



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Sede Consorziata: Seconda Università degli Studi Di Napoli
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Biologia e Medicina della Rigenerazione
INDIRIZZO: Endocrinologia Comparata
CICLO: XXIV

**STUDIO DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTIMOSINA-ALFA NELLE CELLULE GERMINALI
MEIOTICHE E POST-MEIOTICHE DURANTE LA PRIMA ONDATA SPERMATOGENETICA DI
RATTO E NEGLI SPERMATOZOI EPIDIDIMALI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Luisa Dalla Valle
Supervisore: Ch.mo Prof. Sergio Minucci

Dottorando: Paolo Pariante

I. Indice

II. Abstract (Italiano)	II
III. Abstract (English)	IV
1. Introduzione	1
<i>1.1 - La Protimosina α</i>	<i>1</i>
1.1.1 - Storia della famiglia e isolamento	1
1.1.2 - Caratteristiche di PTMA e della famiglia genica	3
1.1.3 - Ruolo biologico di PTMA	7
1.1.3a - PTMA e la cromatina	8
1.1.3b - PTMA e la proliferazione, i tumori, l'apoptosi	9
1.1.3c - PTMA, l'immunità e altre funzioni	13
<i>1.2 - Le gonadi maschili e la spermatogenesi</i>	<i>16</i>
1.2.1 - Struttura del testicolo nei mammiferi	16
1.2.2 - La spermatogenesi dei Mammiferi	18
1.2.3 - Struttura subcellulare della testa dello SPZ maturo	21
2. Scopo della ricerca	29
3. Materiali e Metodi	31
4. Risultati	56
<i>4.1 - Espressione del trascritto di Ptma e della proteina in ratti adulti</i>	<i>56</i>
<i>4.2 - PCR e WB durante la prima ondata della spermatogenesi di ratto</i>	<i>57</i>
<i>4.3 - Localizzazione di Ptma durante la prima ondata della spermatogenesi</i>	<i>59</i>
<i>4.4 - Localizzazione di PTMA nei testicoli e negli spermatozoi di ratto</i>	<i>61</i>
<i>4.5 - Analisi di co-localizzazione di PTMA tramite IF su eSPZ di ratto</i>	<i>67</i>
<i>4.6 - Analisi di co-localizzazione di PTMA tramite IF su SPZ di uomo</i>	<i>70</i>
5. Discussione e Conclusioni	73
6. Bibliografia	77

II. Abstract (Italiano)

La protimosina- α (PTMA) è una proteina acida di piccole dimensioni, studiata per la prima volta nel timo di ratto quale fattore immunogeno (Haritos et al., 1984a), e in seguito identificata in molteplici tessuti dei Mammiferi, tra cui il cervello, il cuore, i reni, e le gonadi (Haritos et al., 1984b; Clinton *et al.*, 1989). La proteina è filogeneticamente conservata: la sua presenza è stata confermata in ogni Mammifero finora studiato, mentre, solo di recente, è stata scoperta in un ristretto numero di Vertebrati non mammiferi, quali *Rana esculenta*, (Aniello *et al.*, 2002), *Danio rerio* (Donizetti *et al.*, 2008) e *Torpedo marmorata* (Prisco *et al.*, 2009). Le atipiche caratteristiche strutturali di PTMA favoriscono l'assunzione di una conformazione nativa random-coil (Gast *et al.*, 1995), che le consente di interagire con numerose molecole di natura cationica. Ciò, insieme alla sua localizzazione, che si estende dal nucleo al citoplasma fino ai distretti extracellulari (Enkermann *et al.*, 2000b, Mosoian, 2011), giustifica la sua partecipazione in una elevata varietà di processi biologici. Tra le innumerevoli funzioni associate a PTMA vi sono la proliferazione cellulare, il rimodellamento della cromatina (tramite il legame all'istone H1), l'attivazione trascrizionale, la difesa dai sistemi di morte cellulare, e la trasformazione neoplastica, ruoli che sono stati spesso spiegati con l'ipotesi del mimetismo molecolare. Pochi studi finora hanno affrontato il possibile coinvolgimento di PTMA nella riproduzione, precisamente nella gametogenesi maschile: i primi riscontri hanno suggerito che la proteina possa essere associata alle fasi proliferative e alle prime fasi meiotiche della spermatogenesi dei Mammiferi (Rosón *et al.*, 1990). In seguito, il nostro gruppo ha dato inizio a un progetto di tipo comparativo sulla spermatogenesi dei vertebrati e ha riportato, per la prima volta, l'isolamento della protimosina in una specie non-mammifera, l'Anfibio *Rana esculenta* (Aniello *et al.*, 2002): il trascritto di *ptma* è espresso ad alti livelli durante il ciclo riproduttivo annuale della rana, con un picco in Settembre/Ottobre, quando sono in corso le meiosi e le prime fasi della spermiogenesi, ed è localizzato negli spermatociti

(SPC) I e II, e nelle cellule di Leydig (LC; Aniello *et al.*, 2002). Analogamente, la proteina è stata rilevata nel compartimento germinale, dagli SPCII agli spermatozoi (SPZ) e nelle LC (Ferrara *et al.*, 2009). Recentemente, è stato evidenziato un *pattern* corrispondente nel pesce selaceo *Torpedo marmorata*. I nostri dati suggeriscono, dunque, che PTMA sia associata alle fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi dei vertebrati.

Allo scopo di proseguire gli studi comparati e di valutare la possibile conservazione del pattern nei mammiferi, nel presente testo abbiamo studiato la correlazione tra PTMA e le fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi di ratto. Per prima cosa abbiamo confermato la presenza del messaggero e della proteina nei testicoli di esemplari adulti, poi ci siamo soffermati sulla prima ondata della spermatogenesi, analizzando gonadi di giovani ratti prelevate a tre tempi di sviluppo, ognuno valido per l'osservazione approfondita di specifiche cellule germinali (CG): 27 giorni dopo la nascita (dpp), momento in cui le meiosi sono state completate per la prima volta; 35 dpp, durante la spermiogenesi; 60 al termine della prima ondata, quando il testicolo è ormai maturo. I nostri dati mostrano che sia i livelli di espressione dell'mRNA di *Ptma*, sia della proteina subiscono una riduzione da 27 a 60 dpp. L'ibridazione *in situ* ha permesso di localizzare il trascritto nelle LC e nelle cellule peritubulari mioidi (PMC) e, nei tubuli, dagli SPC in pachitene agli SPT aploidi di nuova formazione. L'analisi di immunostochimica ha mostrato che la proteina si trova negli stessi tipi cellulari a 27 dpp, mentre nel compartimento germinale a 35 e a 60 dpp è rilevabile solo nelle cellule aploidi (Ferrara *et al.*, 2010). Ulteriori indagini hanno mostrato che PTMA è associata al sistema acrosomale durante tutto il processo di biogenesi, fino alla sua destinazione perinucleare nella testa dello SPZ, come supportato da studi di immunofluorescenza su gameti maturi di ratto e uomo.

Pertanto, i nostri dati rivelano, per la prima volta, che PTMA potrebbe avere un ruolo diretto nella maturazione degli SPZ dei Mammiferi, o addirittura concorrere alla realizzazione degli eventi successivi della fecondazione.

III. Abstract (English)

Prothymosin- α (PTMA) is a small, highly acidic protein, first studied in the rat thymus as an immunogenic factor (Haritos et al., 1984a), and soon detected in a wide variety of mammalian tissues, including heart, brain, kidney and gonads (Haritos et al., 1984b; Clinton *et al.*, 1989). The protein is noticeably conserved through evolution: it has been found in all the Mammals studied so far and, only recently, in a restricted number of non-mammalian Vertebrates, such as *Rana esculenta*, (Aniello *et al.*, 2002), *Danio rerio* (Donizetti *et al.*, 2008) and *Torpedo marmorata* (Prisco *et al.*, 2009). PTMA uncommon structural features support the adoption of a native random-coil conformation (Gast *et al.*, 1995), which favours both its interaction with several cationic species and its varied localization, that spans from nuclear and cytoplasmic intracellular environments to the extracellular districts (Enkermann *et al.*, 2000b, Mosoian, 2011), allowing for its established participation in a substantial variety of physiological processes. Among the multiple functions that have been associated with PTMA are cell proliferation, DNA packaging (through its binding to histone H1), activation of transcription, cell survival, and neoplastic transformation, some of which have often been ascribed to molecular mimicry. Only few studies have tried to weigh its possible involvement in reproduction, specifically in male gametogenesis: the first reports suggested that PTMA might be associated with the proliferative and early-meiotic phases of Mammal spermatogenesis (Rosón *et al.*, 1990). Some years later our group started a comparative project on vertebrate spermatogenesis and reported, for the first time, the isolation of the prothymosin in a non-mammalian species, the Amphibian *Rana esculenta* (Aniello *et al.*, 2002): *ptma* transcript is highly expressed through the annual reproductive cycle of this frog, peaking in September/October, when meiosis is active and the first phases of spermiogenesis are occurring, and it is localized in I and II spermatocytes (SPC), as well as in the interstitial Leydig cells (LC; Aniello *et al.*, 2002). Consistently, the protein has been found in the

germinal compartment, from IISPC to spermatozoa (SPZ), and in the LC (Ferrara *et al.*, 2009). A congruent pattern has been recently highlighted in studies on the fish *Torpedo marmorata*. Thus, our data have suggested that PTMA could be associated with the meiotic and post-meiotic phases of vertebrate spermatogenesis.

In order to extend our comparison and to evaluate the possible conservation of this pattern in Mammals, in the present work we have studied the correlation between PTMA and the meiotic and post-meiotic phases of rat spermatogenesis. After confirming the presence of both the transcript and its protein in the testes of adult specimens, we focused on the first wave of spermatogenesis, analysing young male gonads sampled at three developmental time points, each one suitable for the thorough observation of specific germ cell (GC) types: 27 dpp (days post-partum), when meiosis has been completed for the first time; 35 dpp, during the spermiogenic phase; 60 dpp, after the end of the first wave, when the testis is fully developed. Our experiments showed that the expression levels of both *Ptma* mRNA and of the corresponding protein decrease in total extracts from 27 to 60 dpp. The *in situ* hybridization localized the transcript in interstitial LC, peritubular myoid cells (PMC) and, inside the tubules, in GC from pachytene SPC to the newly formed haploid SPT. The immunohistochemistry analysis localized the protein in the same cell types at 27 dpp, while in the germinal compartment at 35 and 60 dpp PTMA is only detectable in the haploid cells. Further analysis have shown that the protein is associated with the acrosome system throughout its biogenesis, up until its final perinuclear destination in the head of SPZ (Ferrara *et al.*, 2010), as corroborated by immunofluorescence studies on rat and human mature gametes.

Thus, our data reveal, for the first time, that PTMA may play a direct role in the maturation of Mammal SPZ, or even be involved in the subsequent events of fertilization.

1. Introduzione

1.1 - La Protimosina α

1.1.1 - Storia della famiglia e isolamento

L'importanza del timo nello sviluppo del sistema immunitario è ben nota, e la presenza del suo microambiente è un elemento essenziale per la maturazione dei linfociti T. Ad oggi permangono dubbi sull'effettiva sequenza di eventi differenziativi, ma è ormai chiara la rilevanza dell'intervento di fattori umorali perché essa sia compiuta (Goldstein e White., 1970); già dal 1949, infatti, è stata riportata l'esistenza di frazioni timiche ricche di nucleoproteine in grado di stimolare la produzione linfocitaria (Roberts e White., 1949; Gregoire e Duchateau, 1956; Klein *et al.*, 1966), e capaci di contrastare gli effetti della timectomia neonatale nei roditori, ripristinando i loro parametri immunitari. Nel 1966 è stata riportata la preparazione e la parziale purificazione, dal timo di vitello, di un fattore proteico linfocitopoietico, denominato *timosina*, attivo sia a seguito di somministrazione *in vivo*, sia su sospensioni linfocitarie incubate *in vitro* (Goldstein *et al.*, 1966). Gli studi successivi si sono concentrati principalmente sulla "frazione timosinica 5" estratta dall'organo, in breve tempo definita come una preparazione in grado di potenziare il sistema immunitario e di ottenere la ricostituzione della funzione immune in animali immunodepressi (Thurman *et al.*, 1975), probabilmente per mezzo della sua componente acida (Goldstein *et al.*, 1975). Nello stesso periodo, da questa frazione sono stati caratterizzati altri polipeptidi immunoattivi (Goldstein *et al.*, 1972; Hooper *et al.*, 1975) tra i quali una piccola molecola denominata timosina α_1 ($T\alpha_1$), costituita da 28 a.a, e dal punto

isoelettrico di 4.2 (Goldstein *et al.*, 1977; Low e Goldstein, 1985). Dato l'accrescimento del numero dei membri appartenenti alla famiglia (più di 40 molecole da 1 a 15 KDa, provenienti dalla frazione 5), si è adottata una nomenclatura delle timosine basata sul loro punto isoelettrico; le proteine sono state, così, divise in tre gruppi principali (Goldstein *et al.*, 1977): α -timosine (pI < 5.0); β -timosine (pI tra 5.0 e 7.0); γ -timosine (pI > 7.0).

L'osservazione che $T\alpha_1$ possedeva solo alcune delle principali attività biologiche della frazione 5, tra cui la modulazione di alcuni passaggi della maturazione dei linfociti T (Schulof e Goldstein, 1981) ha fatto presto pensare che la funzione immunologica completa fosse espletata da più peptidi. Del resto, vi era la possibilità che $T\alpha_1$ fosse prodotto come artefatto tecnico dovuto all'elevata suscettibilità della metodica di estrazione all'azione delle proteasi, e che rappresentasse un frammento proteolitico di un polipeptide di maggiori dimensioni. L'ipotesi era supportata dalla scoperta che nell'estratto erano presenti almeno altre due molecole strettamente correlate (Caldarella *et al.*, 1983): des-(25-28)-timosina α_1 , contenente i primi 24 residui di $T\alpha_1$, e timosina α_{11} , contenente l'intera sequenza di $T\alpha_1$ più sette residui C-terminali: la presenza nella stessa frazione di tre molecole con una sequenza aminoacidica identica non escludeva, però, che esse fossero peptidi fisiologici maturi, originati da uno stesso precursore in seguito a differenti tagli proteolitici.

Le previsioni sull'esistenza di un'altra proteina, sfuggita alle analisi precedenti, sono state confermate nel 1984 (Haritos *et al.*, 1984a, b), con l'isolamento, dal timo di ratto, di un polipeptide molto acido (pI = 3.55), composto di 112 a.a. e contenente all'N-terminale l'intera sequenza di $T\alpha_1$: la molecola è stata, così, denominata *protimosina- α* (ProT- α , PTMA; **Fig.1.1A**). In realtà, non è stato chiarito se $T\alpha_1$ fosse un prodotto di proteolisi artificiale durante la preparazione della frazione 5, o se fosse parte del normale processo di maturazione della protimosina, fino al 2003, quando è stato definito che essa è

effettivamente prodotta per azione di proteasi lisosomiali, che tagliano PTMA in corrispondenza del legame peptidico Asn28-Gly29 (Sarandeses *et al.*, 2003).

Nonostante il timo sia la principale fonte di PTMA, la proteina e il trascritto sono stati trovati in un alto numero di altri tessuti (Haritos *et al.*, 1984b; Clinton *et al.*, 1989). Nell'mRNA la presenza di un codone di inizio immediatamente precedente la tripletta per la serina N-terminale, e il codone di stop successivo al W-109 C-terminale, suggeriscono che il prodotto sia sintetizzato direttamente, senza precursori; inoltre, non vi è un peptide segnale (Goodall *et al.*, 1986).

PTMA è stata rilevata in tutti i Mammiferi finora studiati e la sua sequenza è molto conservata (**Fig. 1.1B,C**); per molto tempo non è stato possibile determinare la sua presenza in specie al di fuori della classe, al punto che si pensava improbabile che la sua filogenesi avesse avuto inizio prima della nascita del gruppo (Thrubore *et al.*, 1998). Negli ultimi anni, però, la molecola è stata identificata e studiata in altri Vertebrati, come gli Anfibi (*Rana esculenta*; Aniello *et al.*, 2002; De Rienzo *et al.*, 2002), i Condroitti (*Torpedo marmorata*; Prisco *et al.*, 2009) e i Teleostei (*Danio rerio*; Donizetti *et al.*, 2008), ed è stata confermata la sua partecipazione in molteplici funzioni biologiche.

1.1.2 - Caratteristiche di PTMA e della famiglia genica

Acquisire la conoscenza dei determinanti strutturali di una molecola fornisce dettagli importanti per comprendere il suo comportamento e le sue funzioni; la protimosina mostra certamente una struttura molto particolare, decisamente correlata alla promiscuità funzionale ad essa attribuita. Si è già accennato all'elevato grado di conservazione tra gli ortologi (**Fig. 1.1C**): PTMA di ratto (112 a.a.) e uomo (110) mostrano identità del 95%,

differendo in sole 6 posizioni, tra cui 4 sostituzioni e 2 delezioni. A sua volta, PTMA di vitello (109 a.a.) è quasi identica a quella umana, e anche i membri più distanti della famiglia mostrano elevati rapporti di correlazione, con identità non inferiore al 50%, e con similarità superiore al 70%.

PTMA è una delle proteine maggiormente acide presenti in natura: il suo punto isoelettrico è inferiore a 3.5 e, in tutte le specie descritte, è priva di amminoacidi aromatici (dunque, non assorbe a 280 nm), di cisteine o metionine, mentre circa metà della struttura primaria è rappresentata da a.a. acidi (52, di cui 31 nella regione centrale; Frangou-Lazaridis *et al.*, 1988), in rapporto 5:1 con quelli basici (**Fig.1.1**). Inoltre, tutti i membri presentano 9 lisine in posizioni conservate, quasi equamente divise tra le estremità N- e C-terminale. L'elevato contenuto acido rende PTMA molto carica negativamente, determinando l'adozione fisiologica di una conformazione *random-coil*, priva di strutture secondarie o terziarie definite (Gast *et al.*, 1995), nonostante sia stato studiato che la molecola può formare fibrille in specifiche condizioni sperimentali. Tali caratteristiche la rendono in grado di interagire con molte molecole di natura cationica e, potenzialmente, con membrane o recettori, mentre la stabilizzazione dell'N-terminale, dovuta sia alla sequenza, sia all'acetilazione post-traduzionale, fa sì che PTMA sia resistente alla degradazione. L'assenza di una struttura terziaria non rappresenta un limite funzionale: come è noto, infatti, alcune proteine possono ripiegarsi contestualmente in caso di interazione con altre molecole, acquisendo conformazioni di transizione biologicamente attive.

La localizzazione di PTMA, coerentemente con la sua duttilità strutturale, è estesa, essendo stata confermata a livello nucleare, citoplasmatico, e nei distretti extracellulari. È stato, infatti, identificato un segnale di localizzazione nucleare (NLS) bipartito nella regione C-terminale della molecola (**Fig. 1.1B**) filogeneticamente conservato. L'induzione

di mutazioni in entrambe le parti dell’NLS porta a una marcata redistribuzione della proteina nel citoplasma cellulare. La sequenza è divisa da amminoacidi principalmente acidi che mostrano motivi sovrapponibili e ripetuti -DXXD-, conformi ai siti di reclutamento della caspasi-3 (**Fig. 1.1B**): è stato determinato che, in cellule in apoptosi, il taglio della protimosina- α per opera della caspasi induce la perdita del segnale NLS e, di conseguenza, della sua capacità di entrare nel nucleo (Enkermann *et al.*, 2000a).

PTMA è oggetto di modificazioni post-traduzionali: è fosforilata durante tutto il ciclo cellulare, sebbene vi sia una controversia riguardo ai residui interessati (Sburlati *et al.*, 1991; Barcia *et al.* 1993;). E’ probabile che *in vivo* la proteina sia fosforilata solo a livello del glutammato, caso unico nei Mammiferi (Trumbore *et al.*, 1997); viste le proprietà di tale modificazione è possibile che i legami del glutammil-fosfato siano in grado di fornire energia per i processi nucleari e che, data la possibilità di ritrasferire il fosfato all’ADP, PTMA agisca come uno scambiatore energetico nel nucleo (Trumbore *et al.*, 1997; Hannappel e Huff, 2003).

A livello genomico la protimosina è stata ben caratterizzata nell’uomo: è codificata da una famiglia composta di sette membri, alcuni dei quali molto conservati (Eschenfeldt *et al.*, 1989; Rubtsov e Vartapetian, 1995). Uno di essi, localizzato sul cromosoma 2 (in *Homo sapiens*; Szabo *et al.*, 1993), contiene esoni, introni e segnali regolatori classici, mentre gli altri sei sono privi di introni (Eschenfeldt *et al.*, 1989; Rubtsov e Vartapetian, 1995) e probabilmente sono pseudogeni (Manrow *et al.*, 1992). Dal *locus* codificante sono prodotti due mRNA, isolati originariamente dalla milza e dai fibroblasti, sintetizzati come isoforme dovute a splicing alternativo. Questa maturazione avviene a livello dell’accettore AG al confine tra l’introne 2 e l’esone 3, dando un rapporto 9:1 tra la forma più lunga e quella più corta, che differiscono per la presenza di una tripletta per il glutammato. Sembra

Figura 1.1

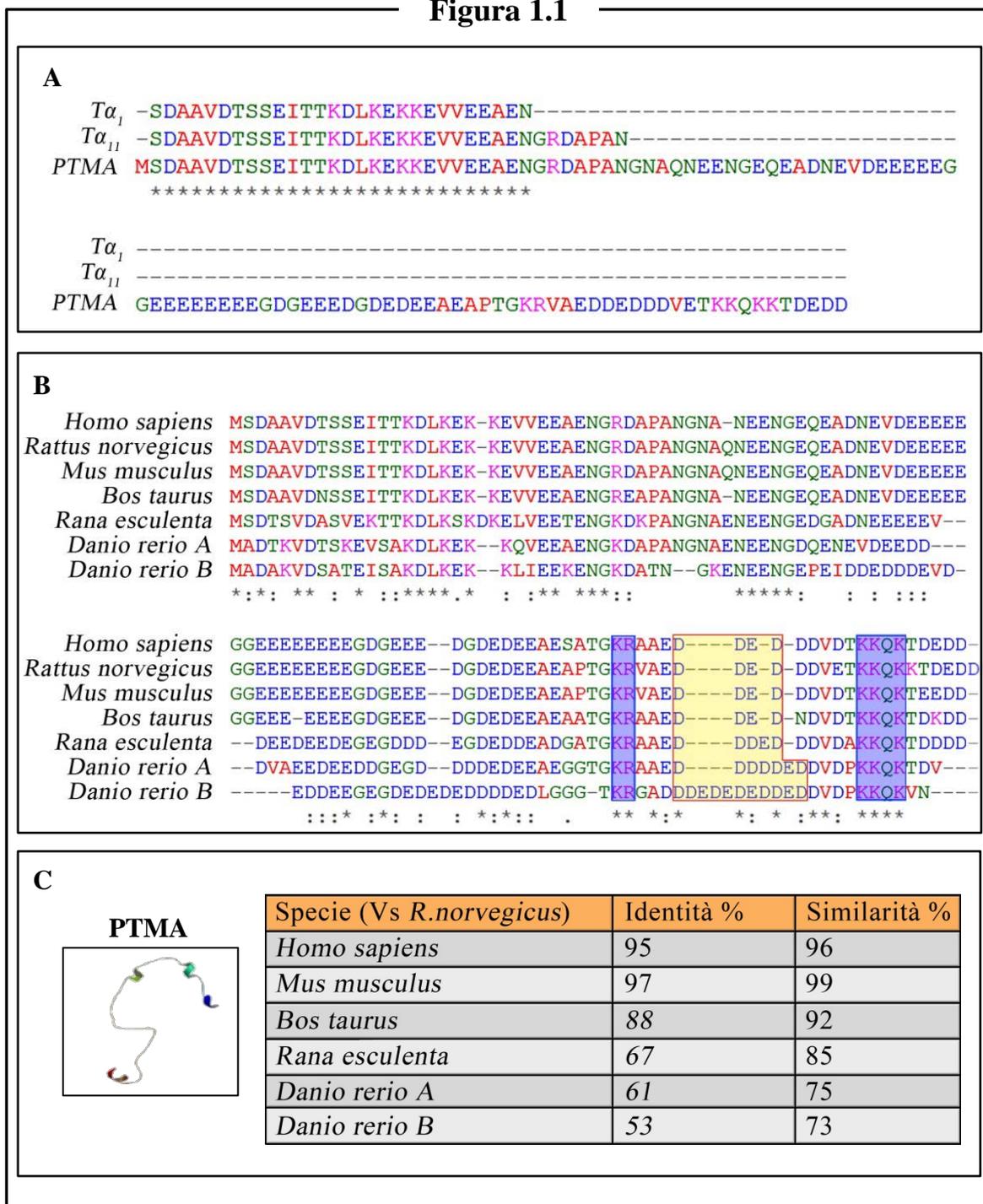


Fig. 1.1 – La protimosina- α : sequenza e conservazione .

1.1A – Allineamento delle sequenze di Ta_1 , Ta_{11} con PTMA di ratto. La struttura primaria della protimosina contiene l'intera sequenza delle altre due timosine, che *in vivo* sono prodotte in seguito alla sua degradazione da parte delle proteasi lisosomiali. L'allineamento è stato eseguito tramite ClusalOmega.

1.1B – Allineamento delle sequenze di PTMA di specie diverse. E' evidente l'elevato grado di conservazione della sequenza, soprattutto tra i Mammiferi (ClustalOmega). I rettangoli blu indicano il segnale di localizzazione bipartito, il rettangolo giallo il sito di taglio da parte della caspasi 3.

1.1C – Conservazione della sequenza di PTMA. La tabella indica le percentuali di identità e di similarità di PTMA di ratto, allineata con alcuni ortologi. Alla sinistra, una rappresentazione della conformazione *random coil* di PTMA. Dati ottenuti con blastp, confrontati con ClustalW2.

che il processamento sia privo di regolazione specifica: ciò significa che nelle cellule viene trascritta una quantità forse rilevante di una PTMA diversa da quella principale. Inoltre, questo tipo di splicing non è molto comune, e sarebbe sufficiente una singola sostituzione nel motivo intronico per invalidarlo. Invece, è stato osservato che la sequenza è conservata in diverse specie, ed è stato proposto che la produzione delle due isoforme di protimosina sia stata protetta evolutivamente (Manrow *et al.*, 1993). I trascritti per PTMA sono stati rilevati in tutti i tessuti analizzati, inclusi il timo, l'ovario, il rene, il cervello, il cuore, il fegato, la milza, il muscolo, l'intestino, il polmone, il cervelletto e il testicolo (Clinton *et al.*, 1989) e, complessivamente, il gene *ptma* è tra i *loci* più espressi insieme alla *heat shock protein 90*, alla catena leggera della miosina e alle proteine ribosomali (Adams *et al.*, 1995).

