risposte immunitarie.

Lo studio della risposta infiammatoria, avvenuta in seguito all'inoculo di varie sostanze, ha permesso di osservare delle reazioni specifiche soprattutto in seguito ad inoculo di batteri come *E. coli*. Questa risposta specifica, che termina nella comparsa di una zona di rigetto, fa ipotizzare un'estrusione del materiale danneggiato da parte dell'animale probabilmente dai pori di estrusione delle aconzie presenti nel disco pedale, un meccanismo di difesa non ancora riscontrato in altri cnidari.

Uno studio ulteriore è stato inoltre effettuato mediante una analisi istologica per la caratterizzazione dei tessuti e dell'area di rigetto.

E' stata anche analizzata l'attività enzimatica, nello specifico l'attività proteasica, fosfatasica ed esterasica, mostrando come l'inoculo dei diversi ceppi batterici, in particolare *E. coli*, altera l'espressione di questi enzimi. Questo dato è in accordo con i risultati degli studi sull'infiammazione suggerendo una correlazione tra la comparsa della reazione infiammatoria e la modifica dell'attività enzimatica.

E' stata quindi evidenziata per la prima volta negli cnidari una risposta cellulare e molecolare in seguito ad inoculo di batteri.

Infine, è stato isolato, purificato e caratterizzato un peptide antimicrobico verso *Micrococcus lysodeikticus* presente nelle banche dati come neurotossina ATX II specifica per i canali sodici. Alla luce dei risultati ottenuti, possiamo quindi

considerare ATX II una neurotossina con caratteristiche strutturali e funzionali dei peptidi antimicrobici.

Questa multifunzionalità può rappresentare una strategia di sopravvivenza ottimale permettendo a questi animali di essere predatori attivi attraverso la produzione di neurotossine e di resistere alle infezioni batteriche causate dall'eventuale rottura dei tentacoli attraverso la funzionalità da peptidi antimicrobici.

Ipotizziamo una potenziale applicazione per rallentare o inibire la crescita microbica, oltre che in campo farmacologico anche nei protocolli per la conservazione ed il restauro di manufatti di interesse storico-artistico.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare alcune persone per il loro fondamentale contributo, che ha reso possibile la stesura di questo lavoro di tesi.

Il gruppo di lavoro coordinato dal Prof. Nicolò Parrinello, dell'Università degli Studi di Palermo, Facoltà di Scienze MM.FF.NN. Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche Chimiche e Farmaceutiche (Italia) per avermi dato la possibilità di svolgere la mia attività di ricerca.

L'équipe Pathogènes et Environnements del Laboratoire Ecologie des Systèmes Marins Côtiers - Université de Montpellier 2 - Montpellier – France - Directeurs de recherche Philippe Roch per il supporto fornito durante il periodo di permanenza presso il loro laboratorio nell'ambito del progetto: PICS n°5197 “Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as indicator of environmental impact in mussels”

Laurent Coquet, e Thierry Jouenne, UMR6270 CNRS – Laboratoire PBS, Plateforme de Protéomique «PISSARO», Faculté des Sciences de Rouen (France) per il supporto tecnico fornito.

Appendice I

Esperienza all'estero

- 06-16/06/2011 – Research on the innate immune system of molluscs – PICS n°5197 “Macrophage migration inhibition factor (MIF) as indicator of environmental impact in mussels” – University of Montpellier 2, France
- 06/11/2011-11/12/2011 – Research on the innate immune system of molluscs – PICS n°5197 “Macrophage migration inhibition factor (MIF) as indicator of environmental impact in mussels” – University of Montpellier 2, France
- 26/05/2012-30/06/2012 – Research on the innate immune system of molluscs – PICS n°5197 “Macrophage migration inhibition factor (MIF) as indicator of environmental impact in mussels” – University of Montpellier 2, France
- 07/01/2013-01/02/2013 – Research on the innate immune system of molluscs – PICS n°5197 “Macrophage migration inhibition factor (MIF) as indicator of environmental impact in mussels” – University of Montpellier 2, France

Appendice II

Produzione scientifica

Publicazioni:

- Molruedee Sonthi, Franck Cantet, Mylène Toubiana, Maria-Rosa Trapani, Maria-Giovanna Parisi , Matteo Cammarata, Philippe Roch, Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM); Fish & Shellfish Immunology 32 (2012) 45 e 50
- Maisano Maria, Trapani Maria Rosa, Parrino Vincenzo, Parisi Maria Giovanna, Cappello Tiziana, D'Aagata Alessia, Benenati Gigliola, Natalotto Antonino, Mauceri Angela, Cammarata Matteo, Haemolytic activity and characterization of nematocyst venom from *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa); Italian Journal of Zoology 2013, 168–176 Vol. 80, No. 2
- Palla F., Cammarata M., Trapani M., Ghersi G., Salamone M., Sebastianelli M., Novel proteases from marine organisms with potential interest in restoration procedure; Science and Technology for the Conservation of Cultural Heritage – Rogerio-Candelera, Lazzari & Cano (eds) 2013 Taylot & Francis Group, London, ISBN 978-1-138-00009-4
- Parisi Maria Giovanna, Trapani Maria Rosa, Cammarata Matteo, Granulocytes of sea anemone *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) body fluid contained and released Cytolysins. Percoll gradient cell separation and plaque of lysis assay; Invertebrate survival Journal Accepted
- Trapani MR , Parisi MG, Coquet L, Toubiana M, Cammarata M; ATX II neurotoxins from tentacle of *Anemonia sulcata* (Cnidaria) act as antimicrobial peptides; Comparative Biochemistry and Physiology Submitted

- Trapani MR , Sanfratello A., Parrinello D., Parisi MG, Benenati G., Cammarata M., Inflammatory reaction to bacterial injection of *Anemonia sulcata* (Cnidaria); Developmental and Comparative Immunology In preparation

Abstract e poster presentati presso congressi:

- M. Cammarata, V. Mangano, M.R. Trapani, V. Arizza, A. Vizzini, D. Parrinello, M. Vazzana, M. Pergolizza, N. Parrinello; Further insight on *Ciona intestinalis* prophenoloxidase system activated during the LPS induced inflammatory response; XI scientific meeting of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI), 24-26 Febbraio 2010, Modena.
- M. Giovanna Parisi, Maria Rosa Trapani, Gigliola Benenati, Stefano Piraino, Matteo Cammarata, Nicolò Parrinello (2011). Isolation, characterization and cellular distribution of a neurotoxin with lytic activity of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria). 72° Congresso dell'Unione Zoologica Italiana 5-8 Settembre 2011, BOLOGNA.
- Maisano Maria, Cammarata Matteo, Parrino Vincenzo, Parisi Maria Giovanna, Natalotto Antonino, Trapani Maria Rosa e Mauceri Angela (2011). Hemolytic activity of the extract from nematocysts of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa). XXI Congresso S.It.E. 3-6 Ottobre 2011 – Palermo.
- Franco Palla, Matteo Cammarata, Maria Rosa Trapani, Noemi Billeci, Mauro Sebastianelli, Monica Salamone, Giulio Ghersi, Removal of old protein layers from surfaces of works of art by new enzymes. International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property 2012, Microbial Biodeterioration of Cultural Property December 5 (Wed.) – 7 (Fri.), 2012 National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo

- MR Trapani, D Parrinello, MA Sanfratello, G Benenati, MG Parisi, P Roch, M Cammarata, Inflammatory-like reaction following bacterial injection and antimicrobial peptide isolation from *Anemonia sulcata* (Cnidaria); Italian journal of zoology 2013, 10: 15–28. XIVth scientific meeting of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI), 14 - 16 February 2013, Department of Biological Chemical Pharmaceutical Science and Technology, University of Palermo, Palermo, Italy
- MG Parisi, F Cantet, M Toubiana, M Sonthi, MR Trapani, M Cammarata, N Parrinello, P Roch, Individual variability and gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM); Italian journal of zoology 2013, 10: 15–28. XIVth scientific meeting of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI), 14 - 16 February 2013, Palermo
- MA Damiano, V Arizza, M Cammarata, M Celi, MG Parisi, D Parrinello, D Russo, MA Sanfratello, MR Trapani, M Vazzana, A Occhialini, Components of hemocyte extracts from marine invertebrates exert antimicrobial activity; Italian journal of zoology 2013, 10: 15–28. XIVth scientific meeting of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI), 14 - 16 February 2013, Palermo
- MR Trapani, D. Parrinello, MA Sanfratello, G. Benenati, MG Parisi, F. Palla, P. Roch, M. Cammarata Reazione infiammatoria ed isolamento di un peptide antimicrobico da *Anemonia sulcata* (Cnidaria) – Meeting Biotecnologie: ricerca di base, interdisciplinare e traslazionale in ambito biomedico 27-28 Giugno 2013, Palermo
- M. Giovanna Parisi, Maria Rosa Trapani, Gigliola Benenati, Stefano Piraino, Nicolò Parrinello, Matteo Cammarata, Attività biologica e caratterizzazione molecolare di un peptide neurotossico ad attività litica di *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria) – Meeting Biotecnologie: ricerca di base, interdisciplinare e traslazionale in ambito biomedico 27-28 Giugno 2013, Palermo

- Cammarata M, Vizzini A, Parrinello D, Sanfratello MA, Trapani M, Mangano V, Parrinello N, Il sistema della profenolossidasi in *Ciona intestinalis*. Caratterizzazione e interazione tra fenolossidasi, perossinectina e superossido dismutasi Cu-Zn dipendente nella risposta infiammatoria indotta da LPS. 74° Congresso dell'Unione Zoologica Italiana 30 Settembre – 3 ottobre 2013, Modena

