Riassunto

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici. Essi derivano dall'acido arachidonico e sono in grado di legare ed attivare specifici recettori di membrana, come CB1 e CB2. I principali composti classificati come "endocannabinoidi" sono l'arachidonoiletanolamina (AEA, anandamide) ed il 2-arachidonoil glicerolo (2-AG); queste molecole mostrano una differente affinità per i due recettori. L'effetto dell'AEA via CB1 o CB2 dipende dalla sua concentrazione extracellulare, controllata mediante il suo "uptake" o la sua degradazione, rispettivamente dal trasportatore di membrana AMT e dall'idrolasi FAAH.

Generalmente, i cannabinoidi endogeni, i recettori dei cannabinoidi, FAAH ed AMT costituiscono il "sistema endocannabinoide".

Data l'elevata complessità del sistema, l'ampia distribuzione al di là del sistema nervoso centrale e l'alto grado di conservazione lungo la scala evolutiva, la caratterizzazione molecolare dettagliata di uno dei componenti - il recettore CB1 - risulta un utile approccio per approfondire le conoscenze relative all'attività degli endocannabinoidi, a livelli multipli.

Con questo spirito, abbiamo utilizzato come modello sperimentale, l'anfibio anuro *Rana esculenta*. Si tratta di un basso vertebrato la cui attività riproduttiva è influenzata da fattori ambientali, principalmente temperatura e fotoperiodo, nonché da molteplici fattori molecolari che governano le numerose ed importanti relazioni di tipo endocrino, autocrino e paracrino che si instaurano lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. La sua tipica organizzazione testicolare consente, inoltre, di analizzare contemporaneamente tipi cellulari diversi, racchiusi in particolari strutture, definite "cisti".

Il clonaggio molecolare del recettore CB1 dall'encefalo e dal testicolo di *R. esculenta* ha rappresentato il punto di partenza di questo lavoro. Servendoci della metodica di RT-PCR, usata in combinazione con la tecnica 3' RACE, abbiamo ottenuto un frammento parziale di 1586 bp, dall'encefalo di rana. Il confronto di tale sequenza con quella degli altri vertebrati rivela un range di identità nucleotidica compreso tra il 62.6 e l'81.9%. Una proteina di 462 aa, dal peso molecolare di 51.89 kDa è stata dedotta dalla sequenza nucleotidica. L'approccio bioinformatico è stato, poi, utile a caratterizzare i vari domini della proteina, dai sette domini idrofobici - tipici dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) - ai loops intra ed extra cellulari. I domini critici per la funzionalità del recettore sono pure ritrovati in rana, dai potenziali siti di fosforilazione ai motivi critici

per l'internalizzazione, desensibilizzazione ed interazione con le proteine G. Un frammento di 1384 bp è stato anche clonato dal testicolo di rana; l'allineamento tra il cDNA di encefalo e quello di testicolo rivela due differenze nucleotidiche, a livello dei codoni 186 e 252. Per valutare la possibilità di modificazioni post-trascrizionali, abbiamo clonato l'intera regione codificante da preparazioni di DNA genomico, ottenute dagli stessi pool di animali utilizzati per preparare i cDNA. Mentre il cDNA di encefalo differisce dalla sequenza genomica nei codoni 5, 30, 70, 186, 252, 408, il cDNA di testicolo differisce nei codoni 5, 30, 70 e 408. Le uniche differenze nucleotidiche che determinano differenze aminoacidiche riguardano i codoni 70 e 408. Con l'analisi di Northern blot abbiamo riconosciuto sia nel testicolo che nell'encefalo di rana un trascritto di 2.2 kb; l'analisi di Southern blot ha dimostrato che *cb1* sia un gene a singola copia.

Da questi risultati abbiamo ipotizzato che un processo di "editing", un'elaborata e precisa modificazione post-trascrizionale dell'RNA, possa aver luogo. Inoltre, la struttura secondaria dell'mRNA, predetta dalla sequenza genomica, è sostanzialmente diversa dalla struttura secondaria dell'mRNA di encefalo e di testicolo. I cambiamenti nucleotidici che abbiamo osservato in questo studio potrebbero, dunque, influenzare il "folding" dell'RNA, così come la sua stabilità ed il suo turnover.

L'analisi di espressione di *cb1* in vari tessuti di *R. esculenta* rappresenta un approccio utile a comparare il nostro modello sperimentale alle altre classi di vertebrati.

I più alti livelli di trascritto sono stati trovati nell'encefalo e nelle gonadi. Mentre il rene, il fegato ed il muscolo mostrano una discreta quantità di trascritto, nell'ipofisi, nel cuore e nella milza, l'espressione di *cb1* è veramente ridotta. Usufruendo della stagionalità riproduttiva della rana, abbiamo valutato l'espressione del recettore nel testicolo, da settembre a luglio. *Cb1* si esprime ad alti livelli a settembre, raggiunge un picco a novembre e decrescere durante la stasi invernale. L'espressione del recettore incrementa nuovamente durante la stagione degli amori.

Il recettore presenta un peculiare pattern di espressione anche nell'encefalo *in toto,* durante il ciclo riproduttivo annuale: livelli comparabili di espressione sono stati osservati a settembre e ad ottobre, si riducono a novembre ed aumentano nuovamente da gennaio ad aprile; una diminuzione significativa del segnale è stata osservata a maggio ed a giugno ed un nuovo incremento si è avuto a luglio. Per poter dare una spiegazione a questo profilo di espressione, principalmente in relazione alle funzioni riproduttive, abbiamo sezionato l'encefalo nelle singole aree così come il midollo nei

singoli tratti ed abbiamo usato questi campioni per un'analisi di espressione. Sebbene il recettore mostri un particolare profilo a seconda del mese considerato, durante tutto il ciclo, *cb1* risulta maggiormente espresso nel prosencefalo e nel mesencefalo.

Durante il ciclo riproduttivo annuale, il profilo di *cb1* nel testicolo è risultato chiaramente opposto a quello nell'encefalo *in toto*. Tale risultato ci fa ipotizzare che gli endocannabinoidi possano influenzare negativamente la secrezione del GnRH, il principale regolatore dell'attività gonadica.

Per poter verificare questa ipotesi, abbiamo valutato l'esistenza di una relazione neuroanatomica e funzionale tra il sistema endocannabinoide e quello del GnRH, nel prosencefalo di rana.

Data l'anatomia dell'encefalo dei bassi vertebrati, abbiamo scelto *R. esculenta* come un valido modello per analizzare gli aspetti principali del controllo centrale della riproduzione. Usando la metodica di doppia immunofluorescenza, supportata dall'analisi di microscopia confocale, abbiamo dimostrato che una sotto-popolazione di neuroni ipotalamici GnRH secernenti di rana possiede anche il recettore CB1. Mediante RT-PCR, abbiamo, poi, evidenziato - durante il ciclo riproduttivo annuale - che le fluttuazioni dell'espressione del *GnRHI* sono chiaramente opposte al profilo di espressione di *cb1*, sia nell'encefalo *in toto* che nel telencefalo e nel diencefalo isolati, aree coinvolte nel rilascio del GnRH e nel controllo della riproduzione. Inoltre, mediante esperimenti *in vitro*, abbiamo dimostrato che l'AEA inibisce la sintesi del *GnRHI* e la buserellina (un agonista del GnRHI), a sua volta, inibisce la sintesi del *GnRHI* ed induce un incremento di trascrizione di *cb1*. Le nostre osservazioni hanno, dunque dimostrato l'esistenza di una relazione anatomica morfofunzionale tra il sistema degli endocannabinoidi e l'attività del GnRH.

Appendice A

Il recettore CB1, come tutti gli altri membri della superfamiglia dei recettori GPCRs, presenta domini altamente conservati, importanti per la sua funzionalità. All'interno del suo settimo dominio transmembrana, abbiamo riconosciuto il motivo aminoacidico "NPxxY", conosciuto per regolare l'internalizzazione, il "binding" con il ligando e l'interazione con le proteine G di molti GPCRs.

Partendo da queste informazioni, abbiamo analizzato il ruolo di questo motivo anche nell'attività del recettore CB1. Attraverso saggi di mutagenesi *in vitro*, abbiamo modificato i singoli residui del motivo ad alanina ed abbiamo, poi, utilizzato i costrutti mutanti per trasfettare in modo stabile cellule di rene embrionale umano (HEK).

La prima attività del recettore analizzata è stata quella dell'internalizzazione. Le cellule HEK, esprimenti il recettore wild-type (WT) ed i mutanti, sono state trattate con il ligando CP55940, in un esperimento di dose-risposta ed in un "time course". L'effetto più significativo riguarda la mutazione asparagina (N) 394/alanina (A) che inibisce completamente l'internalizzazione del recettore.

Un'indagine più approfondita ci ha portato ad analizzare l'influenza di queste mutazioni sul riciclo del recettore verso la membrana. L'effetto principale riguarda la mutazione prolina (P) 395/alanina (A) che induce un riciclo del mutante più rapido rispetto a quello del WT. Nessun cambiamento sia nell'efficienza di internalizzazione che di riciclo si è avuto per il mutante tirosina (Y) 398/alanina (A) che si comporta esattamente come il WT.

Infine, abbiamo valutato la capacità del recettore WT e mutato di attivare le MAPK, in seguito all'interazione con le proteine G. Mentre il mutante Y398A, ancora una volta, funziona come il WT, i mutanti N394A e P395A mostrano picchi di attivazione delle chinasi più bassi del controllo.

Con questi esperimenti, abbiamo, dunque, dimostrato che il motivo "NPxxY" potrebbe influenzare l'attività del recettore CB1, così come è già stato osservato per molti altri GPCRs.

Appendice B

La spermatogenesi è un complesso quadro di eventi che consente ad uno spermatogone di diventare una cellula altamente specializzata, lo spermatozoo, dotata di acrosoma e di flagello. Numerosi sono gli elementi molecolari che governano le importanti interazioni che si instaurano lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade.

Dopo aver dimostrato un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione della funzionalità riproduttiva - per di più dimostrando un suo possibile controllo a livello centrale, sulla produzione del GnRH - abbiamo preso in esame un ulteriore sistema molecolare coinvolto nella spermatogenesi, il sistema mUBPy/MSJ-1.

Il rimodellamento di proteine nascenti è una funzione cellulare importante, specialmente durante la spermatogenesi, quando nuove strutture si sviluppano ed altre vengono degradate.

La presenza dell'enzima deubiquitinante mUBPy è già stata osservata nel testicolo e nell'encefalo di topo, per di più collegando la sua localizzazione a quella della proteina DNAJ MSJ-1.

Ancora una volta, il nostro modello sperimentale è risultato valido per dimostrare che se un sistema molecolare è presente in un basso vertebrato, deve avere una funzione basilare, preservata lungo la scala evolutiva.

Mediante Western blot, abbiamo riconosciuto un segnale specifico, relativo all'enzima mUBPy, nel testicolo di rana, durante il ciclo riproduttivo annuale. Il pattern osservato è opposto a quello di MSJ-1, analizzato sugli stessi campioni. L'enzima, inoltre, è localizzato in cisti di spermatidi e forma un sottile anello citoplasmatico intorno al nucleo, nella testa degli spermatozoi isolati, prelevati dalla cloaca, dopo trattamento con buserellina (un analogo del GnRH).

Un possibile controllo da parte di mUBPy dell'efficienza del "folding" proteico durante la spermatogenesi è ipotizzato in *R. esculenta*.

Abstract

Endocannabinoids are a novel class of lipidic mediators. They derive from arachidonic acid and bind and activate specific membrane receptor as CB1 and CB2. The main compounds classified as "endocannabinoids" are arachidonoylethanolamide (AEA, anandamide) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG); these molecules have different affinity for the receptors. The effect of AEA via CB1 and CB2 depends on its extracellular concentration, which is controlled by uptake and degradation, respectively due to a specific AEA membrane transporter (AMT) and to a fatty acid amide hydrolase (FAAH). Generally, endogenous cannabinoids, cannabinoid receptors, FAAH and AMT are designed as "endocannabinoid system".

Due to the great complexity of the system, the widespread distribution outside the nervous system and the high degree of evolutionary conservation, detailed CB1 molecular characterization may be an useful approach to better understand the endocannabinoids activity, at multiple levels.

With this aim, we used as experimental model, the anuran amphibian *Rana esculenta*, a low vertebrate, whose reproductive activity is affected by environmental factors, mainly temperature and photoperiod, and various molecular factors that control many important endocrine, autocrine and paracrine relations along the hypothalamus-hypophysis-gonad. The typical organization of the testis allow to analyse, at the same time, different cellular types, included in special structures called "cysts".

CB1 molecular cloning from *R. esculenta* brain and testis was the first part of our report. By RT-PCR approach, in combination with 3'RACE, we obtained a partial cDNA, 1586 bp long, from the frog brain. The *cb1* nucleotide sequence, compared with those of other vertebrates, revealed a nucleotide identity ranging from 62.6 to 81.9%. A protein of 462 aa, with a predicted molecular mass of 51.89 kDa was deduced from the nucleotide sequence. Bioinformatic approach was, then, useful to characterize the protein domains, from the seven hydrophobic domains - typical of the coupled to G proteins receptors (GPCRs) - to extra and intracellular loops. Critical domains for CB1 functionality were also observed in the frog, from the potential sites of phosphorylation to the critical motifs for internalization, desensitization and interactions with G proteins. A fragment of 1384 bp was also cloned from frog testis; the alignment between brain and testis cDNA revealed two nucleotide differences, in correspondence of codons 186 and 252. To assess the possibility of post-transcriptional modifications, we cloned the

whole coding region from genomic DNA preparations, obtained from the same samples used to prepare cDNAs. While brain cDNA was different from the genomic sequence in the codons 5, 30, 70, 186, 252, 408, testis cDNA differed in codons 5, 30, 70 and 408. The only nucleotide differences responsible to generate aminoacidic differences were observed in codons 70 and 408, important as glycosylation site and for the coupling with G proteins, respectively. By Northern blot analysis, we recognized in both brain and testis only a signal of 2.2 kb. On the other hand, the Southern blot analysis was useful to demonstrate that *cb1* was a single copy gene.

Our hypothesis was that an "editing" process, an elaborate and precise form of post-transcriptional RNA modification, took place. Furthermore, the secondary structure of the mRNA predicted from the genomic sequence was substantially different from the secondary structure of brain and testis mRNA. In this respect, we speculated that the nucleotide changes observed in this study may affect RNA folding and therefore its stability and turnover.

In our experimental model, an analysis of *cb1* expression in some tissues, as it has already done in other classes of vertebrates, may be an useful approach to receive more knowledge about the functionality of the receptor.

With this aim, we analysed - by RT-PCR technique - the *cb1* presence in different frog tissues. Higher levels of mRNA were found in the brain and in gonads. While in kidney, in liver and in muscle there was a significant amount of transcript, in pituitary, in heart and in spleen, the expression levels were very low. Using the seasonal reproduction of the frog, we analysed the receptor expression in the testis, from September to July. *Cb1* levels were high in September with a peak in November, then they decreased during the winter stasis. Receptor expression increased again during the breeding season.

The receptor showed a particolar pattern of expression also in the brain *in toto*, during the reproductive cycle: similar levels of expression were observed in September and October, they decreased in November and increased again from January to April; a significant decrease of the signal was observed in May and in June and a new increase was in July. To gain further information about this pattern of expression, mainly in relationship to the reproductive function, we dissected the whole brain in the isolated areas as well as the spinal cord in every tract and we used these samples for a second analysis of expression. Even if the receptor showed a particular pattern depending on the month considered, during the entire cycle, *cb1* was more expressed in the forebrain and in the midbrain.

A mismatching profile of *cb1* between the testis and the whole brain may be the consequence of a negative control from the endocannabinoids on the GnRH secretion, the main controller of gonadal activity.

To verify this hypothesis, we valued the neuroanatomical and functional relationship between the endocannabinoid system and the GnRH one, in the frog forebrain.

The morphofunctional relationship between the endocannabinoid system and gonadotropin releasing hormone (GnRH) activity in the regulation of reproduction has poorly been investigated in vertebrates. Due to the anatomical features of lower vertebrate brain, in the present paper, we choose the frog *R. esculenta* (anuran Amphibian) as a suitable model to better investigate such aspects of the central control of the reproduction. By using double labelling immunofluorescence aided with a laser-scanning confocal microscope, we demonstrated that a subpopulation of the frog hypothalamic GnRH neurons possessed CB1 cannabinoid receptors. By means of semi-quantitative RT-PCR assay, we showed that the fluctuations of *GnRHI* clearly mismatched, during the annual sexual cycle, the expression profile of *cb1* in the whole brain as well as in isolated areas such as the telencephalon and the diencephalon which are known to be mainly involved in GnRH release and control of the reproduction. Furthermore, we found that anandamide was able to inhibit *GnRHI* synthesis, and buserelin (a GnRH agonist), in turn, inhibited the synthesis of *GnRHI* and induced an increase of *cb1* transcription. Our observations pointed out, for the first time *in vivo*, the occurrence of a morphofunctional anatomical basis to explain a reciprocal relationship between the endocannabinoid system and GnRH activity.

Appendix A

CB1 receptor, as the other members of the GPCRs superfamily, shows highly conserved domains, important for its functionality. In its seven transmembrane domain, we recognized the aminoacidic motif "NPxxY", known to regulate the internalization, the binding to the ligand and the interaction with the G proteins of many GPCRs.

Starting from these informations, we studied the function of this motif on CB1 activity too. Using mutagenesis *in vitro* assay, we mutated the single residues of the motif to alanine and we used these mutated receptors to stably transfecte HEK cells.

