



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale**

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**Uno studio preliminare delle proteine implicate nella  
biocalcificazione di protisti marini  
(Foraminifera d'Orbigny, 1826)**

**Preliminary study of proteins involved in the  
biocalcification of marine protistan organisms  
(Foraminifera d'Orbigny, 1826)**

Tesi di Laurea Magistrale di:  
Elisa Costanzi

Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Anna Sabbatini

Correlatore:  
Prof. Adolfo Amici

**Sessione Autunnale (Ottobre 2022)  
Anno Accademico 2021/2022**

## INDICE

<b>1 Capitolo primo INTRODUZIONE</b> .....	5
<b>1.1 Foraminiferi</b> .....	5
<b>1.2 Biomineralizzazione nei foraminiferi</b> .....	7
<b>1.3 Il processo di formazione di una camera in un foraminifero perforato</b> .....	11
<b>1.4 La composizione della matrice organica nel guscio dei foraminiferi</b>	22
<b>1.5 Le Annessine come proteine di biomineralizzazione</b> .....	25
<b>1.6 Obiettivi</b> .....	27
<b>2 Capitolo secondo MATERIALI E METODI</b> .....	30
<b>2.1 Foraminiferi</b> .....	30
<b>2.2 Protocollo di Estrazione delle Proteine di Membrana</b> .....	34
2.2.1 Buffer di lisi .....	34
2.2.2. Soluzione madre DTT .....	35
2.2.3 Soluzione madre Carbonato .....	35
2.2.4 Preparazione dei gel per elettroforesi.....	35
<b>2.3 Western Blot</b> .....	37
2.3.1 Anticorpi .....	37

<b>2.4 Estrazione proteine di membrana ed elettroforesi in SDS-Page</b> .....	39
2.4.1 Prova sperimentale 1 .....	39
2.4.2 Prova sperimentale 2 .....	42
2.4.3 Prova sperimentale 3 .....	44
2.4.4 Prova sperimentale 4 .....	44
2.4.5 Prova sperimentale 5 .....	45
<b>2.5 Trasferimento proteico su membrana di nitrocellulosa e Western Blot</b> .....	45
2.5.1 Western Blot relativo al gel ricavato dalla Prova sperimentale 3 .	45
2.5.2 Western Blot relativo al gel ricavato dalla Prova sperimentale 4 .	46
2.5.3 Western Blot relativo al gel ricavato dalla Prova sperimentale 5 .	47
<b>3 Capitolo terzo RISULTATI</b> .....	48
<b>3.1 Gel estrazione proteica relativa alla Prova sperimentale 1</b> .....	48
<b>3.2 Gel estrazione proteica relativa alla Prova sperimentale 2</b> .....	50
<b>3.3 Membrana Western Blot relativo alla prova sperimentale 3</b> .....	52
<b>3.4 Membrana Western Blot relativo alla prova sperimentale 4</b> .....	52
<b>3.5 Membrana Western Blot relativo alla prova sperimentale 5</b> .....	56

<b>4 Capitolo quarto DISCUSSIONI .....</b>	<b>57</b>
<i>4.1 La rilevazione delle proteine di membrana in diverse specie di foraminiferi bentonici mediante gel elettroforetico .....</i>	<i>57</i>
<i>4.2 Discussione dei risultati del Western Blot: confronto degli anticorpi .....</i>	<i>67</i>
<i>4.3 Implicazioni dello studio .....</i>	<i>72</i>
<b>5 Capitolo quinto CONCLUSIONI .....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>79</b>

## Capitolo primo

### INTRODUZIONE

#### *1.1 Foraminiferi*

I foraminiferi sono protozoi, organismi eucariotici unicellulari, recentemente classificati come phylum all'interno dell'infraregno Rhizaria del Regno dei Chromista (WoRMS taxon details). Fanno parte della meiofauna per via delle loro dimensioni comprese tra 50 e 400  $\mu\text{m}$ . La loro cellula è protetta e rivestita esternamente da un guscio, spesso mineralizzato, che può raggiungere dimensioni eccezionali per un organismo unicellulare (fino a 11–14 cm di diametro). La presenza di parti mineralizzate consente ai gusci dei foraminiferi di fossilizzare con relativa facilità nelle rocce sedimentarie di origine marina. Il loro nome deriva da “foramina”, vale a dire da aperture interne, perlopiù invisibili all'esterno e che mettono in comunicazione le varie camere dei foraminiferi, organizzate in modi diversi. Il guscio dei foraminiferi è prevalentemente calcareo (ialino e porcellanaceo), ma può presentarsi anche agglutinante (arenaceo) e in alcuni casi chitinoso e siliceo. Il guscio può avere forme molto diverse; è attraversato da numerosi pori (perforato o ialino) o ne è privo (imperforato o porcellanaceo). La cavità del guscio può essere unica (monotalamici o uniloculari), o consistere di più camere (politalamici o multiloculari). La forma del guscio è molto varia, ed assieme alla

conformazione dell'apertura principale, è un carattere diagnostico per la classificazione. I foraminiferi sono sia planctonici che bentonici. Essi colonizzano gli ambienti marini, dalle zone intertidali a quelle batiali e spaziano dai poli ai tropici.

I foraminiferi fossili si incontrano attraverso tutte le formazioni geologiche dal Cambriano (545 Milioni di anni fa) fino ad oggi e sono universalmente considerati come degli ottimi fossili guida, nonché eccellenti indicatori ambientali o paleoambientali (Haq & Boersma, 1998). I foraminiferi, grazie alla loro abbondanza in tutti i mari, rivestono una grande importanza negli studi ecologici; essi, infatti, hanno preferenze definite relativamente a salinità, temperatura, disponibilità di cibo e concentrazione di ossigeno; la distribuzione spaziale e temporale di questi organismi quindi, controllata da una varietà di fattori abiotici e biotici, fornisce delle informazioni ambientali. È possibile, perciò, attraverso l'interpretazione della composizione qualitativa e quantitativa delle associazioni dei foraminiferi, ottenere notizie riguardo le caratteristiche chimiche e fisiche dell'ambiente in cui vivono.

Inoltre, lo sviluppo delle tecnologie ha permesso di ottenere risultati molto precisi come tecniche che prevedono l'analisi degli isotopi stabili dell'ossigeno ed altre in grado di fornire dati quantitativi riguardanti paleotemperatura e paleosalinità.

## ***1.2 Biomineralizzazione nei foraminiferi***

I foraminiferi, quindi, sono dotati di un guscio o scheletro, di solito concamerato, in genere calcareo, talvolta agglutinante o di pseudochitina, o più semplicemente organico. In particolare, i gusci carbonatici sia perforati che imperforati, contengono circa il 90 % di  $\text{CaCO}_3$ , a cui si aggiunge  $\text{MgCO}_3$  in percentuale variabile, e una grande varietà di elementi in bassa proporzione, tra cui più frequentemente ferro e silicio.

Il processo di calcificazione dei gusci dei foraminiferi rappresenta la fase di crescita in cui vengono definite le composizioni elementari ed isotopiche del guscio ed è anche il momento cruciale che modella la varietà morfologica di questo gruppo tassonomico (Nagai et al., 2018).

Negli ultimi anni, il guscio dei foraminiferi è stato ampiamente utilizzato come *proxy* paleoambientale e la sua composizione geochemica e isotopica è diventata uno degli strumenti principali per le ricostruzioni paleoambientali stesse; infatti, la morfologia e la composizione chimica del guscio dipendono in certa misura dall'ambiente (De Nooijer et al., 2014; Schiebel et al., 2017). La comprensione dei meccanismi alla base della calcificazione dei foraminiferi è stata ed è ancora oggi oggetto di grande interesse nel campo delle geoscienze. Ad esempio, è stato dimostrato che la temperatura dell'acqua marina e il rapporto Mg/Ca dei foraminiferi mostrano una forte correlazione lineare

(Nürnberg et al., 1996; Toyofuku et al., 2000). Risulta anche noto che il rapporto di incorporazione di Mg/Ca è variabile e specifico per ogni specie di foraminifero considerata (Toyofuku et al., 2011). Le distribuzioni chimiche, tuttavia, variano anche tra individui della stessa specie e presentano quella che viene definita zonazione, che si manifesta a livello della struttura della parete del guscio (Kunioka et al., 2006; van Dijk et al., 2017). Queste variazioni nella composizione chimica, sia inter- che intraspecifiche, sono definite "effetto vitale" (Urey, 1951).

Per ricostruire accuratamente i paleoambienti, è importante utilizzare *proxy* affidabili, come la composizione chimica e isotopica dei gusci dei foraminiferi. Pertanto, la comprensione dei processi biologici alla base della formazione delle camere ha assunto grande importanza. Il processo di formazione delle camere dei foraminiferi era già stato documentato nel 1854 con il genere *Peneroplis* (Schultze, 1854) e in seguito anche in molte altre specie. L'osservazione della struttura mediante microscopia elettronica a scansione e a trasmissione (SEM e TEM) è stata utilizzata per documentare in modo più dettagliato il processo cellulare di precipitazione della calcite durante la formazione della camera nella specie bentonica *Rosalina floridana* (Angell, 1967) e nelle specie planctoniche *Globorotalia truncatulinoides* (Hemleben et al., 1986) e *Orbulina universa* (Spero, 1988). Le caratteristiche comuni

riassumibili da queste osservazioni, indicano che il citoplasma e i vari tipi di strutture organiche alle quali ci si riferisce generalmente con i termini "foglietti" o "strati" (cioè strati organici come lo strato organico esterno, OOL, e lo strato organico interno, IOL) giocano ruoli fondamentali nella calcificazione.

Gli pseudopodi sono strutture chiave per la biologia dei foraminiferi. Essi rappresentano una parte del citoplasma e sono costituiti da strutture citoscheletriche quali microtubuli e filamenti di actina, e da altri organelli come mitocondri, strutture sferiche e vacuoli (Marszalek, 1969, rivisto in Travis e Bowser, 1991). Lo pseudopodio rappresenta una struttura cellulare multifunzionale coinvolta nello svolgimento di diverse funzioni come la locomozione, l'alimentazione, la digestione e la formazione delle camere. L'aspetto degli pseudopodi e la loro attività cambiano durante il processo di formazione della camera, durante il quale si sviluppano una serie di pseudopodi che assumono una particolare disposizione che ricorda l'aspetto di un ventaglio (Bé et al., 1979). In seguito, si forma una struttura organica che costituisce l'impalcatura per la formazione delle camere, chiamata *anlage* (Angell, 1967). Nei foraminiferi bentonici, attorno all'*anlage* si vengono a formare cisti composte da detriti estranei e altri materiali (Angell, 1967). L'*anlage* è in gran parte costituito da microstrutture schiumose e sferiche ( $< 1 \mu\text{m}$ ) (Angell, 1967;

Hemleben et al., 1986) e ha una forma rigonfia, che ha portato alcuni autori a chiamarlo "bulge" nei primi studi condotti sui foraminiferi planctonici (ad esempio, Bé et al., 1979). Questo *anlage* rigonfio rappresenta quindi la struttura tridimensionale precursore della camera.

Ci sono tre strati organici nell'*anlage*: quello sulla superficie esterna è stato definito OOL (Spero, 1988), quello al centro è stato inizialmente chiamato "membrana organica primaria" (POM) (Hemleben et al., 1986), ma in seguito tale termine è stato sostituito e modificato in "foglio organico primario" (POS) (Erez, 2003), e quello più interno viene chiamato IOL (Spero, 1988).

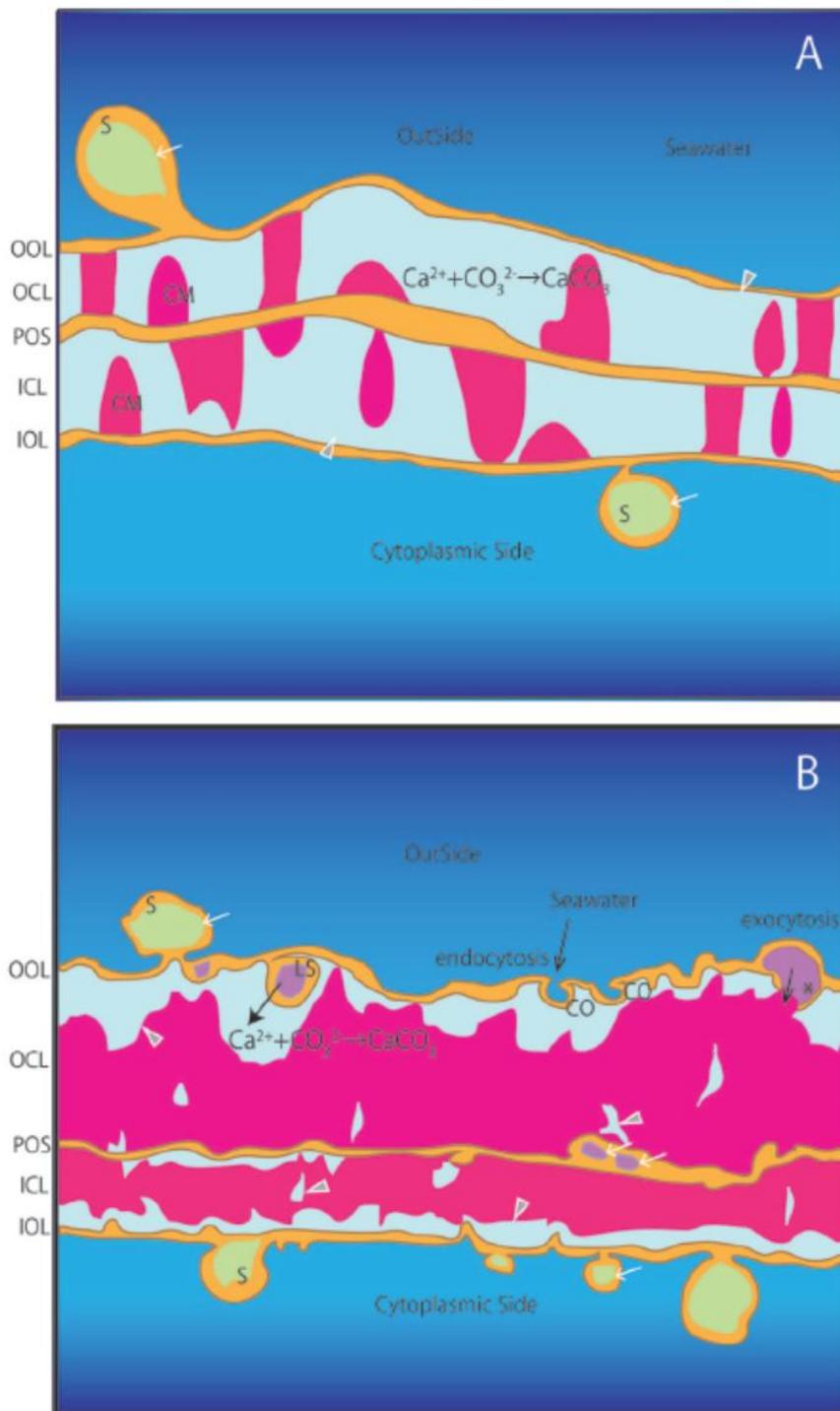
La precipitazione dei microcristalli di carbonato di calcio avviene su entrambi i lati del POS, tra lo strato organico esterno e quello interno. Oltre a questi tre strati organici, il termine *anlage* è ora accettato in modo generico per includere anche i numerosi pseudopodi che sono presenti intorno ad essi durante la calcificazione. Poiché diversi autori hanno opinioni e definizioni diverse sul significato di *anlage* (ad esempio Angell, 1979; Bé et al., 1979; Hemleben et al., 1986), di seguito ci asteniamo dall'utilizzare il termine *anlage* e usiamo invece "impalcatura organica" per riferirci alla struttura organica su cui è costruita la parete della camera.

### ***1.3 Il processo di formazione di una camera in un foraminifero perforato***

Al fine di comprendere le funzioni fondamentali degli strati organici POS, OOL e IOL durante la formazione della camera, Nagai et al. (2018) hanno applicato la tecnica del fascio ionico focalizzato (FIB) su di un campione di foraminiferi durante il processo di calcificazione, che consente di effettuare una sezione sottile del sito di calcificazione (SOC) per poi osservare il citoplasma e la morfologia ben conservata del guscio (cristalli di carbonato di calcio) mediante SEM/TEM. Le loro osservazioni mostrano chiaramente che l'impalcatura organica presenta numerosi spazi vuoti all'interno della struttura membranosa del SOC. Viene anche evidenziata la presenza del liquido di calcificazione e la messa in atto di meccanismi di eso- ed endocitosi. Nel processo descritto da Nagai et al. (2018) sono state rilevate numerose strutture definite schiumose presenti nel Sito di Calcificazione (SOC). Queste strutture costituiscono la base della matrice organica iniziale, precedentemente definita *anlage* ora impalcatura organica. Come descritto in precedenza, questa matrice è stata anche indicata da altri autori (Hemleben et al., 1986) come Membrana Organica Primaria (POM) e, solo più recentemente, è stato proposto il termine di Foglietto Organico Primario (POS). La presenza di numerose strutture vescicolari organiche (di diametro compreso tra submicron e 1 $\mu$ m) è stata descritta intorno agli strati organici sia a livello della superficie interna che di

quella esterna della parete di calcite, suggerendo il coinvolgimento attivo di questo strato, ovvero il POS, nella regolazione chimica del liquido di calcificazione presente nel SOC. Il Foglietto Organico Primario risulta infatti compreso tra due strati di calcite, ricoperti a loro volta da ulteriori strati organici esterni e interni. Il Foglietto Organico Primario funge da stampo per il processo di calcificazione; esso rappresenta la base sulla quale precipita il primo strato di calcite. Le analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) della camera in costruzione hanno mostrato la presenza di tre strati organici: lo Strato Organico Esterno (OOL), lo Strato Organico Interno (IOL) e il Foglietto Organico Primario (POS). Piccoli volumi di fluido sono presenti all'interno degli strati di calcite; queste sacche di liquido, se presenti, riflettono probabilmente la soluzione dalla quale viene precipitato il carbonato di calcio. Questo liquido di calcificazione ha un pH notevolmente più alto rispetto al mezzo circostante, e ciò è il risultato del pompaggio dei protoni che si verifica durante il processo di calcificazione. La differenza di pH può essere anche maggiore di due unità: ciò significa che il SOC è ben separato dall'ambiente esterno.

