



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorziata: Seconda Università degli Studi di Napoli

Dipartimento di \_\_\_\_\_ Medicina Molecolare \_\_\_\_\_

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Biomedicina

INDIRIZZO: Medicina Rigenerativa

CICLO XXVIII

**STUDIO DELL' ESPRESSIONE E DELLA LOCALIZZAZIONE DI TRE  
PROTEINE, PTMA, PREP E DAAM1, PER LA PRIMA VOLTA ASSOCIATE  
ALLA SPERMATOGENESI DEI VERTEBRATI**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Sergio Minucci

**Dottorando:** Raffaele Dotolo

# I. Indice

II. Abstract (Italiano).....	IV
III. Abstract (English).....	XI

## Le gonadi maschili e la spermatogenesi.....18

1.1 - Struttura del testicolo nei Mammiferi.....	18
1.2 - Proliferazione e differenziamento delle cellule germinali maschili.....	21
2.1 - Sviluppo post-natale del testicolo di <i>Rattus norvegicus</i> .....	25
3.1 - Struttura generale del testicolo nei Teleostei.....	33
3.2 - La spermatogenesi dei pesci.....	34

### *Parte I:*

<i>Espressione e localizzazione di PTMA durante la spermatogenesi di Danio rerio</i> .....	39
--	----

## 1. Introduzione- *La Protimosina $\alpha$* (PTMA).....40

1.1 - Storia della famiglia e isolamento.....	40
1.2 - Caratteristiche di PTMA e della famiglia genica.....	42
1.3 - Ruolo biologico di PTMA.....	45

## 2. Scopo della ricerca.....50

## 3. Materiali e Metodi.....52

## 4. Risultati.....58

4.1 - <i>Espressione di ptmaa e ptmab nei tessuti di zebrafish</i> .....	58
--	----

4.2 - <i>Localizzazione di ptma nel testicolo adulto di zebrafish</i> .....	58
---	----

4.3 - <i>Espressione di Ptma nel testicolo adulto di zebrafish</i> .....	62
--	----

4.4 - <i>Localizzazione di Ptma nel testicolo adulto di zebrafish</i> .....	63
---	----

4.5 - <i>Analisi di localizzazione di Ptma tramite immunofluorescenza in spermatozoi di zebrafish</i> .....	65
---	----

## 5. Discussione e Conclusioni.....67

## ***Parte II:***

<i>PREP è associato alle funzioni riproduttive maschili ed ai gameti maschili in topo</i> .....	71
<b>1. Introduzione- <i>La Prolil endopeptidasi (PREP)</i></b> .....	72
1.1 - Storia della famiglia e isolamento.....	72
1.2 - Struttura, localizzazione e segnalazione cellulare.....	73
1.3 - Funzioni biologiche di PREP.....	75
<b>2. Scopo della ricerca</b> .....	79
<b>3. Materiali e Metodi</b> .....	81
<b>4. Risultati</b> .....	85
4.1 - <i>Espressione di PREP nel testicolo e negli spermatozoi di</i> <i>topi wild type e knockdown</i> .....	85
4.2 – <i>Peso dei testicoli ed analisi istologica</i> .....	85
4.3 - <i>Localizzazione di PREP nel testicolo e negli spermatozoi</i> .....	89
4.4 - <i>Conta totale, motilità e morfologia degli spermatozoi</i> .....	92
<b>5. Discussione e Conclusioni</b> .....	93

## ***Parte III:***

<i>Espressione e localizzazione di DAAMI durante la spermatogenesi</i> <i>di ratto e negli spermatozoi di uomo</i> .....	96
<b>1. Introduzione- <i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAMI)</i></b> .....	97
1.1 - <i>Daam1: caratteristiche e struttura della proteina</i> .....	97
1.2 - <i>Pathway di Wnt e attivazione di DAAM1</i> .....	99
1.3 - <i>Ruolo biologico di DAAM1</i> .....	103
<b>2. Scopo della ricerca</b> .....	107
<b>3. Materiali e Metodi</b> .....	109

<b>4. Risultati.....</b>	<b>113</b>
<i>4.1 - Espressione di DAAMI, Actina e Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto.....</i>	<i>113</i>
<i>4.2 – Localizzazione di DAAMI durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto.....</i>	<i>114</i>
<i>4.3 - Localizzazione di Actina e Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto.....</i>	<i>119</i>
<i>4.4 - Espressione di DAAMI, Actina e Tubulina negli spermatozoi di ratto e di uomo.....</i>	<i>124</i>
<i>4.5 - Localizzazione di DAAMI, Actina e Tubulina in spermatozoi di ratto e uomo.....</i>	<i>125</i>
<b>5. Discussione e Conclusioni.....</b>	<b>128</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>134</b>

# Abstract (Italiano)

Durante l'attività di ricerca svolta, come dottorando, nel gruppo del Prof. Sergio Minucci (Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli), ho contribuito allo studio dell'espressione e della localizzazione di due proteine, prothymosin alpha (**Parte I**) e discevelled-associated activator of morphogenesis (**Parte III**), nella gametogenesi maschile. Inoltre, durante il periodo di studi all'estero presso la School of Medicine della Yale University (NH, Connecticut), ho analizzato il possibile coinvolgimento dell'enzima Prolil-endopeptidasi nella spermatogenesi, utilizzando modelli murini geneticamente modificati (**Parte II**).

## ***Parte I: Espressione e localizzazione di PTMA durante la spermatogenesi di *Danio rerio****

La protimosina alfa (PTMA) è una proteina altamente acida (Frangou-Lazaridis et al., 1988), appartenente alle proteine intrinsecamente non strutturate (Gast et al., 1995), isolata per la prima volta nel timo di ratto. Caratterizzata inizialmente come un fattore immunogeno (Haritos et al., 1984a), presto è stata ritrovata in diversi tessuti dei Mammiferi (Haritos et al., 1984b; Clinton et al., 1989). La presenza di un segnale nucleare, oltre alla peculiare conformazione random coil, permettono a tale proteina di interagire con numerosi partner molecolari. PTMA è una molecola altamente conservata nella filogenesi e coinvolta in diversi processi biologici, come nell'interazione con l'istone H1 e il rimodellamento cromatinico (Karetsou et al., 1998; Ueda et al., 2012), la morte cellulare (Enkermann et al., 2000a; Jiang et al., 2003; Malicet et al., 2006; Ueda, 2009), la regolazione della trascrizione (Karetsou et al.,

2002; Martini et al., 2000; Martini and Katzenellenbogen, 2003), lo sviluppo del cancro (Dominguez et al., 1993; Skopeliti et al., 2006; Tsitsiloni et al., 1993; Wu et al., 1997; Zhang et al., 2014), e l'immunità (Baxevanis et al., 1992; Pan et al., 1986; Voutsas et al., 2000).

Dal 2002 il nostro gruppo ha iniziato uno studio di espressione e localizzazione di PTMA durante la spermatogenesi di diversi Vertebrati (Aniello et al., 2002; Ferrara et al., 2009; Prisco et al., 2009; Ferrara et al., 2010; Ferrara et al., 2013): l'espressione della proteina nelle cellule meiotiche e post-meiotiche dei testicoli e la sua presenza negli spermatozoi (associata con l'acrosoma, dove presente) rivelano un pattern molto conservato durante la filogenesi e suggeriscono un possibile ruolo per PTMA nella gametogenesi e nella fecondazione. Dato che alcuni Vertebrati mostrano un'associazione di PTMA e l'acrosoma (Ferrara et al., 2013), lo studio della proteina in modelli animali che presentano spermatozoi privi della suddetta struttura risulta particolarmente interessante. Per questo motivo è stato scelto il modello *Danio rerio* per continuare il progetto di ricerca (prima parte del lavoro di tesi), data la sua peculiare organizzazione dei testicoli in tubuli anastomizzati e principalmente per la caratteristica assenza dell'acrosoma nello spermatozoo (SPZ), il quale feconda l'uovo attraverso una penetrazione meccanica (Hirai, 1988).

La localizzazione del trascritto di *ptma* nel testicolo di *Danio rerio*, presenta un pattern simile a quanto osservato in altre specie (Aniello et al., 2002, Ferrara et al., 2009; Prisco et al., 2009; Ferrara et al., 2010; Ferrara et al., 2013), in particolare nelle cellule meiotiche e post-meiotiche.

I dati dell'analisi immunostochimica mostrano che la proteina mantiene la propria localizzazione anche in questa specie. Infatti, risulta assente negli spermatogoni, suggerendo che essa non partecipa nella fasi proliferative, mentre la presenza della proteina negli spermatociti (SPC) primari e negli spermatidi (SPT) supporta un suo possibile ruolo durante la meiosi e/o nelle fasi di differenziamento degli SPT in SPZ. In particolare, la proteina è

presente nel citoplasma degli SPC in leptotene/zigotene; in seguito Ptma estende la sua localizzazione alla regione cromatinica delle cellule in divisione, e mantiene la sua distribuzione nucleare anche durante il differenziamento degli SPT.

La localizzazione nucleare in spermatozoi privi di acrosoma suggerisce un ruolo per Ptma nel rimodellamento cromatinico durante il differenziamento dei gameti. Questi dati, quindi, forniscono un'interessante punto di partenza per lo studio delle funzioni di Ptma nella riproduzione dei Vertebrati.

## ***Parte II: PREP è associato alle funzioni riproduttive maschili ed ai gameti maschili in topo***

La prolil endopeptidasi (PREP) è un membro della famiglia delle serina peptidasi molto conservato durante l'evoluzione (Venäläinen et al., 2004). PREP è coinvolto nella maturazione e degradazione di ormoni peptidici e neuropeptidi (Mentlein, 1988; Wilk, 1983), ma la sua attività è limitata a oligopeptidi composti da non più di trenta residui amminoacidici.

Nonostante la sua localizzazione citoplasmatica, tale enzima può svolgere la propria attività esternamente alla cellula, inattivando neuropeptidi nell'ambiente extracellulare. Infatti, è stato suggerito che PREP può essere rilasciato dalle cellule (Ahmed et al., 2005), anche se non possiede un segnale di secrezione o una regione di interazione con la membrana plasmatica (Venäläinen et al, 2004). PREP è stato implicato in diversi processi biologici, come la maturazione e la degradazione di ormoni e neuropeptidi (Mentlein, 1988), apprendimento e memoria (Cunningham and O'Connor, 1997; D'Agostino et al., 2013), proliferazione cellulare e differenziamento (Matsubara et al., 1998; Suzuki et al., 2014), e nel metabolismo del glucosio (Kim et al., 2014). Ad oggi, alcuni studi hanno ipotizzato una

partecipazione di PREP anche nei processi associati alla riproduzione (Kimura et al., 1998; Kimura et al., 2002). Allo scopo di approfondire un possibile ruolo della proteina nella riproduzione maschile, in questa seconda parte del lavoro di tesi sono stati esaminati gli effetti della sua mancata espressione genica, utilizzando topi transgenici PREP knockdown (*Prep<sup>gt/gt</sup>*), su testicoli e spermatozoi (SPZ).

Dopo aver confermato la presenza dell'espressione di PREP nei testicoli e SPZ wild type (wt), rispetto ai campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>*, è stata eseguita un'analisi comparata dei parametri macroscopici sui testicoli di wt e knockdown: i dati mostrano che le gonadi di *Prep<sup>gt/gt</sup>* presentano un peso e dimensione ridotta rispetto ai wt. Similmente, le analisi istologiche mostrano che, mentre la morfologia generale è preservata tra i due genotipi, il diametro e il lume dei tubuli sono ridotti nei topi *Prep<sup>gt/gt</sup>*, e che la percentuale di tubuli seminiferi spermiati è maggiore nei wt.

Nella gonade maschile la proteina localizza negli spermatidi allungati e negli SPZ luminali dei topi wt, nelle cellule di Sertoli, Leydig e nelle cellule peritubulari. PREP è espresso anche negli SPZ epididimali, dove localizza nella testa e nel tratto intermedio del flagello, mentre nella restante regione della coda il segnale è ridotto. Come atteso, nei campioni knockdown sia nel testicolo che negli SPZ il segnale non è rilevabile.

Questi dati suggeriscono che la endopeptidasi potrebbe essere associata alla maturazione dei gameti; infatti, a supporto di ciò, i dati finali ottenuti analizzando i parametri spermatici mostrano una riduzione della conta totale e della motilità, nonché una maggiore alterazione della normale morfologia nei topi *Prep<sup>gt/gt</sup>*, rispetto ai wt.

Questi risultati suggeriscono che PREP potrebbe avere un ruolo fondamentale nella spermatogenesi di topo e nella motilità dello spermatozoo. Tuttavia, ulteriori esperimenti sono



richiesti per comprendere se il ruolo di questo enzima nella spermatogenesi è svolto durante lo sviluppo testicolare o direttamente nella fisiologia del gamete maturo.

### ***Parte III: Espressione e localizzazione di DAAM1 durante la spermatogenesi di ratto e negli spermatozoi di uomo***

DAAM1 è una proteina appartenente alla famiglia delle formine, un gruppo di molecole che controllano la nucleazione e l'assemblaggio delle fibre di actina in risposta a diversi segnali (Kovar, 2006; Goode and Eck, 2007). Molti studi hanno mostrato che DAAM1 è coinvolto in processi biologici essenziali, come la polarità cellulare, il movimento e l'adesione durante la morfogenesi e organogenesi, così come l'organizzazione citoscheletrica (Zallen, 2007; Sato et al., 2006; Matusek et al., 2006; Aspenstrom et al., 2006; Lu et al., 2007; Yamashita et al., 2007).

Il rimodellamento citoscheletrico è un processo mediante il quale le cellule modulano la loro architettura e forma in seguito a stimoli intracellulari e/o extracellulari. Come tutte le formine, DAAM1 possiede la capacità di nucleare filamenti di actina ed agire come regolatore del citoscheletro nel movimento e nella polarità cellulare. Sebbene il ruolo di questa proteina durante lo sviluppo sia stato ben studiato, la sua potenziale attività nei tessuti adulti resta ancora da esplorare.

Fino ad oggi, non ci sono studi che mostrano un coinvolgimento di DAAM1 nei processi riproduttivi, tuttavia alcune molecole che sono coinvolte negli stessi pathway molecolari risultano espresse durante la spermatogenesi (Ma et al., 2006).

Nel 2011, il nostro gruppo ha isolato un cDNA codificante DAAM1 dal testicolo di *Pelophylax esculentus*. I primi studi, condotti utilizzando questo modello, hanno mostrato che la proteina localizza nelle spermatocisti. In questa terza parte del lavoro di tesi lo studio è stato spostato su un altro modello, *Rattus norvegicus*, dato che in questa specie l'anatomia testicolare e gli eventi che avvengono durante la spermatogenesi sono rappresentati nei Mammiferi (Russell et al., 1989). Inizialmente, è stata confermata la presenza di DAAM1 nel testicolo di ratto a diversi stadi durante lo sviluppo post-natale (7-14-21-28-35-42-60 days post-partum, dpp), che ricapitola gli eventi chiave della prima ondata spermatogenetica. Allo scopo di caratterizzare un profilo di espressione della proteina e confermare il suo possibile coinvolgimento durante la spermatogenesi, è stata studiata la sua localizzazione durante lo sviluppo post-natale delle gonade di ratto, tramite immunofluorescenza. DAAM1 mostra una particolare distribuzione negli stadi analizzati: a 7 dpp, la proteina localizza nella regione centrale dei tubuli; a 14 dpp, il segnale è evidente negli spermatogoni A e B nella stessa regione centrale, fino ai 21- 28 dpp, quando il segnale si evidenzia negli spermatociti. Durante la spermioistogenesi (35 e 42 dpp), DAAM1 è presente negli spermatidi, con una peculiare localizzazione nella regione acrosomica in formazione. Infine a 60 dpp, quando la prima ondata spermatogenetica è completata, il segnale è presente anche negli spermatozoi (SPZ), a livello del residuo citoplasmatico.

Dato il coinvolgimento di DAAM1 nel rimodellamento citoscheletrico, il profilo di localizzazione della proteina è stato comparato con la distribuzione di altre proteine citoscheletriche: actina e tubulina. Il segnale dell'actina è simile a quello di DAAM1 durante le prime fasi dello sviluppo testicolare, ma essa è presente anche nelle cellule di Sertoli che iniziano a formare la barriera emato-testicolare; in seguito, a 35 dpp, il segnale è evidente nella barriera completata. Inoltre, durante la spermioistogenesi, l'actina localizza anche nelle cellule epiteliali che supportano il riarrangiamento cito-strutturale delle cellule germinali

verso il lume (42 dpp). Nel testicolo adulto, l'actina è espressa in tutte le cellule, inclusi gli SPZ. La tubulina risulta espressa in tutte le fasi dello sviluppo, e localizza nelle cellule di Sertoli che svolgono un ruolo essenziale nel sostenere le cellule germinale durante il loro differenziamento in SPZ. Allo scopo di approfondire la localizzazione di DAAM1 nei gameti maschili, è stata eseguita un'analisi di immunofluorescenza su spermatozoi epididimali di ratto: i risultati mostrano che la proteina è presente nel flagello. Successivamente, l'analisi è stata estesa a SPZ eiaculati di uomo, dove la goccia citoplasmatica è spesso fisiologicamente ritenuta (WHO 2010; Mortimer & Menkveld, 2001). Infatti, è stata confermata la localizzazione di DAAM1 nel residuo citoplasmatico dei gameti umani. Infine, è stata condotta un'analisi comparativa della localizzazione delle proteine citoscheletriche negli SPZ di ratto e uomo: in entrambe le specie l'actina localizza nella testa, nella regione acrosomale, e nella coda; mentre la tubulina è distribuita nel flagello.

Questi risultati mostrano, per la prima volta, l'espressione e la localizzazione di DAAM1 durante la spermatogenesi di ratto e negli spermatozoi di ratto e uomo, e forniscono un profilo comparato della distribuzione della formina rispetto ai principali fattori che controllano la cito-architettura delle cellule germinali, suggerendo un suo possibile coinvolgimento nel rimodellamento morfo-funzionale e nell'organizzazione della gonade e dei gameti maschili.

# Abstract (English)

During the years of activity as a PhD student in the group of Prof. Sergio Minucci (Dept. of Experimental Medicine, Second University of Naples) I studied the expression and localization of two proteins, prothymosin alpha (***Part I***) and discevelled-associated activator of morphogenesis (***Part III***) in male gametogenesis. Moreover, I spent six months in US at the School of Medicine of Yale University (NH, Connecticut). There I focused on the possible role for Prolyl endopeptidase on spermatogenesis in mouse (***Part II***).

## ***Part I: PTMA expression and localization during the spermatogenesis of Danio rerio***

Prothymosin alpha (PTMA) is a highly acidic (Frangou-Lazaridis et al., 1988), intrinsically disordered protein (Gast et al., 1995), which was first extracted from rat thymus and characterized as an immunogenic factor (Haritos et al., 1984a) but soon detected in a variety of mammalian tissues (Haritos et al., 1984b; Clinton et al., 1989). The presence of a nuclear localization signal and the adoption of a peculiar random coil conformation are amongst the reasons behind its interaction with a number of molecular partners; hence, today PTMA is known to be a very conserved and widely-expressed molecule, involved in several and diverse biological processes, like H1 histone interaction and chromatin remodeling (Karetsou et al., 1998; Ueda et al., 2012), cell death (Enkermann et al., 2000a; Jiang et al., 2003; Malicet et al., 2006; Ueda, 2009), transcriptional regulation (Karetsou et al., 2002; Martini et al., 2000; Martini and Katzenellenbogen, 2003) cancer development (Dominguez et al., 1993; Skopeliti et al., 2006; Tsitsiloni et al., 1993; Wu et al., 1997; Zhang et al., 2014)

and, as already alluded to, immunity (Baxevanis et al., 1992; Pan et al., 1986; Voutsas et al., 2000).

Since 2002 our group has studied PTMA during the spermatogenesis of several vertebrate species (Aniello et al., 2002; Ferrara et al., 2009; Prisco et al., 2009; Ferrara et al., 2010; Ferrara et al., 2013): the expression of PTMA in meiotic and post-meiotic germ cells inside testicular tubules and its presence in spermatozoa (associated with the acrosome, where present) reveal a striking conservation of the pattern during phylogenesis and suggest a possible role for the protein in gametogenesis and in fertilization. Since many vertebrate models show an established association between PTMA and the acrosome (Ferrara et al., 2013), the study of the possible differences in an acrosome-less sperm model may prove very compelling. In the light of the above *Danio rerio* was chosen as a model for the continuation of the project (first part of thesis work), given its peculiar anastomosing tubular organization of the testis and, above all, the fact that the spermatozoa (SPZ) do not develop an acrosome system at all, being its fertilization a mechanical process (Hirai, 1988).

*Ptma* transcript localization in the testis of *Danio rerio* approximately matches the pattern that we and others had previously highlighted in other species (Aniello et al., 2002, Ferrara et al., 2009; Prisco et al., 2009; Ferrara et al., 2010; Ferrara et al., 2013), with a clear predilection for meiotic and post-meiotic germ cells.

The immunohistochemical data clearly show that the protein shares the same localization. Indeed, it is absent in spermatogonia, which suggests that it does not participate in the proliferation of staminal/mitotic phases, while its presence in primary spermatocytes (SPC) and in spermatids (SPT) supports its possible role during meiosis and/or during the subsequent stages of SPT differentiation into mature SPZ. Specifically, soon after its first appearance in the cytoplasm of leptotene/zygotene primary SPC, PTMA extends its

localization to the membrane-free chromatin region of dividing cells and, then, it retains its nuclear distribution during SPT differentiation.

The nuclear localization in the acrosome-lacking spermatozoa suggests a role for PTMA in chromatin remodeling during gamete differentiation. These data further provide a compelling starting point for the study of PTMA functions during vertebrate fertilization.

## ***Part II: PREP is associated with male reproductive function and male gametes in mice***

Prolyl endopeptidase (PREP) is a member of the serine peptidase group, which is widely conserved through evolution (Venäläinen et al., 2004). PREP is involved in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides (Mentlein, 1988; Wilk, 1983), but its activity is restricted to oligopeptides comprising no more than about 30 amino acid residues.

Despite its common cytosolic localization, it is believed that PREP may act outside the cells by inactivating extracellular neuropeptides. In fact, it was suggested that PREP may be released from the cells (Ahmed et al., 2005), even though it lacks a secretion signal and it does not contain a transmembrane region, or a lipid anchor sequence (Venäläinen et al, 2004). PREP has been implicated in many biological processes, such as the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides (Mentlein, 1988), learning and memory (Cunningham and O'Connor, 1997; D'Agostino et al., 2013), cell proliferation and differentiation (Matsubara et al., 1998; Suzuki et al., 2014) and glucose metabolism (Kim et al., 2014). A small number of reports have also suggested PREP participation in both male and female reproduction-associated processes (Kimura et al., 1998; Kimura et al., 2002). In order to improve the understanding of the possible role of PREP in male reproduction, in this

second part of thesis work the effect of PREP knockdown (*Prep<sup>gt/gt</sup>*) on testis and sperm in adult mice was examined.

After confirming PREP expression in wild type (wt) testis and spermatozoa (SPZ), as opposed to *Prep<sup>gt/gt</sup>* samples, we performed a comparison of macroscopic parameters on wt and knockdown testes: the data show that *Prep<sup>gt/gt</sup>* gonads are smaller and weigh less than the wild type. Likewise, histological analysis shows that, while the general morphology appears to be preserved, tubule and lumen diameters are reduced in *Prep<sup>gt/gt</sup>* mice, and that the percentage of spermiated tubules is also lower than wt.

Inside the gonad, the protein is localized in elongating spermatids and luminal SPZ of wt mice, as well as Sertoli cells, Leydig cells and peritubular cells. PREP is also expressed in epididymal SPZ, where it is detected in the head, as well as in the midpiece of the sperm flagellum, while the remaining tail region shows a weaker signal. Conversely, in knockdown testis and SPZ the signal is almost undetectable. These data suggest that the endopeptidase may be involved in mature sperm function; indeed, this is supported and enriched by final data on sperm parameters, which show that total count, normal morphology, and motility are altered and reduced in *Prep<sup>gt/gt</sup>* mice, compared to the wild type.

These results suggest that PREP may play a fundamental role in mouse spermatogenesis, and sperm motility. Further experiments are required to understand whether the role played by this protein in spermatogenesis affects gonadal tissue development and gamete function directly.

***Part III: DAAM1 expression and localization during the spermatogenesis of rat and in human spermatozoa***

DAAM1 is a protein belonging to the formins, a large group of molecules which control the nucleation and assembly of actin fibers in response to several signals (Kovar, 2006; Goode and Eck, 2007). Several studies have shown that DAAM1 participates in essential biological processes, such as cytoskeletal organization, movement and adhesion during morphogenesis and organogenesis, as well as cell polarity (Zallen, 2007; Sato et al., 2006; Matussek et al., 2006; Aspenstrom et al., 2006; Lu et al., 2007; Yamashita et al., 2007).

Cytoskeletal remodelling is a process that allows the cells to modulate their architecture and shape following intracellular and/or extracellular stimuli. As a formin, DAAM 1 has the ability to nucleate unbranched actin filaments and, thus, it acts as a regulator of the cytoskeleton in cell polarity and movement. Although its role during the development has been well studied, its potential activity in adult tissues is still unexplored. As of now, no reports have directly associated DAAM1 with reproductive processes, but it is known that factors which participate in the same molecular pathways are expressed during spermatogenesis: these include Dvl1, Dvl2 and 3 (Ma et al., 2006), as well as several GTPases and Rho-related proteins (Naud et al., 2003).

In 2011, our group isolated a cDNA coding for DAAM1 from the testis of *Pelophylax esculentus*. The first studies, carried out on this model, showed that the protein localizes inside the spermatocysts. In this third part of thesis work, the study was focused on another model, *Rattus norvegicus*, since its testicular anatomy and the events which occur during spermatogenesis are emblematic of those of Mammals (Russell et al., 1989). First, the presence of DAAM1 was confirmed in rat testis at several time points during post-natal



development (7-14-21-28-35-42-60 days post-partum, dpp), which suitably recapitulate the key events of the first spermatogenic wave. In order to better characterize DAAM1 profile and to confirm its possible involvement during spermatogenesis, the localization of the protein during the post-natal development of the male gonad was studied by immunofluorescence analysis. A remarkable variation in DAAM1 distribution was detected through the times point studied: at 7 dpp, the protein localizes in the central region of the tubules; at 14 dpp, the signal is evident in A and B spermatogonia in the same central region, up until 21-28 dpp, when the signal is detectable inside the spermatocytes. During spermiogenesis (35 dpp and 42 dpp), DAAM1 signal is detectable in spermatids, with a peculiar localization in the forming acrosomal region. Finally, at 60 dpp, the signal is also present in mature spermatozoa (SPZ), in the cytoplasmic droplet.

Given DAAM1 involvement in cytoskeletal remodeling, the localization profile of the formin was compared with the distribution of other cytoskeletal proteins: actin and tubulin. Actin signal is consistent with DAAM1 during the first phases of testis development, but it is also present in Sertoli cells which form the blood-testis barrier; later, at 35 dpp, the signal is evident in the now-complete barrier, as well as, during spermiogenesis, in the epithelial cells which rearrange their architecture to support the path of the evolving germ cells toward the lumen (42 dpp). Inside the adult testis, actin is expressed by all the cell types, including the SPZ. As for tubulin, it is also expressed in all stages, located inside the Sertoli cells which nurse the germ cells during their differentiation into SPZ. In order to deepen the knowledge on DAAM1 localization in male gametes, an immunofluorescence analysis was carried out on rat epididymal SPZ: there, the protein is mainly detectable inside the flagellum. Then, the analysis was extended to DAAM1 localization in human ejaculated SPZ, where the droplet is often physiologically retained (WHO 2010; Mortimer & Menkveld, 2001). Indeed, the signal in human gametes confirmed DAAM1 retention inside this cytoplasmic structure. Finally, a

comparative analysis of the localization of cytoskeletal proteins was also performed on rat epididymal SPZ and in human ejaculated sperm: in both species actin is located in the head, in the acrosomal region, as well as in the flagellum, while tubulin is mainly distributed in the latter region.

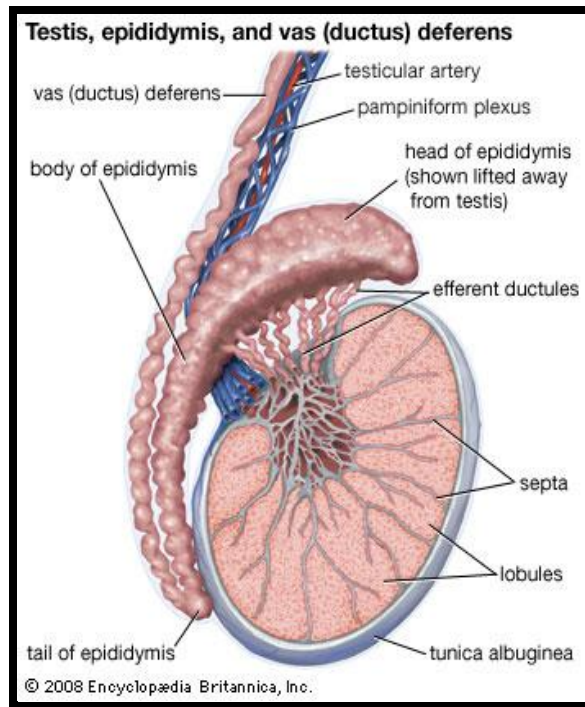
These results show, for the first time, the expression and the localization of DAAM1 during rat spermatogenesis and in rat and human SPZ, and they provide a comparative profile of its distribution versus the main germinal-compartment architectural factors, suggesting its possible involvement as an actor in morpho-functional remodeling and organization of the gonad and of male gametes.

# Le gonadi maschili e la spermatogenesi

## 1.1- *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 luminale fluida in cui sono rilasciati gli SPZ (Fig. 1.1, 1.2). 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. 1.2). 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. Il movimento della lamina genera contrazioni peristaltiche del tubulo seminifero, che sostengono il trasporto degli SPZ alla *rete testis*, dalla quale originano i condotti efferenti per l'epididimo (Fig. 1.1). Le SC 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 (Russell and Griswold, 1993). Le loro funzioni principali sono di nutrimento e protezione delle CG che attraversano i cicli di sviluppo, e instaurano con esse contatti dovuti principalmente alla presenza di N-caderine. Inoltre, le SC formano tra loro giunzioni serrate o occludenti: durante il processo di divisione e differenziamento, CG si spostano progressivamente dalla regione della membrana basale per mezzo dei complessi di giunzione alle SC, fino alla loro destinazione nel compartimento del lume.

**Fig. 1.1**

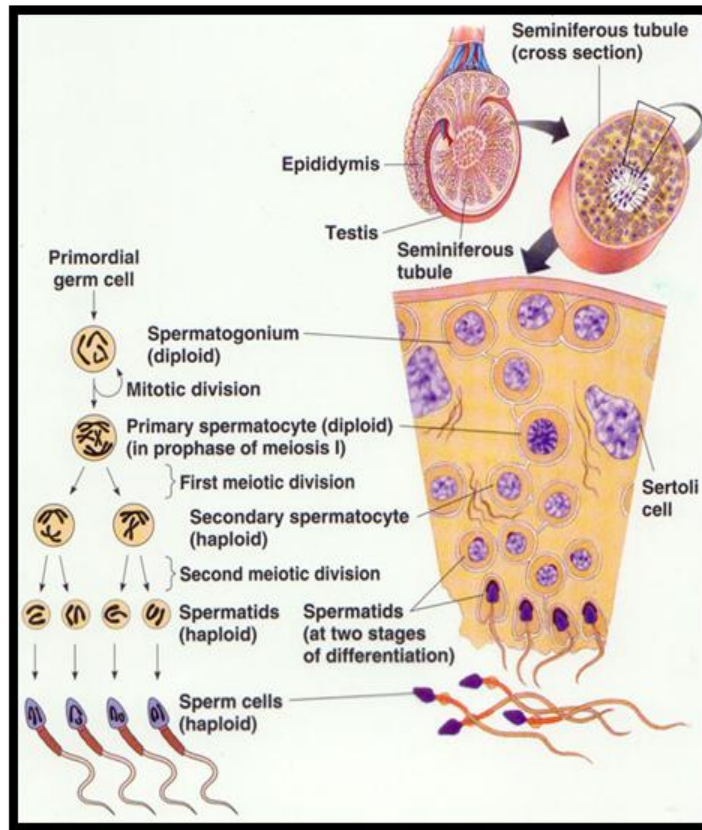


**Fig. 1.1** - Struttura del testicolo nei Mammiferi.

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 solo cellule diploidi (spermatogoni (SPG) e spermatociti (SPC) I fino allo stadio di preleptotene), e il compartimento luminale che contiene SPC I successivi al preleptotene, SPC II, spermatidi (SPT) e SPZ. 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. Tale processo di divisione incompleta assicura lo sviluppo sincrono e consente una comunicazione rapida tra le cellule.

**Fig. 1.2**



**Fig. 1.2** Schema della progressione cellulare all'interno dei tubuli seminiferi.

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. 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. Tra i tubuli seminiferi è localizzato del connettivo molto vascolarizzato, il tessuto interstiziale, caratterizzato da gruppi di cellule di Leydig (LC), 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.

## ***1.2- Proliferaazione e differenziamento delle cellule germinali maschili***

Il processo di formazione degli SPZ si distingue in tre fasi: la spermatogenesi (fase proliferativa, che include la meiosi), la spermiogenesi (fase differenziativa, nota anche come spermioistogenesi) e la spermiazione (fase di rilascio dal testicolo). Le cellule germinali primordiali o SPG sono presenti alla nascita nel testicolo ma non proliferano finché non sopraggiunge la pubertà. In questa fase dell'accrescimento corporeo entra in funzione il complesso sistema di regolazione endocrina, che promuove la formazione degli SPZ e del plasma seminale. Dapprima, ogni SPG va incontro a ripetute mitosi e, previo ritorno alla quiescenza di una delle cellule figlie (necessaria per dare inizio ad un successivo ciclo di mitosi), entra in meiosi. La meiosi è il processo per cui da una cellula progenitrice si originano, dopo due divisioni, quattro cellule figlie; alla fine della meiosi, ciascuna cellula contiene una sola copia di ciascun autosoma più uno dei due cromosomi sessuali. Lo SPG che entra nella prima tappa della I divisione meiotica (Profase I) si chiama SPC "primario". In Profase I, il DNA si presenta come coppie di cromosomi omologhi appaiati (ciascun cromosoma duplicato in cromatidi fratelli); questa tetradè subisce delle modificazioni strutturali, che consistono essenzialmente nello scambio di sequenze polinucleotidiche tra cromatidi omologhi (crossing-over). La prima divisione meiotica porta alla diminuzione riduzionale del genoma, cioè il corredo cromosomico diventa aploide, in quanto contiene uno solo degli autosomi per ogni coppia di cromosomi omologhi originariamente presenti nello SPG ed uno solo dei due cromosomi sessuali (sia pure con il DNA replicato in forma di cromatidi modificati). Lo SPC che entra nella seconda divisione meiotica si chiama "secondario". In questa ultima divisione i cromatidi fratelli modificati si separano: si verifica una diminuzione equazionale, cioè il DNA a disposizione della cellula si dimezza, ma il genoma rimane aploide. Con il completamento della seconda divisione meiotica si conclude la fase di spermatogenesi e comincia quella della spermiogenesi: le cellule, ora definite SPT,

vanno incontro ad un complesso processo di differenziamento. Durante tutta la spermatogenesi e fino alla conclusione della spermiogenesi, le cellule non si separano fisicamente (tranne quello SPG, sopra citato, che è necessario per il reinnesco del processo proliferativo) ma rimangono unite da giunzioni comunicanti, così che esistono “ponti citoplasmatici” di collegamento, dando luogo ad un vero e proprio sincizio. Attraverso i ponti citoplasmatici si verifica lo scambio di fattori solubili, quali RNA, enzimi e metaboliti. La funzione del sincizio assicura, in ogni ondata proliferativa, la sincronia della maturazione di tutte le cellule della popolazione destinata all’eiaculazione: ciò è di evidente importanza per il mantenimento di alleli che offrono un vantaggio evolutivo per una determinata funzione, ma che sono espressi con ridotta efficienza e, quindi, provocherebbero un ritardo nel differenziamento.

Terminata la meiosi, la cellula germinale inizia un processo di differenziamento che prende il nome di spermiogenesi, durante il quale viene chiamata SPT e partecipa ancora al sincizio che migra attraverso le SC. Infatti gli SPT di una stessa onda spermatogenica, concluso lo sviluppo, sono ancora organizzati in sincizio; infatti, i corpi residui mantengono i ponti citoplasmatici: il tutto appare come una sequenza di sacche congiunte, a cui sono associati gli SPT. Fino allo stadio terminale della spermiogenesi, lo SPT rimane associato con la SC, attraverso deboli legami tra proteine esposte sulla testa e ligandi presenti sulla parte apicale della SC. Questi legami sono indispensabili sia per orientare lo SPT (che viene immesso nel lume con la coda in avanti), sia per liberarlo dal corpo residuo (che sporge all’altezza delle regioni del collo e della parte intermedia, proprio in prossimità dell’apice della SC). Quindi, le SC hanno anche la funzione di fagocitare i corpi residui che si formano durante la spermiogenesi.

Dal punto di vista strutturale lo SPT, inizialmente, presenta una forma tondeggiante ma con un abbozzo di polarità, dovuta al fatto che il complesso del Golgi si localizza presso

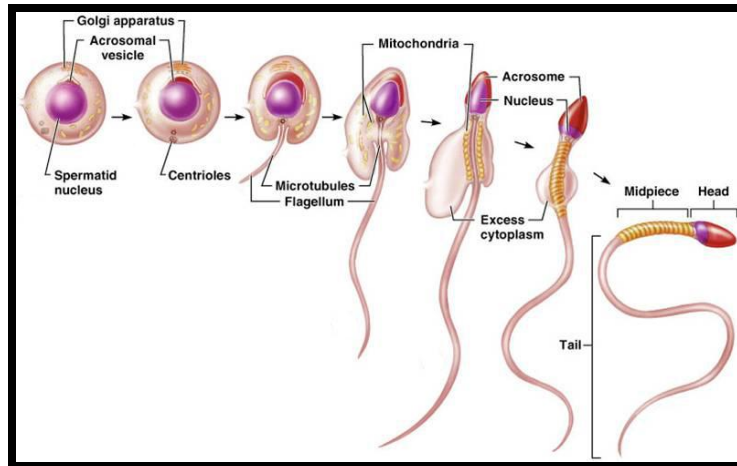
una regione sottostante un sito della membrana plasmatica ed invia vescicole, contenenti enzimi litici, ad un compartimento vacuolare adeso all'involucro nucleare: così si determina un allineamento tra complesso del Golgi, vacuolo bersaglio (detto vescicola acrosomale) e nucleo. Successivamente, la vescicola acrosomale si ingrandisce (per il continuo arrivo di vescicole lisosomiali dal Golgi) e si appiattisce sul nucleo, mentre i microtubuli cominciano ad allungarsi in direzione opposta al Golgi; in questa fase, i centrioli si allineano sull'asse Golgi-vescicola acrosomale-nucleo, disponendosi in posizione diametralmente opposta al Golgi. A questo punto, lo SPT comincia a manifestare grandi cambiamenti morfologici: i microtubuli si organizzano in fasci che si dispongono a forma di manicotto e servono ad orientare il movimento dei mitocondri verso i centrioli. I centrioli fungono da stampo per la sintesi continua di altri filamenti di microtubuli; questi fuoriescono dallo stampo e si accrescono in lunghezza per l'aggiunta di componenti monomerici a partire dalla base, come un capello origina dal bulbo capillifero; essi sono organizzati in strutture cilindriche complesse che costituiranno il flagello. Mentre avviene questo cambiamento morfologico, per cui la cellula perde definitivamente la forma tondeggiante ed espone l'abbozzo di coda, sulla membrana plasmatica vengono esposte proteine che servono al riconoscimento di recettori presenti sulla zona pellucida (l'involucro che riveste l'uovo), le cisterne del Golgi si scompongono e la vescicola acrosomale diventa compatta e si appiattisce sul nucleo. In una fase successiva, i cromosomi si condensano in strutture costipate da protammine, proteine basiche che sostituiscono gli istoni ed impediscono l'espressione genica; il manicotto, nel frattempo, agisce deviando quasi tutto il citoplasma ed i mitocondri oltre i centrioli, che continuano ad organizzare l'allungamento del flagello: l'allineamento che ora si riscontra è definito dalla successione spaziale acrosoma-nucleo-centrioli-coda.

In un'ultima fase, il nucleo si compatta (per l'espulsione di materiale non cromatinico e la chiusura dei pori nucleari), i mitocondri si dispongono in un filare elicoidale che comincia



all'altezza dei centrioli (nella regione di impianto del flagello, detta "collo" della coda), circondando la parte iniziale del flagello per 1/5 - 1/6 della sua lunghezza totale.