La peculiare struttura, l'estesa distribuzione, la mancanza di un segnale di secrezione e l'associazione con diversi partner molecolari hanno presto suggerito che PTMA possa svolgere ruoli che trascendono la sua natura immunogenica.

1.1.3 - Ruolo biologico di PTMA

La funzione principale di PTMA è tuttora oggetto di dibattito, ma è certo che la sua ubiquità e le notevoli capacità di interazione favoriscano il suo coinvolgimento in diversi processi biologici essenziali, come il rimodellamento della cromatina (**Fig. 1.2A**), la proliferazione cellulare, la tumorigenesi, la morte cellulare (**Fig. 1.2C**), l'attivazione trascrizionale (**Fig. 1.2B**), lo stress ossidativo, la gametogenesi.

1.1.3a - PTMA e la cromatina

Alcune funzioni nucleari di PTMA, come l'associazione agli eventi proliferativi, sono sicuramente dovute al suo coinvolgimento nel fenomeno di rimodellamento della cromatina: la struttura primaria inusuale, molto acida e caratterizzata da un *cluster* centrale di residui acidi, presenta analogie con noti organizzatori cromatinici come la nucleoplasmina e HMG1 (Earnshaw, 1987; Trumbore *et al.*, 1997), e le consente di interagire con le proteine istoniche. E' stato verificato il suo legame agli istoni core del nucleosoma, in particolare H3 e H4 (Diaz Jullien *et al.*, 1996), ma soprattutto con la proteina *linker* H1, per mezzo del dominio acido (Papamarcaki e Tsolas, 1994). Questo istone è deputato all'organizzazione e alla stabilizzazione dei nucleosomi in strutture di ordine superiore ed è provato che la modulazione del suo stato associativo incide sull'espressione genica (Zlatanova e Van Holde, 1996). PTMA è in grado di regolare finemente l'interazione di H1 con la cromatina (Gómez-Márquez e Rodríguez, 1998), e potrebbe fungere da *carrier* per H1: è stato suggerito che la protimosina salvaguardi il DNA dall'associazione incontrollata e potenzialmente dannosa con l'istone, poiché *in vitro* permette la loro interazione solo fino al raggiungimento della lunghezza fisiologica dello spazio tra i nucleosomi, impedendo l'aggiunta di eccessi di H1 (Karetsou *et al.*, 1998); inoltre, PTMA è in grado di distaccare l'istone dai siti di legame, decondensando la fibra di cromatina (Boàn *et al.*, 2001), mentre, durante la mitosi, resta esclusa dal volume occupato dal DNA, probabilmente per favorire la sua condensazione (Enkermann *et al.*, 2000b). Il meccanismo secondo cui la proteina interagisce con H1 potrebbe essere dovuto alla fosforilazione del glutammato a carico di PTMA (Trumbore *et al.*, 1997): l'idrolisi del glutammil fosfato fornirebbe *energia libera* sufficiente per liberare l'istone dagli acidi nucleici e per legarlo alla protimosina, generando il complesso transiente con H1 (**Fig. 1.2A**; Gómez-Márquez, 2007). E' stato evidenziato che l'impiego della proteina nella

decondensazione del DNA è il meccanismo alla base del suo ruolo nell'attivazione trascrizionale.

Grazie a studi molto recenti è stato indicato che PTMA, oltre a promuovere il distacco di H1, sia capace di favorire *in vivo* la deposizione dell'istone sul DNA e che, possibilmente incorporata in un complesso di maggiori dimensioni, agisca come chaperone per promuovere lo scambio fisiologico dell'istone *linker* durante la replicazione (George e Brown, 2010)

1.1.3b - PTMA e la proliferazione, i tumori, l'apoptosi

L'espressione della protimosina è elevata nei tessuti in proliferazione incontrollata come alcuni tipi di cancro (Mori *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1997; Tsitsiloni *et al.*, 1993; Dominguez *et al.*, 1993), mentre in cellule quiescenti o in tessuti non proliferativi può essere assente o molto ridotta (Barbini *et al.*, 2006). E' stato dimostrato che l'espressione eterologa di PTMA in fibroblasti di roditore *in vitro* è sufficiente a indurre un fenotipo neoplastico, con aumento della proliferazione, dedifferenziamento, perdita di inibizione da contatto, crescita indipendente dall'ancoraggio (Orre *et al.*, 2001). Inoltre, i suoi livelli aumentano con la progressione degli epitelii normali attraverso la stadiazione neoplastica fino al carcinoma, supportando la correlazione della protimosina con la trasformazione e la progressione del cancro alla prostata (Suzuki *et al.*, 2006) e alla vescica (Tsai *et al.*, 2009); ancora, l'utilizzo di RNA o DNA antisense contro il trascritto di *ptma* inibisce il fenomeno di iperproliferazione in cellule di mieloma (Sburlati *et al.*, 1991).

Durante il ciclo cellulare i livelli di espressione della protimosina sono massimi nella fase di transizione S/G2 e la sua trascrizione è legata all'azione del fattore E2F attivo durante tutta la fase di replicazione (Vareli *et al.*, 1996). La sovraespressione di *ptma* porta ad un accorciamento della fase G1, e ritarda il differenziamento cellulare (Rodríguez *et al.*,

1998). La trascrizione del gene è anche direttamente incrementata da c-myc, proto-oncogene implicato nella proliferazione cellulare e in numerosi processi di cancerogenesi (Kelly *et al.*, 1986); infatti, in alcuni tipi di tumore, come nel cancro al colon o nel carcinoma epatocellulare, vi sono elevati livelli sia dell'mRNA di c-myc sia della protimosina- α . La proteina c-myc stimola la trascrizione di *ptma*, interagendo con un elemento E-box (CACGTG) localizzato all'interno del primo introne del gene codificante (Gaubatz *et al.*, 1994).

Inoltre, è stato riportato che i livelli di espressione della protimosina- α variano in seguito a stimolazione da parte degli estrogeni. Tali ormoni, legati al recettore ER α , determinano un aumento della trascrizione di *ptma*, tramite il riconoscimento di ERE (estrogen response elements) semipalindromici a monte del gene. Invece, il “guardiano del genoma”, P53, regola negativamente la produzione della protimosina, e vi sono prove di un aumento diretto dei livelli trascrizionali dell'oncosoppressore in caso di sovraespressione di *ptma* (Zhao *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2006).

I dati riportati suggeriscono, quindi, che la protimosina abbia funzione oncogenica, e che sia un valido marker tumorale (Wu *et al.*, 1997; Magdalena *et al.*, 2000). Sebbene vi siano ancora dei punti da chiarire, è stato ipotizzato che PTMA agisca nelle cellule in maniera bivalente, sia come regolatore trascrizionale (Cotter e Robertson, 2000, Karetsou *et al.*, 2002), sia come fattore antiapoptotico, contribuendo complessivamente al mantenimento del tasso proliferativo delle linee neoplastiche e alla protezione dai sistemi di morte.

PTMA, infatti, è spesso localizzata in siti di sintesi dei messaggeri all'interno del nucleo (Vareli *et al.*, 2000). In più, non solo la produzione del trascritto viene stimolata dagli estrogeni, ma la proteina può a sua volta potenziare la funzione di attivazione

trascrizionale operata dal loro recettore: legando e sequestrando il suo co-repressore REA, PTMA impedisce l'inibizione di ER, favorendo il legame del coattivatore SRC-1 (**Fig. 1.2B**; Martini *et al.*, 2000; Martini *et al.*, 2003). Questo meccanismo di feedback positivo contribuisce all'iper-proliferazione alla base dell'insorgenza del cancro al seno (Bianco *et al.*, 2002). Ancora, è stato dimostrato che PTMA lega *in vivo* e *in vitro* il co-attivatore trascrizionale CBP (CREB-binding protein) colocalizzando con esso nei domini subnucleari. I due fattori svolgono un'azione sinergica nella stimolazione della trascrizione di promotori dipendenti da CBP, come AP1 e NF- κ B, stimolando allo stesso tempo la transattivazione del fattore: si pensa che il complesso giunga alle regioni promotrici grazie a CBP e che, sfruttando la capacità di PTMA di spiazzare l'istone H1, promuova lo svolgimento delle fibre a 30 nm e impedisca ulteriori interazioni H1-cromatina, preservando le condizioni necessarie al passaggio della RNA pol II (Karetsou *et al.*, 2002). Infine, poiché il recettore degli estrogeni dipende dalla presenza di CBP (Wang *et al.*, 2001), è possibile che PTMA gli fornisca di maggiori quantità di interattore e, conseguentemente, di SRC-1 (Karetsou *et al.*, 2002).

Il coinvolgimento della protimosina nell'apoptosi comprende sicuramente la sua interazione con le caspasi: le prime osservazioni hanno determinato, in cellule HeLa in apoptosi, che il taglio di PTMA nella regione C-terminale (D99) da parte della caspasi-3 (**Fig. 1.1B**) produce una proteina tronca (tPTMA, tProT α), che non possiede il segnale di indirizzamento al nucleo. Questo porta all'accumulo citoplasmatico del polipeptide (Enkermann *et al.*, 2000a), e alla notevole riduzione delle funzioni proliferative della protimosina. Questo fenomeno si verifica solo in cellule apoptotiche. Inoltre, è stato dimostrato che la produzione ectopica di PTMA con localizzazione nucleo-citoplasmatica protegge le linee HeLa dall'apoptosi indotta con TNF (*Tumoral necrosis factor*; Evstafieva *et al.*, 2003). Il principale meccanismo di azione di PTMA è probabilmente basato sulla

Figura 1.2

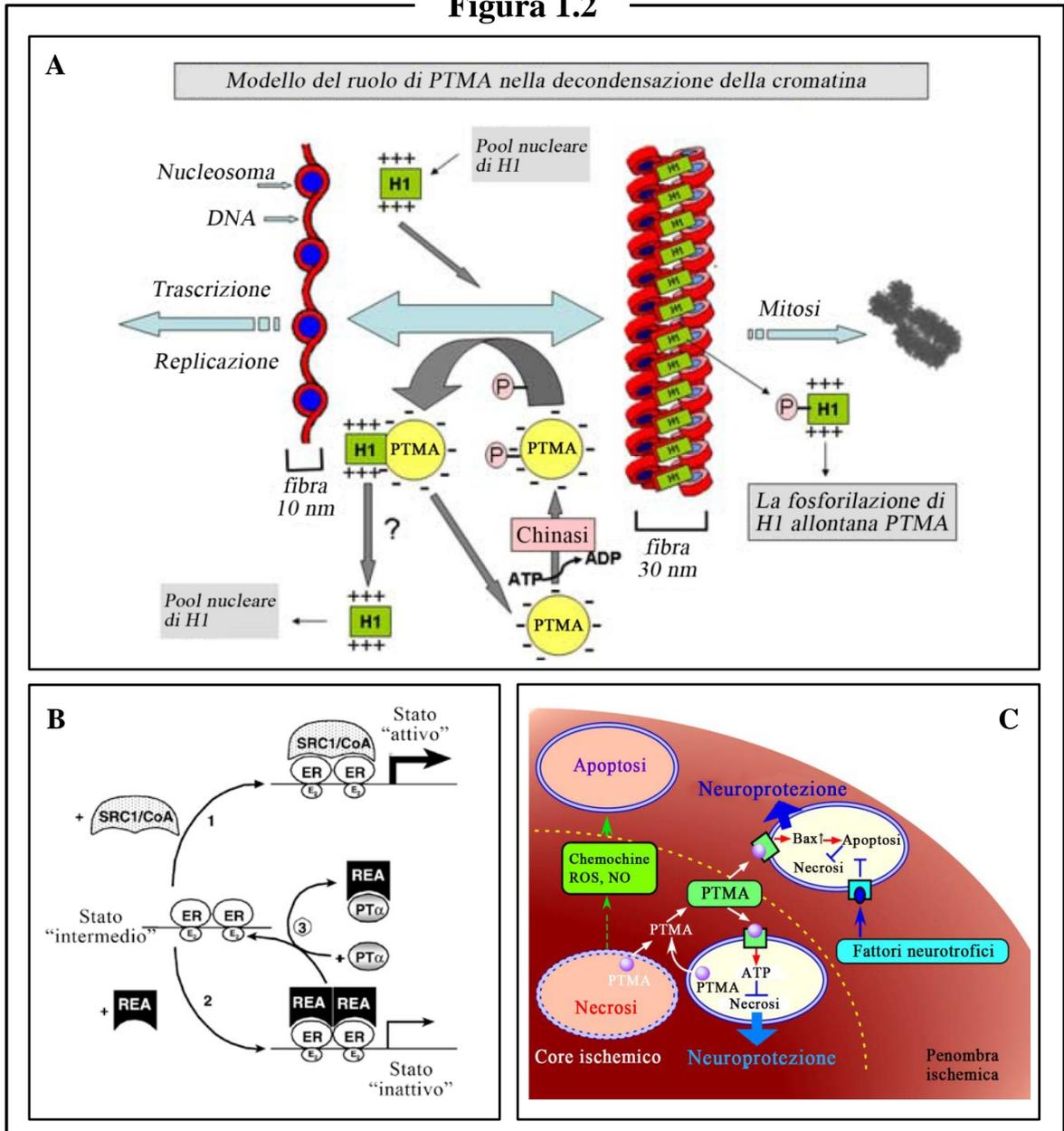


Fig. 1.2 – Alcune funzioni di PTMA.

1.2A – Modello del ruolo di PTMA nel rimodellamento della cromatina, secondo cui l'interazione PTMA-H1 durante l'interfase provoca la decondensazione della fibra di 30 nm, facilitando la replicazione. L'idrolisi del glutammilfosfato nella molecola potrebbe favorire la dissociazione di H1 dal DNA, legandolo temporaneamente a PTMA. Durante la mitosi, PTMA è allontanata dal DNA; il modello suggerisce che la fosforilazione di H1 favorisca questo processo. (modificato da Gómez-Márquez, 2007).

1.2B – Ruolo di PTMA nel potenziamento di ER. In presenza del ligando, il corepressore REA e il coattivatore SRC-1 competono per il legame a ER; REA impedisce il legame di SRC-1 al recettore. L'innalzamento dei livelli di PTMA in seguito alla stimolazione da parte degli estrogeni favorisce il legame della molecola con REA, il cui allontanamento rende possibile il legame SRC-1-ER, stimolando la trascrizione (modificato da Martini *et al.*, 2003).

1.2C – Funzione neuroprotettiva di PTMA in caso di ischemia. PTMA impedisce la necrosi secondaria dei neuroni nel core ischemico tramite la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT1/4, consentendo il rifornimento di ATP alle cellule. Inoltre, PTMA induce l'attivazione della caspasi 3, che inibisce o ritarda la necrosi. Ciò dà alle cellule un tempo maggiore per sintetizzare le neurotrofine, indotte dal danno ischemico, le quali inibiscono l'apoptosi (modificato da Ueda 2009).

regolazione negativa dell'attivazione della caspasi 9 (Jiang *et al.*, 2003), dovuta all'inibizione della formazione dell'apoptosoma, ed è collegata a quella di una *small-stress protein*, denominata p8, con la quale crea un complesso con funzioni anti-apoptotiche. Esperimenti di trasfezione condotti su cellule HeLa, indotte all'apoptosi da trattamenti con staurosporina, hanno, infatti, dimostrato una marcata riduzione dell'attività delle caspasi solo in caso di sovra-espressione di entrambe le proteine, mentre si è osservato un suo aumento in caso di iperproduzione di una sola delle due, a dimostrazione del fatto che l'attività protettiva è legata alla formazione del complesso p8/protimosina (Malicet *et al.*, 2006). Poichè la protimosina- α è substrato della caspasi-3, il taglio potrebbe portare all'abolizione dell'inibizione sull'apoptosoma, una volta attivato il *pathway* apoptotico tramite altre vie.

PTMA protegge le cellule dall'apoptosi anche regolando geni responsabili della difesa contro lo stress ossidativo (Estaf'eva *et al.*, 2005); non solo, sembra che la proteina promuova la sopravvivenza cellulare intervenendo nel *pathway* di Bcl-2 (Letsas *et al.*, 2005). E' stato ipotizzato che PTMA possa addirittura avere un ruolo nello "switch" apoptosi/autofagia (Wang e Pan, 2006) e nello "switch" apoptosi/necrosi (**Fig. 1.2C**; Ueda 2008; Ueda 2009), rivelando un suo possibile impiego terapeutico, ad esempio in caso di danno ischemico (**Fig. 1.2C**; Ueda *et al.*, 2010).

1.1.3c - PTMA, l'immunità e altre funzioni

Oltre alle sue numerose funzioni all'interno delle cellule, la protimosina svolge alcuni ruoli in distretti extracellulari, mostrando capacità immunostimolatorie, che hanno portato alla classificazione del polipeptide tra i modificatori della risposta biologica (Pan *et al.*, 1986): in esperimenti *in vitro* è stato confermato che PTMA potenzia la proliferazione dei linfociti T in risposta ad antigeni cellulari, incrementa l'espressione delle molecole

HLA-DR dei monociti (Baxevanis *et al.*, 1988; Baxevanis *et al.*, 1992) e amplifica la citotossicità delle cellule natural killer (Skopeliti *et al.*, 2006a; Voutsas *et al.*, 2000). Inoltre, la somministrazione di PTMA a splenociti in coltura incrementa la secrezione di interferone e di TNF (Qui *et al.*, 2002); tale attività immunogenica è più forte in pazienti affetti da neoplasie o malattie autoimmuni (Garbin *et al.*, 1997; Reclos *et al.*, 1987). La regione maggiormente attiva nella funzione immune è localizzata nel segmento C-terminale della molecola (Skopeliti *et al.*, 2006a,b); è stata, quindi, suggerita la separazione della struttura primaria di PTMA in due regioni funzionali: la prima, centrale, responsabile delle funzioni legate al rimodellamento della cromatina, alla proliferazione cellulare, all'apoptosi, la seconda, a valle, deputata alle capacità extracellulari, le quali si rivelano citochino-simili (*review*: Mosoian, 2011).

PTMA ha anche caratteristiche antifungine (Romani *et al.*, 2004), antitumorali (Moody *et al.*, 2000) e antivirali (Mosoian *et al.*, 2006); è in grado di sopprimere la replicazione di HIV nei macrofagi ed è stato dimostrato che la sua azione è dovuta all'induzione di geni antivirali generalmente potenziati dall'interferone (Mosoian *et al.*, 2007).

Tra la notevole varietà di processi in cui è stato suggerito un ruolo per la molecola è importante riportare la riproduzione: è stato suggerito che PTMA possa essere importante nella gametogenesi maschile, e i primi dati riportati (Dosil *et al.*, 1990; Rosón *et al.*, 1990) hanno proposto la sua associazione alle fasi proliferative della spermatogenesi dei Mammiferi; da allora vi sono state indagini che hanno dimostrato il suo coinvolgimento nelle fasi meiotiche e postmeiotiche della spermatogenesi in Vertebrati non mammiferi (Aniello *et al.*, 2002; De Rienzo *et al.*, 2002) che hanno indicato che la protimosina potrebbe contribuire all'efficienza della spermatogenesi in specie a riproduzione stagionale.

In ultima analisi, è stato proposto che la notevole mole di funzioni svolte da questo piccolo polipeptide acido possa essere dovuta a mimetismo molecolare (Pineiro *et al.*, 2000; Wang e Pan, 2007): la possibilità che PTMA assuma strutture di transizione prima, o durante il legame con molecole di natura diversa aiuta a spiegare alcune delle sue associazioni intracellulari, ma suggerisce anche che, grazie al cambiamento conformazionale, essa possa acquisire la capacità di essere secreta e di svolgere la sua attività al di fuori dell'ambiente cellulare. Questa teoria non va trascurata, essendo in grado di conciliare ipotesi e osservazioni sulla protimosina che risultano altrimenti contraddittorie.

La correlazione tra PTMA e il processo della riproduzione (in particolare la spermatogenesi), riveste grande importanza per la presente trattazione; per tale motivo, si è ritenuto opportuno fornire, nel paragrafo 1.2, approfondimenti sulla struttura delle gonadi maschili, sui processi di spermatogenesi e sugli eventi che portano alla maturazione degli spermatozoi.

1.2 - Le gonadi maschili e la spermatogenesi

1.2.1 - Struttura del testicolo nei Mammiferi

Le gonadi maschili, o testicoli, sono gli organi in cui risiedono e si sviluppano le cellule germinali (CG) destinate a formare i gameti maturi, gli spermatozoi (SPZ). Il processo di maturazione delle CG avviene nei *tubuli seminiferi*, caratterizzati da un epitelio pluristratificato (*epitelio seminifero, ES*) e da una formazione lumenale fluida in cui sono rilasciati gli spermatozoi (**Fig. 1.3**). L'ES consiste di due tipi cellulari, somatico e germinale. Le CG sono osservabili a diversi livelli dalla base laterale del tubulo fino al lume, e sono circondate dal citoplasma delle cellule somatiche, dette *cellule di Sertoli (SC; Fig. 1.3B,C)*. Esternamente, i tubuli sono circondati da una lamina basale, costituita da uno o più strati di cellule mioidi che si contraggono ritmicamente, e da un tessuto fibroso ricco di collagene che le separa dall'interstizio (Davidoff *et al.*, 1990; **Fig. 1.3B**). Il movimento della lamina genera contrazioni peristaltiche del tubulo seminifero, che sostengono il trasporto degli spermatozoi alla *rete testis*, dalla quale originano i condotti efferenti per l'epididimo (Holstein *et al.*, 1996; **Fig. 1.3A**). Le cellule di Sertoli presentano una forma colonnare, con la base rivolta verso la lamina. Durante il periodo embrionale e fino alla pubertà le SC si dividono per mitosi, che cessano nell'individuo adulto. Nella gonade matura esse presentano un citoplasma esteso per l'intera altezza dell'epitelio e sono caratterizzate da ramificazioni che circondano le cellule germinali (Russel and Griswold, 1993). Le loro funzioni principali sono di nutrimento e protezione delle GC che attraversano i cicli di sviluppo, e instaurano con esse contatti dovuti principalmente alla presenza di N-caderine. Inoltre, le cellule di Sertoli formano tra loro giunzioni serrate o occludenti: durante il processo di divisione e differenziamento, le cellule germinali si spostano progressivamente dalla regione della membrana basale per mezzo dei complessi

di giunzione alle SC, fino alla loro destinazione nel compartimento del lume. I contatti Sertoli-Sertoli portano, inoltre, alla formazione di una *barriera emato-testicolare*, che delimita le due regioni dell'epitelio seminifero: il compartimento basale contenente cellule diploidi (spermatogoni e spermatociti I fino allo stadio di preleptotene), e il compartimento lumenale che contiene spermatociti I successivi al preleptotene, spermatociti II, spermatidi e spermatozoi. Separando l'ambiente interno dell'organismo dalla regione del tubulo dove avviene la spermiogenesi, la barriera impedisce agli antigeni di membrana delle cellule germinali non diploidi di passare nel torrente circolatorio, evitando il rischio di una reazione autoimmune. Inoltre, essa protegge la regione intratubulare da sostanze potenzialmente dannose trasportate nel sangue. Le CG si sviluppano come un sincizio, o *unità clonale*, dato che dopo la divisione restano connesse le une alle altre per mezzo di ponti intercellulari (**Fig. 1.4A**). Tale processo di divisione incompleta assicura lo sviluppo sincrono e consente una comunicazione rapida tra le cellule. Vaste aree dei tubuli contengono, così, un elevato numero di CG allo stesso livello di maturazione, permettendo l'identificazione di diversi *stadi* in un ciclo di spermatogenesi (**Fig. 1.4C**).

Anatomicamente i tubuli seminiferi convergono verso l'*Ilo* del testicolo, dove assumono un andamento rettilineo, per cui sono detti *tubuli retti*; questi continuano poi con la *rete testis*. A essa seguono i *canali efferenti*, l'*epididimo* e il *vaso deferente* o *dotto di Wolf*, che prosegue con l'uretra (**Fig. 1.3A**). Tra i tubuli seminiferi è localizzato del connettivo molto vascolarizzato, il *tessuto interstiziale*, caratterizzato da gruppi di *cellule di Leydig* (LC; **Fig.1.3B**), di forma poligonale (Davidoff *et al.*, 1993), che producono e secernono androgeni. Un tessuto connettivo di tipo fibroso, la *tunica albuginea*, forma, inoltre, una guaina di protezione disposta intorno al testicolo (Middendorff *et al.*, 2002; **Fig.1.3A,B**). Infine, esternamente il testicolo è avvolto dalla *tunica vaginale*, membrana sierosa di origine peritoneale (**Fig. 13.A**).

1.2.2 - La spermatogenesi dei Mammiferi

La spermatogenesi è il processo di sviluppo e differenziamento delle cellule germinali in spermatozoi, realizzato all'interno dell'epitelio seminifero. Nei Mammiferi essa è di tipo continuo: nella parete dei tubuli dei testicoli maturi si osserva la presenza complessiva di cellule germinali a tutti gli stadi di differenziamento, quale sia il periodo scelto per l'osservazione. Esse sono distribuite secondo un gradiente, che procede dalla membrana basale verso il lume del tubulo in base alle divisioni mitotiche che avvengono a intervalli regolari a carico degli spermatogoni, e alle ondate meiotiche sincrone delle CG successive. Il processo è espletato nell'adulto in base alla seguente progressione di tipi germinali: spermatogoni (SPG), spermatociti I (SPCI), spermatociti II (SPCII), spermatidi (SPT), spermatozoi (SPZ; **Fig. 1.3 e 1.4**).