Possiamo quindi definire il SOC come la combinazione delle strutture organiche, del carbonato di calcio precipitato e gli spazi tra di essi, che insieme formano la parete della camera dei foraminiferi (Figura 1).



*Figura 1*

Illustrazione schematica del SOC. (A) Composizione durante le fasi iniziali. (B) Composizione durante le fasi successive; la componente calcarea risulta maggiormente rappresentata rispetto alle fasi iniziali.

OOL, strato organico esterno; OCL, strato calcareo esterno; POS, strato organico primario; ICL, strato calcareo interno; IOL, strato organico interno; S, strutture sferiche; CM, materiali calcarei.

La crescita della parete calcarea è bidirezionale: parte dal Foglietto Organico Primario per poi estendersi sia verso l'esterno, che verso il lato citoplasmatico. Precedenti studi hanno riportato l'esistenza di strutture sferiche, descritte come vescicole, attorno agli strati organici esterni e interni. L'interno delle strutture sferiche è infatti cavo. Alcune di esse si formano a partire dallo Strato Organico Esterno (OOL) a diretto contatto con l'acqua circostante; è quindi probabile che alcune di queste strutture sferiche racchiudano direttamente una parte dell'acqua marina circostante.

Considerata poi la connessione delle vescicole con gli strati organici esterni e interni (OOL/IOL), è stato definito il loro coinvolgimento nell'attuazione di meccanismi di esocitosi ed endocitosi. Un possibile significato attribuito a queste strutture sferiche è l'aumento dell'area totale disponibile per lo scambio tra l'acqua di mare e il liquido di calcificazione dei foraminiferi, dato che naturalmente, durante la calcificazione è necessario un continuo apporto di calcio e di carbonio.

Gli strati organici esterni e interni non sono semplici foglietti organici. Queste strutture sono effettivamente coinvolte nella mineralizzazione: agiscono probabilmente raccogliendo gli ioni necessari, trasportandoli in luoghi specifici e rilasciando sostanze non utilizzate.

Si ipotizza che il processo di calcificazione sia simile tra lo Strato Calcereo Interno (o lamella interna), sul lato citoplasmatico, e lo Strato Calcereo Esterno (o lamella esterna), sul lato esterno, anche se il contributo degli ioni provenienti dall'acqua di mare rispetto alla cellula è differente. Infatti, con il progredire della formazione della camera, lo strato di calcite precipitato sembra formare una barriera che ostacola il trasporto di ioni prelevabili dall'acqua marina circostante allo strato calcereo interno in crescita: in questo caso l'importanza del trasporto degli ioni dal lato citoplasmatico aumenterebbe.

È possibile che gli ioni prelevati dall'interno siano anch'essi di derivazione marina, poiché la camera in via di formazione non sembra essere completamente riempita di citoplasma, ma anche di acqua di mare: l'apertura consente infatti il contatto con l'acqua marina dell'ambiente circostante (Nagai et al., 2018).

Ricapitolando, l'intero processo risulta guidato dagli pseudopodi, estroflessioni della membrana che risultano in prolungamenti citoplasmatici multifunzionali, che si dispongono a formare un'impalcatura. Saranno infatti le caratteristiche morfologiche della componente organica a fungere da stampo per il processo di calcificazione. Dall'impalcatura degli pseudopodi si sviluppa quello che viene detto «sito di precipitazione del carbonato». Quest'ultimo, considerato il precursore della camera, è ricoperto di pseudopodi e risulta composto da tre

strati: lo Strato Organico Esterno (OOL), il Foglietto Organico Primario (POS) (la precipitazione dei cristalli di carbonato di calcio si verifica a livello di entrambi i lati del POS) e lo Strato Organico Interno (IOL).

In funzione della dimensione della camera che si viene a formare, il processo dura dalle 5 alle 8 ore. L'espansione degli pseudopodi a partire dall'apertura dell'ultima camera, che si dispongono a formare una sorta di ventaglio, ci informa dell'inizio del processo; seguiranno tre fasi.

Ad ogni modo Nagai et al. (2018) non hanno documentato il processo che porta alla formazione del Foglietto Organico Primario (POS) e soprattutto le strutture organiche coinvolte durante la formazione della camera.

Indubbiamente, l'impalcatura organica costruita prima della formazione della camera rappresenta il modello che determina la morfologia caratteristica dei foraminiferi, fungendo da stampo per la calcificazione. Infatti, quando il guscio dei foraminiferi viene dissolto, la struttura organica viene rivelata e presenta la stessa morfologia complessiva della parte calcarea (Banner e Williams, 1973). Spesso nella letteratura questa struttura organica prende il nome di "lining" ed è in grado di fossilizzare (Tyszka et al., 2021).

Poco prima dell'inizio della formazione della camera, vengono registrate particolari attività degli pseudopodi estroflessi. Una complessa rete di

pseudopodi si dispone a formare una sorta di ventaglio che si espande dall'apertura dell'ultima camera. Questa rete disposta a formare una densa raggiera rappresenta la caratteristica morfologia che permette di riconoscere gli individui che hanno avviato il processo di biocalcificazione e quindi di formazione delle camere.

Gli eventi che si susseguono in questo processo possono essere divisi in tre fasi.

#### *Fase iniziale*

La fase iniziale della formazione della camera dura approssimativamente 15 minuti, tuttavia, tale intervallo temporale varia notevolmente a seconda dell'individuo considerato e delle dimensioni della camera in formazione. La fase iniziale è lo stadio in cui la struttura organica necessaria alla formazione della camera viene costruita (Figura 2, a-b).

In seguito alla costruzione della rete pseudopodiale, un'aggregazione citoplasmatica inizia a risultare visibile intorno all'apertura dell'ultima camera calcificata esistente. Man mano che il citoplasma si espande, la rete pseudopodiale si ritrae, dando origine alla superficie della nuova camera.

Il completamento della struttura organica viene considerato la fine dello stadio iniziale.

### *Fase intermedia*

La fase intermedia della formazione della camera ha luogo nell'intervallo di tempo compreso tra il quindicesimo e il sessantesimo minuto. Durante questa fase i foraminiferi preparano l'impalcatura organica per la precipitazione del carbonato di calcio, che inizia in questa fase (Figura 2, c-d). Entro il trentesimo minuto, l'aggregazione citoplasmatica tende ad assumere la forma di una camera. A questo punto, gli pseudopodi sottili tendono a ritirarsi pur risultando ancora visibili, e una banda di carbonato di calcio in via di formazione, inizia a definire la superficie della struttura. Questa banda darà poi origine alla parete della camera.

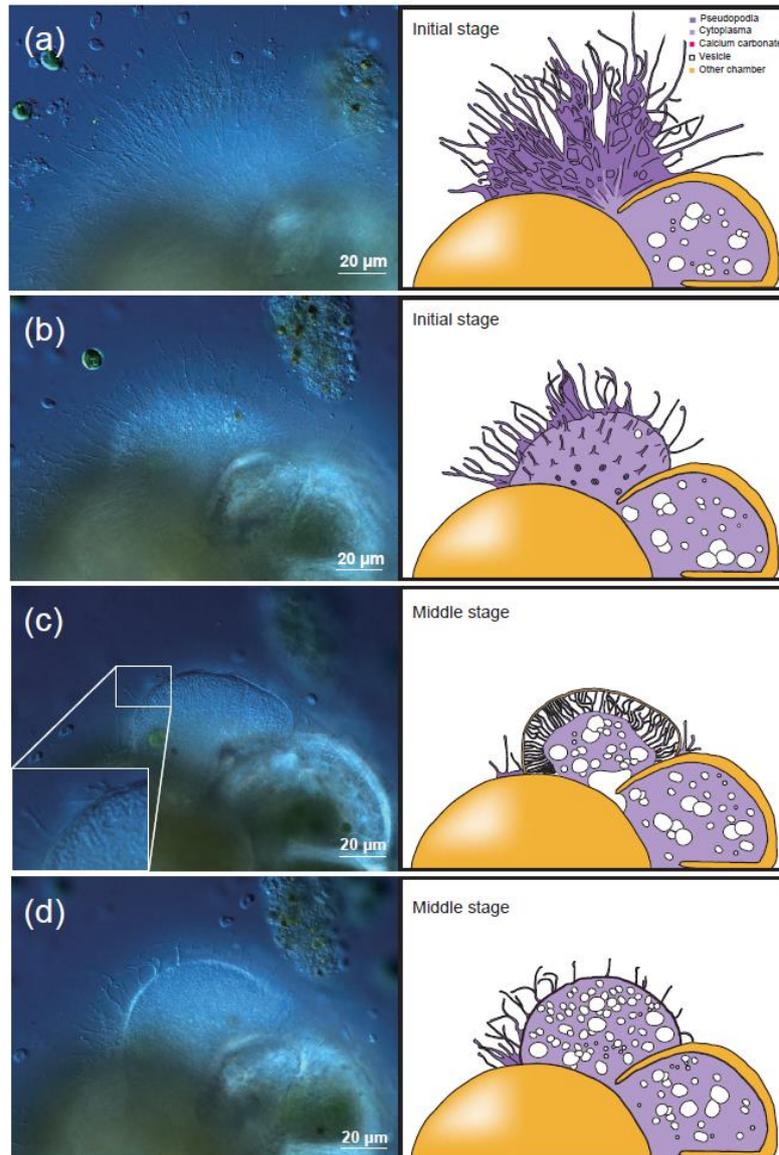
### *Fase finale*

Lo stadio finale della formazione della camera è definito come lo stadio in cui il materiale, con riferimento al carbonato di calcio, continua ad essere precipitato con il fine di ispessire la parete della camera stessa; ciò si verifica tra i minuti 60 e 400 (Figura 3).

L'inizio della fase tardiva corrisponde al momento in cui gli pseudopodi iniziano ad espandersi di nuovo andando a coprire l'impalcatura organica, e in particolare lo strato di carbonato di calcio.

All'inizio di questo stadio, gli pseudopodi si espandono dall'interno, quindi dal citoplasma, formando una rete densa, questa volta composta di filamenti più spessi. Il carbonato di calcio continua a essere precipitato nella parete in formazione.

L'aggregato di citoplasma che riempiva la camera di nuova formazione si ritira verso la camera precedentemente formata, lasciando uno spazio vuoto all'interno della nuova. L'ispessimento della parete della camera continua e durante questo processo, la densità della rete pseudopodiale sulla sua superficie aumenta. Solo quando l'ispessimento della parete della camera arriva al suo completamento, la rete pseudopodiale presente sulla superficie scompare. Ciò indica la fine del processo di formazione della camera: l'individuo inizia a mostrare una normale attività pseudopodiale (Nagai et al., 2018).



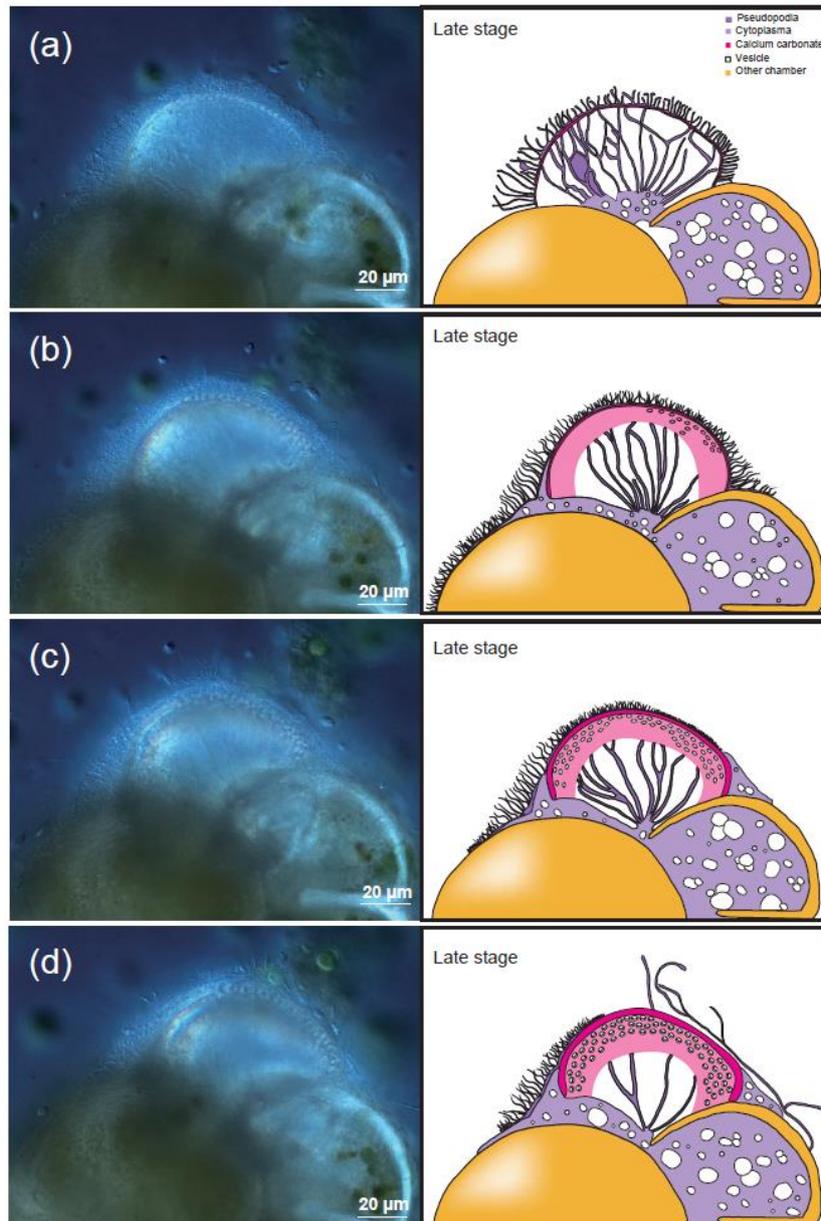
*Figura 2*

Osservazione in serie temporale della formazione delle camere mediante microscopia ottica. La fase iniziale della formazione della camera, in cui viene costruita l'impalcatura organica, è rappresentata in a-b. (a) Inizio della formazione della camera indicato da una densa irradiazione della rete pseudopodiale. (b) Un'aggregazione citoplasmatica diventa visibile intorno all'apertura dell'ultima camera esistente. Mentre questo citoplasma si espande, il reticolo pseudopodiale comincia a ritirarsi verso la superficie della nuova camera per completare la struttura.

Lo stadio intermedio, in cui inizia la precipitazione del carbonato di calcio, è illustrata in c-d. (c) Il citoplasma si concentra e il contorno della parete della camera in formazione è ora chiaramente visibile; gli pseudopodi sono ancora appena visibili sulla superficie. (d) Gli pseudopodi si ritraggono all'interno della parete della camera in formazione.

A sinistra: immagini al microscopio ottico. A destra: immagini schematiche.

Legenda colori: viola intenso=pseudopodia; viola chiaro=citoplasma; magenta=carbonato di calcio nella camera di nuova formazione; giallo=camere precedentemente formate.



*Figura 3*

Osservazione in serie temporale della formazione della camera mediante microscopia ottica (continua). La fase finale della formazione della camera, in cui il carbonato di calcio continua ad essere precipitato e la parete della camera è ispessita, viene descritto in a-b-c-d. (a) Gli pseudopodi si espandono nuovamente per formare una fitta rete, ma in filamenti più spessi di quelli visti nelle fasi precedenti. (b) Vediamo la rete di pseudopodi nella nuova camera, la cui parete si ispessisce. (c) L'ispessimento della parete della camera continua. (d) L'ispessimento della parete della camera è quasi completato e la rete di pseudopodi inizia a scomparire, indicando che la fine del processo di formazione della camera è vicina.

A sinistra: immagini di microscopia ottica. A destra: immagini schematiche.

Legenda colori: viola intenso=pseudopodia; viola chiaro=vitoplasma; magenta=carbonato di calcio nella camera di nuova formazione; giallo=camere precedentemente formate.

#### ***1.4 La composizione della matrice organica nel guscio dei foraminiferi***

La matrice organica, quindi, è integrata o direttamente associata con il guscio del foraminifero. Essa può essere ulteriormente suddivisa in matrice organica solubile e matrice organica insolubile. La matrice organica del guscio si degrada lentamente e tende quindi a fossilizzarsi, a differenza del citoplasma altamente labile che rappresenta l'altra componente organica del foraminifero.

La matrice organica solubile consiste principalmente di proteine, mentre la matrice organica insolubile è composta in prevalenza da polisaccaridi

con tracce di proteine. La maggior parte della matrice organica del guscio è concentrata all'interno dello strato organico interno rivestimenti organici interni (IOL) che è in grado di fossilizzarsi come “lining” (Tyszka et al., 2021).

Le prime indagini sulla composizione della matrice organica del guscio dei foraminiferi sono state principalmente qualitative. Angell (1965, 1967a, 1967b) ha stabilito la natura eterogenea della materia organica all'interno del foraminifero, trascurando le proprietà fisiche delle macromolecole organiche identificate (Pautard, 1970 - p.157). In particolare, ha utilizzato metodi istochimici per dimostrare che IOL e OOL contengono proteine, polisaccaridi, e altre sostanze non identificate.