**Fig. 1.3**



**Fig. 1.3.** Schema rappresentativo della spermiogenesi.

A differenziamento concluso, la "testa" dello SPZ umano, che include il nucleo col sovrastante acrosoma (che in greco significa corpo sollevato) a foggia di elmetto, è lunga circa 5  $\mu\text{m}$  ed appiattita con 1,5  $\mu\text{m}$  di spessore e 3  $\mu\text{m}$  di larghezza. La regione rivestita dai mitocondri, detta "parte intermedia" è lunga 8  $\mu\text{m}$ , con un diametro di 1  $\mu\text{m}$ . L'intera lunghezza della coda, che riduce il suo diametro nella parte terminale, è di quasi 52  $\mu\text{m}$ . E' opportuno, a questo punto, precisare che sia la morfologia che le dimensioni spermatiche presentano delle differenze tra le specie animali. Ad esempio, tra i Mammiferi, i roditori presentano una testa falciforme ed una coda con lunghezza più che doppia rispetto a quella dello SPZ umano; negli Anfibi, la testa è affusolata e lunga quasi un terzo della lunghezza totale spermatica; nella termite non c'è coda e l'acrosoma sporge come un pungiglione, mentre alcune specie di cefalopodi hanno addirittura tre code, corte ed uncinata. Il riccio di mare, invece, ha SPZ molto simili a quelli dell'uomo, nonostante la distanza evolutiva tra queste due specie sia di gran lunga maggiore di quelle tra l'uomo e le specie sopra citate. E'

ovvio che la pressione selettiva esercitata dalle diverse condizioni ambientali ha favorito l'evoluzione di spermatozoi con strutture funzionali che hanno rappresentato un vantaggio per la sopravvivenza di ciascuna specie. Infine il processo di spermiogenesi, per una data popolazione sinciziale di SPT, si conclude con la spermiazione, cioè il rilascio di ondate di cellule individuali, gli SPZ, nel lume del tubulo seminifero.

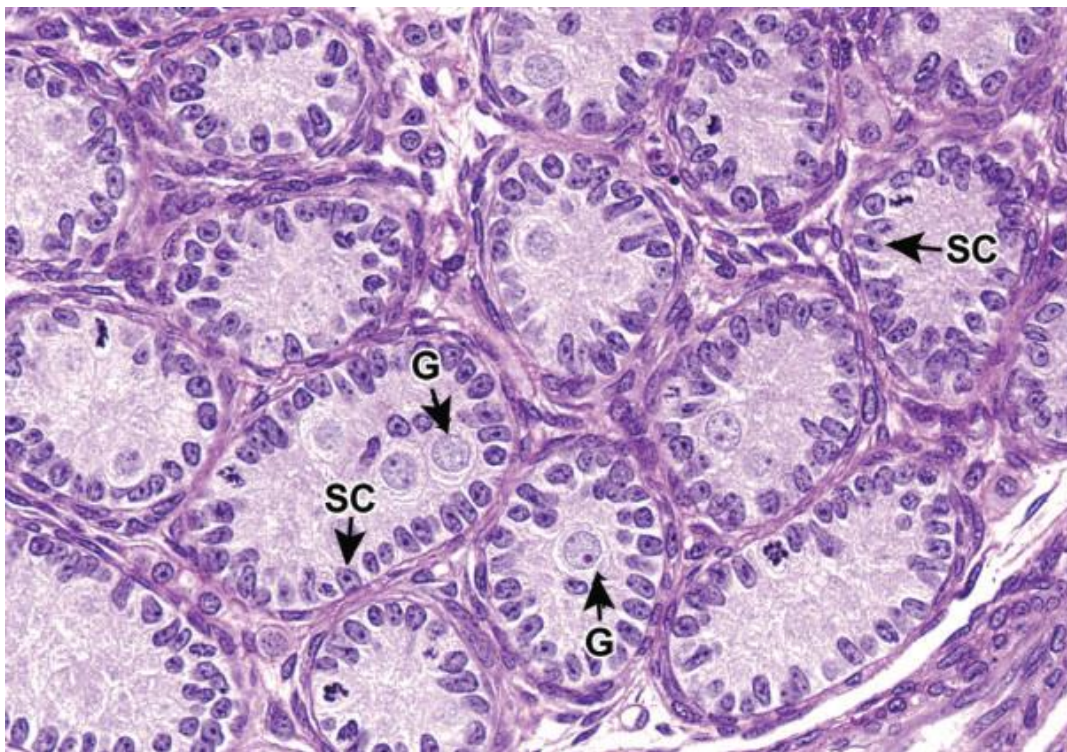
### ***2.1- Sviluppo post-natale del testicolo di *Rattus norvegicus****

Il testicolo di *Rattus norvegicus*, possiede tutte le caratteristiche finora descritte per le gonadi maschili dei Mammiferi. Lo studio dello sviluppo post-natale di questo tessuto, nel modello roditore, risulta particolarmente interessante poiché rappresentativo dell'arricchimento progressivo delle cellule germinali nei tubuli seminiferi, nella prima ondata spermatogenetica. Ratti maschi risultano sessualmente maturi a dieci settimane dopo la nascita (Ojeda and Skinner, 2006), tuttavia è possibile dividere in sei fasi lo sviluppo sessuale di questo mammifero in riferimento alle modifiche istologiche che avvengono nel testicolo. Il periodo neonatale (PND) è rappresentato dai primi sette giorni post-natali (0-7 PND), successivamente si passa a quello precoce infantile (8-14 PND), tardivo infantile (15-20 PND), giovanile (21-32 PND), peri-puberale (33-55 PND), ed infine si raggiunge la maturità nel periodo puberale tardivo (56-70 PND), (Ojeda et al., 1980; Ojeda and Skinner, 2006). Quest'ultima fase corrisponde anche al momento in cui gli spermatozoi maturi vengono rilasciati nella testa dell'epididimo (Korenbroet et al., 1977). Dopo il periodo peri-puberale, il processo continua per circa due settimane successive, fino al raggiungimento della dimensione del testicolo adulto con un adeguato arricchimento di spermatozoi presenti nei tubuli, che corrisponde a 70 PND. Questo processo è similmente ricapitolato nelle tappe dello

sviluppo testicolare di uomo (Barrow et al., 2011). Di seguito è riportata una breve descrizione delle sei fasi di sviluppo.

Il periodo neonatale (0-7 PND), rappresenta il momento in cui nel lume del tubulo seminifero si assiste alla fase di transizione dai gonociti (G) fetali verso la produzione di spermatogoni (SPG) in attiva divisione mitotica. Inoltre si assiste ad un aumento del numero delle cellule di Sertoli (SC), in corrispondenza della regressione delle cellule di Leydig fetali che lasciano il posto alle cellule di Leydig progenitrici. Al terzo giorno post-natale il testicolo si presenta costituito da tubuli delineati dalle SC in divisione che circondano i gonociti situati all'interno del lume: le SC sono distinte dall'aspetto ovale ed allungato, rispetto ai G che risultano rotondi con nucleo contenente cromatina dispersa e un prominente nucleolo (Fig. 2.1).

**Fig. 2.1**

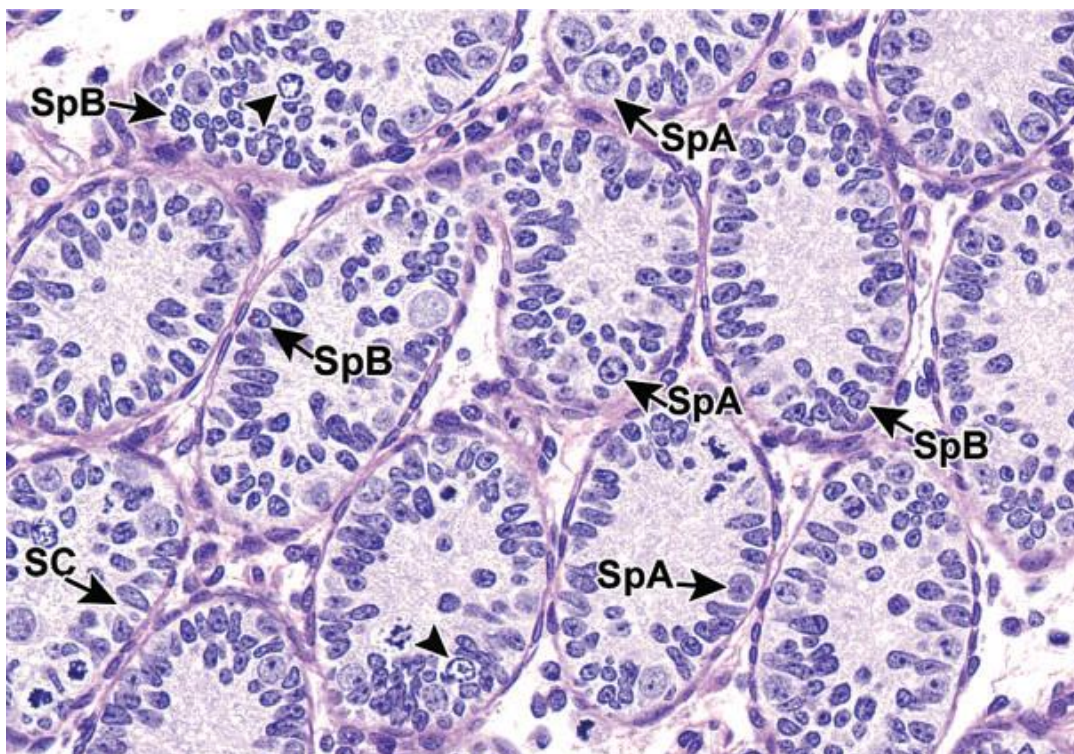


**Fig. 2.1. Testicolo neonatale (3 PND).** I tubuli sono delimitati da numerose cellule di Sertoli (SC) in attiva divisione. I gonociti (G), al centro del tubulo, sono mitoticamente inattivi, e presentano un grande nucleo rotondo (Picut et al., 2015).

Nell'avanzare del periodo neonatale l'attività mitotica diminuisce e diventa meno evidente la popolazione di G, mentre le SC continuano a dividersi.

Durante il periodo precoce infantile (8-14 PND), la caratteristica predominante dei tubuli è rappresentata dalla rapida espansione delle SC e degli spermatogoni (Sp) di tipo A e B. Questa proliferazione provoca un aspetto pseudotratificato dell'epitelio tubulare (Fig. 2.2). Le SC presentano le caratteristiche prima descritte, gli Sp A mostrano un nucleo rotondo grande con cromatina dispersa e nucleolo prominente mentre gli Sp B hanno un piccolo nucleo con cromatina condensata. I G fetalì, con grosso nucleo rotondo e centrale, sono posizionati al centro del tubulo e diventano progressivamente meno presenti a partire da 10 PND.

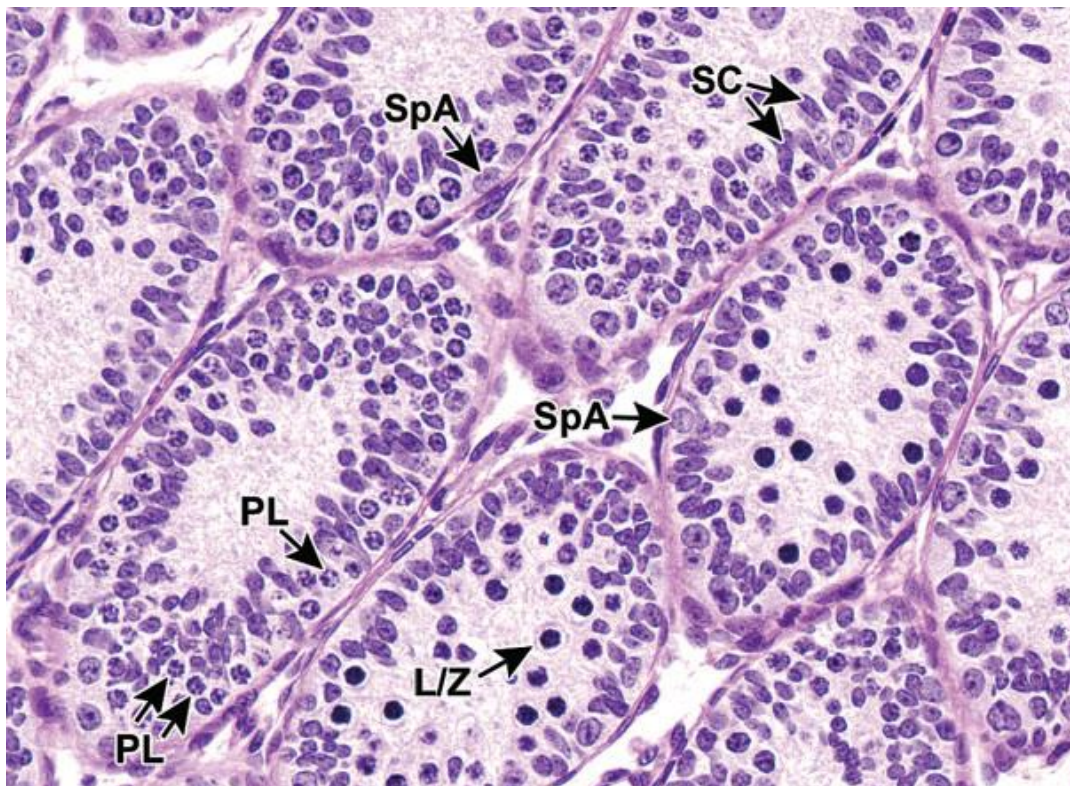
**Fig. 2.2**



**Fig. 2.2. Testicolo infantile precoce (9 PND).** I tubuli sono circondati da numerose SC e spermatogoni (Sp). Le SC sono riconosciute da un nucleo poligonale con cromatina dispersa e un nucleolo prominente. Gli SpA e SpB mostrano rispettivamente un nucleo ovale, rotondo (Picut et al., 2015).

Il periodo tardivo infantile (15-20 PND), è il momento in cui: i tubuli seminiferi mostrano la massima densità cellulare, le SC cessano di dividersi, i tubuli iniziano a separarsi in stadi, e inizia il processo meiotico con la comparsa degli spermatociti (Fig. 2.3). Tra i 15 e 18 PND, sono presenti gli spermatociti che iniziano il processo meiotico: in particolare gli spermatociti in preleptotene (PL) sono identificati dalla loro posizione basale e ampiamente dispersa nel tubulo, mentre quelli in leptotene/zigotene (L/Z) sono riconosciuti dalla posizione luminale con cromatina condensata e citoplasma chiaro. La separazione in stadi inizia ad essere evidente poiché alcuni tubuli presentano spermatociti PL mentre altri presentano spermatociti L/Z (Fig. 2.3).

**Fig. 2.3**

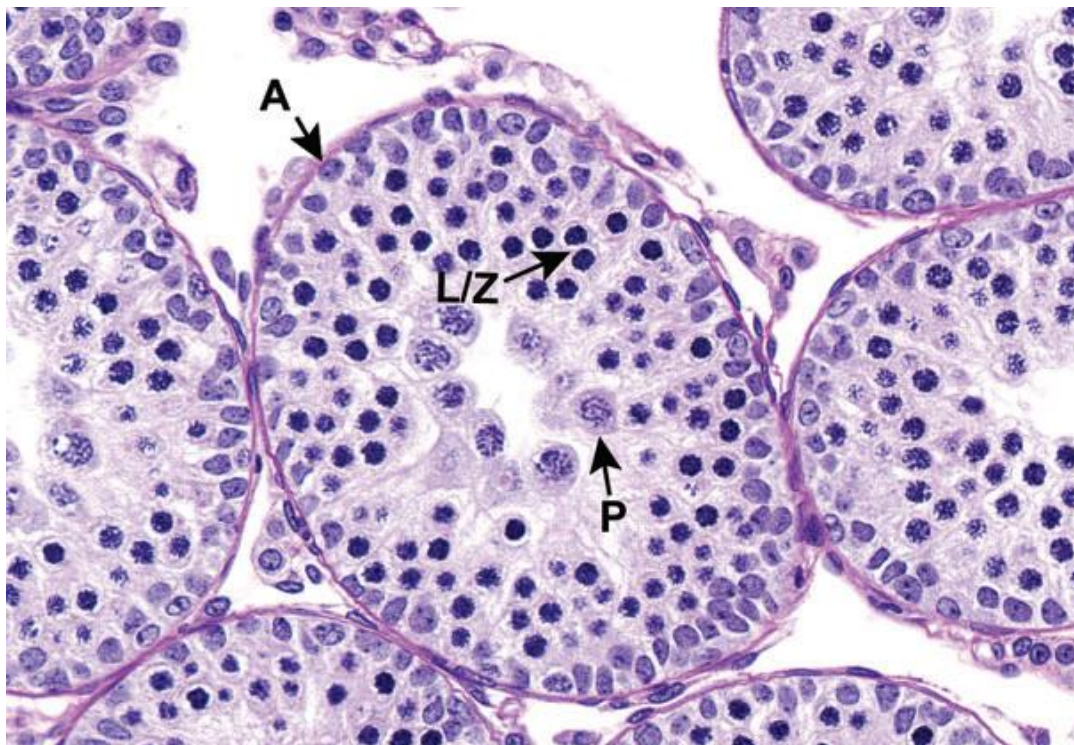


**Fig. 2.3. Testicolo infantile tardivo (16 PND).** In questa fase lo sviluppo degli spermatociti è correlato a quello della barriera emato-testicolare (BTB). In alcuni tubuli sono presenti gli spermatociti in leptotene/ zigotene (L/Z), mentre altri mostrano spermatociti in preleptotene (PL) all'esterno della BTB. SpA = Spermatogoni A; SC = Cellule di Sertoli, (Picut et al., 2015).

A 18 PND, nel lume dei tubuli appaiono i primi spermatozoi in pachitene (P): queste cellule sono caratterizzate da un grande nucleo rotondo con cromatina meno condensata rispetto ai PL e L/Z, e citoplasma eosinofilo ben distinto dalla membrana cellulare. I tubuli a questo stadio sono circondati da uno strato esterno di Sp (A e B) e uno interno di SC con nuclei oblunghi, inoltre l'interstizio contiene un numero minore di cellule di Leydig immature (Fig. 2.3).

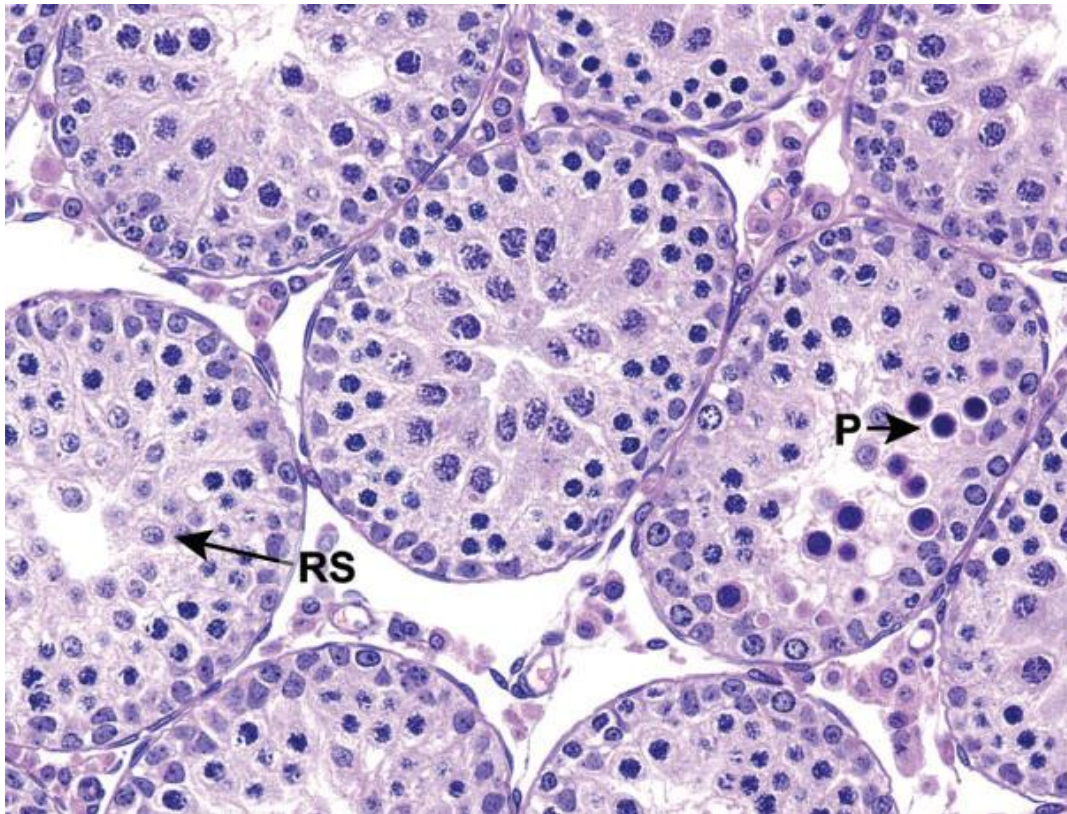
La prima ondata della spermatogenesi prosegue nel periodo giovanile (21-32 PND), in cui appaiono gli spermatozoi rotondi (Fig. 2.5), in concomitanza con l'imponente aumento del diametro dei tubuli. Questo stadio è caratterizzato dalla presenza di spermatozoi in P e spermatozoi secondari (da 26 PND), inoltre le SC e gli Sp sono organizzati in un unico livello lungo la membrana basale (Fig. 2.4).

**Fig. 2.4**



**Fig. 2.4. Testicolo giovanile (25 PND).** Il processo meiotico continua con la comparsa degli spermatozoi in pachitene (P), mentre gli spermatogoni e le cellule di Sertoli si presentano nella regione basale del tubulo. A = Spermatozoi A; L/Z = spermatozoi in leptotene/zygotene, (Picut et al., 2015).

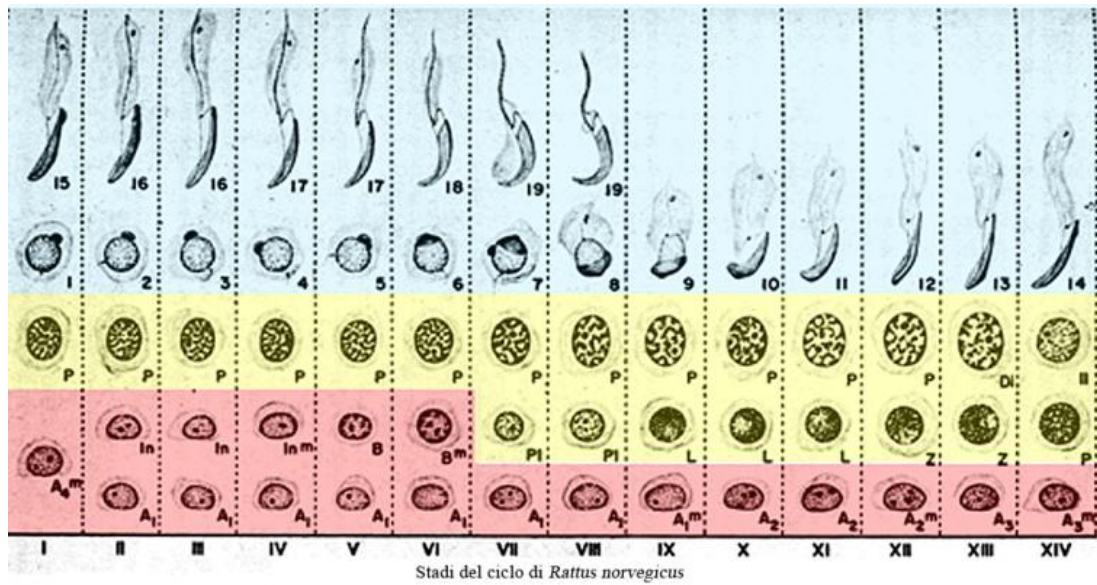
**Fig. 2.5**



**Fig. 2.5. Testicolo giovanile (27 PND).** Gli spermatidi rotondi (RS) iniziano il processo di spermiostogenesi. P = spermatociti pachitenei in apoptosi (Picut et al., 2015).

Durante il periodo peri-puberale (33-55 PND) nei tubuli seminiferi si assiste ad una intensa attività di rimodellamento strutturale degli spermatidi che iniziano il processo di spermiostogenesi, diviso in 19 step (Fig. 2.6). A 46 PND nel tubulo dovrebbero essere presenti tutti gli stadi, compreso l'ultimo step (Fig. 2.7) della spermiogenesi, che rappresentano l'intero processo di spermatogenesi. Tuttavia l'aspetto delle diverse fasi può variare in confronto con il testicolo di individui adulti per il numero più basso di cellule e per una minore densità di spermatidi allungati, oltre che ad una ridotta dimensione dei tubuli seminiferi.

**Fig. 2.6**

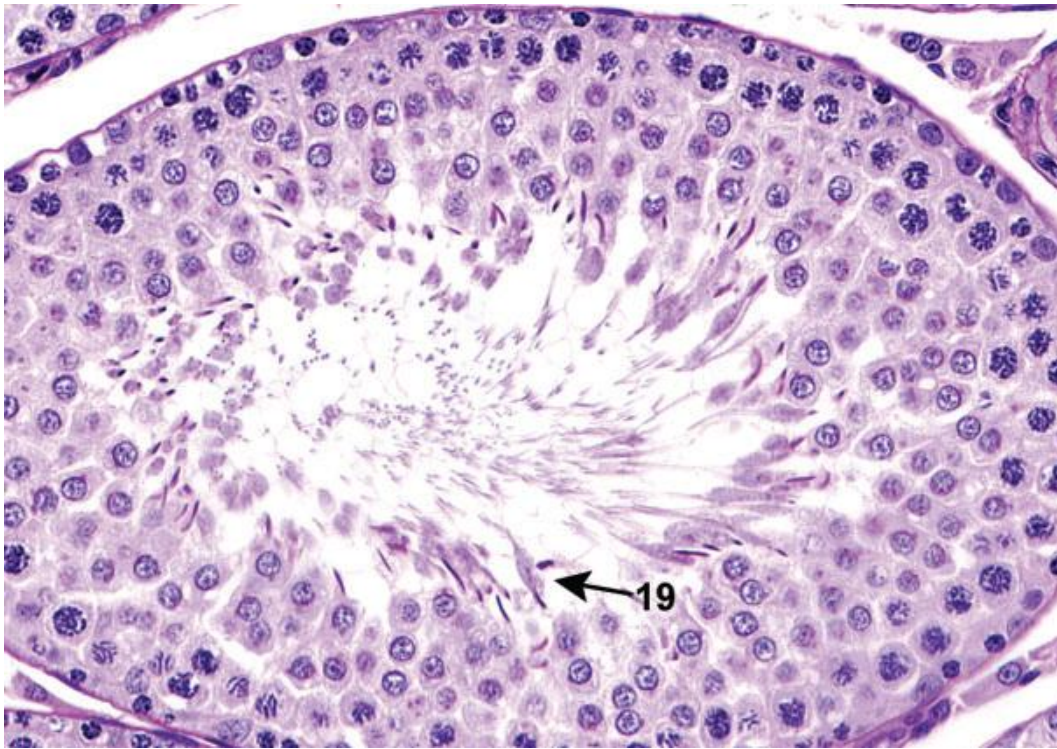


**Fig. 2.6. Stadi del ciclo della spermatogenesi di ratto.** Le aree in rosso, giallo e azzurro evidenziano rispettivamente gli SPG, gli SPC e gli SPT; i numeri e i setti tratteggiati indicano le associazioni cellulari rappresentative di ogni stadio.

La maturità è completa nel periodo puberale tardivo (56-70 PND), dove le dimensioni e le caratteristiche morfologiche del testicolo sono quelle ritrovate in un individuo adulto. Il diametro dei tubuli è aumentato, inoltre gli stadi tubulari sono riconoscibili per la loro caratteristica associazione cellulare (Fig. 2.8).

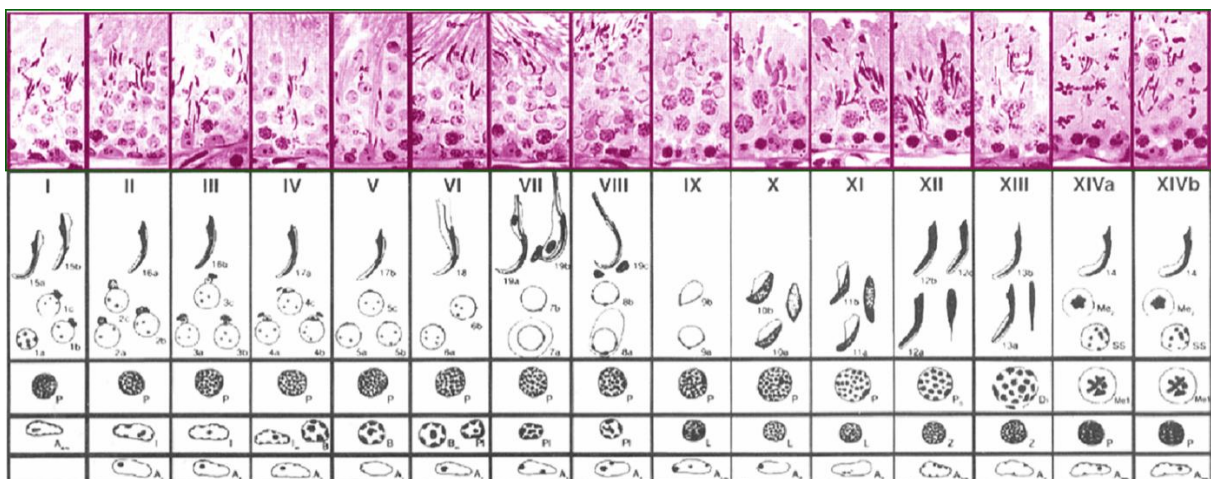


**Fig. 2.7**



**Fig. 2.7. Testicolo peri-puberale (46 PND).** Gli spermatidi allo step 19 sono presenti nel tubulo allo stadio VII. (Picut et al., 2015).

**Fig. 2.8**



**Fig. 2.8. Sviluppo del testicolo di ratto.** In ogni stadio è rappresentata la specifica associazione cellulare.

### ***3.1- Struttura generale del testicolo nei Teleostei***

In tutti i Vertebrati, dai pesci ai mammiferi, il testicolo è costituito da un compartimento intertubulare (interstiziale) e uno tubulare. Il primo contiene le cellule di Leydig, i vasi sanguigni e linfatici, macrofagi, e cellule del tessuto connettivo; il secondo è delimitato da una membrana basale e dalle cellule mioidi, e presenta all'interno l'epitelio germinale. Questo epitelio è costituito da due tipi di cellule: le cellule somatiche e le cellule germinali, presenti in differenti stadi di sviluppo. Nei Vertebrati anamnioti (pesci e anfibi), la spermatogenesi è definita cistica (Callard, 1996). Due differenze possono essere evidenziate tra il testicolo dei pesci e quello dei vertebrati superiori: nei tubuli seminiferi le estensioni citoplasmatiche delle cellule di Sertoli formano spermatocisti che accolgono un singolo gruppo di cellule germinali derivanti da un singolo spermatogonio (Fig.3.1); inoltre queste cellule somatiche mantengono la capacità di proliferare anche nella gonade adulta dei pesci (Schulz et al., 2005). Quindi, in questi vertebrati, il testicolo presenta cisti formate da gruppi di cellule di Sertoli che circondano e coadiuvano lo sviluppo di cellule germinali di un unico clone iniziale. Differenti cloni iniziano il processo di spermatogenesi in tempi diversi generando cisti a diversi stadi di sviluppo, in cui è possibile distinguere differenti gruppi di cellule germinali nelle varie fasi della spermatogenesi (Fig.3.1). In letteratura sono descritte due diverse organizzazioni spaziali per il testicolo dei teleostei, basate sulla distribuzione degli spermatogoni nel compartimento germinale (Grier, 1981). La prima tipologia organizzativa (distribuzione restrittiva degli spermatogoni) prevede la distribuzione delle cellule di Sertoli intorno agli spermatogoni indifferenziati, nella regione distale del compartimento germinale vicino alla tunica albuginea. Nel momento in cui le cellule entrano in meiosi, la cisti migra verso i dotti spermatici localizzati nella regione luminale del testicolo. Secondo l'altra organizzazione (distribuzione non restrittiva degli spermatogoni) gli

spermatogoni diffondono lungo il compartimento germinale in ogni parte del testicolo. Questa organizzazione è stata considerata primitiva e ritrovata in gruppi tassonomici meno evoluti (Parenti and Grier, 2004).

### **3.2- *La spermatogenesi dei pesci***

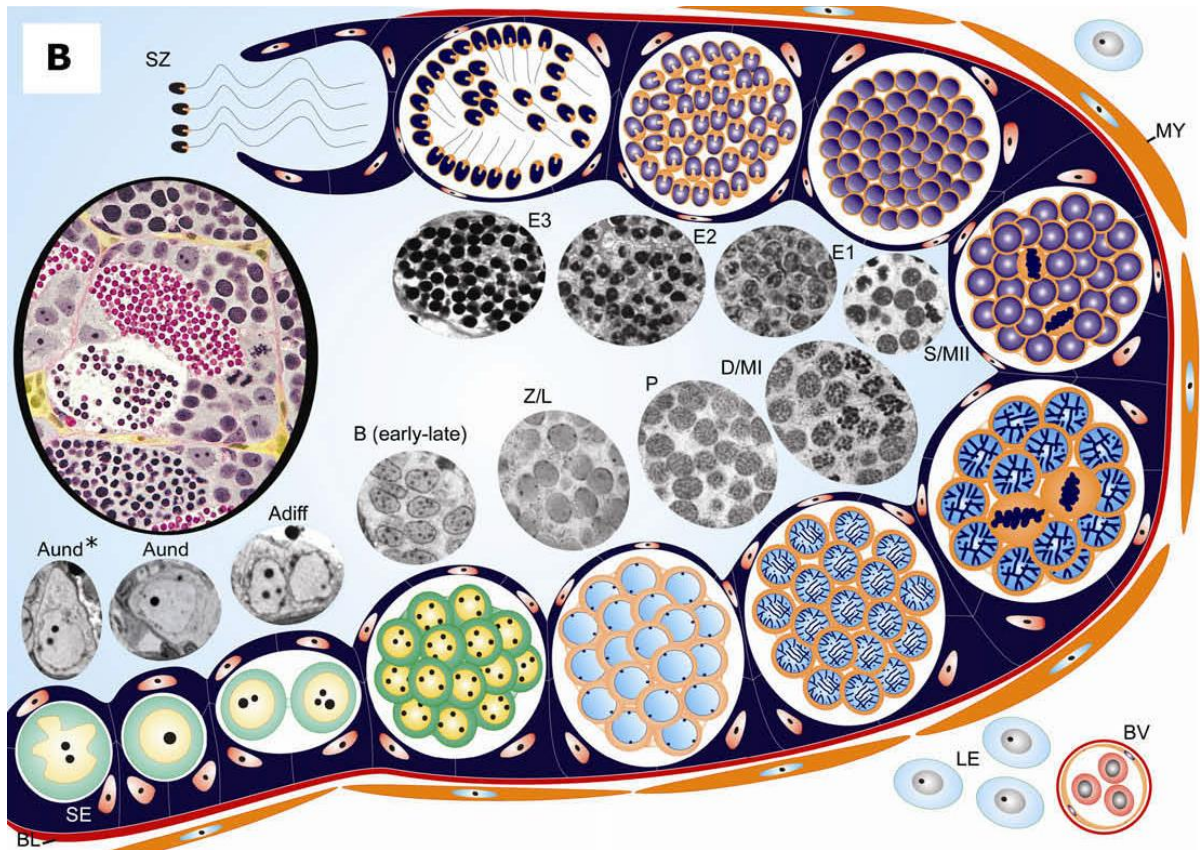
In questo paragrafo saranno descritte le caratteristiche morfo-funzionali dei differenti stadi di sviluppo delle cellule germinali dei pesci, fino agli spermatozoi. La terminologia utilizzata è la stessa di quella dei vertebrati superiori dato il simile processo di sviluppo cellulare durante la spermatogenesi. Come nei mammiferi (De Rooij and Russell, 2000), anche nei pesci gli spermatogoni B si dividono più velocemente degli spermatogoni A poiché possiedono un alto indice mitotico (Schulz et al., 2005). In seguito all'ultima mitosi, gli spermatogoni B si differenziano in spermatociti primari (preleptotene) che iniziano il processo meiotico: spermatociti primari (1° divisione meiotica) → spermatociti secondari (2° divisione meiotica) → spermatidi (spermioistogenesi) → spermatozoi.

Le cellule staminali del testicolo sono rappresentate dagli spermatogoni A indifferenziati ( $A_{und}$ ), i quali possono differenziarsi ( $A_{diff}$ ) mantenendo alcune caratteristiche simili alla fase precedente; mentre gli spermatogoni B, prodotti dagli  $A_{diff}$ , mostrano una morfologia diversa. In alcune specie come lo zebrafish, è possibile differenziare le diverse generazioni spermatogoniali, basandosi sulla dimensione cellula/nucleo e considerando il numero di cellule per spermatocisticisti (Fig.3.1).

In particolare gli spermatogoni  $A_{diff}$  sono presenti nelle cisti da due a otto cellule, con nucleo rotondo oppure ovale che mostra uno o più nucleoli più piccoli rispetto a quelli

ritrovati negli spermatogoni Aund. Inoltre mostrano, come per gli Aund, un basso contenuto di eterocromatina nucleare ed un ampio citoplasma.

**Fig. 3.1**

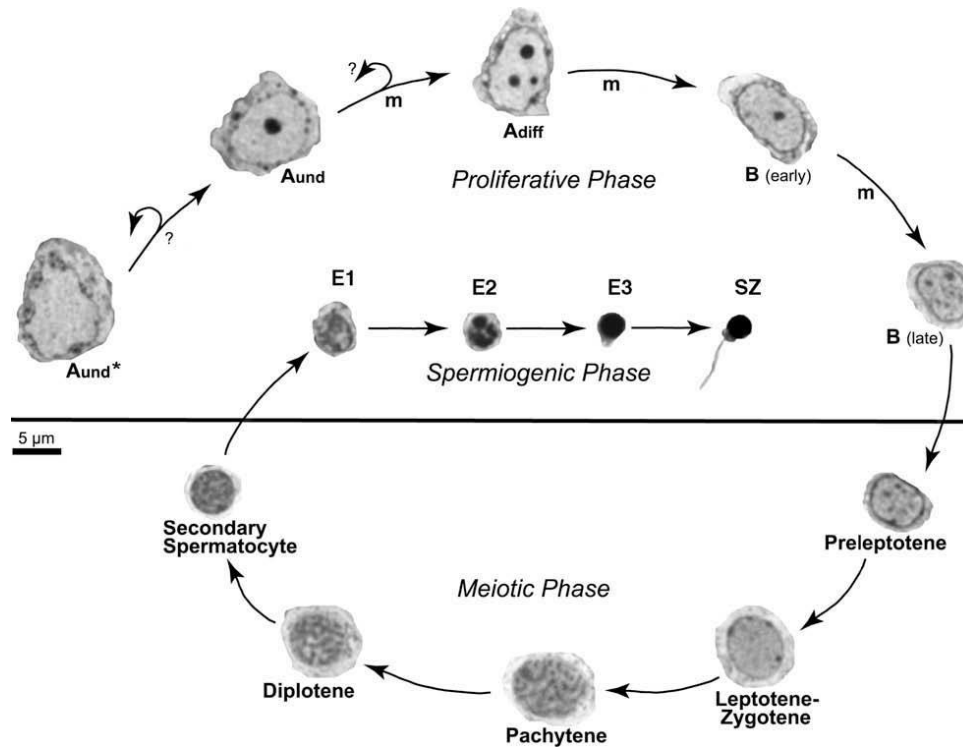


**Fig. 3.1. Schema rappresentativo del testicolo di zebrafish.** L'epitelio germinale contiene cellule di Sertoli (SE) e cellule germinali, delimitate da una lamina basale (BL) e cellule peritubulari mioidi (MY). Lo schema mostra, inoltre: le cellule interstiziali di Leydig (LE) e i vasi sanguigni (BV). (Aund) Spermatogoni di tipo A indifferenziati; (Adiff) spermatogoni di tipo A differenziati; [B (early-late)] spermatogoni di tipo B; (L/Z) spermatociti primari in leptotene/zigotene; (P) spermatociti primari in pachitene; (D/MI) spermatociti primari in diplotene/metafase I; (S/MII) spermatociti secondari in metafase II; spermatidi precoci (E1), intermedi (E2), finali (E3); (SZ) spermatozoi. Il simbolo (\*) indica che non è ancora chiaro se Aund\* e Aund sono separati da una mitosi o rappresentano differenti stadi dello stesso ciclo cellulare (Schulz et al., 2010).

Gli spermatogoni B sono organizzati in gruppi da 16 o più cellule e si distinguono in diverse generazioni. Durante lo sviluppo mostrano una progressiva diminuzione del volume nucleare con un piccolo bordo citoplasmatico che circonda un nucleo sempre più eterocromatinico. In seguito all'ultima divisione lo spermatogonio di tipo B si differenzia in spermatocita primario che inizia il processo meiotico.