Nell'embrione, con la prima fase della gametogenesi maschile, si ha la formazione delle *cellule germinali primordiali* (PGC), diploidi, e il loro ingresso nella *cresta genitale* nel momento in cui vi è la costituzione della gonade, portando alla formazione dei *prospermatogoni* (PSPG) che cessano di dividersi per tutta la durata del ciclo fetale. Dopo la nascita, queste cellule riprendono l'attività mitotica per formare gli SPG che rivestono la superficie interna del tubulo, e non possono più essere sostituite. La spermatogenesi prosegue con le divisioni mitotiche degli SPG, che si verificano per tutto il periodo riproduttivo. Tra le cellule figlie, alcune, caratterizzate da una maggiore percentuale di eucromatina, contribuiscono a mantenere la riserva di cellule staminali, mentre altre, distinguibili per l'elevato contenuto eterocromatinico, continuano la linea del differenziamento (Clermont *et al.* 1966). Durante la maturazione gli SPG riducono le loro dimensioni; queste cellule iniziano nuovamente a trascrivere RNA e sono collegate tra loro mediante ponti intercellulari, determinando la costituzione del sincizio, i cui membri si

Figura 1.3

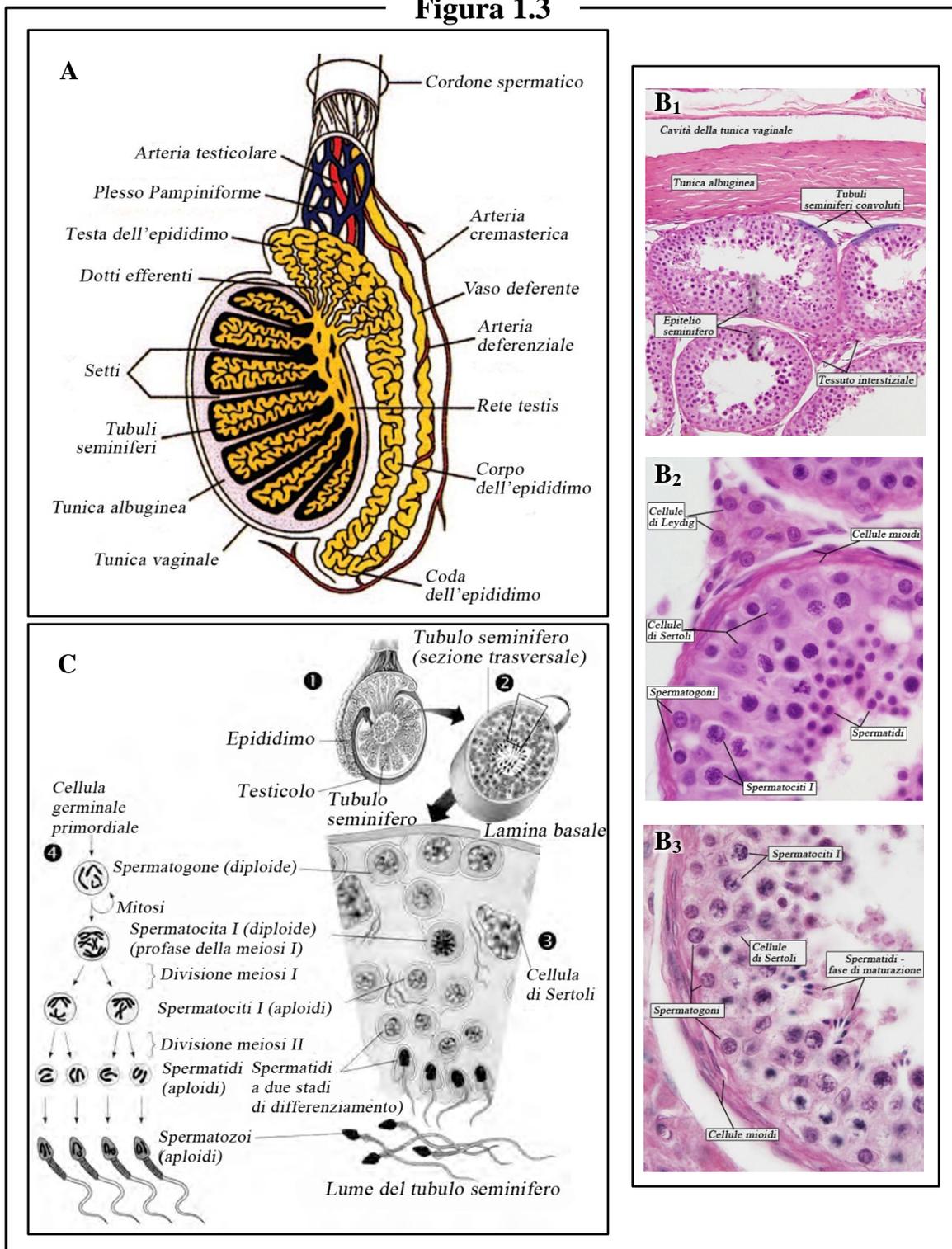


Fig. 1.3 – Struttura e organizzazione cellulare del testicolo dei Mammiferi:

1.3A – Illustrazione dell'anatomia dello scroto umano (modificato da Deurdulian et al., 2007).

1.3B – Sezioni di testicolo di uomo, colorate con ematossillina-eosina. Sono evidenziati i tipi cellulari presenti nei tubuli e nell'interstizio (immagini: UWA Blue Histology).

1.3C – Schema della progressione cellulare all'interno dei tubuli seminiferi. ① Testicolo; ② Sezione trasversale di un tubulo seminifero; ③ Rappresentazione ingrandita della regione del tubulo evidenziata in ②; ④ Esempificazione degli eventi di divisione e differenziamento in atto durante il ciclo della spermatogenesi (modificato da Jikui Guan, 2009).

dividono in maniera sincrona. Le cellule germinali cessano poi di dividersi per mitosi e iniziano le fasi meiotiche. Durante l'interfase precedente le meiosi, gli spermatogoni duplicano il proprio DNA e vanno incontro a un limitato accrescimento, mutando in *spermatociti I*, che entrano nella profase della meiosi I (**Fig. 1.3C**). A seguito della dissociazione transitoria delle giunzioni occludenti tra le cellule di Sertoli, gli SPCI migrano dal compartimento basale, più esterno, verso quello adluminale. Dopo la I divisione meiotica, gli SPCII, aploidi e di ridotte dimensioni, si dividono rapidamente (meiosi II), dando origine agli *spermatidi* rotondi. Questi affrontano le fasi del differenziamento terminale (*spermiogenesi*), che si realizzano in prossimità del lume dei tubuli seminiferi, dove avviene il rilascio degli *spermatozoi* maturi **Fig. 1.3C; Fig. 1.4A,C**)

Durante la spermiogenesi gli SPT vanno incontro ad alcuni notevoli cambiamenti (**Fig.1.5**): la cellula inizia ad allungarsi e ad acquisire una marcata polarità; dall'apparato del Golgi ha origine una formazione vescicolare di tipo lisosomiale, che gradualmente si dispone e si appiattisce sul nucleo, formando l'acrosoma (**Fig.1.5A,B,C**; Clermont e Tang, 1985; Thorne-Tjomslund *et al.*, 1988): la regione di adesione andrà a definire la superficie anteriore del nucleo. Durante l'allungamento degli SPT si nota la formazione di interazioni nucleo-acrosoma, mediate dallo strato citoscheletrico subacrosomale, che aiutano a definire apicalmente la forma della cellula, la quale è, invece, regolata caudalmente dalla disposizione di gruppi di microtubuli transienti (*manchette*, **Fig. 1.5A,B**). Il nucleo subisce una forte condensazione, mediata dalla sostituzione degli istoni legati alla cromatina con le protammine. La peculiare morfogenesi della testa dello SPZ risulta in una conformazione finale specie-specifica, allungata in senso antero-posteriore (**Fig. 1.4B; Fig 1.5C**; Hess RA, 1998; Fouquet e Kann, 1994).

Intanto, in direzione opposta rispetto alla vescicola acrosomale si dispone la coppia di centrioli; da quello più distale inizia la formazione del flagello (**Fig. 1.5C**). Infine, la

quasi totalità del citoplasma della cellula è eliminata sotto forma di corpo residuo, e gli spermatozoi così ottenuti si distaccano dalle cellule del Sertoli e sono rilasciati all'interno del lume dei tubuli seminiferi (**Fig.1.3C**); da qui sono, poi, indirizzati verso le vie efferenti grazie alla contrazione delle cellule peritubulari mioidi.

E' importante notare che in tutta l'area del tubulo seminifero una nuova generazione di spermatogoni inizia a moltiplicarsi prima che le cellule della generazione precedente siano diventate spermatozoi, dando inizio a una nuova *ondata spermatogenica*. Così, prima che termini il differenziamento degli SPZ, altri cicli sono in atto in una stessa zona dell'epitelio seminifero. Come si è già accennato ciò spiega la sovrapposizione, in una stessa area, delle cellule germinali a stadi diversi di differenziamento.

1.2.3 - Struttura subcellulare della testa dello SPZ maturo

Alla luce di quanto descritto è evidente che gli spermatozoi differenziati presentano una struttura specializzata, sebbene la ridotta ampiezza dello spazio occupato dal citoplasma renda la testa della cellula molto compatta: ad eccezione dei mitocondri, infatti, non vi è traccia di alcun organello citoplasmatico comune, quali il reticolo endoplasmatico, o l'apparato di Golgi. Nella testa dello SPZ è, però, possibile osservare formazioni da essi derivate, oltre a un elaborato citoscheletro, la cui strutturazione riflette i complessi mutamenti biochimici attuati durante la spermiogenesi. A prescindere dalle differenze presenti tra le specie, dall'esterno all'interno sono sempre riconoscibili: la membrana plasmatica (MP); l'acrosoma, la teca perinucleare (TP, o citoscheletro perinucleare), il nucleo (N). Data la peculiare morfologia dell'SPZ queste regioni si trovano parzialmente sovrapposte le une alle altre.

Figura 1.4

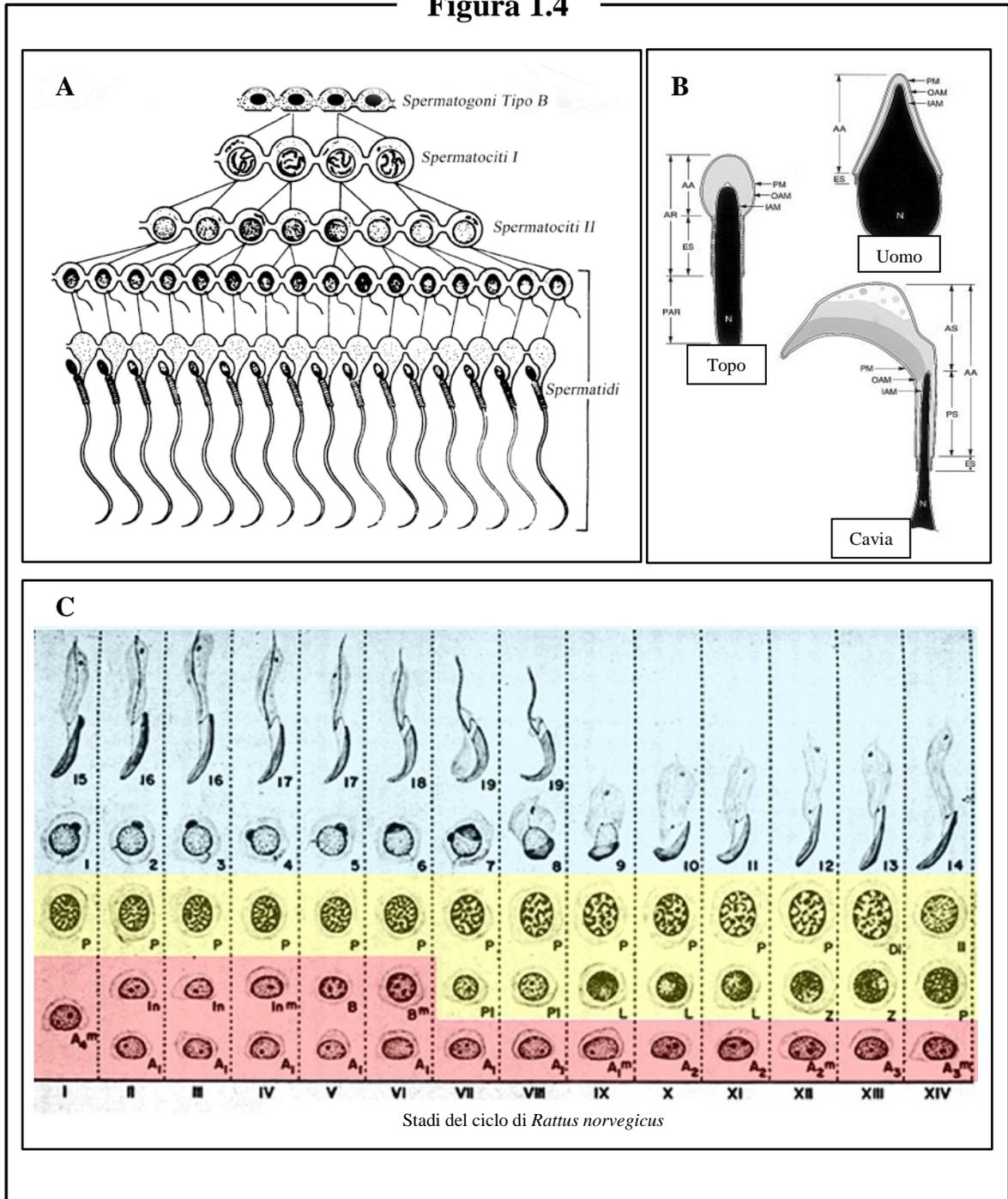


Fig. 1.4 – La spermatogenesi nei Mammiferi:

1.4A – Schema riassuntivo della spermatogenesi, con rappresentazione dei ponti intercellulari tra le CG; (modificato da Dym e Fawcett, 1971).

1.4B – Illustrazione della morfologia specie-specifica degli SPZ di alcuni Mammiferi. E' osservabile l'elevata variabilità nella forma della testa, assunta in seguito al processo morfogenetico (modificato da Yoshinaga e Toshimori, 2003).

1.4C – Stadi del ciclo della spermatogenesi di ratto. Le aree in rosso, giallo e azzurro evidenziano rispettivamente gli SPG, gli SPC e gli SPT; i numeri e i setti tratteggiati indicano le associazioni cellulari rappresentative di ogni stadio.

L'acrosoma, come già accennato, è un organello altamente specializzato, disposto apicalmente rispetto al nucleo dello spermatozoo, e contenente enzimi idrolitici importanti per la fecondazione. (Yanagimachi, 1994). Negli SPZ maturi è compartimentalizzato sia morfologicamente che a livello biochimico, e la regione acrosomale consiste di un dominio anteriore, il cap, e di uno posteriore, il segmento equatoriale (**Fig. 1.5**); è, inoltre, possibile distinguere una membrana acrosomale interna (MAI), posta sopra il nucleo, e una esterna (MAE), sottostante la membrana plasmatica (**Fig. 1.5C**). Recettori presenti sulla MP periacrosomale legano molecole della zona pellucida (ZP) dell'uovo e sono coinvolti nella reazione acrosomale (Yanagimachi, 1994; Wassarman, 1999): durante tale processo, essenziale per la singamia, avviene il rilascio del contenuto idrolitico dell'acrosoma e si verifica la dispersione delle componenti apicali come il dominio del cap, mentre la membrana acrosomale interna e il segmento equatoriale sono preservati fino alla fusione SPZ-uovo (Eddy and O'Brien, 1994). I compartimenti biochimici dell'acrosoma includono, infatti, due frazioni: la matrice acrosomale insolubile, contenente proteine come le acrine e l'acrosina, che restano associate allo spermatozoo durante l'esocitosi e sono coinvolte nell'interazione con la ZP, e il compartimento proteico solubile (Kim *et al.*; 2001a, b), il quale include molecole come ialuronidasi e dipeptidil peptidasi, che sono, invece, esocitate.

Il sistema acrosomale ha origine dall'apparato del Golgi quale omologo lisosomiale e inizia a costituirsi durante le fasi iniziali della spermiogenesi (Thorne-Tjomsland *et al.*, 1988), definendo la sua organizzazione mentre lo SPT termina il differenziamento (**Fig. 1.5A,B**). La formazione della struttura consta di due fasi (Tang *et al.*, 1982; Oko e Clermont, 1998): nella prima, l'apparato di Golgi secerne piccoli granuli ricchi enzimi idrolitici, tra cui la proacrosina; i granuli si riuniscono e si fondono in una singola vescicola sferica e densa, che si associa al nucleo. Durante la seconda fase, la struttura incrementa le sue dimensioni grazie all'apporto di nuove vescicole *carrier* derivate dalla

faccia trans del Golgi. Ciò consente alla regione corticale dell'acrosoma di espandersi e di assumere la forma del “*cap*”(Fig. 1.5); è importante notare che durante la formazione della vescicola lo strato proteico sottostante, la teca, è essenziale per l'interazione acrosoma-nucleo e per l'acquisizione della morfologia definitiva da parte dell'organello.

La Teca perinucleare rappresenta, infatti, il principale complesso citoscheletrico della testa degli SPZ; essa non è composta di proteine del citoscheletro, ma di polipeptidi a localizzazione citosolica e nucleare. L'addensato della TP è una capsula che circonda il nucleo dello SPZ maturo, ad eccezione della regione di innesto della coda (Fig. 1.5C). In posizione apicale risiede tra la membrana acrosomale interna e la membrana nucleare, formando lo strato subacrosomale (SAL), mentre caudalmente si trova tra la membrana plasmatica e quella nucleare, dando origine alla guaina postacrosomale (PAS; Oko, 1995; La regione del SAL, inoltre, presenta continuità di struttura e composizione con lo strato periacrosomale esterno, situato tra la MAE e il plasmalemma nella regione equatoriale (Oko e Maravei, 1994; Fig. 1.5C).

A livello ultrastrutturale, l'espansione della TP nello spermatide in differenziamento è sincrona con quella del sistema acrosomale in formazione. E' stato dimostrato che le proteine del SAL aderiscono alle vescicole proacrosomiche nelle fasi Golgi e Cap della spermiogenesi, conducendole verso la loro destinazione perinucleare, ed è stata confermata l'importanza della teca non solo nel “*docking*” dell'acrosoma al nucleo, ma nella formazione della vescicola stessa (Fig. 1.5).

Nella regione subacrosomale della teca sono contenute proteine non correlate tra loro, accomunate dal processo biogenetico, come RAB2A e SubH2Bv. La prima appartiene alla superfamiglia di Ras, è un regolatore del trasporto vescicolare e del movimento actina- e tubulina-dipendente (Pereira-Leal e Seabra, 2001); la sua presenza a

livello della membrana dell'acrosoma durante la sua formazione fa supporre che essa sia importante nella regolazione del trasporto e nella fusione delle vescicole di secrezione con quelle preacrosomiche (Oko e Sutovsky, 2009). SubH2Bv, invece, è una variante dell'istone H2B, e presenta un segnale di localizzazione nucleare bipartito (NLS), che farebbe supporre la sua presenza nel nucleo; in realtà, essa non è mai rilevabile all'interno della regione nucleare degli spermatidi, ed è stato ipotizzato che il suo NLS indirizzi la vescicola acrosomale cui SubH2Bv è associato verso la membrana nucleare, priva di pori nelle fasi di “*docking*”.

E' stato suggerito che la maggior parte delle molecole presenti nella teca dello spermatozoo siano parzialmente vestigiali, giacché hanno già svolto il loro ruolo durante la secrezione, il trasporto, la fusione dei granuli, e nel “capping” acrosomale; una volta terminata la loro funzione, esse restano intrappolate tra la MAI e il nucleo. E' altresì probabile che nella loro regione di destinazione esse diventino parte di un complesso multiproteico, che lega fermamente l'acrosoma al nucleo (Oko e Sutovsky, 2009).

Il nucleo dello SPZ maturo, come già evidenziato, è molto condensato e presenta morfologia e contenuto caratteristici, frutto degli eventi del differenziamento (**Fig. 1.4B, 1.5**). Già nelle prime fasi meiotiche le CG iniziano, infatti, a incorporare varianti istoniche testicolo-specifiche nella loro cromatina (Kimmins e Sassone-Corsi, 2005); in seguito all'azione di queste molecole, la maggioranza degli istoni canonici viene sostituita da alcune proteine di transizione (TNP), le cui forme principali sono TNP1 e 2, presenti negli spermatidi dei Mammiferi. Queste sono proteine basiche ricche di arginina e lisina che si legano fortemente al DNA (Brewer *et al.*, 2002), e sono espresse solo nelle fasi post-meiotiche del ciclo. Nei momenti finali della spermiogenesi tali proteine sono sostituite da due protammine, PRM1 e PRM2, che rappresentano le principali molecole proteiche presenti nel nucleo degli SPT e degli SPZ (Bellvé, 1988). Alcuni istoni canonici e loro

Figura 1.5

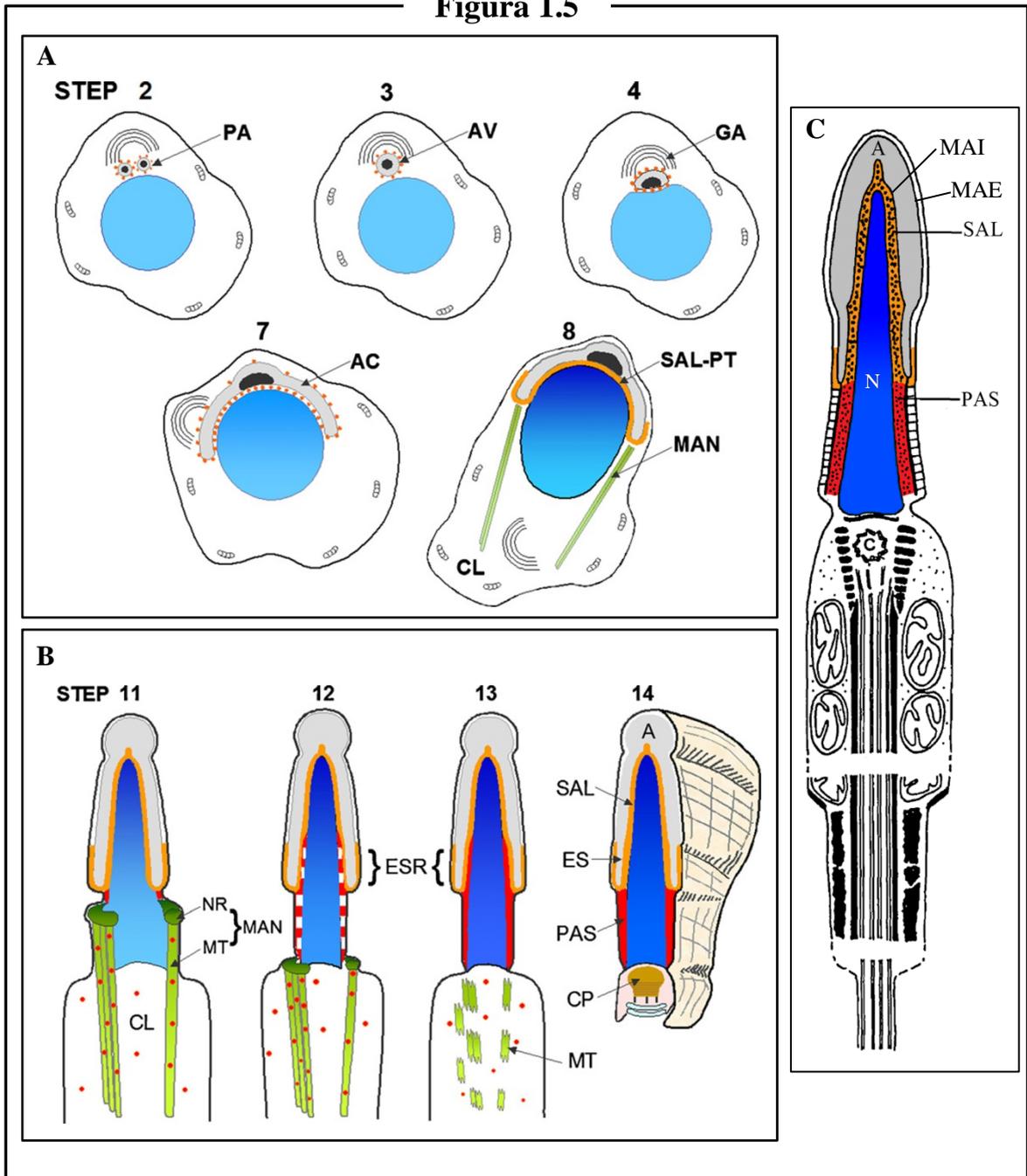


Fig. 1.5 – Eventi morfogenetici in atto durante la spermiogenesi.

1.5A,B – Illustrazione della formazione dell'acrosoma e della teca perinucleare durante le fasi iniziali (A) e conclusive (B) della spermiogenesi. L'acrosoma è indicato in grigio, la regione subacrosomale della teca in arancio, la regione postacrosomale in rosso, il nucleo in blu. Le proteine della teca indirizzano i granuli di origine golgiana verso la superficie del nucleo e, nello SPZ maturo (step 14, in B) si dispongono in parte tra il nucleo e il sistema acrosomale. PA, granuli proacrosomici; AV, vescicola acrosomica; GA, pparato di Golgi; AC, cap acrosomale; SAL teca subacrosomale; PAS, teca postacrosomale; ES, segmento equatoriale; MAN, manchette, CP, punto di connessione testa-coda (Oko e Sutowsky 2009).

1.5C – Schema di una sezione di uno SPZ maturo. A livello della testa si distinguono: l'acrosoma (A, in grigio); la teca perinucleare, in parte sottostante l'acrosoma (SAL, teca subacrosomale, in arancione), in parte estesa oltre il suo confine (PAS, guaina postacrosomale, in rosso); il nucleo (N, in blu), allungato in senso antero-posteriore. MAE, membrana acrosomale esterna; MAI, membrana acrosomale interna; C, centriolo (immagine modificata dall'originale, Fouquet e Kann, 1994).

varianti sono, comunque, mantenuti durante tutta la spermiogenesi. E' noto che il meccanismo di rimodellamento della cromatina si avvale di modificazioni post-traduzionali a carico degli istoni, tra cui acetilazione, ubiquitinazione, fosforilazione e metilazione. Tali sistemi sono stati studiati anche nella spermatogenesi (Rousseaux e Ferro, 2009); in particolare, è stato determinato che, nelle fasi post-meiotiche, gli istoni sono globalmente iperacetilati, rendendo, così, instabili i nucleosomi: ciò crea condizioni favorevoli per la sostituzione da parte delle TNP e delle PRM (Pivot-Pajot *et al.*, 2003; Kurtz *et al.*, 2007).

Il legame delle proteine di transizione prima e delle protammine poi alla doppia elica del DNA porta all'abolizione delle repulsioni elettrostatiche tra filamenti di cromatina vicini, generando toroidi di 50 nm di diametro, con al centro un *core* di PRM (Hud *et al.*, 1993). Un ulteriore elemento stabilizzante è la presenza di ponti disolfuro intra e intermolecolari, che compattano il genoma in uno stato semicristallino, mentre lo SPZ maturo procede attraverso l'epididimo (Golan *et al.*, 1996).