Gli altri strati organici, le cosiddette "membrane" (POS), si sono colorati come un complesso proteico-polisaccaridico privo di altre sostanze. Towe e Cifelli (1967) hanno proposto che la matrice organica consistesse di una componente proteica attiva, la "fase organizzata o orientata", che costituisce il modello per la nucleazione dei cristalli, e da una componente polisaccaridica passiva, la cosiddetta "sostanza di base non organizzata", che fornisce la forma per il guscio.

Lo studio della composizione della matrice organica dei foraminiferi planctonici fossili ha rilevato la presenza, in genere, di rapporti acido aspartico/glicina significativamente più alti rispetto ai fossili dei foraminiferi silicei (King, 1977).

Sabbatini et al. (2014) hanno scoperto che le macromolecole della matrice organica, comprensiva di OOL, IOL e POS, di un foraminifero bentonico (*Schlumbergerella floresiana*) includevano molti aminoacidi carichi e polari (ad esempio, aspartato e glutammato) e la glicina che sono anche abbondanti nelle proteine di biomineralizzazione di altri phyla (in particolare i molluschi).

Dato che non sono ancora disponibili dati genomici e trascrittomici utili alla comprensione della biomineralizzazione dei foraminiferi, le sequenze ottenute da matrici organiche sono state sottoposte a ricerca MS BLAST, e tali ricerche hanno portato alla caratterizzazione di 156 peptidi. Pochissime proteine

omologhe sono state trovate nel database proteomico; ciò ci suggerisce che i peptidi ottenuti derivano da proteine sconosciute presenti nelle matrici organiche dei foraminiferi. La distribuzione amminoacidica di questi peptidi è stata analizzata con il database UNIPROT e in particolare con il database UNIPROT dei molluschi. I molluschi costituiscono un phylum ben studiato comprendente una grande varietà di proteine coinvolte nella biomineralizzazione.

I risultati hanno dimostrato che le proteine estratte dalle conchiglie di *S. floresiana* contengono sequenze ricche degli aminoacidi glicina, alanina e prolina: tale insieme di residui rappresenta una firma unica per i foraminiferi. Tre dei 156 peptidi presentavano somiglianze di sequenza con peptidi presenti in proteine come il pre-collagene-P e un gruppo di ATPasi, tra cui un'ATPasi trasportatrice di calcio. Sorprendentemente, il peptide più simile alla proteina collagen-like è un peptide ricco di glicina presente nel guscio e nella colonna vertebrale del riccio di mare. Le molecole includevano N-glicoproteine solubili in acido, con le componenti zuccherine rappresentate da glicani e carboidrati ad alto contenuto di mannosio.

### ***1.5 Le Annessine come proteine di biomineralizzazione***

Le annessine sono proteine multifunzionali che legano il calcio e che si trovano in organismi facenti parte di tutti i regni. In generale, le annessine sono proteine che si associano ai fosfolipidi in un processo  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente. Il legame delle annessine ai fosfolipidi acidi o ad altri partner di interazione può essere modulato dalla presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , e influisce su diversi processi cellulari quali ad esempio il traffico vescicolare, la segnalazione e le interazioni membrana-citoscheletro.

Queste proteine sono state studiate intensamente negli animali e nelle piante per via della loro importanza: sono infatti coinvolte in diversi processi cellulari. Per quel che riguarda le annessine degli eucarioti unicellulari, che rappresentano una grande varietà di organismi, si sa ancora poco. Ad esempio, il parassita intestinale umano *Giardia intestinalis* presenta più annessine dell'uomo, ed esse contribuiscono al suo potenziale patogeno. La maggior parte degli studi sulle annessine degli eucarioti unicellulari si è infatti concentrata sulle alfa-giardin, proteine classificate a livello del gruppo E delle annessine, espresse da *Giardia intestinalis*.

Ulteriori studi sulle annessine di diversi protisti potrebbero fornire una conoscenza più approfondita delle diverse funzioni delle annessine. Per esempio, gli omologhi (prodotti proteici con funzioni simili codificati da geni

presenti in specie diverse ma correlate e che si sono separati non per un evento di duplicazione ma in seguito a speciazione) delle annessine sono presenti in gruppi unicellulari fratelli di animali come *Choanoflagellida* e *Ichthyosporea*.

L'analisi filogenetica suggerisce inoltre che più geni paraloghi di annessine erano effettivamente presenti nell'ultimo antenato comune di questi gruppi di protisti e animali; gli studi funzionali riguardanti le annessine di questi protisti, potrebbero risultare utili anche per comprendere la funzione delle annessine negli animali e nell'uomo (Einarsson et al., 2016).

Le annessine (ANX) sono quindi una grande famiglia di proteine ampiamente distribuite tra gli eucarioti; diverse sottofamiglie sono state riscontrate in Piante (es. *Arabidopsis thaliana*), Protisti (es. *Giardia lamblia*) e Animali (*Homo sapiens*).

Sono capaci di legare i fosfolipidi della membrana plasmatica in presenza di ioni calcio; presentano infatti un dominio C-terminale conservato costituito da almeno 4 ripetizioni, ciascuna formata da 70 aminoacidi: queste subunità contengono i siti di legame per il calcio (Mirsaeidi et al., 2016).

Altre legano vescicole intracellulari dette matrix vesicles (MVs) destinate all'esocitosi e coinvolte nei processi di mineralizzazione (Veschi et al., 2020) in particolare fungono da sito di nucleazione durante la mineralizzazione della

cartilagine, delle ossa e della dentina. Inoltre, nel foraminifero di acqua dolce *Reticulomyxa filosa* è stata rilevata la presenza dell'Annessina 13; la sua sequenza proteica è infatti riportata nel database bioinformatico UniProt. L'insieme di questi dati ci ha portato ad ipotizzare la presenza dell'Annessina a livello di altri foraminiferi bentonici marini, e il suo coinvolgimento nella biocalcificazione degli stessi.

### ***1.6 Obiettivi***

La biomineralizzazione esprime quindi l'abilità degli organismi di costruire e assemblare del materiale inorganico in un modo organizzato. I foraminiferi come microorganismi unicellulari che producono un guscio, svolgono questa funzione con estrema efficienza. Fino ad ora lo studio dei processi di biomineralizzazione si è sviluppato in un ambito prevalentemente geochimico con un interesse per le analisi isotopiche e degli elementi in tracce utili per ricostruire le condizioni climatiche e ambientali. Il fatto che i biominerali sono prodotti sotto stretto controllo biologico significa che essi non sono semplici e passive testimonianze del loro ambiente. Comprendere questo controllo biologico, il così detto "effetto vitale" è indispensabile per comprenderne l'influenza biologica e ambientale. Tuttavia, l'importanza della comprensione dell'effetto vitale dei foraminiferi nella costruzione del guscio è spesso

invocata senza una completa conoscenza del funzionamento dei processi di biomineralizzazione, specialmente delle molecole coinvolte.

Per questo motivo è importante considerare il ruolo della componente organica dei foraminiferi nella determinazione della struttura e quindi nella formazione stessa del guscio di carbonato di calcio. Come descritto nelle pagine precedenti è evidente il ruolo del citoplasma e degli pseudopodi nel processo di biocalcificazione; infatti, dall'impalcatura degli pseudopodi si sviluppa quello che viene definito «sito di precipitazione del carbonato».

In questo lavoro di tesi si ipotizza non solo il ruolo attivo degli pseudopodi nell'impalcatura organica ma anche delle proteine della membrana plasmatica degli pseudopodi (essendo il foraminifero un organismo unicellulare). In questo ambito, si pone come obiettivo quello di identificare l'eventuale presenza di un gruppo di annessine, che come descritto in precedenza sono generalmente coinvolte nei processi di calcificazione, nelle interazioni membrana-citoscheletro e sono presenti in altri organismi eucarioti unicellulari. In particolare, il disegno sperimentale di tesi ha previsto 1) la messa a punto di un protocollo di estrazione di proteine di membrana dai foraminiferi seguita dall'elettroforesi in SDS-Page; 2) l'esecuzione di Western Blot condotto utilizzando diversi anticorpi policlonali rivolti verso diversi tipi di annessine

Questo lavoro di tesi che è stato svolto in collaborazione con il Prof. Adolfo Amici del Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche dell'Università Politecnica delle Marche, fa seguito ad un progetto precedente svoltosi in collaborazione con la Prof.ssa Annachiara Bartolini del Dipartimento di Scienze della Terra del Museo Nazionale di Storia Naturale di Parigi e con la Dott.ssa Francesca Zito dell'Institut de Biologie Physico-Chimique di Parigi. Sono stati ottenuti dei risultati preliminari sulla caratterizzazione delle proteine e dei carboidrati contenuti nella matrice organica del guscio dei foraminiferi e probabilmente tali molecole sono direttamente coinvolte nel processo di costruzione del guscio. Per la prima volta si sono ottenute delle sequenze di peptidi che sembrano essere tipiche dei foraminiferi e che esprimono delle omologie con le proteine del collagene di molluschi e di ricci di mare e con delle proteine di membrana responsabili degli scambi gassosi e di trasporti di ioni.

## Capitolo secondo

### MATERIALI E METODI

#### *2.1 Foraminiferi*

##### *Campionamento*

Le uscite di dipartimento, a cadenza mensile e svolte grazie al Laboratorio Mobile Actea (Figura 4), hanno consentito il recupero di campioni di acqua e sedimento nei siti di Portonovo e Senigallia; in questo caso i campioni utilizzati per l'esperimento provengono per la maggior parte da Portonovo. Del materiale, prelevato tramite la benna ad una profondità di circa 15-20 m, è stato selezionato tramite delle apposite spatole; in particolare è stato raccolto lo strato superficiale e lo stesso è stato stivato in appositi contenitori di vetro fino all'arrivo in laboratorio.



*Figura 4*  
Laboratorio Mobile Actea dell'Università  
Politecnica delle Marche

### *Pulizia del campione*

Il campione, previa osservazione al microscopio, necessita di essere ripulito dal sedimento fine che altrimenti andrebbe ad ostacolare, se non impedire, l'isolamento dei Foraminiferi presenti. Per fare ciò sono stati utilizzati setacci che ci hanno consentito di selezionare le dimensioni dei Foraminiferi necessarie; in particolare sono stati utilizzati setacci dotati di maglie da 200 $\mu$ m.

### *Mantenimento in coltura*

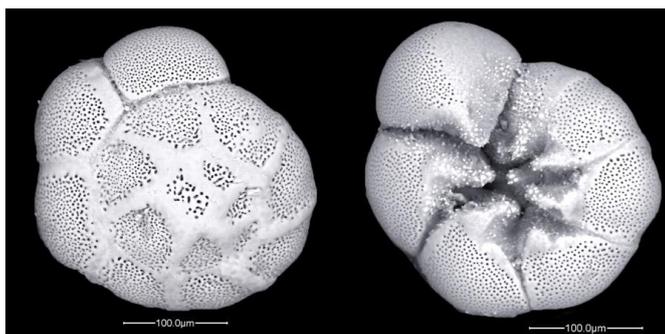
Il materiale recuperato è stato quindi mantenuto in colture in laboratorio, contenute in una serie di becher ed eppendorf (Figura 5). Il loro mantenimento ha richiesto il cambio dell'acqua settimanale (con altra acqua di mare precedentemente filtrata) e monitoraggio periodico, anche questo a cadenza settimanale, della salinità.



*Figura 5*  
Colture mantenute in laboratorio

### *Selezione specie target*

I campioni sono stati posti su di una piastra Petri con dell'acqua di mare filtrata a 0,45 µm e tramite lo stereomicroscopio sono stati individuati i foraminiferi. I generi più frequentemente riscontrati nei campioni prelevati dai siti sopra citati sono *Quinqueloculina*, *Rosalina*, *Textularia* e *Ammonia*. Tra questi il genere selezionato per l'analisi è *Ammonia*, e in particolare le specie di *Ammonia parkinsoniana* (D'Orbigny, 1839) e *Ammonia tepida* (Figura 6) (Cushman, 1926).



*Figura 6*  
Immagini relative ad *Ammonia tepida* ricavate da visualizzazione al SEM.

Si tratta di uno dei generi di foraminiferi ubiquitari e si trova in ambienti marini intertidali riparati e poco profondi, talvolta in acque salmastre (Walton et al., 1990). Delle due specie considerate, *A. tepida* è più piccola, presenta pareti sottili, un minor numero di camere e nessun bottone ombelicale; *A. parkinsoniana*, risulta invece più grande, presenta pareti più spesse, un numero maggiore di camere e un ampio bottone ombelicale.

*A. tepida*, che vive in acque poco profonde, rappresenta un insieme di specie pseudocriptiche (Hayward et al., 2004; Schweizer et al., 2011; Saad e Wade, 2016). Ad esempio, nel lago Grevelingen, *A. tepida* è rappresentata quasi esclusivamente dal genotipo T6. *Ammonia tepida* risulta abbondante nelle aree costiere delle zone a clima temperato ed è in grado di tollerare diversi fattori di stress biologico e ambientale, comprese le condizioni anossiche (Moodley e Hess, 1992; Sen Gupta et al., 1996; Geslin et al., 2014; Nardelli et al., 2014; Thibault de Chanvalon et al., 2015; Cesbron et al., 2016). *Ammonia parkinsoniana* colonizza ambienti infralitorali con un substrato fangoso e ricco di materia organica. Pertanto, *Ammonia* risulta essere un genere molto comune riscontrabile in ambienti salmastri, marini e ipersalini, a batimetrie intertidali (circa 70 m), dai tropici alle regioni temperate del mondo (Phleger e Parker, 1951; Chang e Kaesler, 1974; Walton e Sloan, 1990; Murray, 1991). La maggior parte degli individui vive nei primi centimetri del sedimento (0-1 cm); tuttavia, sono stati trovati esemplari vivi a profondità pari a 30 cm (Goldstein e Rarben, 1993). Gli esemplari del genere *Ammonia* vivono tipicamente 2-3 mesi (Bradshaw, 1957). Gli individui, per gli esperimenti, sono stati quindi selezionati previa valutazione della vitalità: i criteri scelti per tale valutazione sono stati l'integrità del guscio e la colorazione interna variabile dal marroncino al giallo.

## *Stoccaggio*

Gli individui soddisfacenti i criteri di vitalità sono stati raccolti in eppendorf, ciascuna contenente 50 foraminiferi, e congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , al fine di garantire il mantenimento delle strutture target di analisi.

## ***2.2 Protocollo di Estrazione delle Proteine di Membrana***

Per l'esecuzione dell'esperimento, considerate le caratteristiche degli organismi di partenza, è stato necessario apportare modifiche ad un protocollo di estrazione di proteine di membrana. Le modifiche hanno riguardato l'introduzione della frantumazione meccanica dei foraminiferi previo trattamento con azoto liquido, seguita dalla solubilizzazione chimica delle proteine di membrana, altrimenti trattenute dal guscio. La lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine sono tappe fondamentali per le analisi successive.

### ***2.2.1 Buffer di lisi***

Il buffer di lisi è stato preparato a partire da una soluzione madre di Tris-HCl a  $\text{pH}=7.4$ , 1M (preparata a partire da Trizma-base e HCl); e da una soluzione madre di EDTA ( $\text{pH}=8$ ) 0,5M, già disponibile alla concentrazione opportuna. In particolare, per la preparazione del Buffer di Lisi, considerando un volume totale di 50 ml, sono stati aggiunti 500  $\mu\text{l}$  di Tris-HCL ( $\text{pH}=7.4$ ) al fine di

ottenere una concentrazione pari a 10mM (1:100); e 200 µl di EDTA (pH=8) per ottenere una concentrazione pari a 2mM (1:250). La soluzione è stata portata a volume con H<sub>2</sub>O distillata-milliQ.

### ***2.2.2 Soluzione madre DTT***

Considerando il peso molecolare del DTT (154,25 g/mole) e il volume totale di 5 ml, per ottenere una soluzione 1M, sono stati aggiunti 0,77 g di DTT all'H<sub>2</sub>O distillata-milliQ con il quale si è portata la soluzione a volume. Dai 5 ml totali sono state preparate 10 aliquote da 500 µl, mantenute a -20°C.

### ***2.2.3 Soluzione madre Carbonato***

Considerando il peso molecolare di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105,98 g/mole) e anche in questo caso un volume totale di soluzione pari a 5 ml, per ottenere una soluzione 1M, sono stati aggiunti 0,53 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e il tutto è stato portato a volume con H<sub>2</sub>O distillata-milliQ. La soluzione è stata mantenuta in frigorifero a 4°C.

### ***2.2.4 Preparazione dei gel per elettroforesi***

#### *Resolving Gel*

Per la preparazione del Resolving gel, sono stati aggiunti a 3ml di Acrilamide al 40% ; 2,5ml di Tris a pH = 8.8, 1.5M (preparato a partire da Trizma-base e HCl); 0,1 ml SDS 10% (preparato a partire da 1 g di SDS, che è stato portato ad un volume di 10 ml con H<sub>2</sub>O distillata-milliQ); 100 µl APS 10% (preparato

a partire da 20 mg di APS e portando ad un volume pari a 200  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O distillata-milliQ); e, in seguito alla rimozione dei gas, 10 $\mu$ l TEMED. Considerando il volume totale della miscela, ovvero 10 ml, sono stati aggiunti 4,3 ml di H<sub>2</sub>O distillata-milliQ

### *Stacking Gel*

Per la preparazione dello Stacking gel, sono stati aggiunti a 0,5 ml di Acrilamide al 40% ; 1,25ml di Tris a pH = 6.8, 1.5M (preparato a partire da Trizma-base e HCl); 50  $\mu$ l SDS 10% (preparato a partire da 1 g di SDS, che è stato portato ad un volume di 10 ml con H<sub>2</sub>O distillata-milliQ); 50  $\mu$ l APS 10% (preparato a partire da 20 mg di APS e portando ad un volume pari a 200  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O distillata-milliQ); e, in seguito alla rimozione dei gas, 7 $\mu$ l di TEMED. Considerando il volume totale della miscela, ovvero 5 ml, sono stati aggiunti 3,1 ml di H<sub>2</sub>O distillata-milliQ.