Mediante un'analisi microscopica è possibile distinguere le cellule meiotiche considerando specifici parametri nucleari quali: diametro, forma, e grado di condensazione dei cromosomi (Fig. 3.2). Nella fase di leptotene/zigotene, le spermatocisti di zebrafish presentano spermatociti primari con nuclei più grandi (circa 5  $\mu\text{m}$ ) e rotondi rispetto agli spermatogoni B, la cromatina risulta poco condensata e solo in alcuni punti periferici della membrana nucleare mostra un aspetto eterocromatinico. Gli spermatociti in pachitene sono le cellule meiotiche maggiormente ritrovate nelle cisti, contengono un nucleo denso con un diametro di circa 6,55  $\mu\text{m}$ , dove i cromosomi appaiono come linee spesse disposte dalla membrana nucleare fino al centro del nucleo. Nella fase di diplotene, i cromosomi nel nucleo degli spermatociti (massimo livello di compattazione) si distribuiscono nei pressi della membrana nucleare. Gli spermatociti secondari, prodotti dalla prima divisione meiotica, sono rari, in quanto entrano rapidamente nella seconda divisione meiotica. Queste cellule che presentano un piccolo nucleo (circa 4  $\mu\text{m}$ ) sono spesso ritrovate in metafase. Infine il processo meiotico si conclude con la produzione di spermatidi.

**Fig. 3.2**



**Fig. 3.2. Rappresentazione della spermatogenesi di zebrafish dallo spermatogone A indifferenziato allo spermatozoo.** Il simbolo (?) indica che non è ancora chiaro se Aund\* e Aund sono separati da una mitosi o rappresentano differenti stadi dello stesso ciclo cellulare (come nell'immagine precedente). (m) Mitosi. (Aund) Spermatogoni di tipo A indifferenziati; (Adiff) spermatogoni di tipo A differenziati; [B (early-late)] spermatogoni di tipo B; spermatidi precoci (E1), intermedi (E2), finali (E3); (SZ) spermatozoi (Schulz et al., 2010).

La spermiogenesi è il processo mediante il quale si assiste ad una serie di cambiamenti morfologici che inducono il differenziamento degli spermatidi in spermatozoi. Le modifiche strutturali includono la condensazione del nucleo, l'eliminazione degli organelli citoplasmatici, e la formazione del flagello (Jamieson, 1991). In base alla condensazione nucleare è possibile distinguere tre tipologie di spermatidi: E1 (spermatidi precoci), E2 (spermatidi intermedi) ed E3 (spermatidi finali). Nei pesci Teleostei, generalmente, gli spermatozoi non presentano l'acrosoma, e la regione impenetrabile del corion è perforata da

un micropilo che permette l'accesso alla membrana dell'ovocita. In particolare lo spermatozoo mostra: un nucleo sferico contenente cromatina omogeneamente condensata, un tratto intermedio con dimensione variabile e uno o due lunghi flagelli (Jamieson, 1991). Infine la spermiogenesi si completa quando i ponti citoplasmatici che connettono i gameti maturi con le cellule di Sertoli sono interrotti così da permettere il rilascio degli spermatozoi nel lume del tubulo.

# *Parte I:*

*Espressione e localizzazione di PTMA durante la  
spermatogenesi di Danio rerio*



# 1. Introduzione

## *La Protimosina $\alpha$*

### *1.1- Storia della famiglia e isolamento*

La protimosina- $\alpha$  (PTMA) è una proteina appartenente alla famiglia delle timosine, isolate per la prima volta nel 1966 dal timo di vitello (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). A tale frazione appartengono più di 40 polipeptidi di peso molecolare compreso tra 1 e 15 KDa e con un punto isoelettrico (pI) variabile da 4,0 a 7,0 (Hooper et al., 1975). L’eterogeneità di tale popolazione ha reso necessaria un’ulteriore suddivisione in tre gruppi principali (Goldstein et al., 1977) in base al loro pI:  $\alpha$ -timosine (pI < 5,0);  $\beta$ -timosine (pI tra 5,0 e 7,0);  $\gamma$ -timosine (pI > 7,0). La prima proteina isolata dalla “frazione timosinica 5” è stata la T $\alpha$ 1, un piccolo peptide di 28 residui aminoacidici, con un pI di 4,2. L’osservazione che questa proteina possedeva solo alcune delle principali attività biologiche della frazione 5, tra cui la modulazione di alcuni passaggi della maturazione dei linfociti T (Schulof and Goldstein, 1981), ha fatto presto pensare che la funzione immunologica completa fosse espletata da più peptidi. In seguito, dalla frazione 5 sono stati isolati altri due polipeptidi: des-(25-28)-timosina  $\alpha$ 1, contenente i primi 24 residui di T $\alpha$ 1, e timosina  $\alpha$ 11, contenente l’intera sequenza di T $\alpha$ 1 più sette residui C-terminali. La presenza nella stessa frazione di tre proteine con una sequenza aminoacidica identica ha fatto perciò supporre che esse potessero originare

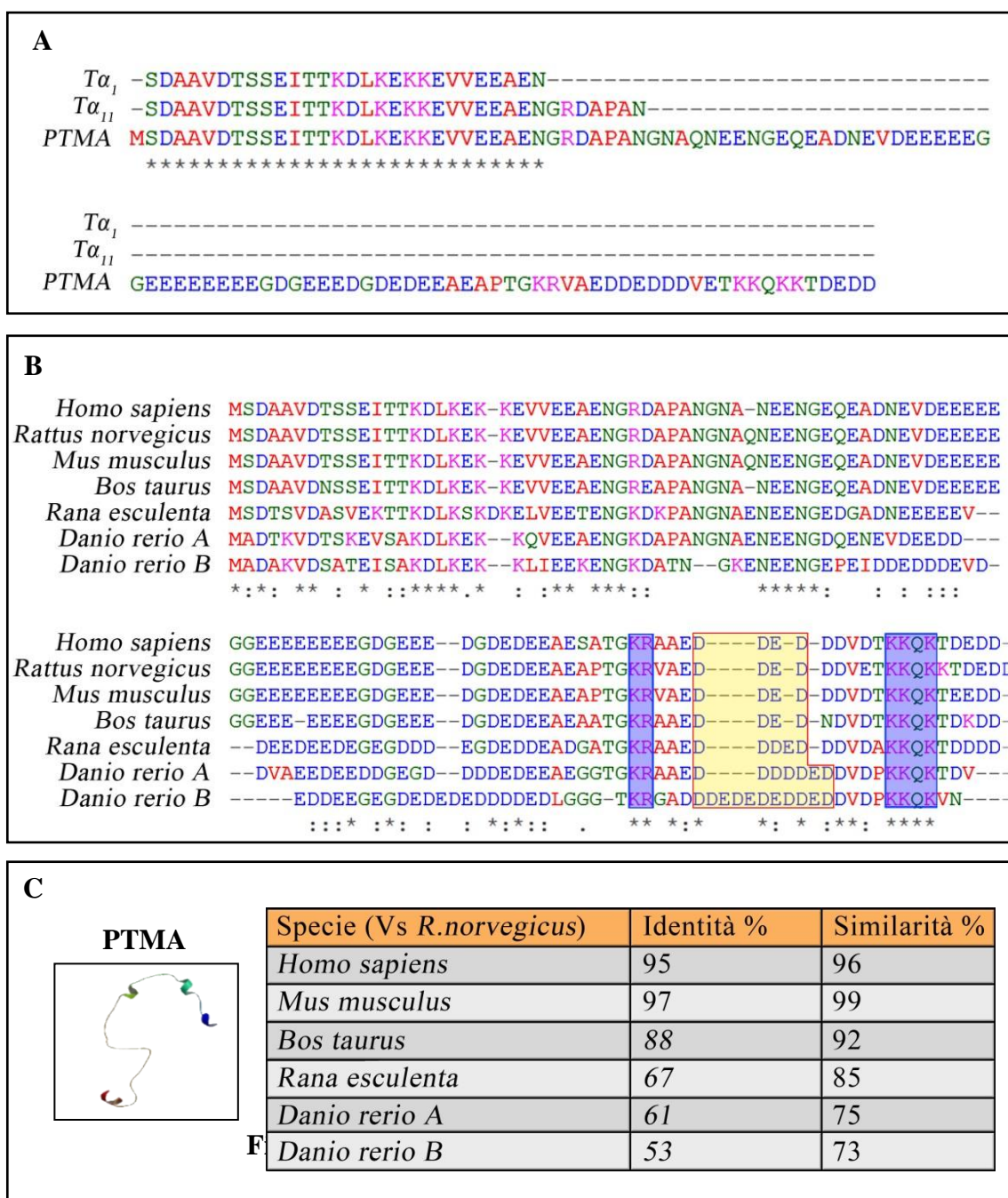
da uno stesso precursore in seguito a differenti tagli proteolitici. Successivamente, da timociti di ratto è stato isolato un polipeptide di 112 residui aminoacidici contenente la sequenza della timosina- $\alpha$ 1 alla sua estremità N-terminale. Questo nuovo peptide è stato denominato PTMA, in quanto si è ipotizzato che potesse essere un precursore della timosina- $\alpha$ 1. A tale ipotesi ne è stata in seguito affiancata una opposta che indicava il peptide più corto come il possibile prodotto artificiale di proteolisi, avvenuta durante la procedura sperimentale di isolamento (Goodall et al., 1986). Nel 2003, grazie ad esperimenti condotti sia *in vivo* sia *in vitro*, è stato possibile dimostrare che la timosina- $\alpha$ 1 è 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); 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 (Thrumboore 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.

## ***1.2- Caratteristiche di PTMA e della famiglia genica***

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 aminoacidi aromatici (dunque, non assorbe a 280 nm), di cisteine o metionine, mentre circa metà della struttura primaria è rappresentata da aminoacidi 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 della sequenza NLS risulta in una marcata redistribuzione della proteina nel citoplasma cellulare.

**Figura 1.1**



**1.1A** –Allineamento delle sequenze di Ta1, Ta11 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 ortologhi. Alla sinistra, una rappresentazione della conformazione random coil di PTMA. Dati ottenuti con blastp, confrontati con ClustalW2.

Questo segnale di localizzazione nucleare bipartito è separato da 12 (Mammiferi), 13 (*Rana esculenta*) e 14 (*Danio rerio*) residui aminoacidici principalmente acidi, che mostrano motivi sovrapponibili -DXXD- conformi ai siti di reclutamento della caspasi-3 (Fig. 1.1B): il taglio di PTMA a livello di tali siti induce la perdita del segnale NLS e, di conseguenza, della sua capacità di entrare nel nucleo.

A livello genomico PTMA 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 and 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 and 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. Il gene *ptma* è tra i loci più espressi nell'uomo, insieme alla heat shock protein 90 (HSP90), alla catena leggera della miosina e alle proteine ribosomali (Adams et al., 1995). Gli mRNA codificanti per tale proteina sono stati riscontrati in tutti i tessuti di Mammifero esaminati finora, inclusi il timo, l'ovario, il rene, il cervello, il cuore, il fegato, la milza, il muscolo, l'intestino, il polmone, il cervelletto ed il testicolo (Clinton et al., 1989). La particolare struttura e l'associazione con diversi partner molecolari hanno suggerito che PTMA possa svolgere funzioni fisiologiche lontane dalla sua natura immunogenica.

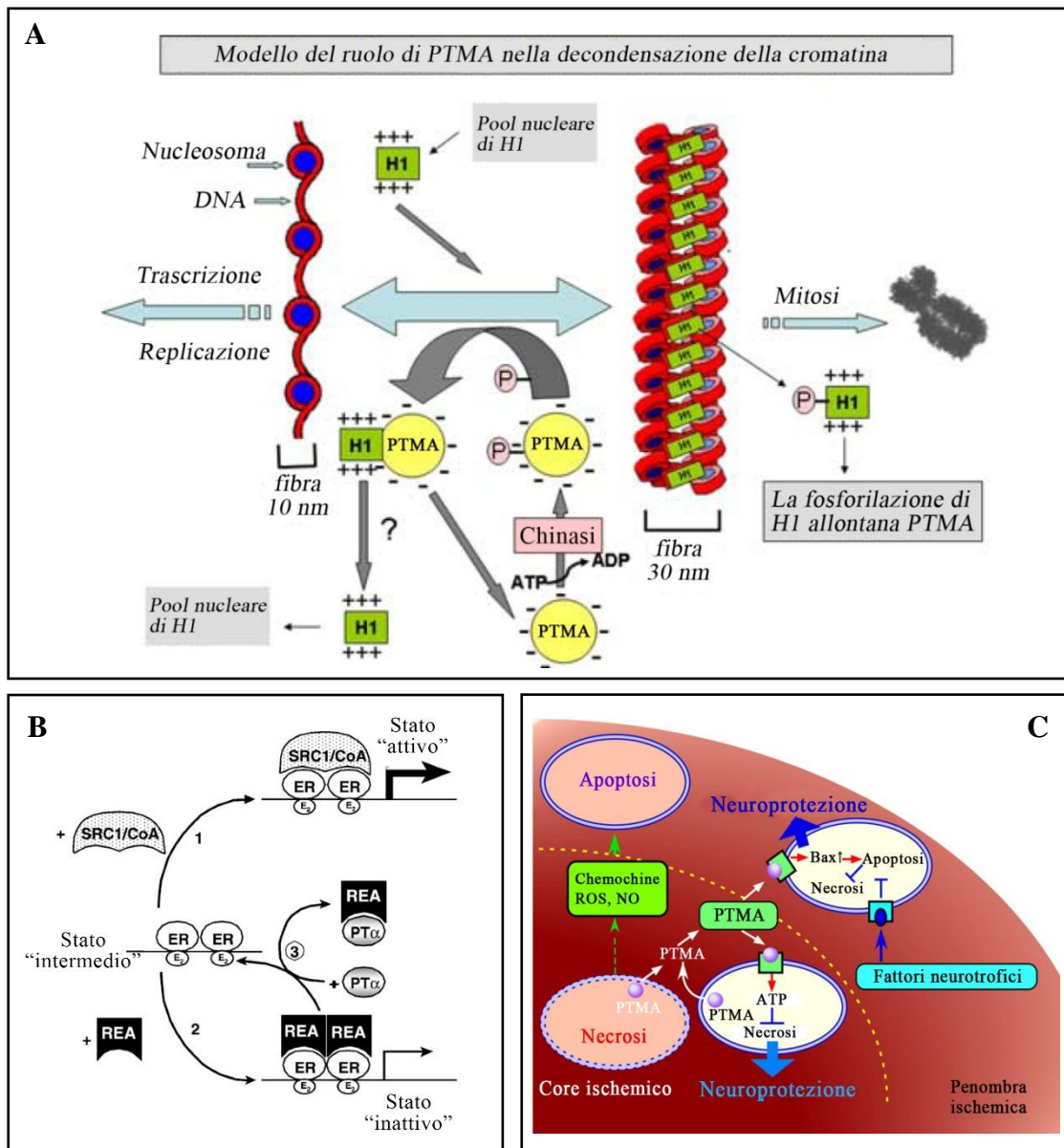
### ***1.3- Ruolo biologico di PTMA***

Diversi studi hanno dimostrato che PTMA è coinvolta in vari processi biologici essenziali, agendo sia a livello intracellulare che extracellulare, 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; anche se il principale ruolo fisiologico è tuttora oggetto di dibattito.

Uno degli aspetti funzionali maggiormente riconosciuti di PTMA è sicuramente la sua associazione con la proliferazione cellulare. Ciò è principalmente dovuto al suo coinvolgimento nel fenomeno del 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. In particolare è stato verificato il suo legame in vitro con gli istoni H3 e H4 (Diaz-Jullien et al., 1996) e, in maniera più specifica, con l'istone H1 (Papamarcaki and Tsolas, 1994), di cui modula l'interazione con la cromatina (Karetsou et al., 1998). Esperimenti eseguiti incubando cromosomi in metafase con PTMA hanno permesso di dimostrare una reale interazione della proteina con l'istone H1 con conseguente decondensazione della cromatina (Boàn et al., 2001). L'attività di PTMA sulla cromatina è mediata dalla sua interazione con l'estremità N-terminale della proteina legante CREB (CBP), un coattivatore trascrizionale molto versatile, che la guida alle regioni promotrici promuovendo la riorganizzazione o lo spiazzamento degli istoni stessi, con conseguente decondensazione della cromatina, in maniera tale da consentire il passaggio dell'RNA polimerasi II e promuovere la trascrizione indotta da fattori quali AP1 e NF-kB (Karetsou et al., 2002). 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. 1.2).

**Figura 1.2**



**Fig. 1.2** – Alcune funzioni di PTMA.

**1.2A** – Modello del ruolo di PTMA nel rimodellamento della cromatina (modificato da Gómez-Márquez, 2007).

**1.2B** – Ruolo di PTMA nel potenziamento di ER (modificato da Martini et al., 2003).

**1.2C** – Funzione neuroprotettiva di PTMA in caso di ischemia (modificato da Ueda 2009).

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 and Brown, 2010). Il ruolo di PTMA nella regolazione dell'espressione genica si esplica anche nella partecipazione ad alcuni pathways trascrizionali, quali ad esempio quello degli estrogeni.

PTMA, infatti, aumenta selettivamente l'attività trascrizionale del recettore degli estrogeni (ER) interagendo con un repressore, la proteina di 37 kDa denominata REA, che compete nel legame con il recettore con un complesso coattivatore denominato, invece, SRC1/CoA. PTMA, andandosi a legare specificamente a REA, inibisce il legame di tale repressore con il recettore, rendendo il complesso estrogeni-ER accessibile a coattivatori come SRC1/CoA, con conseguente aumento della trascrizione di geni bersaglio (Martini et al., 2000). E' stato inoltre riportato che i livelli di espressione di PTMA variano in seguito a stimolazione da parte degli estrogeni. Tali ormoni, infatti, legati specificamente al recettore ER, determinano un aumento della trascrizione di PTMA. Questo meccanismo di feedback positivo contribuisce all'iperproliferazione alla base dell'insorgenza del cancro al seno (Bianco and Montano, 2002). Nell'ambito della regolazione dell'espressione genica, è stato inoltre dimostrato che PTMA è capace anche di inibire il processo di trascrizione. Esperimenti condotti su macrofagi infettati con il virus HIV-1 hanno, infatti, rilevato un'interazione della proteina con l'enzima istone deacetilasi (HDAC) con conseguente blocco della replicazione del virus stesso.

Il coinvolgimento di PTMA nell'induzione della carcinogenesi non è solo dovuto ad una sua partecipazione all'attivazione della proliferazione cellulare, ma anche all'inibizione dell'apoptosi. In tale processo PTMA agisce come regolatore negativo inibendo l'attivazione della caspasi-9, bloccando così la formazione dell'apoptosoma, un complesso multi-molecolare che a sua volta attiva le pro-caspasi effettrici 3 e 7, responsabili della



degradazione delle proteine citoscheletriche e di quelle della matrice nucleare (Jiang et al., 2003). L'azione di PTMA a carico della caspasi-9 è collegata a quella di una small-stress protein, denominata p8, con la quale la proteina 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 over-espressione di entrambe le proteine, mentre si è osservato un aumento di tale attività in caso di iperproduzione di una sola delle due, a dimostrazione del fatto che l'attività anti-apoptotica è legata alla formazione del complesso p8/protimosina (Malicet et al., 2006). Poichè PTMA è essa stessa substrato della caspasi-3, l'inibizione della formazione dell'apoptosoma potrebbe essere abolita, una volta che il pathway apoptotico fosse attivato da altre vie, dal taglio della proteina in questione.

PTMA protegge le cellule dall'apoptosi anche regolando geni responsabili della difesa contro lo stress ossidativo (Evstaf'eva et al., 2005); non solo, sembra che la proteina promuova la sopravvivenza cellulare intervenendo nel *pathway* di Bcl-2. E' stato ipotizzato che PTMA possa addirittura avere un ruolo nello "switch" apoptosi/autofagia (Wang and Pan, 2007) e nello "switch" apoptosi/necrosi (Fig. 1.2C), rivelando un suo possibile impiego terapeutico, ad esempio in caso di danno ischemico (Cannavo et al., 2013).

E' importantissimo anche considerare la funzione extracellulare di PTMA. Questa proteina è stata, infatti, chiamata "ormone timico", in quanto ritrovata anche nel siero del sangue. Diversi studi hanno dimostrato che la funzione extracellulare di PTMA sarebbe quella di modulatore del sistema immunitario. Si è, infatti, visto che questo peptide è in grado di indurre la maturazione, il differenziamento e la proliferazione dei linfociti T, in risposta a specifici antigeni cellulari, e di indurre l'espressione del gene che codifica per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II in diversi tipi di cellule, incluse cellule di linee tumorali (Baxevanis et al., 1992). PTMA può mediare la funzione immunitaria

conferendo anche una certa resistenza a diversi tipi di infezioni, come ad esempio quelle provocate da *Candida albicans* o *Listeria monocytogenes*. A tale riguardo, si può ipotizzare in futuro l'uso di questa proteina nella terapia clinica.

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 coinvolgimento del peptide nelle fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi in tutti i Vertebrati esaminati, inoltre di recente è stata evidenziata la localizzazione di PTMA anche nei gameti dei Mammiferi (Aniello et al. 2002; Ferrara et al., 2013, 2010, 2009; Prisco et al., 2009).

## 2. Scopo della ricerca

La caratteristica adozione di una conformazione random-coil (Gast et al., 1995), oltre alla forte componente acida, rende la protimosina- $\alpha$  (PTMA) una proteina capace di interagire con molti partner molecolari e favorisce la sua estesa localizzazione (Enkermann et al., 2000; Mosoian, 2011), consentendo la sua partecipazione in un elevato numero di processi biologici (Piñeiro et al., 2000; Hannappel and Huff, 2003; Ueda, 2008; Mosoian, 2011). Tuttavia, non è stata ancora chiarita la sua principale funzione fisiologica. Di particolare 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* (Dosil et al., 1990; Rosón et al., 1990). Nel 2002 il gruppo per cui ho svolto l'attività di dottorato, mediante un approccio di librerie di cDNA sottrattive ha isolato, nel testicolo di *Pelophylax esculentus*, un cDNA codificante per una proteina avente un'elevata identità di sequenza con PTMA dei Mammiferi. Questa proteina è espressa in maniera pressoché ubiquitaria in una varietà di tessuti, testicolo compreso; malgrado ciò, molto poco si conosce sul suo possibile ruolo nella riproduzione, e più nello specifico nella gametogenesi maschile. Dal 2002 ad oggi il nostro gruppo ha riportato la conservazione dell'espressione testicolare di PTMA dai Vertebrati non-mammiferi (*Pelophylax esculentus*) a quelli mammiferi (*Rattus norvegicus*): il trascritto è espresso nelle fasi meiotiche e post-meiotiche della spermatogenesi; l'espressione della proteina si estende anche agli spermatozoi in associazione con il sistema acrosomale in via di formazione (SPZ) (Aniello et al, 2002; Ferrara et al, 2009 e 2010). Dati recenti hanno mostrato che la proteina nel Mammifero *Rattus norvegicus* è specificamente localizzata a livello acrosomale, e per la prima volta che la proteina mantiene la sua localizzazione anche

negli SPZ umani (hSPZ). Analisi condotte su SPZ di ratto e di uomo hanno, inoltre, evidenziato che PTMA non fa parte del contenuto solubile dell'acrosoma ma è specificamente associata alla membrana acrosomale interna. Questi dati dimostrano che la specifica distribuzione di PTMA è conservata anche negli SPZ umani e supporta l'ipotesi di un suo probabile ruolo nei fondamentali eventi della fecondazione (Ferrara et al., 2013).

Finora, non sono stati condotti studi della protimosina- $\alpha$  durante la spermatogenesi del comune modello Vertebrato non mammifero, *Danio rerio*, un telosteo in cui sono stati descritti e caratterizzati due geni paraloghi, *ptmaa* e *ptmab*, durante l'embriogenesi (Donizetti et al., 2008).

Data l'associazione di PTMA con l'acrosoma dei Mammiferi, risulta interessante lo studio dell'espressione di questo peptide nella gonade maschile del teleosteo, che presenta tubuli anastomizzati nel cui lume vengono rilasciati spermatozoi privi della vescicola acrosomale. Allo scopo di ampliare l'analisi comparativa, in questa prima parte del lavoro di tesi è stato condotto uno studio della espressione e della localizzazione di Ptma durante la spermatogenesi di zebrafish. In prima analisi è stata valutata l'espressione di entrambi i trascritti (*ptmaa* e *ptmab*), in diversi tessuti inclusi i testicoli, ed è stata studiata la localizzazione degli mRNA nel testicolo adulto. Inoltre è stata analizzata l'espressione e la localizzazione della proteina nel medesimo tessuto. In seguito ai risultati ottenuti, sono state eseguite analisi di immunofluorescenza su sezioni di testicolo allo scopo di ottenere un migliore dettaglio circa la distribuzione di PTMA nei gameti di zebrafish.

## 3. Materiali e Metodi

### 3.1 - *Prelievo di tessuti dal modello sperimentale Danio rerio*

Esemplari maschi di *Danio rerio* (Cypriniformes), sono stati tenuti in vasche contenenti circa una densità di 1 pesce per 2 L di acqua, con un regime di luce-buio di 14/10 ore rispettivamente ad una temperatura di 28.5°C. Gli animali sono stati sacrificati tramite immersione in una soluzione di 0.04% (w/v) MS-222 (Tricaine Methanesulfonate), in accordo con le direttive nazionali e locali riguardanti gli esperimenti sugli animali. Da ogni animale sono stati prelevati muscolo, intestino, cuore, cervello, ovario e testicoli; tutti i tessuti sono stati rapidamente immersi in azoto liquido e conservati -80°C per l'impiego nell'estrazione di RNA e proteine; mentre un testicolo per animale è stato immerso nel fissativo di Bouin per eseguire l'inclusione in paraffina e la successiva analisi di microscopia ottica. 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 sono stati sacrificati mediante decapitazione, in seguito ad anestesia con Ketamina (100mg/kg i.p.). Quindi, testicoli di ratto adulto sono stati prelevati e conservati a -80°C fino all'estrazione delle proteine, e usati come controllo positivo nell'analisi di Western Blot.

### ***3.2 - Estrazione di RNA totali da tessuti, RT-PCR, clonaggio e sequenziamento***

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 18S e 28S. I campioni sono stati conservati a -80°C. 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 ora, al termine della quale l'enzima è stato inattivato a 75°C per 15 minuti. 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, come descritto da De Rienzo et al. (2002) e Ferrara et al. (2004). Per studiare il profilo di espressione della protimosina- $\alpha$  sono stati progettati oligonucleotidi basati sulla sequenza di *Danio rerio* di *ptmaa* (GenBank accession no. NM\_194376.2) e di *ptmab* (GenBank accession no. NM\_001098730.1). Gli inneschi selezionati sono i seguenti:

zfPtmaa for=5'-CATTTAGGAAAAATGGCTGACACA-3';

zfPtmaa rev=5'-TGAGAACATTTCCAGCAGTGAAGC-3';

zfPtmaab for=5'-TACACAACATTAATTATGGCAGAT-3';

zfPtmaab rev=5'-GCTCAGCAATATGAAACAATCCTT-3'.

Come controllo è stato amplificato un trascritto definito Ribosomal Protein Large P0 (rplp0) (GenBank accession no. NM\_031144), con i seguenti inneschi:

Rplp0 for=5'-ATCTCCAGAGGAACCATGAAA-3';

Rplp0 rev= 5'-AAGCCCATGTCTTCATCAGACT-3'.

L'amplificazione è stata condotta per 30 cicli, con temperatura di denaturazione 94°C per 30 secondi, appaiamento di 58°C (*ptmaa* e *ptmab*) o 62°C (rplp0) per 45 secondi ed allungamento a 72°C per 45 secondi, usando la Taq Polymerase Recombinant kit (Invitrogen; Milan, Italy). I prodotti di RT-PCR attesi sono: 357 cd per *ptmaa*, 360 cp per *ptmab* e 497 cp per rplp0. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante gel elettroforesi con agarosio 1,5% in TAE 1x (Tris/Acido acetico/EDTA) con bromuro di etidio a una concentrazione finale di 0,5 µg/mL. I frammenti di cDNA ottenuti dall'amplificazione mediante PCR (*zfptmaa* and *zfptmab*) sono stati purificati dal gel tramite "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden, Germania), e clonati in pGEM®-T Easy Vector seguendo le istruzioni del produttore (Invitrogen; Milan, Italy). 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. Le sequenze sono state poi confrontate con quelle presenti in Genbank.

### ***3.3 - Controllo della qualità del tessuto testicolare e classificazione delle cellule germinali***

Allo scopo di valutare la qualità del tessuto analizzato, sezioni di testicolo di 5  $\mu\text{m}$  sono state colorate mediante ematossilina-eosina (Fig. 4.2). Le cellule germinali nei tubuli sono state caratterizzate prendendo in esame la forma, numero e morfologia, in accordo con le precedenti classificazioni (Leal et al., 2009; Rupik et al., 2011; Schulz et al., 2010).

### ***3.4 - Ibridazione in situ***

L'analisi di localizzazione dei trascritti su sezioni di testicolo (5  $\mu\text{m}$ ) è stata eseguita seguendo la stessa procedura come descritto da Ferrara et al. (2009): il vettore pGEM®-T Easy contenente il cDNA di *ptmaa* o *ptmab* è stato linearizzato con gli enzimi NcoI o Sall (Fermentas; Milan, Italy), per sintetizzare sonde senso ed antisense, tramite le polimerasi SP6 o T7 rispettivamente. Entrambe le sonde sono state preparate utilizzando il kit Dig RNA Labeling (Roche Diagnostics, Monza, Italy), seguendo le indicazioni del produttore.

### ***3.5 - Estrazione di proteine totali ed analisi di Western blot***

I testicoli (di ratto e zebrafish) sono stati sottoposti a lisi in RIPA buffer [1% NP-40, 0.1% SDS, 100 mM sodio ortovanadato, 0.5% sodio deossicolato in PBS (buffer fosfato salino: 13.6 mM NaCl; 2.68 mM; KCl; 8.08 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.4)] in presenza di una serie di inibitori di proteasi: 4 mg/mL di leupeptina, aprotinina, pepstatina A, chimostatina, PMSF, e 5mg/mL di TPCK. Gli omogenati sono stati sonicati con 3 impulsi da 20 Hertz della durata di 20 secondi ognuno e



successivamente centrifugati per 30 minuti 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 Lowry. Proteine di testicolo (100 µg) 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 2.5 ore a 4°C. I filtri sono stati poi trattati per 3 ore con una soluzione di bloccaggio (5% latte in PBS pH 7.4 e 0.1% di Tween-20), prima di aggiungere l'anticorpo primario (zebrafish Ptmaa anticorpo policlonale diluito 1:1000; Ferrara et al., 2013, 2010, 2009; Prisco et al., 2009) e incubati per una notte a 4°C. Successivamente i filtri sono stati sottoposti a tre lavaggi, in PBS pH 7.4, e incubati con IgG secondarie anti -Fc di coniglio coniugate con la perossidasi di rafano (DAKO; Glostrup, Denmark). I filtri sono stati lavati come descritto prima e gli immunocomplessi rilevati utilizzando ECL-Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK). I risultati mostrati rappresentano tre esperimenti indipendenti. La reattività dell'anticorpo verso entrambe Ptmaa e Ptmaab è stata verificata via bioinformatica: le sequenze di Ptmaa (GenBank accession no. NP\_919357.2) e Ptmaab (GenBank accession no. NP\_001092200.1) sono state allineate e comparate utilizzando BLAST Bl2seq tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and EMBL-EBI Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Le due sequenze mostrano alta similarità, specialmente nella loro regione N-terminale (aa 1-43), dove mostrano una identità del 72%. Poiché l'intera sequenza codificante per Ptmaa è stata iniettata in coniglio, l'antisiero prodotto riconosce entrambe le proteine.

### ***3.6 - Immunoistochimica***

Per eseguire la localizzazione di Ptma nel testicolo di zebrafish, sezioni di 5 µm di tessuto sono state reidratate e processate come descritto precedentemente da Ferrara et al. (2009). Allo scopo di controllare la specificità della reazione immune, i controlli sono stati trattati omettendo l'anticorpo primario o utilizzando il siero preimmune.

### ***3.7 - Analisi di immunofluorescenza***

Esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti seguendo lo stesso protocollo di quello utilizzato per l'immunoistochimica, con alcune variazioni. In breve: le sezioni di 5 µm sono state deparaffinate, reidratate, e dopo lavate con PBS. Terminata questa fase i vetrini sono stati posti per 5 minuti in una soluzione di citrato 0.01M pH 6 portato alla temperatura di 100°C, per permettere l'esposizione dell'antigene riconosciuto dall'ab primario contro Ptma. I siti non specifici sono stati bloccati utilizzando un siero appropriato diluito 1:5 in PBS contenente 5% di BSA, prima dell'aggiunta dell'anticorpo primario (zebrafish Ptmaa anticorpo policlonale; Ferrara et al., 2013) diluito 1:50 e incubato una notte a 4°C. Dopo i lavaggi in PBS, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo secondario (Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit; Invitrogen; Paisley, UK) diluito 1:500 nella stessa soluzione di bloccaggio. Infine i vetrini sono stati montati con Vectashield+DAPI (Vector Laboratories; Peterborough, UK) per la marcatura nucleare e, in seguito, visualizzati al microscopio ottico (Leica DM 5000 B+CTR 5000) con la lampada UV, per mezzo del software IM1000.

## 4. Risultati

### 4.1 - *Espressione di ptmaa e ptmab nei tessuti di zebrafish*

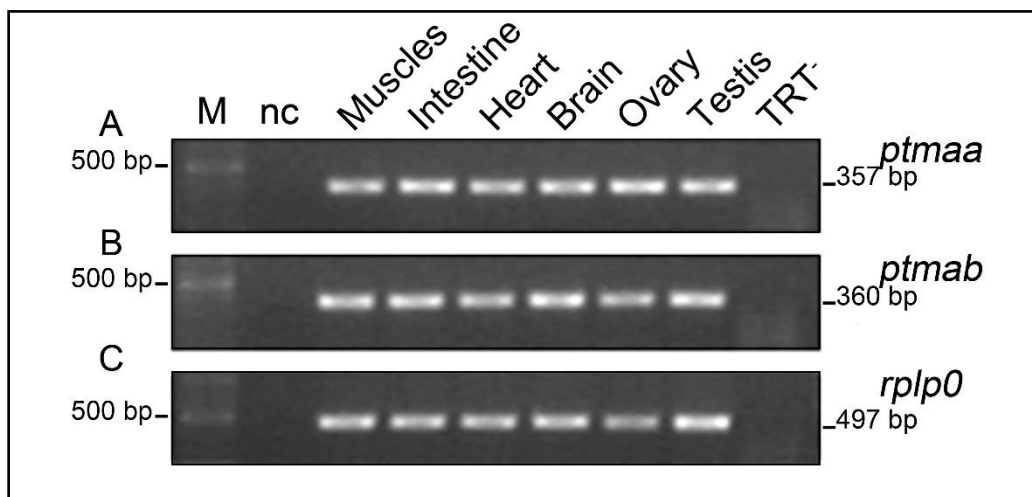
In prima analisi è stata valutata l'espressione di *ptmaa* e *ptmab* tramite RT-PCR in diversi tessuti di zebrafish, compreso il testicolo (Fig. 4.1). L'elettroforesi su gel di agarosio ha rivelato una singola banda di amplificato delle dimensioni attese (357 cb per *ptmaa*, 360 cb per *ptmab*) in tutti i campioni. L'amplicone di interesse è stato clonato e sequenziato, confermando la corrispondenza con il trascritto di *ptma*. Per assicurare la qualità dello stampo è stata eseguita una PCR per il gene *rplp0*, codificante per la proteina ribosomale corrispondente, mentre l'analisi sui campioni per il controllo negativo (RT<sup>-</sup>) non ha prodotto bande di amplificato (dato non mostrato).

### 4.2 - *Localizzazione di ptma nel testicolo adulto di zebrafish*

Allo scopo di controllare la qualità del tessuto e distinguere i diversi tipi di cellule germinali nei tubuli seminiferi, è stata eseguita una colorazione ematossilina-eosina delle sezioni di testicolo (Fig. 4.2). Dopo aver confermato la presenza dei trascritti nel tessuto di interesse, è stata studiata la localizzazione degli stessi tramite analisi di ibridazione *in situ*. Le sonde antisense dei due trascritti, hanno permesso di determinare che *ptma* è localizzato nel compartimento interstiziale (cellule di Leydig; fig. 4.3C) e nei tubuli, dove il segnale è ritrovato nelle cellule meiotiche e post-meiotiche. Specificamente, il trascritto è presente negli spermatociti (SPC), in diverse fasi (leptotene/zigotene, pachitene e diplotene/metafase I;

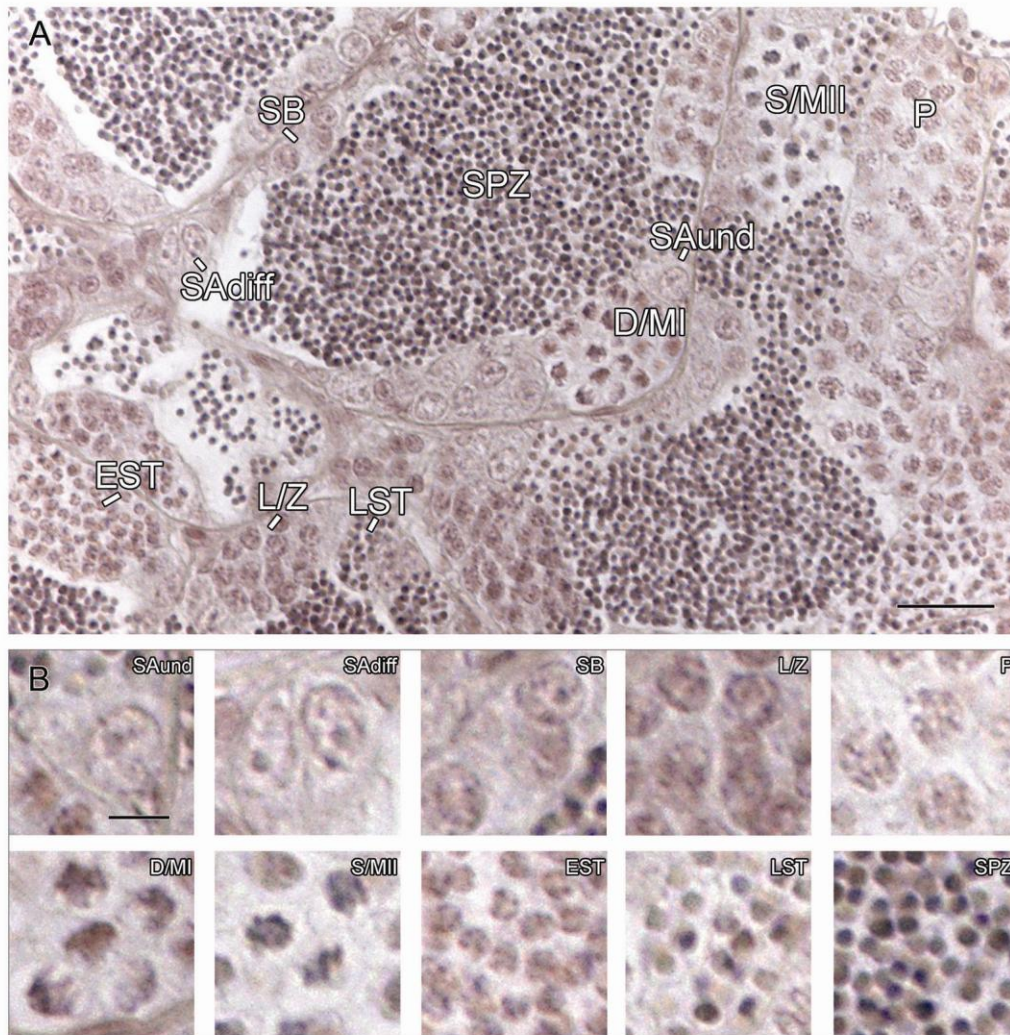
Fig.4.3A, B), come negli spermatidi (SPT; Fig.4.3A), mentre nessun segnale è stato evidenziato dagli spermatogoni A indifferenziati (SPG; Fig. 4.3A, B) agli SPG B (Fig. 4.3A). L'ibridazione con cRNA senso impiegato come controllo negativo non ha dato alcun segnale. La figura 4.3 si riferisce ai risultati ottenuti per *ptmaa*, equivalenti anche per *ptmab* (dato non mostrato).