E' stato ipotizzato che il rimodellamento nucleare sia molto importante per alcune funzioni svolte dagli SPZ durante la maturazione e la fecondazione: innanzitutto, la marcata riduzione delle dimensioni cellulari determina una struttura idrodinamica correlabile con il potenziale di fertilità degli SPZ (Malo *et al.*, 2006); inoltre, la struttura della cromatina diventa molto resistente all'azione delle nucleasi, all'irradiazione e all'applicazione di forze esterne (Kuretake *et al.*, 1996; Wykes e Krawetz, 2003; Rathke *et al.*, 2010).

Nel nucleo degli SPZ sono anche presenti RNA, il cui ruolo è ancora in fase di studio. Tra questi, i trascritti codificanti per le PRM sono i più abbondanti e la loro traduzione è inibita subito dopo la produzione negli spermatidi, fino alla fase di

rimodellamento cromatinico. Alcuni mRNA rilevabili nello SPZ sono, inoltre, trasmessi all'ocita. Oltre ai messaggeri, vi sono degli RNA non codificanti che sono espressi nelle fasi intermedie della spermatogenesi, tra cui miRNA e siRNA, la cui permanenza nello SPZ è incerta.

Da quanto esposto è evidente che l'avanzamento degli studi sulla composizione e sulla funzione nucleare dello SPZ è orientato verso l'ipotesi che il nucleo non sia soltanto vettore dell'informazione del DNA paterno (Johnson *et al.*, 2011).

2. Scopo della ricerca

L'interesse suscitato dalla protimosina- α (PTMA) e dalle sue peculiarità strutturali, sin dall'isolamento del polipeptide nel 1984 (Haritos *et al.*, 1984a, b), ha favorito la produzione di numerosi studi che hanno confermato la sua partecipazione in un elevato numero di processi biologici, tra cui i meccanismi molecolari di rimodellamento della cromatina, l'apoptosi, l'immunità e la proliferazione cellulare. Tuttavia, tale promiscuità funzionale, e il tropismo ubiquitario, rendono complessa la definizione univoca del suo ruolo fisiologico principale. Di sicuro interesse risultano le indagini sulla possibile funzione di PTMA nell'ambito della riproduzione, le quali, a partire dagli anni '90, hanno prodotto sporadici ed eterogenei riscontri sulla sua presenza durante la fase proliferativa della gametogenesi maschile in *Rattus norvegicus* (Dasil *et al.*, 1990; Rosón *et al.*, 1990). Nel 2002 il gruppo per cui ho svolto l'attività di dottorato ha isolato un cDNA codificante per PTMA dal testicolo di *Rana esculenta*: il trascritto è espresso durante tutto il ciclo riproduttivo annuale, con un picco a Settembre/Ottobre, in coincidenza con la massima attività meiotica e con l'inizio della spermiogenesi, ed è localizzato nel citoplasma degli Spermatoцитi I e II (SPC) e nelle cellule interstiziali di Leydig (LC; Aniello *et al.*, 2002). Anche la proteina è stata rilevata nelle LC e, nel compartimento germinale, dagli SPC agli spermatozoi (SPZ; Ferrara *et al.*, 2009). Alcuni studi recenti hanno evidenziato una situazione analoga nel testicolo di *Torpedo marmorata* (Prisco *et al.*, 2009) e di *Danio rerio* (dato non pubblicato). Pertanto, i dati ricavati sui Vertebrati non mammiferi, al contrario di quanto indicato dagli studi precedenti su ratto, suggeriscono che PTMA abbia un ruolo nella meiosi e nel differenziamento delle cellule germinali (CG), e non durante le loro fasi proliferative.

Allo scopo di chiarire e ampliare tali studi a livello comparato, affiancando al modello anfibio quello mammifero, il progetto cui ho lavorato si è rivolto allo studio della possibile conservazione del “*pattern*” di PTMA durante la spermatogenesi di *Rattus norvegicus*, nelle fasi meiotiche e post-meiotiche. I punti iniziali dello studio si sono concentrati su giovani ratti in cui era in corso la prima ondata della spermatogenesi. Nello specifico, sono stati analizzati tre diversi momenti dello sviluppo post-natale della gonade, in cui l’arricchimento progressivo dei tubuli agevola l’analisi delle CG di interesse, precisamente:

- 27 giorni dopo la nascita (dpp), momento in cui nelle gonadi è stata completata la meiosi per la prima volta, ed è possibile osservare le CG fino agli spermatidi (SPT) di nuova formazione;
- 35 dpp, mentre sono in corso le fasi della spermioistogenesi, che permettono di estendere l’osservazione ad alcuni degli eventi di maturazione degli SPT;
- 60 dpp, al termine della prima ondata spermatogenetica, quando nei tubuli, ormai in attiva produzione di spermatozoi, sono presenti tutti i tipi di CG e la gonade può definirsi matura.

In seguito ai risultati ottenuti, i nostri studi sono stati indirizzati verso la valutazione del possibile ruolo di PTMA nella strutturazione e nella funzionalità degli spermatozoi maturi, proseguendo l’indagine sul ratto adulto ed estendendola agli SPZ di uomo.

3. Materiali e Metodi

3.1 - Prelievo di tessuti dal modello sperimentale *Rattus norvegicus*

Ratti maschi *Sprague-Dawley* (*Rattus norvegicus*) sono stati tenuti in stabulario in condizioni di temperatura controllata, con un regime di luce-buio di 12 ore e nutriti con acqua e cibo *ad libitum*. Gli animali a 27, 35 e 60 giorni dopo la nascita (dpp, *days post partum*) sono stati sacrificati mediante decapitazione, in seguito ad anestesia con Ketamina (100mg/kg i.p.), in accordo con le direttive nazionali e locali riguardanti gli esperimenti sugli animali. Da ogni esemplare sono stati prelevati i testicoli, di cui uno è stato immerso nel fissativo di Bouin (**Tab. 5**) per eseguire l'inclusione in paraffina e la successiva analisi di microscopia ottica, l'altro, invece, in azoto liquido e conservato a -80°C per l'impiego nell'estrazione di RNA e proteine. Dai ratti adulti è stato prelevato anche il timo, poi congelato e conservato a -80°C, per produrre il controllo positivo negli studi sulle proteine.

3.2 - Prelievo degli spermatozoi epididimali

Per ottenere gli spermatozoi epididimali di ratto adulto l'epididimo è stato rimosso dal testicolo e in seguito sminuzzato in tampone salino PBS (**Tab. 4**). Ai frammenti di tessuto è stata applicata una lieve pressione per agevolare la fuoriuscita degli spermatozoi. Il campione liquido è stato prelevato e sottoposto a filtrazione ed esaminato al microscopio

ottico per escludere la contaminazione da parte di altri tipi cellulari. Parte dei campioni è stata diluita in PBS e aliquotata su vetrini lasciati asciugare a 37°C e conservati a -20°C fino alle successive analisi istologiche. Le restanti aliquote sono state centrifugate a 1000 x g per 15' a 4°C; il *pellet* ottenuto è stato conservato a -80°C fino all'estrazione proteica.

3.3 - Preparazioni istologiche

I testicoli fissati per immersione nel liquido di Bouin (**Tab. 5**) sono stati successivamente disidratati, con passaggi di 60' ciascuno, in una serie ascendente di alcool etilico in H₂O (75°-85°-95°-100°-100°) seguita da due passaggi in xilene (10') e, infine, inclusi in paraffina (Paraplast).

I blocchi così ottenuti sono stati tagliati con un microtomo Reichert-Jung Supercut 2050, utilizzando lame monouso (Feather, S35), per ottenere delle sezioni dello spessore di 5-7 µm, con le quali sono stati allestiti i preparati.

3.4 - Estrazione di RNA totali da tessuti di Rattus norvegicus

I tessuti congelati sono stati omogenizzati rapidamente con un Ultra-Turrax usando 1 mL di Trizol® Invitrogen per ogni 50-100 mg di tessuto; gli RNA totali sono stati estratti in base alle istruzioni fornite dal produttore.

I campioni ottenuti sono stati trattati con DNasi (DNase I recombinant, RNase free, Roche Diagnostics, Monza, Italia), e i valori di concentrazione sono stati rilevati tramite NanoDrop ND-1000. Aliquote di 1 µL delle preparazioni di RNA totali sono state separate

elettroforeticamente su gel di agarosio sterile 1% per controllare l'integrità degli RNA ribosomiali 18 S e 28 S. I campioni sono stati conservati a -80°C.

3.5 - RT-PCR su testicolo di *Rattus norvegicus*

Per la sintesi del primo filamento di cDNA è stato impiegato il kit SuperScript III (Invitrogen, Paisley, UK), seguendo il protocollo fornito dal produttore, impiegando come stampo 3 µg di RNA totali. La reazione di sintesi è stata condotta alla temperatura di 50°C per 1 h, al termine della quale l'enzima è stato inattivato a 75°C per 15'. Come controllo negativo la reazione è stata effettuata in parallelo sugli stessi RNA, senza impiegare l'enzima (RT⁻).

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato utilizzato per la successiva reazione di amplificazione per PCR, condotta in un volume totale di 25 µL con il kit Taq Polymerase Recombinant (Invitrogen). La reazione è stata così allestita:

Componente	Volume/Concentrazione finale
• cDNA stampo	2 µL
• Tampone di sintesi 10X	2,5 µL
• MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM
• dNTP 2,5mM	0,2 mM
• oligonucleotidi “ <i>forward</i> ”	5 pmol
• oligonucleotidi “ <i>reverse</i> ”	5 pmol

- Taq DNA polimerasi 1,5 U
- DMSO 1,7 μ l
- H₂O a volume

Per studiare il profilo di espressione della protimosina- α sono stati progettati oligonucleotidi basati sulla sequenza di *Ptma* di *Rattus norvegicus* (NCBI Accession Number NM_021740) e della *beta actina* (*rAct*) (A.N. NM_031144), analizzata come controllo positivo, in quanto trascritta costitutivamente. Gli inneschi selezionati sono i seguenti:

rProt- α Oligo for 5'-GAGATCACCACCAAGGACTTG-3'

Oligo rev 5'-GTCATCCTCATCAGTCTTC-3'

Amplificato atteso 307 cb

rAct Oligo for 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'

Oligo rev 5'-CTGCTTGCTGATCCACATC-3'

Amplificato atteso 298 cb

Le condizioni impiegate per l'amplificazione dei cDNA di interesse sono state:

- Denaturazione Iniziale 94°C 4'
- Fase ciclica (30 cicli):
 - denaturazione 94°C 30''
 - appaiamento ***Ptma***: 54°C. ***Act***: 60°C 45''
 - allungamento 72°C 45''
- Allungamento Finale 72°C: 5'

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante gel elettroforesi con agarosio 1,5% in TAE 1x (**Tab. 1**) con bromuro di etidio a una concentrazione finale di 0,5 µg/mL. I risultati della separazione elettroforetica sono stati visualizzati per esposizione del gel su un transilluminatore a lampada UV GELDOC XR+ System (Biorad®, Hercules, CA) e le quantità relative dei prodotti di amplificazione di *Ptma* sono state calcolate mediante la funzione “*Volume Analysis Report*” del programma Quantity One 4.6.3, secondo i valori del rapporto *Ptma/Act*, e inserite nei grafici come unità di densità ottica (OD).

Per valutare la significatività statistica dell’analisi è stata eseguita un’analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Duncan per la comparazione di gruppi multipli. I dati sono stati espressi come media ± SEM di almeno tre saggi indipendenti.

3.6 - Clonaggio in pCR® II –Topo® VECTOR

I frammenti di DNA ottenuti dall’amplificazione mediante PCR sono stati purificati dal gel tramite “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo le istruzioni del produttore.

Il clonaggio è stato poi effettuato utilizzando il vettore pCR® II-Topo® (Invitrogen; **Fig. 3.1**), contenente sequenze per enzimi di restrizione adiacenti al sito multiplo di clonaggio, i geni per la resistenza all’ampicillina e alla Kanamicina, e la sequenza di selezione *LacZ*.

Per inserire l'amplificato è stata eseguita una reazione di ligasi, per mezzo del kit "T4

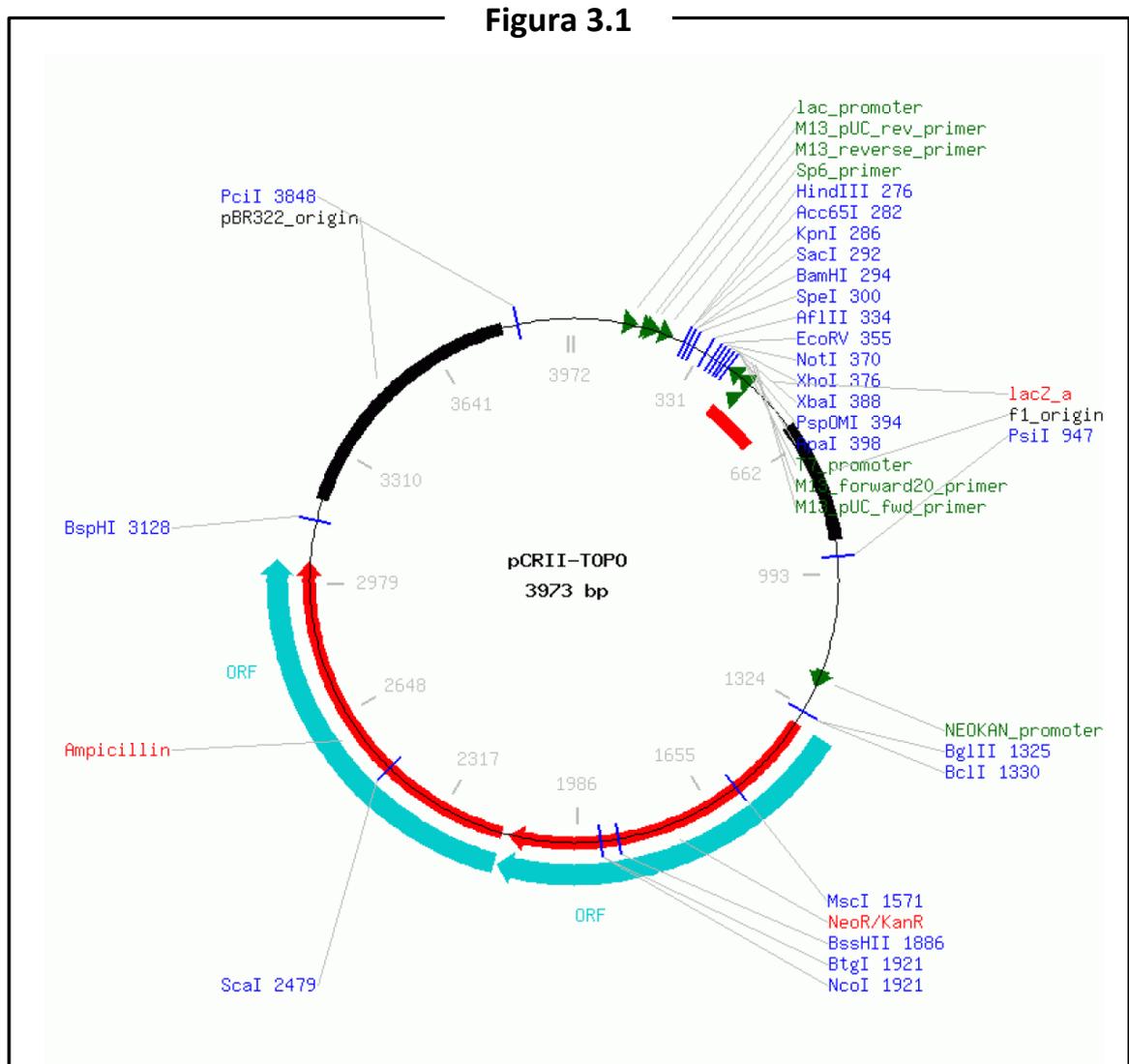


Fig. 3.1 – Mappa del vettore di clonaggio pCRII-TOPO.

DNA Ligase” (Promega), utilizzando un rapporto molare vettore/inserto basato sulle istruzioni della casa produttrice:

Le reazioni sono state incubate 3 h a temperatura ambiente, oppure per la notte (O/N) a 4°C.

3.7 - Trasformazione chimica dei batteri

Per la trasformazione è stato impiegato un ceppo di *E.coli* reso competente per mezzo di un trattamento chimico a base di fosfato di calcio.

Un'aliquota di cellule (50 μ L) è stata scongelata lentamente in ghiaccio, e a essa sono stati aggiunti 5-7 μ L del prodotto di ligasi;

Il campione è stato sottoposto al seguente trattamento: 30' in ghiaccio, 1,5' a 42°C, 1,5' nuovamente in ghiaccio;

Dopo lo shock termico sono stati aggiunti 950 μ L di terreno liquido LB (**Tab. 5**) senza ampicillina e la soluzione è stata incubata a 37°C per 1 ora e 30', in agitazione (150 rpm in vasca riscaldante);

Infine, diversi volumi di cellule batteriche sono stati piastrati in parallelo su capsule Petri contenenti LB + Agar (**Tab. 5**), con 50 μ g/mL ampicillina, precedentemente trattate con 40 μ L di Xgal 20 mg/mL e 20 μ L di IPTG 1 M, per l'induzione del promotore del gene lacZ.

Le piastre sono state, quindi, incubate a 37°C per la notte (circa 14-16 h).

3.8 - Minipreparazione di DNA plasmidico

Il protocollo utilizzato per isolare il DNA plasmidico dalle cellule batteriche è basato sul kit "FastPlasmid Mini" della Eppendorf. Da ogni piastra di trasformazione, sono state selezionate singole colonie bianche, messe a crescere per la notte in 3,5 mL di LB

(**Tab. 5**) con 50µg/mL di ampicillina, sotto agitazione costante a 150 rpm in vasca riscaldante.

Il giorno seguente, da ciascuna coltura batterica sono state prelevate aliquote di 500 µL, cui è stato aggiunto un uguale volume di glicerolo sterile;

In seguito ad accurata agitazione le aliquote sono state conservate a -20°C, al fine di ottenere una riserva di batteri trasformati.

Il restante volume è stato processato secondo le direttive del produttore, per mezzo delle colonne fornite dal kit, e il DNA plasmidico è stato eluito in H₂O. L'eluato è stato conservato a -20°C, dopo averne determinato il valore di concentrazione tramite nanodrop.

3.9 - Digestione analitica con l'enzima di restrizione EcoRI

1µg di DNA plasmidico è stato digerito con 4U di enzima (*EcoRI*, Fermentas). Alla reazione sono stati aggiunti 2µL di tampone H 10x ed H₂O per un volume finale di 20µL. Per valutare la presenza dell'inserto e la sua grandezza, i prodotti di digestione sono stati analizzati su gel di agarosio 1% in TAE 1x (**Tab. 1**) contenente 0,5µg /mL di bromuro di etidio.

3.10 - Sequenziamento del DNA plasmidico

Le sequenze dei plasmidi sono state determinate utilizzando il metodo di marcatura Dye terminator della Beckman mediante sequenziamento ciclico. La procedura,

completamente automatizzata, è stata eseguita dal servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica “Anton Dohrn” di Napoli.

L'analisi dell'elettroferogramma è stata eseguita per mezzo del software FinchTV 1.4. La sequenza è stata poi confrontata con quella presente nella banca dati di NCBI (A.N. NM_021740) per verificarne l'identità.

3.11 - Maxipreparazione di DNA plasmidico

Per ottenere preparazioni di maggiori quantitativi di DNA plasmidico sufficientemente purificato, necessario per le successive fasi sperimentali, è stato effettuato un inoculo di 100mL in LB (**Tab. 2**) a partire da pochi μ L di *stock* batterico in glicerolo; la coltura è stata messa a 37°C con agitazione costante (170 rpm) per tutta la notte. Il giorno successivo, i batteri sono stati raccolti centrifugando a 3000 rpm per 10 minuti in centrifuga Beckman con rotore GH 3.7. Il precipitato è stato processato impiegando il kit Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen), secondo le istruzioni della casa produttrice.

Il DNA è stato risospeso in H₂O, ed è stata effettuata una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando uno spettrofotometro VARIAN DMS 90. Per valutare il grado di purezza del DNA plasmidico estratto, aliquote di 1 μ g sono state analizzate su gel di agarosio 1% in TAE 1x (**Tab. 2**) contenente 0,5 μ g/ μ L di bromuro di etidio. Da questo protocollo sono stati ottenuti generalmente 0,5-1mg di DNA plasmidico.

3.12 - Linearizzazione del plasmide

Per la sintesi di sonde a RNA senso e antisenso, corrispondenti all'inserto di cDNA codificante per *Ptma*, 20 µg di DNA plasmidico sono stati digeriti o con l'enzima di restrizione *Bam HI* o con *Xho I* (Fermentas) in un rapporto iniziale di 4U di enzima per 1 µg di DNA in un volume finale di 100µL, nei tamponi consigliati dalle case produttrici.

Dopo un'incubazione a 37°C per tutta la notte, si è proceduto all'aggiunta di un'ulteriore quota di enzima di restrizione e alla successiva incubazione a 37°C per 2 ore. Un'aliquota è stata analizzata su gel di agarosio allo 0,8% in TAE 1x (**Tab. 4**) per verificare l'avvenuta linearizzazione.

I campioni sono stati poi estratti con un volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) ed una seconda estrazione con un volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1). In seguito, il DNA è stato precipitato con:

Sodio Acetato pH 5,2, 3 M 1/10 del volume finale

Etanolo assoluto 3 volumi

alla temperatura di -20°C per la notte. Il giorno seguente è stata proseguita la precipitazione e si è provveduto alla risospensione con H₂O DEPC. Un'aliquota dei plasmidi, linearizzati e purificati, è stata, infine, analizzata su gel di agarosio 0,8% in TAE 1x.

3.13 - Trascrizione in vitro

La trascrizione *in vitro* delle sonde senso e antisense è stata effettuata utilizzando il “DIG-RNA labeling kit (SP6/T7)” (Roche Diagnostics), seguendo le istruzioni della casa produttrice, impiegando come stampo 1µg di plasmide linearizzato.

La reazione di sintesi è stata condotta alla temperatura di 37°C per 2 ore; successivamente sono stati aggiunti 2 µL di DNAsi I (10U/µL), e i campioni sono stati incubati a 37°C per 20', allo scopo di rimuovere il DNA stampo.

La reazione è stata, infine, bloccata mediante aggiunta di 1µL di EDTA 0,5M pH 8,0, poi ai campioni è stato aggiunto 1/10 di LiCl 4M, e 2,5 volumi di etanolo assoluto. L'RNA è stato lasciato precipitare per la notte a -20°C.

Il giorno seguente si è proceduto con una centrifugazione, in centrifuga Eppendorf, a 13000 rpm, per 30' a 4°C. Il precipitato è stato lavato con etanolo al 70% in H₂O DEPC e ricentrifugato per 15' con le stesse modalità. Infine le sonde sono state risospese in 50µL di H₂O DEPC.

3.14 - Quantificazione delle sonde di RNA

Per valutare la concentrazione degli RNA trascritti *in vitro* è stata eseguita l'elettroforesi di aliquote di 1 µL di entrambe le sonde e, come controllo, di una eguale quantità di un RNA standard a concentrazione nota, fornito dal kit. Le immagini generate tramite transilluminatore sono state analizzate mediante lo strumento “Volume Rect. Tool” del programma Quantity One, per ottenere valori relativi di concentrazione in base allo standard.

Alternativamente, per determinare l'incorporazione di nucleotidi marcati nella sequenza delle sonde, è stato utilizzato un saggio immunoenzimatico, ricorrendo all'utilizzo di anticorpi anti-digossigenina coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina. E' stata fatta avvenire l'interazione tra l'anticorpo (ab) e il corrispondente aptene, DIG-UTP, e la visualizzazione delle molecole di RNA è stata realizzata attraverso una successiva reazione colorimetrica catalizzata dalla fosfatasi alcalina. L'enzima, in presenza di due substrati, il 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato (BCIP) ed il sale Nitroblu di tetrazolio (NBT) produce un substrato insolubile di colore blu. Dal confronto qualitativo dell'intensità dei precipitati colorati prodotti dalle diverse diluizioni di un RNA controllo con quelli prodotti dagli RNA da quantificare, è possibile determinare la concentrazione.

La reazione immunoenzimatica è stata condotta su di un filtro di nylon (Hybond-N, Amersham) sul quale è stato posto 1 μ L di diluizioni crescenti dell'RNA da quantificare e di RNA controllo, realizzate impiegando il tampone 1 (**Tab. 2**). Per consentire all'RNA di legarsi stabilmente al filtro, questo è stato esposto agli U.V. per 30''.

Il filtro è stato posto 2' in una soluzione di SSC 2x (**Tab. 2**) con una leggera agitazione, quindi per 30' nel tampone 2 (**Tab. 2**), lo stesso in cui viene diluito l'anticorpo anti-DIG AP (0,15 U/mL) che è sottoposto ad incubazione a temperatura ambiente per un ora.

Per rimuovere gli anticorpi non legati sono stati eseguiti due lavaggi di 15' con il tampone 1 (**Tab. 2**). Il filtro è stato, poi, equilibrato per 5' nel tampone 3 (**Tab. 2**) di rivelazione e, successivamente, incubato al buio in una soluzione di rivelazione composta da Tampone 3 (**Tab. 2**) e NBT/BCIP, in base alle informazioni fornite dal produttore.

Dopo pochi minuti, con la comparsa del precipitato di colore blu, la reazione è stata bloccata lavando il filtro per 5' in un opportuno volume di tampone 4 (**Tab. 3**).

3.15 - Ibridazione *in situ*

L'ibridazione *in situ* con sonde marcate con digossigenina è stata effettuata su sezioni di 7 µm ottenute dal testicolo di *Rattus norvegicus*.

Dopo la sparaffinatura, condotta mediante il passaggio in xilene e l'idratazione nella serie decrescente degli alcoli, le sezioni sono state fissate, al fine di preservarne la morfologia, per 30' a temperatura ambiente, utilizzando una soluzione contenente:

- Paraformaldeide 4 %
- MOPS pH 7,5 (**Tab. 2**) 0,1 M
- NaCl 0,5 M

Le sezioni fissate sono state lavate in PBS (**Tab. 2**) e poi incubate in una soluzione contenente:

- Proteasi K 10 µg/mL
- Tris-HCl pH 7,2 20 mM
- EDTA 1 mM

Il trattamento con la proteasi è stato condotto per 10'. Esso incrementa l'accessibilità all'RNA messaggero bersaglio, idrolizzando eventuali proteine ad esso legate;

Dopo la digestione con proteinasi, le sezioni sono state lavate per 5' in PBS (**Tab.2**) e, in seguito, sottoposte a postfissazione in paraformaldeide 4% per 30' a temperatura ambiente.