Bibliografia

- Abramson, S.N., Culver, P., Kline, T., Li, Y., Guest, P., Gutman, L., Taylor, P., 1988. Lophotoxin and related coral toxins covalently label the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 18568–18573.
- Al-Zereini, W.; Fotso Fondja Yao, C.B.; Laatsch, H.; Anke, H. Aqabamycins A–G: Novel nitro maleimides from a marine *Vibrio* species. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 2010, 63, 297–301.
- Anderluh, G., Macek, P., 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40, 111–124.
- Anderluh, G.; Krizaj, I.; Strukelj, B.; Gubensek, F.; Macek, P.; Pungercar, J. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon* 1999, 37, 1391–1401.
- Anderluh, G.; Pungercar, J.; Strukelj, B.; Macek, P.; Gubensek, F. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 220, 437–442.
- Andreev, Y.A.; Kozlov, S.A.; Koshelev, S.G.; Ivanova, E.A.; Monastyrnaya, M.M.; Kozlovskaya, E.P.; Grishin, E.V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 23914–23921.
- Aneiros A., Garateix A., 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Review Journal of Chromatography B*, 803 41–53.
- Aneiros, A.; Garcia, I.; Martinez, J.R.; Harvey, A.L.; Anderson, A.J.; Marshall, D.L.; Engstrom, A.; Hellman, U.; Karlsson, E. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1157, 86–92.
- Angulo, E., Noe, V., Casado, V., Mallol, J., Gomez-Isla, T., Lluís, C., Ferrer, I., Ciudad, C.J., Franco, R., 2004. Up-regulation of the Kv3.4 potassium channel subunit in early stages of Alzheimer's disease. *J. Neurochem* 91, 547–557.
- Antuch, W., Berndt, K.D., Chavez, M.A., Delfin, J., Wuthrich, K., 1993. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 212, 675–684.
- Argano R., Boero F., Bologna M.A., Dallai R., Lanzavecchia G., Luporini P., Melone G., Sbordoni V., Scalera Liaci L., 2007. *Zoologia Diversità animale*. Monduzzi Editore.
- Artan, M., Li, Y., Karadeniz, F., Lee, S.H., Kim, M.M., Kim, S.K., 2008. Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6, 6'-bieckol, from *Ecklonia cava*. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 7921–7926.
- Augustin R, Siebert S, Bosch TC. Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of *Hydra*'s innate immune system. *Dev Comp Immunol* 2009; 33:830-7
- Bandurraga, M.M., Fenical, W., 1985. Isolation of the muricins. Evidence of a chemical adaptation against fouling in the marine octocoral *Muricea fruticosa* (Gorgonacea). *Tetrahedron* 41, 1057–1065.
- Baranauskas, G., Tkatch, T., Nagata, K., Yeh, J.Z., Surmeier, D.J., 2003. Kv3.4 subunits enhance the repolarizing efficiency of Kv3.1 channels in fastspiking neurons. *Nat. Neurosci* 6, 258–266.
- Bellomio, A.; Morante, K.; Barlic, A.; Gutierrez-Aguirre, I.; Viguera, A.R.; Gonzalez-Manas, J.M. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon* 2009, 54, 869–880.
- Beress, L., Beress, R. 1971: Reinigung zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*. *Kieler Meeresforsch* 27, 117-127
- Berntson, E. A., S. C. France, and L. S. Mullineaux. 1999. Phylogenetic Relationships within the Class Anthozoa (Phylum Cnidaria) Based on Nuclear 18S rDNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13:417– 433.

- Berrue, F., Thomas, O.P., Laville, R., Prado, S., Golebiowski, J., Fernandez, R., Amade, P., 2007. The marine sponge *Plakortis zygompha*: a source of original bioactive polyketides. *Tetrahedron* 63, 2328–2334.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004; 40:845-59.
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR. 2008. Marine natural products. *Nat Prod Rep*;25:35–94;
- Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR. 2004. Marine natural products. *Nat Prod Rep*; 21:1–49.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR. 2006. Marine natural products. *Nat Prod Rep*;23:26–78. 9-14
- Boero F, Schierwater B, Piraino S. Cnidarian milestones in metazoan evolution. *Integrative and Comparative Biology* 47: 693-700, 2007
- Boman H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts *Journal of Internal Medicine* 2003; 254: 197–215
- Bontemps, N.; Bry, D.; Lopez-Legentil, S.; Simon-Levert, A.; Long, C.; Banaigs, B. Structures and antimicrobial activities of pyridoacridine alkaloids isolated from different chromatotypes of the ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1044–1048.
- Bosch TC, Augustin R, Anton-Erxleben F et al. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence. *Dev Comp Immunol* 2009; 33:559-69.
- Bosch TC. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for *Hydra* regeneration. *Dev Biol* 2007; 303:421-33.
- Bosch TCG, David CN. Immunocompetence in *Hydra*: Epithelial cells recognize self-nonself and react against it. *J Exp Biol* 1986; 238:225-34.
- Bosch TCG, Fujisawa T. Polyps, peptides and patterning. *BioEssays* 23: 420-427, 2001.
- Bridge, D., C. W. Cunningham, B. Schierwater, R. DeSalle, and L. W. Buss. 1992. Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria: Evidence from Mitochondrial Genome Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:8750–8753.
- Bridge, D., Cunningham C. W., DeSalle R., and Buss L. W. 1995. Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria: Molecular and Morphological Evidence. *Molecular Biology and Evolution*,12:679– 689.
- Brower DL, Brower SM, Hayward DC, Ball EE. Molecular evolution of integrins: genes encoding integrin beta subunits from a coral and a sponge. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 9182–9187, 1997.
- Brown Tanya, Bourne David, Rodriguez-Lanetty Mauricio, Transcriptional Activation of c3 and hsp70 as Part of the Immune Response of *Acropora millepora* to Bacterial Challenges. *Coral Immune Response to Bacterial Challenges July 2013 Volume 8 Issue 7*
- Bruhn, T.; Schaller, C.; Schulze, C.; Sanchez-Rodriguez, J.; Dannmeier, C.; Ravens, U.; Heubach, J.F.; Eckhardt, K.; Schmidt, H.; et al. Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* 2001, 39, 693–702.
- Burnett, J.W., Calton, G.J., 1977. The chemistry and toxicology of some venomous pelagic coelenterates. *Toxicon* 15, 177–196.
- Cadavid LF. Self-discrimination in colonial invertebrates: genetic control of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*. *Dev Comp Immunol* 2004; 28:871-9.
- Cantillo-Ciau, Z.; Moo-Puc, R.; Quijano, L.; Freile-Pelegrin, Y. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: A source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs* 2010, 8, 1292–1304.
- Cariello, L.; De Santis, A.; Fiore, F.; Piccoli, R.; Spagnuolo, A.; Zanetti, L.; Parente, A. Calitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Calliactis parasitica*: Amino-acid sequence and electrophysiological properties. *Biochemistry* 1989, 28, 2484–2489.
- Carroll, A.R.; Duffy, S.; Avery, V.M. Citronamides A and B, tetrapeptides from the australian sponge *Citronia astra*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 764–768.

- Cartè BK 1996 Biomedical potential of marine natural products. *BioScience* 46:271-286.
- Castaneda, O., Sotolongo, V., Amor, A. M., Stocklin, R., Anderson, A. J., Harvey, A. L., Engstrom, A., Weinstedt, C., & Karlsson, E. (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus* *Toxicon* 33, 605–613.
- Chadwick-Furman NE, Rinkevich B. A complex allorecognition in a reef building coral: delayed responses, reversals and non transitive hierarchies. *Coral Reefs*. 1994;13:57–63. doi: 10.1007/BF00426436.
- Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Bode HR, David CN, Rokhsar DS et al.,. The dynamic genome of *Hydra*. *Nature* 464: 592-596, 2010.
- Cheng, S.Y.; Chuang, C.T.; Wang, S.K.; Wen, Z.H.; Chiou, S.F.; Hsu, C.H.; Dai, C.F.; Duh, C.Y. Antiviral and anti-inflammatory diterpenoids from the soft coral *Simularia gyrosa*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1184–1187.
- Cheng, S.Y.; Wang, S.K.; Chiou, S.F.; Hsu, C.H.; Dai, C.F.; Chiang, M.Y.; Duh, C.Y. Cembranoids from the octocoral *Sarcophyton ehrenbergi*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 197–203.
- Chintiroglou, C.; Koukouras, A. The feeding habits of three Mediterranean sea anemone species, *Anemonia viridis* (Forsk.) , *Actinia equina* (Linnaeus) and *Cereus pedunculatus* (Pennant). *Helgol. Meeresunters.* 1992, 46, 53–68
- Choi, H.; Engene, N.; Smith, J.E.; Preskitt, L.B.; Gerwick, W.H. Crossbyanols A–D, toxic brominated polyphenyl ethers from the hawaiian bloom-forming cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 517–522.
- Cirne-Santos, C.C., Souza, T.M., Teixeira, V.L., Fontes, C.F., Rebello, M.A., Castello-Branco, L.R., Abreu, C.M., Tanuri, A., Frugulhetti, I.C., Bou-Habib, D.C., 2008. The dolabellane diterpene dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. *Antiviral Res.* 77, 64–71.
- Clark, B.R., Engene, N., Teasdale, M.E., Rowley, D.C., Matainaho, T., Valeriote, F.A., Gerwick, W.H., 2008. Natural products chemistry and taxonomy of the marine cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum*. *J. Nat. Prod.* 71, 1530–1537.
- Cline, E.I.; Wiebe, L.I.; Young, J.D.; Samuel, J. Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora*. *Pharmacol. Res.* 1995, 32, 309–314.
- Collins, A. G. 1998. Evaluating Multiple Alternative Hypotheses for the Origin of Bilateria: An Analysis of 18S rRNA Molecular Evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:15458– 15463.
- Collins, A. G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the Evolution of Cnidarian Life Cycles. *Journal of Evolutionary Biology*, 15:418– 432.
- Collins, A. G., P. Schuchert, A. C. Marques, T. Jankowski, M. Medina, and B. Schierwater. 2006. Medusozoan Phylogeny and Character Evolution Clarified by New Large and Small Subunit rDNA Data and an Assessment of the Utility of Phylogenetic Mixture Models. *Systematic Biology*, 55:97– 115.
- Collins, A.G. 2009. Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithson. Contrib.Zool.*
- Correa, H.; Aristizabal, F.; Duque, C.; Kerr, R. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudo-pteropsins and seco-pseudo-pteropsins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of san andres and providencia islands (Southwest Caribbean Sea). *Mar. Drugs* 2011, 9, 334–343.
- Cunha, R.B.; Santana, A.N.; Amaral, P.C.; Carvalho, M.D.; Carvalho, D.M.; Cavalheiro, E.A.; Maigret, B.; Ricart, C.A.; Cardi, B.A.; Sousa, M.V.; et al. Primary structure, behavioral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 2005, 45, 207–217.
- D'Auria, M.V., Sepe, V., D'Orsi, R., Bellotta, F., Debitus, C., Zampella, A., 2007. Isolation and structural elucidation of callipeltins J-M: antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. *Tetrahedron* 63, 131–140.
- Davis, R.A.; Duffy, S.; Avery, V.M.; Camp, D.; Hooper, J.N.A.; Quinn, R.J. (+)-7-bromotrypargine: An antimalarial β -Carboline from the australian marine sponge *Ancorina* sp. *Tetrahedron Lett.* 2010, 51, 583–585.