**Figura 4.1**



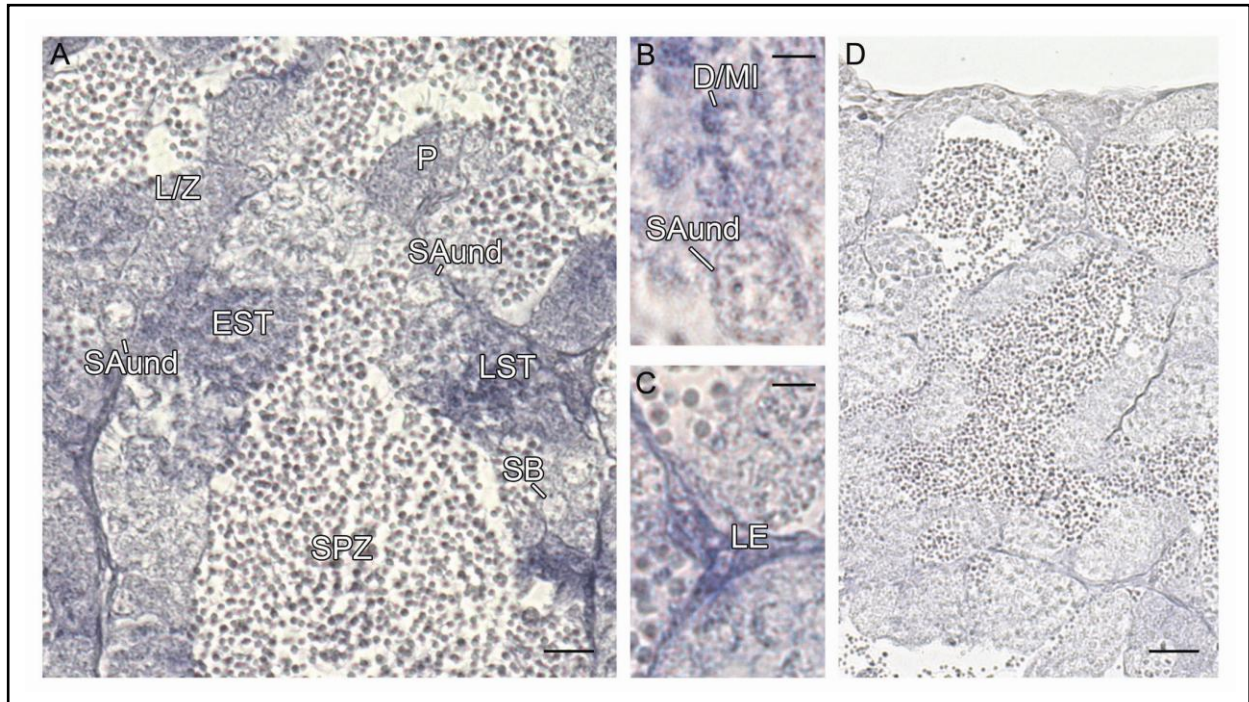
**Fig. 4.1. Espressione di *ptmaa* e *ptmab* nei tessuti di zebrafish.** Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR. Entrambi i trascritti *ptmaa* (A) e *ptmab* (B) sono presenti in tutti i tessuti analizzati. La qualità dei campioni di cDNA è stata controllata tramite amplificazione di un gene costitutivo di zebrafish: Ribosomal Protein Large P0 (*rplp0*). M: marker di peso molecolare (GeneRuler Express DNA Ladder). nc: controllo negativo, senza cDNA. TRT-: controllo negativo specifico del testicolo, effettuato omettendo la trascrittasi inversa.

**Figura 4.2**



**Fig. 4.2. Istologia del testicolo adulto di zebrafish.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di tessuto nel quale sono evidenziate i diversi tipi di cellule germinali (A). (B) Ingrandimento delle cellule germinali, che mostra la loro differente dimensione e morfologia (Schulz et al., 2010). SAund e SAdiff: indifferenziati e differenziati A SPG; SB: B SPG. L/Z: SPC primari in leptotene/zigotene; P: SPC primari in pachitene; D/MII: SPC primari in diplotene/metafase I; S/MII: SPC secondari in metafase II; EST: SPT precoci; LST: SPT tardivi; SPZ: spermatozoi; LE: cellule di Leydig. Le barre rappresentano 20  $\mu\text{m}$  in (A), 5  $\mu\text{m}$  in (B).

**Figura 4.3**

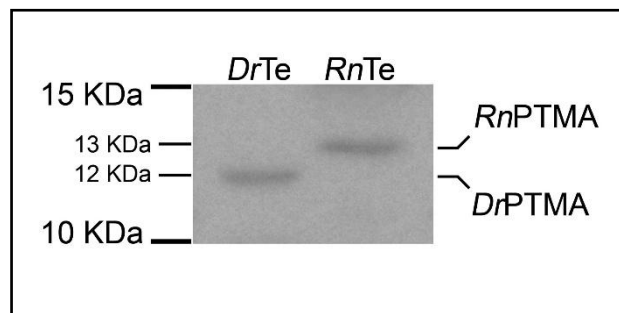


**Fig. 4.3. Localizzazione di *ptmaa* nel testicolo adulto di zebrafish.** Le sezioni sono state trattate con sonda senso (A); ingrandimento in (B, C); o sonda antisenso come controllo negativo (D). Il segnale blu indica le cellule positive, che includono SPC meiotici [leptotene/zigotene e pachitene in (A); diplotene/metafase in (B)], SPT post-meiotici [precoci e tardivi in (A)], cellule di Leydig (C). SPG di tipo A (A, B) e di tipo B (A) sono entrambi negativi. La sonda antisenso per *ptmab* evidenzia lo stesso risultato (dato non mostrato). SAund: SPG A indifferenziati; SB: SPG B; L/Z: SPC primari in leptotene/zigotene; P: SPC primari in pachitene; D/MI: SPC primari in diplotene/metafase; EST: SPT precoci; LST: SPT tardivi; SPZ: spermatozoi; LE: cellule di Leydig. Le barre rappresentano 10  $\mu\text{m}$  in (A), 5  $\mu\text{m}$  in (B, C), 20  $\mu\text{m}$  in (D).

### 4.3 - Espressione di Ptma nel testicolo adulto di zebrafish

La presenza del polipeptide è stata verificata tramite *Western Blotting* su estratti proteici totali di testicolo di zebrafish e di ratto adulto (come controllo positivo; Ferrara et al., 2010), per mezzo di un anticorpo policlonale contro Ptma di zebrafish (Ferrara et al., 2013), visualizzando le rispettive bande specifiche di 12kDa (zebrafish) e di 13kDa (ratto; Fig. 4.4). L'analisi bioinformatica dell'epitopo ha confermato la capacità di tale anticorpo di riconoscere entrambe le proteine (Ptmaa, Ptmaab).

**Figura 4.4**



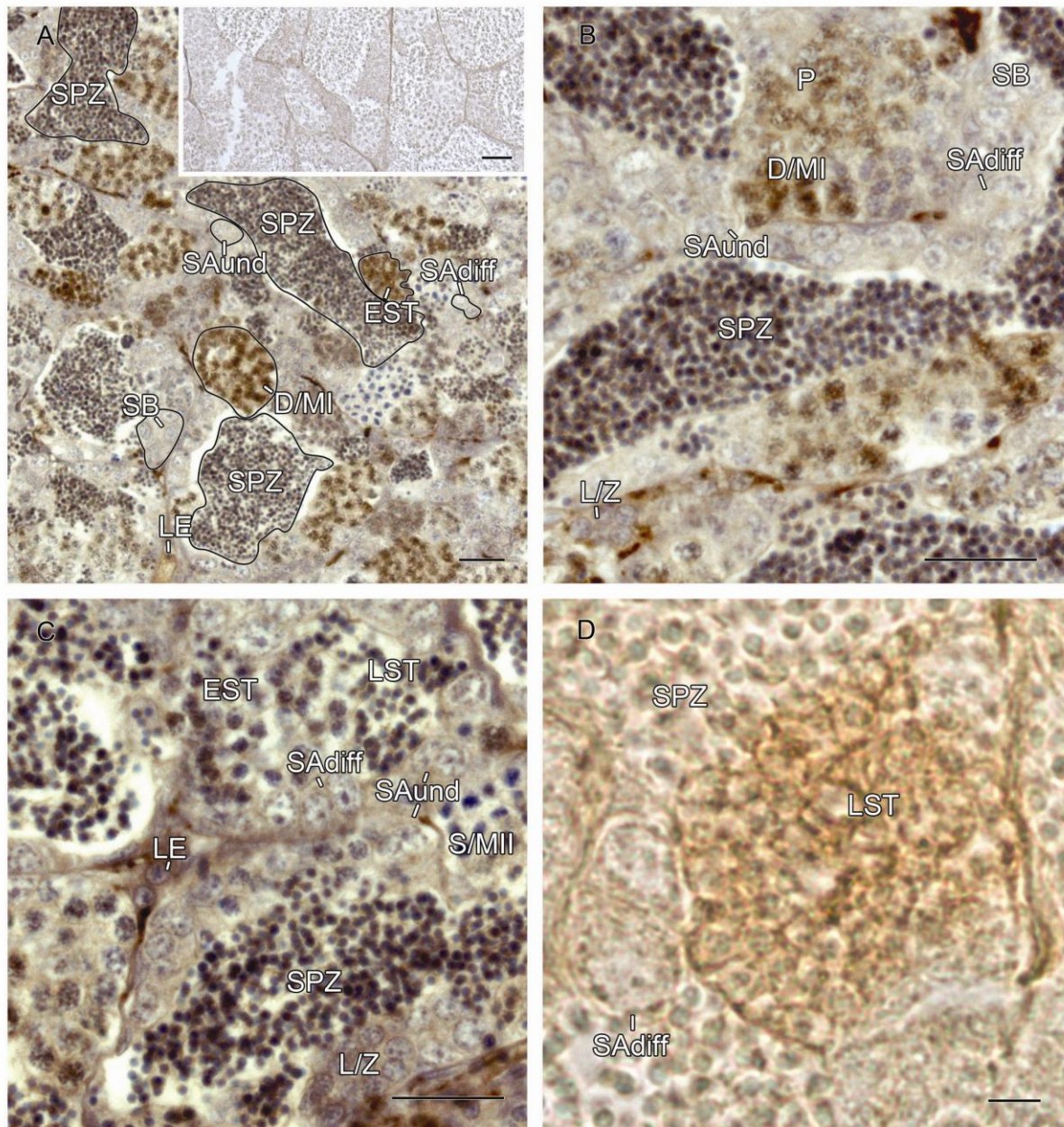
**Fig. 4.4. Espressione di Ptma nel testicolo adulto di zebrafish.** Western blot per Ptma effettuato su estratti proteici totali di testicolo di zebrafish e testicolo di ratto come controllo. L'analisi mostra una singola banda delle dimensioni attese (12kDa) per Ptma di zebrafish. *DrTe*: testicolo di zebrafish; *RnTe*: testicolo di ratto (controllo positivo, Ferrara et al., 2010); *DrPtma*: banda di Ptma in zebrafish; *RnPTMA*: banda di PTMA in ratto.

#### ***4.4 - Localizzazione di Ptma nel testicolo adulto di zebrafish***

Dopo aver determinato la localizzazione dell'mRNA della protimosina, è stata studiata la distribuzione della proteina nella gonade per mezzo di immunistochemica su sezioni. Coerentemente con quanto osservato per il trascritto, Ptma è stata identificata nel citoplasma delle cellule di Leydig (Fig. 4.5A, C e Fig.4.7). Nel compartimento tubulare, nessun segnale è stato rivelato nelle cellule goniali (Fig. 4.5A, B, C, D e Fig. 4.7); la proteina inizia ad essere espressa nella regione perinucleare degli SPC in leptotene/zigotene (Fig. 4.5B, C e Fig. 4.7); in seguito la localizzazione si estende nella regione cromatinica degli SPC in pachitene e diplotene/metafase I (Fig. 4.5A, B, C e Fig. 4.7). È interessante notare che il segnale di Ptma nel compartimento germinale è quasi assente negli SPC secondari (Fig. 4.5C, e Fig. 4.7), dopo appare negli SPT precoci (Fig. 4.5A, C) nella regione perinucleare. Infine, risulta ancora evidente negli SPT tardivi fino agli spermatozoi (SPZ). In particolare, l'analisi immunistochemica, senza il contrasto nucleare dato dalla colorazione con ematossilina, mostra la presenza di Ptma negli SPT tardivi (Fig. 4.5D) ma non permette di verificare il segnale negli SPZ maturi. I controlli negativi non mostrano alcuna marcatura (Fig. 4.5A, inserto). Inoltre è stato composto uno schema (Fig. 4.7) di sette figure che ricapitola la localizzazione di Ptma durante la spermatogenesi di zebrafish.



**Figura 4.5**

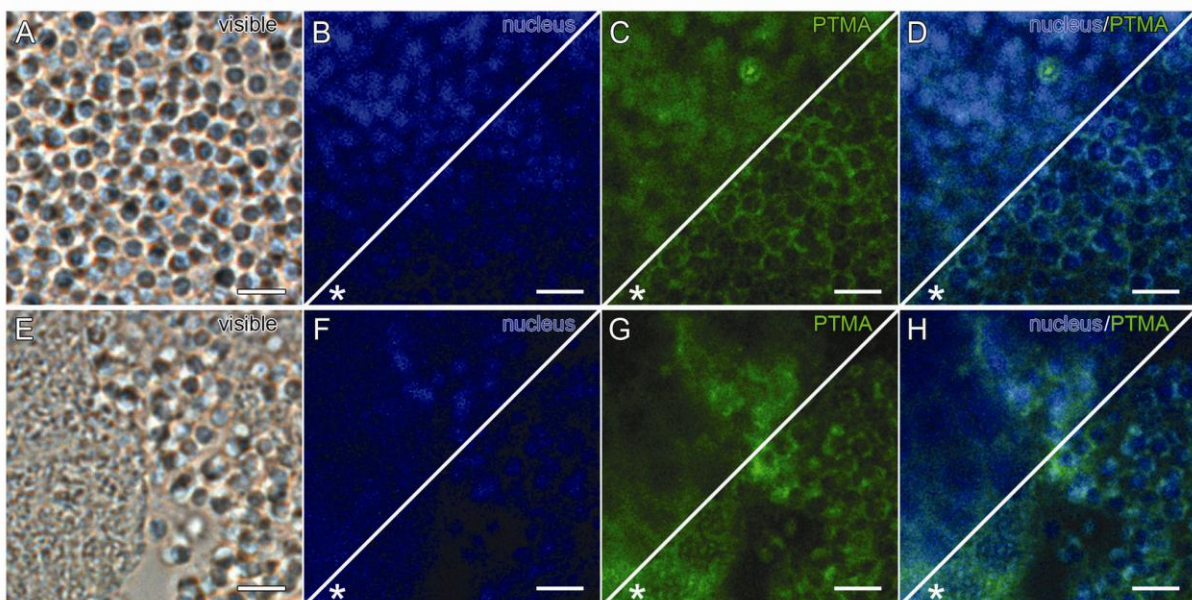


**Fig. 4.5. Immunolocalizzazione di Ptma nel testicolo adulto di zebrafish.** (A) Aspetto generale di sezioni di testicolo incubate con anticorpo anti-Ptma e contrastate con ematossilina. L'inserto mostra un controllo negativo per omissione dell'anticorpo primario. (B, C) Ingrandimenti. (D) Ingrandimento di una sezione non contrastata, che evidenzia la marcatura di uno SPT tardivo. Tutte le cellule meiotiche sono positive, con l'eccezione degli SPC secondari. Anche le cellule post-meiotiche sono positive, mentre quelle mitotiche sono negative; infine, le cellule di Leydig sono positive. SAund e SAdiff: SPG A indifferenziati e differenziati; SB: SPG B. L/Z: SPC primari in leptotene/zigotene; P: SPC primari in pachitene; D/MI: SPC primari in diplotene/metafase I; S/MII: SPC secondari in metafase II; EST: SPT precoci; LST: SPT tardivi; SPZ: spermatozoi; LE: cellule di Leydig. Le barre rappresentano 20  $\mu\text{m}$  in (A-C) e nell'inserto in (A), in (D) le barre rappresentano 5  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 - Analisi di localizzazione di Ptma tramite immunofluorescenza in spermatozoi di zebrafish

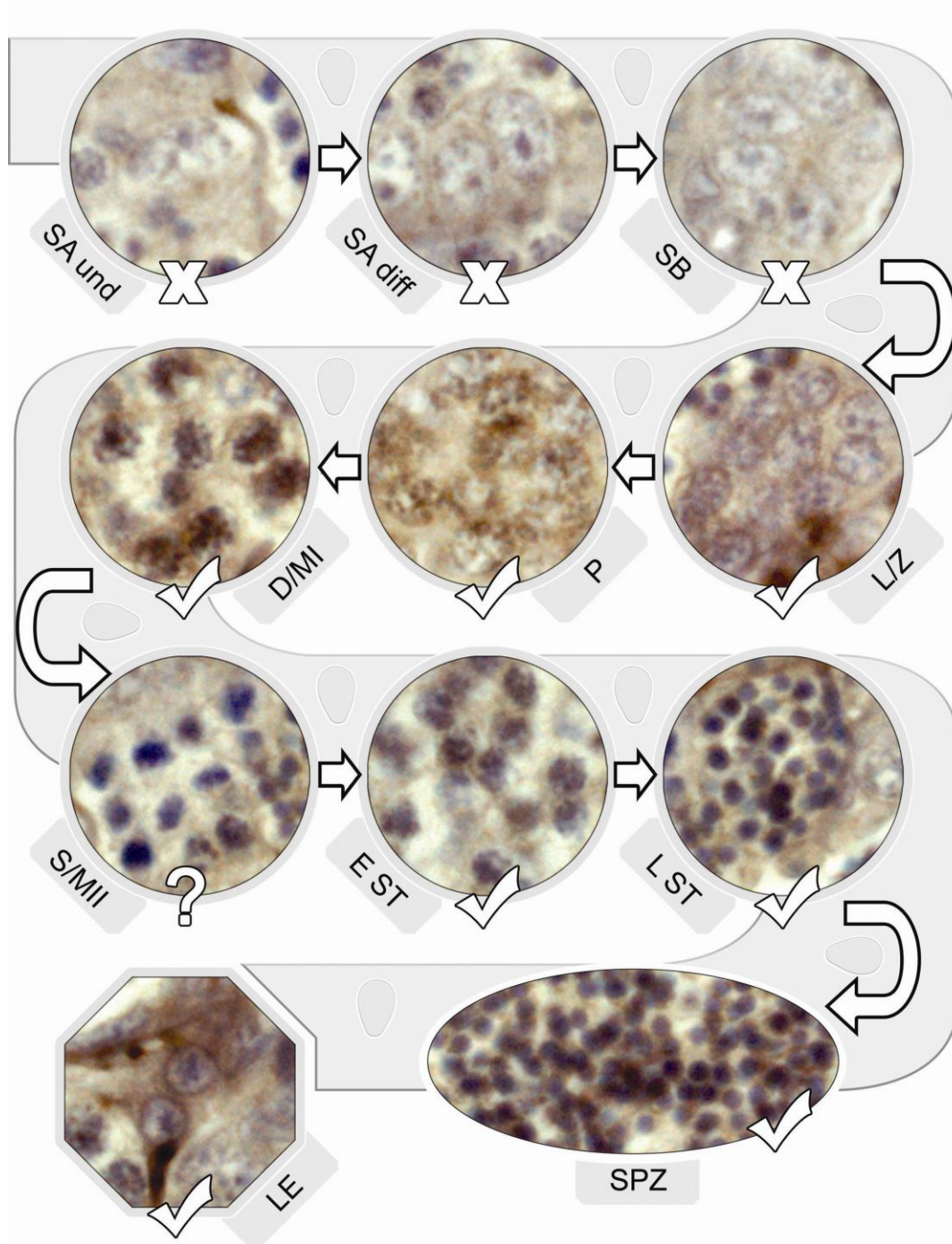
Con l'obiettivo di conseguire una migliore definizione della distribuzione di Ptma nei gameti, sono state effettuate delle analisi di immunofluorescenza su sezioni di testicolo, che hanno nuovamente confermato la presenza della proteina nella testa degli spermatozoi luminali (Fig. 4.6, triangolo superiore; riferirsi alla legenda per dettagli). In aggiunta, è stata eseguita una sovrapposizione dei canali analizzati in fluorescenza con il visibile, allo scopo di rendere maggiormente distinguibile la regione nucleare da quella citoplasmatica in queste cellule. In definitiva, questi risultati suggeriscono che Ptma potrebbe essere localizzata sia nel nucleo che nel citoplasma.

**Figura 4.6**



**Fig. 4.6. Localizzazione di Ptma negli spermatozoi di zebrafish tramite immunofluorescenza su testicolo.** Due differenti immagini sono state catturate [1°: (A/D); 2°: (E/H)]. (A, E) Immagini nel visibile. (B, F) marcatura nucleare con DAPI-fluorescent in blu. (C, G) fluorescenza di Ptma in verde; (D, H) Sovrapposizione dei canali (blu/ verde). Triangoli superiori (B-D, F-H) mostrano il segnale di fluorescenza; il triangolo in basso, marcato con l'asterisco (\*), mostra la sovrapposizione delle fluorescenze con i rispettivi campi visibili, allo scopo di migliorare la separazione tra il nucleo e il citoplasma. Ptma è presente negli spermatozoi, con una possibile distribuzione nucleo-citoplasmatica. SPZ: spermatozoi. Le barre rappresentano 5  $\mu$ m.

**Figura 4.7**



**Fig. 4.7. Rappresentazione schematica della progressione delle cellule germinali nei tubuli, con immagini di cisti selezionate che descrivono il pattern di sub-localizzazione di Ptma nelle cellule germinali durante la spermatogenesi. Le cellule Ptma positive sono marcate con una “V”, mentre quelle negative con una “X”. Nessun segnale è ritrovato negli SPC secondari che sono marcati con un “?”. SAund e SAdiff: indifferenziati e differenziati A SPG; SB: B SPG; L/Z: SPC primari in leptotene/zigotene; P: SPC primari in pachitene; D/MII: SPC primari in diplotene/metafase I; S/MII: SPC secondari in metafase II; EST: SPT precoci; LST: SPT tardivi; SPZ: spermatozoi; LE: cellule di Leydig.**

## 5. Discussione e Conclusioni

La protimosina (PTMA) è un piccolo polipeptide estremamente acido (punto isoelettrico: 3.5), appartenente ad un gruppo di proteine non strutturate (Gast et al., 1995). Questa caratteristica riflette la sua conformazione random-coil e la capacità di interagire con diverse molecole biologiche (Enkermann et al., 2000a; Papamarcaki and Tsolas, 1994). Tali peculiarità di PTMA, in associazione alla presenza di un segnale di localizzazione nucleare all'estremità C-terminale, permettono a questa molecola di distribuirsi sia nel compartimento nucleare che in quello citoplasmatico (Enkermann et al., 2000b; Malicet et al., 2006; Martini et al. 2000), coerentemente con la sua partecipazione in differenti processi biologici (Karetsou et al., 1998, 2002; Skopeliti et al., 2006; Ueda, 2009; Voutsas et al., 2000).

Il primo studio in cui è stato ipotizzato un possibile coinvolgimento di Ptma nella riproduzione fu eseguito in ratto (Dosil et al., 1990; Rosón et al., 1990), successivamente nel 2002 il nostro gruppo ha caratterizzato per la prima volta un suo ortologo in un Vertebrato non mammifero, l'anfibio *Pelophylax esculentus* (Aniello et al., 2002). L'analisi comparativa ha evidenziato un comune pattern di espressione per Ptma durante la spermatogenesi in specie che presentano una diversa struttura testicolare e un diverso processo di fecondazione. È stato stabilito che nei modelli che presentano gonadi organizzate in cisti, come il pesce cartilagineo *Torpedo marmorata* e l'anfibio *Pelophylax esculentus*, la proteina è localizzata in entrambi i compartimenti interstiziale (cellule di Leydig) e germinale (cellule meiotiche e post meiotiche; Ferrara et al., 2009; Prisco et al., 2009). Il pattern di localizzazione è conservato anche nel testicolo del mammifero *Rattus norvegicus*, dove PTMA è associata con la vescicola acrosomale in via di formazione durante il differenziamento degli spermatici (Ferrara et al., 2010). Recenti analisi condotte su spermatozoi di uomo e di ratto mostrano,

inoltre, che PTMA è distribuita specificamente nella membrana acrosomale interna, suggerendo un possibile ruolo per questa proteina nello sviluppo e nella funzione fisiologica dei gameti (Ferrara et al., 2013).

Nel presente lavoro è mostrata per la prima volta l'espressione della protimosina nel testicolo adulto di *Danio rerio* e la sua distribuzione durante la spermatogenesi. L'esemplare maschio di zebrafish rappresenta un comune teleosteo che possiede gonadi con tubuli anastomizzati, nei quali il compartimento germinale è avvolto in anelli o tubuli, che formano una fitta rete di connessioni (Grier, 1993). I tubuli sono formati da *cluster* di cellule germinali in progressione, circondati da cellule somatiche (cellule di Sertoli) che definiscono le spermatocisti, all'interno delle quali è presente una regione luminale in cui vengono rilasciati gli spermatozoi (Billard, 1990; Huszno and Klag, 2012; Parenti and Grier, 2004; Pudney, 1996; Schulz et al., 2010). La peculiarità riscontrata in questi teleostei è la perdita dell'acrosoma a livello del gamete maturo, infatti la fecondazione esterna è attivata da un ingresso meccanico dello spermatozoo nella cellula uovo attraverso una specifica struttura definita micropilo (Hirai, 1988). Lo studio della protimosina in un modello animale che non presenta l'acrosoma risulta molto interessante in riferimento ai recenti studi, che nei Mammiferi evidenziano l'associazione di questa proteina con tale vescicola.

Come precedentemente descritto, in zebrafish sono stati identificati due paraloghi per la protimosina: *ptmaa* e *ptmab* (Donizetti et al., 2008). Entrambi i trascritti sono espressi nei tessuti adulti analizzati, in accordo con la conservazione di *ptma* durante la filogenesi. Inoltre la loro localizzazione nel testicolo adulto è comparabile: *ptma* risulta specificamente presente nelle cellule germinali meiotiche e post-meiotiche, mostrando un pattern simile a quanto già descritto in altre specie (Aniello et al., 2002, Ferrara et al., 2010, 2009; Prisco et al., 2009). Per l'analisi proteica dell'espressione e della localizzazione, poiché in commercio non sono disponibili anticorpi specifici per Ptmaa o Ptmap, è stato usato un antisiero (Ferrara et al.,

2013) che, come verificato mediante analisi bioinformatica, può riconoscere entrambe le proteine, che possiedono, peraltro, lo stesso peso molecolare. Pertanto, durante il testo, con la sigla Ptma si fa riferimento ad entrambe le proteine. I dati ottenuti mediante immunostochimica sono coerenti rispetto a quelli ottenuti mediante ibridazione *in situ*, in particolare: l'assenza di Ptma negli spermatogoni suggerisce che essa non partecipi alle fasi proliferative/mitotiche, mentre la sua presenza negli spermatociti (SPC) primari e negli spermatidi (SPT) supporta un suo possibile ruolo durante le fasi meiotiche e di differenziamento degli SPT in spermatozoi (SPZ). Ptma risulta evidente, inizialmente, nel citoplasma degli SPC primari in leptotene/zigotene; in seguito la sua localizzazione è estesa alla membrana nucleare delle cellule in divisione e, infine, negli SPT in differenziamento. La localizzazione nucleo-citoplasmatica di Ptma suggerisce il suo possibile coinvolgimento nel rimodellamento della cromatina durante la spermatogenesi e spermioistogenesi. La proteina mostra una simile distribuzione in entrambe le specie precedentemente studiate, *Torpedo marmorata* e *Pelophylax esculentus*, la quale, viceversa, risulta notevolmente differente rispetto alla localizzazione citoplasmatica/acrosomale dei Mammiferi. Questa discrepanza risulta particolarmente interessante, in quanto potrebbe riflettere un comune ruolo di Ptma durante gli specifici eventi della fecondazione, i quali presentano, però, modalità di svolgimento diverse a seconda della specie. Nello specifico, nei Mammiferi la proteina è localizzata nella membrana acrosomale interna durante lo sviluppo del gamete (Ferrara et al., 2013), ed è stato ipotizzato che Ptma sia ritenuta dopo la reazione acrosomale, per poi essere condotta nell'ovocita durante la fecondazione. In seguito, dunque, Ptma potrebbe svolgere un ruolo nel rimodellamento della cromatina dei pronuclei attraverso l'interazione con l'istone H1, in accordo con la nota capacità della proteina di decondensare la cromatina dello SPZ umano (Karetsou et al., 2004). In zebrafish, che rappresenta un modello privo di acrosoma, Ptma potrebbe legare la cromatina durante il differenziamento delle cellule germinali, per essere già presente nello SPZ maturo, una volta rilasciato. Questa ipotesi è corroborata da

studi sulla ritenzione dell'istone H1 nei gameti maschili di zebrafish (Carrell, 2011; Wu et al., 2011). Questi dati suggeriscono, quindi, un ruolo analogo di Ptma, come nei Mammiferi, nelle fasi successive all'ingresso meccanico dello spermatozoo nella cellula uovo.

In definitiva, è possibile concludere che, in zebrafish come nelle altre specie studiate, questo piccolo peptide è coinvolto negli eventi della spermatogenesi; pertanto, i risultati finora ottenuti rappresentano un punto di partenza per comprendere le funzioni di Ptma nella fisiologia dei gameti e nella riproduzione dei Vertebrati.

## ***Parte II:***

***PREP è associato alle funzioni riproduttive maschili  
ed ai gameti maschili in topo***



# 1. Introduzione

## *La Prolil endopeptidasi (PREP)*

### *1.1- Storia della famiglia e isolamento*

La prolil endopeptidasi (PREP) è un membro della famiglia delle serina peptidasi, in gran parte conservata nella filogenesi (Venäläinen et al., 2004), descritta per la prima volta nel cervello di coniglio come un enzima capace di degradare il nonapeptide bradichinina su residui amminoacidici di Prolina-Fenilalanina (Oliveira et al., 1976). I membri di questa famiglia, pur presentando una percentuale di identità piuttosto bassa, condividono una struttura tridimensionale simile; inoltre la loro selettività è limitata verso oligopeptidi comprendenti non più di trenta amminoacidi (Camargo et al., 1979).

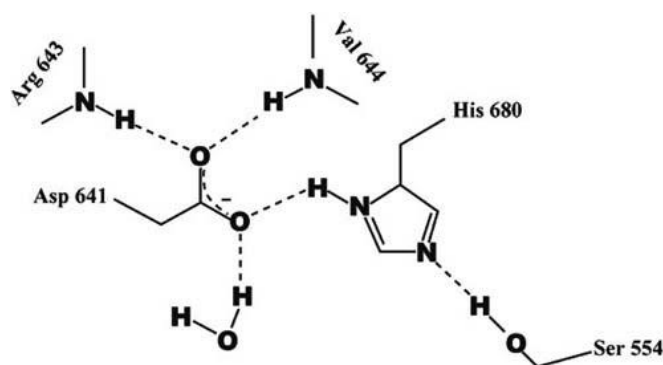
Nell'uomo PREP è stata inizialmente scoperta, come molecola coinvolta nella degradazione dell'ossitocina (Walter et al., 1971; Koida and Walter, 1976). La peptidasi è stata originariamente chiamata POP (prost-prolin cleaving enzyme), poiché idrolizza il legame peptidico all'estremità C-terminale di un residuo di prolina, e successivamente nominata PREP (prolyl-endopeptidase). Nei Mammiferi l'enzima è stato identificato in tutti gli organi e tessuti, e diversi studi mostrano che la sua attività è maggiore nel cervello, mentre risulta ridotta nel fegato, cuore, rene, milza e polmone (Yoshimoto et al., 1979; Taylor et al., 1980).

## 1.2- *Struttura, localizzazione e segnalazione cellulare*

Le prime informazioni strutturali della PREP sono state dedotte dallo studio del cDNA dell'enzima in cervello di suino, che indicava una massa molecolare di 80.751 Da, calcolata in base alla sequenza di 710 amminoacidi (Rennex et al., 1991). I residui catalitici sono stati identificati all'estremità carbossilica della molecola, rispettivamente Ser554 e His680 (Stone et al., 1991). Questo ordine di residui catalitici è l'inverso di quello trovato nella sequenza amminoacidica della tripsina e subtilisina, mentre risulta simile a quello ritrovato nelle lipasi. Inoltre, la relazione strutturale tra il dominio delle lipasi e delle oligopeptidasi è stata definita studiando la simile topologia del gruppo catalitico e dalle sequenze amminoacidiche intorno a questi residui. Pertanto, dall'analisi comparativa di queste sequenze, è stato indicato il residuo Asp641 come terzo membro della triade catalitica (Polgár, 1992).

La triade (Ser554, Asp641, His680) è localizzata in una larga cavità definita tra due domini: uno peptidasico e uno a sette pale eliche-beta.

**Fig. 1.1**

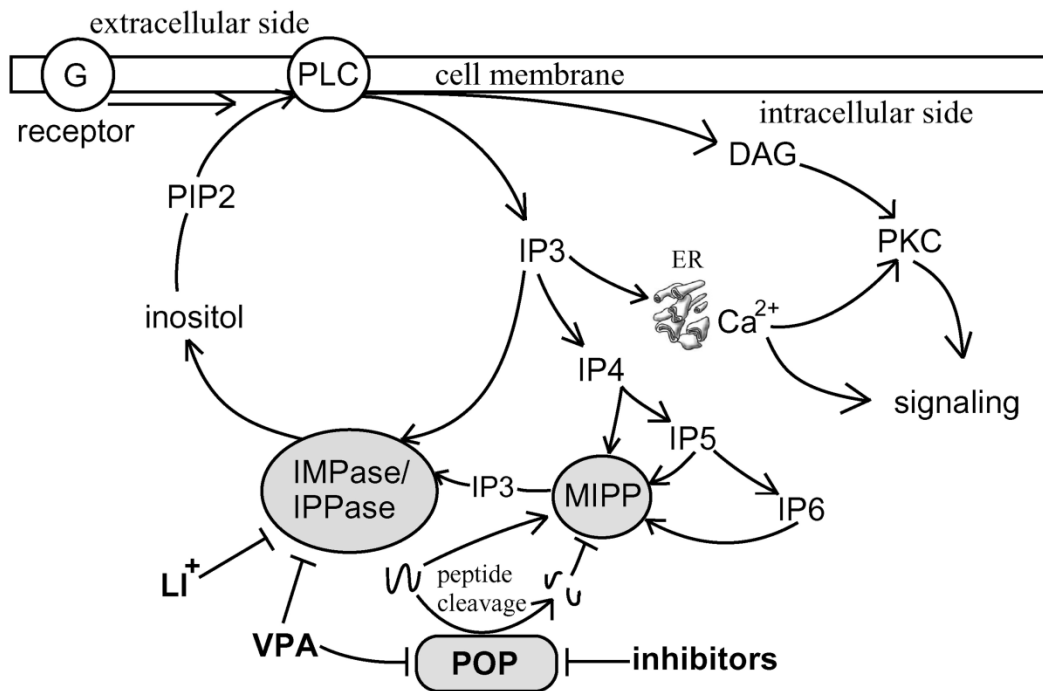


**Fig. 1.1** – Rappresentazione schematica della triade catalitica (Asp, His, Ser) (Szeltner and Polgár, 2008).

PREP è un enzima citosolico ritrovato nello spazio perinucleare in tutte le linee cellulari umane analizzate, ed è capace di inattivare neuropeptidi che sono presenti nello spazio extracellulare, poiché può essere rilasciato dalla cellula (Ahmed et al., 2005). L'enzima è stato anche localizzato in associazione con il citoscheletro: in particolare, esso co-localizza con la tubulina in lievito (Schulz et al., 2005), ed una simile distribuzione è stata ritrovata anche in neuroni di uomo e topo (Rossner et al., 2005).

A livello molecolare, PREP risulta coinvolta nel pathway dell'inositolo fosfato in *Dictyostelium discoideum*; inoltre, la delezione del gene codificante PREP conferisce resistenza al litio e all'acido valproico (VPA) (Williams et al., 1999). Nel suddetto pathway la fosfolipasi C (PLC), attivata da una proteina  $G_q$ , converte il fosfatidil-inositolo-difosfato PIP2 in inositolo-trifosfato (IP3) e diacil-glicerolo (DAG), attivando così la protein-chinasi C (PKC). IP3 è fosforilato producendo IP4 (successivamente IP5, IP6), permettendo una propria riduzione citosolica e, successivamente, defosforilato tramite l'enzima MIPP (multiple inositol polyphosphate phosphatase) e da entrambe le fosfatasi: IPPase (inositol polyphosphatase) e IMPase (inositol monophosphatase). Infine, l'inositolo prodotto da tale processo è convertito in PIP2, substrato della PLC. Presumibilmente, PREP taglia un oligopeptide sconosciuto regolando negativamente l'attività di MIPP. Anche il litio limita il riciclo dell'IP3, inibendo le fosfatasi IPPase e IMPase, mentre il VPA può inattivare sia le fosfatasi che PREP.

**Fig. 1.2**



**Fig. 1.2-** Possibile ruolo di PREP nel Pathway dell'inositolo fosfato (Szeltner and Polgár, 2008).

### **1.3- Funzioni biologiche**

PREP è stata implicata in diversi processi biologici, come i disordini cognitivi, apprendimento e memoria, la malattia celiaca, la proliferazione e la morte cellulare, l'immunità, e il metabolismo energetico.

Diversi studi mostrano il coinvolgimento di PREP nel morbo di Alzheimer (AD), ma con risultati controversi: l'enzima è ritrovato in maggiore (Aoyagi et al., 1990) o minore (Mantle et al., 1996) quantità in pazienti con AD rispetto a individui sani. I primi studi suggerirono un possibile ruolo dell'enzima nella formazione del precursore dell'amiloide (APP) 92; infatti,

studi successivi dimostrarono che il trattamento con inibitori di PREP riduceva la deposizione della proteina  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) nell'ippocampo di topo con AD 93. Anche un altro inibitore selettivo di PREP, (JTP-4819), mostrava una riduzione nella generazione di  $A\beta$  in cellule NG108-15, presumibilmente inibendo il taglio dell'APP da parte della  $\gamma$ -secretasi dopo un residuo di alanina. Tuttavia fu chiarito che un oligopeptide non era capace di idrolizzare una grande molecola come la APP (Shinoda et al., 1997). Successivi studi mostrarono, invece, che PREP era capace di internalizzare la APP, inibendo così la formazione della  $A\beta$  (Soriano et al., 2001); infatti, una riduzione dell'attività dell'enzima era associata con l'accumulo di  $\beta$ -amiloide, con conseguente comparsa della malattia (Laitinen et al., 2001). Ad oggi, si ritiene che il trattamento con inibitori di PREP possa essere utile per contrastare gli effetti delle malattie degenerative (Rossner et al., 2005): infatti, l'associazione dell'enzima con malattie quali Parkinson ed Alzheimer (Hannula et al., 2013) ritrovato anche in tessuti di uomo, ha permesso di considerare la prolil endopeptidasi come target potenziale per il trattamento dei disordini cognitivi (Männistö et al., 2007).

Recenti ricerche hanno evidenziato un possibile ruolo di PREP anche nell'apprendimento e nella memoria: l'enzima è attivo nell'ippocampo e topi PREP knockdown mostrano un indebolimento dell'apprendimento e memoria, associato con una riduzione delle spine dendritiche nella regione CA1 dell'ippocampo. Inoltre è stata osservata anche una riduzione del potenziale a lungo termine (LTP) ed una riduzione della proteina GAP-43 nella sua forma fosforilata. GAP-43, nella sua forma non fosforilata, lega la calmodulina, controllando l'attività della CAM-chinasi II nella plasticità sinaptica (Benowitz and Routtenberg, 1997), mentre quando GAP-43 risulta fosforilata è correlata con la durata del LTP (Leahy et al. 1993). Pertanto, la riduzione dei livelli di GAP-43 fosforilata, osservata in topi PREP knockdown, supporta l'ipotesi di una possibile funzione dell'enzima nei processi di apprendimento e memoria (D'Agostino et al., 2013).

Inoltre PREP, è in grado di degradare peptidi derivati del glutine ricchi di prolina, responsabili di evocare una risposta autoimmune, descritta come malattia celiaca, in soggetti geneticamente predisposti. La celiachia è una malattia caratterizzata dalla distruzione dei villi intestinali causata da una forte infiammazione (Arentz-Hansen et al., 2002), in cui l'unico trattamento terapeutico disponibile è seguire una dieta senza glutine. Ad oggi non ci sono relazioni tra polimorfismi di PREP e sviluppo della malattia, inoltre i livelli endogeni dell'enzima negli epitelii intestinali delle persone che presentano la malattia non risultano diversi rispetto ad individui sani (Garcia-Horsman et al., 2007). Data la capacità dell'enzima di degradare i peptidi derivati dal glutine, sono state realizzate capsule contenenti grosse quantità di PREP prodotte in *E. coli* per valutare un suo possibile ruolo terapeutico (Gass et al., 2005). La parziale digestione della gliadina permette tuttavia ai frammenti prodotti di raggiungere la barriera epiteliale dell'intestino in concentrazioni tossiche (Matysiak-Budnik et al., 2005). Sebbene, secondo un recente studio, sia possibile ingegnerizzare ceppi batterici, normalmente ingeriti con gli alimenti, allo scopo di veicolare grosse quantità dell'enzima nell'ambiente intestinale (Alvarez-Sieiro et al., 2014), ulteriori studi clinici sono necessari per dimostrare il possibile utilizzo di PREP nel trattamento terapeutico della malattia celiaca.