Sono poi stati eseguiti dei lavaggi in PBS (**Tab. 2**) a temperatura ambiente, 2 brevi lavaggi in SSC 2x (**Tab. 2**) ed un lavaggio di 30' in un tampone Tris-glicina (**Tab. 2**). I campioni sono stati, quindi, incubati nella soluzione di ibridazione contenente 100µg di sonda marcata senso o antisense (**Tab. 2**) per la notte, a 60°C.

Il giorno seguente sono stati compiuti dei trattamenti mirati alla rimozione di ibridazioni aspecifiche, aumentando la stringenza tramite modulazione delle condizioni saline e della temperatura. I campioni, quindi, sono stati lavati 3 volte in SSC 5x a temperatura ambiente per 20'; poi in SSC 0,5x, formammide 20% a 60°C, 1 volta per 40'. Dopodiché la soluzione è stata cambiata, e i campioni sono stati lasciati a T amb fino al raggiungimento di 37°C; le sezioni sono state, quindi, trattate con il tampone NTE (**Tab. 2**) per 15' a 37°C e, subito dopo, con tampone NTE (**Tab. 2**) contenente RNAsi A (10 µg/mL) per 30' a 37°C, quindi nuovamente lavate con il solo tampone (**Tab. 2**) per 15' a 37°C.

A questo punto è stato eseguito un altro lavaggio in SSC 0,5%, formammide 20% a 60°C, e uno in SSC 2x (**Tab. 2**) a temperatura ambiente.

Prima dell'aggiunta dell'anticorpo anti-digossigenina, le sezioni sono state incubate per 10' a temperatura ambiente in "blocking solution" (**Tab. 2**).

In una soluzione analoga soluzione di acido maleico (tampone 1, **Tab. 2**), priva però di Boheringer Blocking powder, è stato diluito l'anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina (Anti Dig-AP Fab Fragment, Roche, 0,75 U/µL), diluito 1:2000; 100 µL di questa soluzione sono stati aggiunti ad ogni campione ed il tutto è stato incubato a 4°C per la notte.

Il giorno seguente i campioni sono stati lavati 5 volte in TBS (**Tab. 2**) a T amb, poi in Soluzione B 1x in H₂O, per 10' (**Tab. 2**);

Quest'ultimo trattamento è importante per l'inibizione delle fosfatasi endogene.

Per individuare la localizzazione degli RNA di interesse, le sezioni sono state incubate con la soluzione substrato "BM purple" (Roche Diagnostics), cui è stata aggiunta Soluzione B alla concentrazione finale 1x (**Tab. 2**).

I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per almeno 18 ore. Una volta verificata l'avvenuta colorazione delle sezioni, sono stati eseguiti due lavaggi di 10' in PBS 1x (**Tab. 2**), EDTA 10 mM, per arrestare la reazione. I vetrini sono stati, dunque, sottoposti a disidratazione in una serie a % crescente di etanolo, ai passaggi in xilene e, infine, a montaggio tramite balsamo (Eukitt). Infine, è stata eseguita la rivelazione al microscopio ottico (Leica DM 5000 B + CTR5000), e le immagini sono state prodotte e salvate per mezzo del software Leica IM 1000.

3.16 - Estrazione di proteine

I testicoli, gli spermatozoi epididimali e il timo sono stati sottoposti a lisi in RIPA buffer (**Tab. 3**) in presenza di una serie di inibitori di proteasi: 4 µg/mL di *leupeptina*, *aprotinina*, *pepstatina A*, *chimostatina*, *PMSF* (phenil metil sulfonil fluoride) e 5 µg/mL di *TPCK* (tasy l phenilalanine chloromethyl ketone)

Gli omogenati sono stati sonicati per due volte con 3 impulsi da 20 Hertz della durata di 20'' ognuno e successivamente centrifugati per 30'. a 10000 g. Il surnatante è stato prelevato e congelato a -80°C. La concentrazione di proteine negli estratti totali è stata stimata mediante il saggio colorimetrico di Lowry.

3.17 - Analisi mediante “Western Blot”

Proteine di testicolo (100µg), di spermatozoi epididimali (100µg) e di timo (50µg) sono state separate in base al loro peso molecolare tramite elettroforesi su gel SDS-PAGE al 15% e trasferite su un filtro Hybond-P polivinilidene difluoruro (**PVDF**, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) a 280 mA per 2h e 30' a 4°C.

I filtri sono stati poi tagliati e la loro parte inferiore è stata usata per analizzare l'immunoreattività di PTMA, mentre la parte superiore, come controllo valutativo della quantità di proteine caricate, l'immunoreattività della proteina ERK-2.

I siti non specifici della parte inferiore del filtro sono stati bloccati trattando quest'ultimo con la soluzione di bloccaggio contenente:

- 1% *NGS (normal goat serum)*
- 5% *BSA (Albumin from Bovine Serum, Sigma)*
- In PBS pH 7,4 (**Tab. 4**)

Successivamente è stato aggiunto l'anticorpo primario e i filtri sono stati incubati per tutta la notte a 4°C. Nei saggi per PTMA sono stati impiegati due diversi anticorpi policlonali, entrambi prodotti in coniglio, ottenendo risultati analoghi:

1. Un siero immune prodotto contro l'intero polipeptide PTMAa di zebrafish, fornito dal prof. Francesco Aniello (Dip. di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università degli studi di Napoli “Federico II”), diluito 1:1000 nella soluzione di bloccaggio;

2. IgG dirette contro la regione C terminale della protimosina α umana (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germania), diluita 1:2000 nella soluzione di bloccaggio.

I filtri sono stati sottoposti a tre lavaggi di 15' in PBS pH 7,4 (**Tab. 4**) contenente 0,25% di Tween 20, e un lavaggio di 15' in PBS, e successivamente incubati con IgG secondarie anti-Fc di coniglio coniugate con la perossidasi di rafano. I filtri sono stati lavati come descritto prima e gli immunocomplessi rilevati utilizzando l'ECL-Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK).

I siti non specifici della parte superiore del filtro sono stati, invece, bloccati utilizzando una soluzione contenente:

- 5% siero di latte
- 0,25% Tween 20
- In TBS pH 7,6 (**Tab. 3**)

e incubati a 4°C con un anticorpo primario contro le MAPK (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) che riconosce principalmente ERK-2 (p42), diluito 1:1000 in TBS pH 7,6 contenente siero di latte al 2.5%. I filtri sono stati sottoposti a tre lavaggi di 15' in TBS pH 7,6 + 0,25% di Tween 20, e un lavaggio di 15' in TBS.

I segnali di Western blot sono stati quantificati tramite analisi desintometrica utilizzando il programma Quantity One in seguito alla cattura delle immagini del transilluminatore (Biorad, Hercules, CA). I livelli di PTMA sono stati corretti confrontandoli con quelli di ERK-2 e messi in grafico in base alle loro densità ottiche. Sono stati eseguiti tre saggi indipendenti per valutare la significatività statistica.

3.18 - Analisi di Immunoistochimica (IHC) su testicolo di *Rattus norvegicus*

Per studiare la localizzazione della PTMA nel testicolo di *Rattus norvegicus* sono stati eseguiti esperimenti di ICC usando il sistema ABCComplex-HRP (Vector Laboratories, Vectastain ABC); Per verificare la specificità delle reazioni i controlli sono stati trattati o omettendo l'abI durante la procedura, o utilizzando sieri preimmuni. il protocollo usato è descritto di seguito.

Sezioni spesse 7µm di testicolo dei diversi periodi di sviluppo (27, 35 e 60 dpp) di *Rattus norvegicus* sono state reidratate mediante immersione in una serie “discendente” di alcool etilico preceduta da due passaggi in xilene.

Terminata questa fase i vetrini sono stati posti per 5' in una soluzione di Citrato 0,01M (**Tab. 4**) pH 6 portato alla temperatura di 100 °C, per permettere l'esposizione dell'antigene riconosciuto dall'ab primario contro PTMA. In seguito, i campioni sono stati lasciati raffreddare nella stessa soluzione per altri 20' prima di essere messi in agitazione per 30' in una soluzione di H₂O₂ 3% in metanolo per bloccare le perossidasi endogene.

E' stato poi eseguito un passaggio veloce in H₂O e un lavaggio di 6' in una soluzione di PBS 0,01 M pH 7,4 (**Tab. 4**) a cui è stato aggiunto il detergente Tween 20 (T20) allo 0,05%.

I vetrini sono stati, quindi, asciugati e sulle sezioni è stata aggiunta la soluzione di bloccaggio, costituita da:

- PBS 0,01 M (**Tab. 4**) : NGS in rapporto 1:5 v/v
- 5% BSA (*Albumin from Bovine Serum* della Sigma)

A questo punto i vetrini sono stati posti in una camera umida e sono stati lasciati a temperatura ambiente per 30'.

Al termine del bloccaggio sono stati eseguiti altri lavaggi, da 5' con la soluzione PBS 0,01 M (**Tab. 4**) + 0,05% T20, prima di aggiungere sulle sezioni l'anticorpo specifico (AbI) diluito 1:1000 nella soluzione di bloccaggio già descritta. La reazione è stata incubata a 4 °C per la notte.

Il giorno successivo sono stati eseguiti altri 2 lavaggi da 5' con la soluzione PBS 0,01 M (**Tab. 4**) + 0,05% T20. Le sezioni sono state, quindi, incubate per 30' a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (*Policlonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins Biotinylated* della dakoCytomation) diluito 1: 500 nella soluzione di bloccaggio.

Dopo 2 lavaggi con la soluzione PBS 0,01 M (**Tab. 4**) + T20, da 5' ciascuno, è stato aggiunto il complesso ABC (Avidin Biotin Complex) in TRIS HCl pH 7.6, secondo le istruzioni del produttore.

Dopo 30' di incubazione con il complesso ABC sono stati effettuati altri lavaggi con la soluzione PBS 0,01 M (**Tab. 4**) + T20, ed è stata aggiunta la 3-3' diamminobenzidina tetraidrocloride (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA), substrato per la perossidasi legata alla biotina del complesso, che porta alla formazione di un precipitato di colore bruno.

La soluzione di rivelazione è stata così preparata, al riparo dall'illuminazione diretta:

- 5 mg di DAB in polvere
- 50 µL di DMSO
- Vortex per 10'

- 5 mL di TrisHCl 50 mM pH 7,6
- 5 µL di H₂O₂ 30% aggiunti prima dell'uso

La soluzione è stata lasciata sulle sezioni per 10'-20' prima di arrestare la reazione con un passaggio veloce in H₂O, dopodiché è stato eseguito un passaggio di 1' in ematossilina per colorare i nuclei delle cellule.

A questo punto i vetrini sono stati disidratati mediante immersione in una serie "ascendente" di alcool etilico, seguita da xilene. Terminata la disidratazione, sono stati montati utilizzando balsamo Eukitt e osservati al microscopio ottico. Le immagini sono state prodotte con i mezzi descritti in precedenza.

3.19 - Analisi di Immunocitochimica (ICC) su spermatozoi di Rattus norvegicus e Homo sapiens

Per localizzare PTMA negli spermatozoi epididimali (eSPZ) di ratto sono state impiegate sia tecniche di ICC con sistemi di rivelazione enzima-substrato in luce visibile, sia tecniche di immunofluorescenza (IF), utilizzate anche sugli spermatozoi umani (hSPZ).

Analisi di ICC nel visibile

Il protocollo eseguito per le ICC nel visibile è analogo alla procedura precedentemente descritta per le IHC, con alcune variazioni dovute alla natura dei campioni:

- I vetrini con gli spermatozoi sono stati prelevati da -20°C e lasciati a temperatura ambiente per 15' prima dell'uso;

- Sono poi stati post-fissati in 4% paraformaldeide in PBS pH 7.4 (**Tab. 4**) prima di procedere con il protocollo;
- Non sono stati eseguiti passaggi di esposizione dell'antigene.

Analisi di IF

Per determinare la localizzazione di PTMA tramite la metodica IF sono stati impiegati due diversi abI:

1. L'anticorpo policlonale anti-C-terminale di PTMA umana, prodotto in coniglio (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germania), già utilizzato in precedenza;
2. Un ab policlonale anti-N-terminale di PTMA di ratto, prodotto in capra (SantaCruz).

I campioni, una volta prelevati da -20°C e lasciati a T amb per 15' sono stati fissati in 4% paraformaldeide in PBS pH 7.4 (**Tab. 4**), e bloccati con una soluzione contenente:

- PBS 0,01 M (**Tab. 4**)
- BSA 5% (*Albumin from Bovine Serum* della Sigma)
- NSS 10% (Normal Swine Serum)

Gli anticorpi primari sono stati diluiti 1:50 in una soluzione analoga, in cui la percentuale di NSS era ridotta all'1%, e incubati O/N a 4°C.

Per la rivelazione, in base alle esigenze, sono stati impiegati i seguenti anticorpi, diluiti 1:000 nella stessa soluzione usata per gli abI, e incubati 1 h a T ambiente:

- 1a. Alexa Fluor 488 Goat α -Rabbit (Invitrogen), con emissione nel verde;
- 1b. In alternativa, Alexa Fluor 568 Goat α -Rabbit (Invitrogen), con emissione nel rosso.

- 2a. Alexa Fluor 488 Donkey α -Goat (Invitrogen), con emissione nel verde:
- 2b. In alternativa, Alexa Fluor 568 Donkey α -Goat (Invitrogen), con emissione nel rosso.

I vetrini sono stati montati con Vectashield+DAPI per la marcatura nucleare (Vectorlabs) e, in seguito, visualizzati al microscopio ottico (Leica DM 5000 B + CTR 5000) con lampada UV, per mezzo del software IM 1000;

Alternativamente, per la visualizzazione al microscopio confocale, i campioni sono stati trattati con 2 μ g/mL finali di TO-PRO 3 Ioduro (Invitrogen) in DMSO, in incubazione nella stessa soluzione degli abII, poi montati con Mowiol Solution (Polysciences, Inc). Infine i vetrini sono stati osservati al microscopio Zeiss LSM 510.

Per eseguire gli esperimenti di colocalizzazione di PTMA e la regione della teca perinucleare, dopo aver eseguito il protocollo precedente con l'anticorpo contro PTMA prodotto in capra, è stato usato un siero immune contro le proteine della regione subacrosomale della teca, concessoci dal Prof. Richard Oko della Queen's University, Canada, diluito 1:100 nella stessa soluzione usata per gli altri ab. In questo caso, subito dopo la postfissazione in paraformaldeide, i campioni sono stati trattati con Triton 0,1% in PBS per 30', per consentire la corretta immunolocalizzazione del segnale della teca.

Per valutare la presenza di PTMA nella regione acrosomale, all' α -PTMA è stata, invece, affiancata la PNA-lectina coniugata con Alexa Fluor 568 (Invitrogen), diluita 1:50 nella stessa soluzione impiegata per gli abI. I vetrini sono stati osservati al confocale, con le stesse modalità appena descritte.

3.20 - TABELLE

TABELLA 1

SOLUZIONI PER ELETTROFORESI

TAE 10x

Tris	0,8	M
Acido Acetico Glaciale	0,4	M
EDTA pH 8.0	2	mM

TABELLA 2

TAMPONI IMPIEGATI PER LA
TRASCRIZIONE *IN VITRO*,
L'IMMUNORIVELAZIONE E
L'IBRIDAZIONE *IN SITU*

Tampone 1 (MBT)

Acido maleico pH 7,5	0,1	M
NaCl	0,15	M

a pH con NaOH

In H₂O

Blocking Stock Solution

“Blocking reagent” (Boehringer) disciolto all'1% (w/v) nel tampone 1

Tampone 2

“Blocking stock solution” (Boehringer) diluita 1:10

Tampone 3

Tris-HCl pH 9,5	100	mM
NaCl	100	mM
MgCl ₂	50	mM

Tampone 4

Tris-HCl pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM

Tampone di diluizione

H₂O-DEPC : SSC 20x : Formaldeide 5:3:2

NTP miscela di marcatura

ATP	10	mM
CTP	10	mM
GTP	10	mM
UTP	6,5	mM
DIG-UTP	3,5	mM

Tampone di trascrizione 10x

Tris-HCl pH 8	400	mM
MgCl ₂	60	mM
DTT	100	mM
Spermidina	20	mM

Tampone Tris-Glicina (1 L)

Tris	12,1	g
Glicina	7,5	g
In H ₂ O		

Soluzione di ibridazione

Formammide	40	%
SSC	5	x
Soluzione di Denhardt	1	x

DNA di sperma di salmone	100	µg/mL
tRNA	100	µg/mL
Sonda	100	ng
volume finale	100	µL

Soluzione B 100X

Levamisole	50	mg/mL
Tween 20	10	%

Tampone NTE

NaCl	0,5	M
Tris-HCl pH 7,0	10	mM
EDTA pH 8	5	mM

TBS (1 L)

Tris	10	mM
NaCl	150	mM
NaH ₂ PO ₄	10	mM
In H ₂ O		

PBS

NaCl	200	mM
KCl	3	mM
Na ₂ PO ₄	10	mM
KH ₂ PO ₄	2	mM

Soluzione di lavaggio SSC 20X

NaCl	3	M
Citrato trisodico	300	mM
Portato a pH 7 con NaOH		

In H₂O

MOPS 10x (0.2M)

MOPS	200	mM
Na-Acetato	75	mM
EDTA pH 8	10	mM

Abbreviazioni

DEPC:	dietilpirocarbonato
SSC:	sodio salino citrato
PBS:	tampone salino fosfato
TBS:	tampone tris salino
MOPS:	acido 3 [N-morpholino] propansolfonico

TABELLA 3

SOLUZIONI PER ESTRAZIONE PROTEICA E WESTERN BLOT

Ripa Buffers

PBS pH 7,4 contenente:

SDS	0,1	%
Nonidet P-40	1	%
Sodio deossicolato	0,5	%
Sodio ortovanadato	100	mM

TBS pH 7,6

Tris-HCl pH 7,6	10	mM
NaCl	150	mM

TABELLA 4

SOLUZIONI PER IMMUNOISTO/CITOCHIMICA

PBS [0,1 M] pH 7,4

Soluzione A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M
(Preparare 57 mL)

Soluzione B: Na_2HPO_4 0,2 M
(Preparare 243 mL)

Unire le soluzioni e controllare il pH.

Aggiungere 5,22 g di NaCl e portare a volume di 600 mL

Citrato [0,1 M] pH 6

Citrato Monoidrato 40 g

Portare a pH con NaOH [10 N]

Volume finale: 2 L con H_2O

TABELLA 5

ALTRE SOLUZIONI

Fissativo di Bouin (per 21 mL)

Acido picrico in sol. satura 15 mL

Formalina 5 mL

Acido acetico glaciale 1 mL

LB: Mezzo di coltura di LURIA-BERTANI (1 L)

NaCl 10 g

Triptone 10 g

Estratto di lievito 5 g

4. Risultati

4.1 - Espressione del trascritto di Ptma e della proteina in ratti adulti

Il nostro studio ha previsto, per prima cosa, la determinazione della presenza del trascritto e della proteina nella gonade maschile: per rilevare il messaggero della protimosina è stata eseguita un'analisi di RT-PCR semiquantitativa su RNA estratti da testicoli di ratto adulto. L'elettroforesi su gel di agarosio ha rivelato una singola banda di amplificato delle dimensioni attese (307 cb), sia utilizzando come stampo cDNA di testicolo, sia di timo come controllo positivo (**Fig. 4.1A**). L'amplicone di interesse è stato clonato e sequenziato, confermando la sua corrispondenza con il trascritto di *Ptma*. Per assicurare la qualità dello stampo è stata eseguita una PCR per la β -actina (*Act*), mentre l'analisi sui campioni per il controllo negativo (RT⁻) non ha prodotto bande di amplificato (dato non mostrato).

La presenza del polipeptide è stata verificata tramite *Western Blotting* (WB) su estratti proteici totali di testicolo e timo, per mezzo di un anticorpo specifico α -PTMA, visualizzando la banda specifica da 13 KDa. Come controllo è stato eseguito un WB per le MAP chinasi (**Fig 4.1B**).

4.2 - Analisi della presenza del trascritto di Ptma e della proteina durante la prima ondata della spermatogenesi di ratto

Dopo aver confermato la presenza del trascritto e della proteina nel tessuto di interesse, è stato studiato il *pattern* della loro associazione alle fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi di ratto, impiegando gonadi asportate a tre tempi di sviluppo post-natale (27, 35 e 60 dpp), rispettivamente coincidenti con il completamento delle prime meiosi, con l'inizio dell'attività spermioistogenica, e con la fine della prima ondata della spermatogenesi.

I livelli di espressione di *Ptma* sono stati analizzati tramite RT-PCR effettuata su RNA totali di testicoli prelevati ai tre tempi, rilevando la presenza del trascritto in tutti i campioni (**Fig. 4.2A**). La quantità relativa dei cDNA è stata controllata tramite PCR con oligonucleotidi specifici per *Act* (**Fig. 4.2A**). I dati mostrano una riduzione dei livelli di *Ptma* dallo stadio di 27 dpp ai successivi ($P < 0,05$; **Fig. 4.2A,C**).

La quantità di PTMA è stata, invece, determinata tramite WB su estratti proteici totali di tessuti prelevati agli stessi tempi di sviluppo, per mezzo dell'analisi densitometrica relativa delle bande ottenute: il polipeptide, coerentemente con quanto visto per l'mRNA, è sempre presente durante lo sviluppo della gonade ed è significativamente più abbondante a 27 dpp ($P < 0,01$; **Fig. 4.2B,D**).

Figura 4.1

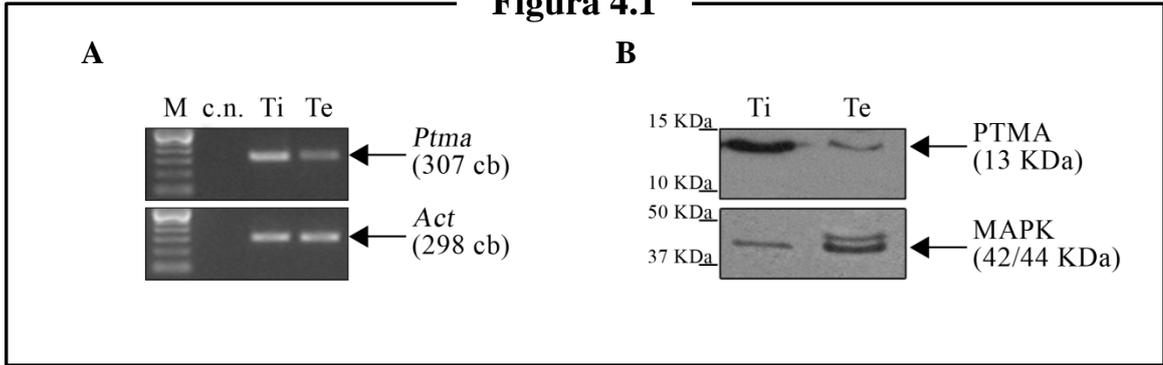


Fig. 4.1 - Espressione dell'mRNA per la protimosina e della proteina nel testicolo di ratto adulto: 4.1A - Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR su mRNA totali di testicolo (Te) e timo (controllo positivo, Ti) di ratto adulto. Il prodotto di amplificazione ottenuto (307 cb) è stato clonato e sequenziato, confermando l'identità di *Ptma*. Il controllo di qualità è stato effettuato mediante amplificazione di un frammento di *Act*. M: Marcatore di peso molecolare, sensibilità 100 cb; c.n. Controllo negativo. 4.1B - WB per PTMA e per le MAPK su estratti proteici totali di testicolo e timo. E' stata rilevata una banda di 13KDa, corrispondente alla protimosina, nel testicolo e nel timo di ratto adulto.

Figura 4.2

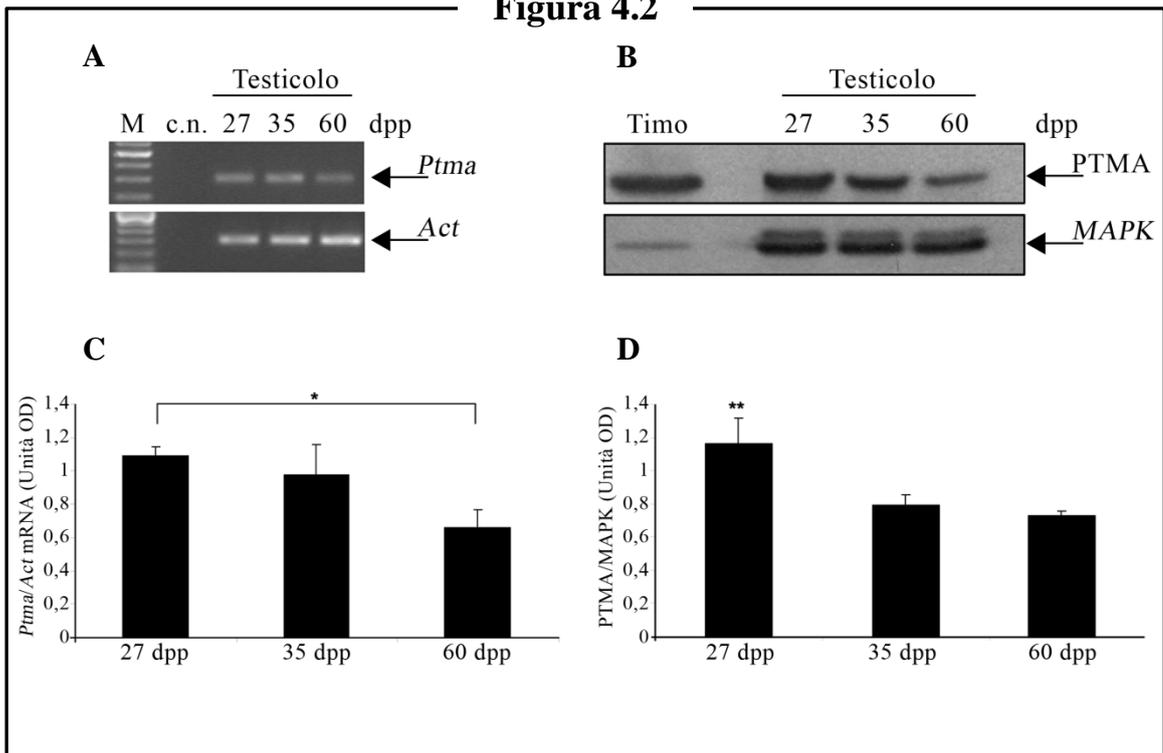


Fig. 4.2 - Espressione di *Ptma* e della proteina nel testicolo, durante lo sviluppo postnatale: 4.2A,C - RT-PCR su RNA totali di testicolo agli stadi di 27, 35, 60 dpp e grafico dei livelli di trascritto. A) In figura è mostrato un saggio rappresentativo di tre esperimenti eseguiti indipendentemente. M: Marcatore di peso molecolare, sensibilità 100 cb; c.n. Controllo negativo. C) Il livello di espressione di *Ptma* subisce un decremento negli stadi successivi a quello di 27 dpp. Il grafico illustra i livelli relativi di trascritto, espressi in densità ottiche (OD). * indica $P < 0,05$. 4.2B,D - WB per PTMA e per le MAPK su estratti proteici di testicolo agli stadi di 27, 35, 60 dpp e grafico dei livelli di proteina. Sono stati eseguiti tre saggi indipendenti. I livelli di proteina degli stadi 35 e 60 dpp risultano inferiori a quelli rilevati a 27 dpp. L'andamento è illustrato in D: i livelli relativi sono espressi in OD. ** indica $P < 0,01$

4.3 - Localizzazione di Ptma durante la prima ondata della spermatogenesi

La localizzazione del trascritto è stata studiata nei diversi tipi cellulari che compongono il testicolo tramite ibridazione *in situ* su sezioni a 27, 35, 60 dpp. Nei campioni a 27 dpp, il segnale della sonda antisenso ha permesso di determinare che *Ptma* è localizzato, nel compartimento germinale, nel citoplasma degli spermatociti I (SPC) in pachitene e degli spermatidi (SPT) rotondi di nuova formazione. Inoltre, la presenza del trascritto è stata rilevata nelle cellule mioidi peritubulari (PMC) che circondano il cordone cellulare e, nell'interstizio, nelle cellule di Leydig (LC; **Fig. 4.3A**). L'ibridazione con un cRNA senso impiegato come controllo negativo non ha dato alcun segnale (**Fig. 4.3B**).