Internalization was the first activity that we analysed. HEK cells were treated with CP55940 ligand, at different concentrations and for different time points. The most significant effect concerned the asparagine 394 mutation that completely inhibited CB1 internalization. A deeper research allowed us to analyse the effect of these mutations on

the recycle activity. The main effect concerned proline 395 mutant that seemed to recycle faster then the wild-type (WT). No significant change for both internalization and recycle was observed for the tyrosine 398 mutant that acted as the WT.

For the internalization analysis as well as for the recycle, the data obtained using the on cell western approach were confirmed by confocal microscopy.

Finally, we tested the ability of the WT and mutated receptors to activate MAPK, after interaction with G proteins. Whereas Y398A mutant behaved as the WT, N394A and P395A mutants showed lower peaks of activation then the control.

With our experiments, we demonstrated that the "NPxxY" motif may affect the activity of CB1, as well as it was already observed for many other GPCRs.

Appendix B

Spermatogenesis is a complex event that allows to the spermatogonia to become a very specialized cell, with an acrosome and a flagellum, as the spermatozoa. Many are the molecular elements involved in the important interactions presented along the hypothalamus-hypophysis-goand axis.

After the demonstration of an involvement of the endocannabinoid system in the regulation of the reproductive functionality - demonstrating a possible control at central level, on the GnRH production - we examined another molecular system involved in the spermatogenesis, the mUBPy/MSJ-1 system

The remodelling of new proteins is a very important cellular function, mainly during the spermatogenesis, when novel structures develop and others are degraded.

mUBPY presence was already showed in the mouse testis and brain, in relationship with MSJ-1 localization.

Also in this case, our experimental model was useful to demonstrate that the presence of a molecular system in a low vertebrate reveals its important function, conserved along the evolution.

By Western blot, we recognized a specific mUBPy signal in the frog testis, during the reproductive cycle. The pattern observed seemed opposite to the MSJ-1 one, analysed on the same samples. The enzyme was localized in spermatids cysts, by immunocytochemical analysis and formed a thin cytosolic rim around the nucleus, in the spermatozoa head, isolated from the cloaca. The enzyme presence in these cells was also confirmed by Western blot.

A possible control from mUBPy of the proteinic folding efficiency during the spermatogenesis is hypothesised in *R. esculenta*. Further studies will be conducted for a

molecular cloning of the enzyme and for the analysis of its profile of expression in the frog testis as well as in the central nervous system, during the annual reproductive cycle.

Introduzione

Sistema degli endocannabinoidi ed analisi del suo ruolo nell'ambito della riproduzione.

Nota in Asia centrale ed in Cina sin dal 3000 a.C., la marijuana è stata per lungo tempo utilizzata dalla medicina popolare, nonché come sostanza in grado di procurare piacere, soprattutto tra i giovani.

Il maggior componente psicoattivo della marijuana, il Δ^9-tetraidrocannabinolo (THC), esibisce diverse attività farmacologiche sia *in vitro* che *in vivo* (Mechoulam *et al*., 1992). Numerosi studi dimostrano, infatti, che la somministrazione di questa sostanza ad animali sperimentali induca una ridotta attività motoria spontanea, analgesia, danno della memoria a breve termine ed ipotermia. Effetti su distretti tissutali al di fuori del sistema nervoso centrale, quale la soppressione della risposta immunitaria, sono stati anche valutati. I meccanismi specifici attivati da questa molecola sono rimasti oscuri fino agli anni '80.

Nel 1988, Devane *et al*. hanno fornito una diretta evidenza dell'esistenza di uno specifico sito di "binding" per i cannabinoidi nell'encefalo di ratto, usando il ligando [^{3}H]CP55940 - un cannabinoide sintetico radiomarcato. Divenne, così, chiaro che il Δ^9-THC legava specifici siti di un qualche recettore, scatenando in tal modo una varietà di risposte farmacologiche. Nel 1990 è stato riportato il clonaggio di un cDNA codificante un recettore dei cannabinoidi, denominato CB1, da una cDNAteca di encefalo di ratto (Matsuda *et al*., 1990). Tale recettore, di 473 aminoacidi (aa), contiene sette domini trans-membrana tipici dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs) (Fig.1).

I cannabinoidi interagiscono con il recettore, contattando una specifica tasca idrofobica, delimitata dalle eliche trans-membrana; i tre loops citosolici e la porzione C-terminale del quarto loop contribuiscono, invece, all'attivazione delle proteine G (Mukhopadhyay *et al*., 2002). L'interazione del recettore CB1 con tali proteine è fondamentale per l'attivazione di specifici pathways di trasduzione del segnale - quali l'inibizione dell'adenilato ciclasi, la modulazione dei canali ionici di Ca^{2+} e di K^+ e l'attivazione di protein chinasi attivate da mitogeni (Howlett *et al*., 2002; Mukhopadhyay *et al*., 2002).

In aggiunta all'interazione del recettore con le proteine G ed all'attivazione di cascate di segnali intracellulari, il "binding" con il ligando scatena anche una serie di processi regolatori che contribuiscono alla desensibilizzazione, all'endocitosi ed alla down-regolazione del recettore.

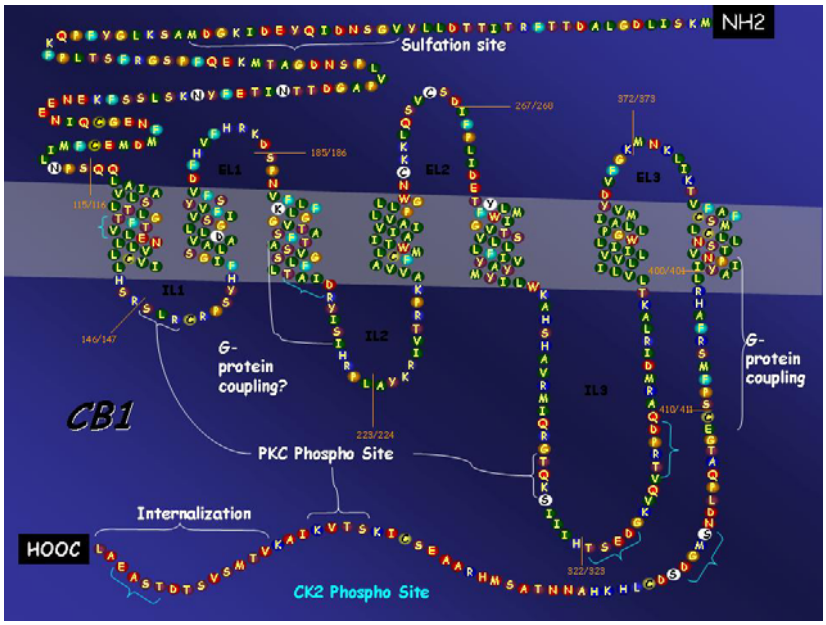


Fig.1 Rappresentazione schematica della struttura del recettore CB1, con la porzione N-terminale extracellulare, sette domini transmembrana e la coda C-terminale citoplasmatica. Possibili siti di regolazione da parte di chinasi PKC e CK2 sono stati indicati, insieme ad aree coinvolte nella regolazione dell'accoppiamento del recettore alle proteine G e della sua internalizzazione.

L'uso di cDNAteche umane è stato un utile approccio per l'identificazione di una variante di splicing amino-terminale del recettore CB1. Durante l'analisi di tali cDNA, sono stati riconosciuti due introni nel gene *cb1*, uno nella regione 5'-UTR, l'altro nella regione codificante. Quest'ultimo introne dà origine ad una forma di CB1 - denominata hCB1a - più corta di 61 aa e, in aggiunta, 28 aa della porzione amino-terminale sono del tutto differenti da quelli presenti nella forma più lunga (Shire *et al*., 1995).

In seguito all'identificazione della forma *a*, è stata riconosciuta una nuova variante umana definita hCB1b. Essa presenta una delezione di 33 aa nella porzione amino-terminale ed un diverso profilo di espressione rispetto alla forma *a*, con un picco di espressione nell'encefalo fetale. La variante *b* ha proprietà diverse dalla forma classica, poiché nessuno dei ligandi noti funziona da agonista. Questo ha fatto ipotizzare l'esistenza di ligandi addizionali o la possibilità che tali forme recettoriali non abbiano alcuna funzione né rilevanza *in vivo* (Ryberg *et al*., 2005).

Un livello di complessità maggiore è determinato dalla formazione di dimeri o più larghi complessi oligomerici di CB1. L'individuazione di tali aggregati in sezioni

ippocampali di ratto ha fatto ipotizzare un loro ruolo altamente specializzato a livello neuronale (Wager-Miller *et al*., 2002).

In seguito al clonaggio del recettore CB1, Munro *et al*. (1993) hanno clonato un altro cDNA codificante la forma 2 del recettore dei cannabinoidi (CB2); anch'esso - come CB1 - è un recettore di sette domini trans-membrana accoppiato alle proteine G_i/G_o. Mentre CB1 è abbondantemente espresso nel sistema nervoso centrale, in particolare nel cervelletto, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, CB2 è prevalentemente presente nei tessuti del sistema immunitario, come la milza, le tonsille ed i linfonodi (Herkenham *et al*., 1995).

Agonisti selettivi per CB2 sono promettenti candidati per il trattamento del dolore; l'attivazione del recettore inibisce, infatti, la nocicezione generata da stimoli termici e meccanici (Clayton *et al*., 2002). Per molti anni, si è ritenuto che CB2 avesse principalmente una localizzazione nel sistema immunitario. Anche nell'ambito del sistema nervoso centrale, il recettore risulta, infatti, localizzato esclusivamente in cellule gliali, dunque immunitarie, così che gli effetti degli endocannabinoidi sull'encefalo sono attribuiti a CB1. In seguito, mediante RT-PCR, è stata dimostrata l'espressione del gene *cb2* anche nel cervelletto, nella corteccia e nelle cellule staminali di ratto, oltre che nella milza (Van Sickle *et al*., 2005).

Nel 1992, Devane *et al*. hanno isolato e caratterizzato il lipide endogeno N-acetiletanolamina, dimostrando la sua capacità di legare ed attivare il recettore CB1; tale lipide - comunemente chiamato anandamide (AEA) - è il primo ligando endogeno, probabilmente appartenente ad una classe più complessa di ligandi, denominata "endocannabinoidi". Questa scoperta, insieme con l'isolamento di un secondo cannabinoide endogeno - il 2-arachidonoilglicerolo (2AG) - ha determinato il fondamento di un nuovo sistema di "signalling" nell'encefalo (Mechoulam *et al*., 1995; Sugiura *et al*., 1995).

Tale sistema è molto importante per la comprensione della comunicazione neuronale.

Gli endocannabinoidi agiscono come messaggeri extracellulari di tipo retrogrado nella modulazione dell'eccitabilità neuronale (Pomelli *et al*., 2003; Wilson *et al*., 2001). E' stato proposto, infatti, che essi vengano rilasciati dai neuroni post-sinaptici - in seguito a depolarizzazione - e diffondano, poi, nel terminale pre-sinaptico per attivare il recettore CB1. L'attivazione di tale recettore inibisce il rilascio di neurotrasmettitori, inducendo iperpolarizzazione e/o chiusura dei canali di Ca^{2+} (Schlicker *et al*., 2001).

Numerose evidenze indicano che i neurotrasmettitori lipidici siano sintetizzati, accumulati e degradati ed esercitino le loro funzioni all'interno della membrana cellulare. Pertanto, è stato suggerito che la conformazione, la localizzazione e l'orientamento del ligando nella membrana siano fattori critici nel determinare la capacità del ligando di raggiungere il sito d'azione sul recettore. Un lavoro computerizzato - riguardante le proprietà conformazionali dell'AEA - mostra che tale molecola sia capace di assumere una varietà di conformazioni in soluzione: una forma ad U, a J ed estesa. Il modello messo a punto da Tian *et al*. (2005) prevede che l'AEA assuma prevalentemente una conformazione estesa, strutturalmente rassomigliante ad una catena acilica lipidica e diffonda lateralmente nella membrana cellulare per prendere, poi, contatto con le eliche 3 e 6 del recettore CB1, determinandone l'attivazione (Fig.2).

Al fine di funzionare come messaggero intracellulare, l'anandamide ha bisogno di essere prodotta nella cellula in maniera stimolo-dipendente; pertanto, anziché essere conservata in vescicole, come succede per altri neurotrasmettitori - tipo la dopamina, il glutammato e l'acetilcolina - essa è prodotta su richiesta, in maniera Ca^{2+}- dipendente (Di Marzo, 1994). Tale processo è il risultato di un meccanismo biosintetico catalizzato da una fosfodiesterasi sensibile al Ca^{2+} che converte un precursore fosfolipidico in AEA. Il precursore è l'N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE), trovato nella membrana plasmatica tanto quanto nelle membrane dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico; l'enzima è un'idrolasi associata alla membrana, appartenente alla famiglia delle zinco-metallo idrolasi e trovata nei microsomi, denominato NAPE-PLD (Okamoto *et al*., 2004).

Una volta sintetizzata, l'AEA viene rilasciata dalla cellula nello spazio extracellulare dove agisce come fattore autocrino o paracrino. Gli effetti di questa molecola dipendono proprio dalla sua concentrazione extracellulare, quest'ultima finemente controllata da un meccanismo di degradazione - nell'ambiente intracellulare - ad opera di un'idrolasi degli acidi grassi (FAAH) (Cravatt *et al*., 1996)

Tale enzima è localizzato sul lato intracellulare della membrana plasmatica e svolge un'importante attività in molte aree encefaliche, quali l'ippocampo, lo striato e le cellule staminali.

Recentemente, è stata scoperta una seconda forma dell'enzima FAAH, denominata FAAH2. Le due forme di idrolasi hanno un diverso profilo di selettività per il substrato, così come un'affinità per inibitori diversi. Di diverso tra i due enzimi c'è anche la

localizzazione tissutale, dal momento che FAAH1 è abbondante nell'encefalo, nell'intestino e nel testicolo e la forma 2 è prevalentemente espressa nel cuore (Wei *et al*., 2006).

Esiste un ulteriore meccanismo di regolazione dei livelli di AEA nello spazio extracellulare; si tratta dell'uptake della molecola ad opera del trasportatore di membrana AMT (van der Stelt *et al*., 2005).

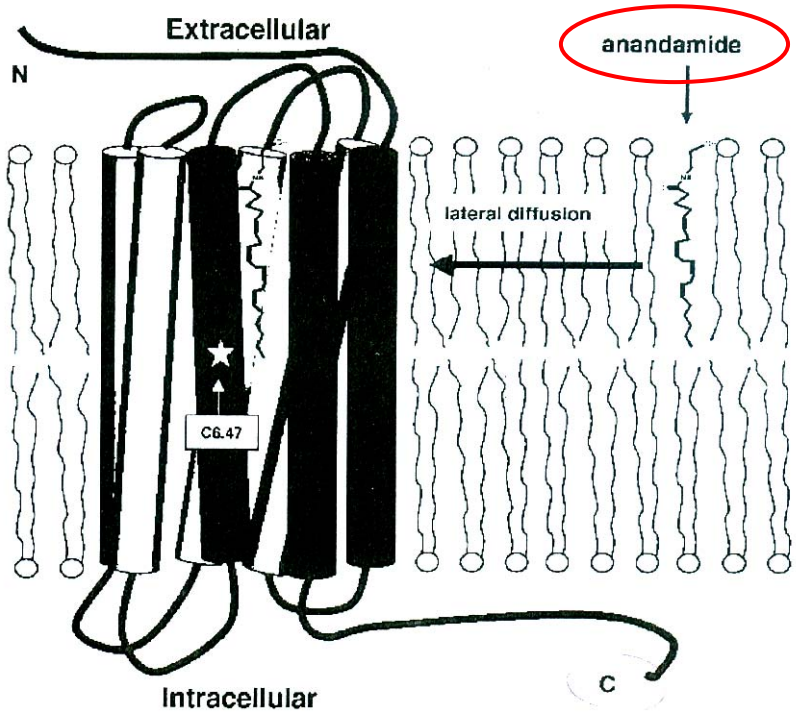


Fig.2 L'anandamide, dopo aver assunto una conformazione estesa, s'inserisce nel doppio strato lipidico con il suo gruppo polare, allo stesso livello della testa polare dei fosfolipidi e diffonde lateralmente per prendere, poi, contatto con la terza e la sesta elica del recettore CB1, determinandone l'attivazione. In particolare, il residuo di cisteina 47 (indicato con un asterisco), nella sesta elica è stato identificato come un sito d'interazione con il carbonio terminale dell'AEA, mediante un legame covalente.

A differenza dell'AEA che agisce come un agonista parziale per il recettore CB1, il 2-AG opera come un "full agonist". Rilasciato da fosfolipidi di membrana, arricchiti di acido arachidonico, mediante l'attività combinata di due enzimi biosintetici - la fosfolipasi C e la diacilglicerolo lipasi (DGL) - attiva CB1 e viene poi trasportato nella cellula per essere idrolizzato ad opera di una monoacilglicerolo lipasi (MGL) (Freund *et*

al., 2003). Enzimi aggiuntivi - quali la cicloossigenasi (COX), la lipoossigenasi (LOX) e FAAH - sono in grado di degradare il 2-AG.

I due recettori CB1 e CB2, insieme con i loro ligandi, i trasportatori di membrana, il complesso sistema enzimatico regolatore della biosintesi e della degradazione, costituiscono il "sistema endocannabinoide".