Un ruolo di PREP è stato descritto anche nella morte cellulare: in particolare, l'enzima sarebbe implicato nel taglio di un peptide anti-apoptotico, l'umanina. Questa molecola lega Bax (proteina pro-apoptotica), prevenendo il suo trasporto nel mitocondrio e così l'attivazione dell'apoptosi. L'umanina presenta due siti di taglio proteolitico riconosciuti da PREP, il quale può, quindi, regolare positivamente l'attività apoptotica della cellula in accordo con l'effetto neuroprotettivo dato dall'inibizione di PREP nelle malattie del sistema nervoso (Bar et al., 2006).

In associazione con la modulazione del processo infiammatorio ed apoptotico PREP risulta avere una maggiore attività in timociti immaturi, infatti l'enzima è stato utilizzato

come marker per definire la maturità dei linfociti T. In aggiunta, le cellule T che presentano una maggiore attività sono suscettibili di morte cellulare, suggerendo che PREP può contribuire alla risposta apoptotica osservata durante l'attivazione dei linfociti T (Odaka et al., 2002).

La localizzazione di PREP nel sistema nervoso centrale (SNC), evidenzia la presenza dell'enzima anche nel ipotalamo, specificamente nel nucleo ventro-mediale. Un recente studio mostra che PREP, nel SNC, svolge un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi glucidica, in particolare nel controllo della secrezione di insulina e glucagone: infatti, modelli murini PREP knockdown presentano livelli di glucosio elevati a digiuno rispetto ai wild type, anche se non mostrano cambiamenti nella composizione corporea (Kim et al., 2014).

Ad oggi, sebbene siano stati descritti molteplici studi che coinvolgono la prolil endopeptidasi in differenti processi biologici, lo specifico ruolo fisiologico di questo enzima resta lontano dall'essere compreso. Pochi sono stati gli studi condotti sul possibile coinvolgimento di PREP nella riproduzione (Kimura et al., 1998; Kimura et al., 2002). Allo scopo di approfondire il possibile ruolo dell'enzima nella riproduzione maschile, in questa seconda parte del lavoro di tesi (durante il periodo di studi all'estero presso la Yale University), sono stati analizzati gli effetti della soppressione di PREP nella spermatogenesi dei Mammiferi, utilizzando un modello murino PREP knockdown.

## 2. Scopo della ricerca

Diversi studi mostrano il coinvolgimento dell'enzima PREP in differenti processi biologici, in cui svolge la funzione di peptidasi, effettuando tagli proteolitici su residui di prolina, con conseguente maturazione o degradazione di oligopeptidi costituiti da non più di trenta amminoacidi (Mentlein, 1988). La principale localizzazione nel tessuto nervoso centrale rende questo enzima partecipe nei processi di apprendimento e memoria (Cunningham and O'Connor, 1997; D'Agostino et al., 2013), nonché nelle alterazioni neurologiche di alcune malattie degenerative (Rossner et al., 2005; Hannula et al., 2013); inoltre, esso risulta coinvolto nei processi che inducono la morte cellulare (Bär et al., 2006; Matsuda et al., 2013), nella malattia celiaca (Siegel et al., 2006; Comino et al., 2013), nella proliferazione e differenziamento (Matsubara et al., 1998; Suzuki et al., 2014), e nel metabolismo energetico (Kim et al., 2014). La specifica attività peptidasica dell'enzima nello spazio extracellulare appare in prima analisi contraddittoria rispetto alla localizzazione citoplasmatica, tuttavia è stata valutata l'ipotesi di un suo possibile rilascio all'esterno della cellula (Ahmed et al., 2005). PREP è sicuramente presente nel plasma sanguigno (Breen et al., 2004), e nel fluido seminale (Siviter and Cockle, 1995; Valdivia et al., 2004) anche se in minori concentrazioni rispetto all'interno della cellula; tuttavia, la relazione tra la componente intra ed extracellulare non è stata ancora descritta.

Un numero ridotto di studi mostra una possibile attività di PREP nei tessuti degli organi riproduttori, e più nello specifico nella gametogenesi maschile. Nel 1983 fu isolato per la prima volta l'enzima dagli spermatozoi di ascidia (Yokosawa et al., 1983) e, dopo, nelle gonadi maschili di aringa (Yoshida et al., 1999). In seguito, gli studi condotti in Mammiferi hanno evidenziato la presenza di PREP durante la spermatogenesi di *Mus musculus*: in



particolare sia il trascritto che la proteina risultano presenti durante tutta la gametogenesi, e l'attività dell'enzima rimane invariata nell'intero processo. La proteina è localizzata negli spermatidi e negli spermatozoi; inoltre, i gameti trattati con inibitori di PREP mostrano una riduzione della motilità, suggerendo un possibile coinvolgimento dell'enzima anche nella spermatogenesi (Kimura et al., 2002). Successive analisi hanno verificato la presenza dell'enzima anche nei tessuti riproduttivi maschili e nel liquido seminale di uomo (Valdivia et al., 2004; Myöhänen et al., 2012). Dato il coinvolgimento dell'enzima nell'attività di proteolisi di alcuni oligopeptidi contenenti residui di prolina, tra cui il GnRH, risulta interessante lo studio dell'effetto della soppressione della suddetta attività sulla spermatogenesi, in modelli murini geneticamente modificati. Inoltre, il possibile coinvolgimento di PREP nel pathway dell'inositolo trifostato, che fisiologicamente regola i livelli citoplasmatici di calcio, induce una possibile ipotesi di associazione di questo messaggero intracellulare con la peptidasi, in accordo con il dato preliminare di Kimura et al., (2002) circa la riduzione della motilità in spermatozoi in cui è stato inibito l'enzima.

Considerato ciò, nella seconda parte del lavoro di tesi (durante il periodo di studi presso la Yale University) è stato esaminato, utilizzando topi PREP knockdown, il possibile ruolo di PREP nella spermatogenesi di *Mus musculus*. In prima analisi è stata valutata la presenza della proteina, e tramite analisi di immunofluorescenza la sua localizzazione nel testicolo adulto e negli spermatozoi epididimali di topo, rispetto ai modelli di studio PREP knockdown. Successivamente è stata eseguita un'analisi macroscopica ed istologica delle gonadi per valutare eventuali differenze nei wild type rispetto ai knockdown. Inoltre sono state anche eseguite analisi dei parametri spermatici tra i due gruppi allo scopo di valutare l'effetto dell'enzima non solo nella gonade maschile ma anche nel prodotto finale della spermatogenesi, ovvero lo spermatozoo.

## 3. Materiali e Metodi

### 3.1 - Cura degli animali e generazione di topi Gene-Trap PREP

*(Prep<sup>gt/gt</sup>)*

Tutti gli animali e le procedure sperimentali sono state approvate dalla Yale University Institution Animal Care and Use Committee. I topi (C57BL/6) sono stati tenuti in stabulario in condizione di temperatura controllata (25°C) con un regime di luce-buio di 12 ore e nutriti con acqua e cibo *ad libitum*. I topi Gene-Trap PREP (*Prep<sup>gt/gt</sup>*) sono stati generati come descritto precedentemente da Kim et al., (2014).

### 3.2 - Estrazione di tessuti e di spermatozoi di topo

I testicoli sono stati prelevati da ogni animale (età: 3 mesi), rapidamente immersi in azoto liquido e conservati -80°C per l'impiego nell'estrazione delle proteine. In aggiunta, sono stati prelevati cervelli di topo allo stesso modo e utilizzati come controlli positivi nelle analisi di Western Blot. Per ogni animale sono stati prelevati gli epididimi ed immersi in tampone fosfato, PBS (13.6 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 8.08 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.6), per estrarre gli spermatozoi. In seguito i campioni di liquido seminale sono stati filtrati ed esaminati al microscopio. Vetrini con

aliquote di spermatozoi (SPZ) sono stati asciugati all'aria e conservati a -20°C. La restante parte dei campioni di liquido seminale è stata utilizzata per l'estrazione delle proteine.

### ***3.3 - Estrazione di proteine ed analisi di Western Blot***

I testicoli e gli SPZ di topi (C57BL/6) wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*, oltre ai cervelli wt sono stati sottoposti a lisi in RIPA buffer (1% NP-40, 0.1% SDS, 100 mM sodio ortovanadato, 0.5% sodio deossicolato in PBS) contenente inibitori di proteasi (Roche, Cat #11 836 170001). Gli omogenati sono stati sonicati con 3 impulsi da 20 Hertz della durata di 20 secondi ognuno e successivamente centrifugati per 30 minuti 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 BCA kit (Thermoscientific, Cat#23228 and 1859078), seguendo le istruzioni del produttore. Le proteine (50 µg) sono state separate in base al loro peso molecolare tramite elettroforesi su gel SDS-PAGE al 8% e trasferite su un filtro Hybond-P polivinilidene difluoruro (PVDF) (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK) a 280 mA per 2.5 ore a 4°C. I filtri sono stati poi trattati per 1 ora con una soluzione di bloccaggio (5% latte in TBS pH 7.4), prima di aggiungere l'anticorpo primario anti-PREP (Abcam, Cat #ab58988) e incubati per una notte a 4°C. Successivamente i filtri sono stati sottoposti a tre lavaggi, in TBS pH 7.4, e incubati con IgG secondarie anti -Fc di coniglio coniugate con la perossidasi (Santa Cruz Biotechnology, Cat#sc-2004) per 1 ora. I filtri sono stati lavati come descritto prima e gli immunocomplessi rilevati utilizzando ECL kit (Thermo scientific, Cat #32016). Le membrane sono state strizzate con uno specifico buffer (Thermoscientific, Cat #21059) ed utilizzate per l'analisi dell'espressione di β-actin (Sigma, Cat#A5441).

### ***3.4 - Valutazione del peso testicolare, istologia e diametro dei tubuli seminiferi***

Testicoli di entrambi i genotipi wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>* (n=5 per ognuno) sono stati pesati, inclusi in OCT e conservati a -80°C fino all'utilizzo. In seguito sezioni (7- $\mu$ m di spessore) di tale tessuto sono state colorate con ematossilina-eosina utilizzando un protocollo standard (Sheehan and Hrapchak, 1987), per eseguire le seguenti analisi istologiche: diametro totale e lumenali dei tubuli seminiferi, percentuale dei tubuli spermatici. I risultati di tale indagine sono stati analizzati con il software ImageJ.

### ***3.5 - Analisi di immunofluorescenza***

Vetrini con sezioni di testicolo (7  $\mu$ m; CM1850, Wetzlar, Germany) e vetrini con SPZ sono stati fissati in 4% paraformaldeide in PBS, e dopo lavati in tampone salino. I siti di legame non specifici sono stati bloccati con un appropriato siero diluito 1:5 in PBS contenente 5% (w/v) BSA, prima dell'aggiunta dell'anticorpo anti-PREP (Abcam, Cat#ab58988) diluito 1:5000, e incubati a 4°C per una notte. In seguito sono stati eseguiti lavaggi in PBS, e i vetrini sono stati incubati per 30 minuti con un appropriato anticorpo secondario (Alexa Fluor 488; Invitrogen, Cat#A31565) diluito 1:500 nella soluzione di bloccaggio. Infine i vetrini sono stati montati con Vectashield+DAPI (Vector Laboratories, Cat#H1200) per la marcatura nucleare e, in seguito, visualizzati al microscopio ottico.

### ***3.6 - Valutazione dei parametri spermatici***

Testicoli di topi wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>* (n=5 per ognuno) sono stati prelevati e gli epididimi sono stati posti in 2.5 mL di buffer Quinn's Advantage Medium with HEPES media (Sage, Cat# ART1023 e ART1024) e incubati a 37°C per 30 minuti per permettere il rilascio degli SPZ dal tessuto. La conta totale (milioni/mL) e la motilità degli SPZ è stata determinata utilizzando la camera di conta Neubauer (Sigma-Aldrich, Cat#BR717810). La percentuale di spermatozoi motili è stata determinata analizzando 200 cellule in ogni campione. Mentre per l'analisi morfologica sono stati utilizzati vetrini con SPZ prima fissati in 4% paraformaldeide in PBS, dopo lavati in tampone salino, e colorati con ematossilina-eosina utilizzando il protocollo standard come prima descritto.

### ***3.7 - Analisi statistica***

Le analisi statistiche sono state effettuate per mezzo del software Prism 5 (GraphPad), utilizzando la funzione Unpaired Student t test per determinare la significatività statistica dei dati ottenuti tra i topi wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Il valore di  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutti i dati sono stati riportati come media  $\pm$  SEM.

## 4. Risultati

### ***4.1 - Espressione di PREP nel testicolo e negli spermatozoi di topi wild type e knockdown***

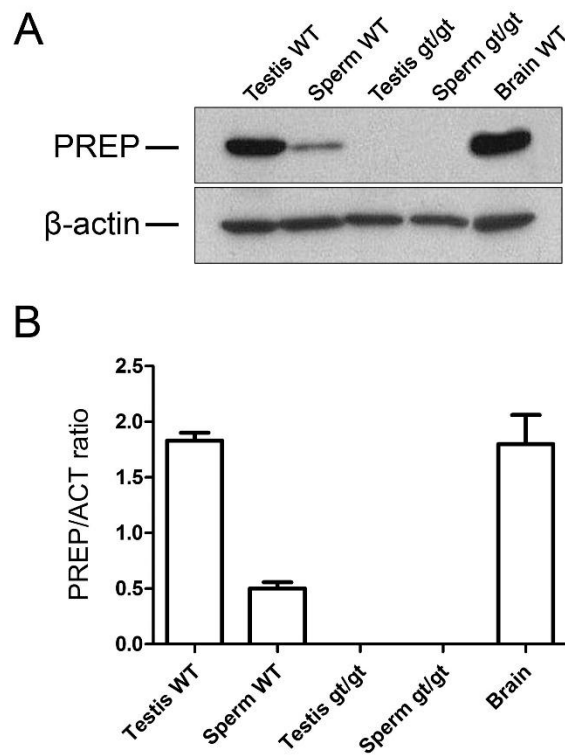
Per prima cosa, è stata determinata l'espressione della proteina nel testicolo e negli spermatozoi di topi wild type (wt) e knockdown ( $Prep^{gt/gt}$ ). La presenza del polipeptide è stata verificata tramite Western Blot su estratti proteici di testicolo e spermatozoi (SPZ), per mezzo di un anticorpo specifico anti-PREP. Come tessuto di controllo positivo è stato utilizzato il cervello (Kim et al., 2014) (Fig. 4.1). Il segnale di PREP è presente solo nei campioni wt. I livelli di espressione di PREP nei campioni wt e  $Prep^{gt/gt}$  sono stati analizzati, mediante densitometria, e riportati come rapporto PREP/actina (Fig. 4.1B): PREP è più espresso nel testicolo e nel cervello rispetto agli spermatozoi.

### ***4.2 - Peso dei testicoli ed analisi istologica***

Dopo aver confermato la presenza della proteina nei campioni wt, è stata analizzata l'istologia dei tubuli seminiferi, oltre al peso dei testicoli, sia nei campioni wt che in quelli  $Prep^{gt/gt}$ . La media del peso testicolare ( $119,1 \pm 3,8$  mg vs.  $101,2 \pm 4,2$  mg; Fig. 4.2) mostra un incremento statisticamente significativo di tale parametro nei wt in confronto ai  $Prep^{gt/gt}$ . L'analisi istologica del tessuto, mediante colorazione ematossilina-eosina, è stata eseguita misurando il diametro totale e luminale dei tubuli seminiferi in entrambi i campioni. I risultati evidenziano un incremento statisticamente significativo del diametro totale ( $258,2 \pm 3,1$   $\mu$ m

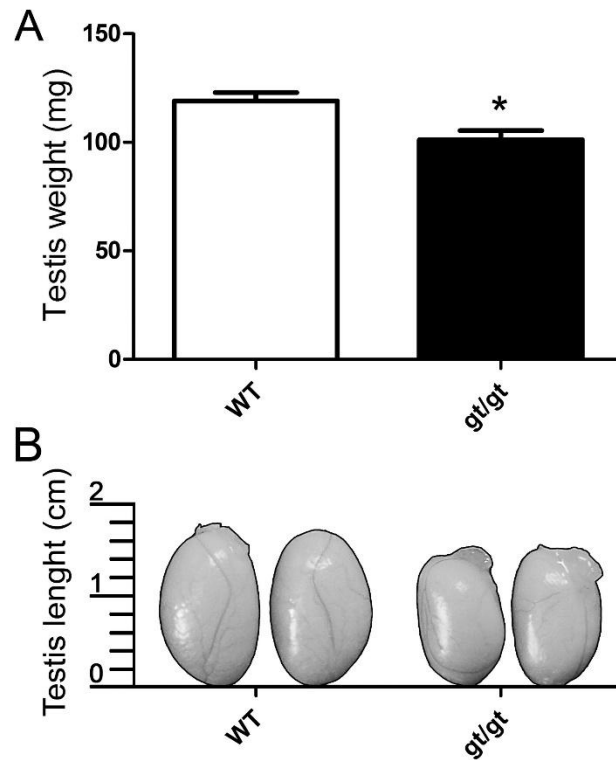
vs.  $191,4 \pm 2,0 \mu\text{m}$ ; Fig. 4.3A) e del diametro luminale ( $93,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$  vs.  $51,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$ ; Fig. 4.3B) nei tubuli seminiferi dei wt rispetto ai *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Inoltre la percentuale dei tubuli spermiati risulta maggiore nei wt ( $65,0 \pm 6,4 \%$  vs.  $31,6 \pm 4,1 \%$ ; Fig. 4.3C).

**Fig. 4.1**



**Fig. 4.1. Espressione di PREP nel testicolo e negli spermatozoi di topi wild type e *Prep<sup>gt/gt</sup>*.** (A) l'analisi di Western blot mostra che PREP è espresso in testicoli e spermatozoi wt; nessun segnale è presente nei campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Estratti proteici di cervello wt sono stati utilizzati come controllo positivo. (B) Istogramma che mostra i livelli di espressione di PREP nei campioni wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*. I dati sono stati normalizzati con beta-actina e riportati come rapporto PREP/ACT. Tutti i dati rappresentano la media $\pm$ SEM. WT: campioni wild type. *gt/gt*: campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>* gene trap.

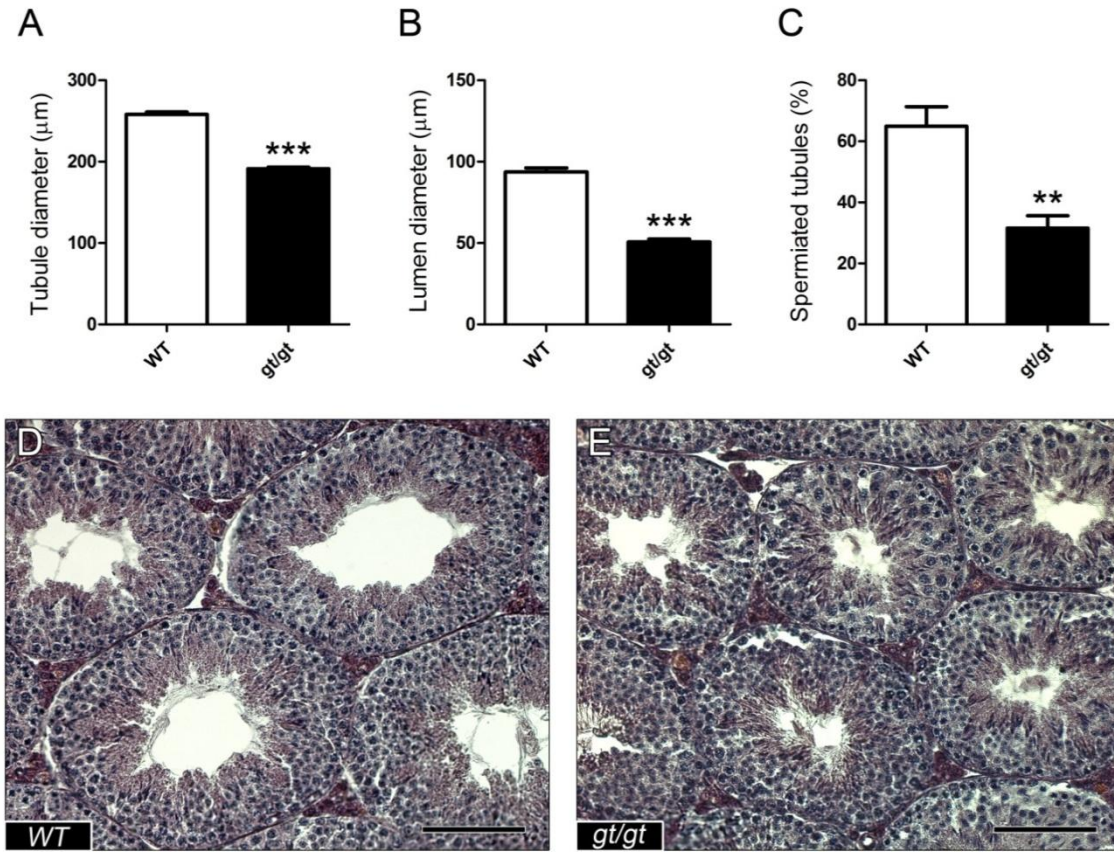
**Fig. 4.2**



**Fig. 4.2. Differenza di peso tra topi wt e  $Prep^{gt/gt}$ .** (A) Il peso testicolare è maggiore nei wt rispetto ai  $Prep^{gt/gt}$ . Tutti i dati rappresentano la media  $\pm$ SEM. \* $P < 0,05$ . (B) Aspetto e lunghezza approssimativa dei testicoli di topi wt e  $Prep^{gt/gt}$ , rappresentativi della differenza di dimensione. WT: campioni wild type. gt/gt: campioni  $Prep^{gt/gt}$  gene trap.



**Fig. 4.3**

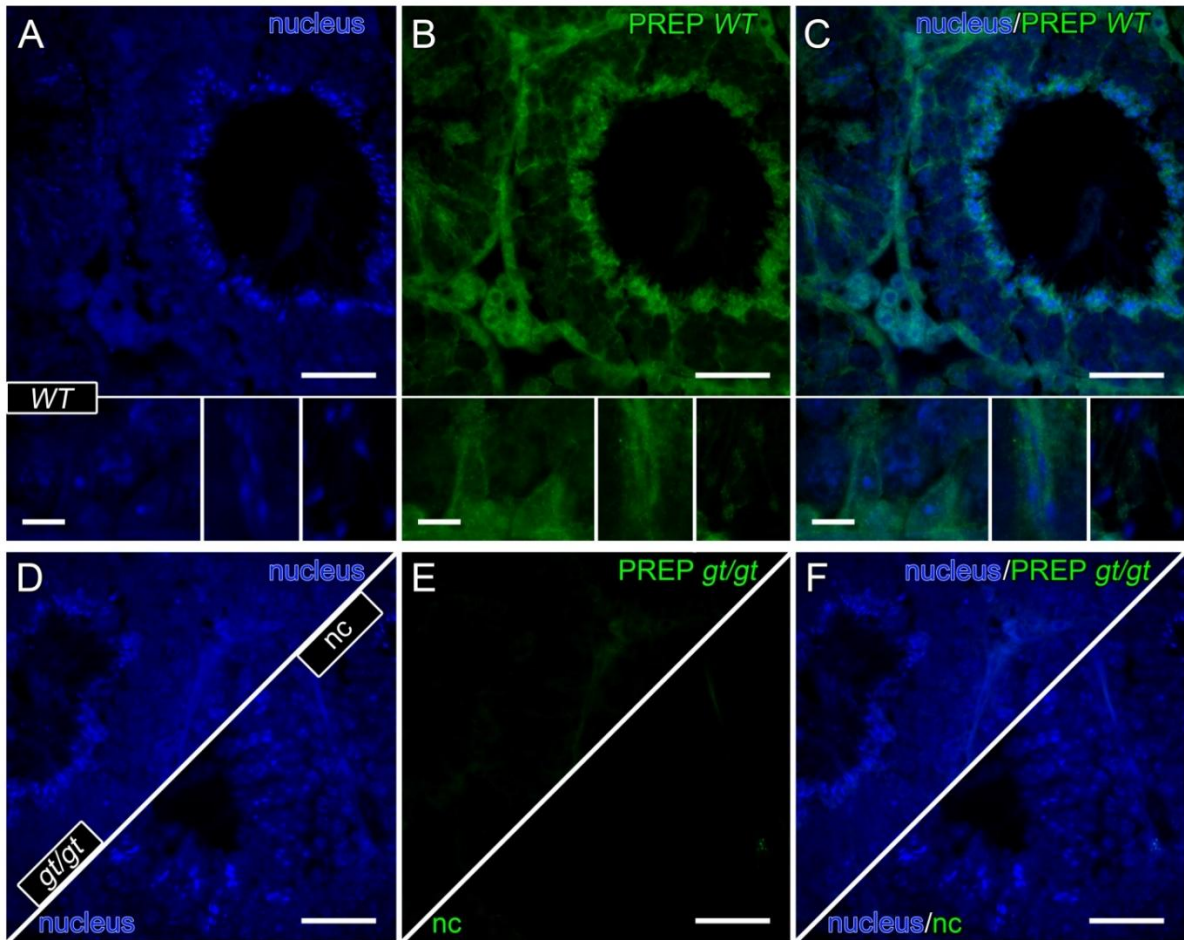


**Fig. 4.3.** Analisi istologica dei tubuli seminiferi del testicolo di topi wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*. (A-C) Differenza del diametro del tubulo (A) e del lume (B), e percentuale di tubuli spermati (C). I testicoli dei wt presentano un maggiore diametro e numero di tubuli spermati. Tutti i dati rappresentano la media  $\pm$ SEM; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . (D, E) Colorazione ematossilina-eosina, rappresentativa delle differenze strutturali dei testicoli nei due genotipi, wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Le barre rappresentano 100  $\mu$ m. WT: campioni wild type. *gt/gt*: campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>* gene trap.

### ***4.3 - Localizzazione di PREP nel testicolo e negli spermatozoi***

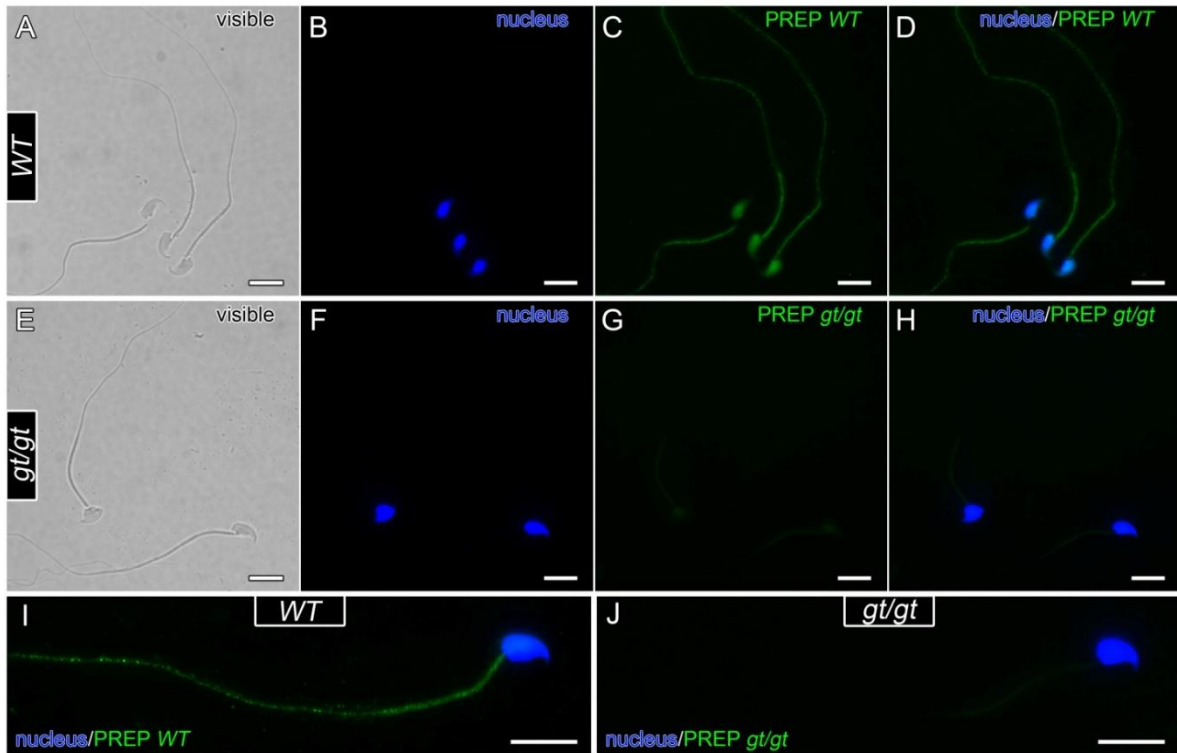
La localizzazione di PREP è stata studiata tramite analisi di immunofluorescenza in campioni wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Come mostrato in fig. 4.4 (B e C), la proteina è presente negli spermatidi in allungamento, negli spermatozoi luminali dei testicoli wt, nelle cellule di Sertoli, Leydig e peritubulari. In accordo con l'analisi di Western Blot, nel testicolo dei topi *Prep<sup>gt/gt</sup>* si evidenzia una debole e diffusa fluorescenza. Per ottenere migliore dettaglio circa la distribuzione di PREP nelle cellule germinali mature, è stata eseguita l'analisi di localizzazione della proteina su spermatozoi epididimali (Fig. 4.5). I risultati mostrano un segnale maggiore nella testa e nel tratto intermedio di SPZ rispetto alla rimanente regione del flagello. Negli SPZ *Prep<sup>gt/gt</sup>* il segnale è quasi assente.

**Fig. 4.4**



**Fig. 4.4. Localizzazione di PREP nel testicolo di topo.** (A, D) Marcatura nucleare con DAPI (blu). (B, E) Fluorescenza di PREP (verde); (C, F): Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/verde). (A-C) Testicoli dei wt; le cellule positive includono le Sertoli, gli spermatidi allungati, gli spermatozoi luminali (inserto, da sinistra a destra), le cellule di Leydig e le peritubulari. (D-F) I triangoli superiori rappresentano i testicoli di *Prep<sup>gt/gt</sup>*, che mostrano solo una fluorescenza diffusa (verde in E, F); triangoli inferiori rappresentano i controlli negativi, ottenuti omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 50 μm (A-F), 10 μm negli inserti. WT: campioni wild type. *gt/gt*: campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>* gene trap. Nc: controllo negativo.

**Fig. 4.5**

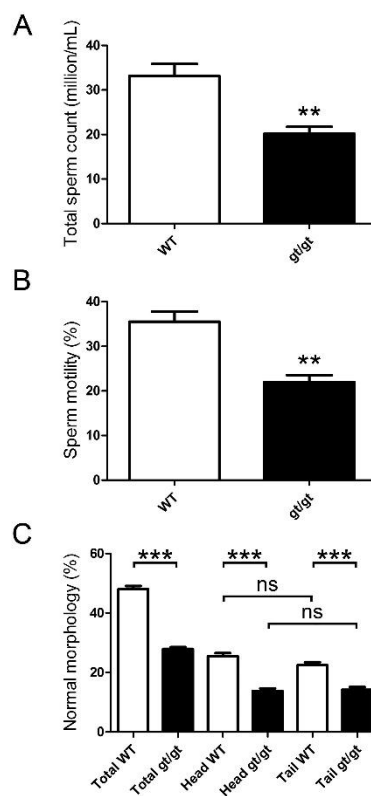


**Fig. 4.5. Localizzazione di PREP in SPZ di topo.** (A, E) Campo chiaro. (B, F) Marcatura nucleare con DAPI (blu). (C, G) Fluorescenza di PREP (verde); (D, H): Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/verde); (I, J) Sovrapposizione dei canali ad alto ingrandimento in SPZ wt (I) e *Prep<sup>gt/gt</sup>* (J). (A-D, I) SPZ di wt dove PREP localizza nella testa e nella coda. Il segnale è particolarmente evidente nel tratto intermedio. (E, F, J): SPZ di *Prep<sup>gt/gt</sup>*: il segnale non è rilevabile. Le barre rappresentano 5  $\mu$ m. WT: campioni wild type. *gt/gt*: campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>* gene trap.

#### 4.4 - Conta totale, motilità e morfologia degli spermatozoi

Successivamente alle analisi istologiche eseguite sul testicolo, allo scopo di estendere l'indagine ai gameti maturi, sono stati valutati i parametri spermatici in entrambi i campioni, wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*. I dati (Fig. 4.6) mostrano che la conta totale ( $33,2 \pm 2,7$  milioni/mL vs.  $20,22 \pm 1,5$  milioni/mL; Fig. 4.6A) e la motilità degli SPZ ( $35,5 \pm 2,3$  % vs.  $22,0 \pm 1,6$  %; Fig. 4.6B) sono statisticamente maggiori nei wt in confronto ai *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Inoltre, anche la percentuale (%) di SPZ morfologicamente normali risulta essere più alta nei wt ( $48,0 \pm 1,1$  % vs.  $27,9 \pm 1,0$  %; Fig. 4.6C), mentre nessuna differenza è rivelata tra la % di alterazioni nella testa e nella coda di SPZ in entrambi i campioni esaminati.

**Fig. 4.6**



**Fig. 4.6. Parametri spermatici di topi wt e *Prep<sup>gt/gt</sup>*.** (A-C) Differenza della conta spermatica totale (A), motilità (B) e morfologia (C). I campioni wt mostrano un maggiore numero di SPZ, percentuale (%) di motilità, e (%) di normale morfologia. Non ci sono differenze statisticamente significative tra la % di alterazioni nella testa e coda (C). Tutti i dati rappresentano la media  $\pm$ SEM; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. Ns: nessuna significatività statistica. WT: campioni wild type. gt/gt: campioni *Prep<sup>gt/gt</sup>* gene trap.

## 5. Discussione e Conclusioni

La prolil endopeptidasi (PREP) è un enzima coinvolto in molti processi fisiologici e patologici per mezzo della sua capacità di digerire piccoli peptidi all'estremità C-terminali di residui di prolina. Diversi studi mostrano che questa proteina potrebbe avere un ruolo molto importante nel sistema nervoso centrale, dove degrada peptidi neuroattivi (Mentlein, 1988; Wilk, 1983); tuttavia, risulta interessante il suo possibile ruolo diretto o indiretto anche in altri distretti, inclusi gli organi riproduttori. Infatti, PREP è stato originariamente trovato nell'utero umano come enzima capace di degradare l'ossitocina (Walter et al., 1971) e, successivamente, è stato studiato nella gametogenesi maschile. PREP è stato prima purificato negli spermatozoi di ascidia (Yokosawa et al., 1983); dopo, Yoshida et al. (1999) hanno isolato la proteina dai testicoli di arringa, e i loro risultati hanno suggerito una possibile localizzazione di PREP sulla superficie del flagello spermatico; inoltre, essi hanno anche ipotizzato che l'enzima possa interagire con alcune proteine attivanti lo spermatozoo. In seguito, nei Mammiferi, specificamente in topo, PREP è stato localizzato negli spermatidi (SPT) e negli spermatozoi (SPZ) ed è stato ipotizzato il suo possibile coinvolgimento nella motilità dello spermatozoo (Kimura et al., 2002). Infine, successive analisi eseguite in uomo hanno mostrato che l'enzima localizza nei tubuli seminiferi e nelle cellule di Leydig del testicolo, e proposto la sua partecipazione nella regolazione dei livelli di TRH, come molecola coinvolta nella morte cellulare, associata alla necrozoospermia (Valdivia et al., 2004; Myöhänen et al., 2012). Tutti questi studi suggeriscono che PREP potrebbe svolgere un ruolo importante nelle funzioni riproduttive maschili. Nel presente studio, allo scopo di approfondire le attuali conoscenze circa il possibile ruolo di PREP nella spermatogenesi, sono stati esaminati gli effetti della mancata espressione genica di tale enzima, utilizzando topi transgenici PREP knockdown (*Prep<sup>gt/gt</sup>*), su testicoli e SPZ. In prima analisi è stata confermata la presenza dell'espressione

della proteina nei testicoli e SPZ sia in topi wild type (wt) che *Prep<sup>gt/gt</sup>*. Successivamente, è stata eseguita un'analisi macroscopica dei testicoli nei wt e knockdown: i dati mostrano che le gonadi di topi *Prep<sup>gt/gt</sup>* risultano di peso inferiore rispetto ai wt. Similmente, le analisi istologiche mostrano che, mentre la morfologia generale appare conservata, il diametro totale e luminale dei tubuli seminiferi risulta ridotto nei knockdown, e che la percentuale di tubuli spermatici è anche ridotta rispetto ai wt. Questa prima evidenza potrebbe suggerire un possibile risultato sistemico/gonadico causato dalla mancata funzione di PREP nel sistema nervoso centrale dei topi knockdown: l'enzima è, infatti, coinvolto nella regolazione pulsatile di GnRH (Yamanaka et al., 1999). Per cui, dato il ruolo cruciale del GnRH nell'asse riproduttivo ipotalamo-ipofisi-gonade, l'assenza di PREP potrebbe di conseguenza interrompere il fisiologico controllo degli ormoni che sono normalmente rilasciati sotto stimolazione dell'asse, come LH, FSH e testosterone. Quindi, una relazione potrebbe esistere tra le funzioni normali di PREP e un corretto sviluppo, e/o una appropriata struttura del testicolo. Nelle gonadi, PREP localizza nelle cellule di Sertoli, SPT allungati e negli SPZ, in accordo con le precedenti osservazioni di Kimura et al., (2002). Questi dati sono correlati con la fisiologica attività delle cellule di Sertoli nel mantenere gli SPT fino al loro rilascio durante la spermiogenesi, e con il processo di spermiogenesi, durante il quale PREP potrebbe essere necessario per un corretto differenziamento degli SPT. Inoltre, la presenza dell'enzima fuori dal compartimento germinale, nelle cellule interstiziali di Leydig, supporta l'ipotesi che esso potrebbe agire nel controllo dello sviluppo delle cellule germinali, modulando entrambi i livelli paracrini ed endocrini delle gonadotropine. Nelle cellule peritubulari, che sono essenziali per la contrazione dei tubuli nel processo di spermiogenesi, la presenza di PREP potrebbe essere associata con la maturazione di piccole molecole attive che contribuiscono in tale processo, come l'ossitocina. Pertanto, questa ampia distribuzione nel distretto tubulare suggerirebbe una possibile funzione locale di PREP, insieme ad un coinvolgimento sistemico, indiretto. Tuttavia l'espressione dell'enzima è ritenuta sia nella testa che nel tratto intermedio

degli spermatozoi epididimali di topi wt (in accordo con Kimura et al., 2002), indicando che la endopeptidasi potrebbe essere implicata anche nelle funzioni dei gameti maturi. Infatti, questa ipotesi è supportata dai risultati, ottenuti in questo studio, circa i parametri spermatici: la conta totale, la normale morfologia e la motilità sono alterati e ridotti nei topi knockdown, rispetto ai wt. Come indicato, le differenze nel numero e nella forma fisiologica degli SPZ, potrebbero essere spiegate dalle sopracitate azioni sistemiche e/o locali dell'enzima sulla spermiiazione e spermiogenesi. La riduzione della motilità degli spermatozoi, tuttavia, risulta molto interessante: nei Mammiferi tale processo è attivato dall'aumento intracellulare di calcio (Herrick et al., 2005; Ho and Suarez, 2003), e PREP è stato descritto come possibile membro del pathway dell'inositolo 1,4,5 trifosfato, in particolare come regolatore dell'attività di fosfatasi multiple dell'inositolo, che permettono una modulazione dei livelli di calcio citosolici (Szeltner and Polgár, 2008). Quindi, i risultati finora descritti suggeriscono che PREP, attraverso il suo coinvolgimento nel signaling del calcio, potrebbe essere implicato nella regolazione del movimento e progressione dello spermatozoo.

In conclusione, ad oggi, non è stato descritto un ruolo specifico di PREP nel sistema riproduttivo maschile, ma studi precedenti hanno suggerito che questo enzima potrebbe svolgere un ruolo nella funzione delle gonadi e nella fisiologia del gamete. Allo scopo di approfondire tali ipotesi, in questo studio è stato dimostrato, per la prima volta, che l'enzima è, infatti, necessario per una corretta funzione riproduttiva e che la sua assenza provoca alterazioni delle gonadi e dei gameti. Questi nuovi dati forniscono una base per studi futuri che possano investigare sui meccanismi molecolari nei processi riproduttivi in cui PREP è coinvolto.