Inizialmente è stato preparato il Resolving Gel secondo la composizione sopra indicata; al di sopra della miscela è stato aggiunto un sottile strato di H<sub>2</sub>O distillata-milliQ, rimosso solo una volta terminato il processo di polimerizzazione.

Lo Stacking Gel è stato posto al di sopra del Resolving Gel polimerizzato. Dato che esso deve contenere i pozzetti, la polimerizzazione di quest'ultimo è stata svolta in presenza di un apposito pettine.

### ***2.3 Western Blot***

Il Western Blot è una tecnica analitica che permette di rilevare, analizzare e quantificare le proteine. Questo metodo è diffusamente utilizzato per rilevare molecole proteiche specifiche in campioni complessi, come nel caso specifico, trattandosi di lisati cellulari. Il Western Blot richiede la separazione elettroforetica delle proteine in SDS-Page, seguita dal trasferimento su una membrana nitrocellulosa. Dopo il trasferimento, le proteine vengono identificate direttamente mediante immunorilevazione. Nell'immunorilevazione le proteine vengono identificate grazie al legame con anticorpi specifici; nel caso specifico ne sono stati testati tre, tutti policlonali rivolti verso le annessine A5, A6 e A13. L'anticorpo primario viene in genere utilizzato in combinazione con un anticorpo secondario coniugato, come nel caso specifico, con HRP per la rilevazione chemiluminescente, mediante esposizione ad un substrato appropriato.

#### ***2.3.1 Anticorpi***

La scelta degli anticorpi ha costituito una parte significativa del lavoro di tesi ed è stata dettata dalla necessità di trovare anticorpi che corrispondessero alle principali famiglie di annessine in grado di legare le membrane cellulari in maniera Ca<sup>2+</sup>-dipendente.

### *Anti ANX A5 e Anti ANX A6*

La scelta dell'anticorpo policlonale rivolto verso l'Annessina A6 (AnxA6) è stata guidata dal fatto che questa è il rappresentante più grande della famiglia delle annessine presenti nelle vescicole di matrice (MV), una classe speciale di vescicole extracellulari che servono come sito di nucleazione durante la mineralizzazione della cartilagine, dell'osso e della dentina. Per quanto riguarda la scelta dell'anticorpo rivolto verso l'Annessina A5 (AnxA5), essa è stata guidata dal fatto che le annessine presenti nel lume delle MV si legano alla fosfatidilserina del foglietto interno del doppio strato della MV in presenza di  $Ca^{2+}$  innescando la formazione di un sito di nucleazione (NC) con l'aiuto proprio dell'AnxA5 e altre proteine. La presenza di ioni  $Ca^{2+}$  porta, inoltre, ad un aumento significativo dell'associazione delle proteine in questione con i doppi strati lipidici, suggerendo un'associazione alle membrane citoplasmatiche  $Ca^{2+}$  dipendente (Veschi et al., 2020).

### *Anti ANX A13*

La scelta dell'anticorpo rivolto verso l'Annessina 13 è stata guidata dalla presenza della stessa in un foraminifero di acqua dolce, *Reticulomyxa filosa*. La sequenza proteica dell'Annessina A13 di questo foraminifero è stata infatti trovata su UniProt (Universal Protein)

(<https://www.uniprot.org/uniprotkb/X6LBI7/entry>), il più grande database bioinformatico per le sequenze proteiche di tutti gli organismi viventi e dei virus; molte delle informazioni contenute in questo portale derivano da progetti di sequenziamento del genoma. Dalle informazioni depositate è stato possibile risalire anche alla funzione svolta dalla suddetta proteina, che risulta essere capace di legare i fosfolipidi tramite un meccanismo  $Ca^{2+}$  dipendente.

#### *Goat Anti Rabbit IgG (HRP)*

Per la rivelazione del legame di ciascun anticorpo primario alla relativa proteina target è stato utilizzato l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG marcato con HRP (Horseradish peroxidase), l'enzima perossidasi di rafano, presente nelle radici del rafano e ampiamente utilizzato nelle applicazioni biochimiche.

### ***2.4 Estrazione proteine di membrana ed elettroforesi in SDS-Page***

#### ***2.4.1 Prova sperimentale 1***

Il protocollo per l'estrazione proteica a partire da campioni di foraminiferi mantenuti a  $-80^{\circ}C$  ha richiesto l'iniziale trasferimento di 200 individui in un'unica provetta, dove, in seguito alla rimozione dell'acqua in eccesso e al trattamento con l'azoto liquido (immersione in un bagnetto di azoto liquido) è stata condotta la frantumazione tramite pestello da provetta, anch'esso sottoposto a congelamento con azoto liquido. Si è poi ricorsi al microscopio

ottico per il controllo del contenuto della provetta: il risultato desiderato era il riscontro di una polverina omogenea. Al tessuto frantumato sono stati aggiunti 500 µl del Buffer di Lisi e 5 µl del Protease Inhibitor Cocktail; il tutto è stato sottoposto all'azione del vortex per circa 20 secondi e centrifugato per 90s a 10.000g, al termine del quale si è provveduto al recupero del pellet (provetta P1) e alla rimozione del surnatante, conservato in un'altra eppendorf (provetta S1). Il pellet è stato quindi nuovamente sottoposto all'azione del vortex con altri 500 µl del Buffer di Lisi e 5 µl del Protease Inhibitor Cocktail (per circa 20 secondi) e centrifugato per altri 90s a 10.000g. Anche in questo caso il pellet è stato recuperato e il surnatante conservato in un'altra eppendorf (provetta S2). Il pellet è stato quindi sottoposto ancora un'ultima volta all'azione del vortex con altri 500 µl del Buffer di Lisi e 5 µl del Protease Inhibitor Cocktail (per circa 20 secondi) e centrifugato per altri 90s a 10.000g. Il pellet è stato recuperato e il surnatante conservato in una nuova eppendorf (provetta S3). Sono state ottenute tre provette S1, S2 e S3 contenenti il surnatante raccolto dopo ciascun lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail, e una P1 contenente il pellet. Il tutto è stato poi congelato a -80°C. Per quanto riguarda il trattamento del pellet, sono stati aggiunti alla provetta P1 5 µl DTT, 5 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 40 µl H<sub>2</sub>O distillata-milliQ. Infine, sono stati aggiunti,

sempre alla provetta S1, 10 µl di Buffer SDS per l'ottenimento di una diluizione 1:5.

Il trattamento del surnatante ha invece previsto il prelievo di 50 µl (il tutto è stato fatto per le provette S1, S2, ed S3) dai 500 µl recuperati da ciascun lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail. Anche in questo caso sono stati aggiunti 10 µl di Buffer SDS per l'ottenimento di una diluizione 1:5.

Il volume totale dei campioni trattati, per tutte le provette considerate, era quindi 60 µl.

Prima di essere sottoposti a separazione elettroforetica, tutti i campioni sono stati scaldati per 10 minuti a 94°C e poi centrifugati per 5 minuti a 17.000g. Vediamo in Tabella 1 lo schema di caricamento del gel; l'elettroforesi è stata poi condotta a 150V.

Pozzetti	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sigla	P	P	P	P	P	Marker	S1	S2	S3	
Campioni	Ammonia	Ammonia	Ammonia	Ammonia	Ammonia	Marker	Ammonia	Ammonia	Ammonia	
Aliquote (µl)	5	10	20	25	5		20	20	20	
Heated	yes	yes	yes	yes			yes	yes	yes	

*Tabella 1*

Schema caricamento gel relativo alla Prova 1. Con P=pellet; S1=surnatante ricavato dal primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; S2= surnatante ricavato dal secondo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; S3=surnatante ricavato dal terzo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker peso molecolare.

Il gel ottenuto è stato sottoposto a colorazione in una piastra contenente una miscela di Blue di Comassie, Etanolo e Acido acetico, in agitazione per circa 40 minuti; è stata in seguito effettuata la decolorazione (circa 5 ore).

#### ***2.4.2 Prova sperimentale 2***

In questo caso sono stati trasferiti 400 individui in due provette (P e PS) ciascuna contenente 200 individui, dove, in seguito alla rimozione dell'acqua in eccesso e al trattamento con l'azoto liquido, è stata condotta la frantumazione tramite pestello da provetta, anch'esso sottoposto a congelamento con azoto liquido.

Mentre la Provetta S ha seguito il trattamento illustrato nel protocollo riportato nella Prova sperimentale 1, la provetta PS è stata sottoposta a sonicazione. In particolare, in seguito all'aggiunta del Buffer di Lisi e al Protease Inhibitor Cocktail necessari al primo lavaggio, il contenuto della provetta PS è stato sottoposto a sonicazione per un minuto tenendo la provetta immersa in un bagno di ghiaccio, dopodiché, anche la provetta PS è stata sottoposta ai restanti due lavaggi e ai cicli di centrifugazioni illustrati nella Prova sperimentale 1 descritta in precedenza.

Al termine dell'estrazione sono state ottenute 4 provette contenenti i surnatanti raccolti dopo ciascun primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail (S e SS), e due contenenti il pellet (P e PS). Il tutto è stato poi

congelato a -80°C.

Mentre il procedimento riguardante il trattamento del surnatante e della provetta PS (sottoposta a sonicazione) è rimasto invariato rispetto al trattamento illustrato nel protocollo relativo alla Prova sperimentale 1, la provetta P è stata trattata con una concentrazione doppia di DTT e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Infatti, alla provetta P sono stati aggiunti 10 µl DTT, 10 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30 µl H<sub>2</sub>O distillata-milliQ e i 10 µl di Buffer SDS al pellet (diluizione 1:5). Il volume totale dei campioni trattati, per tutte le provette, anche in questo caso era 60 µl. Tutti i campioni sono stati scaldati per 10 minuti a 94°C e poi centrifugati per 5 minuti a 17.000g. Vediamo in Tabella 2 lo schema di caricamento del gel; l'elettroforesi è stata poi condotta a 150V.

Pozzetti	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Sigla</b>	ST	P	P		PS	PS	PS	SST		
<b>Campioni</b>	<i>Ammonia</i>	<i>Ammonia</i>	<i>Ammonia</i>	M	<i>Ammonia</i>	<i>Ammonia</i>	<i>Ammonia</i>	<i>Ammonia</i>		
<b>Aliquote (µl)</b>	20	10	20	5	10	20	25	20		
<b>Heated</b>	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes		

*Tabella 2*

Schema caricamento gel relativo alla Prova 2. Con P=pellet trattato con doppia concentrazione del Buffer DTT-Carbonato; ST=surnatante ricavato dal primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; PS=pellet sottoposto a sonicazione; SST=surnatante ricavato dal primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail, dopo sonicazione; M=marker peso molecolare.

Il gel ottenuto è stato sottoposto a colorazione in una piastra contenente una miscela di Blue di Comassie, Etanolo e Acido acetico, in agitazione per circa 40 minuti; è stata in seguito effettuata la decolorazione (circa 5 ore).

### 2.4.3 Prova sperimentale 3

È stato ripetuto il protocollo illustrato per la Prova sperimentale 1, quindi utilizzando sempre 200 individui, ma anche in questo caso è stato conservato ed utilizzato per l'elettroforesi, oltre al pellet, solamente il surnatante ricavato dal primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail.

Vediamo illustrato in Tabella 3 lo schema di caricamento del gel.

<b>Pozzetti</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Sigla</b>		P	P	P	S	S	P	P	P	
<b>Campioni</b>	M	Ammonia	M							
<b>Aliquote (µl)</b>		3	7	20	20	20	20	7	3	
<b>Heated</b>		yes								

Tabella 3

Schema caricamento gel relativo alla Prova 3. Con P=pellet; S=surnatante ricavato dal primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker peso molecolare.

### 2.4.4 Prova sperimentale 4

Per la Prova sperimentale 4 è stato eseguito il protocollo relativo all'estrazione precedente, utilizzando però 400 individui, e seguendo poi lo schema di caricamento del gel riportato in Tabella 4. In questo caso il Marker è stato sottoposto a diluizione 1:5 con l'SDS buffer: 3µl del Marker sono stati aggiunti a 12µl dell'SDS buffer.

<b>Pozzetti</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Sigla</b>		P	S		P	S		P	S	
<b>Campioni</b>	M	Ammonia	Ammonia	M	Ammonia	Ammonia	M	Ammonia	Ammonia	
<b>Aliquote (µl)</b>	5	20	20	5	20	20	5	20	20	
<b>Heated</b>		yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	

Tabella 4

Schema caricamento gel relativo alla Prova 4-5. Con P=pellet; S=surnatante ricavato dal primo lavaggio con il Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker peso molecolare diluito 1:5.

### ***2.4.5 Prova sperimentale 5***

Per l'estrazione numero 5 è stato eseguito il protocollo relativo all'estrazione precedente, utilizzando sempre 400 individui, e seguendo poi lo stesso schema di caricamento del gel (Tabella 4).

## ***2.5 Trasferimento proteico su membrana di nitrocellulosa e Western Blot***

### ***2.5.1 Western Blot relativo al gel ricavato dalla Prova sperimentale 3***

In seguito all'elettroforesi si è proceduto con il Trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa e con il Western Blot.

Il trasferimento viene fatto ponendo il gel (posizionato al polo negativo) a contatto con la membrana di nitrocellulosa (posizionata al polo positivo); da entrambi i lati sono stati posti due foglietti di carta e una spugnetta, ammorbiditi tramite immersione in una vaschetta contenente il Buffer di Trasferimento; ciò conferisce la pressione necessaria a far sì che membrana e gel aderiscano strettamente l'uno all'altro. Una volta montato l'apposito supporto, e aggiunto il Buffer di Trasferimento, viene lasciata partire la migrazione a 52mA. Dopo 1 ora e 45 minuti è possibile procedere con i lavaggi. Per quanto riguarda i lavaggi post trasferimento, è stato inizialmente utilizzato il TBS, necessario alla rimozione detergente (circa 15 minuti), cui è seguito un lavaggio con TTBS e latte in polvere al 5% (2,5g su 20ml), capace di saturare

la membrana così da evitare interazioni aspecifiche durante il saggio anticorpale, per almeno 1 ora, e infine sono stati effettuati tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con TTBS. Per consentire l'ibridazione tra anticorpo e proteina target, gli anticorpi primari sono stati aggiunti al TTBS diluiti 1:1000 e posti in incubazione over-night. Sono stati aggiunti tutti e tre (Anti ANX A5, Anti ANX A6, Anti ANX A13) in contemporanea. La membrana è stata sottoposta ad ulteriori 3 lavaggio da 10 minuti ciascuno con TTBS cui è seguita l'incubazione con l'anticorpo secondario diluito 1:1000 in TTBS per 1 ora.

Prima di procedere alla rivelazione del legame Ab secondario-Ab primario-Proteina Target tramite HRP e relativo substrato, sono stati fatti altri 3 lavaggi con TTBS, sempre da 10 minuti ciascuno.

#### ***2.5.2 Western Blot relativo al gel ricavato dalla Prova sperimentale 4***

Una volta fatta l'elettroforesi e il trasferimento su membrana di nitrocellulosa, la membrana, prima dell'incubazione con gli anticorpi primari è stata tagliata in modo tale da ottenere tre frammenti ciascuno contenente Marker, Pellet e Surnatante. Ciascun frammento è stato poi incubato con un singolo anticorpo primario (Anti ANX A5, Anti ANX A6, Anti ANX A13) rispettando le stesse diluizioni indicate in precedenza. La procedura ha poi seguito il normale protocollo.