La riproduzione ha inizio con l'interazione tra un gamete maschile (spermatozoo) ed un gamete femminile (cellula uovo), portando alla fecondazione. Attraverso numerose divisioni cellulari mitotiche, l'uovo fecondato (embrione) produce, poi, la blastocisti (Dey *et al*., 2004). Numerosi mediatori lipidici funzionano come importanti molecole di "signalling" durante gli eventi riproduttivi (Dey, 2005). Nell'ultima decade, una consistente evidenza di dati si è focalizzata sugli endocannabinoidi come lipidi bioattivi coinvolti nella regolazione della fertilità femminile e maschile (Park *et al*., 2004; Wang *et al*., 2006). Con la caratterizzazione del sistema endocannabinoide e la generazione di modelli murini knockout, in cui gli elementi del sistema sono geneticamente deleti, numerose evidenze molecolari e fisiologiche hanno dimostrato, infatti, che il "signalling" (endo)cannabinoide sia critico per la sopravvivenza delle cellule del Sertoli, la spermatogenesi, la placentazione, la fecondazione, lo sviluppo dell'embrione nella fase di pre-impianto, il suo impianto e la sua crescita nella fase di post-impianto.

In un lavoro, pubblicato nel 1993 da Chang *et al*., sono stati utilizzati i gameti del riccio di mare come sistema *in vitro* per studiare gli effetti cellulari di sostanze psicoattive (cocaina, oppioidi, nicotina). Tale studio dimostra che il Δ^9-THC è in grado di inibire la capacità fecondante degli spermatozoi, bloccando la reazione acrosomale, normalmente stimolata da specifici ligandi presenti nello strato gelatinoso che protegge la cellula uovo. La recettività dell'uovo non ancora fecondato e la motilità degli spermatozoi sono, pure, danneggiati dal trattamento effettuato. La presenza di un recettore cannabinoide sugli spermatozoi di riccio implica la presenza di un ligando endogeno. Con questa idea, lo stesso gruppo ha ricercato gli effetti dell'anandamide sulla capacità fertilizzante e sulla reazione acrosomale, ottenendo risultati simili - reversibili e dose-dipendente - a quelli ricavati dal trattamento con il Δ^9-THC (Schuel *et al*., 1994).

La presenza dei recettori dei cannabinoidi e dell'AEA è stata dimostrata anche nei distretti riproduttivi dei mammiferi, quali testicolo, epididimo, prostata, sperma, ovario, placenta ed utero. La tecnica della cromatografia liquida ad alta performance (HPLC) è risultato un utile approccio per dimostrare la presenza delle molecole N-aciletanolamine

(AEA, PEA, OEA) nei fluidi riproduttivi umani, come il plasma seminale, il fluido oviduttale e quello amniotico, il fluido follicolare ed il latte (Schuel *et al*., 2002).

Gli spermatozoi risultano, pertanto, esposti ai cannabinoidi durante il transito nell'epididimo e nelle vie genitali femminili, fino all'ovidutto, dove avviene la fecondazione. Mediante un esperimento *in vitro* si è cercato di mimare un processo probabilmente verificabile *in vivo*: il [^{3}H]CP-55,940, un potente agonista cannabinoide, è in grado di legare il recettore CB1 sulla membrana di spermatozoi umani, modulandone la capacitazione e la capacità fecondante (Schuel *et al*., 2002a).

L'evidenza diretta della presenza di un recettore dei cannabinoidi negli spermatozoi (SPZ) umani è stata offerta dagli studi di Rossato *et al*. (2005) i quali, mediante tecniche biomolecolari ed istologiche, localizzano il recettore nella testa e nel segmento intermedio della coda degli SPZ. L'attivazione di tale recettore da parte dell'AEA riduce la motilità ed inibisce la reazione acrosomale.

Il quadro delle interazioni tra il sistema degli endocannabinoidi e le funzioni riproduttive è incominciato a complicarsi quando è nata l'idea che tali molecole agissero non solo localmente, nei tessuti riproduttivi, ma a livello centrale, influenzando la produzione ed il rilascio degli ormoni sessuali. Tale proprietà modulatoria è stata inizialmente attribuita ad un'azione diretta sulla ghiandola ipofisaria (Murphy *et al*., 1990); nel ratto, infatti, la presenza del recettore CB1 è stata evidenziata nell'ipofisi. La capacità dell'ipofisi stessa di sintetizzare endocannabinoidi è stata, pure, evidenziata (Pagotto *et al*., 2001).

Mentre è stata dimostrata la capacità degli endocannabinoidi di inibire il rilascio di prolattina (Scorticati *et al*., 2002) e dell'ormone luteinizzante (LH) (Fernandez-Solari *et al*., 2003), gli effetti di tali molecole sulla secrezione di FSH non sono stati ben definiti.

Studi successivi hanno dimostrato che l'azione degli endocannabinoidi sul rilascio dell'LH sia a monte dell'ipofisi. Si è, dunque, pensato ai neuroni ipotalamici secernenti il GnRH (fattore di rilascio delle gonadotropine), il principale regolatore delle funzioni riproduttive, come target cellulare di tali mediatori lipidici. In tale ambito, rientrano gli studi di Gammon *et al*. (2005) che rivelano l'esistenza di un sistema cannabinergico completo e funzionale, comprendente gli enzimi responsabili della sintesi del 2-AG e dell'AEA, i trasportatori di membrana, l'enzima idrolitico FAAH ed i due recettori CB1 e CB2, nei neuroni ipotalamici immortalizzati GnRH secernenti.

Nasce così l'idea che gli endocannabinoidi possano influenzare la riproduzione attraverso interazioni di tipo autocrino o paracrino direttamente con neuroni ipotalamici

GnRH secernenti o con cellule vicine, in ogni modo, capaci di controllare il rilascio di tale fattore.

Infine, per quel che riguarda la riproduzione femminile, è stato, dimostrato che l'esposizione cronica ai cannabinoidi danneggia la maturazione sessuale, distrugge il ciclo mestruale, deprime la maturazione follicolare dell'ovario, altera la citologia uterina e vaginale e riduce i livelli di LH e di steroidi sessuali nel sangue (Solomon *et al*., 1977; Smith *et al*., 1993). Un ruolo importante è svolto da tali molecole anche durante le prime fasi della gravidanza (Paria *et al*., 2000); in particolare, bassi livelli di AEA sono risultati benefici per l'impianto della blastocisti (Wang *et al*., 2003). Considerando la ridotta quantità dell'enzima FAAH nell'utero dei topi, considerati per questo tipo di indagine, si è ipotizzata una regolazione dei livelli di AEA da parte della NAPE-PLD. Un approccio biomolecolare e biochimico ha, infatti, evidenziato che l'espressione e l'attività di tale enzima cambiano in maniera spazio-temporale, influenzando i livelli di AEA nel sito d'impianto e durante i vari stadi della recettività uterina (Guo *et al*., 2005). In casi di aborto, i livelli dell'enzima FAAH nei linfociti circolanti materni - durante le prime otto settimane di gestazione - sono risultati anch'essi critici (Maccarrone *et al*., 2004).

In tabella 1, sono riassunti alcuni degli effetti del THC sulla riproduzione umana.

Lo scambio di segnali chimici rappresenta un linguaggio universale in grado di mettere in comunicazione cellule anche distanti fra loro.

Le somiglianze tra le funzioni neuronali e quelle degli spermatozoi sono state messe in luce osservando le somiglianze dei pathways molecolari attivati durante il rilascio di neurotrasmettitori e la reazione acrosomale, rispettivamente.

Dunque, anche ambienti cellulari apparentemente diversi possono condividere molecole e pathways (Schuel *et al*., 2005).

Tabella 1. Effetti del THC, componente della *Cannabis sativa* sugli eventi riproduttivi umani.

Effetto	Referenza
Fertilità maschile	
Riduzione dei livelli di testosterone	Kolodny *et al*. (1974)
Oligospermia	Hembree *et al*. (1978)
Riduzione dei livelli sierici di LH	Kolodny *et al*. (1974)
Induzione di anomalie degli spermatozoi	Issidorides (1978)
Blocco della reazione acrosomale	Whan *et al*. (2006)
Fertilità femminile	
Induzione di anomalie del feto	Persaud *et al*. (1967)
Distruzione del ciclo mestruale	Bauman *et al*. (1980)
Inibizione della secrezione di prolattina	Bauman *et al*. (1980)
Incremento dell'incidenza di morte fetale prematura	Fried *et al.* (1984)
Blocco della crescita fetale	Qazi *et al*. (1985)

Caratteristiche dell'anfibio anuro, *Rana esculenta*.

Come si è potuto comprendere, il quadro delle funzioni svolte dal sistema endocannabinoide è veramente complesso.

L'utilizzo di modelli sperimentali più semplici dei mammiferi favorisce la comprensione di meccanismi molecolari più complicati aventi luogo nei vertebrati superiori. Questo spirito ha spinto McPartland *et al*. (2006) a ricercare le origini evolutive del sistema endocannabinoide - definendo le storie filogenetiche dei vari membri del sistema - ed ha spinto noi ad utilizzare un basso vertebrato, quale l'anfibio anuro *R. esculenta*, come modello sperimentale per l'analisi del sistema.

Rana esculenta è un ibrido ibridogenetico risultante dalla fusione dei genomi delle due specie parentali, *Rana ridibunda* e *Rana lessonae*. Secondo l'ibridogenesi della fusione dei gameti delle due specie parentali si formerebbe un genoma misto in grado di trasmettersi alle generazioni successive allorché l'ibrido si accoppia con la specie parentale o con altri ibridi ibridogenetici.

Numerosi sono i vantaggi offerti da questo modello: innanzitutto, la sua riproduttività stagionale.

La spermatogenesi rappresenta quella sequenza di eventi citologici che portano alla formazione degli spermatozoi da precursori cellulari. Nei mammiferi, questo processo ha luogo senza interruzione nei tubuli seminiferi; in altre specie, come i riproduttori stagionali, la spermatogenesi s'interrompe o si suddivide in una serie di fasi distinte, in funzione di specifiche condizioni ambientali. La complessità dell'organizzazione strutturale del testicolo dei vertebrati predice la presenza di un sistema di controllo intragonadico. Orchestrata in larga misura dalle cellule di Sertoli, la spermatogenesi richiede una regolazione endocrina, autocrina-paracrina e sicuramente una diretta interazione cellula-cellula (Cobellis *et al*., 2003). Pertanto, al di là del classico controllo ormonale esercitato dalle gonadotropine, FSH o ormone follicolo-stimolante ed LH o ormone luteinizzante, negli ultimi anni si è fatta luce sulla complessa ed intricata rete intragonadica di regolatori molecolari.

Lo studio della spermatogenesi condotto sui mammiferi risulta spesso ostacolato dall'elevata complessità organizzativa del loro testicolo. Al contrario, tra i vertebrati non mammiferi, ci sono specie caratterizzate da una spermatogenesi di tipo cistico: si tratta appunto degli anfibi anuri, che costituiscono un valido modello alternativo per lo studio di questo processo.

Il nostro modello sperimentale presenta, dunque, una più semplice morfologia testicolare ed una peculiare organizzazione cistica che permette l'osservazione contemporanea di linee germinali distinte spazialmente le une dalle altre. Il suo testicolo subisce, inoltre, modificazioni morfologiche e fisiologiche nel corso del ciclo riproduttivo annuale, alternando periodi di attività a periodi di inattività. In particolare, il processo incomincia gradualmente nei mesi primaverili, procede attivamente durante l'estate e declina gradualmente in inverno, raggiungendo, per un periodo limitato di tempo, una totale quiescenza. La moltiplicazione degli spermatogoni primari inizia generalmente a gennaio-febbraio, mesi in cui sono assenti le cisti di spermatociti primari, secondari e quelle di spermatidi. Nel mese di marzo, i tubuli seminiferi contengono il maggior numero di spermatogoni primari; occorre attendere aprile-maggio per riscontrare la comparsa di cisti di spermatogoni secondari, il cui numero rimane alto durante l'estate. La massiva trasformazione di questi ultimi in spermatociti primari inizia a maggio-giugno e continua per tutta l'estate. Il numero di spermatociti secondari diventa relativamente alto a giugno-luglio, mentre si riduce durante l'autunno (ottobre-dicembre), stagione caratterizzata dalla comparsa di cisti di spermatidi. Proprio in questo periodo, un'attiva spermioistogenesi determina la formazione di spermatozoi non immediatamente rilasciati, ma tenuti in rapporto con le cellule di Sertoli e liberati durante la stagione degli amori, dopo l'inverno, quando la temperatura esterna comincia ad essere più mite (Rastogi *et al*., 1980).

Questa catena di eventi è scatenata da un insieme di fattori endocrini ed ambientali. Tra i primi, l'integrità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade è essenziale per garantire una corretta spermatogenesi; infatti, fluttuazioni cicliche nella produzione di ormoni, quali il testosterone ed il 17β-estradiolo, sono associate all'andamento ciclico della spermatogenesi (Fasano *et al*., 1991; Rastogi *et al*., 1976).

I fattori ambientali, non certo di minore rilevanza, rientrano in questo interessante mosaico di eventi che sono alla base della spermatogenesi.

Il nostro modello sperimentale, *R. esculenta*, rappresenta un organismo esemplare per la sua capacità di adattare la propria funzionalità testicolare ai cambiamenti ambientali.

La temperatura, in particolare, influenza il blocco e la ripresa della funzionalità testicolare, con un'azione più efficace rispetto al fotoperiodo; quest'ultimo, infatti, gioca un considerevole ruolo nel mediare gli effetti della temperatura sull'attività gametogenica ed endocrina del testicolo. La tolleranza termica, comunque, varia enormemente tra le specie; in *R. esculenta*, l'intervallo ottimale di temperatura per il

mantenimento di un'attiva spermatogenesi è compreso tra 10 e 20°C. Temperature intorno ai 4°C causano degenerazione degli spermatociti primari ed inibizione della proliferazione degli spermatogoni primari; d'altro canto, temperature al di sopra di 24°C danneggiano la spermatogenesi (Rastogi *et al*., 1980).

Per quanto riguarda l'influenza della luce, gli studi di Galgano (1936) su *R. esculenta* indicano che il fotoperiodo condiziona l'attività testicolare attraverso gli occhi ed il complesso pineale. Una serie di esperimenti fatti usando diverse combinazioni di regimi luminosi, in differenti periodi dell'anno, indicano chiaramente che, come per la temperatura, esiste un intervallo ottimale di luminosità. Sia fotoperiodi troppo lunghi che fotoperiodi troppo brevi hanno un effetto deleterio sulla spermatogenesi; pertanto, un regime di 12 ore di luce e 12 ore di buio è il migliore per il mantenimento di un'attiva spermatogenesi, a temperature di circa 20°C.

La disponibilità di cibo influenza la spermatogenesi solo indirettamente, attraverso l'accumulo di corpi grassi che costituiscono un'imponente riserva energetica per le gonadi degli anfibi. Nei maschi di rana è stata dimostrata l'importanza di tali strutture per il normale funzionamento del complesso ipotalamo-ipofisi-gonade; infatti, la rimozione dei corpi grassi, in ogni stagione dell'anno, causa atrofia testicolare e regressione della callosità del pollice.

La sincronia tra il processo spermatogenico ed i cambiamenti ambientali è garantita dall'ipotalamo il quale è sia un organo endocrino che un centro integrativo; esso, infatti, è capace di ricevere informazioni provenienti dall'ambiente esterno e da quello interno e di rispondere adeguatamente a questi stimoli inducendo la secrezione di gonadotropine ipofisarie. L'ipofisi, infatti, si trova in intimo contatto con il pavimento encefalico al quale è collegata da un delicato peduncolo. Questo rapporto non è casuale, poiché la capacità funzionale dell'intera ipofisi dipende proprio dalle sue connessioni nervose e vascolari con l'ipotalamo (Pierantoni *et al*., 2002).

Altra caratteristica vantaggiosa del nostro modello sperimentale è rappresentata dalla semplice morfologia dell'encefalo: si tratta, infatti, di un encefalo di tipo laminato, un archetipo di quelli più elaborati dei mammiferi (Herrick, 1948).

Il ciclo riproduttivo annuale degli anfibi è, inoltre, caratterizzato in entrambi i sessi dall'accumulo del GnRH nel periodo post-riproduttivo e dal suo rilascio nel periodo pre-riproduttivo (Fasano *et al*., 1993; Cobellis *et al*., 1999). Nell'encefalo, nell'ipofisi e nelle gonadi di *R. esculenta*, sono state scoperte numerose forme molecolari di GnRH, principalmente il GnRHI ed il GnRHII (Fasano *et al*., 1993; Fasano *et al*., 1988),

insieme con i rispettivi recettori (Cariello *et al*., 1989; Fasano *et al*., 1990; Battisti *et al*., 1994; Di Matteo *et al*., 1996).

In questo lavoro, l'utilizzo di un modello animale non mammifero è finalizzato, dunque, all'analisi degli aspetti comparativi e funzionali del sistema cannabinergico.

Nella prima parte dei nostri esperimenti, abbiamo condotto il clonaggio molecolare del recettore *cb1* dall'encefalo e dal testicolo di rana, evidenziando differenze nucleotidiche tra la sequenza del cDNA e del DNA genomico.

Nella seconda parte, ci siamo occupati di analizzare il profilo di espressione del recettore sia a livello centrale - nell'encefalo *in toto* e nelle aree encefaliche e nei tratti midollari isolati - che periferico - nel testicolo, durante il ciclo riproduttivo annuale. Poiché già da questo studio preliminare è emersa una qualche interazione tra l'attività encefalica e l'espressione testicolare di *cb1*, abbiamo verificato l'esistenza di tale interazione correlando il profilo di espressione di *cb1* all'attività del GnRHI, il principale regolatore della funzionalità testicolare. A tale scopo, nella terza parte, abbiamo analizzato la relazione anatomica morfofunzionale tra il sistema cannabinergico e quello neurosecretorio del GnRHI, nel prosencefalo di rana, servendoci di approcci molecolari ed istologici.