Lo schema rilevato al primo stadio è mantenuto in quelli successivi (**Fig.4.3C**), ed è interessante notare che, a 60 dpp, gli SPT rotondi restano il tipo cellulare più avanzato in cui il trascritto è espresso (**Fig. 4.3C₂**), mentre i differenziamenti successivi della linea germinale ne sono privi (**Fig. 4.3C_{3,4}**).

Figura 4.3

27 dpp

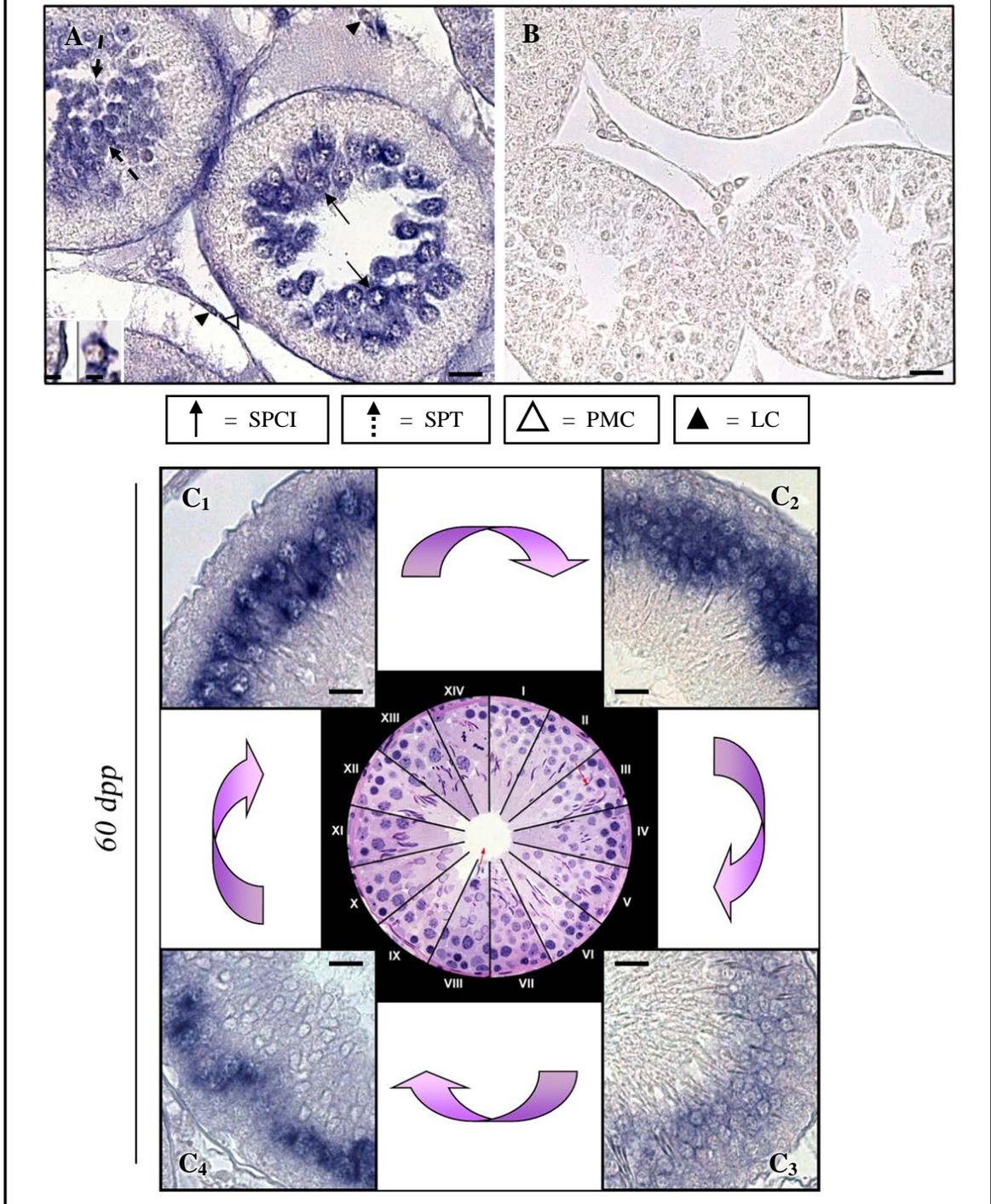


Fig. 4.3 - Localizzazione di *Ptma* durante lo sviluppo post-natale del testicolo, mediante ibridazione *in situ* (ISH): 4.3A,B - Sezioni di testicolo a 27 dpp trattate con sonde ribonucleotidiche antisenso (A) e senso (B). A) Le cellule positive sono marcate in blu; il segnale è evidente negli SPCI in pachitene, negli SPT, nelle cellule peritubulari (PMC) e nelle LC. L'inserto a sinistra mostra l'ingrandimento di una PMC positiva, quello di destra una LC. I campioni trattati con sonda senso (B) non hanno dato segnale. 4.3C - ISH su sezioni a 60 dpp, trattate con sonda antisenso. E' possibile notare che il trascritto non è espresso nei tipi cellulari successivi agli SPT. Le foto in A,B,C sono state scattate ad ingrandimento 20x; le barre rappresentano 20 μ m, mentre negli inserti (100x) 10 μ m.

4.4 - Localizzazione di PTMA nei testicoli a 27, 35, 60 dpp e negli spermatozoi epididimali (eSPZ) di ratto

Dopo aver determinato la localizzazione dell'mRNA della protimosina, è stata studiata la distribuzione della proteina nella gonade per mezzo di immunocistochemica su sezioni, agli stessi periodi di sviluppo analizzati precedentemente. Coerentemente con quanto visto per il trascritto, a 27 dpp PTMA è stata identificata nei tubuli, nel citoplasma degli SPC I in pachitene e in divisione, e negli SPT da essi derivati (**Fig. 4.4**); Inoltre, la proteina è stata rilevata nelle PMC e, nell'interstizio, nelle LC (**Fig. 4.4**).

Dall'analisi degli stadi successivi è stato osservato che la localizzazione interstiziale e peritubulare è mantenuta durante lo sviluppo del testicolo; inoltre, è interessante notare che il segnale di PTMA nel compartimento germinale è quasi assente negli SPC in attiva divisione meiotica, mentre è evidente negli SPT in differenziamento (**Fig. 4.5**).

In particolare la localizzazione di PTMA nella testa degli SPT durante la spermiogenesi suggerisce che essa sia associata al sistema dell'acrosoma (**Fig. 4.6**): è, infatti, evidente che il segnale di immunolocalizzazione segue la morfogenesi dell'organello durante tutto il processo di differenziamento.

Visti i risultati ottenuti durante la spermiogenesi, ha suscitato naturale interesse lo studio del destino di PTMA a livello degli spermatozoi (SPZ) maturi, una volta completato il differenziamento. Per iniziare, è stata quindi valutata la presenza della molecola in SPZ epididimali di ratto, tramite WB e immunocistochemica (ICC) (**Fig. 4.7A,B**): entrambe le analisi hanno confermato la presenza di PTMA, e le immagini di ICC mostrano che il polipeptide mantiene la localizzazione nel citoplasma apicale a ridosso del nucleo, attesa in

base ai dati ottenuti sugli SPT in differenziamento (**Fig. 4.7B,D**). L'indagine, quindi, ha rafforzato le prove di un'associazione tra PTMA e il sistema dell'acrosoma. E' però noto che la complessa struttura dello SPZ presenta regioni adiacenti o sovrapposte che non rendono semplice la precisa determinazione della regione interessata da PTMA (**Fig. 4.7E**): a ridosso del nucleo, infatti, vi è l'addensato citoplasmatico della teca perinucleare (TP), avvolta, parzialmente, dall'acrosoma (A). La definizione offerta dalla microscopia ottica e dalla ICC nel visibile non è sufficiente per confermare la posizione subcellulare della protimosina in una delle due zone: come descritto nel paragrafo 4.5, per approfondire le nostre conoscenze abbiamo adoperato tecniche di immunofluorescenza e microscopia confocale, in esperimenti di co-localizzazione con marcatori delle regioni di interesse.

Figura 4.4

27 dpp

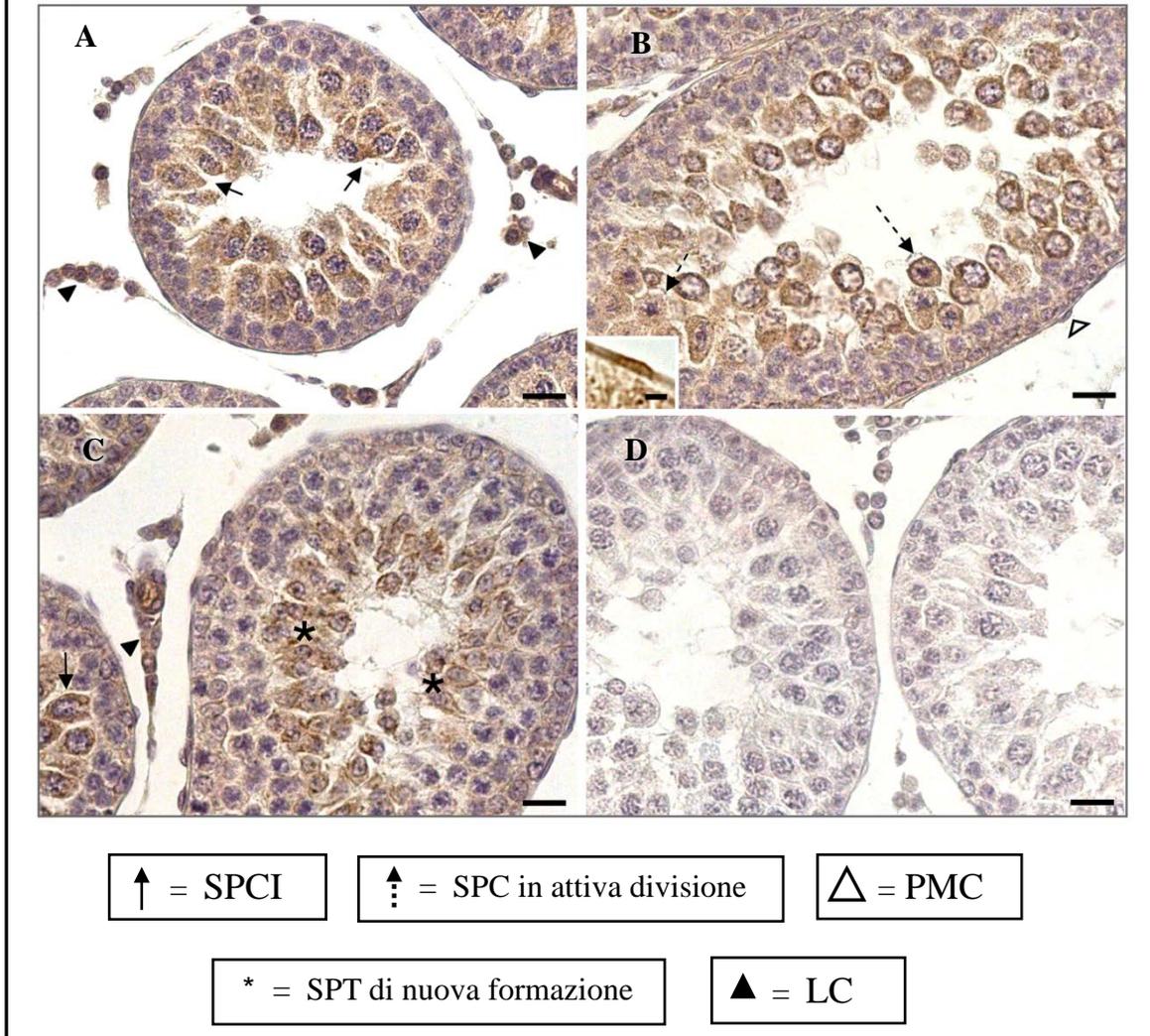
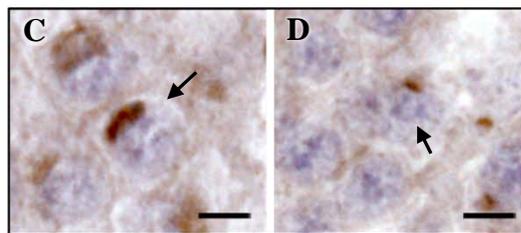
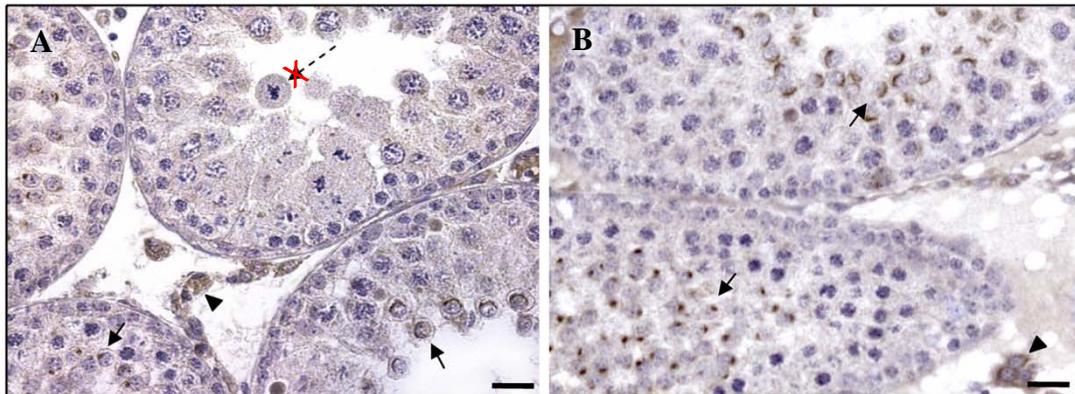


Fig. 4.4 - Localizzazione di PTMA nel testicolo di ratto a 27 dpp, mediante IHC: 4.4A,B,C - sezioni marcate per mezzo della 3,3-diamminobenzidina; la colorazione bruna indica le cellule positive. Il segnale è presente nelle LC (A,C), nelle PMC (B), negli SPCI in pachitene (A,C), e in attiva divisione meiotica (B), e negli SPT di nuova formazione (C). L'inserto in figura B mostra l'ingrandimento di una PMC positiva. 4.4D - controllo negativo, non trattato con anticorpo I.

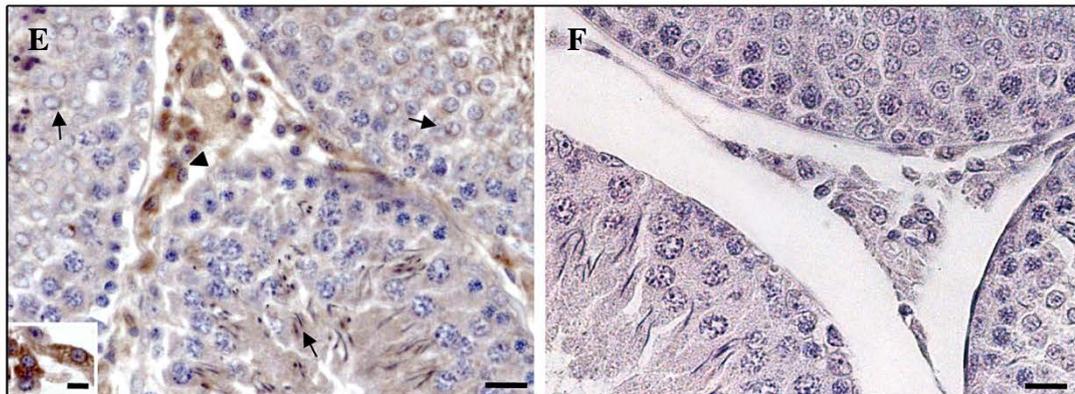
Tutti i campioni sono stati contrastati con ematossilina. Le immagini sono state prodotte all'ingrandimento di 20x. Le barre in A,B,C,D rappresentano 20 μ m, mentre nell'inserto (100x) 5 μ m.

Figura 4.5

35 dpp



60 dpp



↑ = SPT in differenziamento

~~*~~ = SPC in meiosi - negativi

▲ = LC

Fig. 4.5 - Localizzazione di PTMA nel testicolo di ratto a 35 (A-D) e 60 dpp (E,F), mediante IHC: 4.5A-E - sezioni marcate per mezzo della 3,3-diamminobenzidina; Il segnale è presente nelle LC (A,B,E), e negli SPT in differenziamento (A-E). In A è indicato uno SPCI in meiosi, negativo al segnale. L'inserto in figura E mostra l'ingrandimento di LC positive. 4.5F - controllo negativo, non trattato con anticorpo I.

Tutti i campioni sono stati contrastati con ematossilina. Le immagini A,B,E,F sono state prodotte all'ingrandimento di 20x e le barre rappresentano 20 μ m. L'inserto di E e le figure C e D sono all'ingrandimento di 100x, e le barre indicano 5 μ m.

Figura 4.6

60 dpp

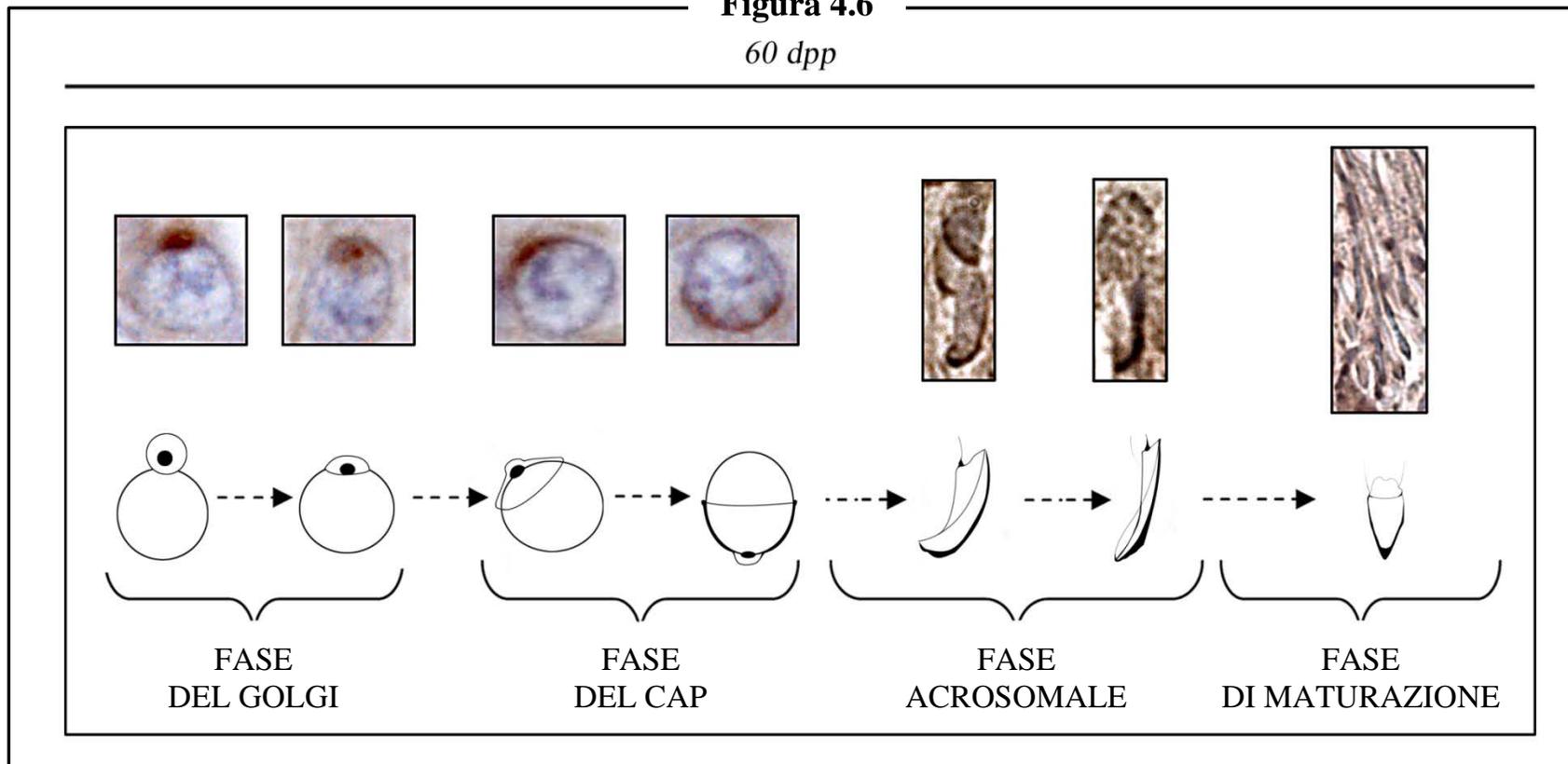


Fig. 4.6 - Associazione di PTMA alla biogenesi del sistema acrosomale: immunohistochimica su sezioni di testicolo a 60 dpp, e rappresentazione schematica delle fasi della spermiogenesi. La protimosina è associata al sistema acrosomale durante tutte le fasi del differenziamento dello SPT in SPZ: nella fase del Golgi il segnale è presente a livello della formazione vescicolare che si dispone a ridosso del nucleo degli SPT rotondi; durante la fase del “cap” esso permane a livello della vescicola acrosomale che gradualmente si distende per coprire la regione perinucleare, ed è ancora evidente nella fase “acrosomale”, mentre il nucleo è in allungamento; Analogamente, nella fase di “maturazione”, esso è ancora rilevabile nella zona apicale della testa dello SPZ in formazione.

Figura 4.7

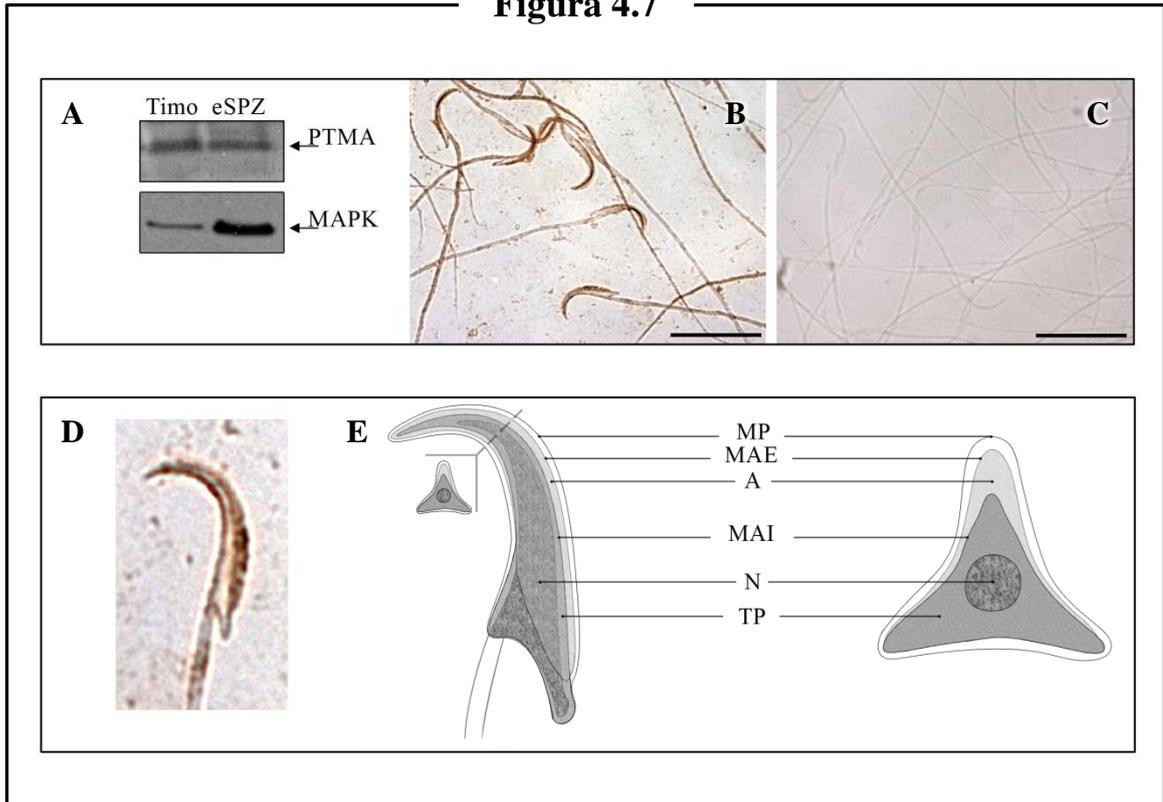


Fig. 4.7 - PTMA negli SPZ epidididimali di ratto (eSPZ): **4.7A** - Analisi WB per PTMA, che conferma la presenza della protimosina negli eSPZ. **4.7B,C,D** - ICC su eSPZ: in **B** è possibile notare il segnale perinucleare di PTMA (colorazione bruna), coerentemente con quanto osservato durante la spermatogenesi. **C**) controllo negativo, per omissione dell'abl. **D**) ingrandimento digitale di un dettaglio di B. Le immagini di ICC sono state scattate all'ingrandimento di 40x, le barre indicano 20 μ m. **4.7E** - a sinistra, schema rappresentativo delle regioni principali in cui è suddivisa la testa dello SPZ; a destra, ingrandimento del piano trasverso. MP, membrana plasmatica; MAE, membrana acrosomale esterna; A, acrosoma; MAI, membrana acrosomale interna; N, nucleo; TP, teca perinucleare. Si nota la parziale sovrapposizione delle regioni della teca e dell'acrosoma:

Nonostante risulti evidente la presenza di PTMA in una regione prossima al nucleo (**B,C,D**) le immagini finora mostrate non forniscono dettagli sufficienti per determinare se essa sia localizzata a livello della TP o dell'acrosoma (**D,E**).