### ***2.5.3 Western Blot relativo al gel ricavato dalla Prova sperimentale 5***

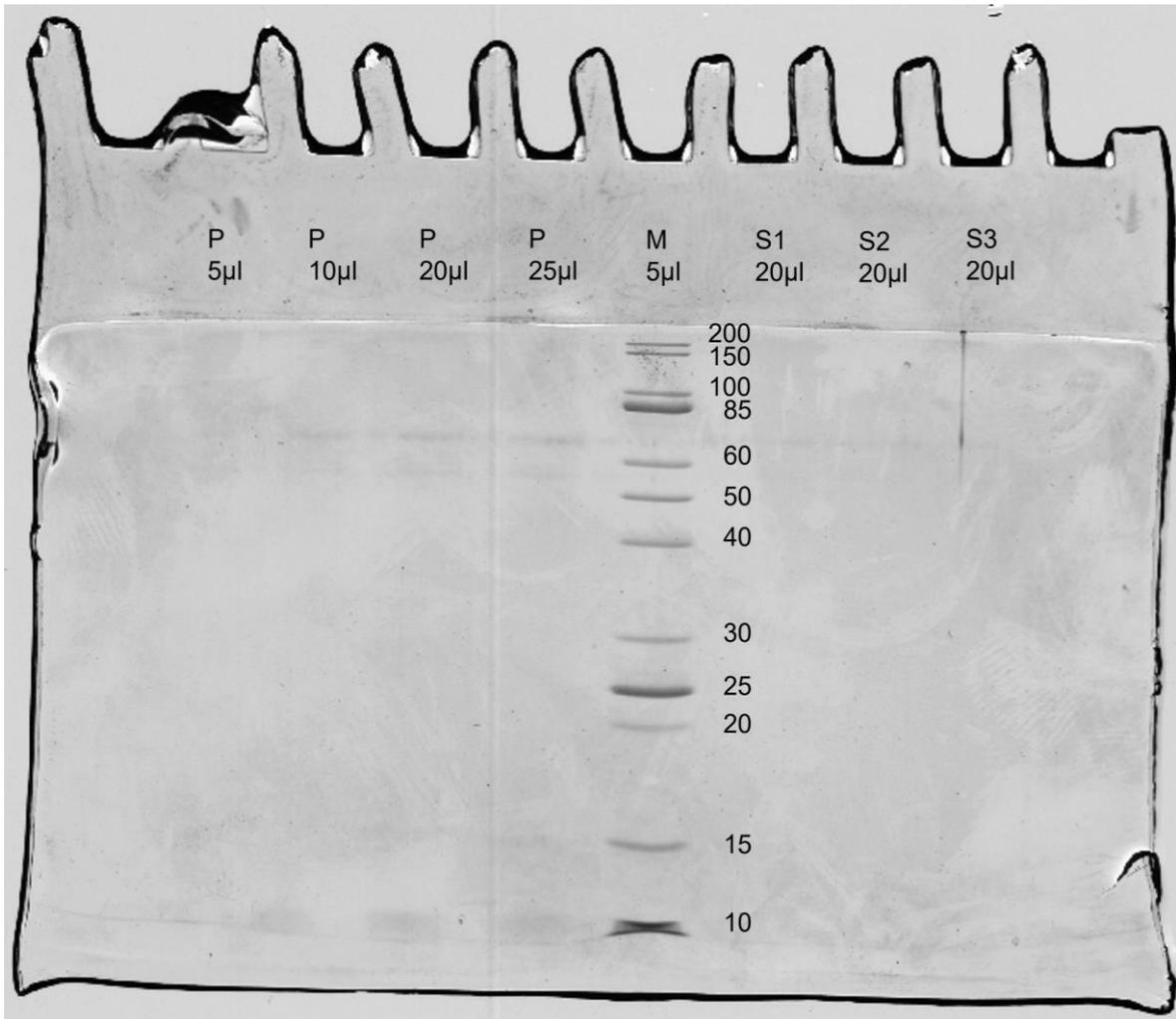
Una volta fatta l'elettroforesi e il trasferimento su membrana di nitrocellulosa, la membrana, prima dell'incubazione con gli anticorpi primari è stata tagliata in modo tale da ottenere tre frammenti, indicati con Membrana 1, 2, e 3, ciascuno contenente Marker, Pellet e Surnatante. La Membrana 1 è stata esposta ad una concentrazione di anticorpo Anti-ANX A13 pari a 1:1000, la Membrana 2 e la Membrana 3 sono state esposte ad una concentrazione di anticorpo primario, sempre Anti-ANX A13 pari a 1:3000. Per il trattamento con l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP) invece, le Membrane 1 e 3 sono state trattate con una concentrazione di anticorpo secondario pari a 1:3000 mentre la Membrana 2 con una concentrazione dell'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP) pari a 1:1000.

## Capitolo terzo

### RISULTATI

#### *3.1 Gel estrazione proteica relativa alla Prova sperimentale 1*

Possiamo vedere riportato in Figura 7 il gel ottenuto dall'estrazione proteica, condotta a partire da 200 individui, relativa alla Prova sperimentale 1. Le bande sono state evidenziate tramite colorazione del gel stesso con Blu di Coomassie. Ciò che possiamo osservare è la presenza di deboli bande in corrispondenza dei pozzetti contenenti il Pellet, in particolare per quel che riguarda quelli contenenti aliquote di 10, 20 e 25  $\mu$ l, all'altezza delle bande del Marker corrispondenti ad un peso molecolare pari a circa 60-65 kDa, e 10 kDa.



*Figura 7*

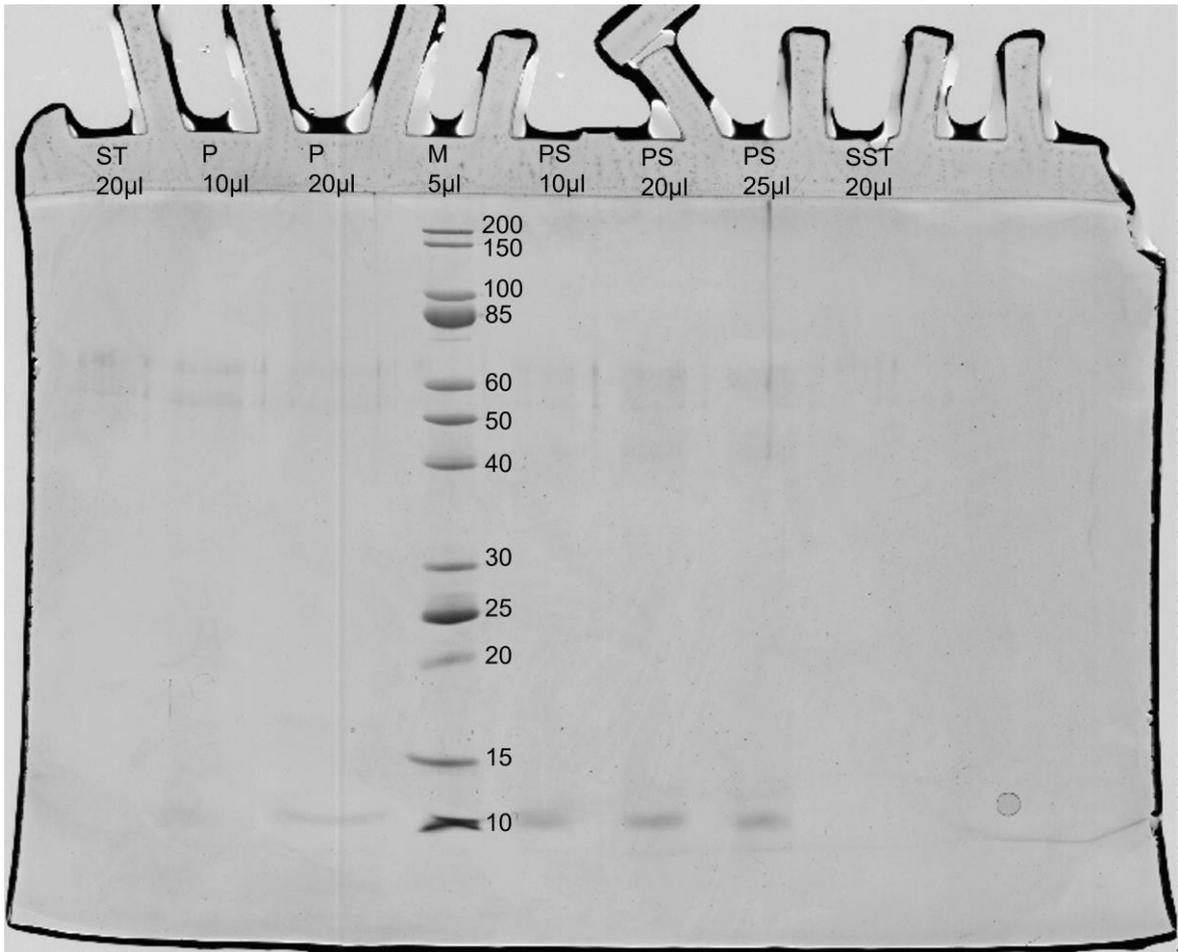
Gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa alla Prova sperimentale 1. Con P=pellet; S1=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; S2=surnatante ricavato dal secondo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; S3=surnatante ricavato dal terzo lavaggio Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker PM in kDa.

### ***3.2 Gel estrazione proteica relativa alla Prova sperimentale 2***

Il gel ottenuto dalle due estrazioni proteiche che hanno visto l'aggiunta per una della sonicazione, per l'altra del trattamento con concentrazione doppia rispetto al protocollo originario di buffer DTT-Carbonato, è riportato in Figura 8.

Entrambe le estrazioni relative alla Prova sperimentale 2 sono state condotte a partire da 200 individui, e il gel ottenuto dall'elettroforesi è stato sottoposto a colorazione con Blue di Coomassie.

Ciò che possiamo osservare è la presenza di deboli bande in corrispondenza dei pozzetti contenenti sia il Pellet che il Surnatante, ad eccezione di quello ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail sottoposto a sonicazione. Le bande, anche in questo caso sono riscontrabili alla stessa altezza delle bande del Marker corrispondenti ad un peso molecolare pari a circa 60-65 kDa, e 10 kDa. Le bande a 10kDa corrispondenti al Pellet sottoposto a sonicazione risultano più evidenti rispetto alle stesse corrispondenti al Pellet trattato con una concertazione doppia di buffer DTT-Carbonato.



*Figura 8*

Gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa alla Prova sperimentale 2. Con ST=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail trattato con doppia concentrazione di buffer DTT-Carbonato; P=pellet trattato con doppia concentrazione di buffer DTT-Carbonato; PS=pellet sonicato; SST=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail sonicato; M=marker PM in kDa.

### ***3.3 Membrana Western Blot relativo alla prova sperimentale 3***

Una volta fatta l'elettroforesi dei campioni ricavati dall'estrazione relativa alla Prova sperimentale 3 (condotta a partire da 200 individui) e il trasferimento su membrana di nitrocellulosa, questa, è stata esposta a tutti e tre gli anticorpi primari (Anti ANX A5, Anti ANX A6, Anti ANX A13) in contemporanea, tutti diluiti 1:1000. Ha fatto seguito l'incubazione con l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP) sempre diluito 1:1000.

In questo caso l'immunorilevazione tramite esposizione della membrana al substrato per HRP non ha dato risultati: nessun segnale risultava apprezzabile, se non quello relativo al Marker.

### ***3.4 Membrana Western Blot relativo alla prova sperimentale 4***

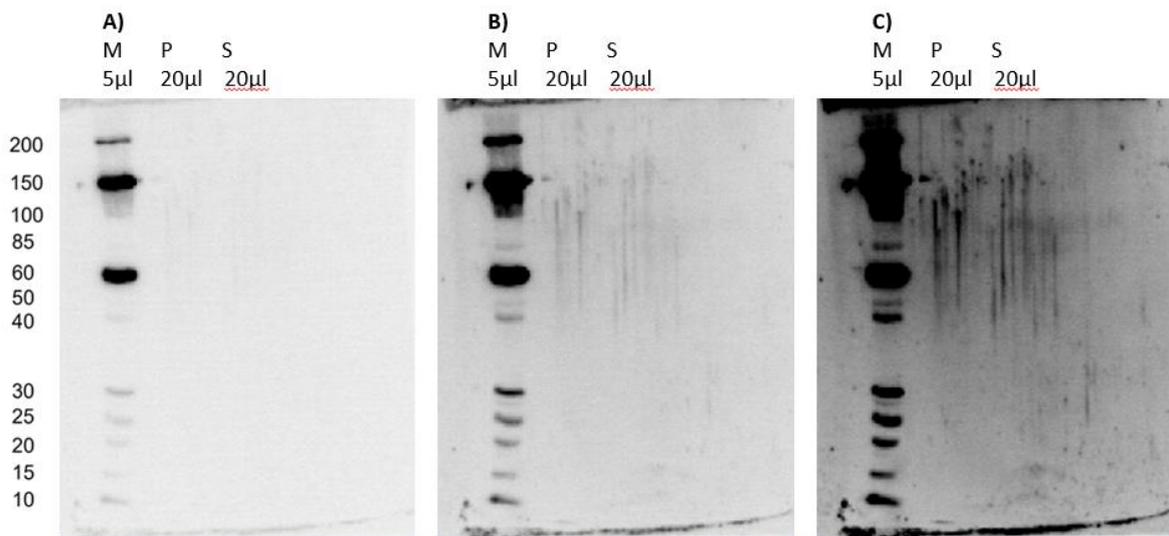
Una volta fatta l'elettroforesi dei campioni ricavati dall'estrazione relativa alla Prova sperimentale 4 (condotta a partire da 400 individui) e il trasferimento su membrana di nitrocellulosa, questa, prima dell'incubazione con gli anticorpi primari è stata tagliata in modo tale da ottenere tre frammenti ciascuno contenente Marker, Pellet e Surnatante. Ciascun frammento è stato poi incubato con un singolo anticorpo primario: Anti ANX A5 (Figura 9), Anti ANX A6 (Figura 10) e Anti ANX A13 (Figura 11), mantenendo per ciascuno una

diluizione 1:1000. Ha fatto seguito l'incubazione con l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP) sempre diluito 1:1000.

Nella Figura 9, relativa al saggio condotto con l'anticorpo primario Anti ANX A5, risulta subito evidente che le uniche bande evidenziate sono quelle relative al Marker di pesi molecolari.

Nella figura 10 vediamo come il Marker sia stato meno riconosciuto dagli anticorpi utilizzati nel saggio di immunorilevazione condotto con l'anticorpo primario Anti ANX A6; inoltre, sono presenti deboli bande, riscontrabili dopo 60 secondi dall'esposizione al substrato specifico per HRP, sia a livello del Pellet che del Surnatante, in corrispondenza di un peso molecolare pari a 20-25 kDa.

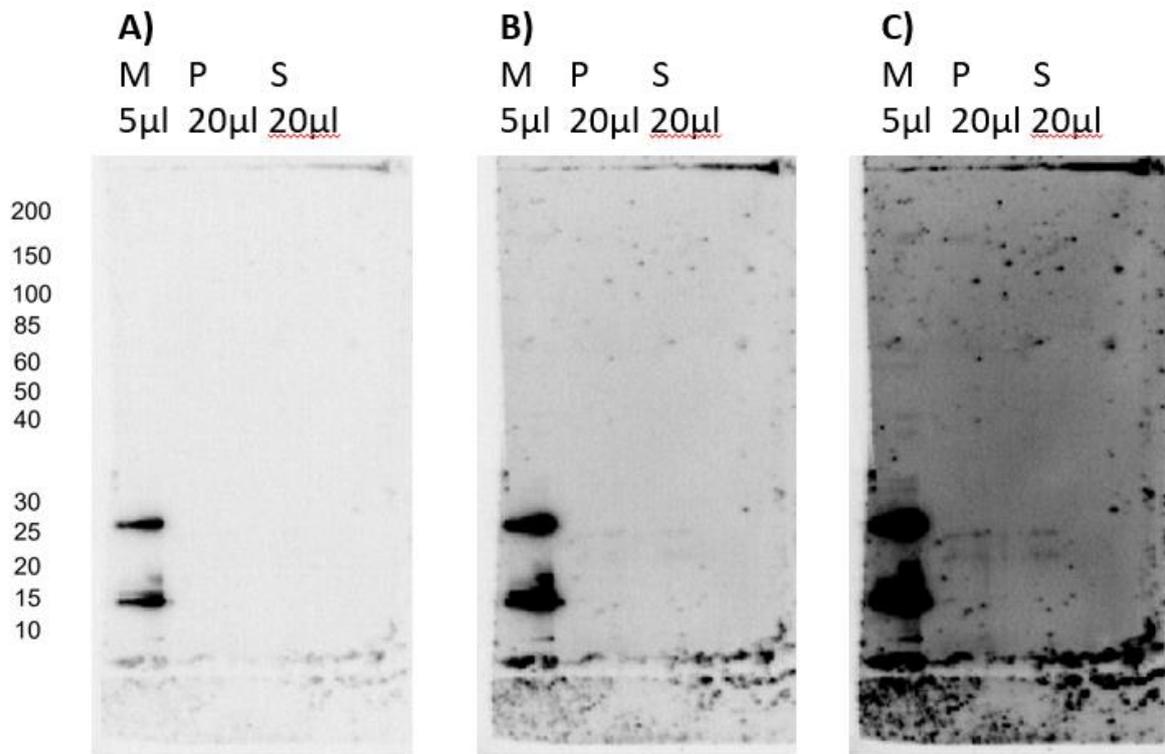
Nella Figura 11, relativa al saggio condotto con l'anticorpo Anti ANX A13, possiamo notare che, rispetto alle altre membrane, in questa non risulta evidenziato il Marker, mentre bande simili a quelle registrate per il Pellet e il Surnatante nel saggio condotto con l'anticorpo Anti ANX A6, sono riscontrabili all'incirca alla stessa altezza.



*Figura 9*

Membrana di nitrocellulosa dopo immunorilevazione con anticorpo primario Anti ANX A5 e secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP), (A) dopo 2 secondi; (B) dopo 10 secondi; (C) dopo 30 secondi.

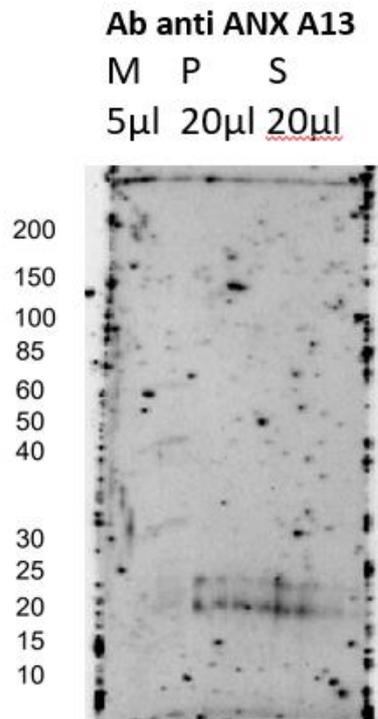
Con P=pellet; S=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker PM in kDa.



*Figura 10*

Membrana di nitrocellulosa dopo immunorilevazione con anticorpo primario Anti ANX A6 e secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP), (A) dopo 9 secondi; (B) dopo 20 secondi; (C) dopo 60 secondi.

Con P=pellet; S=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker PM in kDa.



*Figura 11*

Membrana di nitrocellulosa dopo immunorilevazione con anticorpo primario Anti ANX A13 e secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP), dopo 338 secondi. Con P=pellet; S=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker PM in kDa.