CAPITOLO 1

IL CLONAGGIO DEL RECETTORE DEI CANNABINOIDI DI TIPO I IN *Rana esculenta* RIVELA DIFFERENZE TRA LA SEQUENZA GENOMICA E QUELLA DEL cDNA.

Meccariello R., Chianese R., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S. (2007). Cloning of type 1 cannabinoid receptor in *Rana esculenta* reveals differences between genomic sequence and cDNA. *FEBS J* **274** : 2909-2920.

Riassunto

Il sistema endocannabinoide è un sistema conservato coinvolto nella modulazione di numerosi processi fisiologici, dall'attività del sistema nervoso centrale alla riproduzione. Un frammento di cDNA di *cb1* è stato clonato dall'encefalo e dal testicolo dell'anfibio anuro *Rana esculenta*, rivelando un'identità nucleotidica compresa tra il 62.6 e l'81.9% rispetto agli altri vertebrati. Il frammento clonato codifica una proteina di 462 aa (FCB1), con tutte le proprietà tipiche dei recettori di membrana accoppiati alle proteine G. L'allineamento di FCB1 con la sequenza di CB1 degli altri vertebrati rivela un range di identità aminoacidica compreso tra il 61.9 e l'88.1%; domini critici per la funzionalità del recettore sono conservati in rana. Poiché sono state riscontrate delle differenze nucleotidiche tra il cDNA di *cb1* dell'encefalo e quello del testicolo, è stata analizzata la sequenza genomica nelle stesse preparazioni tissutali. Dal confronto del cDNA con il DNA genomico sono emerse variazioni nucleotidiche nei codoni 5, 30, 70, 186, 252 e 408; tali differenze nucleotidiche non alterano la sequenza aminoacidica predetta, eccetto per i cambiamenti nei codoni 70 e 408.

Il "folding" predetto dell'RNA risulta fortemente influenzato dalle differenti sequenze nucleotidiche. Il confronto delle sequenze di mRNA di *cb1* disponibili in Banca dati con le corrispondenti sequenze genomiche rivelano che pure nell'uomo, nel ratto, in *D. rerio* ed in *F. rubripes* si verificano dei cambiamenti nucleotidici tra le sequenze di mRNA e di DNA genomico.

Inoltre, le sequenze aminoacidiche dedotte sia dall'mRNA che dal DNA genomico sono state confrontate tra i vertebrati, ed anche in *F. rubripes* alcune variazioni nucleotidiche modificano la sequenza aminoacidica.

I risultati mostrati in questo lavoro indicano per la prima volta che dei cambiamenti nucleotidici possono verificarsi nella maturazione dell'mRNA di *cb1* e che questo fenomeno potrebbe non essere limitato alla rana.

1.1 Introduzione

I recettori dei cannabinoidi legano il Δ^9-THC, il maggior costituente psicoattivo della pianta di marijuana, *Cannabis sativa*, ed alcuni mediatori lipidici endogeni, collettivamente definiti "endocannabinoidi" (Mechoulam *et al*., 2002; De Petrocellis *et al*., 2004). I ligandi endogeni meglio caratterizzati sono l'anandamide (arachidonoiletanolamina, AEA), il 2-arachidonoilglicerolo, la noladina, la virodamina e la *N*-arachidonoildopamina (Mechoulam *et al*., 2002; De Petrocellis *et al*., 2004). Oltre che dai recettori e dai loro ligandi, il sistema endocannabinoide comprende un trasportatore di membrana specifico per l'AEA, un'idrolasi degli acidi grassi, responsabile della degradazione dell'AEA ad etanolamina ed acido arachidonico ed una NAPE fosfolipasi D, un enzima responsabile del rilascio, su richiesta, di AEA dal precursore *N*-acilfosfatidiletanolamina di membrana (Okamoto *et al*., 2004). Ad oggi, due tipi di recettori dei cannabinoidi sono stati caratterizzati: il recettore di tipo I (CB1) è ampliamente espresso nel sistema nervoso ed in numerosi tessuti periferici (Galiegue *et al*., 1995; Shire *et al*., 1995); il recettore di tipo 2 (CB2) è principalmente espresso nel sistema immunitario (Shire *et al*., 1996; Brown *et al*., 2002). Varianti di splicing di CB1 (chiamate CB1a e CB1b), con differenti effetti farmacologici e livelli di espressione tissutale, sono stati descritti nell'uomo (Shire *et al*., 1995; Ryberg *et al*., 2005). Inoltre, la presenza di sottotipi addizionali di recettori CB (CBx) è stata ipotizzata nei topi (Wiley *et al*., 2002).

Il sistema endocannabinoide è altamente conservato lungo la scala evolutiva. Ortologhi del gene codificante il recettore umano CB1 (*cb1*) sono stati clonati e sequenziati nei mammiferi (Elphick *et al*., 2001). Inoltre, ortologhi di *cb1* sono stati clonati e sequenziati anche nei pesci (Yamaguchi *et al*., 1996; Valenti *et al*., 2005), negli anfibi urodeli ed anuri (Soderstrom *et al*., 2000; Cottone *et al*., 2003) e negli uccelli (Soderstrom *et al*., 2001). Nei rettili, la presenza di un recettore CB1 non è stata ancora accertata. Oltre che nei vertebrati, il gene *cb1* è stato clonato in *Ciona intestinalis* (Elphick *et al*., 2003), un urocordato in cui CB1 è espresso ad alti livelli nei gangli cerebrali, nella faringe branchiale, nel cuore e nel testicolo (Matias *et al*., 2005). Nell'ambito degli invertebrati, l'attività del recettore endocannabinoide è stata valutata anche nel riccio di mare, nei molluschi, negli anellidi e negli cnidari (Chang *et al*., 1993; De Petrocellis *et al*., 1999; Salzet *et al*., 2002). Dal momento che l'analisi degli ortologhi di *cb1* nel genoma di *D. melanogaster* e di *C. elegans* non ha prodotto risultati

e che nessun sito di "binding" per i ligandi sintetici di CB1 è stato trovato in numerose specie di insetti (Salzet *et al*., 2002), la prima evidenza del sistema endocannabinode potrebbe essere evolutivamente legata agli organismi deuterostomi (Elphick *et al*., 2001; Salzet *et al*., 2002).

CB1 è un classico recettore di membrana eptamerico accoppiato alle proteine G (Matsuda *et al*., 1990). Il pathway di trasduzione del segnale attivato da CB1 comprende sia l'inibizione dell'adenilato ciclasi attraverso l'azione della proteina G_i e la conseguente attivazione/inibizione dei canali di Ca^{2+} e di K^+ che l'attivazione di chinasi attivate da mitogeni (Mukhopadhyay *et al*., 2002). Oltre che con i classici recettori CB1 e CB2, l'AEA interagisce con canali di Ca^{2+} e di K^+, con il recettore 5-idrossitriptamina-3 e con il recettore per i vanilloidi di tipo 1, un canale cationico non selettivo e dipendente da ligando (Di Marzo *et al*., 2002). A tal proposito, l'AEA - prodotta dopo la mobilizzazione di Ca^{2+} - è stata recentemente proposta come un messaggero intracellulare in grado di regolare l'attività di alcuni canali ionici legando il recettore per i vanilloidi di tipo 1, sull'interfaccia citoplasmatica del doppio strato lipidico (van der Stelt *et al*., 2005).

L'omodimerizzazione e l'eterodimerizzazione di CB1 rappresenta un ulteriore ed interessante aspetto delle potenzialità del sistema cannabinergico (Mackie *et al*., 2005).

Pertanto, data l'elevata complessità del sistema endocannabinoide, l'ampia distribuzione al di là del sistema nervoso e l'alto grado di conservazione evolutiva, riteniamo che la caratterizzazione molecolare dettagliata di CB1 tra le specie possa essere utile per chiarire l'attività degli endocannabinoidi a livelli multipli.

In questo lavoro, abbiamo dunque clonato e caratterizzato *cb1* nell'anfibio anuro *R. esculenta*, precedentemente descritto.

I nostri risultati dimostrano, per la prima volta, l'esistenza di differenze nucleotidiche tra il cDNA di encefalo, il cDNA di testicolo ed il DNA genomico, insieme con le corrispondenti variazioni aminoacidiche. Abbiamo quindi verificato se questo fenomeno si verifichi anche in altre classi di vertebrati.

1.2 Materiali e metodi

1.2.1 Raccolta di animali e di tessuti.

Cinque maschi di *R. esculenta* sono stati catturati mensilmente da settembre a luglio, nelle vicinanze di Napoli. Gli animali sono stati anestetizzati con MS222 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Encefalo, testicolo (per l'analisi di DNA genomico e cDNA) e muscolo sono stati prelevati ed opportunamente conservati a -80°C, fino al loro uso per un'estrazione di RNA o di DNA. Questa ricerca è stata approvata dal Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica.

1.2.2 Estrazione dell'RNA totale.

Un pool di RNA totale è stato estratto dai tessuti di *R. esculenta* (cinque per mese) usando il reagente Trizol (Invitrogen Life Techologies, Paisley, UK), come da protocollo. L'RNA totale è stato trattato per 30 min a 37°C con *Dnasi*I (10U per campione) (Amersham Pharmacia Biotech, Chalfront St Giles, UK) per eliminare eventuali contaminanti di DNA genomico. La purezza e l'integrità dell'RNA estratto sono state, infine, determinate mediante analisi spettrofotometrica a 260/280 nm ed elettroforesi.

1.2.3 Isolamento dell'intera regione codificante di *cb1* in *R. esculenta.*

I pool di RNA totale sono stati utilizzati per preparare i cDNA mediante la reazione di trascrizione inversa. Tale reazione è stata eseguita usando 5 µg di RNA totale, 0.5 µg di primer anchor (AP) (tabella 1), 10 mM dNTP, 0.01 M DTT, 1X buffer, 40 U RNasi out, 200 U Trascrittasi Inversa SuperScript-III Rnasi H^- (Invitrogen Life Techonologies, UK) in un volume finale di 20 µl, come da protocollo. Come controllo negativo, è stato usato l'RNA totale non trattato con Trascrittasi Inversa. Il cDNA è stato usato per un'analisi di PCR. Un frammento di cDNA di rana di 339 bp, codificante i segmenti transmembrana 4 – 7 di CB1, è stato ottenuto usando primers disegnati sul cDNA di *cb1* di *X. laevis* (primers P1 e P2; tabella 1). Dopodichè, le sequenze nucleotidiche complete di *cb1* di ratto, di topo, di *Xenopus* e dello zebrafish sono state allineate mediante il programma CLUSTALW e primers degenerati sono stati selezionati in regioni altamente conservate. Per estendere la sequenza al 5' ed al 3', abbiamo utilizzato combinazioni di primers specifici e degenerati. Le sequenze di tutti i primers usati e gli specifici programmi di PCR sono riportati in tabella 1.

Tutte le analisi di PCR sono state condotte in un Termociclatore Applied Biosystem usando 1 µl di cDNA (diluito 1:5) o 100 ng di DNA genomico e la Ex Taq TaKaRa ad alta fedeltà (Cambrex Bio Science, Milano). I prodotti di amplificazione sono stati clonati nel vettore pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI). Cellule competenti DH5α ad alta efficienza sono state trasformate e le colonie ricombinanti sono state identificate mediante screening colorimetrico. Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit di estrazione NucleoBond (Machery-Nagel, Duren, Germania) e la taglia dell'inserto è stata controllata mediante analisi di restrizione con *Eco*RI (Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Germania). Il DNA è stato poi sequenziato su entrambi i filamenti dal Servizio di Sequenziamento Primm (Primm srl, Napoli). Le sequenze nucleotidiche del cDNA e del genoma sono state ricavate dalla sovrapposizione degli amplificati e da questa sono state dedotte le sequenze aminoacidiche.

1.2.4 Analisi delle sequenze.

I prodotti di amplificazione delle reazioni di nested, ottenuti indipendentemente da reazioni di amplificazioni distinte, sono stati sequenziati su entrambi i filamenti; la sequenza di mRNA e di DNA gnomico di *cb1* è stata ottenuta allineando le sequenze dei frammenti clonati che sono parzialmente sovrapposti.

Sulla base della sequenza nucleotidica, è stata dedotta la sequenza aminoacidica. Per poter stabilire il grado di identità tra le varie sequenze di CB1 nei vertebrati, sia la sequenza nucleotidica che quella aminoacidica sono state allineate con le sequenze codificanti complete disponibili in Banca dati, mediante i programmi di allineamento LALIGN e CLUSTALW.

Dopo aver fatto gli allineamenti delle sequenze aminoacidiche, abbiamo costruito un albero filogenetico usando il metodo di PHYLIP'S DRAWGRAM ed esportando i dati da CLUSTALW.

Infine, possibili domini transmembrana, siti di glicosilazione e di fosforilazione sono stati predetti usando i programmi TMAP, TMHMM, NETNGLYC 1.0 Server e NETPHOS 2.0 Server, disponibili su Workbench SDSC (http://workbench.sdsc.edu/) e sul Server di Proteomica ExPASy (http://au.expasy.org/).

Tabella 1 Sequenze dei primers e dei programmi di PCR usati per l'amplificazione del cDNA e del DNA genomico.

	Origine	Sequenza primer 5' → 3'	Programma di PCR	Taglia (bp)
P1	*X .laevis*	CAGTTCTTCCTCTGTTTGGGTGGAAC	95°C 5';	
P2	*X. laevis*	CCATAAGAGGGCCCCAACAAATG	94°C 30'',	339
			58°C 45'',	
			72°C 1', 35 cycle ; 72°C 7'	
P3	degenerato	GCTTCATGATTCT(GT)A(AC)(CT)CC(AC)AG	95°C 5';	
P2	*R.esculenta*	CCATAAGAGGGCCCCAACAAATG	94°C 45'',	780
			50°C 45'',	
			72°C 45'', 5 cycles ;	
			94°C 45'',	
			45°C 45'',	
			72°C 45'', 30 cycles; 72°C 7'	
P5	*X .laevis*	AAAACTGGGGTAATGAAGTC	95°C 5';	
P6	*R.esculenta*	AGTAAATGTACCCAGGGTTA	94°C 30'',	
			50°C 30'',	378
			72°C 45'', 5 cycles ;	
			94°C 30'',	
			54°C 30'',	
			72°C 45'', 35 cycles; 72°C 7'	
P7	*R.esculenta*	ATTGGGGTAACCAGTGTTCT	95°C 5';	
P8	degenerato	T(GC)GC(AG)ATCTTAAC(AG)GTGCT	94°C 30'',	528
			52°C 30'',	
			72°C 1', 5 cycles;	
			94°C 30'',	
			48°C 30'',	
			72°C 1', 25 cycles; 72°C 7'	
P9	*R.esculenta*	ACGGTCAGAACAGACATGCG	95°C 5';	
AP		5'- GGCCACGCGTCGACTAGTAC$(T)_{17}$ – 3'	94°C 30'',	
			62°C 1',	
			72°C 1'30'', 35 cycles; 72°C 7'	

1.2.5 Analisi dell'ORF di sequenze genomiche di *cb1* di vari vertebrati.

Per valutare la presenza di differenze nucleotidiche tra i cDNA ed il DNA genomico, abbiamo confrontato le sequenze di cDNA di *cb1*, depositate in Banca dati, alle corrispondenti sequenze genomiche.

Le sequenze aminoacidiche sono state dedotte dalle corrispondenti sequenze genomiche di *cb1* e confrontate a quelle dedotte dalle sequenze di cDNA.

1.2.6 Northern blot.

Dieci microgrammi di RNA totale - precedentemente denaturato con gliossale e dimetilsulfossido - estratto da encefalo e testicolo di rana, sono stati sottoposti ad elettroforesi su un gel di agarosio all'1.4% e trasferiti su membrane di nylon (Nytran; Amersham Pharmacia Biotech). Una sonda di RNA antisenso, marcata con digossigenina complementare ad un frammento di *cb1* di 780 bp clonato in pGEM-T Easy, è stata prodotta usando il kit DIG RNA labelling (SP6/T7) (Roche, Mannhein, Germania), come da protocollo. In breve, 6 µg di plasmide ricombinante sono stati linearizzati mediante digestione con *Pst*I (Fermentas, GmbH) e la trascrizione *in vitro* è stata eseguita usando una RNA polimerasi T7 ed una miscela di dNTP e DIG-11-UTP.

Il filtro è stato preibridato e marcato con la sonda a 65°C in Church buffer (0.5 M NaCl/P_i, pH 7.4, 7% SDS, 0.5 mM EDTA e 100 mg/ml di sperma di salmone sonicato); 100 ng/ml di sonda marcata sono stati poi aggiunti al buffer di ibridazione. Il filtro è stato, in seguito, lavato due volte a temperatura ambiente per 5 min, in un buffer a bassa stringenza (2X SSC, 0.1% SDS) e poi due volte a 65°C in un buffer ad alta stringenza (0.2X SSC, 0.1% SDS). Per il rilevamento del segnale, abbiamo usato il protocollo di chemioluminescenza suggerito dalla Roche.

Dopo l'incubazione con il substrato della fosfatasi alcalina chemioluminescente CSPD (Roche), il filtro è stato esposto, per un tempo opportuno, alla pellicola autoradiografica Hyperfilm Kodak (Rochester, NY).