## ***Parte III:***

***Espressione e localizzazione di DAAM1 durante la spermatogenesi di ratto e negli spermatozoi di uomo***

# 1.Introduzione

## *Dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAM1)*

### *1.1- Daam1: caratteristiche e struttura della proteina*

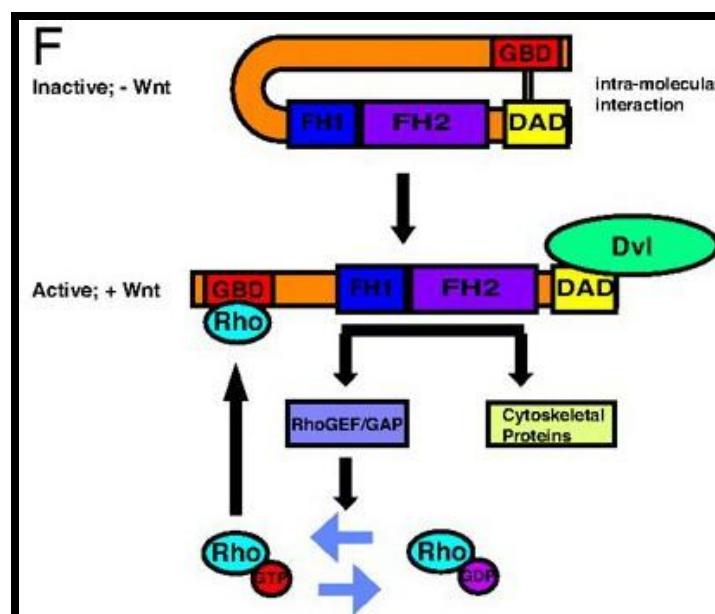
Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1), isolata per la prima volta nel 2001 in uno studio sulla gastrulazione di *Xenopus* (Habas et al., 2001), è una proteina appartenente alla famiglia delle formine, un grande gruppo di proteine che regola l'assemblaggio dei filamenti di actina in risposta a diversi segnali (Kovar, 2006; Goode and Eck, 2007).

DAAM1 presenta la struttura di una tipica formina, contenente tre domini principali: il dominio che lega la GTPasi (GDB), il dominio FH1 e il dominio FH2 (Formin Homology Domain 1 e 2) (Higgs, 2005). Il dominio FH1 è caratterizzato da tratti ricchi di prolina che legano la profilina, così come altre proteine contenenti il dominio SH3. Il dominio FH2 lega l'actina, e permette la nucleazione di nuovi filamenti non ramificati di quest'ultima (Sagot et al., 2002; Pruyne et al., 2002).

Il diaphanous autoinhibitory domain (DAD) mantiene la proteina in uno stato autoinibito nel citoplasma. Questo dominio, localizzato all'estremità C-terminale, media l'interazione con l'estremità N-terminale della proteina, che comprende il dominio diaphanous inhibitory (DID) e il dominio GDB, stabilizzandola in una conformazione chiusa (Goode and Eck, 2007). L'attivazione di DAAM1 si ha in seguito all'interazione di quest'ultima con una fosfoproteina chiamata Dishevelled (Dvl), che lega specificamente DAAM1, rompendo l'interazione DAD/GDB (Fig. 1.1). Nello stato attivo DAAM1 può

interagire con diversi effettori, quali la profilina, e le proteine RhoGEF e RhoGAP per modulare l'attività di Rho. È importante sottolineare che, a valle di DAAM1, sono evidenti due attività: l'attivazione di Rho e i cambiamenti citoscheletrici, compresa la formazione delle fibre di stress che comporta le variazioni di forma delle cellule. Il dominio FH2 è quello responsabile della formazione delle fibre di stress, perché mutazioni indotte all'interno del dominio FH2 aboliscono la capacità di DAAM1 di indurre la formazione di tali fibre. Inoltre, mutazioni nel dominio FH2 non aboliscono l'attivazione di Rho mediata da DAAM1, ma l'inibizione dell'attività di Rho riduce la formazione delle fibre di stress, suggerendo che queste due attività sono strettamente integrate (Liu et al., 2008).

**Fig. 1.1**



**Fig. 1.1** - Modello di attivazione di DAAM1(Liu et al., 2008).

## ***1.2- Pathway di Wnt e attivazione di DAAMI***

DAAMI è una proteina localizzata sia sulla membrana plasmatica, sia sulle vescicole citoplasmatiche e la sua attività è strettamente correlata a Wnt e Dishevelled (Habas et al., 2001; Kida et al., 2007). Queste due proteine regolano numerosi processi cellulari, fra cui determinazione del destino della cellula, motilità, polarità, formazione dell'asse primario ed organogenesi (Yamaguchi, 2001).

Sono stati identificati 19 ligandi Wnt, che sono delle proteine ricche in cisteina, di circa 350-400 amminoacidi, che possiedono una sequenza segnale per la secrezione all'estremità N-terminale. Nella matrice extracellulare, le proteine Wnt possono legare ed essere stabilizzate da proteoglicani eparan solfato, come Dally, che limitano la loro diffusione e modulano la loro attività (Lin, 2004).

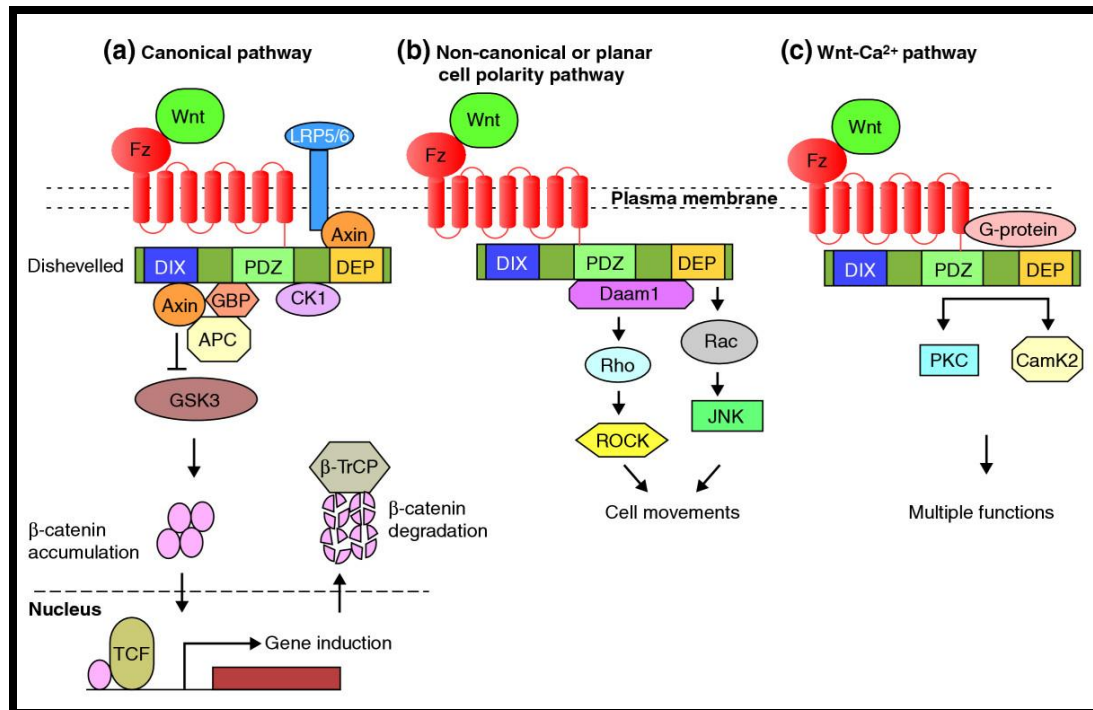
I recettori per Wnt sono stati identificati nelle proteine Frizzled (Fz) (Bhanot et al., 1996). Inoltre, per l'attivazione della via canonica è necessaria la presenza di un recettore a singolo segmento transmembrana, della famiglia LRP che, insieme a Fz e Wnt, forma un complesso recettoriale trimetrico che attiva la via di trasduzione (Tamai et al., 2000).

Il segnale extracellulare portato da Wnt attiva, infatti, varie cascate di trasduzione del segnale intracellulari, quali il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina dipendente, o canonico, e il pathway  $\beta$ -catenina indipendente, o non canonico, che a sua volta può essere suddiviso nel pathway Planar Cell Polarity (PCP) e nel pathway Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1.2) (Habas et Dawid, 2005).

La via canonica attivata da Wnt coinvolge la  $\beta$ -catenina. In assenza del segnale, la  $\beta$ -catenina citoplasmatica è degradata, in quanto viene fosforilata da una serina-treonina chinasi, la caseina chinasi Ia (CKIa) (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002, Yanagawa et al., 2002) e dalla glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK-3) (Yost et al., 1996). Queste chinasi, insieme alle proteine scaffold Axina e APC (Hart et al., 1998; Kishida et al., 1998) formano con la  $\beta$ -catenina un

complesso che permette a quest'ultima di essere riconosciuta dalla  $\beta$ -TrCP, ubiquitinata e quindi degradata via proteasoma (Aberle et al., 1997; Liu et al., 1999).

**Fig. 1.2**



**Fig. 1.2** - Vie di trasduzione del segnale attivate da Wnt (Habas and Dawid, 2005).

Quando Wnt lega il recettore Fz, il segnale è trasdotto alla fosfoproteina Dishevelled, che interagisce direttamente con Fz (Wallingford and Habas, 2005), e che, una volta attiva, inibisce l'attività dell'enzima GSK-3. Si ha, quindi, la mancata fosforilazione della  $\beta$ -catenina, e così della sua degradazione. Questa, pertanto, si accumula, migra nel nucleo (Tolwinski and Wieschaus, 2004) e lega i fattori trascrizionali LEF/TCF (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Il complesso così formato lega le sequenze promotrici di geni target, quali *Siamesis* and *Twin*, che sono richiesti durante l'embriogenesi (Reya and Clevers, 2005). La via di segnalazione canonica di Wnt gioca, di conseguenza, un ruolo essenziale nel decidere il destino delle cellule durante lo sviluppo embrionale.

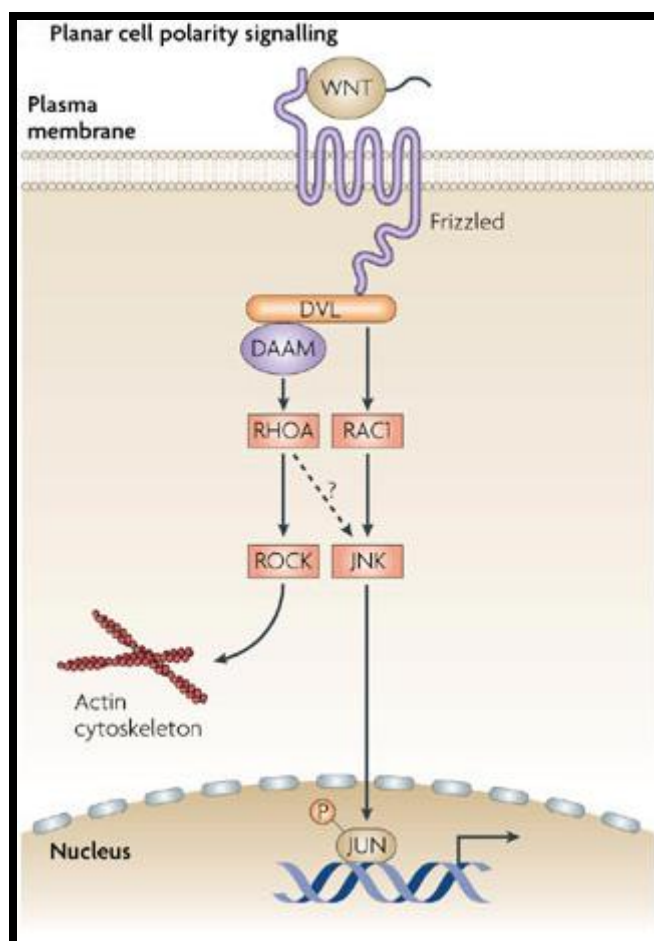
Nelle due vie del pathway non canonico il segnale portato da Wnt è mediato dal suo legame con Fz ed è indipendente dai corecettori LRP (He et al., 2004):

Il pathway Wnt/  $Ca^{2+}$ , che dipende dall'attivazione di proteine Gq, stimola il rilascio intracellulare di  $Ca^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico (Kohn and Moon, 2005; Slusarski and Pelegri, 2007). Infatti, il legame Wnt/Fz porta all'attivazione della fosfolipasi C e al risultante aumento del  $Ca^{2+}$ . Il flusso di  $Ca^{2+}$  attiva quindi una serie di proteine  $Ca^{2+}$  – dipendenti, quali PKC (Sheldahl et al., 2003) e la chinasi calcio/calmodulina dipendente II. Quest'ultima attiva i fattori di trascrizione NFAT, TAK1 e NLK, che possono antagonizzare il segnale  $\beta$ -catenina/TCF (Ishitani et al., 1999). Questa via di segnalazione è coinvolta nel regolare l'adesione cellulare, riarrangiamenti citoscheletrici ed altri processi che avvengono durante lo sviluppo, come la comparsa della simmetria dorso-ventrale e la separazione dei tessuti negli embrioni (Kohn and Moon, 2005).

L'altra via del pathway non canonico è rappresentato dal Planar Cell Polarity (PCP) (Fig. 1.3). È stato mostrato che esso è implicato nel movimento delle cellule polarizzate e nella gastrulazione dei vertebrati (Klein and Mlodzik, 2005). Infatti, il fine di questo pathway è la regolazione, indipendente dalla trascrizione, dell'actina del citoscheletro.

Dopo il legame di Wnt con il recettore Fz, si ha l'attivazione della proteina Dvl. Questa consiste di circa 750 amminoacidi, e possiede tre domini altamente conservati: all'estremità N-terminale è presente il dominio DIX, di 80 amminoacidi; un dominio centrale di circa 90 amminoacidi, chiamato PDZ, mentre all'estremità C-terminale si trova il dominio DEP, costituito da 80 amminoacidi (Boutros and Mlodzik, 1999). Inoltre, sono presenti altre due regioni conservate: una regione basica, ed una regione ricca di proline, implicate nell'interazione proteina / proteina e nella fosforilazione.

**Fig. 1.3**



**Fig. 1.3** - Pathway PCP (Staal et al., 2008).

I domini PDZ e DEP sono utilizzati per innescare due vie parallele, che attivano le GTPasi Rho e Rac (Wallingford et Habas, 2005).

Il dominio DEP di Dsh permette l'attivazione della GTPasi Rac, che una volta attiva è in grado di stimolare l'attività di JNK, che può fosforilare vari fattori trascrizionali, tra cui c-Jun (Dhanasekaran and Reddy, 2008).

Dvl interagisce con Rho tramite DAAM1 (Habas et al., 2001), che viene mantenuta nel citoplasma in uno stato autoinibito grazie all'interazione tra i domini GDB e DAD. Infatti, tramite i suoi domini PDZ e DEP, Dsh rimuove questa inibizione intramolecolare, portando all'attivazione di DAAM1 (Liu et al, 2008). Il complesso Dvl/DAAM1 è, quindi, in grado di

reclutare ed attivare il fattore di scambio guanilico WGEF, che attiva a sua volta Rho (Habas et al., 2001; Tanegashima and Dawid., 2008). Infine, Rho è in grado di attivare una “chinasi associata a Rho” (ROCK) (Marlow et al., 2002), che porta a modificazioni dell’actina e a riarrangiamenti del citoscheletro.

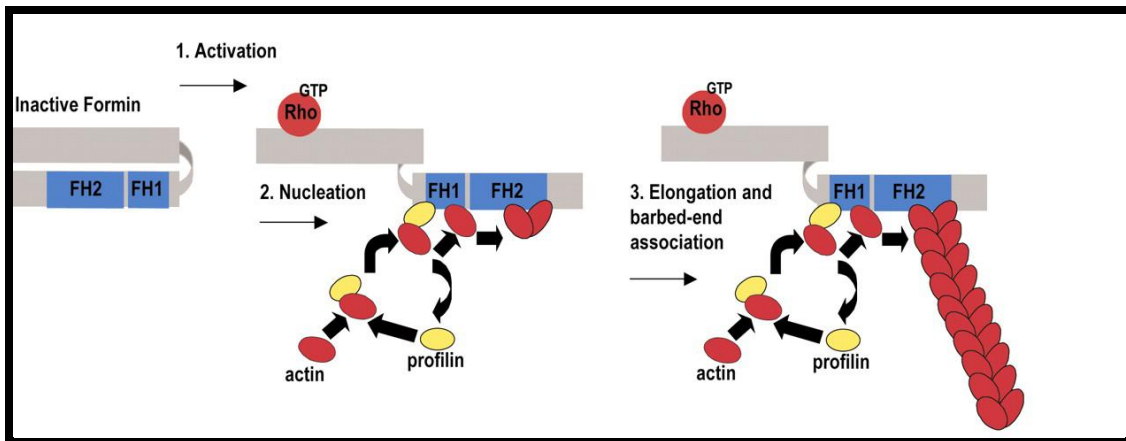
### ***1.3- Ruolo biologico di DAAM1***

Diversi studi hanno mostrato che DAAM1 interviene in vari processi biologici essenziali, quali la polarità cellulare, il movimento cellulare e l’adesione durante la morfogenesi e l’organogenesi (Zallen, 2007).

Il suo compito in molti di questi eventi è principalmente dovuto al suo coinvolgimento nella formazione di polimeri di actina, il cui ruolo è fondamentale in strutture quali giunzioni aderenti tra le cellule epiteliali e filopodi (Kobielak et al., 2004; Pellegrin and Mellor, 2005). Al pari delle altre formine, il dominio FH2 è quello responsabile della nucleazione dell’actina. Tale dominio, l’unità funzionale necessaria e sufficiente per la nucleazione (Pruyne et al., 2002; Li and Higgs, 2003), forma un dimero a forma di anello (Xu et al, 2004). Dopo la dimerizzazione (Li and Higgs, 2003), le due molecole di formina legano monomeri di G-actina e stabilizzano un dimero di quest’ultima (Fig. 1.4). Poiché l’affinità del dominio FH2 per la G-actina e l’affinità del complesso formina - actina per altre molecole di actina risultano essere basse (<5mM), l’attività di nucleazione di questa classe di molecole è molto lenta. Studi *in vivo* hanno invece mostrato che le formine hanno un turnover molto rapido, suggerendo la presenza di altri fattori che possono accelerare il processo (Zigmond, 2004). Uno di questi è la profilina, che lega il loro dominio FH1e la G-actina, promuovendo l’aggiunta di monomeri alla “barbed-end” dei filamenti di actina, permettendone l’allungamento.



**Fig. 1.4**



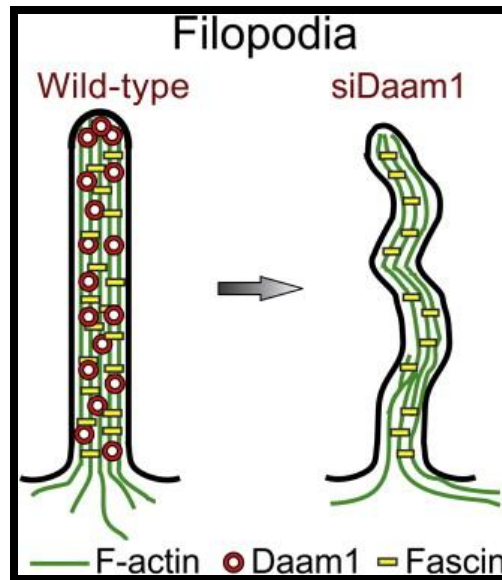
**Fig. 1.4** - Ruolo delle formine nella nucleazione dell'F-actina (Evangelista et al., 2003).

L'actina è uno degli elementi principali che costituiscono i fillopodi, sottili protrusioni cellulari che, grazie alle loro azioni di estensione e ritrazione, consentono la migrazione e l'adesione cellulare (Faix and Rottner, 2006; Mattila and Lappalainen, 2008). I fasci di actina corrono parallelamente lungo la lunghezza del fillopodio, e sono legati tra di loro da legami crociati (DeRosier and Edds, 1980; Vignjevic et al., 2006), che vengono promossi da una proteina, la fascina. Questi fasci sono orientati in modo che la "barbed end" punti verso la punta del fillopodio (Small et al., 1978), terminando con una regione chiamata "tip complex" formata da numerose proteine che legano e promuovono la nucleazione dell'actina (Okabe and Hirokawa, 1991); i fasci di actina che invece si trovano alla base del fillopodio sono collegati alla rete di actina che giace al di sotto della membrana plasmatica (Lewis and Bridgman, 1992).

Studi mirati al silenziamento di DAAM1 mostrano la formazione di fillopodi dall'aspetto ondulante, in cui i filamenti di actina sono curvi, deformati e disorganizzati (Vignjevic et al., 2006), anche se questo non ferma la formazione dei fillopodi stessi (Fig. 1.5). È stato inoltre

dimostrato che DAMM1 interviene attivamente nella formazione di queste strutture, collaborando direttamente con la fascina (Jaiswal et al., 2013).

**Fig. 1.5**



**Fig. 1.5** - Effetto del silenziamento di DAAM1 nella formazione di filopodi (Jaiswal et al., 2013).

Grazie a questo studio si è potuto verificare non solo che la fascina è legata all'estremità C-terminale di DAAM1, ma anche che essa stabilizza il legame di DAAM1 con i fasci di actina lungo l'asta del filopodio. Quindi, sia DAAM1 che la fascina sono indispensabili per la produzione di filopodi integri strutturalmente.

Il pathway PCP di Wnt è anche coinvolto nella morfogenesi del cuore. Studi recenti, infatti, hanno dimostrato che topi knockout per il gene *DAAM1* morivano precocemente in utero, mostrando gravi malformazioni cardiache (Li et al., 2011).

Il ruolo di DAAM1 è esplicito anche nel regolare il movimento cellulare. Questa proteina, infatti, è stata ritrovata associata alla miosina IIB, avvalorando il modello secondo il quale la formina contribuisce al suo assemblaggio con l'F-actina, in un pathway che

coinvolge il movimento polarizzato, come appunto la migrazione diretta di cellule in coltura. La posizione di DAAM1 rispetto alla miosina IIB suggerisce, inoltre, che i filamenti di miosina possono attirare fattori di nucleazione dei filamenti di actina per produrre complessi funzionali di acto-miosina. Questi processi possono quindi promuovere il movimento nucleare e la posizione del centrosoma durante la polarizzazione cellulare (Bershadsky and Futerman, 1994).

Il ruolo di DAAM1 nei tessuti adulti risulta a tutt'oggi poco chiaro. Data la sua influenza nell'elongazione dei filamenti di actina, si può comunque ipotizzare un suo ruolo in tessuti che richiedono un considerevole contenuto di questa componente del citoscheletro. Uno di questi è sicuramente il testicolo, in cui si osservano vari riarrangiamenti strutturali nell'epitelio seminifero durante la spermatogenesi. Questo rimodellamento è reso possibile grazie alla presenza di specifiche giunzioni cellula-cellula, movimenti ameboidi e plasticità delle cellule presenti nel tessuto riproduttivo. Dato il caratteristico rinnovamento continuo del testicolo, l'analisi e la comprensione dei meccanismi alla base di questo processo è di attuale interesse.

## 2. Scopo della ricerca

Il dominio FH2, comune a tutte le formine, conferisce a Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1) la capacità di nucleazione di filamenti di actina non ramificati. Questo rende DAAM1 una proteina il cui ruolo risulta essenziale in processi che coinvolgono la formazione di F-actina, quali determinazione della polarità cellulare, movimento cellulare, e adesione durante l'embriogenesi e la morfogenesi. Sebbene sia stato ben studiato il ruolo di DAAM1 nello sviluppo, non è del tutto chiara la sua attività in tessuti adulti.

Nel 2011, il gruppo per cui ho svolto l'attività di dottorato ha isolato nel testicolo di *Pelophylax esculentus* un cDNA codificante per DAAM1. Studi preliminari eseguiti su questo modello animale hanno in seguito evidenziato la presenza del peptide all'interno delle spermatocisti nel testicolo. Successivamente, gli studi sono stati concentrati su un altro modello animale, *Rattus norvegicus*, la cui struttura del testicolo e gli eventi che avvengono durante la spermatogenesi sono emblematici di quelli dei Mammiferi (Russell et al., 1989).

Infatti, come evidenziato nei capitoli precedenti, la biologia della riproduzione rappresenta la tematica di interesse principale del gruppo in cui ho svolto l'attività di dottorato, ed in particolare lo studio della spermatogenesi. Già in passato sono stati isolati e studiati vari fattori che prendono parte nei processi di maturazione dei gameti maschili, nonché nella funzionalità dello spermatozoo durante la reazione acrosomale (PTMA; Ferrara et al., 2013).

Allo scopo di acquisire nuove conoscenze nei meccanismi molecolari che permettono il differenziamento delle cellule germinali maschili, data la capacità della formina di interagire con i filamenti di actina e quindi il suo coinvolgimento nel modulare il

citoscheletro, nella terza parte del lavoro di tesi, è stata valutata l'espressione e la localizzazione di DAAM1 durante la morfogenesi del testicolo di ratto e nei gameti dei Mammiferi. In prima analisi è stata studiata la presenza della proteina nel testicolo di ratto in diversi stadi di sviluppo post-partum (7-14-21-28-35-42-60 dpp) che ben ricapitolano gli eventi della prima ondata spermatogenetica. Durante la maturazione della gonade, ma anche durante il ciclo dell'epitelio seminifero, infatti, avvengono vari processi di rimodellamento della struttura del testicolo; in quest'ottica quindi può suscitare grande interesse il ruolo di DAAM1 che, come noto, è implicato nei fondamentali eventi dello sviluppo embrionale. Quindi è stata analizzata la localizzazione della proteina durante la prima ondata spermatogenetica nella quale si assiste all'arricchimento progressivo dei tubuli con i vari tipi di cellule germinali di nuova formazione e al rimodellamento dell'architettura della gonade (Clermont and Perey, 1957). Dato il coinvolgimento di DAAM1 nel rimodellamento citoscheletrico è stato approfondito lo studio della localizzazione della proteina rispetto alla distribuzione di proteine citoscheletriche, quali actina e tubulina. Infine l'analisi di localizzazione di DAAM1 è stata estesa nei gameti maschili sia di ratto che di uomo.

## 3. Materiali e Metodi

### *3.1 - Cura degli animali, estrazione di tessuti e di spermatozoi di ratto*

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 differenti stadi di sviluppo (7 giorni dopo il parto (dpp), 14 dpp, 21 dpp, 28 dpp, 35 dpp, 42 dpp, 60 dpp) 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 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 proteine. In aggiunta sono stati rimossi epididimi da ratti adulti e immersi in tampone fosfato, PBS (13.6 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 8.08 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4) per estrarre gli spermatozoi (SPZ). In seguito i campioni di liquido seminale sono stati filtrati ed esaminati al microscopio per escludere contaminazioni di altri tipi cellulari. Vetrini con aliquote di SPZ sono stati asciugati all'aria e conservati a -20°C, mentre la restante parte dei campioni di liquido seminale è stata centrifugata a 1000g per 15 minuti e conservata a -80°C, per l'estrazione delle proteine.

### ***3.2 - Collezione di spermatozoi di uomo***

Spermatozoi di umani da donatori qualificati sono stati centrifugati a 800g per 10 minuti, il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in PBS. I campioni sono stati esaminati al microscopio ottico e aliquote di SPZ sono stati asciugati all'aria e conservati a -20°C, mentre la restante parte dei campioni di liquido seminale è stata utilizzata per l'estrazione delle proteine.

### ***3.3 - Preparazione di proteine totali ed analisi di Western blot***

Testicoli e spermatozoi (di ratto e uomo) sono stati lisati in uno specifico tampone (1% NP-40, 0.1% SDS, 100 mM sodio ortovanadato, 0.5% sodio deossicolato in PBS) in presenza di una serie di inibitori di proteasi: 4 mg/mL di leupeptina, aprotinina, pepstatina A, chimostatina, PMSF, e 5mg/mL di TPCK.

Gli omogenati sono stati sonicati con 3 impulsi da 20 Hertz della durata di 20 secondi ognuno e successivamente centrifugati per 30 minuti a 10000 g. Il surnatante è stato prelevato e congelato a -80 °C. La concentrazione delle proteine negli estratti totali è stata stimata mediante il saggio colorimetrico Lowry. Proteine di testicolo e gli spermatozoi (50 µg) sono stati separati in base al loro peso molecolare tramite elettroforesi su gel SDS-PAGE al 9% e trasferite su un filtro Hybond-P polivinilidene difluoruro (PVDF; Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK) a 280 mA per 2.5 ore a 4°C. I filtri sono stati poi trattati per 3 ore con una soluzione di bloccaggio (5% latte in PBS pH 7.4 e 0.1% di Tween-20), prima di aggiungere l'anticorpo primario 1:1000 anti-DAAM1(Sigma Sigma-Aldrich Corp.; Milan, Italy), o anti-actina (DAKO; Glostrup, Denmark), o anti-tubulina (Sigma Sigma-Aldrich Corp.; Milan, Italy), e incubati per una notte a 4°C. Successivamente i filtri sono stati

sottoposti a tre lavaggi, in PBS pH 7.4, e incubati con IgG secondarie anti -Fc di coniglio coniugate con la perossidasi di rafano 1:5000 (DAKO; Glostrup, Denmark) per DAAM1, o con IgG secondarie anti -Fc di topo 1: 1000 (DAKO; Glostrup, Denmark), per l'actina e tubulina , nella stessa soluzione di bloccaggio. I filtri sono stati lavati come descritto prima e gli immunocomplessi rilevati utilizzando ECL-Western Blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK).

### ***3.4 - Controllo della qualità dei tessuti e classificazione dei tipi cellulari***

Allo scopo di verificare la qualità dei campioni e il loro stadio, sezioni di 7µm di tutti i campioni (7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 dpp) sono state utilizzate per effettuare una colorazione ematossilina eosina (Fig. 4.2). I tipi cellulari per ogni dpp sono stati caratterizzati seguendo una precedente classificazione (Picut et al., 2015).

### ***3.5 - Analisi di immunofluorescenza su testicoli***

Per l'analisi di localizzazione di DAAM1, actina e tubulina, sezioni di testicoli di 7 µm sono state deparaffinate, reidratate, e dopo lavate con PBS. Terminata questa fase i vetrini sono stati posti per 3 minuti in una soluzione di citrato 0.01M pH 6 portato alla temperatura di 100°C, per permettere l'esposizione dell'antigene riconosciuto da ogni anticorpo primario. I siti non specifici sono stati bloccati utilizzando un siero appropriato diluito 1:5 in PBS contenente 5% di BSA, prima dell'aggiunta dell'anticorpo primario (anti-DAAM1, o anti-actina, o anti-tubulina) diluito 1:100 e incubato una notte a 4°C. Dopo i lavaggi in PBS, i vetrini sono stati incubati per 1 ora con PNA lectina (Alexa Fluor 568- Invitrogen, Monza



MB, Italy) diluito 1:50 e un anticorpo secondario appropriato (Alexa Fluor 488- Invitrogen, Monza MB, Italy; o FITC-Jackson ImmunoResearch, Pero MI, Italy) diluito 1:500 nella stessa soluzione di bloccaggio. Infine i vetrini sono stati montati con Vectashield+DAPI (Vector Laboratories; Peterborough, UK) per la marcatura nucleare e, in seguito, visualizzati al microscopio ottico (Leica DM 5000 B+CTR 5000) con la lampada UV, per mezzo del software IM1000.

### ***3.6 - Analisi di immunofluorescenza su SPZ***

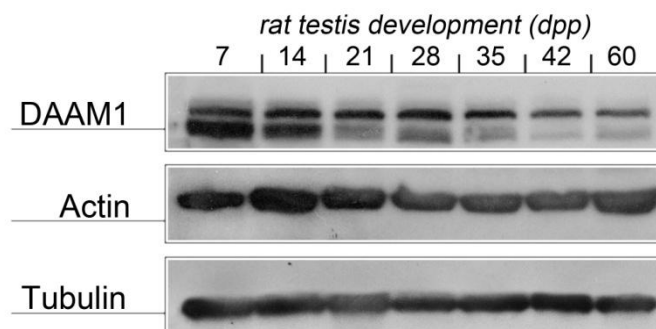
Allo scopo di determinare la localizzazione di DAAM1, actina e tubulina negli spermatozoi di ratto e uomo, vetrini con SPZ di entrambe le specie sono stati fissati in 4% paraformaldeide in PBS, e dopo lavati in tampone salino (0.01M PBS, pH 7.4). Inizialmente i campioni sono stati incubati in Triton X-100 in PBS per 30 minuti. In seguito, i siti di legame non specifici sono stati bloccati con un appropriato siero diluito 1:5 in PBS contenente 5% (w/v) BSA, prima dell'aggiunta dell'anticorpo primario (anti-DAAM1, o anti-actina, o anti-tubulina) come descritto nel paragrafo precedente, e incubati a 4°C per una notte. In seguito sono stati eseguiti lavaggi in PBS, e i vetrini sono stati incubati per 1 ora con PNA lectina (Alexa Fluor 568- Invitrogen, Monza MB, Italy) diluito 1:50 e con un appropriato anticorpo secondario (Alexa Fluor 488- Invitrogen, Monza MB, Italy; o FITC-Jackson ImmunoResearch, Pero MI, Italy) diluito 1:500 nella soluzione di bloccaggio. Infine i vetrini sono stati montati con Vectashield+DAPI (Vector Laboratories; Peterborough, UK) per la marcatura nucleare e, in seguito, visualizzati al microscopio ottico.

## 4. Risultati

### *4.1 - Espressione di DAAM1, Actina e Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto*

L'espressione di DAAM1 è stata eseguita mediante un'analisi di Western Blot su estratti proteici totali di testicolo di ratto (Fig. 4.1). La presenza della proteina durante lo sviluppo post-natale della gonade maschile è stata investigata attraverso l'utilizzo di estratti proteici di alcune delle fasi che rappresentano la prima ondata spermatogenetica: 7 days post-partum (dpp; transizione dei gonociti dal lume del tubulo alla base; 14 dpp (proliferazione delle cellule di Sertoli e spermatogoni A e B); 21 dpp (presenza degli spermatociti, che iniziano il processo meiotico; inizio della formazione della barriera emato-testicolare); 28 dpp (conclusione del primo ciclo meiotico, completamento della barriera emato-testicolare); 35 dpp (presenza degli spermatidi neoformati che iniziano il processo di spermioistogenesi); 42 dpp (step finali della spermioistogenesi); 60 dpp (testicolo maturo; presenza degli spermatozoi e di tutte le caratteristiche associazioni cellulari). La banda di DAAM1 è stata rilevata in tutti i campioni analizzati. Inoltre, un'ulteriore banda di minori dimensioni è stata rilevata, dovuta probabilmente a modifiche post-traduzionali (Fig. 4.1). Gli estratti proteici di testicoli prelevati agli stessi giorni post-natali sono stati utilizzati per valutare l'espressione di due proteine citoscheletriche: actina e tubulina. Come atteso, le loro bande sono state rivelate in tutti i campioni, come conferma dell'espressione di entrambe durante lo sviluppo del testicolo (Fig. 4.1).

**Fig. 4.1**



**Fig. 4.1. Espressione di DAAM1, Actina e Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto.** L'analisi di Western Blot mostra l'espressione di DAAM1 (110 kDa), Actina (42 kDa), e Tubulina (50kDa) durante lo sviluppo post-natale a 7, 14, 21, 28, 35, 42, e 60 days post-partum (dpp). Le tre proteine sono sempre espresse.

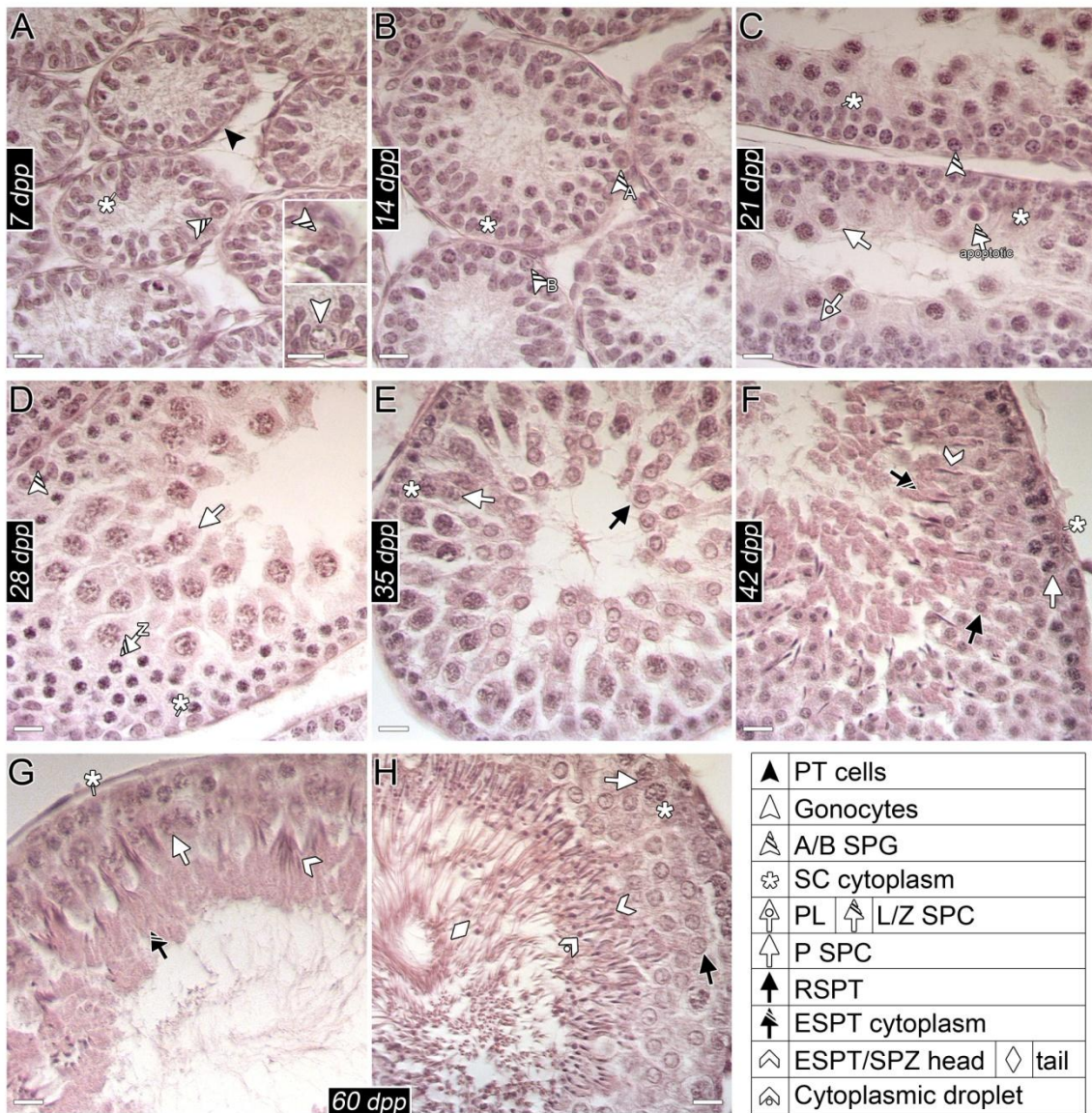
## ***4.2 - Localizzazione di DAAM1 durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto***

In prima analisi, è stato controllato lo stadio di sviluppo e la qualità dei testicoli tramite colorazione ematossilina eosina su sezioni di gonade agli stessi dpp come descritto nel paragrafo precedente (Fig. 4.2).