- Davis, R.A.; Sykes, M.; Avery, V.M.; Camp, D.; Quinn, R.J. Convolutamines I and J, antitrypanosomal alkaloids from the bryozoan *Amathia tortosa*. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 6615–6619.
- de Lira, S.P., Selegim, M.H., Williams, D.E., Marion, F., Hamill, P., Jean, F., Andersen, R.J., Hajdu, E., Berlinck, R.G., 2007. A SARS-coronavirus 3CL protease inhibitor isolated from the marine sponge *Axinella cf. corrugata*: structure elucidation and synthesis. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 440–443.
- De Petrocellis L, Orlando P, Pierobon P, De Falco M, Ruggiero AM, Stefano GS, Tino A, Grippo P. Kelletin A, from the marine mollusc *Buccinum corneum*, promotes differentiation in *Hydra vulgaris*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1999 Jan;103(1):17-28.
- De Vries, D.J. and P.M. Beart, 1995. Fishing for drugs from the sea: Status and strategies. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 275-279.
- Delfin, J., Gonzalez, Y., Diaz, J., Chavez, M., 1994. Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. *Arch. Med. Res.* 25, 199–204.
- Delfin, J.; Martinez, I.; Antuch, W.; Morera, V.; Gonzalez, Y.; Rodriguez, R.; Marquez, M.; Saroyan, A.; Larionova, N.; Diaz, J.; et al. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 1996, 34, 1367–1376.
- Desjardine, K., Pereira, A., Wright, H., Matainaho, T., Kelly, M., Andersen, R.J., 2007. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. *J. Nat. Prod.* 70, 1850–1853.
- Diaz, J.; Morera, V.; Delfin, J.; Huerta, V.; Lima, G.; Rodriguex de la Vega, M.; Garcia, B.; Padron, G.; Assfalg-Machleidt, I.; Machleidt, W.; et al. Purification and partial characterization of a novel proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 1998, 36, 1275–1276.
- DiGirolamo, J.A.; Li, X.C.; Jacob, M.R.; Clark, A.M.; Ferreira, D. Reversal of fluconazole resistance by sulfated sterols from the marine sponge *Topsentia* sp. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1524–1528.
- Ding, L.; Munch, J.; Goerls, H.; Maier, A.; Fiebig, H.H.; Lin, W.H.; Hertweck, C. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 6685–6687.
- Diochot, S., Schweitz, H., Be´ress, L., Lazdunski, M., 1998. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* 273, 6744–6749.
- Diochot, S.; Baron, A.; Rash, L.D.; Deval, E.; Escoubas, P.; Scarzello, S.; Salinas, M.; Lazdunski, M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 2004, 23, 1516–1525.
- Diochot, S.; Loret, E.; Bruhn, T.; Beress, L.; Lazdunski, M. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related genopotassium channels. *Mol. Pharmacol.* 2003, 64, 59–69.
- Dishaw LJ, Litman GW. Invertebrate Allorecognition: The Origins of Histocompatibility. *Current Biology* 2009; 19:R286-R8.
- Dishaw LJ, Smith SL, Bigger CH. Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. *Immunogenetics* 57: 535-548, 2005.
- Doppelfeld I.-S., Henschen-Edman A., Graf E., Zwick J., Beress L., Etschenberg E. "Polypeptides, process for their preparation, and their use as hypotensive active compounds." Patent number DE3324689, 17-JAN-1985
- Dos Santos, A.O.; Britta, E.A.; Bianco, E.M.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B.P.; Pereira, R.C.; Nakamura, C.V. 4-Acetoxydolastane diterpene from the brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. *Mar. Drugs* 2011, 9, 2369–2383.
- Driscoll, P. C., Clore, G. M., Be´ress, L., and Gronenborn, A. M. (1989) *Biochemistry* 28, 2178–2187
- Driscoll, P. C., Gronenborn, A. M., Be´ress, L., and Clore, G. M. (1989) *Biochemistry* 28, 2188–2198
- Du Pasquier L. The immune systems of vertebrates and invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* Volume: 126, Supplement 1, pp. S30. 2000

- Du Pasquier L., Flajnik M.F. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line; Trends in Immunology Volume: 25, Issue: 12, pp. 640-644. 2004
- Du, X., Lu, C., Li, Y., Zheng, Z., Su, W., Shen, Y., 2008. Three new antimicrobial metabolites of *Phomopsis* sp. J. Antibiot. (Tokyo) 61, 250–253.
- Dunn CW, Hejnal A, Matus DQ et al. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. Nature 2008; 452:745-9.
- Dunn SR 2009 Immunorecognition and immunoreceptors in the Cnidaria Center for Marine Studies, University of Queensland, Australia ISJ 6: 7-14
- Dunn SR, Phillips WS, Spatafora JW, Green DR, Weis VM. Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution. J. Mol. Evol. 63: 95-107, 2006.
- Dunn, B., 1989. Determination of protease mechanism. In: Beyon, K.J., Bond, J.S. (Eds.), Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, pp. 57–81.
- Dunn, C. W., Hejnal A., Matus D. Q., Pang K., Browne W. E., Smith S. A., Seaver E., Rouse G. W., Obst M., Edgecombe G. D., Sørensen M. V., Haddock S. H. D., Schmidt-Rhaesa A., Okusu A., Kristensen R. M., Wheeler W. C., Martindale M. Q., and Giribet G.. 2008. Broad Phylogenomic Sampling Improves Resolution of the Animal Tree of Life. Nature (London), 452:745– 749.
- El-Gendy, M.M., Hawas, U.W., Jaspars, M., 2008b. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. J. Antibiot. (Tokyo) 61, 379–386.
- El-Gendy, M.M., Shaaban, M., Shaaban, K.A., El-Bondkly, A.M., Laatsch, H., 2008a. Essramycin: a first triazolopyrimidine antibiotic isolated from nature. J. Antibiot. (Tokyo) 61, 149–157.
- El-Gendy, M.M.; El-Bondkly, A.M. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya 48. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010, 37, 831–841.
- Engelhardt, K.; Degnes, K.F.; Kemmler, M.; Bredholt, H.; Fjaervik, E.; Klinkenberg, G.; Sletta, H.; Ellingsen, T.E.; Zotchev, S.B. Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardioopsis* Species. Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76, 4969–4976.
- Fan, G.; Li, Z.; Shen, S.; Zeng, Y.; Yang, Y.; Xu, M.; Bruhn, T.; Bruhn, H.; Morschhauser, J.; Bringmann, G.; et al. Baculiferins A–O, O-Sulfated pyrrole alkaloids with anti-HIV-1 activity, from the chinese marine sponge *Iotrochota baculifera*. Bioorg. Med. Chem. 2010, 18, 5466–5474.
- Fattorusso, C.; Persico, M.; Calcinai, B.; Cerrano, C.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Novellino, E.; Romano, A.; Scala, F.; Fattorusso, E.; et al. Manadoperoxides A–D from the Indonesian sponge *Plakortis* cfr. *simplex*. Further insights on the structure-activity relationships of simple 1,2-dioxane antimalarials. J. Nat. Prod. 2010, 73, 1138–1145.
- Faulkner DJ. 2000 Marine natural products. Nat Prod Rep;17:7–55.; 2001;18:1–49; 2002;19:1–48
- Fautin DG, Mariscal RN. Cnidaria: Anthozoa. In Microscopic anatomy of invertebrates Harrison F.W, Westfall J.A vol. 2 pp. 267–358. Eds. New York, NY:Wiley, 1991.
- Feher, D.; Barlow, R.; McAtee, J.; Hemscheidt, T.K. Highly brominated antimicrobial metabolites from a marine *Pseudoalteromonas* sp. J. Nat. Prod. 2010, 73, 1963–1966.
- Feng, Y.; Davis, R.A.; Sykes, M.; Avery, V.M.; Camp, D.; Quinn, R.J. Antitrypanosomal cyclic polyketide peroxides from the Australian marine sponge *Plakortis* sp. J. Nat. Prod. 2010, 73, 716–719.
- Fenical, W., Okuda, R.K., Bandurraga, M.M., Culver, V., Jacobs, R.S., 1981. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogorgia*. Science 212, 1512–1514.
- Fraune S, Bosch TCG. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 32, 2007.
- Fração Bárbara, Vasconcelos Vitor and Antunes Agostinho Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview Mar. Drugs 2012, 10, 1812-1851
- Garateix, A., Castellanos, M., Hernandez, J.L., Mas, R., Menendez, R., Romero, L., Chavez, M., 1992. Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on cholinergic responses. Comp. Biochem. Physiol. C 103, 403–409.

- Gaspar, H., Santos, S., Carbone, M., Rodrigues, A.S., Rodrigues, A.I., Uriz, M.J., Savluchinske Feio, S.M., Melck, D., Humanes, M., Gavagnin, M., 2008. Isomeric furanosesquiterpenes from the Portuguese marine sponge *Fasciospongia* sp. *J. Nat. Prod.* 71, 2049–2052
- Gendeh GS, Young LC, de Medeiros LC, Jeyaseelan K, Harvey AL, Chung MCM 1997 A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* 36, 11461–11471
- Gerwick, W.H. 1987 " Drugs from the Sea: The Search Continues *J. Pharm. Technol.* (July–August) 136.
- Ghiretti F., Cariello L., 1984 – Gli animali marini velenosi e le loro tossine. Ed. Piccin, Padova.
- Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A., 1999. Purification and partial characterization of the phospholipase A2 and co-lytic factor from sea anemone *Aiptasia pallida* nematocyst venom. *Toxicon* 37, 1779–1796.
- Hancock R.E., Brown K.L., Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211, 315–322. 2006
- Hanif, N., Tanaka, J., Setiawan, A., Trianto, A., de Voogd, N.J., Murni, A., Tanaka, C., Higa, T., 2007. Polybrominated diphenyl ethers from the Indonesian sponge *Lamellodysidea herbacea*. *J. Nat. Prod.* 70, 432–435.
- Hasegawa, Y.; Honma, T.; Nagai, H.; Ishida, M.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Isolation and cDNA cloning of a potassium channel peptide toxin from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Toxicon* 2006, 48, 536–542.
- Hauenschild C. Genetische und entwicklungphysiologische Untersuchungen ueber Intersexualitaet und Gewebevertraeglichkeit bei *Hydractinia echinata* Flem. Wilhelm Roux's Arch Entwicklungsmech Org 1954; 147:1-41
- Hauenschild C. Uber Die Vererbung Einer Gewebevertraeglichkeits-Eigenschaft Bei Dem Hydroidpolypen Hydractinia-Echinata. Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete 1956; 11:132-8.
- Hertiani, T.; Edrada-Ebel, R.; Ortlepp, S.; van Soest, R.W.; de Voogd, N.J.; Wray, V.; Hentschel, U.; Kozytska, S.; Muller, W.E.; Proksch, P. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian Agelas sponges. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 1297–1311.
- Hessinger D A. 1988. Nematocyst venoms and toxins. In: (DA Hessinger, HM Lenhoff eds) *The Biology of Nematocysts*. New York. Academic Press, pp 333-369.
- Hessinger, D. A. and H. M. Lenhoff. 1988. Preface. Pp. xi-xii in D. A. Hessinger and H. M. Lenhoff (eds.) *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, San Diego and other cities
- Hildemann WH, Jokiel PL, Bigger CH, Johnston IS. Allogeneic polymorphism and alloimmune memory in the coral, *Montipora verrucosa*. *Transplantation*. 1980;30:297–301
- Hohmann, C.; Schneider, K.; Bruntner, C.; Irran, E.; Nicholson, G.; Bull, A.T.; Jones, A.L.; Brown, R.; Stach, J.E.; Goodfellow, M.; et al. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J. Antibiot.* 2009, 62, 99–104.
- Holmblad T, Thornqvist PO, Soderhall K, Johansson MW. Identification and cloning of an integrin b subunit from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus lenisculus*. *J. Exp. Zool.* 277, 255–261, 1997.
- Honma, T., Hasegawa, Y., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2005. Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon* 45, 33–41.
- Honma, T.; Kawahata, S.; Ishida, M.; Nagai, H.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides* 2008, 29, 536–544.
- Honma, T.; Shiomi, K. Peptide toxins in sea anemones: Structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* 2006, 8, 1–10.
- Horie, S., Tsutsumi, S., Takada, Y., Kimura, J., 2008. Antibacterial quinone metabolite from the brown alga, *Sargassum sagamianum*. *Bull. Chem. Soc. Jpn* 81, 1125–1130.