1.2.7 Estrazione di DNA genomico ed analisi di Southern blot.

Il DNA ad alto peso molecolare è stato estratto e purificato mediante tecniche standard (Sambrook *et al*., 1989) dai tessuti di rana (cinque animali/mese). Il DNA genomico estratto dal muscolo (10 µg) è stato digerito con *Eco*RI, *Bam*HI o *Hind*III (Fermentas GmbH) ed analizzato tramite elettroforesi e Southern blot, usando la sonda *fcb1* di 780 bp marcata con digossigenina. La sonda è stata marcata mediante "random priming" e l'ibridazione è stata eseguita a 50°C, in church buffer. Il rilevamento del segnale è stato effettuato seguendo le istruzioni del kit DIG-High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche).

1.2.8 Analisi del "folding" dell'mRNA.

La struttura secondaria dell'RNA e del DNA è stata ottenuta usando il software MFOLD, disponibile sul sito

http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi (Zuker *et al*., 2003; Mathews *et al*., 1999). Quest'analisi è stata limitata a frammenti sovrapposti di 1354 bp dell'mRNA di testicolo e di encefalo e del DNA genomico.

1.3 Risultati

1.3.1 Clonaggio molecolare di *cb1* e caratterizzazione del recettore da preparazioni di encefalo.

Mediante la combinazione di RT-PCR e 3'RACE, abbiamo clonato dall'encefalo di *R. esculenta* un cDNA parziale di *cb1* (*fcb1*) di 1586 bp. Questo frammento di cDNA comprende: una regione 5'-UTR di 12 bp, una regione di 1389 bp codificante una proteina di 462 aminoacidi (aa) ed una completa 3'-UTR di 169 bp, con un sito di poliadenilazione canonico in posizione 1522.

La sequenza codificante di *fcb1* è stata paragonata a quella degli altri vertebrati - [mammiferi (gatto, ratto, topo, chimpanzè, scimmia ed uomo), uccelli (*T. guttata*), anfibi (l'anfibio anuro *X. laevis* e l'urodelo *T. granulosa*) e pesci teleostei (*D. rerio* e *F. rubripes*, il cui genoma contiene un gene *cb1* chiamato *cb1a* ed un gene paralogo, chiamato *cb1b*) - tanto quanto a quella di invertebrati (l'urocordato *C. intestinalis*). In questo studio non abbiamo considerato le sequenze codificanti parziali di *cb1*, depositate in Banca dati relative ad altri vertebrati ed invertebrati.

Gli allineamenti condotti mediante LALIGN e CLUSTALW hanno rivelato un range di indentità nucleotidica compreso tra il 62.6 e l'81.9% nell'ambito dei vertebrati e del 46.5% verso *C. intestinalis* (Tabella 2). Una proteina di 462 aa con un peso molecolare di 51.89 kDa è stata dedotta dalla sequenza nucleotidica.

Anche la sequenza aminoacidica dedotta di FCB1 è stata confrontata alle altre sequenze disponibili in Banca dati, rivelando un range d'identità compreso tra il 61.9 e l'88.1% tra i vertebrati e del 21.5% rispetto a *C. intestinalis* (Tabella 2). L'allineamento aminoacidico completo è riportato in Fig.1.1.

E' interessante notare come la minore identità aminoacidica sia a livello della regione N-terminale del recettore (aa 1-72) (Fig.1.1).

Un albero filogenetico è stato costruito usando il metodo "PHYLIP'S DRAWGRAM" ed esportato da CLUSTALW (Fig.1.2). Sulla base della relazione filogenetica stimata tra i vari recettori CB1 nei vertebrati, confermiamo una relativa divergenza tra le sequenze di CB1 negli anfibi anuri ed in quelli urodeli (Cottone *et al*., 2003).

L'approccio bioinformatico è stato utile per caratterizzare meglio la proteina FCB1. Sette domini transmembrana, tipici dei recettori accoppiati alle proteine G, sono stati dedotti tramite i programmi TMAP e TMHMM (Fig.1.3). I quattro domini extracellulari (ED1-4) comprendono gli aa 1-109 (ED1), 168-181 (ED2), 248-266 (ED3) e 360-368

(ED4); i domini transmembrana (TM1-7) comprendono gli aa 110-132 (TM1), 145-167 (TM2), 182-204 (TM3), 225-247 (TM4), 267-289 (TM5), 337-359 (TM6) e 369-391 (TM7); i quattro domini citoplasmatici (CD1-4) compendono gli aa 133-144 (CD1), 205-224 (CD2), 290-336 (CD3) e 392-462 (CD4).

Sebbene tra gli anfibi sia stata riportata un'altissima identità nucleotidica ed aminoacidica, un basso grado di conservazione è stato osservato per il primo dominio extracellulare; in *R. esculenta*, in particolare, sette residui aminoacidici consecutivi sono completamente assenti rispetto alle altre specie di anfibi (Fig.1.1).

Inoltre, vari possibili residui di fosforilazione (serina, treonina e tirosina) sono stati individuati tramite il programma NETPHOS 2.0 (Fig.1.3).

Numerosi domini critici per la funzionalità del recettore risultano conservati in rana. Tra questi, ricordiamo due siti di N-glicosilazione nel dominio extracellulare N-terminale; dei potenziali siti di fosforilazione da parte della protein chinasi C, nella prima e nella terza regione intracellulare; un residuo conservato di lisina nel terzo dominio transmembrana (TMD3) di cui è stata riconosciuta una notevole importanza per l'interazione del recettore con i ligandi biciclici, ma non con quelli aminoalchilindolici (Song *et al*., 1996; Chin *et al*., 1998); un motivo TQK nel terzo loop citoplasmatico, critico nel ratto per l'attivazione dei canali K^+ e Ca^{2+} (Garcia *et al*., 1998); residui di leucina ed alanina nella porzione C-terminale del terzo loop citoplasmatico, implicati nell'interazione con le proteine G_s nel ratto (Abadji *et al*., 1995); due residui di serina nella coda citoplasmatica, (residui aminoacidici 426 e 430 nel ratto), coinvolti nella desensibilizzazione del recettore (Jin *et al*., 1999); una sequenza TVK corrispondente ad un potenziale sito di fosforilazione da parte della protein chinasi C nella coda intracellulare; un motivo TMS nella coda citoplasmatica, (residui aminoacidici 460-463 nel ratto), richiesti per l'internalizzazione del recettore mediata da WIN55212-2 in cellule trasfettate AtT20 (Hsieh *et al*., 1999).

1.3.2 Clonaggio molecolare di *fcb1* da preparazioni di testicolo di rana.

Un frammento di cDNA di 1384 bp (codoni 1-447) è stato clonato, mediante RT-PCR, dal testicolo di rana. L'allineamento tra la sequenza del cDNA dell'encefalo e quella del testicolo rivela due differenze nucleotidiche nei codoni 186 (GGG nel testicolo e GGA nell'encefalo) e 252 (CTC nel testicolo e CTA nell'encefalo). Tali modificazioni sono state confermate dalle sequenze di tre cloni differenti isolati da diverse preparazioni di cDNA e non determinano differenze aminoacidiche.

Table 2. Identità nucleotidica (nt) ed aminoacidica (aa) espressa in percentuale tra il recettore CB1 di *R.esculenta* ed i recettori CB1 e CB2 di altri organismi.

CBs	***% identità nt****	***Lunghezza cds (nt)***	***% identità aa***	***Residui aa***
CB1				
C. intestinalis	46.5	1272	21.5	423
D. rerio	64.9	1428	70.7	475
F. rubipres cnr1a	68.2	1407	73.9	467
F. rubipres cnr1b	62.6	1413	61.9	470
T. granulosa	76.6	1422	82.9	473
X. laevis	81.9	1413	88.1	470
T. guttata	74.2	1422	84.4	473
F. catus	73	1419	82.2	472
M. musculus	73.4	1422	83.3	473
R. norvegicus	73.2	1422	83.3	473
P. troglodytes	72.2	1419	82.4	472
M. mulatta	72.6	1419	82.4	472
H. sapiens	72.5	1418	82.4	472
H. sapiens cnr1a	66.6	1236	74.4	411
H. sapiens cnr1b	70.8	1320	80.2	439
CB2				
D. rerio	48.9	1038	44.0	345
M. musculus	45.7	1044	35.6	347
R. norvegicus	44.4	1033	36.3	360
H. sapiens	48.4	1082	35.6	360

* L'identità nucleotidica è riferita alle sequenze codificanti (cds). I numeri di accesso in Banca Dati NCBI per le sequenze nucleotidiche di *cb1* sono: *Ciona intestinalis:* AB087259; *Fugu rubripes cnr1a*: X94401; *Fugu rubripes cnr1b*: X94402; *Danio rerio*: AY148349; *Taricha granulosa*: AF181894; *Xenopus laevis*: AY098532; *Taeniopygia guttata*: AF255388; *Mus musculus*: AF153345; *Rattus norvegicus*: U40395; *Felis catus*: U94342; *Macaca mulatta*: AF286025; *Pan troglodytes*: NM_001013017; *Homo sapiens*: NM_016083; *Homo sapiens cnr1a*: NM_033181; *Homo sapiens cnr1b:* AY766182. I numeri di accesso in Banca Dati NCBI per le sequenze nucleotidiche di *cb2* sono: *Danio rerio* NM_212964; *Mus musculus* NM _009924; *Rattus norvegicus* NM_020543; *Homo sapiens*: NM_001841.

1.3.3 Analisi della sequenza genomica di *fcb1*.

Per valutare la possibilità di modificazioni post-trascrizionali, abbiamo clonato l'intera regione codificante di *cb1* da preparazioni di DNA genomico, ottenute dagli stessi pool di tessuti usati per preparare i cDNA.

Risultati simili sono stati ottenuti da sequenze di DNA genomico estratto da testicolo, encefalo e muscolo. Gli allineamenti condotti con il programma CLUSTALW del cDNA di encefalo, del cDNA di testicolo e della sequenza genomica hanno mostrato varie differenze nucleotidiche (Fig.1.4). Il cDNA di encefalo differisce dalla sequenza genomica nei codoni 5, 30, 70, 186, 252 e 408. Il cDNA di testicolo differisce, invece, dalla sequenza genomica nei codoni 5, 30, 70 e 408. Tali differenze nucleotidiche non causano differenze aminoacidiche, eccetto per i codoni 70 e 408.

A livello genomico, infatti, i codoni TCA_{70} ed AAA_{408} codificano, rispettivamente, una serina (S_{70}) ed una lisina (K_{408}); nel cDNA, i codoni GCA_{70} e GAA_{408} codificano, rispettivamente, un'alanina (A_{70}) ed un residuo di acido glutammico (E_{408}). A_{70} è collocata nel primo loop extracellulare, proprio a livello di un sito conservato di N-glicosilazione; E_{408} si trova, invece, nella coda citoplasmatica, in una regione ritenuta critica per l'accoppiamento del recettore con le proteine G_i, nel ratto (Mukhopadhyay *et al*., 2002).

Per valutare l'esistenza di simili differenze nucleotidiche tra i cDNA di *cb1* e le corrispondenti sequenze genomiche in altre classi di vertebrati, abbiamo confrontato le sequenze di mRNA depositate in Banca dati alle corrispondenti sequenze genomiche. Le sequenze aminoacidiche dedotte dalle sequenze di mRNA sono state poi confrontate con quelle dedotte dalle corrispondenti sequenze genomiche. I risultati della nostra ricerca sono riassunti in tabella 3; differenze tra l'mRNA ed il DNA genomico di *cb1* sono state riscontrate nell'uomo, nel ratto, in zebrafish e nel pesce palla. Solo in *cb1b* di *F. rubripes*, tali differenze nucleotidiche determinano differenze aminoacidiche.

1.3.4 Analisi di Northern e Southern blot.

Un'analisi di Northern blot dell'mRNA dell'encefalo e del testicolo di *R. esculenta* è stata eseguita usando una sonda di RNA antisenso di 780 bp.

Un segnale di 2.2 kb è stato osservato nell'encefalo e nel testicolo (Fig.1.5, A).

L'analisi di Southern blot rivela un unico segnale di 3 kb nel DNA genomico di rana, precedentemente digerito con *Eco*R1, risultato che indica che *fcb1* è un gene a singola copia (Fig.1.5, B).

1.3.5 Analisi del "folding" dell'RNA

L'analisi del "folding" dell'RNA evidenzia una differenza tra la struttura secondaria dell'mRNA di encefalo e quella di testicolo (Fig.1.6, A, B, asterischi); numerose differenze, invece, sono mostrate tra la sequenza di mRNA di encefalo/testicolo e la sequenza di mRNA dedotta dal DNA genomico (Fig.1.6, C).

Table 3. mRNA di *cb1 vs.* DNA genomico di *cb1* nei vertebrati: confronto delle differenze tra la sequenza nucleotidica (nt) e la sequenza aminoacidica dedotta (aa).

Specie	Genoma - mRNA (nt)	Genoma - cDNA (aa)
H. sapiens CB1A	-	-
H. sapiens CB1B	nt_{606} (G-A)	-
P. troglodytes	-	-
R. norvegicus	nt_{915} (T-C)	-
M. musculus	-	-
F. catus	-	-
D. rerio	nt_{462} (G-T)	-
	nt_{510} (T-A)	-
	nt_{681} (T-C)	-
	nt_{777} (G-T)	-
	nt_{798} (G-A)	-
F. rubripes CB1A	-	-
F. rubripes CB1B	nt_{728} (C-A)	A_{241}-E_{241}
	nt_{1388}(A-C)	D_{463}-A_{463}

I numeri di accesso in Banca Dati NCBI per le sequenze di mRNA di *cb1* sono le stesse di quelle in tabella 2; le possibili sequenze dell'mRNA *cb1a* e *cb1b* di *Fugu rubripes* sono state dedotte dalle sequenze del gene clonato. I numeri di accesso in Banca Dati NCBI per le sequenze genomiche di *cb1* sono: *Fugu rubripes cb1a*: CAAB01001440.1; *Fugu rubripes cb1b*: CAAB01001484.1; *Danio rerio*: NW_634056.1; *Mus musculus*: NT_109315.2; *Rattus norvegicus*: NW_047711.2; *Felis catus*: NM_001009331.1; *Pan troglodytes: NW_107960.1; Homo sapiens*: NT_086697.1.

1.4 Discussione

In questo lavoro, riportiamo il clonaggio molecolare di *cb1* dall'encefalo e dal testicolo di *R. esculenta*. Sia il gene che la proteina rivelano un alto grado di identità nucleotidica ed aminoacidica, (rispettivamente compreso tra il 62.6% e l'81.9% e tra il 61.9% e l'88.1%), rispetto agli altri vertebrati. Numerosi domini critici per la funzionalità del recettore sono presenti in rana, suggerendo un'attività conservata dal punto di vista evolutivo. Inoltre, l'analisi dell'organizzazione del gene *cb1* mostra una regione codificante non interrotta da sequenze introniche, come riportato per altri vertebrati (Shire *et al*., 1995; Ryberg *et al*., 2005; Abood *et al*., 1997). Infatti, i siti accettori o donatori di splicing presenti nell'uomo e responsabili delle forme di splicing *cb1a* e *cb1b* non sono conservati in rana.

Il confronto tra il DNA genomico ed il cDNA, sia dall'encefalo che dal testicolo di rana, suggerisce l'esistenza di cambiamenti nucleotidici nelle sequenze di cDNA.

Quattro polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel gene *cb1* umano sono responsabili della risposta dello striato a differenti volti (Zhang *et al*., 2004; Chakrabarti *et al*., 2006). Nel presente studio, pensiamo che la possibilità di siti polimorfici in rana possa essere esclusa dal momento che le preparazioni di DNA e di RNA utilizzate sono state ottenute da tessuti, prelevati dagli stessi pool di animali (cinque animali/mese) e che i risultati sono stati sempre confermati. Inoltre, le sequenze ottenute dal DNA genomico di encefalo e di testicolo sono identiche. In aggiunta, per evitare ogni deduzione di sequenza dalla sovrapposizione delle estremità 3', il sequenziamento è stato condotto su entrambi i filamenti su tre cloni separati, lunghi non più di 800 bp. Solo le alterazioni nei codoni 70 e 408 determinano modificazioni a livello aminoacidico. A_{70} ed E_{408} sono localizzati rispettivamente nel primo dominio extracellulare, proprio a livello del dominio conservato di N-glicosilazione e nella coda citoplasmatica, una regione critica per l'accoppiamento con le proteine G_i nel ratto (Mukhopadhyay *et al*., 2002); a tal proposito, un ruolo nella modulazione dell'attività di CB1 non è escluso.

Infine, l'analisi di Southern e Northern blot dimostra che *cb1* è un gene a singola copia e che il medesimo trascritto è presente sia nell'encefalo che nel testicolo.

Per verificare se le differenze riportate tra le sequenze di cDNA e di DNA genomico siano presenti anche in altri vertebrati, abbiamo allineato tutte le sequenze nucleotidiche depositate in Banca dati con le corrispondenti sequenze genomiche; in aggiunta,

abbiamo confrontato le sequenze aminoacidiche dedotte dal DNA genomico con quelle dedotte dall'mRNA. E' interessante notare che simili cambiamenti nucleotidici si verificano anche in altre specie e sono piuttosto diffusi tra i vertebrati. Comunque, come in rana, la maggior parte di tali cambiamenti non influenza la composizione aminoacidica. Solo in *F. rubripes* il gene *cb1b* presenta cambiamenti nucleotidici nei codoni 243 e 463, che modificano la composizione aminoacidica predetta dall'mRNA.