La localizzazione di DAAM1 è stata studiata attraverso analisi di immunofluorescenza su sezioni di testicolo di ratto durante lo sviluppo (7, 14, 21, 28 dpp, Fig.4.3; 35, 42 e 60 dpp, Fig. 4.4). A 7 dpp (Fig. 4.3 A-C), la proteina localizzata nella regione centrale del tubulo, dove è presente il citoplasma delle cellule di Sertoli (SC), oltre ai gonociti (Fig. 4.3 B, C); a 14 dpp (Fig. 4.3D-F), il segnale risulta ancora localizzato nelle SC, ed è evidente negli spermatogoni A e B (SPG; Fig. 4.3 E-F), fino ai 21-28 dpp (Fig. 4.3 G-L), quando è rilevato nel citoplasma degli spermatociti (SPC; Fig. 4.3 H, I, K, L, meglio evidenziato negli inserti),

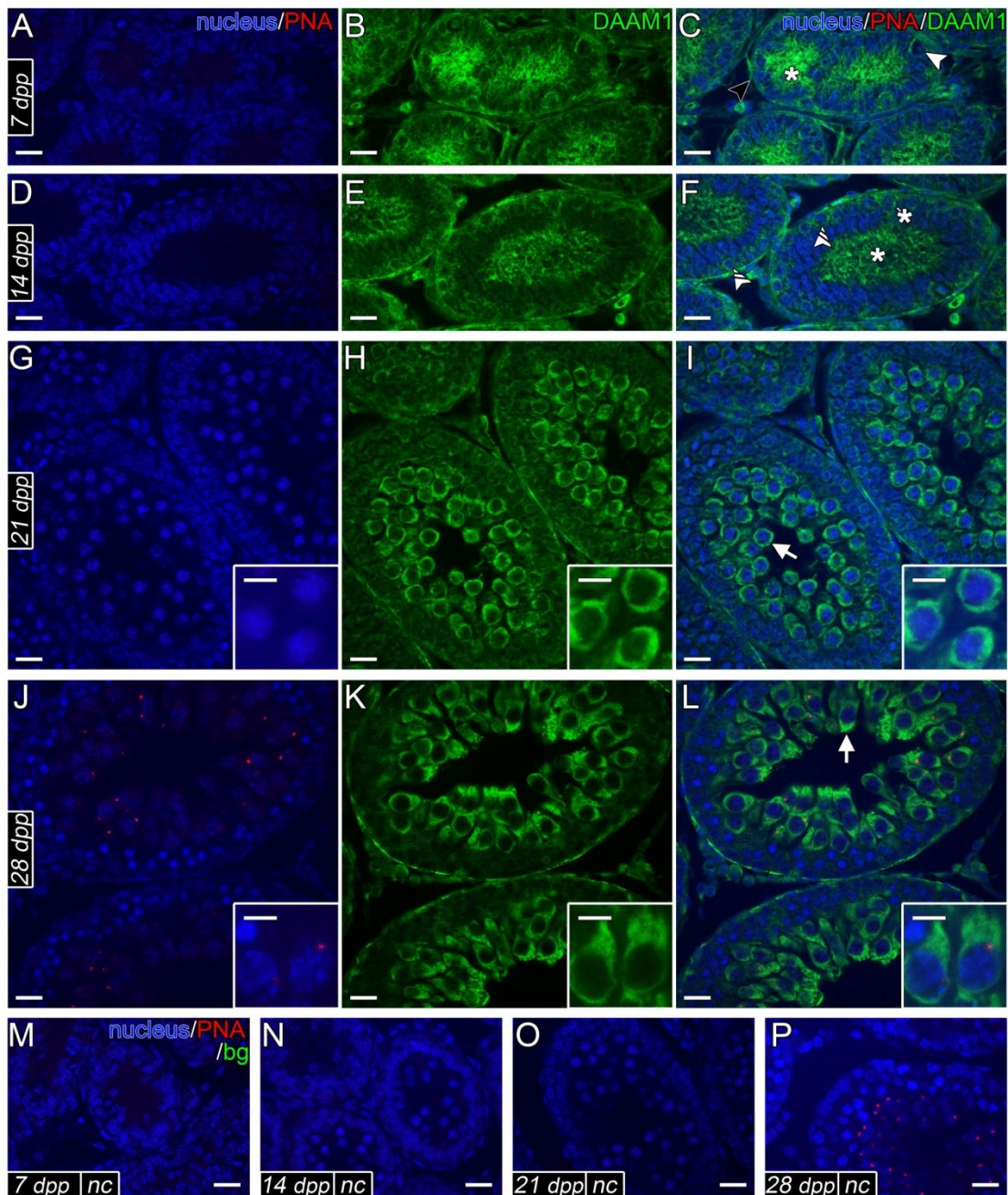
mentre in questa fase non è chiaramente visibile nelle cellule somatiche. Durante la spermiogenesi, come mostrato a 28 dpp, è possibile evidenziare la iniziale formazione dell'acrosoma, grazie alla marcatura con PNA lectina (Fig. 4.3 J-L, P; Fig. 4.4).

**Fig. 4.2**



**Fig. 4.2. Istologia e stadiazione dello sviluppo del testicolo di ratto.** Colorazione ematossilina eosina su sezioni di tessuto a 7 (A), 14 (B), 21 (C), 28 (D), 35 (E), 42 (F), 60 (G e H) dpp, in cui i diversi tipi cellulari sono stati precedentemente descritti (Picut et al., 2015). La legenda dei simboli utilizzati è mostrata nella tabella in basso a destra. PT cells: cellule Peritubulari; SPG: Spermatogoni; SC: cellule di Sertoli; PL SPC: Spermatociti primari in Pre-leptotene; L/Z: Leptotene/Zigotene; P: Pachitene; RSPT: Spermatidi rotondi; ESPT: Spermatidi allungati; SPZ: Spermatozoi. Le barre rappresentano 20  $\mu$ m.

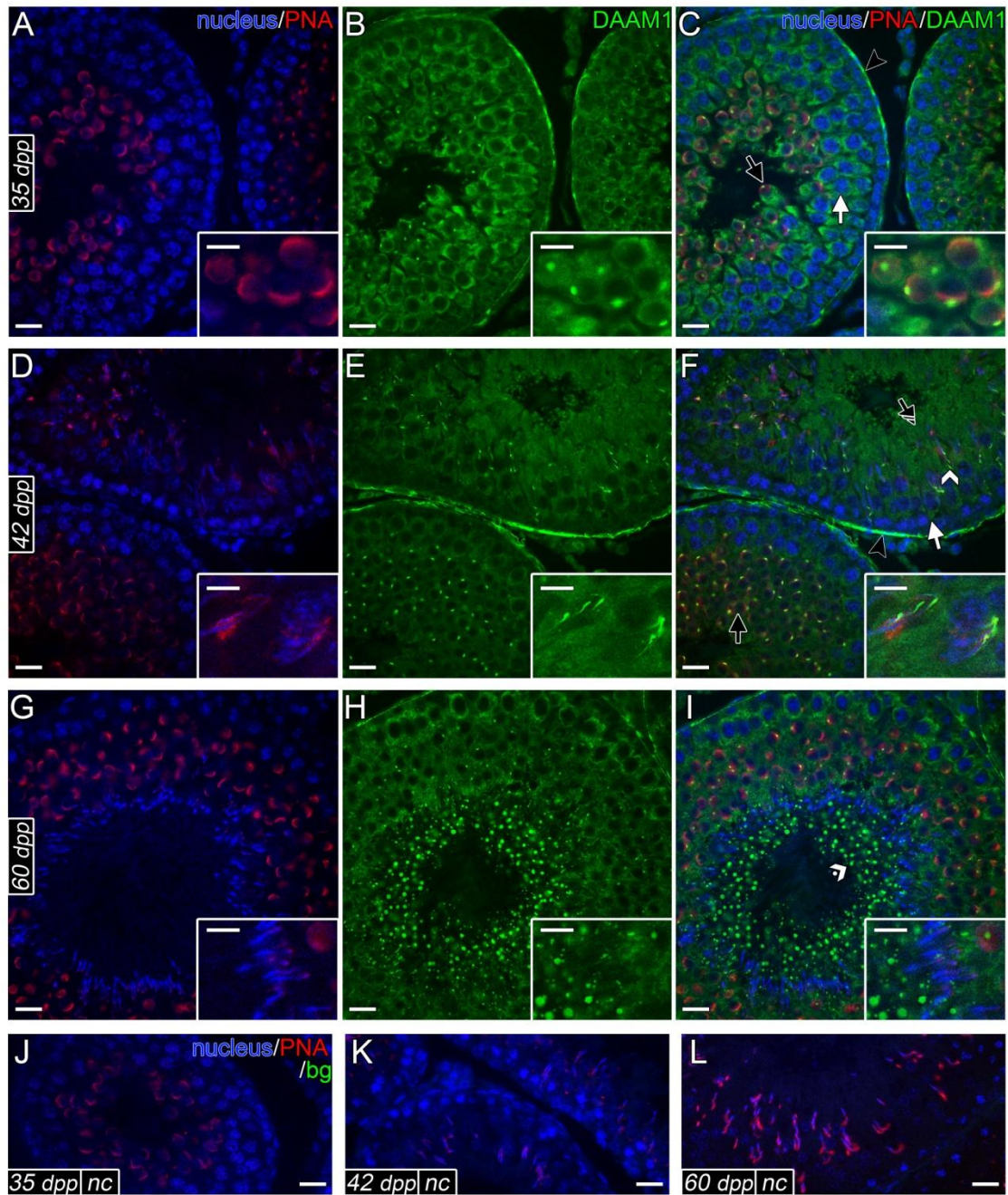
**Fig. 4.3**



**Fig. 4.3. Localizzazione di DAAM1 durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto, parte I (7-28 dpp).** A, D, G, J. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). B, E, H, K. Fluorescenza di DAAM1 (verde). C, F, I, L, M, N, O, P. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, B, C. Testicoli 7 dpp: il segnale di DAAM1 è presente nella regione centrale del tubulo in maturazione. D, E, F. 14 dpp: la forma localizza negli spermatogoni e cellule di Sertoli. G, H, I. 21 dpp; J, K, L. 28 dpp; le cellule positive includono gli spermatociti; le cellule di Sertoli non sono positive; gli inserti mostrano spermatociti primari in diverse fasi. A 28 dpp inizia la formazione dell'acrosoma visibile con il marcatore PNA-lectina. M, N, O, P. Controllo negativo nelle stesse fasi di sviluppo testicolare, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 20  $\mu\text{m}$ , mentre negli inserti 10  $\mu\text{m}$ . PNA: marcatore PNA lectina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo. Per la legenda dei simboli utilizzati, vedere la tabella in Fig. 4.2.

A 35 dpp, nel tubulo è possibile visualizzare gli spermatidi (SPT) rotondi, dove il segnale di DAAM1 è particolarmente rappresentato, con particolare localizzazione nella regione centrale dell'acrosoma (Fig. 4.4 A-C e inserti). In seguito, la proteina mantiene la localizzazione negli SPT allungati a 42 dpp, sempre nella regione acrosomale, ma risulta evidente anche nell'eccesso citoplasmatico (Fig. 4.4 D-F). A 60 dpp (Fig. 4.4 G-I), dopo la fine della prima ondata spermatogenetica, DAAM1 è presente nello spermatozoo maturo (SPZ), dove il segnale è traslocato dalla testa al residuo citoplasmatico del gamete. Un segnale positivo è ritrovato anche nelle cellule peritubulari.

**Fig. 4.4**



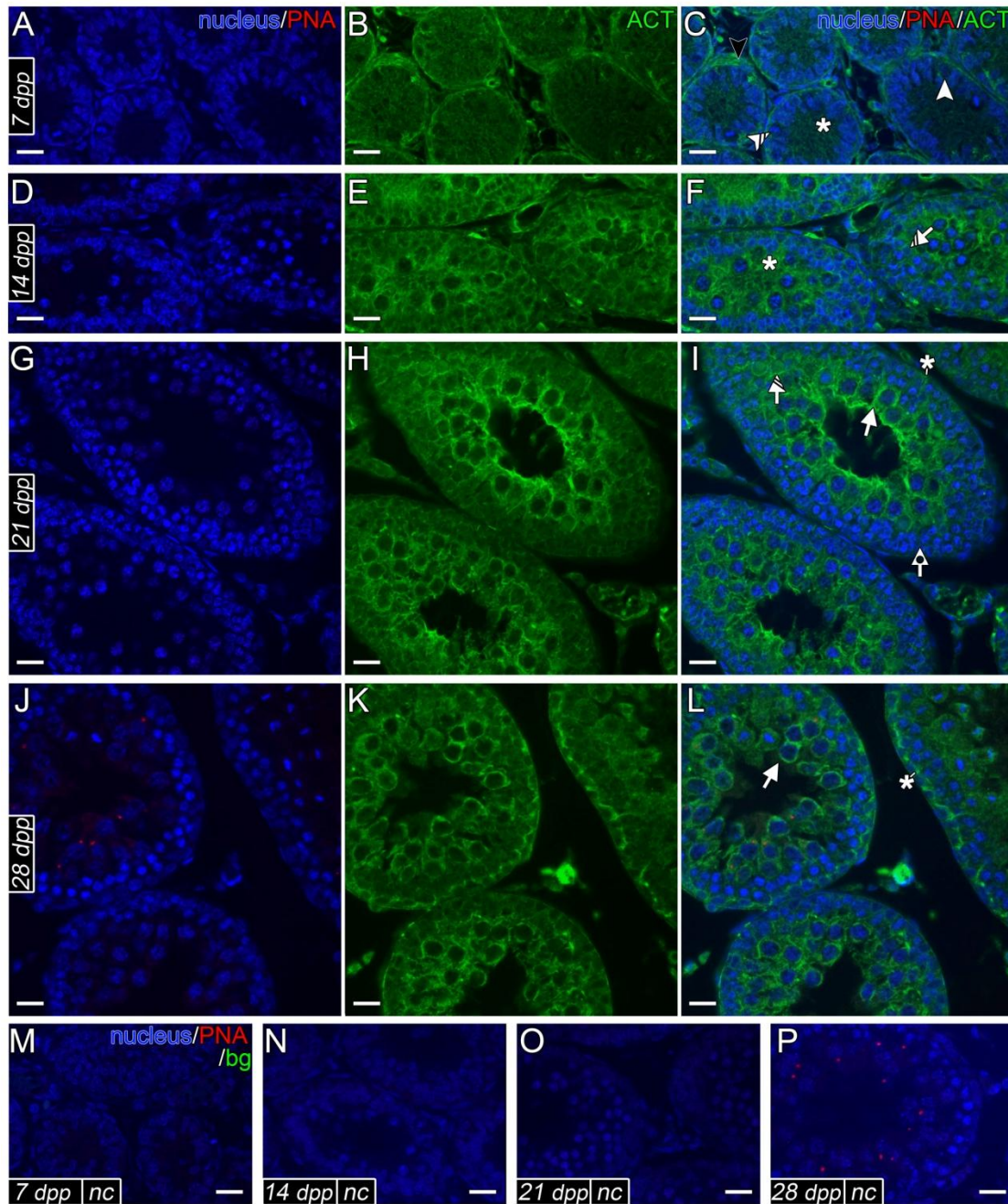
**Fig. 4.4. Localizzazione di DAAM1 durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto, parte II (35-60 dpp).** A, D, G. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). B, E, H. Fluorescenza di DAAM1 (verde). C, F, I, J, K, L. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, B, C. Testicolo 35 dpp; D, E, F 42 dpp: DAAM1 è presente negli spermatociti e spermatidi durante la formazione dell'acrosoma. G, H, I. 60 dpp; tutti i tipi cellulari sono positivi; particolarmente evidente è la goccia citoplasmatica; gli inserti mostrano gli spermatidi rotondi (35 dpp), spermatidi allungati (42 dpp) e gli spermatozoi (60 dpp). J, K, L. Controllo negativo nelle stesse fasi di sviluppo testicolare, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 20  $\mu\text{m}$ , mentre negli inserti 10  $\mu\text{m}$ . PNA: marcatore PNA lectina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo. Per la leggenda dei simboli utilizzati, vedere la tabella in Fig. 4.2.

### ***4.3 - Localizzazione di Actina e Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto***

Dato il coinvolgimento di DAAM1 nel rimodellamento citoscheletrico, il profilo di localizzazione della formina è stato affiancato da un'analisi di distribuzione delle altre proteine citoscheletriche, actina e tubulina, durante lo sviluppo post-natale della gonade di ratto. L'analisi di immunofluorescenza mostra che l'actina presenta inizialmente un pattern comparabile con la localizzazione di DAAM1 (7-14-21 dpp, Fig. 4.3); prima, la proteina è trovata nelle SC, nei gonociti e SPG (Fig. 4.5 B, C, E, F e H, I), dopo negli SPC (Fig. 4.5 E, F, H, I). Successivamente, a 28 dpp, il segnale si estende alle SC (Fig. 4.5, K, L) che sostengono la formazione della barriera emato-testicolare, dove DAAM1 non è stato rilevato (Fig. 4.3). A 35 dpp, (Fig. 4.6), l'actina localizza a livello della barriera completata (Fig. 4.6, B, C), inoltre durante la spermiogenesi è presente negli SPT e nelle cellule epiteliali che rimodellano il proprio citoscheletro, con la funzione di supportare lo sviluppo delle cellule germinali attraverso il tubulo (42 dpp, Fig. 4.6 E, F). Nel testicolo adulto, l'actina è presente in tutti i tipi cellulari, inclusi gli SPZ (Fig. 4.6, H, I). Per quanto riguarda la localizzazione della tubulina (Fig.4.7 e 4.8), essa è espressa in tutti gli stadi e tipi cellulari, ma particolare risulta la localizzazione nelle SC che guidano e sostengono le cellule mitotiche e meiotiche durante le fasi della spermatogenesi (Fig. 4.7), oltre a sostenere gli spermatidi durante il loro differenziamento in SPZ (Fig. 4.8). Inoltre la tubulina risulta evidente anche nelle giunzioni tra le cellule germinali.

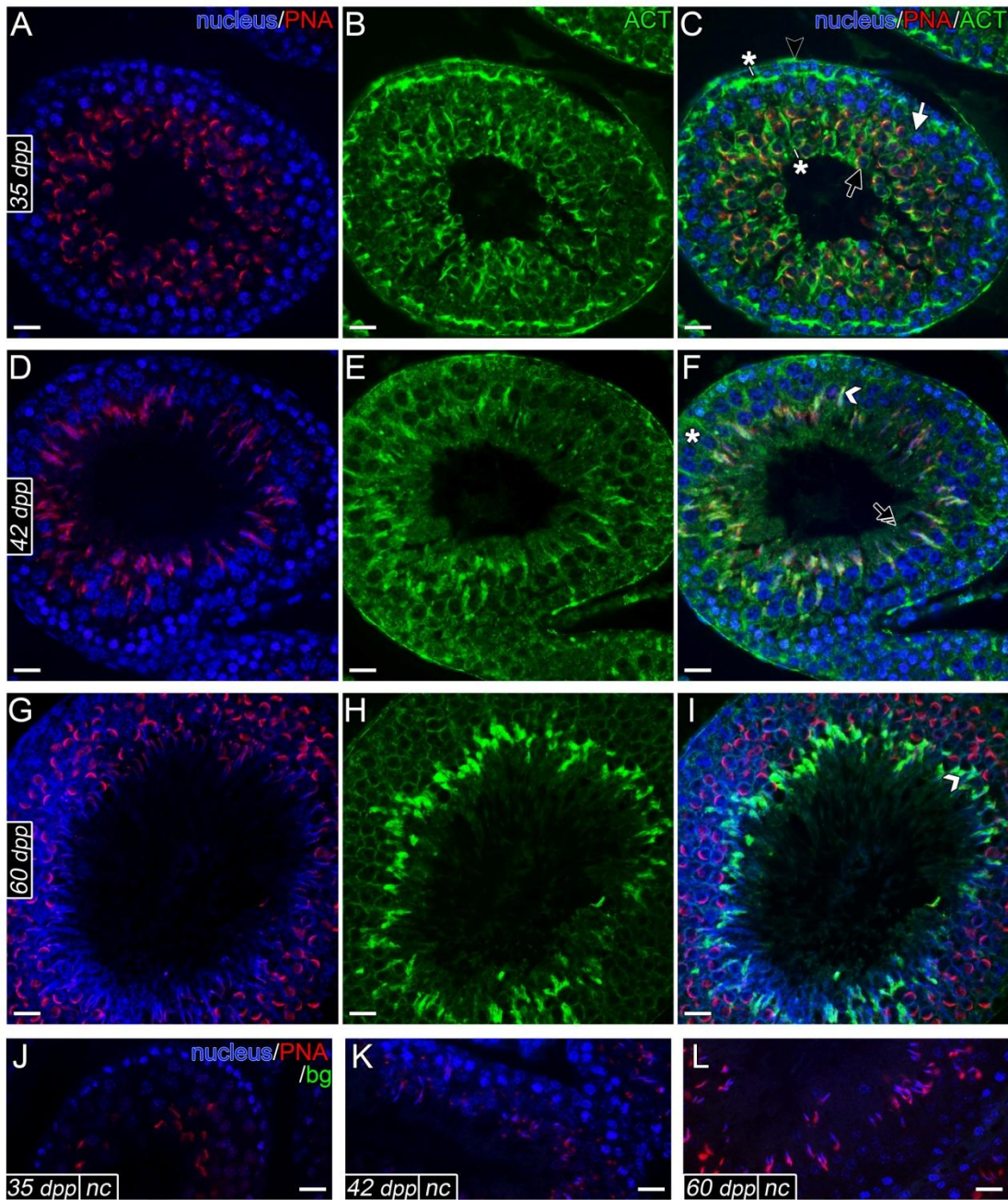


**Fig. 4.5**



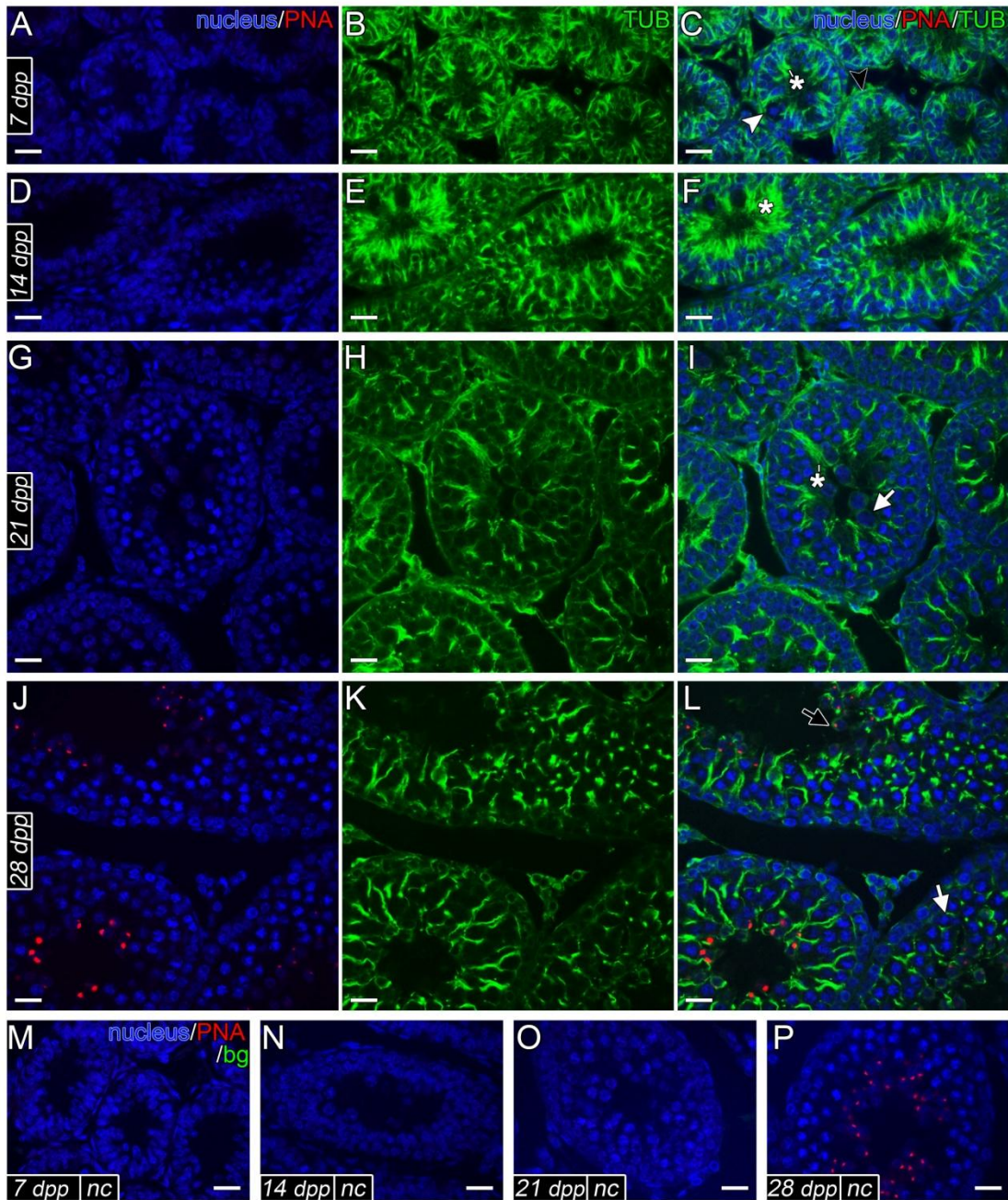
**Fig. 4.5. Localizzazione dell'Actina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto, parte I (7-28 dpp).** A, D, G, J. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). B, E, H, K. Fluorescenza dell'actina (verde). C, F, I, L, M, N, O, P. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, B, C. Testicoli 7 dpp; D, E, F. 14 dpp; G, H, I. 21dpp; J, K, L. 28 dpp; Il segnale dell'actina è simile a quello di DAAM1 durante le prime fasi dello sviluppo testicolare. Le cellule positive includono le cellule di Sertoli, gli spermatogoni e gli spermatociti. A 28 dpp, inizia ad essere visibile la barriera emato-testicolare. M, N, O, P. Controllo negativo nelle stesse fasi di sviluppo testicolare, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 20  $\mu$ m. PNA: marcatore PNA lectina. ACT: actina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo. Per la legenda dei simboli utilizzati, vedere la tabella in Fig. 4.2.

**Fig. 4.6**



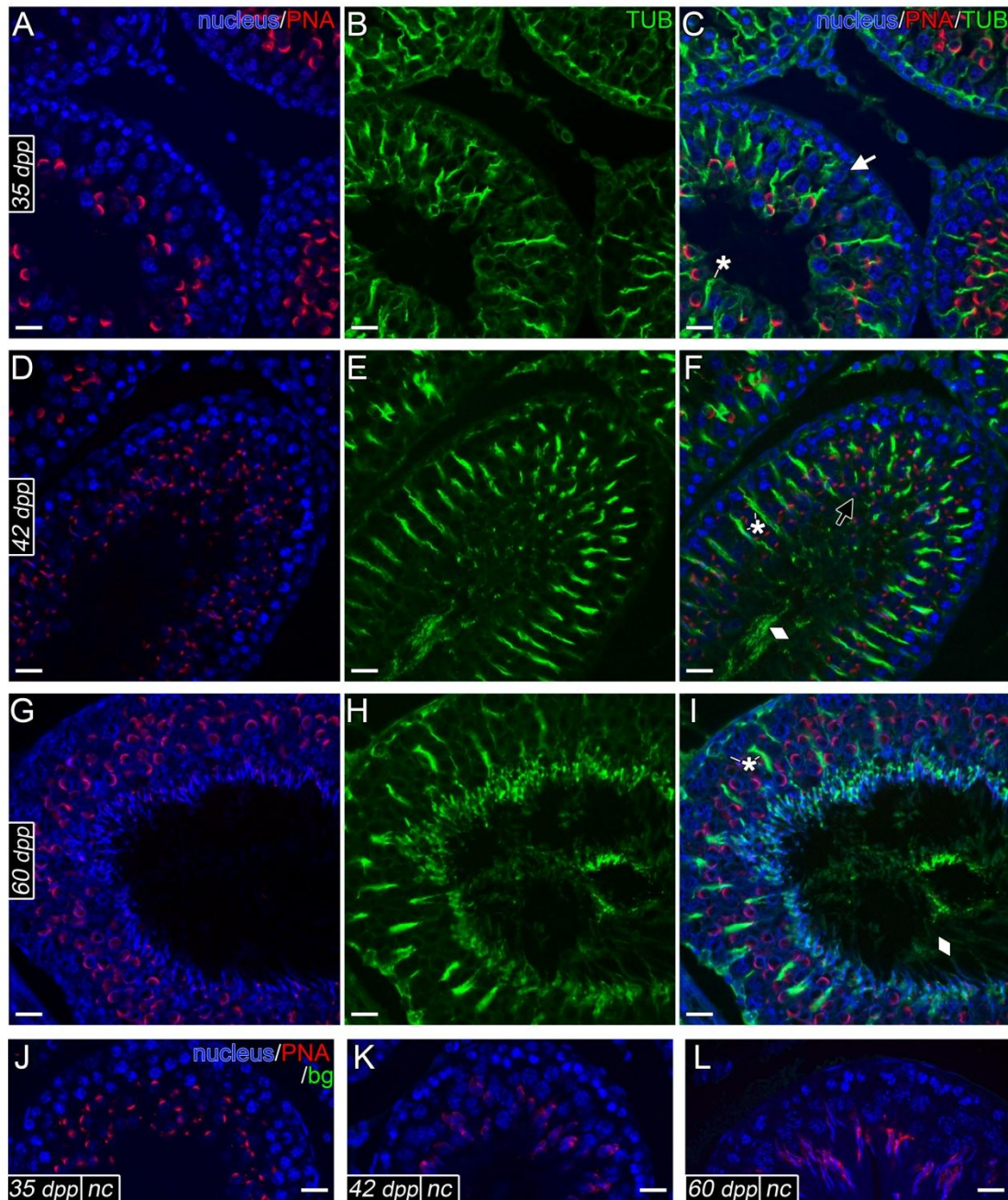
**Fig. 4.6. Localizzazione dell'Actina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto, parte II (35-60 dpp).** A, D, G. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). B, E, H. Fluorescenza dell'actina (verde). C, F, I, J, K, L. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, B, C. Testicolo 35 dpp; D, E, F. 42 dpp: l'actina è adesso visibile negli spermatidi, così come a livello della barriera emato-testicolare e nelle cellule di Sertoli. G, H, I. 60 dpp; negli spermatidi maturi la fluorescenza è maggiormente evidente. J, K, L. Controllo negativo nelle stesse fasi di sviluppo testicolare, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 20  $\mu$ m. PNA: marcatore PNA lectina. ACT: actina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo. Per la legenda dei simboli utilizzati, vedere la tabella in Fig. 4.2.

**Fig. 4.7**



**Fig. 4.7. Localizzazione della Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto, parte I (7-28 dpp).** A, D, G, J. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). B, E, H, K. Fluorescenza della tubulina (verde). C, F, I, L, M, N, O, P. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, B, C. Testicoli 7 dpp; D, E, F. 14 dpp; G, H, I. 21dpp; J, K, L. 28 dpp. Il segnale della tubulina è presente in tutti i campioni, specialmente nel citoplasma delle cellule di Sertoli. M, N, O, P. Controllo negativo nelle stesse fasi di sviluppo testicolare, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 20  $\mu\text{m}$ . PNA: marcatore PNA lectina. TUB: tubulina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo. Per la legenda dei simboli utilizzati, vedere la tabella in Fig. 4.2.

**Fig. 4.8**

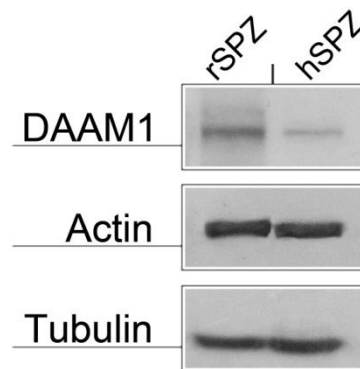


**Fig. 4.8. Localizzazione della Tubulina durante lo sviluppo post-natale del testicolo di ratto, parte II (35-60 dpp).** A, D, G. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). B, E, H. Fluorescenza della tubulina (verde). C, F, I, J, K, L. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, B, C. Testicolo 35 dpp; D, E, F 42 dpp; G, H, I. 60 dpp. Il segnale è presente nella protrusioni delle cellule di Sertoli dalla regione basale a quella luminale del tubulo, e a livello delle giunzioni cellula-cellula. Nei testicoli maturi, la positività è osservata anche negli spermatozoi. J, K, L. Controllo negativo nelle stesse fasi di sviluppo testicolare, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 20  $\mu$ m. PNA: marcatore PNA lectina. TUB: tubulina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo. Per la legenda dei simboli utilizzati, vedere la tabella in Fig. 4.2.

#### ***4.4 - Espressione di DAAM1, Actina e Tubulina negli spermatozoi di ratto e di uomo***

L'espressione di DAAM1, Actina e Tubulina negli spermatozoi di ratto e uomo è stata eseguita tramite analisi di Western Blot su estratti proteici di spermatozoi epididimali ed eiaculati (Fig. 4.9). I dati confermano la presenza delle tre proteine nei gameti di entrambe le specie.

**Fig. 4.9**

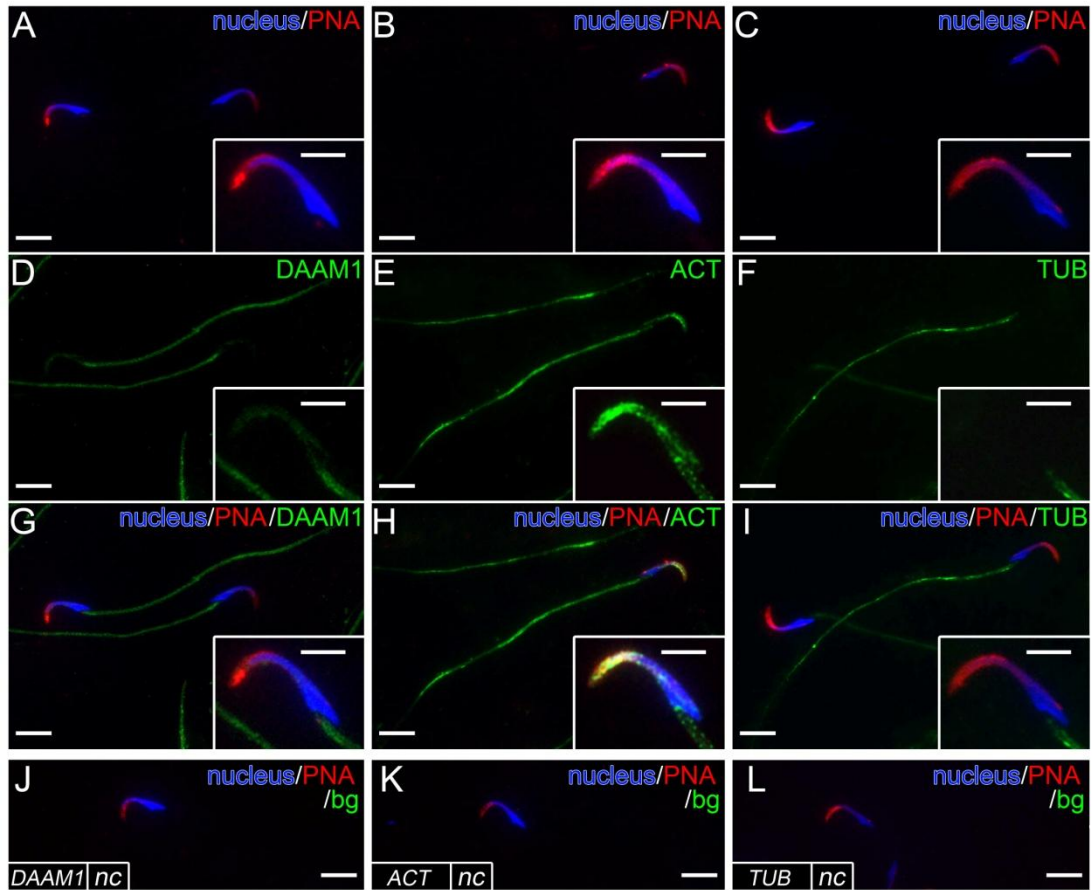


**Fig. 4.9. Espressione di DAAM1, Actina e Tubulina in spermatozoi di ratto e uomo.** Analisi di Western Blot su estratti proteici di spermatozoi di ratto (lane 1) e uomo (lane 2). DAAM1 (110 kDa), Actina (42 kDa) e Tubulina (50 kDa) sono presenti in tutti i campioni.

#### ***4.5 - Localizzazione di DAAM1, Actina e Tubulina in spermatozoi di ratto e uomo***

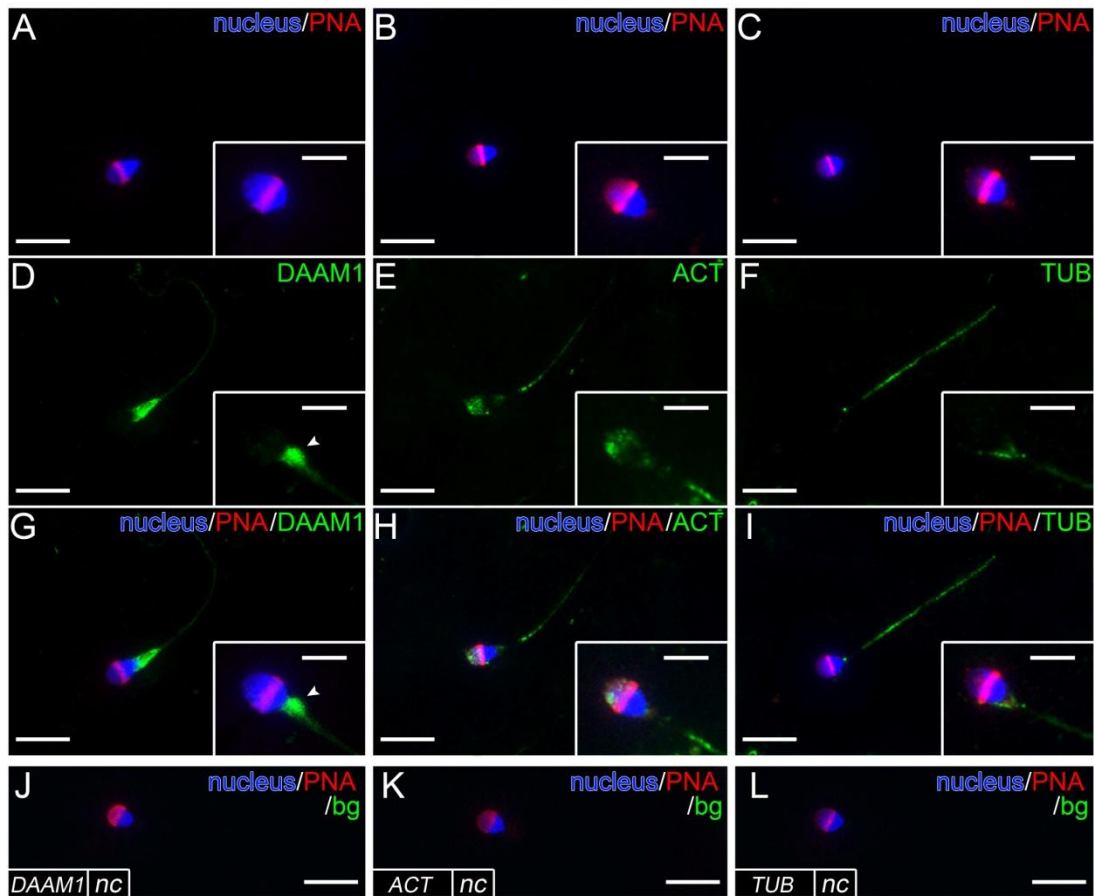
Allo scopo di approfondire il profilo di localizzazione di DAAM1 nei gameti maschili, è stata eseguita un'analisi di immunofluorescenza su spermatozoi epididimali di ratto, che ha evidenziato la presenza della proteina nel flagello (Fig. 4.10, D, G). Poiché nel ratto le modifiche epididimali non permettono di evidenziare con frequenza la goccia citoplasmatica, l'analisi della localizzazione di DAAM1 è stata estesa nello SPZ maturo di uomo (Fig. 4.11), dove la goccia citoplasmatica (CD) può essere trovata fisiologicamente (WHO 2010; Mortimer & Menkveld, 2001). Il segnale nei gameti umani ha effettivamente confermato la ritenzione di DAAM1 a livello di tale struttura citoplasmatica (Fig. 4.11, D, G). In seguito, è stata condotta un'analisi comparativa della localizzazione dell'actina e della tubulina negli stessi campioni: in entrambe le specie l'actina è presente nella testa dello SPZ (Fig. 4.10 e 4.11, E, H), associata alla regione acrosomale, così come nel flagello, mentre la tubulina è distribuita nella coda (Fig. 4.10 e 4.11, F, I).

**Fig. 4.10**



**Fig. 4.10. Sub-localizzazione di DAAM1, Actina e Tubulina in spermatozoi di ratto.** A, B, C. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). D, E, F. Fluorescenza di DAAM1, Actina e Tubulina, rispettivamente (verde). G, H, I. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, D, G. DAAM1 non è evidente nella testa degli spermatozoi, mentre risulta presente nel flagello. B, E, H. L'actina è presente nella testa, a livello acrosomale, e nella coda. C, F, I. La tubulina localizza nella coda. Gli spermatozoi nei rispettivi inserti evidenziano le specifiche localizzazioni. J, K, L. Controllo negativo per DAAM1, Actina o Tubulina, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 10  $\mu\text{m}$ , mentre negli inserti 5  $\mu\text{m}$ . PNA: marcatore PNA lectina. ACT: Actina. TUB: Tubulina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo.