- Hua, H.M., Peng, J., Dunbar, D.C., Schinazi, R.F., de Castro Andrews, A.G., Cuevas, C., Garcia-Fernandez, L.F., Kelly, M., Hamann, M.T., 2007. Batzelladine alkaloids from the Caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens. *Tetrahedron* 63, 11179–11188.
- Huerta, V.; Morera, V.; Guanche, Y.; China, G.; Gonzalez, L.J.; Betancourt, L.; Martinez, D.; Alvarez, C.; Lanio, M.E.; Besada, V. Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon* 2001, 39, 1253–1256.
- Hughes, C.C., Prieto-Davo, A., Jensen, P.R., Fenical, W., 2008. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* 10, 629–631.
- Hutton, DMC, Smith VJ. Antibacterial properties of isolated amoebocytes from the sea anemone *Actinia equina*. *Biol. Bull.* 191: 441–451, 1996.
- Il'ina, A.; Lipkin, A.; Barsova, E.; Issaeva, M.; Leychenko, E.; Guzev, K.; Monastyrnaya, M.;
- Il'ina, A.P.; Monastyrnaia, M.M.; Isaeva, M.P.; Guzev, K.V.; Rasskazov, V.A.; Kozlovskaja, E.P. Primary structures of actinoporins from sea anemone *Oulactis orientalis*. *Bioorg. Khim.* 2005, 31, 357–362.
- Ishida, M.; Yokoyama, A.; Shimakura, K.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Halcurin, a polypeptide toxin from the sea anemone *Halcurias* sp., with a structural resemblance to type 1 and 2 toxins. *Toxicon* 1997, 35, 537–544.
- Isnansetyo, A.; Kamei, Y. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of MC21-B, an antibacterial compound produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas phenolica* O-BC30T. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, 34, 131–135.
- Ivker FB. Hierarchy of Histo-Incompatibility in Hydractinia-Echinata. *Biol Bull* 1972; 143:162-174.
- Iwanaga S., Lee B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 128-150. 2005
- James ER, Green DR. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. *Trends Parasitol.* 20: 280-287, 2004.
- Jang, J.H., Kanoh, K., Adachi, K., Matsuda, S., Shizuri, Y., 2007a. Tenacibactins A–D, hydroxamate siderophores from a marine-derived bacterium, *Tenacibaculum* sp. A4K-17. *J. Nat. Prod.* 70, 563–566.
- Jang, J.H., van Soest, R.W., Fusetani, N., Matsunaga, S., 2007b. Pseudoceratins A and B, antifungal bicyclic bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *J. Org. Chem.* 72, 1211–1217.
- Jang, K.H., Chung, S.C., Shin, J., Lee, S.H., Kim, T.I., Lee, H.S., Oh, K.B., 2007c. Aaptamines assortase A inhibitors from the tropical sponge *Aaptos aaptos*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 5366–5369.
- Jeon, J.E.; Na, Z.; Jung, M.; Lee, H.S.; Sim, C.J.; Nahm, K.; Oh, K.B.; Shin, J. Discorhabdins from the Korean marine sponge *Sceptrella* sp. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 258–262.
- Jiang, X.Y.; Yang, W.L.; Chen, H.P.; Tu, H.B.; Wu, W.Y.; Wei, J.W.; Wang, J.; Liu, W.H.; Xu, A.L. Cloning and characterization of an acidic cytolysin cDNA from sea anemone *Sagartia rosea*. *Toxicon* 2002, 40, 1563–1569.
- Jiménez-Romero, C.; Ortíz, I.; Vicente, J.; Vera, B.; Rodríguez, A.D.; Nam, S.; Jove, R. Bioactive cycloperoxides isolated from the Puerto Rican sponge *Plakortis halichondrioides*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1694–1700.
- Johansson MW, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. In Rinkevich B, Muller WEG (eds), *Invertebrate Immunology*, Springer-Verlag, Berlin, pp 46-66, 1996.
- Johnson, MS, Lu N, Denessiouk K, Heino J, Gullberg D. Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1788: 779–789. 2009.
- Jung S, Dingley AJ, Augustin R et al. Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan *Hydra*. *J Biol Chem* 2009; 284:1896-905.

- Jung, W.K., Jo, H.Y., Qian, Z.J., Jeong, Y.J., Park, S.G., Choi, I.W., Kim, S.K., 2007b. A novel anticoagulant protein with high affinity to blood coagulation factor Va from *Tegillarca granosa*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 832–838.
- Kanoh, K., Adachi, K., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yasumoto, K., Kusumi, T., Okumura, K., Kirikae, T., 2008a. New Sulfoalkyl resorcinol from marine-derived fungus, *Zygosporium sp.* KNC52. *J. Antibiot. (Tokyo)* 61, 192–194.
- Kanoh, K., Okada, A., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Matsuda, S., Shizuri, Y., Utsumi, R., 2008b. Ascochyatin, a novel bioactive spirodioxynaphthalene metabolite produced by the marine derived fungus, *Ascochyta sp.* NGB4. *J. Antibiot. (Tokyo)* 61, 142–148.
- Kasetrathat, C., Ngamrojanavanich, N., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P., 2008. Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium sp.* and CRI247-01. *Phytochemistry* 69, 2621–2626.
- Keen, T.E.B., 1969. The hemolytic properties of extracts of tentacles from the cnidarian *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 7, 55–63.
- Keffer, J.L.; Plaza, A.; Bewley, C.A. Motualevic acids A–F, antimicrobial Acids from the Sponge *Siliquaria spongia sp.* *Org. Lett.* 2009, 11, 1087–1090.
- Kelso, G.; Blumenthal, K. Identification and characterization of novel sodium channel toxins from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Toxicon* 1998, 36, 41–51.
- Kem, W.R.; Parten, B.; Pennington, M.W.; Price, D.A.; Dunn, B.M. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 1989, 28, 3483–3489.
- Khalturin K, Panzer Z, Cooper MD et al. Recognition strategies in the innate immune system of ancestral chordates. *Mol Immunol* 2004; 41:1077-87.
- Khoo, K.S.; Kam, W.K.; Khoo, H.E.; Gopalakrishnakone, P.; Chung, M.C. Purification and partial characterization of two cytolysins from a tropical sea anemone, *Heteractis magnifica*. *Toxicon* 1993, 31, 1567–1579.
- Kihara, H., Anraku, M., Ohno, M., Hashimura, S., 1988. Tetrodotoxinunaffected depolarization of frog muscles induced by the venom of jellyfish (Genus *Aurelia*). *Jap. J. Physiol.* 38, 839–849.
- Kim, J. H., Kim W., and Cunningham C. W.. 1999. A New Perspective on Lower Metazoan Relationships from 18S rDNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 16:423– 427.
- Kitani, Y., Kikuchi, N., Zhang, G., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., Nagashima, Y., 2008. Antibacterial action of l-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 149, 394–400.
- Kleinhaus, A.L., Cranfield, P.F., Burnett, J.W., 1973. The effects on canine cardiac Purkinje fibers of *Chrysaora quinquecirrha* (sea nettle) toxin. *Toxicon* 11, 341–349.
- Klyshko, E.V.; Issaeva, M.P.; Monastyrnaya, M.M.; Il'yna, A.P.; Guzev, K.V.; Vakorina, T.I.; Dmitrenok, P.S.; Zykova, T.A.; Kozlovskaya, E.P. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* 2004, 44, 315–324.
- Knack BA, Iguchi A, Shinzato C, Hayward DC, Ball EE, Miller, DJ Unexpected diversity of cnidarian integrins: expression during coral gastrulation. *BMC Evol. Biol.* 8: 136. 2008
- Kortschak et al, 2003;. Kuo et al, 2004, Kusserow et al, 2005;. Dunn et al, 2006; Hemmerich et al, 2007)
- Kossuga, M.H., Nascimento, A.M., Reimao, J.Q., Tempone, A.G., Taniwaki, N.N., Veloso, K., Ferreira, A.G., Cavalcanti, B.C., Pessoa, C., Moraes, M.O., Mayer, A.M., Hajdu, E., Berlinck, R.G., 2008. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. *J. Nat. Prod.* 71, 334–339.
- Krebs, H.C.; Habermehl, G.G. Isolation and structural determination of a hemolytic active peptide from the sea anemone *Metridium senile*. *Naturwissenschaften* 1987, 74, 395–396.
- Kristan, K.C.; Viero, G.; Dalla Serra, M.; Macek, P.; Anderluh, G. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 2009, 54, 1125–1134.