Sia nei mammiferi che negli invertebrati, l'editing dell'RNA è una forma elaborata e precisa di modificazione post-trascrizionale dell'RNA (Wedekind *et al*., 2003) che contribuisce alla variabilità genetica. Nei mammiferi, ci sono due principali classi di enzimi di "editing", capaci di deaminare i nucleotidi codificati: i primi generano I (inosina) da A (adenosina), mentre i secondi generano U (uridina) da C (citidina) (Seeburg *et al*., 2002; Blanc *et al*., 2003). Nel primo caso, la A codificata genomicamente è letta come G nelle sequenze RNA-cDNA. Attualmente, la letteratura concernente l'editing dell'mRNA è limitata a pochi esempi. In particolare, tutti i trascritti conosciuti per aver subito la modifica A-I sia nei mammiferi che negli invertebrati codificano proteine di membrana del tessuto nervoso. Tali proteine funzionano come canali ionici voltaggio o ligando-dipendenti (ad esempio, il recettore della serotonina o quello dell'*N*-metil-D-aspartato glutammato nei mammiferi ed i canali di K^+ negli invertebrati) (Seeburg *et al*., 2003). Se quello che si verifica in rana è un processo di "editing", il codone GAA_{408} nel cDNA corrispondente al codone AAA_{408} nel DNA genomico potrebbe essere considerato un esempio di "editing" del tipo A-I.

Circa il significato dei cambiamenti nucleotidici nel cDNA che non determinano alcuna variazione della composizione aminoacidica predetta dalla sequenza genomica, non abbiamo una spiegazione al momento. Mutazioni sinonime nel recettore D2 della dopamina umana influenzano la stabilità dell'mRNA e la sintesi del recettore (Duan *et al*., 2003). In accordo a ciò, nel presente studio, mutazioni sinonime e non sinonime alterano debolmente il possibile "folding" dell'mRNA, come emerso dal confronto tra l'mRNA dell'encefalo e del testicolo; in contrasto, la struttura secondaria dell'mRNA predetta dalla sequenza genomica è sostanzialmente differente dalla struttura secondaria dell'mRNA di encefalo e di testicolo. In tal senso, riteniamo che i cambiamenti nucleotidici osservati in questo studio potrebbero influenzare il "folding" dell'RNA, così come la sua stabilità ed il suo turnover.

In conclusione, oltre il clonaggio molecolare di *cb1* in *R. esculenta*, questo è il primo studio che dimostra il verificarsi di cambiamenti nucleotidici durante la maturazione dell'mRNA. Inoltre, crediamo che questo fenomeno non sia ristretto alla rana.

La possibilità che questi processi di "editing" possano generare differenti molecole di mRNA di *cb1* (con diversa attività/stabilità), in differenti tessuti, portando a diverse applicazioni farmacologiche, dovrà essere ulteriormente verificata.

```
H.sapiens          1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIRGDMASKLGYFPQRFPLT
H.sapiens_CNR1B    1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLL-----------------------------
H.sapiens_CNR1A    1 ------------------------------------------------------------
P.troglodytes      1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIRGDMASKLGYFPQRFPLT
M.mulatta          1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIRGDMASKLGYFPQRFPLT
F.catus            1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIRGDMASKLGYFPQRFPLT
R.norvegicus       1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIRGDMASKLGYFPQRFPLT
M.musculus         1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDIRGDMASKLGYFPQRFPLT
T.guttata          1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYVGSNDIQYEDMRGDMASKLGYYPQRFPLS
R.esculenta        1 ---------MRSVLDGLADTTFRTITTDLLYMGPNEVQYEDTRSDLS-RLGYYPQRLPLS
X.laevis           1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYLGPNEVQYDDSRGDISSRLVYFPQRLPLS
T.granulosa        1 ---------MRSILDGLADTTFRTITTDLLYMGSNDVQYEDTRGEMASRLGYFPQRLPLS
D.rerio            1 MLFPASRSDVRSVLDGVAETTFRTITSGLQYIGSNDIGYDDHIIDGDFSRSGYPLPRPFA
F.rubipresCNR1B    1 ---------MRLALHRIAGATMAALTTEVQYLGSNDASYEDPQADAALMRSRFNFERPYS
F.rubipresCNR1A    1 ---------MRSVLDGVADTTFRTITSGLQYLGSNDANYDDPLNDAAF-RTGFSLQRPLS
C.intestinalis     1 ------------------------------------------------------------

H.sapiens         52 SFRGSPFQERMTAGDNPQLVPA--DQVNITEFYNRSLSSFRENEENIQCGENFMD-IECF
H.sapiens_CNR1B   22 ---GSPFQERMTAGDNPQLVPA--DQVNITEFYNRSLSSFRENEENIQCGENFMD-IECF
H.sapiens_CNR1A    1 ------MALQIPPSAPSPLTSC---TWAQMTFSTRTS---RENEENIQCGENFMD-IECF
P.troglodytes     52 SFRGSPFQERMTAGDNPQLVPA--DQVNITEFYNRSLSSFRENEENIQCGENFMD-IECF
M.mulatta         52 SFRGSPFQERMTAGDNSQLVPA--DQVNITEFYNRSLSSYRENEENIQCGENFMD-MECF
F.catus           52 SFRGSPFQERMTAGDNSQLVPA--DQVNITEFYNRSLSSYRENEENIQCGENFMD-MECF
R.norvegicus      52 SFRGSPFQERMTAGDNSPLVPAG-DTTNITEFYNRSLSSFRENEENIQCGENFMD-MECF
M.musculus        52 SFRGSPFQERMTAGDNSPLVPAG-DTTNITEFYNRSLSSFRENEDNIQCGENFMD-MECF
T.guttata         52 SFRGDPFQERMTGGDDSLLSIIPSEQVNITEFYNRSLSTFRDNEENIQCGENFMD-MECF
R.esculenta       51 SYQER-------IIDG-QSTLH-LDSFNATEFYNRSITTFRDGDGNIQCGNNFMD-MECF
X.laevis          52 SLRGDPLHERMTIIDDPLLSIP-LDQINATDFYNRSII-FRDTDDNVQCGKNFMD-MECF
T.granulosa       52 SFRRDHSPDRMTIGDDNLLSFYPLDQFNVTEFFNRSVSTFRENDDNLRCGENFMD-MECF
D.rerio           61 AYRRSSFADRVAPDEELIVRGLPFYPTNSSDVFGN--WSHAED-GSLQCGENFMD-MECF
F.rubipresCNR1B   52 ASSS---LHRLIPGNKELIYGG---LSTILPTNASDFPLSNGSGEATQCGEDIVDNMECF
F.rubipresCNR1A   51 AFRSNSFPNRVPADEELIFRGIPFFPTNSTDLFGN--RNTTRDENSIQCGENFMD-MECF
C.intestinalis     1 ---------------------------MTARIPTLSTLSTIMMNGSFTEDSHVLNGTGCR

H.sapiens        109 MVLNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
H.sapiens_CNR1B   76 MVLNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
H.sapiens_CNR1A   48 MVLNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
P.troglodytes    109 MVLNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
M.mulatta        109 MILNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
F.catus          109 MILNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
R.norvegicus     110 MILNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
M.musculus       110 MILNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
T.guttata        111 MILNPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
R.esculenta      101 MILTPSQQLVIAALSITLGTFTVLENMLVLCVIFQSRTLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
X.laevis         109 MILTPSQQLVIAALSIILGTFTVLENMLVLVVIVQSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
T.granulosa      111 MILTASQQLIIAVLSLTLGTFTVLENFLVLCVILQSRTLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
D.rerio          117 MILTPSQQLAIAVLSLTLGTFTVLENLVVLCVILQSRTLRCRPSYHFIGSLAIADLLGSV
F.rubipresCNR1B  106 MILTPAQQLVIVILAITLGTFTVLENFVVLCVILHSHTLRSRPSYHFIGSLAVADLIGSI
F.rubipresCNR1A  108 MILTPSQQLAVAVLSLTLGTFTVLENLVVLCVIFQSRTLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSV
C.intestinalis    34 Q----SEGNAIHVVGTIISLIIIVENALVLMALTMERRRFRLILFVFINSLAASDLLSGI

H.sapiens        169 IFVYSFID--FHVFHRRDSRNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
H.sapiens_CNR1B  136 IFVYSFID--FHVFHRRDSRNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
H.sapiens_CNR1A  108 IFVYSFID--FHVFHRRDSRNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
P.troglodytes    169 IFVYSFID--FHVFHRRDSRNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
M.mulatta        169 IFVYSFVD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
F.catus          169 IFVYSFVD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
R.norvegicus     170 IFVYSFVD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
M.musculus       170 IFVYSFVD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
T.guttata        171 IFVYSFVD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
R.esculenta      161 IFVYSFVD--FHVFHRIDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLSYKR
X.laevis         169 IFVYSFVD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPMSYKR
T.granulosa      171 IFVYSFLD--FHVFHRRDSSNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYKR
D.rerio          177 IFVYSFLD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYVSIHRPLSYRR
F.rubipresCNR1B  166 IFVYSFLD--FHVLHRRDSPSIFLFRLAGVIASFTASVGSLFLTAIDRYVSIHRPMAYKR
F.rubipresCNR1A  168 IFVYSFLD--FHVFHRRDSPNVFLFRLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISIHRPLAYRR
C.intestinalis    90 VFLYTFLFNDLLSLEFTASAPSWVFRRAFLIASLLVSLGSLQLIALDRFVSVAWPLEHER
```

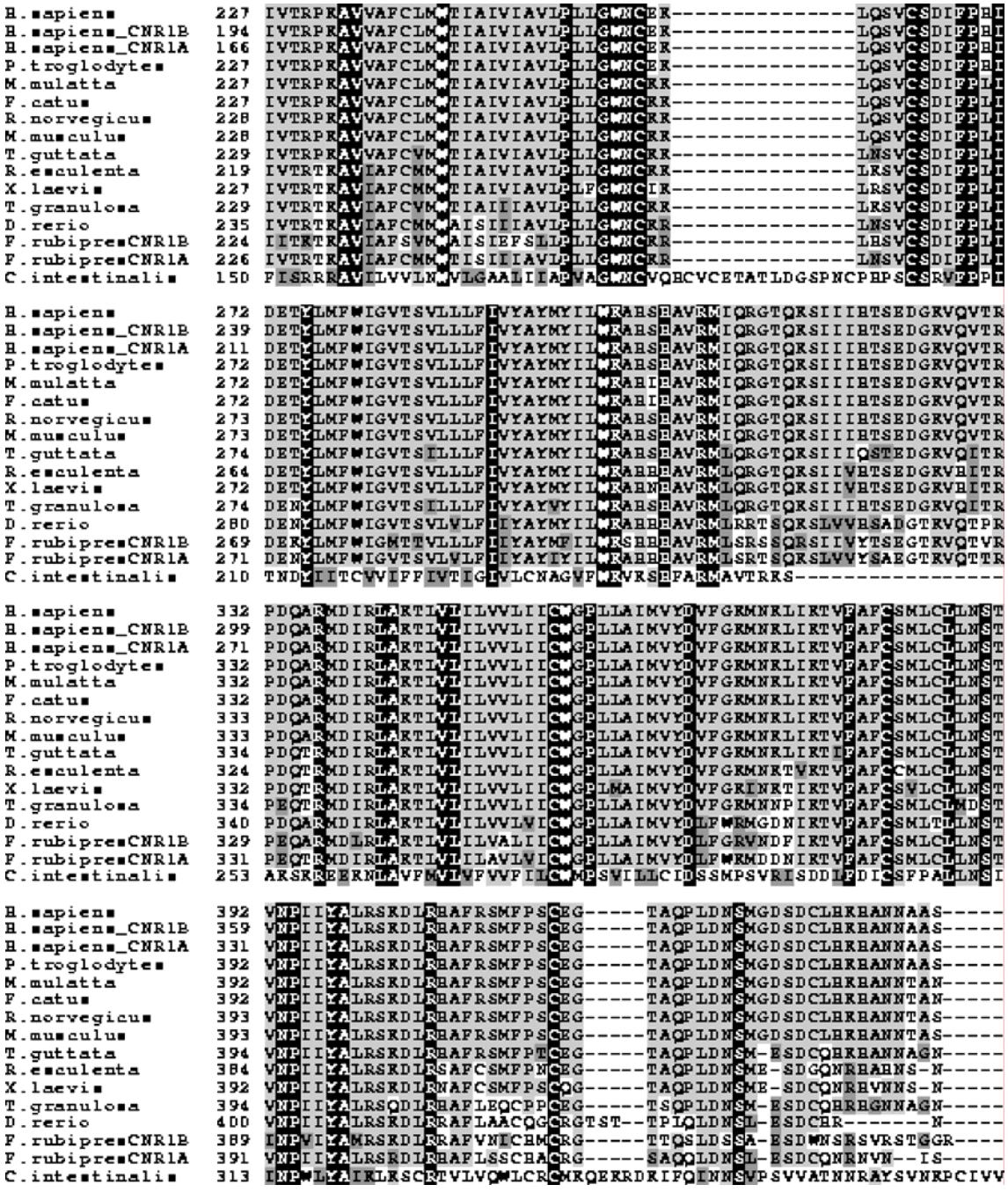


Fig.1.1 Allineamenti delle sequenze aminoacidiche complete di CB1, depositate in Banca dati. I residui aminoacidici completamente conservati sono evidenziati in nero; i residui aminoacidici identici sono in grigio chiaro; i residui aminoacidici simili sono in grigio scuro; i residui aminoacidici differenti sono in bianco. Eventuali somiglianze/differenze sono state evidenziate con il programma di grafica BOX-SHADE.

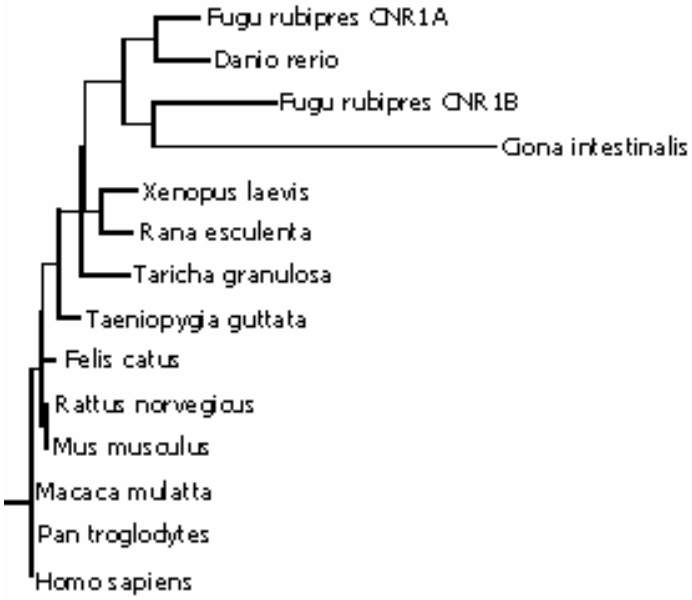


Fig.1.2 Analisi filogenetica del recettore CB1 nei vertebrati. L'albero filogenetico è stato costruito usando il metodo PHYLIP'S DRAWGRAM ed è stato esportato da CLUSTALW. La lunghezza dei rami è proporzionale alla distanza evolutiva stimata tra i vari recettori.

```
  1 MKSVLDGLADTTFRTITTDLLYMGPNEVQYEDTKSDLSKLGY  42
                                  S
 43 YPQKLPLSSYQEKIIDGQSTLHLDSFNATEFYNKSITTFKDG  84
                                   TM1
 85 DGNIQCGNNFMDMECFMILTPSQQLVIAALSITLGTFTVLEN 126
                                  TM2
127 MLVLCVIFQSRTLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFVD 168
                                 TM3
169 FHVFHRIDSPNVFLFKLGGVTASFTASVGSLFLTAIDRYISI 210
                                 TM4
211 HRPLSYKRIVTRTKAVIAFCMMWTIAIVIAVLPLLGWNCKKL 252
                                 TM5
253 KSVCSDIFPLIDETYLMFWIGVTSVLLLFIVYAYMYILWKAH 294
295 HHAVRMLQRGTQKSIIVHTSEDGKVHITRPDQTRMDIRLAKT 336
                TM6
337 LVLILVVLIICWGPLLAIMVYDVFGKMNKTVKTVFAFCCMLC 378
     TM7                    K
379 LLNSTVNPIIYALRSKDLRSAFCSMFPNCEGTAQPLDNSMES 420
                                 TMS
421 DGQNRHAHNSNVHRAAESCIKSTVKIAKVTMSVSTDTSAEAV 462
```

Fig.1.3 Caratterizzazione del recettore CB1 di rana. I domini extracellulari sono nel formato Courier New; i domini transmembrana sono in grassetto; i domini intracellulari sono nel formato italico. * Possibili siti di fosforilazione. I siti di glicosilazione nel dominio extracellulare N-terminale sono sottolineati. ^ Lisina conservata nel terzo dominio transmembrana (TMD3). ^{oo} Coppia di leucina ed alanina nel C-terminale del terzo loop citoplasmatico, implicato nell'interazione con G_s, nel ratto; in grigio chiaro è indicato il motivo TQK nel terzo loop citoplasmatico che nel ratto è necessario per l'attivazione dei canali di Ca^{2+} e K^+; in grigio scuro sono indicati i due residui di serina all'interno della coda intracellulare che nel ratto, previa fosforilazione, sono coinvolti nella desensibilizzazione del recettore; in grigio scuro è indicata la sequenza TVK corrispondente al possibile sito di fosforilazione da parte di protein chinasi C all'interno della regione intracellulare; in nero è indicato il motivo TMS nella coda citoplasmatica che è necessaria nel ratto per l'internalizzazione del recettore mediata da WIN55212-2, nelle cellule AtT20 trasfettate; in bianco sono indicati i possibili siti di editing, mentre i residui aminoacidici differenti - predetti dal cDNA di encefalo e dal DNA genomico, sono in grassetto italico.