### ***3.5 Membrana Western Blot relativo alla prova sperimentale 5***

Una volta fatta l'elettroforesi dei campioni ricavati dall'estrazione relativa alla Prova sperimentale 5 (condotta a partire da 400 individui), e il trasferimento su membrana di nitrocellulosa, la membrana, prima dell'incubazione con gli anticorpi primari è stata tagliata in modo tale da ottenere tre frammenti, indicati con Membrana 1, 2, e 3, ciascuno contenente Marker, Pellet e Surnatante. La Membrana 1 è stata esposta ad una concentrazione di anticorpo Anti-ANX A13 pari a 1:1000, la Membrana 2 e la Membrana 3 sono state esposte ad una concentrazione di anticorpo primario, sempre Anti-ANX A13 pari a 1:3000. Per il trattamento con l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP) invece, le Membrane 1 e 3 sono state trattate con una concentrazione di anticorpo secondario pari a 1:3000 mentre la Membrana 2 con una concentrazione dell'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP) pari a 1:1000. I risultati dell'immunorilevazione in funzione del tempo, dopo 1 secondo, dopo 600 secondi e dopo 1200 secondi mostrano in questo caso la presenza di una banda. Tale banda si mostra più accentuata a livello delle Membrane 1 e 3; essa però risulta continua tra Marker, Pellet e Surnatante; inoltre, a livello della Membrana 1 la banda si estende anche oltre il pozzetto.

## Capitolo quarto

### DISCUSSIONI

#### *4.1 La rilevazione delle proteine di membrana in diverse specie di foraminiferi bentonici mediante gel elettroforetico*

I gel ottenuti dalle estrazioni proteiche, relativi alle Prove sperimentali 1 e 2 (Figura 12, 13), entrambe condotte a partire da 200 individui del genere *Ammonia*, nonostante le modifiche apportate al protocollo della Prova sperimentale 2, non presentano differenze significative.

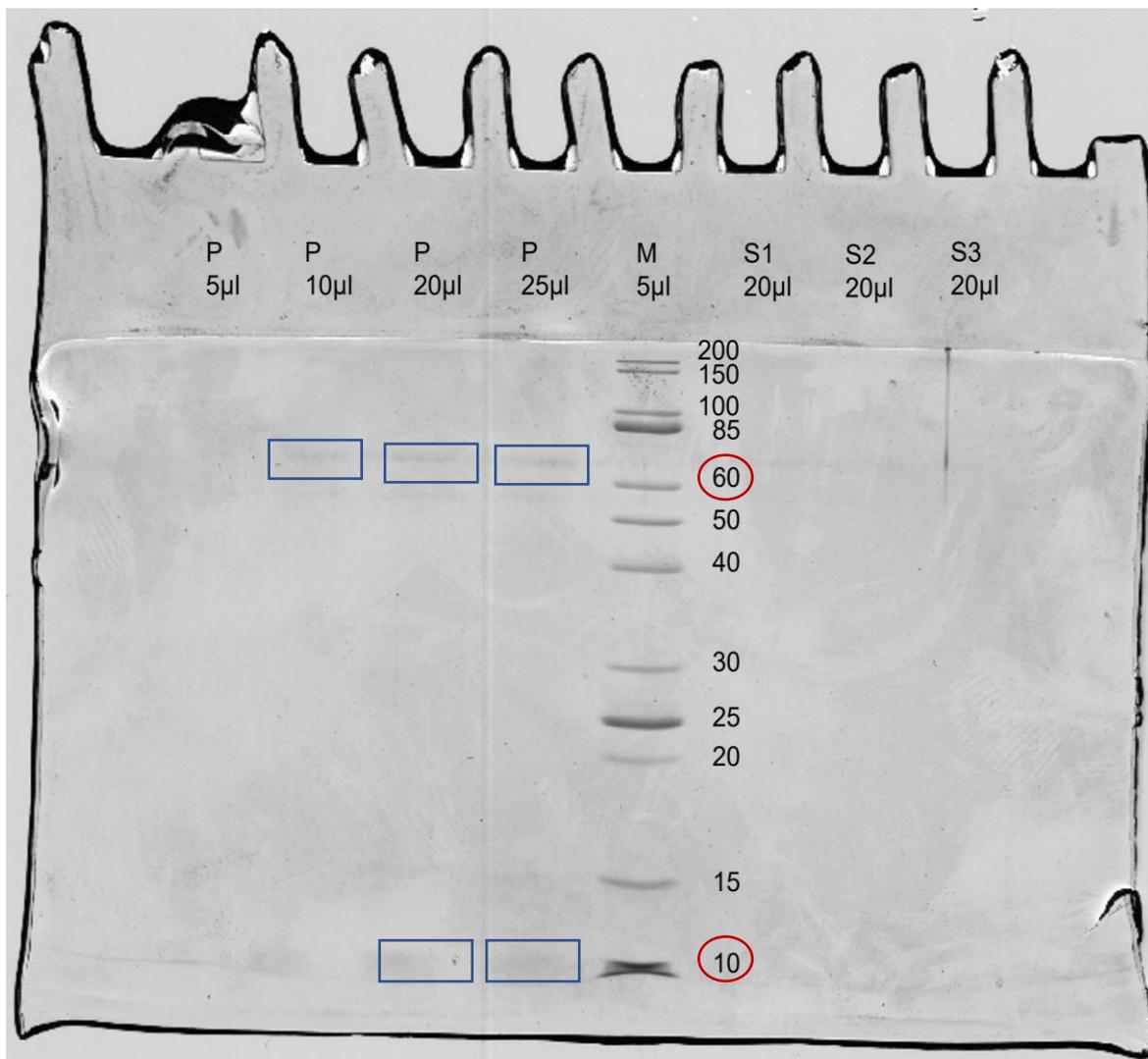
Le bande sono state evidenziate in entrambi i casi tramite colorazione con Blu di Coomassie. Legandosi alle proteine, il Blu di Coomassie permette infatti di visualizzarle in gel elettroforetico tipo, nel caso specifico, SDS-PAGE. Dalle Figure 12 e 13 possiamo vedere come il colorante ha evidenziato con maggiore efficienza le bande corrispondenti al Marker; considerando che ciascuna delle suddette bande contiene un quantitativo proteico compreso tra 3 e 5  $\mu\text{g}$ , possiamo dedurre che le proteine presenti nel campione testato siano presenti in un quantitativo inferiore.

Ciò che possiamo osservare in entrambi i casi (Figura 12, 13) è la presenza di deboli bande in corrispondenza dei pozzetti contenenti il Pellet, all'altezza delle bande del Marker corrispondenti ad un peso molecolare pari a circa 60-65 kDa,

e 10 kDa. Delle bande sempre corrispondenti ad un peso molecolare pari a 60-65 kDa sono percepibili anche a livello del surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail trattato con doppia concentrazione di buffer DTT-Carbonato (Figura 13).

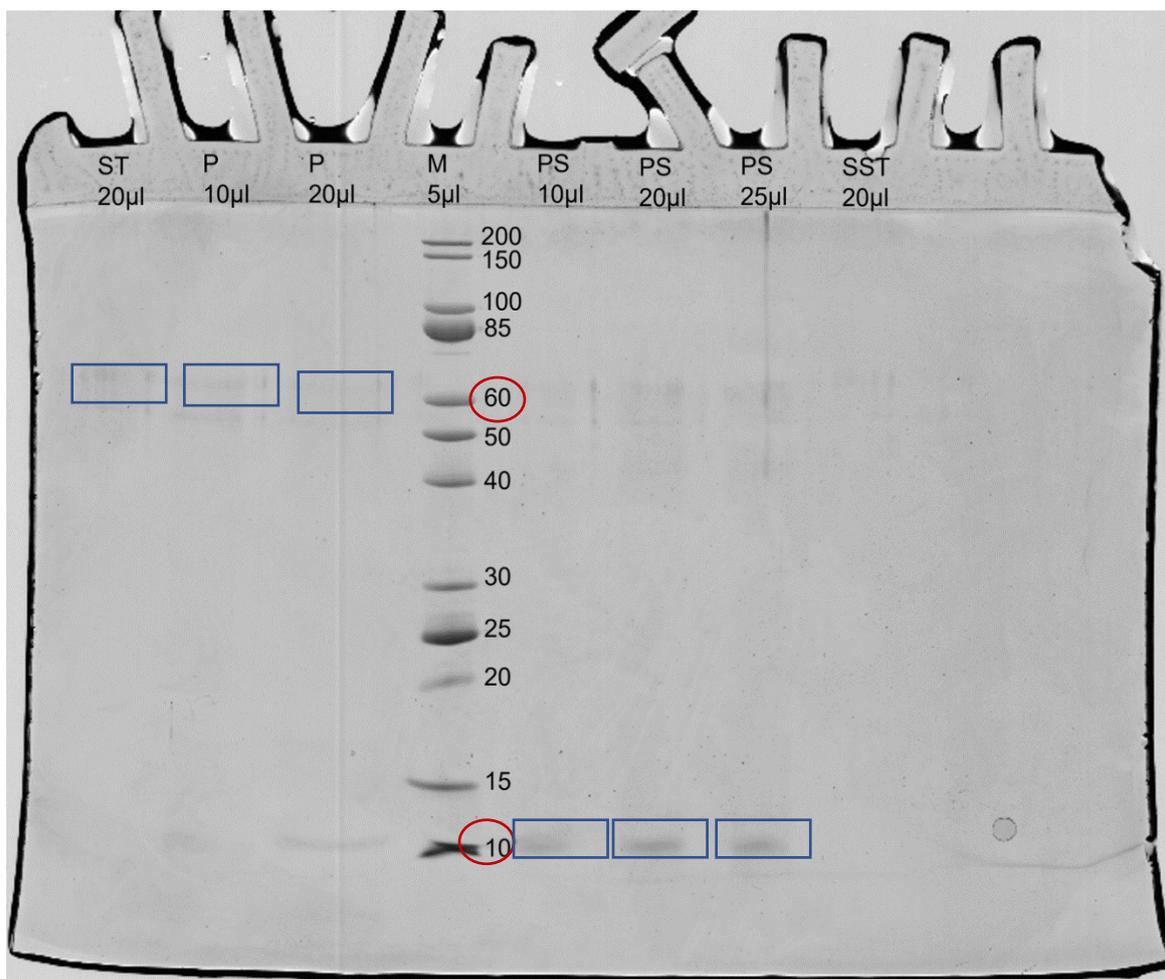
La ridotta quantità di proteine presenti nel campione ha reso impossibile la determinazione della massa proteica, a partire dalle bande ricavate dall'elettroforesi, tramite spettrometria di massa, in quanto al di sotto della soglia rilevabile. Il ridotto quantitativo proteico non è stato considerato un limite per il proseguimento delle analisi tramite trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa, seguito dal Western Blot, in virtù dell'elevata sensibilità degli anticorpi.

Dai risultati ottenuti si evince che, seppur in quantità minime, il protocollo di estrazione delle proteine di membrana, è in grado di rilevare la presenza di tali proteine sia nel residuo citoplasmatico del campione (definito surnatante) che nella matrice organica del guscio (definito pellet) rappresentata dall'insieme degli strati IOL, POS e OOL intercalati nelle lamelle di carbonato di calcio degli individui del genere *Ammonia*. Inoltre, il contenuto proteico sembrerebbe sempre maggiore nella matrice organica del guscio rispetto al residuo citoplasmatico, sottolineando l'importanza di tali matrici nel processo di biomineralizzazione.



*Figura 12*

Gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa alla Prova sperimentale 1. Con P=pellet; S1=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; S2=surnatante ricavato dal secondo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; S3=surnatante ricavato dal terzo lavaggio Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail; M=marker PM in kDa. Le bande sono evidenziate dai riquadri in blu, mentre in rosso troviamo cerchiati i PM corrispondenti.



*Figura 13*

Gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa alla Prova sperimentale 2. Con ST=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail trattato con doppia concentrazione di buffer DTT-Carbonato; P=pellet trattato con doppia concentrazione di buffer DTT-Carbonato; PS=pellet sonicato; SST=surnatante ricavato dal primo lavaggio con Buffer di Lisi e il Protease Inhibitor Cocktail sonicato; M=marker PM in kDa. Le bande sono evidenziate dai riquadri in blu, mentre in rosso troviamo cerchiati i PM corrispondenti.

Successivamente, i gel ottenuti dalle Prove sperimentali 1 e 2 sono stati comparati con quelli ricavati da un progetto precedente svoltosi in collaborazione con la Prof.ssa Annachiara Bartolini del Dipartimento di Scienze della Terra del Museo Nazionale di Storia Naturale di Parigi e con la Dott.ssa Francesca Zito dell'Institut de Biologie Physico-Chimique di Parigi.

Il progetto in questione ha utilizzato oltre al genere *Ammonia*, anche altri generi, tutti caratterizzati da un guscio di carbonato di calcio, quali *Rosalina*, *Amphistegina* ed *Heterostegina*; anche in questo caso, sono stati analizzati parallelamente, il contenuto in proteine di membrana del residuo citoplasmatico (surnatante) e della matrice organica del guscio (pellet) ricavati da ciascuna estrazione.

In figura 14 vediamo riportato il gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa all'estrazione proteica da foraminiferi condotta nel 2012. In particolare, tale analisi aveva considerato oltre a tre diverse specie di foraminiferi anche individui di *Ammonia tepida* con guscio privo di citoplasma all'interno. Ovvero era stata testata la presenza di proteine sia sul residuo citoplasmatico (surnatante) che sul guscio (pellet) di individui considerati vivi al momento del campionamento che sul guscio vuoto di individui di *A. tepida*.

Per quanto riguarda *Amphistegina radiata* ed *Heterostegina depressa*, erano stati considerati solo campioni di surnatante e pellet ricavati da esemplari vivi con citoplasma.

Anche in questo caso, comparando i dati con quelli ottenuti dalle Prove sperimentali 1 e 2, possiamo riscontrare a livello del genere *Ammonia* (*A. tepida* e *A. parkinsoniana*) bande sia attorno ai 50-60 kDa che a 10 kDa; tale distribuzione sembra essere mantenuta anche nelle diverse specie di foraminiferi descritte nella Figura 14 (i.e., *A. radiata* e *H. depressa*).

Il gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa all'estrazione proteica da foraminiferi del 2017 è riportato in Figura 15. In questo caso è stato analizzato il contenuto proteico di due generi, *Amphistegina* e *Rosalina*, distinguendo i campioni in base alla sottoposizione al trattamento termico, e all'utilizzo di acqua marina artificiale o naturale.

Sempre comparando questi dati con quelli ottenuti dalle Prove sperimentali 1 e 2, possiamo riscontrare bande pari a 10 kDa nel genere *Rosalina*. Per quanto riguarda *Amphistegina*, sembrano essere presenti bande comprese tra i 50 e i 60 kDa, che però risultano molto deboli rispetto a quelle corrispondenti a pesi molecolari inferiori (Figura 15).

Il confronto dei diversi gel ha permesso di validare il protocollo in uso e di dimostrare la presenza di proteine di membrana di peso molecolare simile nelle diverse specie di foraminiferi bentonici che hanno un guscio di carbonato di calcio sia bilamellare (genere *Ammonia* e *Amphistegina*) che monolamellare (genere *Heterostegina* e *Rosalina*). La differenza nel tipo di biocalcificazione risiede nel fatto che i foraminiferi monolamellari costruiscono una sola serie di lamelle di calcite anziché due sopra il sito di calcificazione.

Questo risultato suggerisce che, negli strati organici IOL, POS e OOL localizzati nel guscio e coinvolti nel processo di biocalcificazione, sono presenti delle proteine di membrana.

Il dato può essere correlato al modello di biocalcificazione proposto da Nagai et al. (2018) che descrive un ruolo attivo degli pseudopodi nella formazione di una nuova camera. Infatti, essi partecipano alla formazione della struttura tridimensionale precursore della camera (o *anlage*) che ospita il sito di calcificazione (SOC in Nagai et al., 2018). Il SOC rappresenta quindi la combinazione delle strutture organiche, del carbonato di calcio precipitato sulle strutture stesse e gli spazi tra di essi, che insieme formano la parete della camera dei foraminiferi. Tra le strutture organiche, probabilmente rimangono gli pseudopodi che, come parte dell'organismo ameboide unicellulare, sono rivestiti da una membrana plasmatica.

Il ruolo della membrana plasmatica, e quindi delle sue proteine, nel processo della biocalcificazione risiede anche nella presenza a livello della stessa di canali ionici e ATPasi, necessari per il mantenimento del pH. Un pH più elevato è stato infatti registrato nel sito di calcificazione, rispetto all'ambiente esterno (Erez, 2003; Bentov et al., 2009; De Nooijer et al., 2009a) e i dati riguardanti gli isotopi dell'ossigeno ricavati da esperimenti di laboratorio (Spero et al., 1997; Zeebe, 1999) suggeriscono che i foraminiferi possono convertire  $\text{CO}_2$  e/o  $\text{HCO}_3^-$  in  $\text{CO}_3^{2-}$  necessari per la calcificazione (De Nooijer et al., 2014).

Le composizioni elementari e isotopiche della calcite dei foraminiferi dipendono infatti da una serie di parametri ambientali come la temperatura, la salinità, il pH e la concentrazione di ioni (McCrea, 1950; Epstein et al., 1951; Boyle, 1981; Nürnberg et al., 1996). Queste variabili fisiche e chimiche sono alla base dello sviluppo dei proxy geochimici che ci consentono di valutare i cambiamenti ambientali che si susseguono nel tempo.

La membrana plasmatica e le sue componenti sono quindi coinvolte nella creazione delle condizioni favorevoli alla precipitazione dei cristalli di carbonato di calcio, che, sempre come descritto in precedenza, si verifica a livello di entrambi i lati del POS.