4.5 - Analisi di localizzazione e co-localizzazione di PTMA tramite immunofluorescenza (IF) su eSPZ di ratto

Con l'obiettivo di conseguire una migliore definizione della localizzazione subcellulare di PTMA sono state eseguite delle analisi di IF su SPZ epididimali di ratto, per ottenere dati di co-localizzazione con alcuni marcatori dell'acrosoma e della teca perinucleare. Per prima cosa è stata provata la validità della marcatura di PTMA in fluorescenza (**Fig. 4.8A**, associata al verde), e dei *marker* selezionati, eseguendo IF singole sugli eSPZ di ratto. Per la TP, non essendo disponibile alcun anticorpo commerciale, è stato impiegato un siero immune contro la sua regione subacrosomale, gentilmente concessoci dal gruppo del Prof. Richard Oko della Queen's University, Canada (**Fig. 4.8B**), e la marcatura è stata associata alla fluorescenza nel rosso. Per l'acrosoma è stata utilizzata PNA lectina (anch'essa associata al rosso), che marca selettivamente l'intera regione (**Fig. 4.8C**). Come è possibile osservare nelle immagini, le tre marcature interessano zone molto prossime al nucleo, e lo "circoscrivono" dorsalmente.

Una volta definita la possibilità applicativa della tecnica sono state eseguite analisi di co-localizzazione di PTMA rispettivamente con la teca (**Fig. 4.9A**) e con l'acrosoma (**Fig. 4.9B**), catturando immagini al microscopio confocale. In base alle aree sovrapposte, i dati suggeriscono che PTMA sia disposta a livello delle membrane dell'acrosoma, e non nella teca. Sono attualmente in fase di preparazione esperimenti di reazione acrosomale, per risolvere con maggiore accuratezza la sua localizzazione, e per valutare la possibilità che PTMA sia associata alla membrana interna o esterna dell'acrosoma.

Figura 4.8

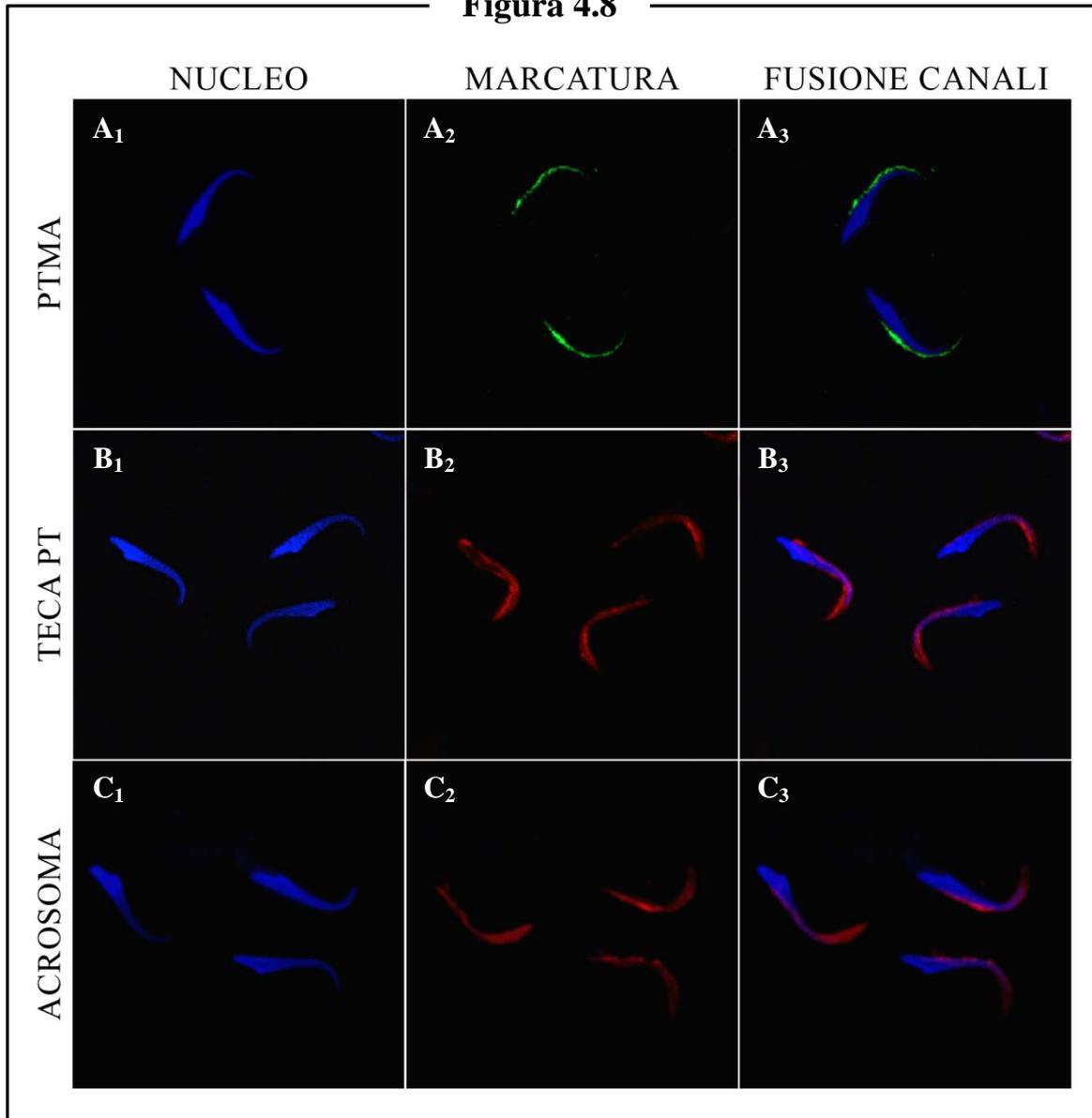


Fig. 4.8 - Marcatura di PTMA, teca perinucleare e acrosoma, mediante IF su spermatozoi epididimali di ratto. 4.8A - IF per PTMA, eseguita impiegando un abI contro l'N-terminale della molecola. L'abII è associato ad Alexa Fluor 488, fluorescente nel verde (A₂ e A₃). 4.8B - IF per la TP, eseguita con un abI contro le proteine della regione subacrosomale. L'abII è associato ad Alexa Fluor 568, fluorescente nel rosso (B₂ e B₃). 4.8C - IF per l'acrosoma, effettuata tramite marcatura con PNA lectina, coniugata con Alexa Fluor 568.

In tutte le immagini il nucleo (A₁, B₁, C₁) è stato marcato tramite DAPI, contenuto nel mezzo montante VectaShield. Le foto sono state scattate al microscopio ottico, a ingrandimento di 100x.

Figura 4.9

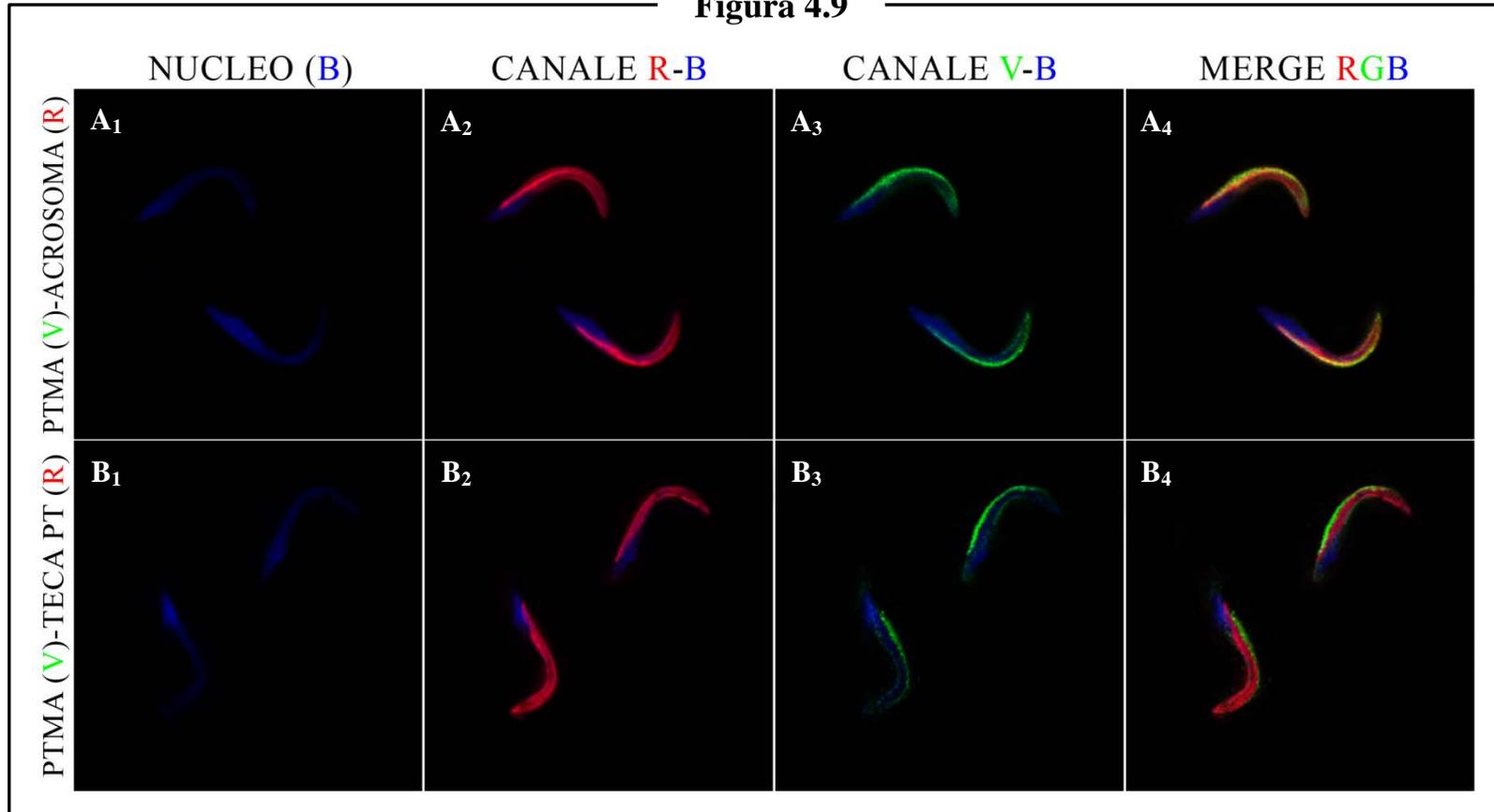


Fig. 4.9 - Co-localizzazione di PTMA (V) con le proteine della teca (TECA PT, R) e con l'acrosoma (PNA lectina, R) su eSPZ di ratto.

4.9A - IF doppia per PTMA e acrosoma: il segnale di PTMA, in verde (A₃, A₄) interessa la regione acrosomale (A₂, A₄, in rosso): le regioni sono sovrapposte per tutta la lunghezza della curva dorsale prodotta dall'acrosoma. **4.9B** - IF doppia per PTMA e TP: PTMA (B₃, B₄, in verde) e le proteine della teca (B₂, B₄, in rosso) non co-localizzano: il segnale di PTMA è esterno alla regione della teca. I dati supportano l'ipotesi acrosomale.

Tutte le immagini sono state scattate al microscopio confocale, all'ingrandimento di 63x. Il nucleo è stato marcato tramite TO-PRO-3.

4.6 - Analisi di localizzazione e co-localizzazione di PTMA tramite immunofluorescenza (IF) su SPZ di uomo

In base ai risultati ottenuti, l'analisi di IF è stata estesa all'uomo, studiando la conservazione della localizzazione subcellulare di PTMA negli spermatozoi maturi. Come detto in precedenza, la peculiare morfologia allungata dei gameti di ratto (**Fig.4.7E**) è la manifestazione di una struttura specializzata e presenta regioni parzialmente sovrapposte. Malgrado l'analoga complessità strutturale, le dimensioni degli SPZ di uomo sono ridotte, e la forma è arrotondata e meno appiattita. Questi fattori possono portare ulteriori difficoltà nell'analisi della sublocalizzazione, dato che le regioni di interesse potrebbero apparire ancora più avviluppate le une alle altre e, quindi, non essere spazialmente distinguibili in uno studio di microscopia confocale. E' stato, comunque, seguito lo stesso procedimento operato per gli eSPZ di ratto, innanzitutto testando la tecnica tramite IF singole (**Fig. 4.10**); l'esperimento ha confermato la marcatura nelle regioni di interesse, e ha permesso di procedere con l'analisi di co-localizzazione PTMA-Acrosoma (**Fig. 4.11 A**) e PTMA-Teca (**Fig. 4.11 B**). I risultati preliminari mostrano che, effettivamente, il pattern è coerente con quanto determinato in ratto: nonostante le maggiori difficoltà di osservazione si evidenzia che PTMA è localizzata a livello dell'acrosoma, e che non interessa la regione occupata dalla teca perinucleare (**Fig. 4.11**).

Figura 4.10

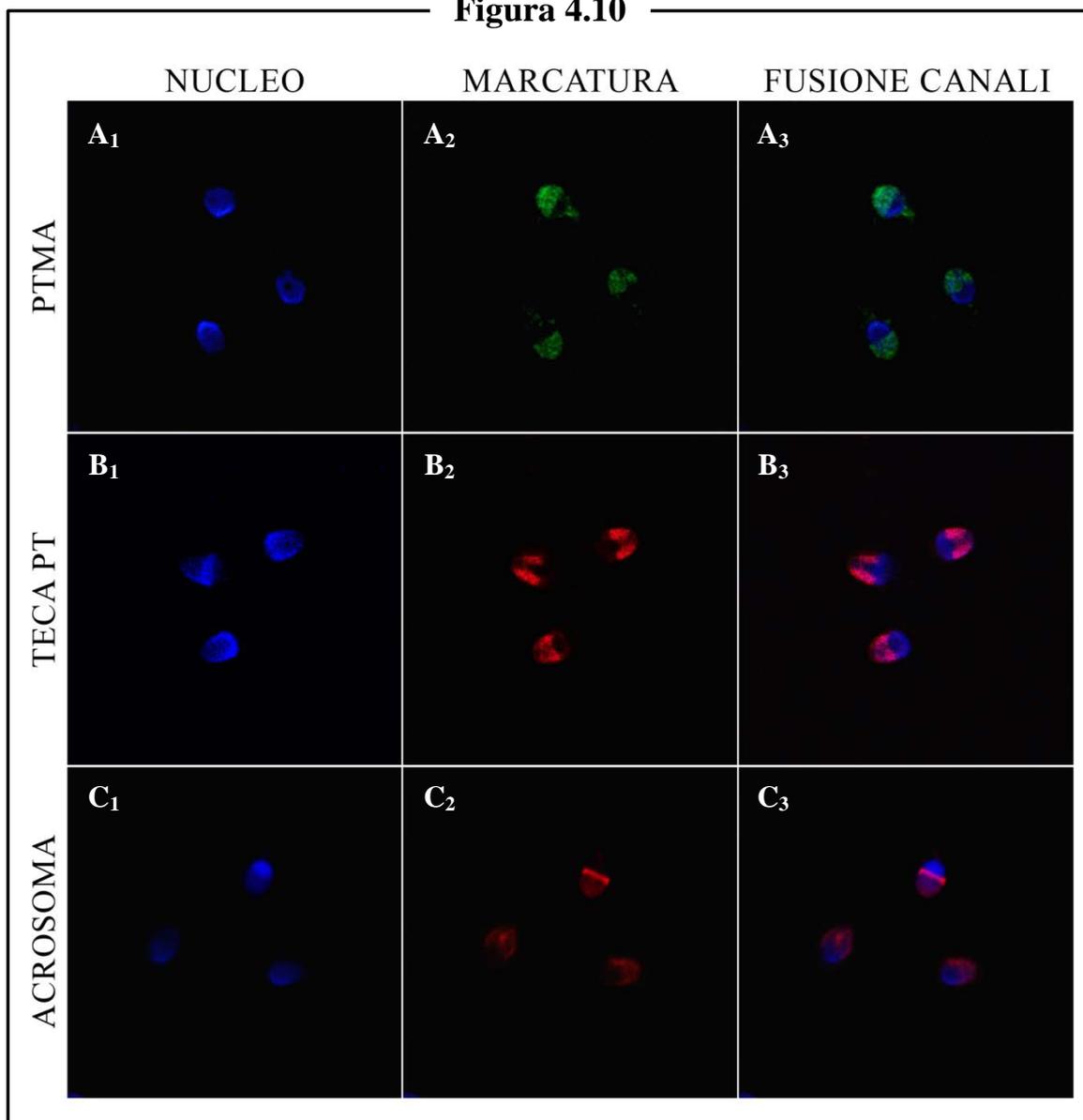


Fig. 4.10 - Marcatura di PTMA, teca perinucleare e acrosoma, mediante IF su spermatozoi di uomo.
4.10A - IF per PTMA, eseguita impiegando un abI contro l'N-terminale della molecola. L'abII è associato ad Alexa Fluor 488, fluorescente nel verde (**A₂** e **A₃**). **4.10B** - IF per la TP, eseguita con un abI contro le proteine della regione subacrosomale. L'abII è associato ad Alexa Fluor 568, fluorescente nel rosso (**B₂** e **B₃**). **4.10C** - IF per l'acrosoma, effettuata tramite marcatura con PNA lectina, coniugata con Alexa Fluor 568.

In tutte le immagini il nucleo (**A₁**, **B₁**, **C₁**) è stato marcato tramite DAPI, contenuto nel mezzo montante VectaShield. Le foto sono state scattate al microscopio ottico, a ingrandimento di 100x.

Figura 4.11

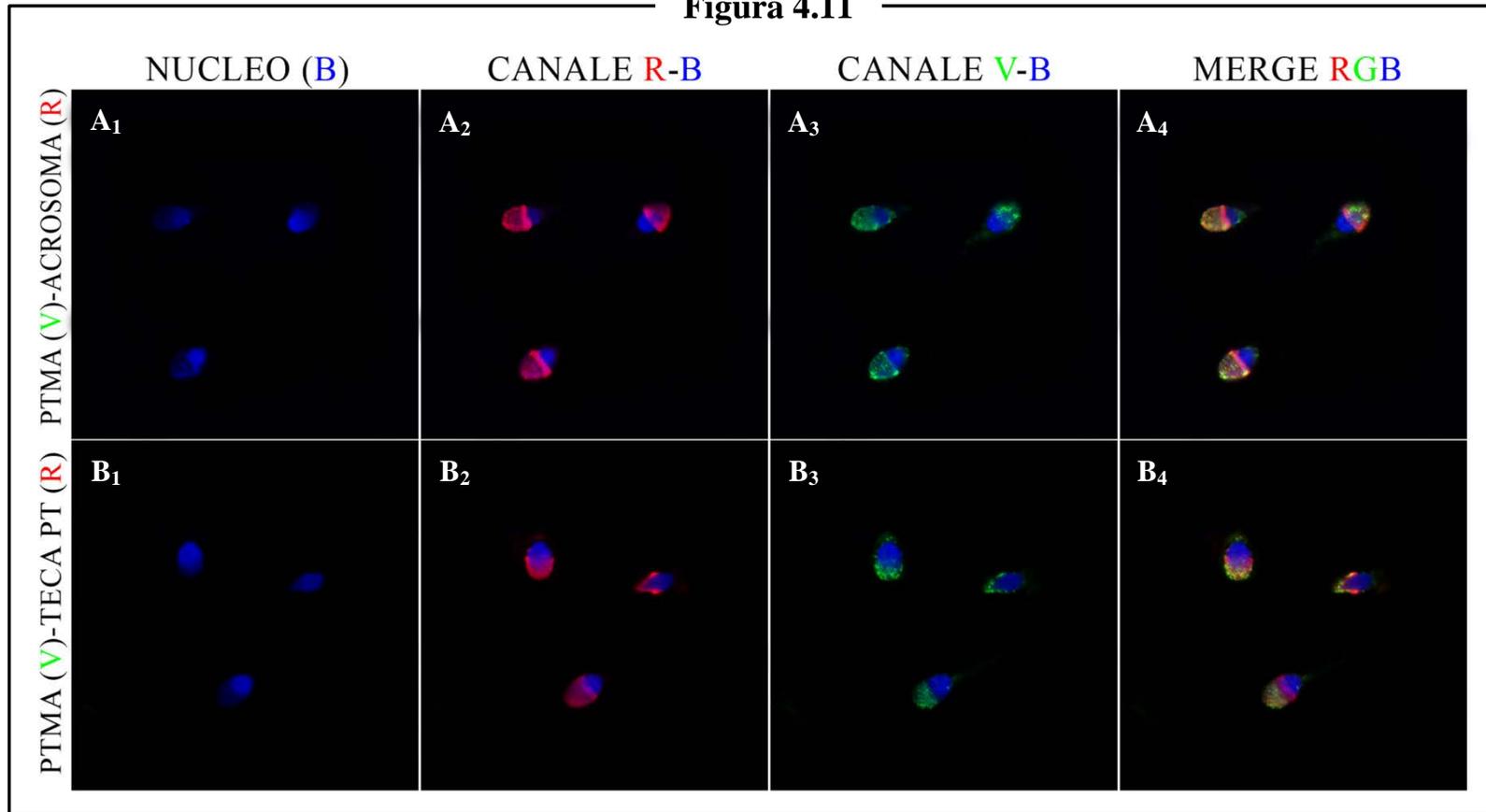


Fig. 4.11 - Co-localizzazione di PTMA (V) con le proteine della teca (TECA PT, R) e con l'acrosoma (PNA lectina, R) su SPZ di uomo.

4.11A - *IF doppia per PTMA e acrosoma*: il segnale di PTMA, in verde (A₃, A₄) interessa la regione acrosomale (A₂, A₄, in rosso): si nota la colorazione giallo-arancione, intermedia tra la marcatura rossa e verde (A₄). **4.11B** - *IF doppia per PTMA e TP*: PTMA (B₃, B₄, in verde) e le proteine della teca (B₂, B₄, in rosso) non mostrano co-localizzazione. Le immagini avvalorano le osservazioni effettuate su ratto.

Tutte le immagini sono state scattate al microscopio confocale, all'ingrandimento di 63x. Il nucleo è stato marcato tramite TO-PRO-3.

5. Discussione e Conclusioni

La protimosina (PTMA) rappresenta certamente un enigma, data la varietà di funzioni e processi in cui è stata identificata. Il gruppo con cui ho svolto l'attività di ricerca, da sempre impegnato nello studio degli eventi e dei fattori molecolari che hanno un ruolo nei processi riproduttivi, si è occupato, in precedenza, di PTMA durante la gametogenesi degli Anfibi, dimostrando l'associazione del messaggero e della proteina alle fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi di *Rana esculenta* (Aniello *et al.*, 2002; Ferrara *et al.*, 2009). Nel presente lavoro di tesi, nell'intento di estendere tali studi ai Mammiferi, è stata compiuta l'analisi dell'espressione della molecola nel testicolo e nei gameti di *Rattus norvegicus*, effettuando anche delle osservazioni preliminari sugli spermatozoi (SPZ) umani.

Partendo dalla verifica della presenza del trascritto e della proteina in testicoli di ratto, ci si è dedicati allo studio della loro espressione durante lo sviluppo postnatale, quando l'attività spermatogenetica porta all'arricchimento progressivo dei tubuli con i tipi di cellule germinali di nuova formazione (Clermont e Perey, 1957).

In ratto la prima ondata spermatogenetica, caratterizzata dal primo completamento dei processi differenziativi degli SPG in SPZ, si verifica entro la sesta settimana dopo la nascita. In particolare, dopo un periodo di piena attività mitotica, la lunga profase della meiosi I inizia 9-12 giorni dopo la nascita e i primi SPC in pachitene sono osservabili intorno al 15° giorno. La meiosi II si verifica a 26 dpp, seguita dall'inizio della spermiogenesi, che porta gli SPT aploidi a differenziarsi in SPZ, i quali compaiono intorno ai 45-50 giorni dopo la nascita. Nell'interesse di valorizzare l'analisi di tipo comparato tra anfibi e mammiferi, si è, quindi, scelto di concentrare gli studi su testicoli di ratti a 27, 35,

e 60 dpp, per analizzare con maggiore attenzione rispettivamente gli SPC, gli SPT, e gli SPZ.

E' stato rilevato che l'espressione del trascritto di *Ptma* subisce una riduzione statisticamente significativa durante lo sviluppo, dal tempo iniziale di 27 dpp a quello di 60 dpp, ed è stato determinato che esso è sempre localizzato nei tubuli, a livello delle GC dagli SPC I in pachitene agli SPT rotondi, oltre che nelle PMC e nell'interstizio, a livello delle LC. I dati di localizzazione per mezzo di ibridazione *in situ* possono spiegare la diminuzione dei livelli di messaggero durante la maturazione della gonade: *Ptma* è identificabile sempre ed esclusivamente negli stessi tipi cellulari, nonostante la comparsa progressiva nei tubuli di CG aploidi a diversi stadi del differenziamento. Ciò si traduce in un numero relativo inferiore di CG che esprimono l'mRNA nel testicolo di ratto adulto rispetto ai tempi di sviluppo precedenti e, quindi, nella "diluizione" valutata con l'analisi di PCR.

Le indagini sono proseguite indirizzandosi al prodotto proteico. E' stato osservato un significativo decremento di PTMA da 27 dpp ai tempi successivi e, anche in questo caso, l'interpretazione dei dati è stata possibile sulla base dell'analisi di localizzazione, effettuata per immunostochimica: a 27 dpp PTMA è presente negli stessi tipi cellulari che esprimono il trascritto, mentre a 35 e a 60 dpp non è più rilevabile a livello degli SPC I, ma solo nelle cellule aploidi, determinando una riduzione complessiva dei livelli della molecola.