DNA genomico

G L8 A Q Y30 E N ***S70*** *T L G186 G K L252 K C* ***K408*** *G*

-//-GTTTTAGAT-//-CAGTATGAA-//-AATTCAACT-//-TTAGGGGGC-//-AAGCTCAAA-//-TGTAAAGGG-//-

cDNA di encefalo

G L8 A Q Y30 E N ***A70*** *T L G186 G K L252 K C* ***E408*** *G*

-//-GTTTTGGAT-//-CAGTACGAA-//-AATGCAACT-//-TTAGGAGGC-//-AAGCTAAAA-//-TGTGAAGGG-//-

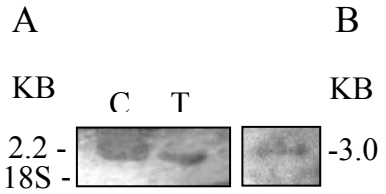
cDNA di testicolo

G L8 A Q Y30 E N ***A70*** *T L G186 G K L252 K C* ***E408*** *G*

-//-GTTTTGGAT-//-CAGTACGAA-//-AATGCAACT-//-TTAGGGGGC-//-AAGCTCAAA-//-TGTGAAGGG-//-

Fig.1.4 Differenze tra le sequenze di *cb1* ottenute dal DNA genomico e dal cDNA isolato dall'encefalo e dal testicolo. Allineamento delle sequenze nucleotidiche di *cb1* dal genoma di encefalo di rana e dal cDNA di encefalo e di testicolo.

Le sequenze aminoacidiche dedotte sono in italico. I codoni con differenze nucleotidiche sono sottolineati; i caratteri in grassetto indicano le differenze nucleotidiche ed aminoacidiche.



C: encefalo

T: testicolo

Fig.1.5 Analisi di Northern e Southern blot. (A) Una banda di 2200 bp è osservata sia nell'encefalo che nel testicolo, mediante esperimenti di Northern blot. (B) Una singola banda di 3000 bp è osservata a livello del DNA genomico - precedentemente digerito con *Eco*RI - indicando che il gene *cb1* sia a singola copia.

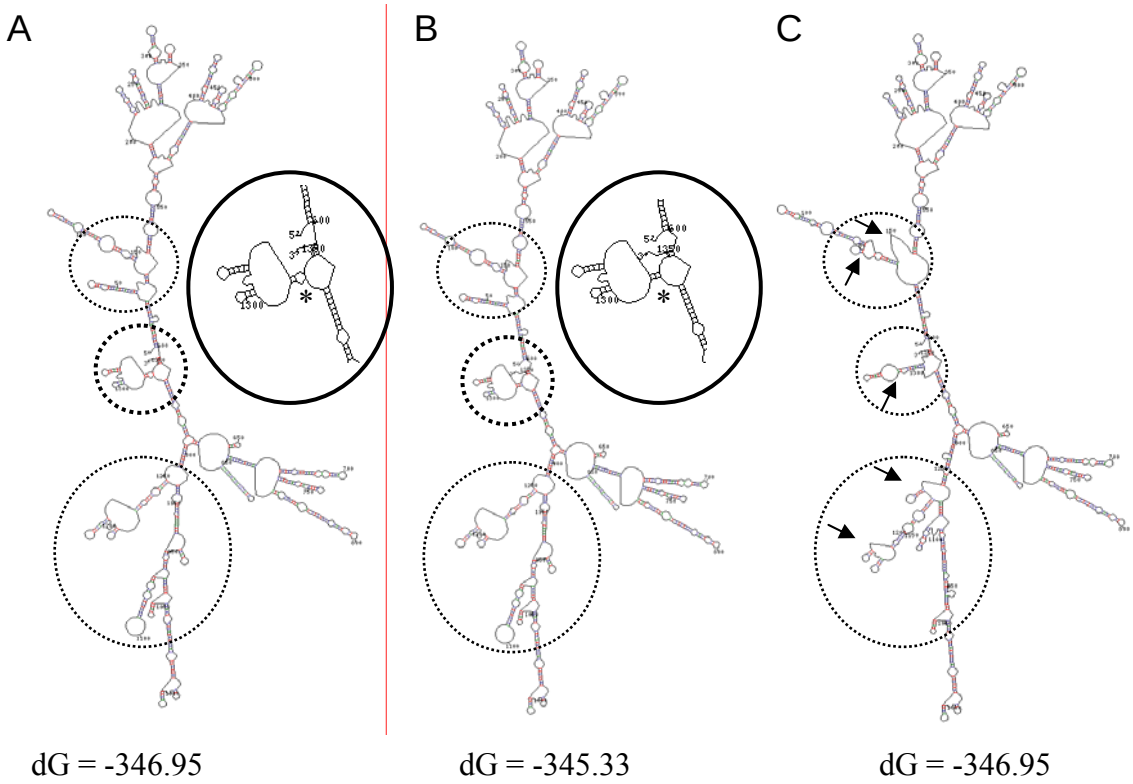


Fig.1.6 Analisi del "folding" dell'mRNA. Struttura secondaria di un frammento di 1354 bp di mRNA di encefalo (A), di mRNA di testicolo (B) e di mRNA dedotto dal DNA genomico (C). I cerchi tratteggiati indicano le regioni con le maggiori differenze tra l'mRNA clonato e la sequenza di mRNA dedotta dal DNA genomico. Gli asterischi indicano la differenza tra l'mRNA di encefalo e quello di testicolo; le frecce indicano le principali differenze nell'mRNA dedotto dal DNA genomico. I cerchi in grassetto rappresentano un ingrandimento di un tratto della struttura secondaria dell'mRNA di encefalo e di testicolo. Le strutture sono state selezionate sulla base della minima energia libera (d*G*).

CAPITOLO 2

ESPRESSIONE DEL RECETTORE DEI CANNABINOIDI DI TIPO I NEI TESSUTI DI *Rana esculenta*: UN POSSIBILE COINVOLGIMENTO NELLA REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' TESTICOLARE.

Meccariello R., Chianese R., Cacciola G., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S. (2006). Type-1 cannabinoid receptor expression in the frog *Rana esculenta* tissues: a possibile involvement in the regulation of testicular activity. *Mol Reprod Dev* **73**: 551-558.

Riassunto

Gli endocannabinoidi ed il recettore CB1 sono ampliamente prodotti e distribuiti nel sistema nervoso centrale, nell'ambito dei mammiferi. In aggiunta, la scoperta degli endocannabinoidi e dei recettori corrispondenti in tessuti periferici non nervosi indica un coinvolgimento del sistema nel controllo di un ampio range di attività fisiologiche, inclusa la riproduzione.

Recentemente, l'esistenza di CB1 è stata osservata anche nei bassi vertebrati e negli urocordati suggerendo che il sistema endocannabinoide sia filogeneticamente conservato.

Usando la metodica di RT-PCR, i profili di espressione dell'mRNA di *cb1* sono stati caratterizzati in un ampio range di tessuti dell'anfibio anuro *Rana esculenta*. Oltre ad una forte espressione nel sistema nervoso centrale, *cb1* è pure presente nel testicolo, nel rene, nel fegato, nell'ovario, nel muscolo, nel cuore, nella milza e nell'ipofisi. Il pattern di espressione di *cb1* è stato caratterizzato sia nel testicolo che nel sistema nervoso centrale, durante il ciclo riproduttivo annuale. Nel testicolo, *cb1* è scarsamente espresso durante la stasi invernale della spermatogenesi ed incrementa durante la stagione degli amori ed il periodo di ripresa. Un profilo di espressione che si oppone a quello osservato nel testicolo è stato osservato in preparazioni di encefalo *in toto*, durante il ciclo riproduttivo; in particolare nel diencefalo, l'area encefalica principalmente coinvolta nel controllo delle funzioni riproduttive. Inoltre, fluttuazioni a livello delle aree encefaliche e dei tratti midollari isolati sono state osservate durante il ciclo riproduttivo annuale.

In conclusione, il recettore CB1 è espresso nel sistema nervoso centrale e nel testicolo di *R. esculenta*. Per quel che concerne la gonade, i nostri risultati suggeriscono il coinvolgimento degli endocannabinoidi nel controllo della funzione riproduttiva.

2.1 **Introduzione**

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici derivati dall'acido arachidonico che legano ed attivano specifici recettori di membrana (CB1 e CB2). I principali composti classificati come "endocannabinoidi" sono l'AEA, il 2-AG, 2-arachidonoil glicerina (noladina) e la *o*-arachidonoiletalamina (virodamina) (Lutz *et al*., 2002). Queste molecole hanno una differente affinità ed attivano in misura diversa i recettori CB1 e CB2. L'effetto di AEA attraverso tali recettori dipende dalla sua concentrazione extracellulare, che è controllata dall'uptake e dalla degradazione, rispettivamente dovuti allo specifico trasportatore di membrana AMT e dall'idrolasi FAAH.

Generalmente, i cannabinoidi endogeni, i recettori, FAAH ed AMT sono designati come "sistema endocannabinoide" (Elphick *et al*., 2001; Fride *et al*., 2002; Lutz *et al*., 2002; Pertwee *et al*., 2002).

Inoltre, oltre che con i classici recettori CB1 e CB2, l'AEA interagisce con canali di calcio e di potassio, con il recettore 5-HT3 ed il recettore vanilloide (TRPV1). Studi *in vitro* ed *in vivo* - questi ultimi condotti usando topi CB1 K.O. - supportano l'esistenza, almeno nel topo, di recettori addizionali, diversi da CB1, CB2 e TRPV1, non ancora identificati (CBx) (Wiley *et al*., 2002).

CB1 è un classico recettore accoppiato alle proteine G con sette domini transmembrana (Matsuda *et al*., 1990). L'uso di cannabinoidi sintetici e naturali (Δ^9-THC: Δ^{9-} tetraidrocannabinolo, il principale costituente psicoattivo della pianta di marijuana, *Cannabis sativa*) è risultato vantaggioso per l'analisi degli aspetti del "signalling" di questo recettore.

In vivo, i cannabinoidi sono responsabili di caratteristici effetti farmacologici nel topo, quali la soppressione dell'attività locomotoria, l'ipotermia, l'antinocicezione e la catalessi (Martin *et al*., 1991). Effetti drammatici a livello centrale e periferico, specialmente sulla riproduzione, nei fumatori di marijuana sono stati ampliamente riportati (Habayeb *et al*., 2002). Le conseguenze cellulari, specialmente legate all'attivazione di CB1, includono l'inibizione dell'adenilato ciclasi e la modulazione dei canali ionici di calcio e potassio e l'attivazione di chinasi attivate da mitogeni (Mukhopadhyay *et al*., 2002).

Il recettore CB1 è ampliamente espresso nel sistema nervoso centrale ed in alcuni tessuti periferici, come l'ipofisi, le cellule immunitarie, i tessuti riproduttivi, i tessuti

gastrointestinali, i gangli simpatici, il cuore, il polmone, la vescica ed il surrene (Galiegue *et al*., 1995; Shire *et al*., 1995).

Varianti di splicing del recettore CB1, *cb1a* e *cb1b*, con differenti effetti farmacologici e livelli di espressione, sono state descritte nell'uomo, ma il loro ruolo funzionale è ancora sconosciuto (Shire *et al*., 1995; Ryberg *et al*., 2005). Il recettore CB2 è espresso quasi esclusivamente nel sistema immunitario, particolarmente nelle cellule B e natural killer; nel ratto, tale recettore è debolmente espresso anche nel testicolo e nel polmone (Brown *et al*., 2002).

Il recettore CB1 è stato clonato in numerosi vertebrati, dai pesci agli anfibi ed ai mammiferi (Elphick *et al*., 2001; Cottone *et al*., 2003, 2005). Pure nell'urocordato *C. intestinalis* sono stati clonati sia CB1 che FAAH e la loro distribuzione tissutale è stata analizzata (Elphick *et al*., 2003; Matias *et al*., 2005).

Al presente, siti di "binding" ad alta affinità per i cannabinoidi sono stati scoperti in numerosi invertebrati deuterostomi e protostomi, ma a parte *C. intestinalis*, nessun recettore dei cannabinoidi funzionale è stato trovato negli invertebrati (Salzet *et al*., 2002; McPartland *et al*., 2003). Ad ogni modo, i risultati discussi sopra indicano che il sistema endocannabinoide è altamente conservato.

In questo lavoro, abbiamo analizzato l'espressione di *cb1* nei tessuti di *R. esculenta*, provvedendo l'evidenza per un'espressione differenziale nell'encefalo e nelle gonadi, durante il ciclo sessuale annuale. Una possibile relazione tra la funzione dei cannabinoidi e quella testicolare, sia a livello centrale che periferico è stata ipotizzata.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Raccolta di animali e di tessuti.

Quaranta maschi di *R. esculenta* sono stati catturati mensilmente da settembre a luglio, nelle vicinanze di Napoli; quattro femmine sono state catturate a giugno. Gli animali sono stati anestetizzati con MS222 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Encefalo, midollo spinale, nervi del plesso lombare, testicoli, rene, muscolo, fegato, milza, cuore ed ovario sono stati prelevati ed opportunamente conservati a -80°C, fino al loro uso per un'estrazione di RNA. Durante il secondo anno di campionamento, quattro encefali e quattro midolli spinali, prelevati da animali dei mesi di giugno, luglio, settembre, ottobre, dicembre, marzo ed aprile sono stati, rispettivamente, sezionati in telencefalo, diencefalo, mesencefalo, romboencefalo e tratto cervicale, toracico, lombare.

Questa ricerca è stata approvata dal Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica.

2.2.2 Estrazione dell'RNA totale.

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti di *R. esculenta* usando il reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). In breve, il campione è stato omogeneizzato nel reagente (1 ml di Trizol/50-100 mg di tessuto); dopo l'omogenizzazione, il campione è stato incubato per 5 min a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine. In seguito, sono stati aggiunti 0.2 ml di cloroformio/ml di Trizol ed il campione è stato centrifugato a 12.000*g* per 15 min a 4°C. La fase acquosa così ottenuta è stata trasferita in un nuovo tubo e l'RNA totale è stato precipitato con alcool isopropilico (0.5 ml/ml Trizol). Dopo centrifugazione a 12.000*g* per 10 min a 4°C, il pellet di RNA è stato lavato con etanolo 75%, centrifugato a 7500*g* per 5 min a 4°C e, poi, risospeso in un opportuno volume di acqua trattata con DEPC. La purezza e l'integrità dell'RNA totale sono state determinate mediante analisi allo spettrofotometro a 260/280 nm ed elettroforesi.

2.2.3 Analisi dell'espressione di *cb1* mediante RT-PCR.

L'RNA totale, precedentemente trattato per 30 min a 37°C con *Dnasi*I (10U/campione) (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germania) per eliminare eventuali contaminanti di DNA genomico, è stato retrotrascritto per preparare i cDNA. Per la preparazione dei pool di testicolo, di encefalo e di midollo spinale, 2 µg RNA/mese

sono stati uniti e processati come singolo campione. La reazione di trascrizione inversa è stata eseguita usando 5 µg di RNA totale, 0.5 µg di oligo $d(T)_{18}$, 10 mM dNTP, 0.01 M DTT, 1X buffer, 40 U RNasi out, 200 U Trascrittasi Inversa SuperScript-III Rnasi H^- (Invitrogen Life Techonologies, UK) in un volume finale di 20 µl, come da protocollo. Come controllo negativo, è stato usato l'RNA totale non trattato con Trascrittasi Inversa.

La reazione di PCR è stata eseguita usando 1 µl di cDNA diluito 1:5 e 10 pMol di primers specifici per l'mRNA di *cb1* di rana (primer senso: 5'-attggggtaaccagtgttct-3'; primer antisenso: 5'-accagggtctttgctaacct-3'; taglia dell'amplificato atteso: 201 bp) in una mix di reazione [0.2 mM dNTP, 1X buffer PCR, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 U Taq Polimerasi (Invitrogen Life Technologies)], usando un Termociclatore Applied Biosystem. Le condizioni di PCR seguite sono state: 94°C per 5 min, 1 ciclo; 94°C per 30 sec, 56°C per 30 sec, 72°C per 30 sec, 30 cicli per l'encefalo, 35 cicli per i campioni di testicolo e di tessuti; infine, 72°C per 7 min, 1 ciclo. Al fine di normalizzare i risultati ottenuti, è stata valutata l'espressione dell'mRNA codificante la proteina ribosomale P1 di *R. esculenta* (*fp1*), usando 1 µl di cDNA diluito e 10 pMol di primers specifici (primer senso: 5'-tacgagcgtccatcacacac-3'; primer antisenso: 5'- agaccaaagcccatgtcatc-3'; taglia dell'amplificato atteso: 356 bp) con la mix di reazione precedentemente descritta. Le condizioni di PCR sono state le seguenti: 94°C per 5 min, 1 ciclo; 94°C per 30 sec, 56°C per 30 sec, 72°C per 30 sec, 22 cicli; infine, 72°C per 7 min, 1 ciclo. Eventuali contaminanti sono state valutate usando come controlli negativi campioni preparati senza cDNA.

Infine, 25 µl di prodotto di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su un gel di agarosio all'1.2% nel buffer Tris-borato (TBE) 1X contenenti con 0.5 µg/ml di bromuro d'etidio.