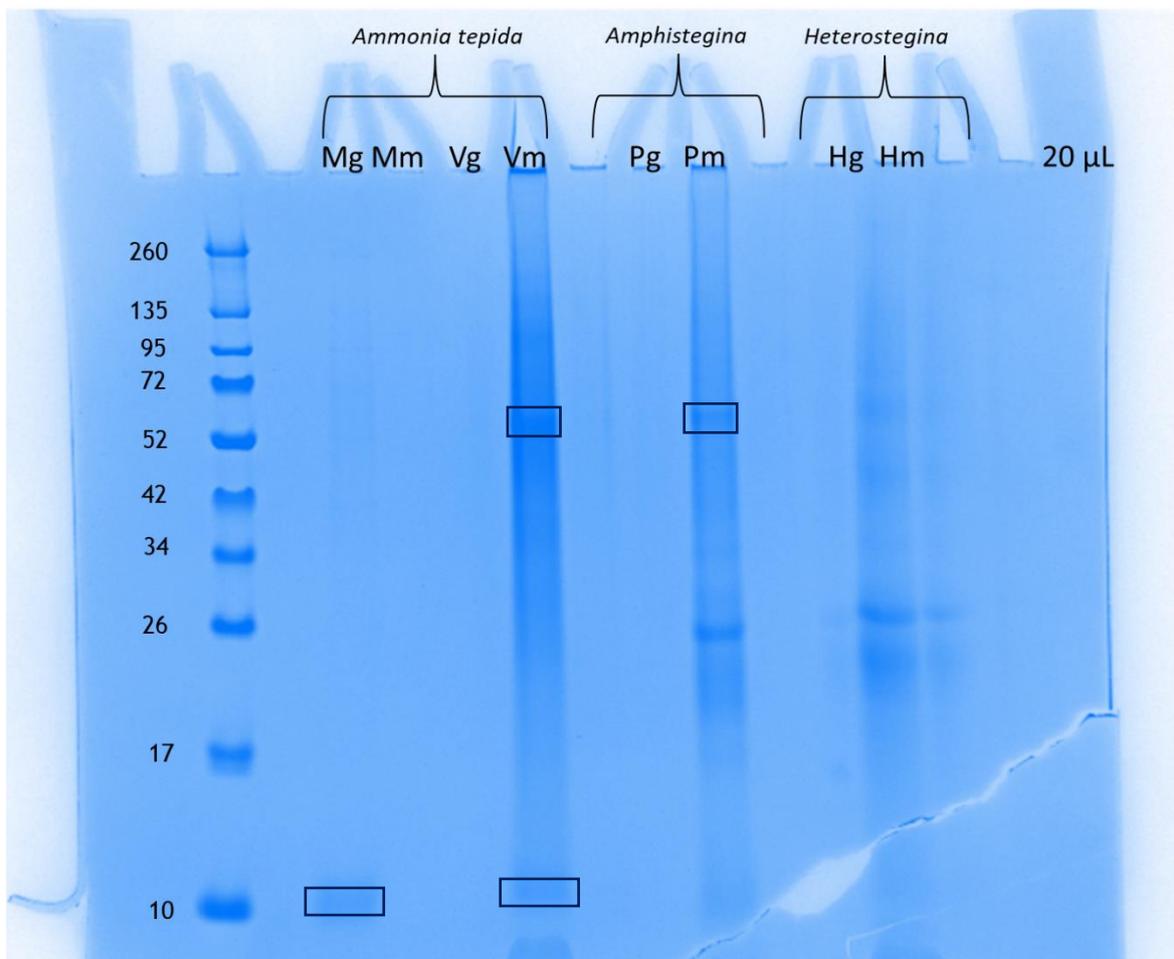
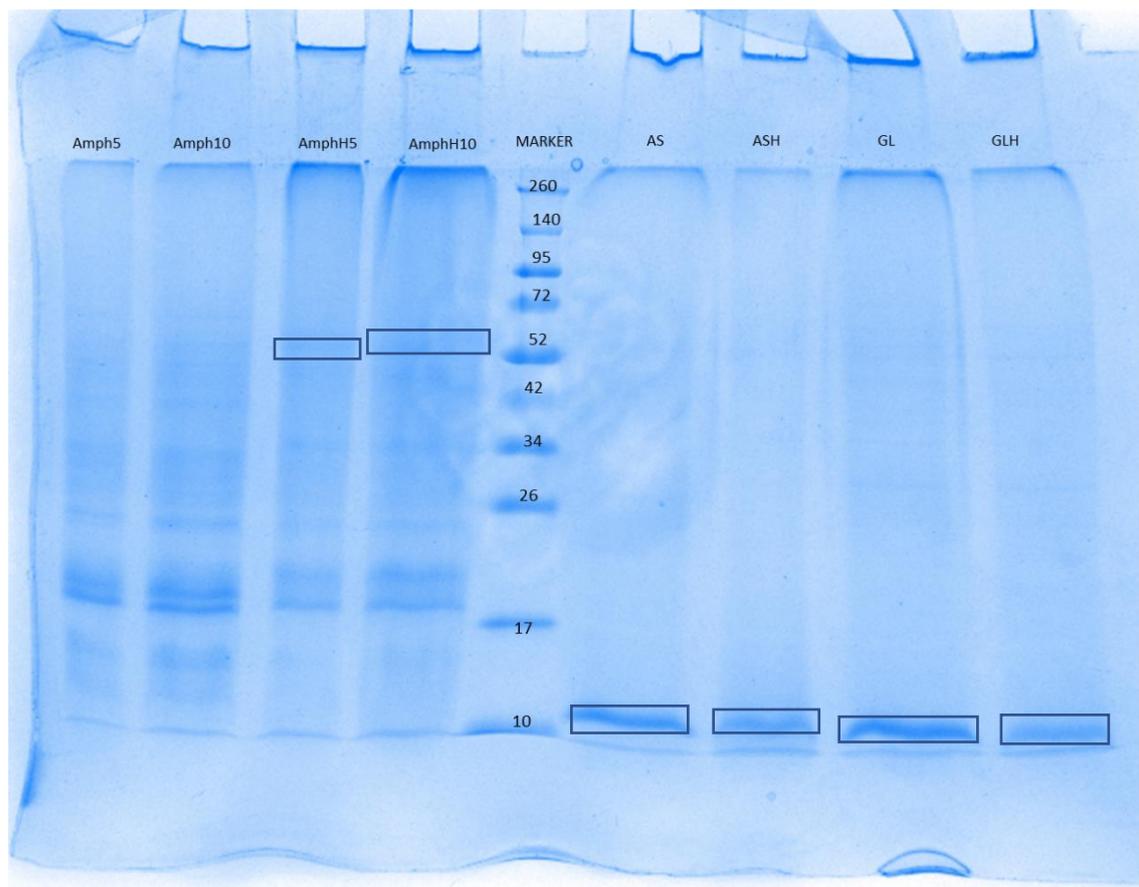


Figura 14

Gel di acrilammide ricavato dall'elettroforesi relativa all'estrazione proteica da foraminiferi del 2012. Con *Ammonia tepida*: Mg=pellet ricavato dai gusci vuoti; Mm=surnatante ricavato dai gusci vuoti; Vg=pellet ricavato da esemplari vivi; Vm=surnatante ricavato da esemplari vivi. *Amphistegina radiata*: Pg=pellet ricavato da esemplari viventi; Pm=surnatante ricavato da esemplari viventi. *Heterostegina depressa*: Hg=pellet ricavato da esemplari viventi; Hm=surnatante ricavato da esemplari viventi. Nella colonna a sinistra troviamo riportato il marker con i relativi pesi molecolari in kDa. Tutte le aliquote sono da 20 µl. Le bande a circa 60 e a 10 kDa sono evidenziate dai riquadri in blu.



*Figura 15*

Gel di agarosio ricavato dall'elettroforesi relativa all'estrazione proteica da foraminiferi del 2017. Con Amph5=aliquota da 5  $\mu$ l di *Amphistegina*; Amph10= aliquota da 10  $\mu$ l di *Amphistegina*; AmphH5=aliquota da 5  $\mu$ l di *Amphistegina* sottoposta a trattamento termico; AmphH10= aliquota da 10  $\mu$ l di *Amphistegina* sottoposta a trattamento termico; AS=aliquota da 14  $\mu$ l di *Rosalina* (acqua marina artificiale); ASH=aliquota da 14  $\mu$ l di *Rosalina* (acqua marina artificiale) sottoposta a trattamento termico; GL=aliquota da 14  $\mu$ l di *Rosalina* (acqua marina naturale); GLH=aliquota da 14  $\mu$ l di *Rosalina* (acqua marina naturale); in posizione centrale troviamo il marker di PM in kDa. Le bande a circa 60 e a 10 kDa sono evidenziate dai riquadri in blu.

#### ***4.2 Discussione dei risultati del Western Blot: confronto degli anticorpi***

Una volta fatta l'elettroforesi dei campioni ricavati dall'estrazione relativa alla Prova sperimentale 4 (condotta a partire da 400 individui) si è proceduto al trasferimento su membrana di nitrocellulosa.

La membrana, prima dell'incubazione con gli anticorpi primari è stata tagliata in modo tale da ottenere tre frammenti ciascuno contenente Marker, Surnatante (campione riferito al residuo citoplasmatico) e Pellet (campione riferito al guscio), ciascuno dei quali è stato poi incubato con un singolo anticorpo primario: Anti ANX A5, Anti ANX A6 e Anti ANX A13. Dopodiché si è proceduto incubando i frammenti con l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit IgG (HRP).

Dalle immagini riportate in Figura 16 possiamo vedere come in un caso sia stato evidenziato in maniera predominante il marker (Figura 16, A), in un altro sono riscontrabili segnali sia a livello del marker che del campione (Figura 16, B) mentre in un altro caso ancora, solo a livello del campione (Figura 16, C).

Da ciò che abbiamo appena descritto, possiamo dedurre che è l'anticorpo primario a legare il marker mentre il secondario evidenzia solo l'avvenuta interazione appena descritta; infatti, vediamo come il marker risulti differentemente evidenziato nei tre frammenti di membrana riportati in Figura

16.

L'anticorpo Anti ANX A5 (Figura 16, A) si è dimostrato il più aspecifico in quanto buona parte delle bande relative al marker è stata evidenziata. Al contempo, nessuna banda risulta percepibile in corrispondenza del Pellet, campione riferito alla matrice organica del guscio e del Surnatante come rappresentante del residuo citoplasmatico, suggerendo l'assenza nel campione di sequenze complementari a quella target dell'anticorpo Anti ANX A5.

Per quanto riguarda i risultati del saggio immunologico condotto con l'anticorpo Anti ANX A6 (Figura 16, B), ciò che emerge è una maggiore specificità di quest'ultimo rispetto all'anticorpo precedentemente considerato, Anti ANX A5. Infatti, le bande relative al marker che è stato in grado di evidenziare, sono poche e concentrate a livello dei pesi molecolari più bassi, a livello dei quali risulta percepibile un segnale anche in corrispondenza dei campioni Pellet e Surnatante, rispettivamente matrice organica del guscio e residuo citoplasmatico. Possiamo quindi ritenere questo un risultato della reazione tra campione e anticorpo Anti ANX A6; tuttavia, la specificità del suddetto non è ancora del tutto soddisfacente.

Nella Figura 16, C, possiamo invece vedere il risultato della reazione tra anticorpo Anti ANX A13 e le proteine di membrana del campione di foraminiferi analizzati. Il marker risulta appena percepibile, specie se

confrontato con i segnali a livello del Pellet e del Supernatante, suggerendo la buona specificità dell'anticorpo primario utilizzato, che evidentemente è stato in grado di riconoscere regioni complementari a quelle presenti nel campione.

Mentre le immagini riportate nella Figura 16 sono state ottenute dopo 10 secondi (Figura 16, A) e 60 secondi (Figura 16, B), in questo caso il segnale è risultato visibile solo dopo 338 secondi.

La rilevazione della reazione tra anticorpo Anti ANX A13 e le proteine del campione ha richiesto tempi maggiori e ha comunque prodotto un segnale debole. Ciò risulta giustificato dal ridotto quantitativo proteico presente nel campione, caratteristica già emersa dai gel elettroforetici sopra descritti e nonostante l'elevata sensibilità degli anticorpi, confermata dai risultati del Western Blot.

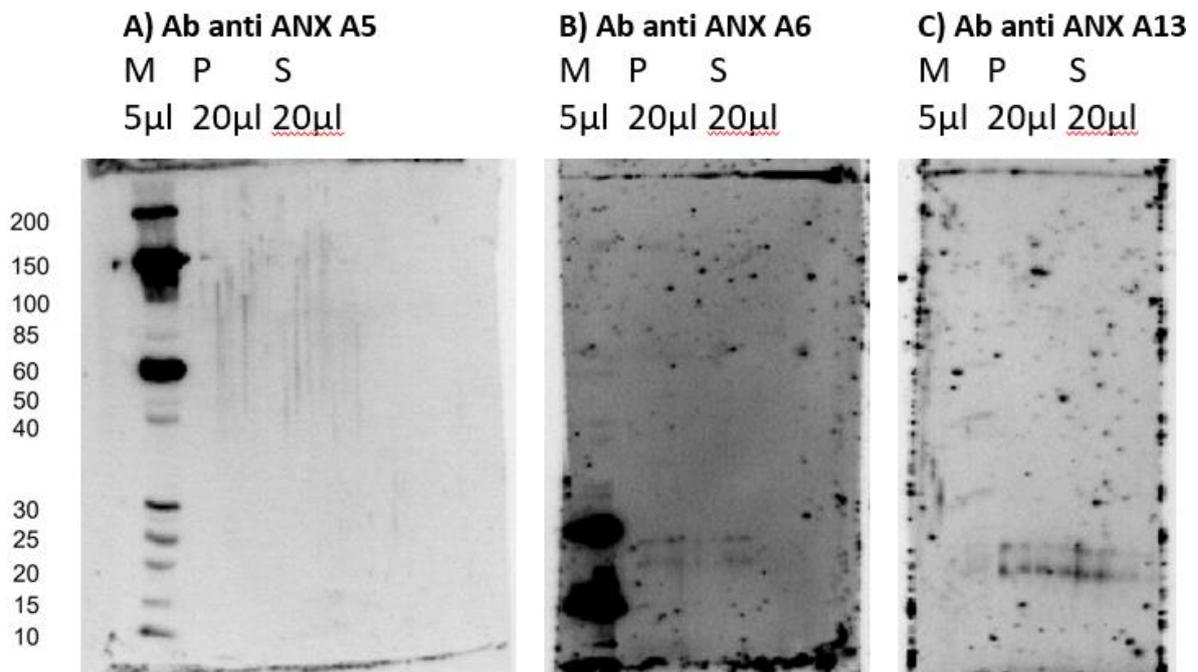
Il risultato emerso da questo studio è quindi la probabile presenza dell'Annessina A13 nella matrice organica del guscio dei foraminiferi *A. tepida* e *A. parkinsoniana*. I saggi anticorpali condotti per verificare la presenza delle Annessine A5 e A6 non hanno mostrato invece riscontri positivi. Inoltre, l'ipotesi della presenza dell'Annessina A13 risultava la più probabile in virtù del fatto che questa proteina è stata trovata in un altro foraminifero, *Reticulomixa filosa*, sebbene questo sia di acqua dolce e privo di guscio di carbonato di calcio. le altre annessine testate sono invece tipicamente umane.

In ogni caso, sulla scheda UniProt relativa all'Annessina A13 di *Reticulomixa filosa*, alla voce "Molecular Function" troviamo riportata la sua natura di proteina legante i fosfolipidi in maniera Ca<sup>2+</sup> dipendente, e legante gli ioni calcio stessi; tale caratteristica rende plausibile un suo coinvolgimento nel meccanismo di biocalcificazione (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/X6LBI7/entry>).

Aver trovato un segnale relativo alla presenza dell'Annessina A13 tramite separazione elettroforetica di un estratto proteico preparato utilizzando un protocollo di estrazione di proteine di membrana, ci informa anche sulla sua localizzazione a livello cellulare.

La rilevazione del segnale a livello del Pellet, e quindi delle proteine presenti a livello della matrice organica del guscio, può rappresentare un indizio della partecipazione dell'Annessina A13 al processo di biocalcificazione, sempre in riferimento al modello proposto da Nagai et al. (2018).

Trattandosi di un risultato preliminare, ulteriori analisi saranno necessarie alla sua validazione.



*Figura 16*

Confronto membrane di nitrocellulosa dopo immunorilevazione con anticorpi primari (A) Anti ANX A5; (B) Anti ANX A6; (C) Anti ANX A13, e anticorpo secondario (A-B-C) Goat Anti Rabbit IgG (HRP).

### ***4.3 Implicazioni dello studio***

I dati di questo lavoro di tesi rappresentano dei risultati preliminari volti a migliorare la comprensione del funzionamento del meccanismo molecolare coinvolto nella biomineralizzazione dei foraminiferi. In particolare, lo studio ha riguardato l'identificazione di proteine di membrana, localizzate nelle matrici organiche del guscio di specie target di foraminiferi bentonici, e probabilmente responsabili del segnale molecolare di biocalcificazione.

Questa linea di ricerca va oltre l'ambito della biologia, in quanto può avere potenziali ripercussioni sia nell'ambito ambientale che geologico.

Su scala globale, tutti i foraminiferi calcarei, sia planctonici che bentonici, generano 1,4 miliardi di tonnellate di carbonato all'anno, pari ad un quarto del carbonato di calcio prodotto a livello globale ogni anno (Langer, 2008).

In quanto produttori di carbonato, questi protisti risultano vulnerabili al riscaldamento degli oceani e all'acidificazione degli stessi, cambiamenti entrambi guidati dalle variazioni legate al clima.

Considerando una scala temporale geologica, gli estesi depositi di calcare del tardo Paleozoico prodotti da foraminiferi bentonici di grandi dimensioni hanno contribuito allo stoccaggio a lungo termine della CO<sub>2</sub> atmosferica.