E' interessante notare che a 35 e 60 dpp vi è un ritardo tra l'espressione del messaggero, già rilevabile negli SPC I in pachitene, e la comparsa della proteina, che avviene a partire dagli SPT in differenziamento: il fenomeno non è inusuale per i Mammiferi, in quanto durante la spermiogenesi le CG caratterizzate dalla presenza di

euromatina, come gli SPC e gli SPT rotondi, presentano una elevata attività trascrizionale che diminuisce con la condensazione del materiale genetico, la quale avviene durante il differenziamento degli SPT, simultaneamente all'elongazione del nucleo (Kierszenbaum e Tres 1975). Nello specifico si è visto che negli SPC in pachitene e negli SPT rotondi si verificano rispettivamente due ondate di sintesi di messaggeri, impiegati per la traduzione di proteine facenti parte delle strutture degli SPT in differenziamento e, infine, dello SPZ (Monesi *et al.*, 1978).

I dati appena esposti hanno permesso di confermare nel ratto l'associazione di PTMA alle fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi, e le analisi di immunoistochimica hanno evidenziato che, nel citoplasma delle cellule aploidi in differenziamento, la molecola è localizzata a livello del sistema acrosomale in formazione. E' risaputo che la biogenesi dell'acrosoma è un processo complesso in atto durante tutta la spermiogenesi, e non è facile determinare quale possa essere il ruolo di PTMA nella sua attuazione. Non è escluso che il polipeptide, se localizzato in complessi a ridosso delle membrane dei granuli proacrosomici o della vescicola acrosomale, possa essere importante durante le fasi di interazione con le proteine della teca, che hanno l'importante compito di indirizzare l'acrosoma alla sua destinazione perinucleare (Oko e Sutowsky 2009); l'incerta localizzazione subcellulare di PTMA durante la spermiogenesi non consente, tra l'altro, di escludere che essa vada infine a far parte del contenuto solubile dell'organello, e che possa essere importante per la sua omeostasi.

E' altresì probabile che PTMA sia prodotta durante il differenziamento per svolgere la sua funzione a livello dello spermatozoo maturo. I dati ottenuti hanno permesso di confermare, per la prima volta, che la proteina mantiene la sua localizzazione anche negli SPZ epididimali di ratto (Ferrara *et al.*, 2010), e negli SPZ di uomo. PTMA è certamente associata all'acrosoma e, per mezzo di IF doppie, è stato possibile escludere la sua

presenza nella teca perinucleare. Anche in questo caso è difficile definire il potenziale ruolo di PTMA nella testa dello SPZ, ma è certamente affascinante ipotizzare una sua azione durante la fecondazione, data l'importanza critica dell'acrosoma per il compimento di tale processo. Si otterrà maggiore chiarezza una volta definito se PTMA faccia parte del contenuto vescicolare disperso durante la reazione acrosomale, o se sia disposta a livello della membrana interna dell'acrosoma, preservata fino alla fusione spermatozoo-uovo. A tal proposito, è utile ricordare la partecipazione di PTMA nei fenomeni di rimodellamento della cromatina nelle cellule somatiche (Gómez-Márquez e Rodríguez 1998; Subramanian *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2003), ma soprattutto la sua capacità di decondensare *in vitro* la cromatina degli spermatozoi umani (Karetsou *et al.*, 2004), cosa che consente di speculare sulla possibilità che la molecola agisca nei fenomeni di decompattazione del materiale genetico maschile una volta penetrati nella cellula uovo.

Per quanto riguarda gli altri tipi cellulari immunopositivi, al momento non ci sono elementi di rilievo per giudicare quale sia la loro relazione con la presenza di PTMA. Complessivamente, le nostre osservazioni fanno pensare che la proteina non sia direttamente correlata ai meccanismi di divisione meiotica, bensì ai processi in atto sin dalla comparsa dei primi SPC durante lo sviluppo postnatale, fino al differenziamento e alla maturazione degli SPT in SPZ.

In conclusione, l'associazione del trascritto e del prodotto proteico di *Ptma* alle fasi meiotiche e post-meiotiche durante la spermatogenesi dei Mammiferi, e la preservazione della localizzazione della proteina a livello della testa degli SPZ di ratto e di uomo suggeriscono fortemente, per la prima volta, che la molecola abbia un ruolo negli processi di maturazione dei gameti maschili, nonché nella funzionalità dello spermatozoo durante la singamia. Se le nostre ipotesi saranno confermate le prossime ricerche potrebbero essere rivolte allo studio del destino di PTMA proprio durante gli eventi della fecondazione.

6. Bibliografía

- Adams MD, Kerlavage AR, Fleischmann RD, Fuldner RA, Bult CJ, Lee NH, Kirkness EF, Weinstock KG, Gocayne JD, White O, et al.** 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *377*:3-174
- Aniello F, Branno M, De Rienzo G, Ferrara D, Palmiero C, Minucci S.** 2002. First evidence of prothymosin alpha in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. *Mech Dev.* 110:213-7
- Barbini L, Gonzalez R, Dominguez F, Vega F.** 2006. Apoptotic and proliferating hepatocytes differ in prothymosin alpha expression and cell localization. *Mol Cell Biochem.* 291:83-91
- Barcia MG, Castro JM, Jullien CD, Freire M.** 1993. Prothymosin alpha is phosphorylated in proliferating stimulated cells. *J Biol Chem.* 268:4704-8
- Baxevanis CN, Reclos GJ, Panneerselvam C, Papamichail M.** 1988. Enhancement of human T lymphocyte functions by prothymosin alpha. I. Augmentation of mixed lymphocyte culture reactions and soluble protein-induced proliferative responses. *Immunopharmacology.* 15:73-84
- Baxevanis CN, Thanos D, Reclos GJ, Anastasopoulos E, Tsokos GC, Papamatheakis J, Papamichail M.** 1992. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J Immunol.* 148:1979-84
- Bellvé AR.** 1988. Purification and characterization of mouse protamines P1 and p2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry* 27:2890-97
- Bianco NR, Montano MM.** 2002. Regulation of prothymosin alpha by estrogen receptor alpha: molecular mechanisms and relevance in estrogen-mediated breast cell growth. *Oncogene* 2002. 21:5233-44. Erratum in *Oncogene* 2002. 21:8221
- Boán F, Viñas A, Buceta M, Domínguez F, Sánchez L, Gómez-Márquez J.** 2001. Prothymosin alpha, a mammalian c-myc-regulated acidic nuclear protein, provokes the decondensation of human chromosomes in vitro. *93*:171-4
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R.** 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 277:38895-900
- Caldarella J, Goodall GJ, Felix AM, Heimer EP, Salvin SB, Horecker BL.** 1983. Thymosin alpha 11: a peptide related to thymosin alpha 1 isolated from calf thymosin fraction 5. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:7424-7

- Clermont Y, Perey B.** 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *AM J Anat.* 100:241-267
- Clermont Y, Tang XM.** 1985. Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anat Rec*213:33-43.
- Clermont Y.** 1966. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat.* 118:509-24
- Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Panneerselvam C, Horecker BL.** 1989. Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. *Arch Biochem Biophys.* 269:256-63
- Cotter MA 2nd, Robertson ES.** 2000. Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of epstein-barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Mol Cell Biol.* 20:5722-35
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidi K.** 1990. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res.* 262:254-61
- Davidoff MS, Shulze W, Middendorff R, Holstein AF.** 1993. The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* 271:429-39.
- De Rienzo G, Di Sena R, Ferrara D, Palmiero C, Chieffi Baccari G, Minucci S.** 2002. Temporal and spatial localization of prothymosin alpha transcript in the Harderian gland of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool.* 292:633-9
- Deurdulian C, Mittelstaedt CA, Chong WK, Fielding JR.** 2007. US of acute scrotal trauma: optimal technique, imaging findings, and management. *Radiographics* 27:357-69
- Díaz-Jullien C, Pérez-Estévez A, Covelo G, Freire M.** 1996. Prothymosin alpha binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochim Biophys Acta.* 1296:219-27
- Dominguez F, Magdalena C, Cancio E, Roson E, Paredes J, Loidi L, Zalvide J, Fraga M, Forteza J, Regueiro BJ, et al.** 1993. Tissue concentrations of prothymosin alpha: a novel proliferation index of primary breast cancer. *Eur J Cancer.* 29A:893-7
- Donizetti A, Liccardo D, Esposito D, Del Gaudio R, Locascio A, Ferrara D, Minucci S, Aniello F.** 2008. Differential expression of duplicated genes for prothymosin alpha during zebrafish development. *Dev Dyn.* 237:1112-8
- Dosil M, Freire M, Gómez-Márquez J.** 1990. Tissue-specific and differential expression of prothymosin alpha gene during rat development. *FEBS Lett.* 269:373-6
- Dym M, Fawcett DW.** 1971. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod.* 4:195-215

- Earnshaw WC.** 1987. Anionic regions in nuclear proteins. *J Cell Biol.* 105:1479-82
- Eddy E, O'Brien DA.** 1994. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press. 29-77
- Enkemann SA, Wang RH, Trumbore MW, Berger SL.** 2000a. Functional discontinuities in prothymosin alpha caused by caspase cleavage in apoptotic cells. *J Cell Physiol.* 182:256-68
- Enkemann SA, Ward RD, Berger SL.** 2000b. Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of prothymosin-alpha. 48:1341-55
- Eschenfeldt WH, Manrow RE, Krug MS, Berger SL.** 1989. Isolation and partial sequencing of the human prothymosin alpha gene family. Evidence against export of the gene products. *J Biol Chem.* 264:7546-55
- Evstaf'eva AG, Karapetian RN, Rubtsov IuP, Filonov GS, Abaeva IS, Fateeva TV, Mel'nikov SV, Chichkova NV, Vartapetian AB.** 2005 [Novel functions of the well-known protein--prothymosin alpha is involved in protection of cells against apoptosis and oxidative stress]. [Article in Russian]. *Mol Biol (Mosk).* 39:729-45
- Evstafieva AG, Belov GA, Rubtsov YP, Kalkum M, Joseph B, Chichkova NV, Sukhacheva EA, Bogdanov AA, Pettersson RF, Agol VI, Vartapetian AB.** 2003. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res.* 284:211-23
- Ferrara D, Izzo G, Liguori L, d'Istria M, Aniello F, Minucci S.** 2009. Evidence for the involvement of prothymosin alpha in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 311: 1-10
- Ferrara D, Izzo G, Pariante P, Donizetti A, d'Istria M, Aniello F, Minucci S.** 2010. Expression of prothymosin alpha in meiotic and post-meiotic germ cells during the first wave of rat spermatogenesis. *J Cell Physiol.* 224:362-8
- Fouquet JP, Kann ML.** 1994. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol Cell.* 81:89-93
- Frangou-Lazaridis M, Clinton M, Goodall GJ, Horecker BL.** 1988. Prothymosin alpha and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs. *Arch Biochem Biophys.* 263:305-10
- Garbin F, Eckert K, Immenschuh P, Kreuser ED, Maurer HR.** 1997. Prothymosin alpha 1 effects, in vitro, on the antitumor activity and cytokine production of blood monocytes from colorectal tumor patients. *Int J Immunopharmacol.* 19:323-32
- Gast K, Damaschun H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR, Müller-Frohne M, Zirwer D, Czarnecki J, Damaschun G.** 1995. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry.* 34:13211-8

- Gaubatz S, Meichle A, Eilers M.** 1994. An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Mol Cell Biol.* 14:3853-62
- George EM, Brown DT.** 2010. Prothymosin alpha is a component of a linker histone chaperone. *FEBS Lett.* 584:2833-6
- Golan R, Cooper TG, Oschry Y, Oberpenning F, Schulze H, Shochat L, Lewin LM.** 1996. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod* 11:1457-62
- Goldstein A, White A.** 1970. The thymus as endocrine gland. In: G Litwack editors. *Biochemical Actions of Hormones.* New York: Academic Press
- Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA, White A.** 1972. Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69:1800-3
- Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, Lai CY, Chang D, Wang SS, Harvey C, Ramel AH, Meienhofer J.** 1977. Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74:725-9.
- Goldstein AL, Stater FD, White A.** 1966. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopenic factor (thymosin). *Proc Nat Acad Sci USA.* 56:1010-17
- Goldstein AL, Thurman GB, Cohen GH, Hooper JA.** 1975. Thymosin chemistry, biology and clinical applications. In: Van Bekkum DW editors. *Biological Activity of Thymic Hormones.* Rotterdam: Kooyker Scientific Pub. pp 173-197
- Gómez-Márquez J, Rodríguez P.** 1998. Prothymosin alpha is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells. *Biochem J.* 333:1-3
- Gómez-Márquez J.** 2007. Function of prothymosin alpha in chromatin decondensation and expression of thymosin beta-4 linked to angiogenesis and synaptic plasticity. *Ann N Y Acad Sci.* 1112:201-9
- Goodall GJ, Dominguez F, Horecker BL.** 1986. Molecular cloning of cDNA for human prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:8926-8
- Gregoire C, Duchateau G.** 1956. A study on lympho-epithelial symbiosis in thymus; reactions on the lymphatic tissue to extracts and to implants of epithelial components of thymus. *Arch Biol (Liege).* 67:269-96
- Guan J.** 2009. Mammalian sperm flagella and cilia. Published by Karolinska Institutet.
- Hannappel E, Huff T.** 2003. The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: structure and function. *Vitam Horm.* 66:257-96

- Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL.** 1984a. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:1008-11
- Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL.** 1984b. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:1391-3
- Hess RA.** 1998. Spermatogenesis, overview. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction* vol.4, San Diego: Academic Press. pp 539-545
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS.** 1996. Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogenous phenotype. *Arch Histol Cytol.* 59:109-125
- Hooper JA, McDaniel MC, Thurman GB, Cohen GH, Schulof RS, Goldstein AL.** 1975. Purification and properties of bovine thymosin. *Ann N Y Acad Sci.* 249:125-44
- Hud NV, Allen Mj, Downing KH, Lee J, Balhorn R.** 1993. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1347-54
- Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X.** 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science.* 299:223-6
- Johnson GD, Lalancette C, Linnermann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA.** 2011. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. 141:21-36
- Karetsou Z, Kretsovali A, Murphy C, Tsolas O, Papamarcaki T.** 2002. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep.* 3:361-6
- Karetsou Z, Martic G, Tavoulari S, Christoforidis S, Wilm M, Gruss C, Papamarcaki T.** 2004. Prothymosin alpha associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation. *FEBS Lett.* 577:496-500
- Karetsou Z, Sandaltzopoulos R, Frangou-Lazaridis M, Lai CY, Tsolas O, Becker PB, Papamarcaki T.** 1998. Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res.* 26:3111-8
- Kelly K, Siebenlist U.** 1986. The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells. *Annu Rev Immunol.* 4:317-38
- Kierszenbaum AL, Tres LL.** 1975. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol.* 65:258-70
- Kim KS, Cha MC, Gerton GL.** 2001a. Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol Reprod* 64:36-43

- Kim KS, Foster JA, Gerton GL.** 2001b. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod* 64:148-156
- Kimmins S, Sassone-Corsi P.** 2005. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434:583-589
- Klein JJ, Goldstein AL, White A.** 1966. Effects of the thymus lymphocytopoietic factor. *Ann N Y Acad Sci.* 135:485-95.
- Knight JS, Lan K, Subramanian C, Robertson ES.** 2003. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J Virol.* 77:4261-72
- Kobayashi T, Wang T, Maezawa M, Kobayashi M, Ohnishi S, Hatanaka K, Hige S, Shimizu Y, Kato M, Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Hasegawa K, Tanaka Y, Brachmann RK.** 2006. Overexpression of the oncoprotein prothymosin alpha triggers a p53 response that involves p53 acetylation. *Cancer Res.* 66:3137-44
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R.** 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 55:789-95
- Kurtz K, Martinez-Soler F, Ausio J, Chiva M.** 2007. Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J Cell Biochem* 102:1432-41
- Letsas KP, Frangou-Lazaridis M, Skyrilas A, Tsatsoulis A, Malamou-Mitsi V.** 2005. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Int.* 55:694-702
- Low TL, Goldstein AL.** 1985. Thymosin alpha 1 and polypeptide beta 1. *Methods Enzymol.* 116:233-48
- Magdalena C, Dominguez F, Loidi L, Puente JL.** 2000. Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer* 82:584-90
- Malicet C, Giroux V, Vasseur S, Dagorn JC, Neira JL, Iovanna JL.** 2006. Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:2671-6
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ER.** 2006. Sperm design and sperm function. *Biol Lett.* 2:246-9
- Manrow RE, Berger SL.** 1993. GAG triplets as splice acceptors of last resort. An unusual form of alternative splicing in prothymosin alpha pre-mRNA. *J Mol Biol.* 234:281-8
- Manrow RE, Leone A, Krug MS, Eschenfeldt WH, Berger SL.** 1992. The human prothymosin alpha gene family contains several processed pseudogenes lacking deleterious lesions. *Genomics* 13:319-31.

- Martini PG, Delage-Mourroux R, Kraichely DM, Katzenellenbogen BS.** 2000. Prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Mol Cell Biol.* 20:6224-32
- Martini PG, Katzenellenbogen BS.** 2003. Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85:117-22
- Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS.** 2002. The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metabol* 87:3486-99
- Monesi V, Geremia R, D'Agostino A, Boitani C.** 1978. Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals: RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. *Curr Top Dev Biol.* 12:11-36
- Moody TW, Leyton J, Zia F, Tuthill C, Badamchian M, Goldstein AL.** 2000. Thymosinalpha1 is chemopreventive for lung adenoma formation in A/J mice. *Cancer Lett* 155: 121-7
- Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, Jessup JM, Steele GD Jr, Chen LB.** 1993. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene.* 8:2821-6
- Mosoian A, Teixeira A, Burns CS, Khitrov G, Zhang W, Gusella L, Klotman P, Klotman M.** 2007. Influence of prothymosin-alpha on HIV-1 target cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1112:269-85
- Mosoian A, Teixeira A, High AA, Christian RE, Hunt DF, Shabanowitz J, Liu X, Klotman M.** 2006. Novel function of prothymosin alpha as a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary macrophages. *J Virol.* 80:9200-6
- Mosoian A.** 2011. Intracellular and extracellular cytokine-like functions of prothymosin α : implications for the development of immunotherapies. *Future Med Chem.* 3:1199-208.
- Oko R, Clermont Y.** 1998. Spermiogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. editors. *Encyclopedia of Reproduction.* San Diego: Academic Press. pp 602-609.
- Oko R, Maravei D.** 1994. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod* 50:1000-1014.
- Oko R, Sutovsky P.** 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol* 83:2-7
- Oko R.** 1995. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 7:777-797

- Orre RS, Cotter MA 2nd, Subramanian C, Robertson ES.** 2001. Prothymosin alpha functions as a cellular oncoprotein by inducing transformation of rodent fibroblasts in vitro. *J Biol Chem.* 276:1794-9
- Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S, Salvin SB, Horecker BL.** 1986. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys.* 250:197-201
- Papamarcaki T, Tsolas O.** 1994. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett.* 345:71-5
- Pereira-Leal JB, Seabra M.C.** 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313:889-901.
- Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M.** 2000. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides.* 21:1433-46
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin K, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S.** 2003. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 23:5354-65
- Prisco M, Donizetti A, Aniello F, Locascio A, Del Giudice G, Agnese M, Angelini F, Andreuccetti P.** 2009. Expression of Prothymosin alpha during the spermatogenesis of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Gen Comp Endocrinol.* 164:70-6
- Qiu L, Guo BY, Miao H, Dao SY, Zhang R, Yuan PQ, Yang X.** 2002. [Effect of recombinant prothymosin alpha on secretion of IFN-gamma, IFN-alpha and TNF-alpha in vitro]. [Article in Chinese]. *Yao Xue Xue Bao.* 37:326-8
- Rathke C, Barkmann B, Burkhard S, Jayaramaiah-Raja S, Roote J, Renkawitz-Pohl R.** 2010. Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *Eur J Cell Biol* 89:326-38
- Reclos GJ, Baxevanis CN, Sfagos C, Papageorgiou C, Tsokos GC, Papamichail M.** Multiple sclerosis: II. Effects of prothymosin alpha on the autologous and allogeneic MLR in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 70:336-44
- Roberts S, White A.** 1949. Biochemical characterization of lymphoid tissue proteins. *J Biol Chem.* 178:151-62
- Rodríguez P, Viñuela JE, Alvarez-Fernández L, Buceta M, Vidal A, Domínguez F, Gómez-Márquez J.** 1998. Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells. *Biochem J.* 331:753-61
- Romani L, Bistoni F, Gaziano R, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Pitzurra L, Bellocchio S, Velardi A, Rasi G, Di Francesco P, Garaci E.** 2004. Thymosin alpha 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through toll-like receptor signaling. *Blood.* 103:4232-9

- Rosón E, Gallego R, García-Caballero T, Heimer EP, Felix AM, Domínguez F.** 1990. Prothymosin alpha expression is associated to cell division in rat testis. *Histochemistry*. 94:597-9
- Rousseaux S, Ferro M.** 2009. Epigenetics of spermiogenesis combining *in silico* and proteomic approaches in the mouse model. In *Bioinformatics for system biology 2nd ed.*, SA Krawetz editors. New York: Humana Press. pp 106-117
- Rubtsov IuP, Vartapetian AB.** 1995. [New intronless members of human prothymosin alpha genes]. [Article in Russian]. *Mol Biol (Mosk)*. 29:1320-5
- Russell LD, Griswold MD.** 1993. The Sertoli Cell. Cache River Press, Clearwater FL. *Mol Reprod Dev* 36:517
- Sarandeses CS, Covelo G, D Díaz-Jullien C, Freire M.** 2003. Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem*. 278:13286-93
- Sburlati AR, De La Rosa A, Batey DW, Kurys GL, Manrow RE, Pannell LK, Martin BM, Sheeley DM, Berger SL.** 1993. Phosphorylation of human and bovine prothymosin alpha in vivo. *Biochemistry*. 32:4587-96
- Sburlati AR, Manrow RE, Berger SL.** 1991. Prothymosin alpha antisense oligomers inhibit myeloma cell division. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:253-7.
- Schulof RS, Goldstein AL.** 1981. In: Hadden JW, Stewart WR editors. *The Lymphokines, Biochemistry and Biological Activity*. Clinton, NJ: Humana Press. pp 397-423
- Skopeliti M, Iconomidou VA, Derhovanessian E, Pawelec G, Voelter W, Kalbacher H, Hamodrakas SJ, Tsitsilonis OE.** 2009. Prothymosin alpha immunoreactive carboxyl-terminal peptide TTKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol*. 46:784-92
- Skopeliti M, Voutsas IF, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Bamias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Voelter W, Tsitsilonis OE.** 2006a. The immunologically active site of prothymosin alpha is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 55:1247-57
- Subramanian C, Hasan S, Rowe M, Hottiger M, Orre R, Robertson ES.** 2002. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol*. 76:4699-708
- Suzuki S, Takahashi S, Takahashi S, Takeshita K, Hikosaka A, Wakita T, Nishiyama N, Fujita T, Okamura T, Shirai T.** 2006. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate*. 66:463-9

- Szabo P, Panneerselvam C, Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Weksler D, Whittington E, Macera MJ, Grzeschik KH, Selvakumar A, Horecker BL.** 1993. Prothymosin alpha gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Human Genet.* 90:629-34
- Tang XM, Lalli MF, Clermont Y.** 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Am J Anat* 163: 283-294
- Thorne-Tjomsland G, Clermont Y, Hermo L.** 1988. Contribution of the Golgi apparatus components to the formation of the acrosomic system and chromatoid body in rat spermatids. *Anat Rec* 221:591-598
- Thurman A, Ahmed A, Strong M, Gershwin ME, Steinberg AD, Goldstein AL.** 1975. Thymosin induced increase in mitogenic responsiveness of C57BL/6J, NZB/W, and nude mice. *Trans Proc* 7:299-303
- Trumbore MW, Manrow RE, Berger SL.** 1998. Prothymosin alpha is not found in yeast. *Protein Expr Purif.* 1998 13:383-8
- Trumbore MW, Wang RH, Enkemann SA, Berger SL.** 1997. Prothymosin alpha in vivo contains phosphorylated glutamic acid residues. *J Biol Chem.* 272:26394-404
- Tsai YS, Jou YC, Lee GF, Chen YC, Shiau AL, Tsai HT, Wu CL, Tzai TS.** 2009. Aberrant prothymosin-alpha expression in human bladder cancer. *Urology.* 73:188-92
- Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W, et al.** 1993. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:9504-7
- Ueda H, Matsunaga H, Uchida H, Ueda M.** 2010. Prothymosin alpha as robustness molecule against ischemic stress to brain and retina. *Ann Ny Acad Sci.* 1194:20-6
- Ueda H.** 2008. Prothymosin alpha plays a key role in cell death mode-switch, a new concept for neuroprotective mechanisms in stroke. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 377:315-23.
- Ueda H.** 2009. Prothymosin alpha and cell death mode switch, a novel target for the prevention of cerebral ischemia-induced damage. *Pharmacol Ther.* 123:32333
- Vareli K, Tsolas O, Frangou-Lazaridis M.** 1996. Regulation of prothymosin alpha during the cell cycle. *Eur J Biochem* 238:799-806
- Voutsas IF, Baxevanis CN, Gritzapis AD, Missitzis I, Stathopoulos GP, Archodakis G, Banis C, Voelter W, Papamichail M.** 2000. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 49:449-58

- Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T, Fuqua SA, Lopez GN, Kushner PJ, Pestell RG.** 2001. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem.* 276:18375-83
- Wang M, Pan JY.** 2007. Prothymosin alpha and tumor: current status and perspective. *Chin J Cancer.* 26:333-336
- Wassarman PM.** 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96:175-183
- Wu CG, Boers W, Reitsma PR, van Deventer SJ, Chamuleau RA.** 1997. Overexpression of prothymosin alpha, concomitant with c-myc, during rat hepatic carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 232:817-21
- Wu CG, Habib NA, Mitry RR, Reitsma PH, van Deventer SJ, Chamuleau RA.** 1997. Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 76:1199-204
- Wykes SM, Krawetz SA.** 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 278:29471-7
- Yanagimachi R.** 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press. pp 189-317
- Yoshinaga K, Toshimori K.** 2003. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech.* 61:39-45
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ.** 2000. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *14:981-93*
- Zlatanova J, van Holde K.** 1996. The linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 52:217-59