**Fig. 4.11**



**Fig. 4.11. Sub-localizzazione di DAAM1, Actina e Tubulina in spermatozoi di uomo.** A, B, C. Marcatura nucleare con DAPI (blu) e marcatura con PNA lectina (rosso). D, E, F. Fluorescenza di DAAM1, Actina e Tubulina, rispettivamente (verde). G, H, I. Sovrapposizione dei canali in fluorescenza (blu/rosso/verde). A, D, G. Il segnale di DAAM1 negli spermatozoi umani è simile a quello ritrovato nei gameti di ratto, ma risulta evidente la fluorescenza ritenuta nella goccia citoplasmatica (inserto in D, indicato con la freccia) mentre una lieve fluorescenza è ritrovata nella coda. B, E, H. Come atteso, l'actina è localizzata in entrambe le specie nella testa, a livello della regione acrosomale, e nella coda. C, F, I. La tubulina come in ratto, marca la regione della coda; in alcuni spermatozoi è presente un segnale anche nel collo. Gli spermatozoi nei rispettivi inserti evidenziano le specifiche localizzazioni. J, K, L. Controllo negativo per DAAM1, Actina o Tubulina, omettendo l'anticorpo primario. Le barre rappresentano 10  $\mu\text{m}$ , mentre negli inserti 5  $\mu\text{m}$ . PNA: marcatore PNA lectina. ACT: Actina. TUB: Tubulina. bg: Background/autofluorescenza. nc: Controllo negativo.



## 5. Discussione e Conclusioni

Nei Mammiferi, lo sviluppo post-natale della gonade maschile è un processo nel quale i tubuli seminiferi cambiano progressivamente il loro diametro, l'organizzazione strutturale e la composizione, mentre è in atto la prima ondata spermatogenetica. Durante questa fase, le cellule germinali (CG) migrano verso la base del tubulo e iniziano la loro proliferazione e differenziamento, che porterà alla produzione degli spermatozoi nella regione luminale, tramite il supporto delle cellule di Sertoli (SC). Inoltre, si verifica un significativo rimodellamento del citoscheletro delle stesse cellule che permette la formazione di complesse strutture che separano e proteggono le CG dal compartimento interstiziale.

L'actina, mediante la regolazione della propria polimerizzazione, rappresenta uno dei fattori chiave coinvolti in questo processo. Tra i diversi ruoli svolti, questa proteina è implicata nelle SC per la formazione delle protrusioni citoplasmatiche (Lie et al., 2010), che permettono il differenziamento delle CG verso il lume del tubulo. Fasci di actina sono ritrovati nella barriera emato-testicolare (BTB; Vogl et al. 2008), nelle giunzioni serrate della regione basale per separare il compartimento mitotico da quello meiotico (Cheng and Mruk, 2012; Franca et al., 2012; Li et al., 2012; Pelletier, 2011; Wong et al., 2008), così come a livello delle specializzazioni ectoplasmiche (ES), ovvero particolari connessioni tra SC e CG (Su et al., 2013).

Fino ad oggi, è noto che la regolazione dell'actina in parte è svolta da proteine Wnt, molecole coinvolte nello sviluppo testicolare, che attraverso il loro pathway canonico o non-canonico permettono un controllo della proliferazione e dei riarrangiamenti citoschelatrici che avvengono della gonade in sviluppo (Nicol and Guiguen, 2011; Kerr et al., 2014; Li et al.,

2005; Ma et al., 2006; Gong et al., 2013). Mediante l'interazione con recettori di membrana, (Marinou et al., 2012), Wnt recluta Dishevelled (Dvl; anche implicato nella spermatogenesi, Ma et al. 2006; Gong et al. 2013), che rappresenta il punto di snodo tra le diverse cascate. Il pathway canonico, per esempio, termina con il reclutamento della  $\beta$ -catenina che non può quindi essere degradata dalla cellula. Questa molecola attiva la trascrizione genica, regola la proliferazione e il suo controllo positivo/negativo risulta essere un importante fattore per lo sviluppo testicolare (Jeays-Ward et al., 2004; Chassot et al., 2012). Nel pathway PCP non-canonico, invece, Dvl interagisce con il dominio autoinibitorio (DAD) di DAAM1: il cambiamento conformazionale rende accessibile il dominio centrale di DAAM1 al fattore di scambio guanilico (WGEF), il quale attiva una Rho GTPasi (Habas et al., 2001; Tanegashima and Dawid, 2008). La successiva attivazione della chinasi ROCK (Marlow et al., 2002), induce una polimerizzazione dell'actina nel dominio dimerizzato FH2 di DAAM1 (Kühn and Geyer, 2014) con conseguente riorganizzazione del citoscheletro.

Dato il coinvolgimento di Wnt e Dvl nello sviluppo testicolare, e poiché DAAM1 risulta essere un regolatore della nucleazione dell'actina, lo scopo del presente studio è stato investigare la possibile associazione di DAAM1 con i cambiamenti morfogenetici che avvengono durante lo sviluppo post-natale della gonade di ratto. Sono stati scelti diversi stadi (da 7 a 60 giorni post-partum (dpp)), che rappresentano la prima ondata spermatogenetica, ed è stato eseguito un profilo della distribuzione dell'actina e della tubulina, dato il loro importante ruolo svolto in questo processo.

I primi dati dell'analisi di Western Blot hanno evidenziato l'espressione di DAAM1 nel testicolo adulto e durante lo sviluppo. La successiva localizzazione ha mostrato la presenza della proteina nei gonociti e nelle SC durante le prime fasi dello sviluppo (come mostrato a 7 e 14 dpp, Fig. 2 A-F). Tale dato risulta peculiare, perché nelle fasi successive non è stato possibile visualizzare il segnale somatico, quando le giunzioni specializzate

iniziano a formarsi prima nella regione basale e poi in quella apicale del tubulo. Nelle prime fasi di sviluppo testicolare, durante la migrazione dei gonociti, è possibile notare una corrispondenza tra il profilo di DAAM1 e la distribuzione dell'actina. È noto che il coinvolgimento di Wnt nel pathway PCP non-canonico (attraverso Wnt5a/Ror2) è essenziale per la migrazione delle cellule germinali e lo sviluppo del sesso maschile nei Mammiferi (Chawengsaksophak et al., 2012). Questa informazione, in accordo con i risultati ottenuti, potrebbe suggerire una possibile attività di DAAM1, come molecola che partecipa a tale pathway. Per quanto riguarda la tubulina, durante le prime fasi è localizzata nei gonociti e nel citoplasma delle SC, in accordo con il complesso rimodellamento in corso. A 21 e 28 dpp, sia DAAM1 che l'actina localizzano nelle cellule meiotiche, mentre solo l'actina è presente nella BTB, che separa gli spermatociti (SPC) in pre-leptotene dagli stadi successivi. L'assenza di DAAM1 non è inaspettata, e potrebbe essere coerente con il differente meccanismo di polimerizzazione dell'actina nelle ES, che è regolato da fattori come Eb1, Eps8, Formina 1, Wasp e Arp2/3 (Tang et al., 2015; Lie et al., 2009; Li et al., 2015; Rotkopf et al., 2011). La tubulina in queste fasi continua a mantenere una localizzazione nelle cellule somatiche, dove marca completamente le protrusioni citoplasmatiche.

Durante la spermiogenesi, DAAM1 localizza nella vescicola derivante dal Golgi, che formerà l'acrosoma nelle cellule aploidi, mostrando un caratteristico segnale puntiforme negli Spermatidi (SPT) rotondi, che si appiattisce negli step successivi negli spermatidi allungati. Questa peculiare distribuzione appare simile a quanto mostrato da una GTPasi, MgcRacGAP, e da Rnd2, una proteina G appartenente alla famiglia di Rho mancante della funzione GTPasica, per le quali è stato ipotizzato un ruolo nel traffico vescicolare e nella formazione dell'acrosoma (Naud et al., 2003). Infatti, MgcRacGAP è stata associata alla tubulina e alla formazione di un complesso di proteine che presentano un'attività di legame ai microtubuli (Naud et al., 2003). I risultati della localizzazione della formina durante la spermiogenesi

suggeriscono che potrebbe esistere una interazione tra DAAM1 e MgcRacGAP o Rnd2, anche considerando che questa GAP è un regolatore di Rho e Rac (Naud et al., 2003). Tuttavia, l'espressione di queste GTPasi non sembra rilevante negli SPC e negli SPT, quindi ogni ipotesi richiederebbe ulteriori approfondimenti.

Durante la stessa fase, l'actina risulta ancora evidente nella BTB, ed estende la sua localizzazione nella regione apicale delle SC. Questa distribuzione è diversa rispetto a quella della formina, ma è in accordo con la presenza dell'actina nel complesso tubulolobulare e nelle ES (Russell, 1979; Guttman et al., 2004a; Guttman et al., 2004b; Young et al., 2009a; Young et al., 2009b), che sono regolate dagli stessi meccanismi descritti per le specializzazioni basali. Coerentemente, la tubulina mantiene la localizzazione nelle SC, denotando il suo ruolo di “binario” per la ri-localizzazione del contenuto cellulare, così come il suo ruolo nelle interazioni con i filamenti di actina a livello dell'interfaccia SC/SPT (Lie et al., 2010). Entrambe le proteine citoscheletriche mantengono la loro localizzazione negli step successivi, fino alla completa maturazione della gonade, dove il segnale si manifesta negli SPT allungati e negli spermatozoi (SPZ), specificamente nelle giunzioni ectoplasmiche.

Nel testicolo adulto DAAM1 mostra lo stesso pattern di localizzazione citoplasmatica nelle cellule germinali, come descritto precedentemente. Tuttavia, è interessante notare che negli SPZ maturi la formina non è ritrovata nella regione acrosomale, ma ri-localizza nel residuo citoplasmatico che è rilasciato durante i momenti finali dello sviluppo, prima della spermiazione, quando le SC effettuano la fagocitosi di tale residuo (Huszar and Vigue, 1990; Huszar et al., 1998). Come conferma del dato ottenuto, non è stato possibile osservare alcun segnale positivo nell'acrosoma di SPZ epididimali di ratto; tuttavia, una ritenzione del segnale è stata trovata nella regione della coda. Come atteso, l'actina, invece, è ancora presente nella testa dello SPZ, nella regione peri-acrosomale (Dvoráková et al., 2005) e nel flagello, mentre la tubulina è distribuita specialmente nella coda.

Il segnale di DAAM1 nella goccia citoplasmatica (CD) degli SPZ durante la spermiiazione è evidente, ma difficile da confermare nei gameti isolati di ratto (Hermo et al., 1988). Nei tubuli seminiferi e nel passaggio attraverso l'epididimo, gli SPZ rilasciano l'eccesso citoplasmatico, incluso la goccia citoplasmatica, durante le modifiche che porteranno alla loro completa maturazione (Cooper, 2011). Poiché la CD è una struttura spesso ritrovata negli SPZ umani eiaculati, sono stati utilizzati SPZ di donatori allo scopo di comparare la finale localizzazione di DAAM1 osservata in ratto. Come anticipato, la forma localizza proprio nella CD ritenuta. Nel presente lavoro non sono stati ottenuti dati aggiuntivi che supportano un ruolo di DAAM1 dopo la spermatogenesi; anzi, la sua presenza nella CD potrebbe essere dovuta all'incompleta eliminazione dell'eccesso citoplasmatico, mentre DAAM1 ha già svolto il suo principale ruolo morfogenetico. È anche vero che la CD è stata studiata come un parametro di qualità spermatica, positivamente correlato con una migliore motilità e resistenza agli ambienti vaginali (Yeung et al., 2006), come nella fertilità (Cooper et al., 2004; Fetic et al., 2006; Chantler and Abraham-Peskir., 2004; Lishko et al., 2010; Abraham-Peskir et al., 2002; Mortimer et al., 1982), in presenza di specifici requisiti morfologici (Rengan et al., 2012; World Health Organization: Standard procedures, 2010). Pertanto, il segnale di DAAM1 potrebbe essere un utile marker della goccia citoplasmatica dello SPZ in ricerche future incentrate sullo studio della regolazione del volume citoplasmatico nel gamete maturo. Entrambe actina e tubulina mantengono la stessa localizzazione negli SPZ di uomo, come osservato in ratto.

In conclusione, questo lavoro mostra, per la prima volta, l'espressione e la localizzazione di DAAM1 durante la spermatogenesi e nei gameti di ratto, nonché negli spermatozoi di uomo. Tuttavia, studi futuri sono richiesti per meglio comprendere le possibili implicazioni dei diversi pattern. I dati mostrati forniscono un profilo della distribuzione di DAAM1 rispetto ai fattori di regolazione strutturale del compartimento germinale, e

suggerisce un possibile coinvolgimento di questa forma nel rimodellamento morfofunzionale e nella organizzazione della gonade e dei gameti maschili.

## 6. Bibliografia

### *Introduzione:*

Barrow PC, Barbellion S, Stadler J. 2011. Preclinical evaluation of juvenile toxicity. *Methods Mol Biol* 691:17-35

Callard GV. 1996. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.), *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, IL, USA, pp. 308–331

Davidoff MS, Schulze 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(3):429-39

De Rooij DG, Russell LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21: 776–798

Grier HJ. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21:345–357

Jamieson BGM. 1991. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge

Korenbrodt CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI. 1977. Prepubertal separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod* 17(2):298-303

Ojeda SR, Advis JP, Andrews WW. 1980. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Fed Proc* 39(7):2365-71

Ojeda SR and Skinner MK. 2006. Puberty in the rat. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Vol. 2, 3rd ed., pp. 2061–126. Academic Press, San Diego, CA

Parenti LR, Grier HJ. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44:333-48

Picut CA, Remick AK, de Rijk EP, Simons ML, Stump DG, Parker GA. 2015. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol.* 43(3):326-42

Russell D, Griswold MD. 1993. The Sertoli cell. *Mol Reprod Dev* Vol. 36, Issue 4, page 517

Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, Le Gac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Comp. Endocrinol.* 165:390-411

Schulz RW, Menting S, Bogerd J, Franca LR, Vilela DAR, Godinho HP. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891–898

### *Parte I (Ptma):*

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
- 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
- Bianco NR, Montano MM. 2002. Regulation of prothymosin alpha by estrogen receptor alpha: molecular mechanisms and relevance in estrogen-mediated breast cell growth. *Oncogene* 21:5233-44. Erratum in *Oncogene* 2002. 21:8221
- Billard R. 1990. Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming, G.E. (Ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction. Reproduction in Males*, vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 183-212
- 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. *Cytogenet Cell Genet* 93:171-4
- Cannavo A, Rengo G, Liccardo D, Pironti G, Scimia MC, Scudiero L, De Lucia C, Ferrone M, Leosco D, Zambrano N, Koch WJ, Trimarco B, Esposito G. 2013. Prothymosin alpha protects cardiomyocytes against ischemia-induced apoptosis via preservation of Akt activation. *Apoptosis* 18(10):1252-61
- Carrell DT. 2011. Epigenetic marks in zebrafish sperm: insights into chromatin compaction, maintenance of pluripotency, and the role of the paternal genome after fertilization. *Asian J. Androl.* 13:620-1
- 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
- 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
- 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. 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
- Earnshaw WC. 1987. Anionic regions in nuclear proteins. *J Cell Biol.* 105:1479-82
- Enkemann SA, Ward 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. *J. Histochem. Cytochem.* 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
- Evstafeva 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. *Mol Biol (Mosk).* 39:729-45
- Ferrara D, Palmiero C, Branno M, Pierantoni R, Minucci S. 2004. Testicular activity of Mos in the frog, *Rana esculenta*: A new role in spermatogonial proliferation. *Biol. Reprod.* 70:1782-1789



- 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
- Ferrara D, Pariante P, Di Matteo L, Serino I, Oko R, Minucci S. 2013. First evidence of prothymosin  $\alpha$  localization in the acrosome of mammalian male gametes. *J. Cell. Physiol.* 228:1629-37
- 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
- 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
- George EM, Brown DT. 2010. Prothymosin alpha is a component of a linker histone chaperone. *FEBS Lett.* 584:2833-6
- 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 lymphocytopoietic 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. 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
- Grier, HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In L. D. Russell, and M. D. Griswold (eds.), *The Sertoli cell*, pp. 704–730. Cache River Press, Clearwater, Florida.
- 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
- Hirai A. 1988. Fine structure of the micropyles of pelagic eggs of some marine fishes. *Jap. J. Ichthyol.* 35, 351–357.
- 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
- Huszno J, Klag J. 2012. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). *Stereological analysis.* *Micron* 43:666-72
- Jamieson, BGM. 1991. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X. 2003. Distinctive role of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 299:233-6
- 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
- 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
- Leal MC, Cardoso ER, Nóbrega RH, Batlouni SR, Bogerd J, França LR, Schulz RW. 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol. Reprod.* 81:177-87
- 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
- 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
- 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
- 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. 2011. Intracellular and extracellular cytokine-like functions of prothymosin  $\alpha$ : implications for the development of immunotherapies. *Future Med. Chem.* 3:1199-208
- 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
- Parenti LR, Grier HJ. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44:333-48
- Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M. 2000. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides* 21:1433-46
- 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
- Pudney J. 1996. Comparative cytology of the Leydig cell. In: Payne, A.M., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.), *The Leydig Cell*. Vienna, Cache River, pp. 611–657
- 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

- Rubtsov IuP, Vartapetian AB. 1995. New intronless members of human prothymosin alpha genes. *Mol Biol (Mosk)*. 29:1320-5
- Rupik W, Huszno J, Klag J. 2011. Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae; Teleostei)--structural and ultrastructural studies. *Micron* 42:833-9
- Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94:441-448
- 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
- Schulof RS, Goldstein AL. 1981. In: Hadden JW, Stewart WR editors. *The Lymphokines, Biochemistry and Biological Activity*. Clinton, NJ: Humana Press. pp 397-423
- Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, Le Gac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Comp. Endocrinol.* 165:390-411
- Skopeliti M, Voutsas IF, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Bamias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Voelter W, Tsitsilonis OE. 2006. 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
- Sprenger H, Konrad L, Rischowsky E, Gemsa D. 1995. RNA extraction from gastrointestinal tract and pancreas by a modified Chomczynski and Sacchi method. *Biotechniques* 19:340-343
- 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
- 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
- Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W. 1993. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9504-7
- 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
- Ueda H, Matsunaga H, Halder SK. 2012. Prothymosin  $\alpha$  plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012 1269:34-43
- Voutsas IF, Baxeavanis 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 M, Pan JY. 2007. Prothymosin alpha and tumor: current status and perspective. *Chin. J. Cancer* 26:333-336
- 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
- Wu SF, Zhang H, Cairns BR. 2011. Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm. *Genome Res.* 21:578-89

Zhang M, Cui F, Lu S, Lu H, Jiang T, Chen J, Zhang X, Jin Y, Peng Z, Tang H. 2014. Increased expression of prothymosin- $\alpha$ , independently or combined with TP53, correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7:4867-76

## *Parte II (PREP):*

Ahmed MM, Arif M, Chikuma T, Kato T. 2005. Pentylentetrazol-induced seizures affect the levels of prolyl oligopeptidase, thimet oligopeptidase and glial proteins in rat brain regions, and attenuation by MK-801 pretreatment. *Neurochem Int* 47:248-59

Alvarez-Sieiro P, Martin MC, Redruello B, Del Rio B, Ladero V, Palanski BA, Khosla C, Fernandez M, Alvarez MA. 2014. Generation of food-grade recombinant *Lactobacillus casei* delivering *Myxococcus xanthus* prolyl endopeptidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(15):6689-700

Aoyagi T, Wada T, Nagai M, Kojima F, Harada S, Takeuchi T, Takahashi H, Hirokawa K and Tsumita T. 1990. Deficiency of kallikrein-like enzyme activities in cerebral tissue of patients with Alzheimer's disease. *Experientia* 46(1):94-7

Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P and Sollid LM. 2002. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123(3):803-9

Bär JW, Rahfeld JU, Schulz I, Gans K, Ruiz-Carrillo D, Manhart S, Rosche F, Demuth HU. 2006. Prolyl endopeptidase cleaves the apoptosis rescue peptide humanin and exhibits an unknown post-cysteine cleavage specificity. *Adv Exp Med Biol* 575:103-8

Benowitz LII, Routtenberg A. 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20(2):84-91

Breen G, Harwood AJ, Gregory K, Sinclair M, Collier D, St Clair D and Williams RS. 2004. Two peptidase activities decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients. *Bipolar Disord* 6(2):156-61

Camargo AC, Caldo H, Reis ML. 1979. Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. *J Biol Chem* 254(12):5304-7

Comino I, Moreno Mde L, Real A, Rodríguez-Herrera A, Barro F, Sousa C. 2013. The gluten-free diet: testing alternative cereals tolerated by celiac patients. *Nutrients* 5:4250-68

Cunningham DF, O'Connor B. 1997. Identification and initial characterisation of a N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal (Z-Pro-prolinal)-insensitive 7-(N-benzyloxycarbonyl-glycyl-prolyl-amido)-4-methylcoumarin (Z-Gly-Pro-NH-Mec)-hydrolysing peptidase in bovine serum. *Eur J Biochem* 244(3):900-3

D'Agostino G, Kim JD, Liu ZW, Jeong JK, Suyama S, Calignano A, Gao XB, Schwartz M, Diano S. 2013. Prolyl endopeptidase-deficient mice have reduced synaptic spine density in the CA1 region of the hippocampus, impaired LTP, and spatial learning and memory. *Cereb Cortex* 23:2007-14

Garcia-Horsman JA, Venalainen JI, Lohi O, Auriola IS, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Maki M and Mannisto PT. 2007. Deficient activity of mammalian prolyl oligopeptidase on the immunoactive peptide digestion in coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol* 42(5):562-71

Gass J, Ehren J, Strohmeier G, Isaacs I and Khosla C. 2005. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy. *Biotechnol Bioeng* 92(6):674-84

Hannula MJ, Myöhänen TT, Tenorio-Laranga J, Männistö PT, Garcia-Horsman JA. 2013. Prolyl oligopeptidase colocalizes with  $\alpha$ -synuclein,  $\beta$ -amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience* 242:140-50

- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202:663-71
- Ho HC, Suarez SS. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68:1590-6.
- Irazusta J, Larrinaga G, González-Maeso J, Gil J, Meana JJ, Casis L. 2002. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem Int* 40:337-45
- Kimura A, Ohnishi J, Okimura H, Hamabata T, Takahashi T. 1998. Localization of prolyl endopeptidase mRNA in small growing follicles of porcine ovary. *Mol Reprod Dev* 50:121-7.
- Kimura A, Matsui H, Takahashi T. 2002. Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility. *Zoolog Sci* 19:93-102
- Kim JD, Toda C, D'Agostino G, Zeiss CJ, DiLeone RJ, Elsworth JD, Kibbey RG, Chan O, Harvey BK, Richie CT, Savolainen M, Myöhänen T, Jeong JK, Diano S. 2014. Hypothalamic prolyl endopeptidase (PREP) regulates pancreatic insulin and glucagon secretion in mice. *Proc Natl Acad Sci* 111:11876-81
- Koida M, Walter R. 1976. Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J Biol Chem* 251(23):7593-9
- Laitinen KS, van Groen T, Tanila H, Venalainen J, Männistö PT and Alafuzoff I. 2001. Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than beta-amyloid accumulation. *Neuroreport* 12(15):3309-12
- Leahy JC, Luo Y, Kent CS, Meiri KF, Vallano ML. 1993. Demonstration of presynaptic protein kinase C activation following long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 52:563-574
- Männistö PT, Venalainen J, Jalkanen A and Garcia-Horsman JA. 2007. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect* 20(5):293-305
- Mantle D, Falkous G, Ishiura S, Blanchard PJ and Perry EK. 1996. Comparison of proline endopeptidase activity in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Chim Acta* 249(1-2):129-39
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N and Heyman M. 2005. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 129(3):786-96
- Matsubara Y, Ono T, Tsubuki S, Irie S, Kawashima S. 1998. Transient up-regulation of a prolyl endopeptidase activity in the microsomal fraction of rat liver during postnatal development. *Eur J Biochem* 252:178-83
- Matsuda T, Sakaguchi M, Tanaka S, Yoshimoto T, Takaoka M. 2013. Prolyl oligopeptidase is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-binding protein that regulates genotoxic stress-induced cell death. *Int J Biochem Cell Biol* 45:850-7
- Mentlein R. 1988. Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett* 234:251-6
- Myöhänen TT, Pyykkö E, Männistö PT, Carpen O. 2012. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and in ovarian and colorectal tumors. *J Histochem Cytochem* 60:706-15.
- Odaka C, Mizuochi T, Shirasawa T, Morain P, Checler F. 2002. Murine T cells expressing high activity of prolyl endopeptidase are susceptible to activation-induced cell death. *FEBS Lett* 512(1-3):163-7
- Oliveira EB, Martins AR, Camargo AC. 1976. Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. *Biochemistry* 15(9):1967-74
- Polgár L. 1992. Prolyl endopeptidase catalysis. A physical rather than a chemical step is rate-limiting. *Biochem J* 283 ( Pt 3):647-8
- Rennex D, Hemmings BA, Hofsteenge J, Stone SR. 1991. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30(8):2195-203

- Rossner S, Schulz I, Zeitschel U, Schliebs R, Bigl V, Demuth HU. 2005. Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 30:695-702
- Schulz I, Zeitschel U, Rudolph T, Ruiz-Carrillo D, Rahfeld JU, Gerhartz B, Bigl V, Demuth HU, Rossner S. 2005. Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion. *J Neurochem.* 94(4):970-9
- Sheehan DC, Hrapchak BB. 1987. *Theory and practice of histotechnology.* Battelle Press.
- Shinoda M, Toide K, Ohsawa I and Kohsaka S. 1997. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235(3):641-5
- Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, Stuge TB, Gray GM, Lee PP, Khosla C. 2006. Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol* 13:649-58
- Siviter RJ1, Cockle SM. 1995. Peptides related to thyrotrophin-releasing hormone are degraded in seminal plasma by an enzyme similar to prolyl endopeptidase. *J Endocrinol* 144(1):61-6
- Soriano S, Lu DC, Chandra S, Pietrzik CU and Koo EH. 2001. The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases. *J Biol Chem* 276(31):29045-50
- Stone SR, Rennex D, Wikstrom P, Shaw E, Hofsteenge J. 1991. Inactivation of prolyl endopeptidase by a peptidylchloromethane. Kinetics of inactivation and identification of sites of modification. *Biochem J* 276 ( Pt 3):837-40
- Suzuki K, Sakaguchi M2, Tanaka S1, Yoshimoto T3, Takaoka M1. 2014. Prolyl oligopeptidase inhibition-induced growth arrest of human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 443:91-6
- Szeltner Z, Polgár L. 2008. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci* 9:96-107
- Taylor WL, Andrews PC, Henrikson CK, Dixon JE. 1980. New fluorogenic substrates for a rat brain proline endopeptidase. *Anal Biochem* 105:58-64
- Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, Múgica J, Ochoa C, Casis L *Regul Pept.* 2004. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regul Pept* 122:79-84
- Venäläinen JI, Juvonen RO, Männistö PT. 2004. Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *Eur J Biochem* 271:2705-15
- Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerényi TD. 1971. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* 173:827-829
- Wilk S. 1983. Prolyl endopeptidase. *Life Sci* 33:2149-57
- Williams RS, Eames M, Ryves WJ, Viggars J, Harwood AJ. 1999. Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J.* 18(10):2734-45
- Yamanaka C, Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, Purnelle G, Lemaitre M, Wilk S, Bourguignon JP. 1999. Early prepubertal ontogeny of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion: I. Inhibitory autocrine control through prolyl endopeptidase degradation of GnRH. *Endocrinology* 140:4609-15
- Yokosawa H, Miyata M, Sawada H, Ishii S. 1983. Isolation and characterization of a post-proline cleaving enzyme and its inhibitor from sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Biochem* 94:1067-1076
- Yoshida K, Inaba K, Ohtake H, Morisawa M. 1999. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from the Pacific herring, *Clupea pallasii*, and its role in the activation of sperm motility. *Dev Growth Differ* 41:217-25
- Yoshimoto T, Ogita K, Walter R, Koida M, Tsuru D. 1979. Post-proline cleaving enzyme. Synthesis of a new fluorogenic substrate and distribution of the endopeptidase in rat tissues and body fluids of man. *Biochim Biophys Acta* 569:184-92

### *Parte III (DAAM1):*

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.*, 16:3797–804
- Abraham-Peskir JV, Chantler E, Uggerhøj E, Fedder J. 2002. Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Hum Reprod* 17(2):375-82
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.*, 16:1066–76
- Aspenström P, Richnau N, Johansson AS. 2006. The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Exp Cell Res* 312:2180-94
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382(6588):225-30
- Bao B, Zhang L, Hu H, Yin S, Liang Z. 2012. Deletion of a single-copy DAAM1 gene in congenital heart defect: a case report. *BMC Med Genet* 13:63
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382:638–42
- Bershadsky AD, Futerman AH. 1994. Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A blocks cell polarization and inhibits directed cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5686–5689
- Boutros M, Mlodzik M. 1999. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech. Dev.*, 83:27–37
- Chantler E, Abraham-Peskir JV. 2004. Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia* 36(2):87-93
- Chassot AA, Gillot I, Chaboissier MC. 2014. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction* 148(6):R97-110
- Chawengsaksophak K, Svingen T, Ng ET, Epp T, Spiller CM, Clark C, Cooper H, Koopman P. 2012. Loss of Wnt5a disrupts primordial germ cell migration and male sexual development in mice. *Biol Reprod* 86(1):1-12
- Cheng CY, Mruk DD. 2012. The blood-testis barrier and its implication in Male contraception. *Pharmacol Rev* 64:16–64
- Clermont Y, Perey B. 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *AM J Anat.* 100:241-267
- Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. 2004. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum Reprod* 19(10):2283-8
- Cooper TG. 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl.* 13(1):130-8
- Cui Q, Xie P. 2015. Correlation Between Daam2 Expression Changes and Demyelination in Guillain-Barre Syndrome. *Cell Mol Neurobiol* [Epub ahead of print]
- Dhanasekaran DN, Reddy EP. 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*;27:6245-51
- DeRosier DJ, Edds KT. 1980. Evidence for fascin cross-links between the actin filaments in coelomocyte filopodia. *Exp. Cell Res.*, 126:490–494

- Dvorakova K, Moore HDM, Sebkova N, Palecek J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* 130: 61–69
- Evangelista M, Zigmond S, Boone C. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci.*, 116: 2603–2611
- Faix J, Rottner K. 2006. The making of filopodia. *Cell Biol.* 18:18–25
- 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):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(2):362-8
- Fetic S, Yeung CH, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG. 2006. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl.* 27(2):294-301
- Franca LR, Auharek SA, Hess RA, Dufour JM, Hinton BT. 2012. Blood-tissue barriers: Morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers. *Adv Exp Med Biol* 763:237–259
- Gong W, Pan L, Lin Q, Zhou Y, Xin C, Yu X, Cui P, Hu S, Yu J. 2013. Transcriptome profiling of the developing postnatal mouse testis using next-generation sequencing. *Sci. China Life Sci* 56(1):1-12
- Goode BL, Eck MJ. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev. Biochem* 76:593-627
- Guttman J, Takai Y, Vogl AW. 2004a. Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biol. Reprod* 71(2):548-59
- Guttman JA, Obinata T, Shima J, Griswold M, Vogl AW. 2004b. Non-muscle cofilin is a component of tubulobulbar complexes in the testis. *Biol Reprod* 70(3):805-12
- Habas R, Kato Y, He X. 2001. Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. *Cell* 107:843–854
- Habas R, Dawid IB. 2005. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol* 2005; 4:2
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.*, 8:573–81
- Higgs HN. 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci.*, 30: 342–353
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131:1663-77
- Hermo L, Dworkin J, Oko R. 1988. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am J Anat* 183(2):107-24
- Huszar G, Vigue L. 1990. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 25(3):258-62
- Huszar G, Patrizio P, Vigue L, Willets M, Wilker C, Adhoot D, Johnson L. 1998. Cytoplasmic extrusion and the switch from creatine kinase B to M isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. *J Androl* 19(1):11-20
- Jaiswal R, Breitsprecher D, Collins A, Corre<sup>^</sup>a IR Jr, Xu MQ, Goode BL. 2013. The Formin Daam1 and Fascin Directly Collaborate to Promote Filopodia Formation *Current Biology*, 23:1373–1379



- Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. 2004. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 276(2):431-40
- Ju R, Cirone P, Lin S, Griesbach H, Slusarski DC, Crews CM. 2010. Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(15):6906-11
- Kerr GE, Young JC, Horvay K, Abud HE, Loveland KL. 2014. Regulated Wnt/beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 90(1):3
- Kida Y, Shiraishi T, Ogura T. 2004. Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 153(1):143-50
- Kida YS, Sato T, Miyasaka KY, Suto A, Ogura T. 2007. Daam1 regulates the endocytosis of EphB during the convergent extension of the zebrafish notochord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6708-13
- Klein TJ, Mlodzik M. 2005. Planar cell polarization: An emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 21:155–176
- Kobielak A, Pasolli HA, Fuchs E. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol.*, 6:21-30
- Kohn AD, Moon RT. 2005. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38:439-46
- Kovar DR. 2006. Molecular details of forminmediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18:11–17
- Kovar DR, Harris ES, Mahaffy R, Higgs HN, Pollard TD. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* 124:423-35
- Kühn S, Geyer M. 2014. Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases* 5:e29513
- Lewis AK, Bridgman PC. 1992. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity, *J. Cell. Biol.*, 119:1219–1243
- Li F, Higgs HN. 2003. The mouse formin, mDia1, is a potent actin nucleation factor regulated by auto-inhibition. *Curr Biol.*, 13:1335-1340
- Li Q, Ishikawa TO, Miyoshi H, Oshima M, Taketo MM. 2005. A targeted mutation of Nkd1 impairs mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 280(4):2831-9
- Li N, Mruk DD, Wong CKC, Han D, Lee WM, Cheng CY. 2015. Formin 1 regulates ectoplasmic specialization in the rat testis through its actin nucleation and bundling activity. *Endocrinology* 156(8):2969–2983
- Li D, Hallett MA, Zhu W, Rubart M, Liu Y, Yang Z, Chen H, Haneline LS, Chan RJ, Scharz RJ, Field LJ, Atkinson SJ, Shou W. 2011. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 Daam1 is required for heart morphogenesis. *Development* 138:303-315
- Li D, Hallett MA, Zhu W, Rubart M, Liu Y, Yang Z, Chen H, Haneline LS, Chan RJ, Scharz RJ, Field LJ, Atkinson SJ, Shou W. 2011. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 Daam1 is required for heart morphogenesis *Development*, 138:303-315
- Li MWM, Mruk DD, Cheng CY. 2012. Gap junctions and blood-tissue barriers. *Adv Exp Med Biol* 763:260–280
- Lie PPY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2009. Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier integrity in the seminiferous epithelium. *FASEB J* 23:2555–2567
- Lie PPY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2010. Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:1581–1592

- Lin X. 2004. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, 131:6009-21
- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140(3):327-37
- Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X. 1999. Beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6273–78.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/ degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108:837–47
- Liu W, Sato A, Khadka D, Bharti R, Diaz, H, Runnels LW, Habas R. 2008. Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(1):210-5
- Lu J, Meng W, Poy F, Maiti S, Goode BL, Eck MJ. 2007. Structure of the FH2 domain of Daam1: implications for formin regulation of actin assembly. *J Mol Biol* 369:1258-69
- Ma P, Wang H, Guo R, Ma Q, Yu Z, Jiang Y, Ge Y, Ma J, Xue S, Han D. 2006. Stage-dependent Dishevelled-1 expression during mouse spermatogenesis suggests a role in regulating spermatid morphological changes. *Mol Repr and Develop* 73:774–783
- Marinou K, Christodoulides C, Antoniadis C, Koutsilieris M. 2012. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab* 23(12):628-36
- Marlow F, Topczewski J, Sepich D, Solnica-Krezel L. 2002. Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* 12:876-84
- Mattila PK, Lappalainen P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9: 446–454
- Matussek T, Djiane A, Jankovics F, Brunner D, Mlodzik M, Mihály J. 2006. The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. *Development* 133:957-66
- Miller RK, Canny SG, Jang CW, Cho K, Ji H, Wagner DS, Jones EA, Habas R, McCrea PD. 2011. Pronephric tubulogenesis requires Daam1-mediated planar cell polarity signaling. *J Am Soc Nephrol* 22(9):1654-64
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. 1996. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86:391–99
- Mortimer D, Menkveld R. 2001. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J Androl* 22(2):192-205
- Mortimer D, Templeton AA, Lenton EA, Coleman RA. 1982. Semen analysis parameters and their interrelationships in suspected infertile men. *Arch Androl* 8(3):165-71
- Naud N, Tourè A, Liu J, Pineau C, Morin L, Dorseuil O, Escalier D, Chardin P, Gacon G. 2003. Rho family GTPase Rnd2 interacts and co-localizes with MgcRacGAP in male germ cells. *Biochem J* 372(Pt 1):105-12
- Nicol B, Guiguen Y. 2011. Expression profiling of Wnt signaling genes during gonadal differentiation and gametogenesis in rainbow trout. *Sex Dev* 5(6):318-29
- Okabe S, Hirokawa N. 1991: Actin dynamics in growth cones, *J. Neurosci.*, 11:1918–1929
- Pellegrin S, Mellor H. 2005. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol.*, 15:129-133
- Pelletier RM. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. 2011. *ProgHistochem Cytochem* 46:49–127

- Pengpeng M, Huizhen W, Rui G, Quanhong M, Zuoren Y, Yi J, Yeuha G, Jing M, Shepu X, Daishu H. 2006. Stage-dependent Dishevelled-1 expression during mouse spermatogenesis suggests a role in regulating spermatid morphological changes. *Mol Repr and Develop* 73:774–783
- Picut CA, Remick AK, de Rijk EP, Simons ML, Stump DG, Parker GA. 2015. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol.* 43(3):326-42
- Pruyne D, Evangelista M., Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297:612–615
- Rengan AK, Agarwal A, van der Linde M, du Plessis SS. 2012. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol* 17;10:92
- Reya T, Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434:843-50
- Rotkopf S, Hamberg Y, Aigaki T, Snapper SB, Shilo BZ, Schejter ED. 2011. The WASp-based actin polymerization machinery is required in somatic support cells for spermatid maturation and release. *Development* 138(13):2729-39
- Russell LD. 1979. Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cell in rat testis. *Anat Rec* 194: 213–232
- Russell LD, Bartke A, Goh JC. 1989. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat.*,184(3):179-89
- Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL, Pellman D. 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nature Cell Biol.*, 4:626–631
- Sato A, Khadka DK, Liu W, Bharti R, Runnels LW, Dawid IB, Habas R. 2006. Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Development* 133(21):4219-31
- Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M, Moon RT. 2003. Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* ;161(4):769-77
- Slusarski DC, Pelegri F. 2007. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol.*, 307:1-13
- Small JV, Isenberg G, Celis JE. 1978. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells, *Nature*, 272:638–639
- Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. 2008. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature Reviews Immunology* 8, 581-593
- Su W, Mruk DD, Cheng CY. 2013. Regulation of actin dynamics and protein trafficking during spermatogenesis--insights into a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48(2):153-72
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407:530– 35
- Tanegashima K, Zhao H, Dawid IB. 2008. WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation. *EMBO J* 27(4):606-17
- Tang EI, Mok KW, Lee WM, Cheng CY. 2015. EB1 regulates tubulin and actin cytoskeletal networks at the Sertoli cell blood-testis barrier in male rats—an in vitro study. *Endocrinology* 156:680–693
- Tolwinski NS, Wieschaus E. 2004. A nuclear function for Armadillo/beta-Catenin. *PLoS Biol.*, 2:486–93
- Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell Biol.*, 174:863–875

- Vogl AW, Vaid KS, Guttman JA. 2008. The Sertoli cell cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 636:186–211
- Wallingford JB, Habas R. 2005. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, 132:4421–36
- Wong EWP, Mruk DD, Cheng CY. 2008. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochim Biophys Acta* 1778,692–708
- World Health Organization: Standard procedures. In WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. Edited by Cooper TG. Cambridge: Cambridge University Press 2010:68
- Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL, Eck MJ. 2004. Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, 116:711–723
- Yamaguchi TP. 2001. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol.*, 11:713–24
- Yamashita M, Higashi T, Suetsugu S, Sato Y, Ikeda T, Shirakawa R, Kita T, Takenawa T, Horiuchi H, Fukai S, Nureki O. 2007. Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain. *Genes Cells* 12(11):1255–65
- Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. 2002. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.*, 21:1733–42
- Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. 2006. Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2):98–105
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10:1443–54
- Young JS, Guttman JA, Vaid KS, Vogl AW. 2009a. Tubulobulbar complexes are intercellular podosome-like structures that internalize intact intercellular junctions during epithelial remodeling events in the rat testis. *Biol Reprod* 80:162–174
- Young JS, Guttman JA, Vaid KS, Shahinian H, Vogl AW. 2009b. Cortactin (CTTN), N-WASP (WASL), and clathrin (CLTC) are present at podosome-like tubulobulbar complexes in the rat testis. *Biol Reprod* 80:153–161
- Zallen JA. 2007. Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129:1051–1063
- Zigmond SH. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 16(1):99–105