A partire dal Cretaceo, anche i foraminiferi planctonici hanno ampiamente contribuito a questo immagazzinamento.

I foraminiferi calcificanti hanno quindi svolto un ruolo importante negli ecosistemi del passato e continuano ancora oggi a svolgere la loro funzione partecipando ai moderni cicli geochimici. Essi in particolare costituiscono un importante strumento utilizzato per le ricostruzioni paleoambientali, e ciò grazie al loro record fossile pressoché continuo, favorito anche dalla loro abbondanza.

Molti studi si concentrano infatti sul loro processo di biomineralizzazione, utilizzando una prospettiva geochimica con il fine di registrare i cambiamenti ambientali e climatici, tramite valutazione delle composizioni isotopiche e della presenza di elementi in traccia nel guscio.

Al contempo, l'intima relazione tra i processi biologici a livello cellulare e la secrezione del guscio è stata scarsamente studiata fino ad oggi.

Questo studio si è interrogato sul ruolo dei processi biologici nel controllo della costruzione del guscio dei foraminiferi. Una comprensione dettagliata della biomineralizzazione dei foraminiferi potrebbe infatti (i) fornire una migliore conoscenza delle interazioni tra i foraminiferi e l'ambiente, in un ampio intervallo sia temporale che spaziale, (ii) migliorare la valutazione quantitativa

del bilancio del carbonio e del loro ruolo di immagazzinatori e (iii) implementare l'uso dei foraminiferi come strumenti paleoclimatologici e paleoceanografici.

## Capitolo quinto

### CONCLUSIONI

I risultati di questo studio rappresentano un primo approccio alla comprensione dei meccanismi molecolari della biocalcificazione in questi grandi produttori di carbonato. L'esperimento descritto in questa tesi rappresenta uno studio preliminare che ci indica la presenza di proteine di membrana nel guscio e in particolare di un annessina; dal saggio immunologico, questa sembrerebbe più simile all'Annessina A13, rispetto alle altre due annessine, Annessina A5 e A6, verso le quali erano rivolti gli altri anticorpi testati.

Questo dato è ancora preliminare ma supporta la validità del saggio immunologico considerando che l'Annessina A13 è stata rilevata in un foraminifero bentonico di acqua dolce (*Reticulomyxa filosa*), anche se in una specie differente rispetto a quella usata in questo lavoro (*Ammonita tepida* e *Ammonia parkinsoniana*). Inoltre, le funzioni molecolari dell'Annessina A13 sono rispettivamente quella di legare gli ioni calcio (GO:0005509) e di legarsi alle membrane plasmatiche ricche di fosfatidilserina e fosfatidilglicerolo in maniera calcio dipendente (GO:0005544).

Il fatto, che essa sia stata trovata nella matrice organica del guscio di *A. tepida*, fa supporre il suo coinvolgimento nel processo di biocalcificazione dei foraminiferi.

La letteratura riguardante la biocalcificazione dei foraminiferi è a volte contraddittoria; molte domande restano ancora senza risposta.

1) Alcune specie di foraminiferi perforati o ialini usano acqua di mare vacuolizzata come fonte principale mentre altre specie usano il trasporto transmembrana di ioni calcio e carbonio inorganico disciolto durante la calcificazione.

- Qual è la relazione tra il trasporto transmembrana e la vacuolizzazione da un lato, e la produzione di riserve intracellulari di calcio e/o carbonio dall'altro?

- Quali sono i principi biochimici alla base di questi processi? Quali sono i trasportatori transmembrana coinvolti (ad esempio, Ca-ATPasi, antiporto protone-Ca<sup>2+</sup>)?

- Una volta caratterizzati, questi meccanismi di trasporto possono spiegare l'incorporazione degli elementi e i frazionamenti isotopici osservati? Se sì, questi meccanismi sono condivisi per tutti gli elementi e gli isotopi considerati?

- I foraminiferi utilizzano entrambi i meccanismi per calcificare? In caso affermativo, qual è l'equilibrio tra queste due vie?

2) La struttura a tre componenti della matrice organica è stata descritta da Nagai et al. (2018) così come il ruolo della stessa nella biomineralizzazione.

- Quali delle molecole in essa contenuta contribuiscono alla nucleazione della calcite?

- Questi composti organici hanno un impatto sul coefficiente di partizione degli elementi e sul frazionamento degli isotopi nella prima fase del processo di formazione della camera?

Non possiamo rispondere a molte delle domande ma probabilmente i dati preliminari fanno supporre che *A. tepida* e *A. parkinsoniana* come foraminiferi imperforati usino un meccanismo di accumulo di ioni calcio transmembrana e che le molecole delle matrici organiche del guscio coinvolte siano anche delle annessine.

Fare luce sulle proteine di biomineralizzazione permetterà di studiare il segnale della cellula e quindi il suo effetto vitale o controllo biologico sulla costruzione del guscio in termini soprattutto di composizione in elementi (i.e., Mg, Ca, Sr, O, C) e frazionamento isotopico; questo approccio sarà importante per una corretta interpretazione dei proxies geochimici utilizzati per le ricostruzioni paleoceanografiche e paleoambientali.

Questi risultati preliminari necessitano comunque di ulteriori validazioni. I passi successivi necessari al suo consolidamento sono rappresentati dal sequenziamento dell'intero genoma del foraminifero, la cui mancanza rappresenta un grande limite per lo studio dei meccanismi molecolari alla base della loro biomineralizzazione, e dall'ottenimento delle sequenze proteiche.

## BIBLIOGRAFIA

- Angell, R.W., 1965. The process of chamber formation in the foraminifer *Rosalina floridana* (Cushman). Ph.D. Thesis. University of Chicago, Interdivisional Program in Paleozoology.
- Angell, R.W., 1967a. The test structure and composition of the foraminifer *Rosalina floridana*. *J. Protozool.* 14 (2), 299–307.
- Angell, R.W., 1967b. The process of chamber formation in the foraminifer *Rosalina floridana* (Cushman). *J. Protozool.* 14, 566–574.
- Banner, F. T., & Williams, E. (1973). Test structure, organic skeleton and extrathalamous cytoplasm of *Ammonia Brünnich*. *The Journal of Foraminiferal Research*, 3(2), 49-69.
- Bé, A. W. H., Hemleben, C., Anderson, O. R., and Spindler, M.: Chamber formation in planktonic foraminifera, *Micropaleontology*, 25, 14, <https://doi.org/10.2307/1485304>, 1979.
- Bentov, S., Brownlee, C., Erez, J., 2009. The role of seawater endocytosis in the biomineralization process in calcareous foraminifera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21500–21504.
- Boyle, E., 1981. Cadmium, zinc, copper, and barium in foraminiferal tests. *Earth Planet. Sci. Lett.* 53, 11–35.

- Bradshaw, J. S. (1957). Laboratory Studies on the Rate of Growth of the Foraminifer, " *Streblus beccarii* (Linné) var. *tepida* (Cushman)". *Journal of Paleontology*, 1138-1147.
- Cesbron, F., Geslin, E., Jorissen, F. J., Delgard, M. L., Charrieau, L., Deflandre, B., ... & Metzger, E. (2016). Vertical distribution and respiration rates of benthic foraminifera: Contribution to aerobic remineralization in intertidal mudflats covered by *Zostera noltei* meadows. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 179, 23-38.
- Chang, Y. M., & Kaesler, R. L. (1974). Morphological variation of the foraminifer *Ammonia beccarii* (Linné) from the Atlantic coast of the United States.
- Cushman, J. A. (1926). The foraminifera of the Velasco Shale of the Tampico Embayment. *AAPG Bulletin*, 10(6), 581-612.
- De Nooijer, L. J., Spero, H. J., Erez, J., Bijma, J., & Reichart, G. J. (2014). Biomineralization in perforate foraminifera. *Earth-Science Reviews*, 135, 48-58.
- De Nooijer, L.J., Toyofuku, T., Kitazato, H., 2009a. Foraminifera promote calcification by elevating their intracellular pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15374–15378.
- D'Orbigny, A. D. (1839). *Foraminifères*. A. Bertrand.

- Einarsson, E., Ástvaldsson, Á., Hultenby, K., Andersson, J. O., Svärd, S. G., & Jerlström-Hultqvist, J. (2016). Comparative cell biology and evolution of annexins in diplomonads. *Mosphere*, 1(2), e00032-15.
- Epstein, S., Buchsbaum, R., Lowenstam, H., Urey, H.C., 1951. Carbonate-water isotopic temperature scale. *Bull. Geol. Soc. Am.* 62, 417–426.
- Erez, J. (2003). The source of ions for biomineralization in foraminifera and their implications for paleoceanographic proxies. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 115–149. doi: 10.2113/0540115
- Erez, J., 2003. The source of ions for biomineralization in foraminifera and their implications for paleoceanographic proxies. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 115–149.
- Geslin, E., Barras, C., Langlet, D., Nardelli, M. P., Kim, J. H., Bonnin, J., ... & Jorissen, F. J. (2014). Survival, reproduction and calcification of three benthic foraminiferal species in response to experimentally induced hypoxia. In *Approaches to Study Living Foraminifera* (pp. 163-193). Springer, Tokyo.
- Haq, H. U., & Boersma, A. (1998). *Introduction to Marine Micropaleontology*. Elsevier Science (Singapore) Pte Ltd.
- Hayward, B. W., Holzmann, M., Grenfell, H. R., Pawlowski, J., & Triggs, C. M. (2004). Morphological distinction of molecular types in *Ammonia*–

towards a taxonomic revision of the world's most commonly misidentified foraminifera. *Marine Micropaleontology*, 50(3-4), 237-271.

- Hemleben, C., Erson, O. R., Berthold, W., and Spindler, M. (1986). "Calcification and chamber formation in foraminifera - a brief overview," in *Biom mineralization in Lower Plants and Animals: The Systematics Association*, eds R. Riding and L. BSC (Oxford: Clarendon Press), 237–249
- King, K., 1977. Amino acid survey of recent calcareous and siliceous deep-sea microfossils. *Micropaleontology* 23, 180–193.
- Kunioka, D., Shirai, K., Takahata, N., Sano, Y., Toyofuku, T., and Ujiie, Y.: Microdistribution of Mg = Ca, Sr = Ca, and Ba = Ca ratios in *Pulleniatina obliquiloculata* test by using a NanoSIMS: Implication for the vital effect mechanism, *Geochem. Geophys. Geosy.*, 7, <https://doi.org/10.1029/2006GC001280>, 2006.
- Langer, M. R. (2008). Assessing the contribution of foraminiferan protists to global ocean carbonate production 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(3), 163-169.
- Marszalek, D. S.: Observations on *Iridia diaphana*, a Marine Foraminifer, *J. Protozool.*, 16, 599–611, 1969.
- McCrea, J.M., 1950. On the isotopic chemistry of carbonates and a paleotemperature scale. *J. Chem. Phys.* 18, 849–857.

- Mirsaeidi, M., Gidfar, S., Vu, A., & Schraufnagel, D. (2016). Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *Journal of translational medicine*, 14(1), 1-9.
- Moodley, L., & Hess, C. (1992). Tolerance of infaunal benthic foraminifera for low and high oxygen concentrations. *The Biological Bulletin*, 183(1), 94-98.
- Murray, J. W. (2001). The niche of benthic foraminifera, critical thresholds and proxies. *Marine Micropaleontology*, 41(1-2), 1-7.
- Nagai, Y., Uematsu, K., Chen, C., Wani, R., Tyszka, J., & Toyofuku, T. (2018). Weaving of biomineralization framework in rotaliid foraminifera: implications for paleoceanographic proxies. *Biogeosciences*, 15(22), 6773-6789.
- Nagai, Y., Uematsu, K., Wani, R., & Toyofuku, T. (2018). Reading the fine print: Ultra-microstructures of foraminiferal calcification revealed using focused ion beam microscopy. *Frontiers in Marine Science*, 5, 67.
- Nardelli, M. P., Barras, C., Metzger, E., Mouret, A., Filipsson, H. L., Jorissen, F., & Geslin, E. (2014). Experimental evidence for foraminiferal calcification under anoxia. *Biogeosciences*, 11(14), 4029-4038.

- Nürnberg, D., Bijma, J., and Hemleben, C.: Assessing the reliability of magnesium in foraminiferal calcite as a proxy for water mass temperatures, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 60, 803–814, 1996.
- Nürnberg, D., Bijma, J., Hemleben, C., 1996. Assessing the reliability of magnesium in foraminiferal calcite as a proxy for water mass temperature. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 803–814.
- Pautard, F.G., 1970. Calcification in unicellular organisms. Chapter 4. In: Schraer, H. (Ed.), *Biological Calcification*. Appleton-Century-Crofts, pp. 105–201.
- Phleger, F. B., and Parker, F. L. Ecology of Foraminifera, northwest Gulf of Mexico, *Geol. Soc. Amer. Mem.* 46. 1951.
- Saad, S. A., & Wade, C. M. (2016). Seasonal and spatial variations of saltmarsh benthic foraminiferal communities from North Norfolk, England. *Microbial Ecology*. ISSN 1432-184X.
- Sabbatini, A., Bédouet, L., Marie, A., Bartolini, A., Landemarre, L., Weber, M.X., Gusti Ngurah Kade Mahardika, I., Berland, S., Zito, F., V'enc-Peyr'e, M.T., 2014 Biomineralization of *Schlumbergerella floresiana*, a significant carbonate-producing benthic foraminifer. *Geobiology*. 12 (4), 289–307.

- Schiebel, R., & Hemleben, C. (2017). Planktic foraminifers in the modern ocean.
- Schultze, M. J. S.: Über den Organismus der Polythalamien (Foraminiferen), nebst Bemerkungen über die Rhizopoden im allgemeinen, Ingelmann, Leipzig, Germany, 1854.
- Schweizer, M., Polovodova, I., Nikulina, A., & Schönfeld, J. (2011). Molecular identification of Ammonia and Elphidium species (foraminifera, Rotaliida) from the Kiel Fjord (SW Baltic Sea) with rDNA sequences. Helgoland Marine Research, 65(1), 1-10.
- Sen Gupta, B. K., Eugene Turner, R., & Rabalais, N. N. (1996). Seasonal oxygen depletion in continental-shelf waters of Louisiana: Historical record of benthic foraminifers. Geology, 24(3), 227-230.
- Spero, H. J. (1988). Ultrastructural examination of chamber morphogenesis and biomineralization in the planktonic foraminifer *Orbulina universa*. Mar. Biol. 99, 9–20. doi: 10.1007/BF00644972
- Spero, H.J., Bijma, J., Lea, D.W., Bemis, B.E., 1997. Effect of seawater carbonate concentration on foraminiferal carbon and oxygen isotopes. Nature 390, 497–500.

- Thibault de Chanvalon, A., Metzger, E., Mouret, A., Cesbron, F., Knoery, J., Rozuel, E., ... & Geslin, E. (2015). Two-dimensional distribution of living benthic foraminifera in anoxic sediment layers of an estuarine mudflat (Loire estuary, France). *Biogeosciences*, 12(20), 6219-6234.
- Towe, K.M., Cifelli, R., 1967. Wall ultrastructure in the calcareous foraminifera: crystallographic aspects and a model for calcification. *J. Paleontol.* 742–762.
- Toyofuku, T., Kitazato, H., Kawahata, H., Tsuchiya, M., and Nohara, M.: Evaluation of Mg= Ca thermometry in foraminifera Comparison of experimental results and measurements in nature, *Paleoceanography*, 15, 456–464, 2000.
- Toyofuku, T., Suzuki, M., Suga, H., Sakai, S., Suzuki, A., Ishikawa, T., De Nooijer, L. J., Schiebel, R., Kawahata, H., and Kitazato, H.: Mg= Ca and  $\delta_{18}O$  in the brackish shallow-water benthic foraminifer *Ammonia* “beccarii”, *Mar. Micropaleontol.*, 78, 113–120, 2011.
- Travis, J. L. and Bowser, S. S.: Reticulopodial Motility, in: *The Biology of the Foraminifera*, edited by: Lee, J. J. and Anderson, O. R., Academic Press, London, UK, 1991.

- Tyszka, J., Godos, K., Goleń, J., & Radmacher, W. (2021). Foraminiferal organic linings: Functional and phylogenetic challenges. *Earth-Science Reviews*, 220, 103726.
- Urey, H. C., Lowenstam, H. A., Epstein, S., and McKinney, C.R.: Measurement of paleotemperatures and temperatures of the upper cretaceous of England, Denmark, and the southeastern United States, *GSA Bulletin*, 62, 399–416, 1951.
- van Dijk, I., de Nooijer, L. J., and Reichart, G.-J.: Trends in element incorporation in hyaline and porcelaneous foraminifera as a function of pCO<sub>2</sub>, *Biogeosciences*, 14, 497–510, <https://doi.org/10.5194/bg-14-497-2017>, 2017.
- Veschi, E. A., Bolean, M., Strzelecka-Kiliszek, A., Bandorowicz-Pikula, J., Pikula, S., Granjon, T., ... & Ciancaglini, P. (2020). Localization of annexin A6 in matrix vesicles during physiological mineralization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1367.
- Walton, W. R., & Sloan, B. J. (1990). The genus *Ammonia* Bruennich, 1772; its geographic distribution and morphologic variability. *The Journal of Foraminiferal Research*, 20(2), 128-156.

- Walton, W. R.; Sloan, B. J. (1990). "The genus *Ammonia* Bruennich, 1772; its geographic distribution and morphologic variability". *The Journal of Foraminiferal Research*. 20 (2): 128–156. [doi:10.2113/gsjfr.20.2.128](https://doi.org/10.2113/gsjfr.20.2.128)
- Zeebe, R.E., Bijma, J., Wolf-Gladrow, D.A., 1999. A diffusion–reaction model of carbon isotope fractionation in foraminifera. *Mar. Chem.* 64, 199–227.