- Kumar, R., Chaturvedi, A.K., Shukla, P.K., Lakshmi, V., 2007. Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4387–4391.
- Kunze, B., Bohlendorf, B., Reichenbach, H., Hofle, G., 2008. Pedein A and B: production, isolation, structure elucidation and biological properties of new antifungal cyclopeptides from *Chondromyces pediculatus* (Myxobacteria). *J. Antibiot. (Tokyo)* 61, 18–26
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hrouda M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature.* 2005;433:156–160. doi: 10.1038/nature03158.
- Kuznetsov SG, Anton-Erxleben F, Bosch TCG. Epithelial interactions in Hydra: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *J Exp Biol* 2002; 205:3809-17.
- Kuznetsov SG, Bosch TCG. Self/nonself recognition in Cnidaria: contact to allogeneic tissue does not result in elimination of nonself cells in *Hydra vulgaris*. *Zoology* 2003; 106:109-16.
- Kvennefors ECE, Leggat W, Hoegh-Guldberg O, Degnan BM, Barnes AC. An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 1582-1592, 2008.
- Kwan, J.C.; Meickle, T.; Ladwa, D.; Teplitski, M.; Paul, V.; Luesch, H. Lyngbyoic acid, a “Tagged” fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biosyst.* 2011, 7, 1205–1216.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lane, A.L.; Stout, E.P.; Lin, A.S.; Prudhomme, J.; Le, R.K.; Fairchild, C.R.; Franzblau, S.G.; Hay, M.E.; Aalbersberg, W.; Kubanek, J. Antimalarial bromophycolides J–Q from the fijian red alga *Callophycus serratus*. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 2736–2742.
- Lanio M.E., Morera V., Alvarez C., Tejuca M., Gomez T., Pazos F., Basada V., Martinez D., Huerta V., Padron G., Chavez M.A., 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus* *Toxicon* 39 -187.
- Laville, R.; Thomas, O.P.; Berrue, F.; Marquez, D.; Vacelet, J.; Amade, P. Bioactive guanidine alkaloids from two caribbean marine sponges. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1589–1594.
- Lebouvier, N.; Jullian, V.; Desvignes, I.; Maurel, S.; Parenty, A.; Dorin-Semlat, D.; Doerig, C.; Sauvain, M.; Laurent, D. Antiplasmodial activities of homogentisic acid derivative protein kinase inhibitors isolated from a vanuatu marine sponge *Pseudoceratina sp.* *Mar. Drugs* 2009, 7, 640–653.
- Lee H, Jung E, Kang C, Yoon W D, Kim JS, Kim E Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity *Toxicon* 58 (2011) 277–284
- Lee, D., Shin, J., Yoon, K.M., Kim, T., Lee, S.H., Lee, H.S., Oh, K.B., 2008. Inhibition of *Candida albicans* isocitrate lyase activity by sesterterpene sulfates from the tropical sponge *Dysidea sp.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5377–5380
- Lee, H.S., Lee, T.H., Lee, J.H., Chae, C.S., Chung, S.C., Shin, D.S., Shin, J., Oh, K.B., 2007a. Inhibition of the pathogenicity of *Magnaporthe grisea* by bromophenols, isocitrate lyase inhibitors, from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6923–6928.
- Lee, J.U., Kang, D.I., Zhu, W.L., Shin, S.Y., Hahm, K.S., Kim, Y., 2007b. Solution structure and biological functions of the antimicrobial peptide, arenicin-1, and its linear derivative. *Biopolymers* 88, 208–216.
- Lenhoff HM, Lenhoff SG 1988 How the animal nature of marine cnidarians was recognized and the nematocyst discovered. In: *The biology of nematocysts* (Hessinger DA, Lenhoff HM, eds.). Academic Press, San Diego
- Lin, A.S.; Stout, E.P.; Prudhomme, J.; Le, R.K.; Fairchild, C.R.; Franzblau, S.G.; Aalbersberg, W.; Hay, M.E.; Kubanek, J. Bioactive bromophycolides R–U from the Fijian red alga *Callophycus serratus*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 275–278.
- Lin, X.-Y., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K., 1996. A polypeptide toxin in the sea anemone *Actinia equina* homologous with other sea anemone sodium channel toxins: isolation and amino acid sequence. *Toxicon* 34, 57–65.

- Linington, R.G.; Clark, B.R.; Trimble, E.E.; Almanza, A.; Urena, L.D.; Kyle, D.E.; Gerwick, W.H. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: Isolation and structural elucidation of gallinamide A. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 14–17.
- Llewellyn, L. E., and Norton, R. S. (1991) *Biochem. Int.* 24, 937–946
- Look, S.A., Fenical, W., Jacobs, R.S., Clardy, J., 1986. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6238–6240.
- Loret, E.P.; del Valle, R.M.; Mansuelle, P.; Sampieri, F.; Rochat, H. Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 16785–16788.
- Lu, C.X., Li, J., Sun, Y.X., Qi, X., Wang, Q.J., Xin, X.L., Geng, M.Y., 2007. Sulfated polymannuroguluronate, a novel anti-AIDS drug candidate, inhibits HIV-1 Tat-induced angiogenesis in Kaposi's sarcoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1330–1339.
- Lubbock R. 1980. Clone-specific cellular recognition in a sea anemone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6667-6669, 1980.
- Lukyanov, S.; Kozlovskaya, E. Amino acid sequence of RTX-A's isoform actinoporin from the sea anemone, *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* 2006, 47, 517–520.
- Ma, W.S.; Mutka, T.; Vesley, B.; Amsler, M.O.; McClintock, J.B.; Amsler, C.D.; Perman, J.A.; Singh, M.P.; Maiese, W.M.; Zaworotko, M.J.; et al. Norselic acids A–E, highly oxidized anti-infective steroids that deter mesograzers, from the antarctic sponge *Crella sp.* *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1842–1846.
- Macek, P., Lebez, D., 1988. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* 26, 441–451
- Macherla, V.R., Liu, J., Sunga, M., White, D.J., Grodberg, J., Teisan, S., Lam, K.S., Potts, B.C., 2007. Lipoxazolidinones A, B, and C: antibacterial 4-oxazolidinones from a marine actinomycete isolated from a Guam marine sediment. *J. Nat. Prod.* 70, 1454–1457.
- Maeda, M.; Honma, T.; Shiomi, K. Isolation and cDNA cloning of type 2 sodium channel peptide toxins from three species of sea anemones (*Cryptodendrum adhaesivum*, *Heterodactyla hemprichii* and *Thalassianthus aster*) belonging to the family Thalassianthidae. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2010, 157, 389–393.
- Maisano M., Trapani M.R., Parrino V., Parisi M.G., Cappello T., D'Aagata A., Benenati G., Natalotto A., Mauceri A., Cammarata M. Haemolytic activity and characterization of nematocyst venom from *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa) *Italian Journal of Zoology*, 2013, 1–9
- Malpezzi, E.L.; de Freitas, J.C.; Muramoto, K.; Kamiya, H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 1993, 31, 853–864.
- Marinlit 2007. A marine literature database produced and maintained by the Department of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand)
- Martinez, G.; Kopeyan, C. Toxin III from *Anemonia sulcata*: Primary structure. *FEBS Lett.* 1977, 84, 247–252.
- Matsuda, S.; Adachi, K.; Matsuo, Y.; Nukina, M.; Shizuri, Y. Salinisporamycin, a novel metabolite from *Salinispora arenicola*. *J. Antibiot.* 2009, 62, 519–526.
- Mayer Alejandro M. S., Rodríguez Abimael D., Tagliatalata-Scafati Orazio and Fusetani Nobuhiro Review Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action *Mar. Drugs* 2013, 11, 2510-2573
- Mayer AMS, Gustafson KR. Marine pharmacology in 2005–2006: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer* 2008;44:2357–87;
- Mayer AMS, Hamann MT. Marine pharmacology in 2001–2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol* 2005;140:265–86;

- Mayer AMS, Lehmann VKB. Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds. *Anticancer Res* 2001;21:2489–500; Mayer AMS. Marine pharmacology in 1998: antitumor and cytotoxic compounds. *The Pharmacologist* 1999;41:159–64;
- Mayer AMS, Lehmann VKB. Marine pharmacology in 1998: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *The Pharmacologist* 2000;42:62–9
- Mayer AMS, Rodriguez AD, Berlinck RG, Hamann MT. Marine pharmacology in 2005-6: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790:283–308;
- McArthur, K.A., Mitchell, S.S., Tsueng, G., Rheingold, A., White, D.J., Grodberg, J., Lam, K.S., Potts, B.C., 2008. Lynamycins A–E, chlorinated bisindole pyrrole antibiotics from a novel marine actinomycete. *J. Nat. Prod.* 71, 1732–1737
- McPhail, K.L., Correa, J., Linington, R.G., Gonzalez, J., Ortega-Barria, E., Capson, T.L., Gerwick, W.H., 2007. Antimalarial linear lipopeptides from a Panamanian strain of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* 70, 984–988.
- Medina, M., Collins A. G., Silberman J. D., and Sogin M. L.. 2001. Evaluating Hypotheses of Basal Animal Phylogeny Using Complete Sequences of Large and Small Subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:9707– 9712.
- Meinardi E, Florin-Christensen M, Paratcha G, Azcurra JM, Florin-Christensen J. The molecular basis of the self/nonself selectivity of a coelenterate toxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;216:348–354. doi: 10.1006/bbrc.1995.2630.
- Meszáros, A., Bigger, C., 1999. Qualitative and quantitative study of wound healing processes in the coelenterate, *Plexaurella fusifera*: spatial, temporal, and environmental (light attenuation) influences. *J. Invert. Pathol.* 73, 321–331.
- Metrione, R.M.; Schweitz, H.; Walsh, K.A. The amino acid sequence of toxin RpIII from the sea anemone, *Radianthus paumotensis*. *FEBS Lett.* 1987, 218, 59–62.
- Miljanich, 1997 G.P Miljanich, Venom peptides as human pharmaceuticals. *Sci. Med.*, Sept/Oct (1997), pp. 6–15.
- Miller DJ, Hemmerich G, Ball E, Hayward DC, Khalturin K, Funayama N, Agata K, Bosch TCG. The innate immune repertoire in Cnidaria - ancestral complexity and stochastic gene loss. *Gen. Biol.* 8: R59, 2007.
- Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K., 1998. Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Lett.* 427, 149–151.
- Minagawa, S.; Ishida, M.; Shimakura, K.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura aff. xanthogrammica*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1997, 118, 381–386.
- Mokady O, Buss LW. Transmission genetics of allorecognition in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria:Hydrozoa). *Genetics* 1996; 143:823-7.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 172, 495–498.
- Moran, Y.; Gordon, D.; Gurevitz, M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels- molecular and evolutionary features. *Toxicon* 2009, 54, 1089–1101.
- Moran, Y.; Weinberger, H.; Sullivan, J.C.; Reitzel, A.M.; Finnerty, J.R.; Gurevitz, M. Concerted evolution of sea anemone neurotoxin genes is revealed through analysis of the *Nematostella vectensis* genome. *Mol. Biol. Evol.* 2008, 25, 737–747.
- Moran, Y.; Weinberger, H.; Sullivan, J.C.; Reitzel, A.M.; Finnerty, J.R.; Gurevitz, M. Concerted evolution of sea anemone neurotoxin genes is revealed through analysis of the *Nematostella vectensis* genome. *Mol. Biol. Evol.* 2008, 25, 737–747.

- Müller WE, Müller I, Zahn RK, Maidhof A. Intraspecific recognition system in scleractinian corals: morphological and cytochemical description of the autolysis mechanism. *J Histochem Cytochem.* 1984;32:285–288.
- Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology* (7th Ed), Garland Science, New York, 2008.
- Mydlarz LD, Holthouse SF, Peters EC, Harvell CD. Cellular responses in sea fan corals: Granular amoebocytes react to pathogen and climate stressors. *PLoS ONE* 3(3):e1811, 2008.
- Mydlarz LD, Jacobs RS. Comparison of an inducible oxidative burst in free-living and symbiotic dinoflagellates reveals properties of pseudopterosins. *Phytochemistry* 65: 3231-3241, 2004.
- Na, M., Meujo, D.A.F., Kevin, D., Hamann, M.T., Anderson, M., Hill, R.T., 2008. A new antimalarial polyether from a marine *Streptomyces* sp. H668. *Tetrahedron Lett.* 49, 6282–6285.
- Nagai, H.; Oshiro, N.; Takuwa-Kuroda, K.; Iwanaga, S.; Nozaki, M.; Nakajima, T. A new polypeptide toxin from the nematocyst venom of an Okinawan sea anemone *Phyllo-discus semoni* (Japanese name “unbachi-isoginchaku”). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66, 2621–2625.
- Nagai, H.; Oshiro, N.; Takuwa-Kuroda, K.; Iwanaga, S.; Nozaki, M.; Nakajima, T. Novel proteinaceous toxins from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Phyllo-discus semoni* Kwietniewski. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 294, 760–763.
- Nappi A.J., Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays.* 22(5), 469-80. 2000
- Newman DJ et al., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000 Jun;17(3):215-34. Review
- Newman, I., Fishelson, L., Kashman, Y., 1974. Sarcophine – a new toxin from the soft coral *Sarcophyton glaucum* (Alcyonaria). *Toxicon* 12, 593–598.
- Nishida, S.; Fujita, S.; Warashina, A.; Satake, M.; Tamiya, N. Amino acid sequence of a sea anemone toxin from *Parasicyonis actinostoloides*. *Eur. J. Biochem.* 1985, 150, 171–173.
- Nishimura, S.; Arita, Y.; Honda, M.; Iwamoto, K.; Matsuyama, A.; Shirai, A.; Kawasaki, H.; Kakeya, H.; Kobayashi, T.; Matsunaga, S.; et al. Marine antifungal theonellamides target β -hydroxysterol to activate rho1 signaling. *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 519–526.
- Norton R.S. (2012). *Biologically Active Peptides II ed. Sea Anemone Peptides.* Capitolo 60
- Norton Raymond S. Structures of sea anemone toxins *Toxicon* 54 (2009) 1075–1088
- Norton RS. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon.* 1991;29:1051–1084
- Norton, R.S.; Bobek, G.; Ivanov, J.O.; Thomson, M.; Fiala-Beer, E.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J. Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* 1990, 28, 29–41.
- Norton, T.R. Cardiotoxic polypeptides from *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt) and *A. elegantissima* (Brandt). *Fed. Proc.* 1981, 40, 21–25.
- Nyholm SV, Passegue E, Ludington WB et al. fester, A candidate allorecognition receptor from a primitive chordate. *Immunity* 2006; 25:163-73.
- Oku, N., Adachi, K., Matsuda, S., Kasai, H., Takatsuki, A., Shizuri, Y., 2008. Ariakemicins A and B, novel polyketide–peptide antibiotics from a marine gliding bacterium of the genus *Rapidithrix*. *Org. Lett.* 10, 2481–2484.
- Olano CT, Bigger CH Phagocytic activities of the gorgonian coral *Swiftia exserta*. *J. Invert. Pathol.* 76, 176–184, 2000.
- Oliveira, J.S.; Zaharenko, A.J.; Ferreira, W.A., Jr.; Konno, K.; Shida, C.S.; Richardson, M.; Lucio, A.D.; Beirao, P.S.; de Freitas, J.C. BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1764, 1592–1600.
- Oshiro, N.; Kobayashi, C.; Iwanaga, S.; Nozaki, M.; Namikoshi, M.; Spring, J.; Nagai, H. A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Actinaria villosa*. *Toxicon* 2004, 43, 225–228.

- Ospina, C.A., Rodriguez, A.D., Zhao, H., Raptis, R.G., 2007. Bipinapterolide B, a bioactive oxapolycyclic diterpene from the Colombian gorgonian coral *Pseudopterogorgia bipinnata*. *Tetrahedron Lett.* 48, 7520–7523.
- Ovchinnikova TV, Baladin SV, Aleshina GM, Tagaev AA, Leonova YF, Krasnodembsky ED, et al. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 348: 514-523, 2006.
- Palem, J.R.; Bedadala, G.R.; El Sayed, K.A.; Hsia, S.C. Manzamine a as a novel inhibitor of herpes simplex virus type-1 replication in cultured corneal cells. *Planta Med.* 2011, 77, 46–51.
- Palmer CV, Modi CK, Mydlarz LD. Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PLoS ONE* 4, e7298. 2009b
- Palmer CV, Mydlarz LD, Willis BL. Evidence of an inflammatory-like response in non-normally pigmented tissues of two scleractinian corals. *Proc. R. Soc. B* 275: 2687-2693, 2008.
- Palmer CV, Roth MS, Gates, RD. Red fluorescent protein responsible for pigmentation in trematode-infected *Porites compressa* tissues. *Biol. Bull.* 215,68–74, 2009a.
- Palmer CV, Traylor-Knowles N. Towards an integrated network of coral immune mechanisms. *Proc Biol Sci.* 2012 Oct 22;279(1745):4106-14
- Palmer CV, Traylor-Knowles NG, Willis BL, Bythell JC. Corals use similar immune cells and wound-healing processes as those of higher organisms. *PLoS ONE* 6, e23992, 2011.
- Patterson, M., Landolt, M., 1979. Cellular reaction to injury in the anthozoan *Anthopleura elegantissima*. *J. Invert. Pathol.* 33, 189–196.
- Perez S, Weis VM. Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *J. Exp. Biol.* 209: 2804-2810, 2006.
- Petes LE, Harvell CD, Peers EC, Webb MAH, Mullen KM. Pathogens compromise reproduction and induce melanization in *Caribbean Sea fans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 264: 167-171, 2003
- Pettit, G.R.; Knight, J.C.; Herald, D.L.; Pettit, R.K.; Hogan, F.; Mukku, V.J.; Hamblin, J.S.; Dodson, M.J.; Chapuis, J.C. Antineoplastic agents. 570. Isolation and structure elucidation of bacillistatins 1 and 2 from a marine *Bacillus silvestris*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 366–371.
- Philippe H, Derelle R, Lopez P et al. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol* 2009; 19:706-12.
- Pimentel-Elardo, S.M.; Kozytska, S.; Bugni, T.S.; Ireland, C.M.; Moll, H.; Hentschel, U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces sp.* strains isolated from mediterranean sponges. *Mar. Drugs* 2010, 8, 373–380.
- Plaza, A., Gustchina, E., Baker, H.L., Kelly, M., Bewley, C.A., 2007. Mirabamides A–D, depsipeptides from the sponge *Siliquariaspongia mirabilis* that inhibit HIV-1 fusion. *J. Nat. Prod.* 70, 1753–1760.
- Plaza, A.; Bifulco, G.; Keffer, J.L.; Lloyd, J.R.; Baker, H.L.; Bewley, C.A. Celebesides A-C and theopapuamides B-D, depsipeptides from an indonesian sponge that inhibit HIV-1 entry. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 504–512.
- Plaza, A.; Keffer, J.L.; Bifulco, G.; Lloyd, J.R.; Bewley, C.A. Chrysophaentins A–H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. *J. Am. Chem Soc.* 2010, 132, 9069–9077.
- Pontius, A., Krick, A., Kehraus, S., Brun, R., Konig, G.M., 2008a. Antiprotozoal activities of heterocyclic-substituted xanthenes from the marine-derived fungus *Chaetomium sp.* *J. Nat. Prod.* 71, 1579–1584.
- Powell AE, Nicotra ML, Moreno MA et al. Differential effect of allorecognition loci on phenotype in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa). *Genetics* 2007; 177:2101-7.
- Proksch P. and W.E.G. Muller, 2006. *Frontiers in Marine Biotechnology*. Horizon Bioscience: Norfolk, U.K.
- Pruksakorn, P.; Arai, M.; Kotoku, N.; Vilcheze, C.; Baughn, A.D.; Moodley, P.; Jacobs, W.R., Jr.; Kobayashi, M. Trichoderins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma sp.*, are active against dormant mycobacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 3658–3663.

- Pungercar, J.; Anderluh, G.; Macek, P.; Franc, G.; Strukelj, B. Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone *Actinia equina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1341, 105–107.
- Putnam, N.H.; Srivastava, M.; Hellsten, U.; Dirks, B.; Chapman, J.; Salamov, A.; Terry, A.; Shapiro, H.; Lindquist, E.; Kapitonov, V.V.; et al. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 2007, 317, 86–94.
- Quade MJ, Roth JA. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997 Sep 19;58(3-4):239-48.
- Quiocho F.A. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annu Rev Biochem.*;55, 287-315. 1986
- Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rodes C.P. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97, 183-350. 1985
- Raveh, A., Carmeli, S., 2007. Antimicrobial ambiguines from the cyanobacterium *Fischerella sp.* collected in Israel. *J. Nat. Prod.* 70, 196–201.
- Razpotnik, A.; Krizaj, I.; Kem, W.R.; Macek, P.; Turk, T. A new cytolytic protein from the sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol- and sphingomyelin-rich membranes. *Toxicon* 2009, 53, 762–769.
- Razpotnik, A.; Krizaj, I.; Šribar, J.; Kordiš, D.; Maček, P.; Frangež, R.; Kem, W.R.; Turk, T. A new phospholipase A2 isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis*—its primary structure and phylogenetic classification. *FEBS J.* 2010, 277, 2641–2653.
- Regalado, E.L.; Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Cachet, N.; Amade, P.; Thomas, O.P. Antiprotozoal steroidal saponins from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1404–1410.
- Reimer, N.S.; Yasunobu, C.L.; Yasunobu, K.T.; Norton, T.R. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin-B. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 8690–8693.
- Reitzel AM, Sullivan, JC, Traylor-Knowles N, Finnerty JR. Genomic survey of candidate stress-response genes in the estuarine anemone *Nematostella vectensis*. *Biol. Bull.* 214: 233–254, 2008.
- Ritchie KB. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 322: 1-14, 2006.
- Rodriguez-Lanetty M, Phillips WS, Weis VM. Transcriptome analysis of a cnidarian-dinoflagellate mutualism reveals complex modulation of host gene expression. *BMC Gen.* 7: 23, 2006
- Rosa SF, Powel IAE, Rosengarten RD, Nicotra ML, Moreno MA, Grimwood J, Lakkis FG, Dellaporta SL, Buss LW. Hydractinia Allodeterminant alr1 Resides in an Immunoglobulin Superfamily-like Gene Complex. *Current Biology*, Volume 20, Issue 12, 1122-1127, 27 May 2010
- Ross Neil W., Firth Kara J., Wang Anping, Burka John F., Johnson Stewart C. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation, *Diseases of aquatic organisms* 41: 43-51, 2000
- Rubio, B.K., van Soest, R.W., Crews, P., 2007. Extending the record of meroditerpenes from *Cacospongia* marine sponges. *J. Nat. Prod.* 70, 628–631.
- Rubio, B.K.; Tenney, K.; Ang, K.H.; Abdulla, M.; Arkin, M.; McKerrow, J.H.; Crews, P. The marine sponge *Diacarnus bismarckensis* as a source of peroxiterpene inhibitors of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of sleeping sickness. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 218–222.
- Sadd BM, Siva-Jothy MT. Self-harm caused by an insect's innate immunity. *Proc. R. Soc. B* 273: 2571–2574, 2006.
- Salih A, Larkum AWD, Cox C. Photoprotection from photoinhibition of symbiotic algae in corals by fluorescent pigments. *Photosynth. Res.* 69: 221–222, 2001.
- Salvini-Plawen, L. 1978. On the Origin and Evolution of the Lower Metazoa. *Zeitschrift fuer Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 16:40– 88.
- Sanchez, L.M.; Lopez, D.; Vesely, B.A.; Della, T.G.; Gerwick, W.H.; Kyle, D.E.; Linington, R.G. Almiramides A–C: Discovery and development of a new class of leishmaniasis lead compounds. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 4187–4197.

- Satish Kumar V., Santosh Kumar S., Abhishek M. and Shivsharan S., 2010. In vitro cytotoxicity of *Argemone mexicana* Against Different Human Cancer Cell Lines. *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research*. Vol. 1, No.1, 37-39
- Scala, F.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Tagliatalata-Scafati, O.; Tierney, M.; Kaiser, M.; Tasdemir, D. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. *Mar. Drugs* 2010, 8, 2162–2174.
- Scheffler, J.J.; Tsugita, A.; Linden, G.; Schweitz, H.; Lazdunski, M. The amino acid sequence of toxin V from *Anemonia sulcata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, 107, 272–278.
- Schweitz H, Bruhn T, Guillemare E, Moinier D, Lancelin J-M, Beress L, and Lazdunski M 1995 Kalicludines and Kaliseptine: two different classes of sea anemones toxins for voltage-sensitive K_v channels. *J Biol Chem* 270:25121– 25126.
- Schweitz, H.; Bidard, J.N.; Frelin, C.; Pauron, D.; Vijverberg, H.P.M.; Mahasneh, D.M.; Lazdunski, M.; Vilbois, F.; Tsugita, A. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry* 1985, 24, 3554–3561.
- Scrutton, C.T., 1979. Early Fossil Cnidarians. In: House, M.R. (Ed.), *The Origin of Major Invertebrate Groups*. Academic Press, London, pp. 161–207.
- Seipel K, Schmid V. Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 589–599, 2006.
- Shaini Thomas; Shreyas Karnik; Ram Shankar Barai; V. K. Jayaraman; Susan Idicula Thomas CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides *Nucleic Acids Research* 2009 D774–D780 *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38
- Shapo JL, Moeller PD, Galloway SV. Antimicrobial activity in the common seawhip, *Leptogorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonaceae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 148: 65-73, 2007.
- Shiomi, K.; Honma, T.; Ide, M.; Nagashima, Y.; Ishida, M.; Chino, M. An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon* 2003, 41, 229–236.
- Shiomi, K.; Lin, X.Y.; Nagashima, Y.; Ishida, M. Isolation and amino acid sequence of a polypeptide toxin from the sea anemone *Radianthus crispus*. *Fish. Sci.* 1996, 62, 629–633.
- Shiomi, K.; Qian, W.H.; Lin, X.Y.; Shimakura, K.; Nagashima, Y.; Ishida, M. Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1335, 191–198.
- Simmons, T.L., Engene, N., Urena, L.D., Romero, L.I., Ortega-Barria, E., Gerwick, L., Gerwick, W.H., 2008. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. *J. Nat. Prod.* 71, 1544–1550.
- Simpson, R.J.; Reid, G.E.; Moritz, R.L.; Morton, C.; Norton, R.S. Complete amino acid sequence of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Eur. J. Biochem.* 1990, 190, 319–328.
- Smith-Keune C, Dove S. Gene expression of a green fluorescent protein homolog as a host-specific biomarker of heat stress within a reef-building coral. *Mar. Biotechnol.* 10, 166–180, 2008.
- Soderhall K., Smith V.J. The prophenoloxidase activating system as a recognition and defence system in arthropods. In: "Hemocytic and humoral immunity in arthropods" (A.P. Gupta, Ed.), pp. 251-286. Wiley, New York. 1986
- Spagnuolo, A.; Zanetti, L.; Cariello, L.; Piccoli, R. Isolation and characterization of two genes encoding calitoxins, neurotoxic peptides from *Calliactis parasitica* (Cnidaria). *Gene* 1994, 138, 187–191.
- Standker, L.; Beress, L.; Garateix, A.; Christ, T.; Ravens, U.; Salceda, E.; Soto, E.; John, H.; Forssmann, W.G.; Aneiros, A. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* 2006, 48, 211–220.
- Stout, E.P.; Hasemeyer, A.P.; Lane, A.L.; Davenport, T.M.; Engel, S.; Hay, M.E.; Fairchild, C.R.; Prudhomme, J.; Le, R.K.; Aalbersberg, W.; et al. Antibacterial neurymenolides from the fijian red alga *Neurymenia fraxinifolia*. *Org. Lett.* 2009, 11, 225–228.

- Sunahara, S.; Muramoto, K.; Tenma, K.; Kamiya, H. Amino acid sequence of two sea anemone toxins from *Anthopleura fuscoviridis*. *Toxicon* 1987, 25, 211–219.
- Tadesse, M.; Strom, M.B.; Svenson, J.; Jaspars, M.; Milne, B.F.; Torfoss, V.; Andersen, J.H.; Hansen, E.; Stensvag, K.; Haug, T. Synoxazolidinones A and B: Novel bioactive alkaloids from the ascidian *Synoicum pulmonaria*. *Org. Lett.* 2010, 12, 4752–4755.
- Tadesse, M.; Tabudravu, J.N.; Jaspars, M.; Strom, M.B.; Hansen, E.; Andersen, J.H.; Kristiansen, P.E.; Haug, T. The antibacterial ent-eusynstyelamide B and eusynstyelamides D, E, and F from the arctic bryozoan *Tegella cf. spitzbergensis*. *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 837–841.
- Tagliatalata-Scafati, O.; Fattorusso, E.; Romano, A.; Scala, F.; Barone, V.; Cimino, P.; Stendardo, E.; Catalanotti, B.; Persico, M.; Fattorusso, C. Insight into the mechanism of action of plakortins, Simple 1,2-Dioxane antimalarials. *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8, 846–856.
- Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 8, 215, 2007.
- Takeya, H., Onikura, A., Nikai, T., Sugihara, H., Iwanag, S., 1990. Primary structure of a haemorrhagic metalloproteinase, HT-2, isolated from the venom of *Crotalus ruber ruber*. *J. Biochem.* 108, 711–719
- Talarico, L.B., Duarte, M.E., Zibetti, R.G., Nosedá, M.D., Damonte, E.B., 2007. An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Planta Med.* 73, 1464–1468.
- Talesa V, Romani R, Rosi G, Giovannini E. Presence of (an Acetylcholinesterase in the Cnidarian *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniaria) and of a Thiocholine Ester-Hydrolyzing Esterase in the Sponge *Spongia offCicinaZis* (Demospongiae: Keratosa) THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY 276:102-III(1996)
- Tanaka, M.; Haniu, M.; Yasunobu, K.T.; Norton, T.R. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin A. *Biochemistry* 1977, 16, 204–208.
- Tardent, P., 1963. Regeneration in the Hydrozoa. *Biol. Rev.* 38, 293–333
- Tasdemir, D., Topaloglu, B., Perozzo, R., Brun, R., O'Neill, R., Carballeira, N.M., Zhang, X., Tonge, P.J., Linden, A., Ruedi, P., 2007. Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6834–6845
- Teasdale, M.E.; Liu, J.; Wallace, J.; Akhlaghi, F.; Rowley, D.C. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 567–572.
- Technau U, Rudd S, Maxwell P, Gordon PM, Saina M, Grasso LC, Hayward DC, Sensen CW, Saint R, Holstein TW, et al. Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends Genet.* 2005;21:633–639. doi: 10.1016/j.tig.2005.09.007.
- Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. Cembranoid diterpenes from the caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1595–1602.
- Till, M.; Prinsep, M.R. 5-Bromo-8-methoxy-1-methyl- β -carboline, an alkaloid from the New Zealand marine bryozoan *Pterocella vesiculosa*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 796–798.
- Torrent Marc, Di Tommaso Paolo, Pulido David, Nogués M. Victòria, Notredame Cedric, Boix Ester and Andreu David AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions *BIOINFORMATICS* Vol. 28 no. 1 2012, pages 130–131
- Torrent Marc, Nogués Victòria M and Boix Ester A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins *BMC Bioinformatics* 2009, 10:373
- Trapido-Rosenthal HG, Sharp KH, Galloway TS, Morrall CE. Nitric oxide and cnidarian-dinoflagellate symbiosis: pieces of a puzzle. *Amer. Zool.* 41: 247-257, 2001.
- Tripathi, A.; Puddick, J.; Prinsep, M.R.; Rottmann, M.; Tan, L.T. Lagunamides A and B: Cytotoxic and antimalarial cyclodepsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1810–1814.
- Turk T., William R. Kem 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 54 1031–1037.

- Uechi, G.; Toma, H.; Arakawa, T.; Sato, Y. Biochemical and physiological analyses of a hemolytic toxin isolated from a sea anemone *Actineria villosa*. *Toxicon* 2005, 45, 761–766.
- Uechi, G.; Toma, H.; Arakawa, T.; Sato, Y. Molecular characterization on the genome structure of hemolysin toxin isoforms isolated from sea anemone *Actineria villosa* and *Phyllodiscus semoni*. *Toxicon* 2010, 56, 1470–1476.
- Uechi, G.; Toma, H.; Arakawa, T.; Sato, Y. Molecular cloning and functional expression of hemolysin from the sea anemone *Actineria villosa*. *Protein Expr. Purif.* 2005, 40, 379–384.
- Ueoka, R.; Nakao, Y.; Kawatsu, S.; Yaegashi, J.; Matsumoto, Y.; Matsunaga, S.; Furihata, K.; van Soest, R.W.; Fusetani, N. Gracilioethers A–C, antimalarial metabolites from the marine sponge *Agelas gracilis*. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 4203–4207.
- Vargas-Ángel, B., Peters, E.C., Kramarsky-Winter, E., Gilliam, D.S., Dodge, R.E., 2007. Cellular reactions to sedimentation and temperature stress in the Caribbean coral *Montastraea cavernosa*. *J. Invert. Pathol.* 95, 140–145.
- Vasta G.R., Ahmed H., Fink N. E., Elola M.T., Marsh A.G., Snowden A., Odom E.W. Animal lectins as self/nonself recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. *Ann. N.Y. Acad.Sci.*, 712, 55-73. 1994
- Vicente, J.; Vera, B.; Rodríguez, A.D.; Rodríguez-Escudero, I.; Raptis, R.G. Euryjanicin A: A new cycloheptapeptide from the caribbean marine sponge *Prosuberites laughlini*. *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 4571–4574.
- Vik, A.; Prosznyak, A.; Vermeersch, M.; Cos, P.; Maes, L.; Gundersen, L.L. Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; Identification of hits for visceral leishmaniasis and chagas disease. *Molecules* 2009, 14, 279–288.
- Wainright, P. O., Hinkle G., Sogin M. L. and Stickel S. K.. 1993. The Monophyletic Origins of the Metazoa; An Unexpected Evolutionary Link with Fungi. *Science*, 260:240– 243.
- Walker, M.J.A., 1977. Pharmacological and biochemical properties of a toxin containing material from the jellyfish *Cyanea capillata*. *Toxicon* 15, 3–14. D.J. De Vries, P.M. Beart, *TIPS* 16 (1995) 275.
- Wang Y., K.L. Chua, H.E. Khoo, 2000. A new cytolysin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1478
- Wang Zhe and Wang Guangshun, APD: the Antimicrobial Peptide Database D590-D592 *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32
- Wang, L.; Ou, J.; Peng, L.; Zhong, X.; Du, J.; Liu, Y.; Huang, Y.; Liu, W.; Zhang, Y.; Dong, M.; et al. Functional expression and characterization of four novel neurotoxins from sea anemone *Anthopleura sp.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 313, 163–170.
- Wang, Y.; Chua, K.L.; Khoo, H.E. A new cytolysin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: Isolation, cDNA cloning and functional expression. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1478, 9–18.
- Wanke, E.; Zaharenko, A.J.; Redaelli, E.; Schiavon, E. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon* 2009, 54, 1102–1111.
- Wattanapiromsakul, C.; Plubrukarn, A.; Suwanborirux, K. 8-Isocyanoamphilecta-11(20),15-diene, a new antimalarial isonitrile diterpene from the sponge *Ciocalapata sp.* *Can. J. Chem.* 2009, 87, 612–618.
- Wei, X., Rodriguez, A.D., Wang, Y., Franzblau, S.G., 2007b. Novel ring B abeo-sterols as growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from a Caribbean Sea sponge, *Svenzea zeai*. *Tetrahedron Lett.* 48, 8851–8854.
- Wei, X., Rodriguez, I.I., Rodriguez, A.D., Barnes, C.L., 2007a. Caribenols A and B, sea whip derived norditerpenes with novel tricyclic skeletons. *J. Org. Chem.* 72, 7386–7389.
- Wei, X.; Nieves, K.; Rodríguez, A.D. Neopetrosiamine A, biologically active bis-piperidine alkaloid from the caribbean sea sponge *Neopetrosia proxima*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 5905–5908.
- Weinheimer, A.J., Spraggins, R.L., 1969. Chemistry of Coelenterates XV. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *Tetrahedron Lett.* 59, 5185–5188.

- Weis VM, Davy SK, Hoegh-Guldberg O, Rodriguez-Lanetty M, Pringle JR. Cell Biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends Ecol. Evol.* 23: 369-376, 2008.
- Weiss I.W., Drickamer K., Henrickson W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 254, 1608-1615. 1992.
- White SH, Wimley WC. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1999;28:319-65.
- Wimmer W, Blumbach B, Diehl-Seifert B, Koziol C, Batel R, Steffen R, et al., Increased expression of integrin and receptor tyrosine kinase genes during autograft fusion in the sponge *Geodia cydonium*. *Cell Adhesion Commun* 7: 111–124, 1999.
- Won, J., Rho B., and Song J. 2001. A Phylogenetic Study of the Anthozoa (Phylum Cnidaria) Based on Morphological and Molecular Characters. *Coral Reefs*, 20:39– 50.
- Work TM, Aeby GS (2010) Wound repair in *Montipora capitata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105: 116–119.
- Wright, A.D.; Lang-Unnasch, N. Diterpene formamides from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi* and their antimalarial activity in vitro. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 492–495.
- Wright, A.D.; McCluskey, A.; Robertson, M.J.; MacGregor, K.A.; Gordon, C.P.; Guenther, J. Antimalarial, anti-algal, anti-tubercular, anti-bacterial, anti-photosynthetic, and anti-fouling activity of diterpene isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*. *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 400–407.
- Wright, A.E., Botelho, J.C., Guzman, E., Harmody, D., Linley, P., McCarthy, P.J., Pitts, T.P., Pomponi, S.A., Reed, J.K., 2007. Neopeltolide, a macrolide from a lithistid sponge of the family Neopeltidae. *J. Nat. Prod.* 70, 412–416.
- Wunderer Gert, FRITZ Hans, Wachter Eimar, and Machleidt Werner; Amino-Acid Sequence of a Coelenterate Toxin : Toxin II from *Anemonia sulcata* *Eur. J. Biochem.* 68. 193-198 (1976)
- Wunderer, G.; Beress, L.; Machleidt, W.; Fritz, H. Broad-specificity inhibitors from sea anemones. *Methods Enzymol.* 1976, 45, 881–888.
- Wunderer, G.; Eulitz, M. Amino-acid sequence of toxin I from *Anemonia sulcata*. *Eur. J. Biochem.* 1978, 89, 11–17.
- Wunderer, G.; Machleidt, W.; Wachter, E. Toxin II from *Anemonia sulcata*-the first sequence of a coelenterate toxin. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1976, 357, 239–240.
- Yamada, M.; Takahashi, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Ishiyama, A.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Omura, S.; Kobayashi, J. Zamamidine C, 3,4-dihydro-6-hydroxy-10,11-Epoxymanzamine A, and 3,4-Dihydromanzamine J N-oxide, new manzamine alkaloids from sponge *Amphimedon sp.* *Tetrahedron* 2009, 65, 2313–2317.
- Yamaguchi, Y.; Hasegawa, Y.; Honma, T.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. Screening and cDNA cloning of Kv1 potassium channel toxins in sea anemones. *Mar. Drugs* 2010, 8, 2893–2905.
- Yang, X.; Davis, R.A.; Buchanan, M.S.; Duffy, S.; Avery, V.M.; Camp, D.; Quinn, R.J. Antimalarial bromotyrosine derivatives from the Australian marine sponge *Hyattella sp.* *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 985–987.
- Yeung, S.Y., Thompson, D., Wang, Z., Fedida, D., Robertson, B., 2005. Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: significance for CNS and biophysical studies. *J. Neurosci* 25, 8735–8745.
- Ykova, T.A.; Kozlovskaya, E.P. Amino acid sequence of a neurotoxin from the anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1989, 15, 1301–1306.
- Young, J.A., 1974. The nature of tissue regeneration after wounding in the sea anemone *Calliactis parasitica* (Couch). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 54, 599–617.
- Yuan, W.H.; Yi, Y.H.; Tang, H.F.; Liu, B.S.; Wang, Z.L.; Sun, G.Q.; Zhang, W.; Li, L.; Sun, P. Antifungal triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia marmorata*. *Planta Med.* 2009, 75, 168–173.
- Yuyama, I, Harii S, Hidaka M, Algal symbiont type affects gene expression in juveniles of the coral *Acropora tenuis* exposed to thermal stress. *Mar. Environ. Res.* 76: 41–47, 2012.

- Zaharenko, A.J.; Ferreira, W.A., Jr.; de Oliveira, J.S.; Konno, K.; Richardson, M.; Schiavon, E.; Wanke, E.; de Freitas, J.C. Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: Purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 2008, 51, 1303–1307.
- Zaharenko, A.J.; Ferreira, W.A., Jr.; Oliveira, J.S.; Richardson, M.; Pimenta, D.C.; Konno, K.; Portaro, F.C.; de Freitas, J.C. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 2008, 3, 219–225.
- Zhang, D., Yang, X., Kang, J.S., Choi, H.D., Son, B.W., 2008a. Circumdatin I, a new ultraviolet-A protecting benzodiazepine alkaloid from a marine isolate of the fungus *Exophiala*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 61, 40–42.
- Zhang, Y., Ling, S., Fang, Y., Zhu, T., Gu, Q., Zhu, W.M., 2008b. Isolation, structure elucidation, and antimycobacterial properties of dimeric naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*. *Chem. Biodivers.* 5, 93–100.
- Zykova, T.A.; Kozlovskaya, E.P. Disulfide bonds in neurotoxin-III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1989, 15, 904–907.
- Zykova, T.A.; Kozlovskaya, E.P.; Eliakov, G.B. Amino acid sequence of neurotoxin II from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1988, 14, 878–882.
- Zykova, T.A.; Kozlovskaya, E.P.; Eliakov, G.B. Amino acid sequence of neurotoxins IV and V from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1988, 14, 1489–1494.
- Zykova, T.A.; Vinokurov, L.M.; Markova, L.F.; Kozlovskaya, E.P.; Elyakov, G.B. Amino-acid sequence of trypsin inhibitor IV from *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1985, 11, 293–301.