2.2.4 Analisi statistica.

L'analisi dei livelli di mRNA è stata condotta mediante il GELDOC, 1.00-UV Fluorescent Gel Documentation System (BioRAD, Hercules, CA). Le quantità relative dei segnali sono espresse come incremento rispetto al valore minimo (fold increase) del rapporto *cb1* mRNA/*fp1* mRNA ± *s.e.m.* Il test ANOVA seguito dal test di Duncan - per il confronto tra più gruppi - è stato condotto per valutare la significatività delle differenze. Intervallo delle osservazioni: 3-8.

2.3 Risultati

2.3.1 Distribuzione tissutale del recettore *cb1*.

Dato il recente clonaggio del cDNA di *cb1* dall'encefalo di *R. esculenta* (numero di accesso in NCBI Banca dati AM113546), abbiamo deciso di valutare l'espressione e la distribuzione del recettore in vari tessuti di rana, mediante RT-PCR semiquantitativa. Specifici primers sono stati disegnati sulla sequenza di *cb1* dell'encefalo di rana ed un amplificato della taglia di 201 bp è stato analizzato mediante elettroforesi. L'espressione del gene *fp1* costitutivamente espresso, codificante la proteina ribosomale di rana P1 è stata valutata come un amplificato di 356 bp ed è stata usata per normalizzare i segnali di *cb1*.

Cb1 è risultato espresso in tutti i tessuti testati (Fig.2.1), sebbene a basso livello nel cuore, nell'ipofisi e nella milza (Fig.2.1, B). Una quantità significativa di trascritto è osservabile nel rene, nel fegato e nel muscolo. I più alti livelli di espressione sono ritrovati nelle gonadi ($P<0.01$), sia nel testicolo che nell'ovario. Nel sistema nervoso centrale, *cb1* si esprime maggiormente nell'encefalo *in toto*. L'espressione del recettore nel midollo spinale è significativamente più bassa di quella osservata nell'encefalo ($P<0.01$), ma paragonabile a quella nel rene, nel fegato e nel muscolo.

2.3.2 Espressione di *cb1* nel testicolo durante il ciclo riproduttivo annuale.

Il ciclo sessuale annuale di *R. esculenta* può essere diviso in quattro fasi: ripresa (settembre-novembre), quando la spermatogenesi procede e gli eventi di spermiogenesi sono predominanti; stasi invernale (dicembre-febbraio), quando la proliferazione degli spermatogoni viene interrotta, così che il testicolo progressivamente si svuoti; stagione degli amori (marzo-maggio), quando la spermatogenesi riprende, gli spermatogoni proliferano e gli spermatozoi vengono rilasciati; infine, periodo post-riproduttivo (giugno-luglio), quando la spermatogenesi procede con la comparsa degli stadi meiotici (Rastogi *et al*., 1976; Pierantoni *et al*., 2002).

Durante il ciclo appena descritto, sono state osservate fluttuazioni di *cb1* nel testicolo maturo, da settembre a luglio (Fig.2.2). L'espressione di *cb1* è alta a settembre e raggiunge un picco a novembre (settembre *vs* novembre, $P<0.01$); in seguito, decresce raggiungendo valori minimi durante la stasi invernale (dicembre, gennaio e febbraio *vs* novembre e settembre, $P<0.01$). Appena l'attività testicolare riprende, durante la stagione degli amori, l'espressione di *cb1* rapidamente incrementa (marzo-aprile *vs*

dicembre, gennaio e febbraio, $P<0.01$); dopodiché, essa si riduce a maggio (marzo-aprile *vs* maggio, $P<0.01$) e rimane ancora bassa nel periodo post-riproduttivo (maggio *vs* giugno N.S.; giugno *vs* luglio, $P<0.05$).

2.3.3.Espressione di *cb1* nel sistema nervoso centrale durante il ciclo riproduttivo annuale.

Per valutare l'espressione di *cb1* nell'encefalo, abbiamo raccolto campioni durante il ciclo riproduttivo annuale, da settembre a luglio e li abbiamo processati come encefali *in toto* (Fig.2.3).

L'espressione di *cb1* è a livelli comparabili a settembre ed ottobre, raggiunge un valore minimo a novembre ($P<0.01$), gradualmente incrementa da dicembre a gennaio (dicembre *vs* gennaio, $P<0.05$) e resta alta a marzo ed aprile. Dopodichè, l'espressione del recettore gradualmente si riduce a maggio e giugno ($P<0.01$), per poi raggiungere un nuovo picco a luglio ($P<0.01$ luglio *vs* novembre, dicembre, maggio, giugno).

Per approfondire le nostre conoscenze circa l'espressione di *cb1* nel sistema nervoso centrale di rana, abbiamo raccolto e processato mensilmente le singole aree encefaliche ed i tratti midollari isolati (Fig.2.4). Globalmente, l'espressione di *cb1* è più alta nel prosencefalo e nel mesencefalo rispetto all'encefalo posteriore ($P<0.01$), in tutti i periodi considerati, eccetto che a settembre ed ottobre. Infatti, a settembre, i livelli di espressione del recettore sono paragonabili tra diencefalo e romboencefalo e sono significativamente più bassi di quelli nel telencefalo e nel mesencefalo ($P<0.01$). Ad ottobre, l'espressione di *cb1* è significativamente più alta nella sola area mesencefalica ($P<0.01$) (Fig.2.5). A giugno, alti livelli di espressione sono stati trovati nel mesencefalo ($P<0.01$), mentre a luglio essi incrementano gradualmente dal telencefalo al diencefalo ($P<0.05$). A settembre, un picco di espressione è osservato nel telencefalo e nel mesencefalo ($P<0.01$ *vs* diencefalo); a dicembre, invece, l'espressione del recettore raggiunge il valore maggiore nel diencefalo ($P<0.01$). A marzo, un picco di espressione è presente nel telencefalo e nel mesencefalo ($P<0.01$ *vs* diencefalo) e ad aprile, al contrario, la più alta espressione è registrata nel mesencefalo ($P<0.05$ *vs* telencefalo e diencefalo).

Anche nelle singole aree encefaliche, l'espressione di *cb1* fluttua durante il ciclo riproduttivo annuale ed uno specifico profilo per ciascuna area è stato osservato (Fig.2.5).

Nel telencefalo, dove risiede il sistema olfattorio, i livelli di *cb1* sono minimi a giugno, aumentano progressivamente fino a settembre, riducendosi ancora ad ottobre. Durante la stasi invernale, l'espressione del recettore incrementa raggiungendo livelli massimi a marzo.

Nel diencefalo, l'area encefalica principalmente coinvolta nella regolazione delle funzioni riproduttive, l'espressione di *cb1* raggiunge un picco a dicembre ed è mantenuta ad alti livelli durante tutta la stagione degli amori ($P<0.01$). Bassi livelli di *cb1* sono stati trovati durante il periodo post-riproduttivo, con valori minimi osservati a giugno e ad ottobre (giugno ed ottobre *vs* luglio e settembre $P<0.01$; luglio *vs* settembre $P<0.01$).

Nel mesencefalo, l'espressione di *cb1* incrementa da giugno a settembre ($P<0.01$), raggiungendo un valore minimo ad ottobre, poi aumenta a marzo ($P<0.01$) e rimane ancora alta ad aprile ($P<0.01$).

Nel romboencefalo, l'espressione del recettore è minima a giugno, aumenta gradualmente a settembre (giugno *vs* luglio $P<0.05$, giugno e luglio *vs* settembre $P<0.01$) e si riduce ad ottobre, raggiungendo un picco a dicembre ed aprile.

Nel tratto cervicale del midollo spinale, livelli minimi di espressione sono riportati a giugno ($P<0.01$); *cb1* aumenta poi ad aprile, mese in cui raggiunge la massima espressione ($P<0.05$).

Nel tratto toracico del midollo spinale, l'espressione di *cb1* è costante da giugno a dicembre e raggiunge un picco a marzo ($P<0.01$).

Nel tratto lombare del midollo spinale, bassi livelli di espressione sono osservati a giugno ed aprile ($P<0.01$); dopodichè, l'mRNA mostra un picco a luglio ($P<0.01$) e raggiunge un valore minimo a settembre ($P<0.01$).

Infine, una debolissima espressione del recettore è mostrata nei nervi spinali durante tutto l'anno, tranne ad aprile.

2.4 Discussione

Nel presente lavoro, abbiamo mostrato l'espressione del recettore CB1 nell'anfibio anuro, *R. esculenta*. Al di là del sistema nervoso centrale, in cui era attesa una forte espressione di *cb1*, l'approccio di RT-PCR ha consentito l'individuazione di una modesta espressione del recettore anche in un ampio range di tessuti periferici, mimando, così, il pattern di espressione già descritto nei mammiferi (Galiegue *et al*., 1995; Shire *et al*., 1995). In particolare, nelle gonadi (ovario e testicolo), l'espressione di *cb1* è significativamente più alta rispetto a quella negli altri tessuti (eccetto l'encefalo). Pure in *C. intestinalis*, *cb1* è differenzialmente espresso nei tessuti; in particolare, i più alti livelli di mRNA sono osservati nei gangli cerebrali, nel cuore, nella faringe e nel testicolo, mentre i più bassi livelli sono osservati nell'intestino, nell'ovario e nello stomaco (Matias *et al*., 2005). Nel topo, la NAPE-PLD, l'enzima responsabile per il rilascio, su richiesta, di AEA dai precursori di membrana, è altamente espresso nell'encefalo e pure nel rene e nel testicolo; i più bassi livelli di espressione sono riportati in altri tessuti periferici quali fegato, milza, polmone ed intestino (Okamoto *et al*., 2004).

Nei mammiferi, il ruolo del sistema endocannabinoide nell'impianto dell'embrione è ben documentato (Paria *et al*., 1996; Yang *et al*., 1996; Schmid *et al*., 1997). Inoltre, alterazioni dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade nei fumatori di marijuana ed in modelli animali sono state riportate (Wenger *et al*., 2001; Habayeb *et al*., 2002). Poche informazioni sono invece disponibili sugli effetti degli endocannabinoidi sulla funzione testicolare. In tal senso, il nostro modello sperimentale offre il vantaggio di una lenta progressione degli stadi della spermatogenesi con gruppi di cellule germinali allo stesso stadio maturativo che si sviluppano all'interno di "cisti germinali (Rastogi *et al*., 1976; Pierantoni *et al*., 2002). L'analisi dell'espressione di *cb1* nel testicolo rivela un alto livello di espressione nei periodi di settembre-novembre e marzo-aprile. Nel primo periodo, si verifica la massiva formazione di stadi post-meiotici; nel secondo corrispondente alla stagione degli amori, gli spermatozoi sono rilasciati e riprende l'attività spermatogenica. Studi di Western blot e di immunocitochimica condotti sugli stessi animali sperimentali rivelano che a settembre pure la proteina CB1 è altamente prodotta; il recettore è localizzato negli spermatidi allungati e negli spermatozoi (Cobellis *et al*., 2005). Gli effetti dell'AEA sulla motilità degli spermatozoi e sulla capacità fecondante sono riportati sia nell'uomo che nel riccio di mare (Schuel *et al*.,

1994, 2002); in aggiunta, nell'uomo, CB1 è espresso negli SPZ (Rossato *et al*., 2005). Il profilo di mRNA di *cb1* riportato in questo lavoro correla bene con i livelli plasmatici di testosterone osservati durante il ciclo sessuale annuale (d'Istria *et al*., 1974; Cobellis *et al*., 1997). A tal proposito, un ulteriore esame sarà condotto per valutare la dipendenza dell'espressione del recettore da steroidi.

Fluttuazioni di mRNA di *cb1* nell'ambito del sistema nervoso centrale, durante il ciclo riproduttivo annuale nell'encefalo *in toto*, nelle aree encefaliche e nei tratti midollari isolati sono state descritte in questo lavoro. Generalmente, i principali siti di espressione nell'encefalo sono il prosencefalo ed il mesencefalo. Simili patterns di espressione sono osservati nei vertebrati, dai pesci (Cottone *et al*., 2005) ai mammiferi (Matsuda *et al*., 1993; Tsou *et al*., 1998) all'anfibio anuro *X. laevis* (Cottone *et al*., 2003; Cesa *et al*., 2001). Gli endocannabinoidi controllano il processo di "feeding" negli invertebrati. L'AEA accelera la chiusura della bocca nel celenterato *Hydra vulgaris*, un celenterato (De Petrocellis *et al*., 1999); dopo stimolazione meccanica, l'agonista del recettore dei cannabinoidi, HU-210, inibisce la riapertura del sifone boccale nel deuterostomo *C. intestinalis* (Matias *et al*., 2005). Nei mammiferi, il sistema cannabinoide modula numerose attività nel sistema nervoso centrale, quale la funzionalità del sistema olfattorio, la memoria, il controllo del movimento, l'acquisizione di cibo, l'analgesia (Elphick *et al*., 2000) ed alcune di queste funzioni sono conservate tra i vertebrati. In *P. pulcher*, *X. laevis* e nel ratto, una potenziale azione degli endocannabinoidi a livelli differenti sul sistema olfattorio è stata ipotizzata (Tsou *et al*., 1998; Cesa *et al*., 2001; Cottone *et al*., 2003). Nel tritone *T. granulosa*, un anfibio urodelo, un'alta espressione di *cb1* è stata riportata nell'encefalo e gli effetti dei cannabinoidi sull'attività locomotoria spontanea e sul comportamento riproduttivo sono stati descritti (Soderstrom *et al*., 2000). In maniera simile, sia in *X. laevis* che nei roditori, l'espressione e la distribuzione di *cb1* nel midollo spinale sono correlate alla nocicezione (Salio *et al*., 2002). Non è quindi escluso che un simile coinvolgimento del sistema cannabinergico possa essere esteso anche alla rana.

Il profilo di espressione di *cb1* nel testicolo è chiaramente opposto a quello nell'encefalo *in toto*. Focalizzando l'attenzione sul controllo dell'attività riproduttiva, è stata evidenziata una regolazione negativa della secrezione del fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dei cannabinoidi nel ratto ed in neuroni immortalizzati GnRH secernenti (Fernandez-Ruiz *et al*., 1997; de Miguel *et al*., 1998; Gammon *et al*., 2005). Nel diencefalo di *R. esculenta*, l'area encefalica principalmente coinvolta nel

rilascio del GnRH, l'espressione di *cb1* raggiunge un picco a dicembre. Bassi livelli di forme molecolari di GnRH nell'encefalo di maschi di rana sono stati riportati da dicembre ad aprile (Fasano *et al*., 1993; Di Matteo *et al*., 1996; Meccariello *et al*., 2004), in corrispondenza dell'incremento del rilascio di gonadotropine (Polzonetti-Magni *et al*., 1998) e della produzione di androgeni testicolari (Fasano *et al*., 1993). Nel testicolo, livelli minimi di espressione di *cb1* sono riportati a dicembre, durante la stasi invernale. In *X. laevis*, l'immunoreattività per CB1 a livello dei terminali nervosi è stata osservata nell'eminenza mediana e nell'ipofisi, CB1 colocalizza con le cellule che rilasciano LH (Cesa *et al*., 2002); in base a ciò si potrebbe ipotizzare un coinvolgimento del sistema cannabinergico degli anfibi nel controllo neuroendocrino dell'asse ipotalamo-ipofisi.

In conclusione, è stata analizzata l'espressione di *cb1* in *R. esculenta*, confermando che il sistema cannabinergico sia filogeneticamente conservato. In aggiunta, le fluttuazioni dell'mRNA di *cb1* sia a livello centrale che testicolare descritte in questo lavoro indicano fortemente un possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione dell'attività gonadica.

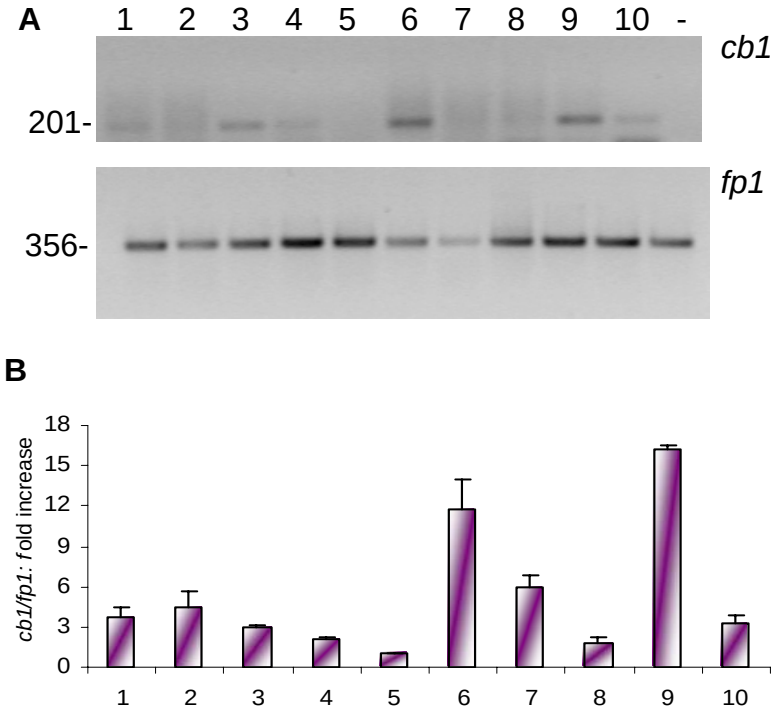


Fig.2.1 A: espressione di *cb1* ed *fp1* nei tessuti di rana. 1, rene; 2, fegato; 3, muscolo; 4, cuore; 5, milza; 6, ovario; 7, testicolo; 8, ipofisi; 9, encefalo; 10, midollo spinale; -, controllo negativo. B: normalizzazione dei segnali osservati mediante RT-PCR. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo (fold increase) ± *s.e.m.* Intervallo delle osservazioni: 3 - 8.

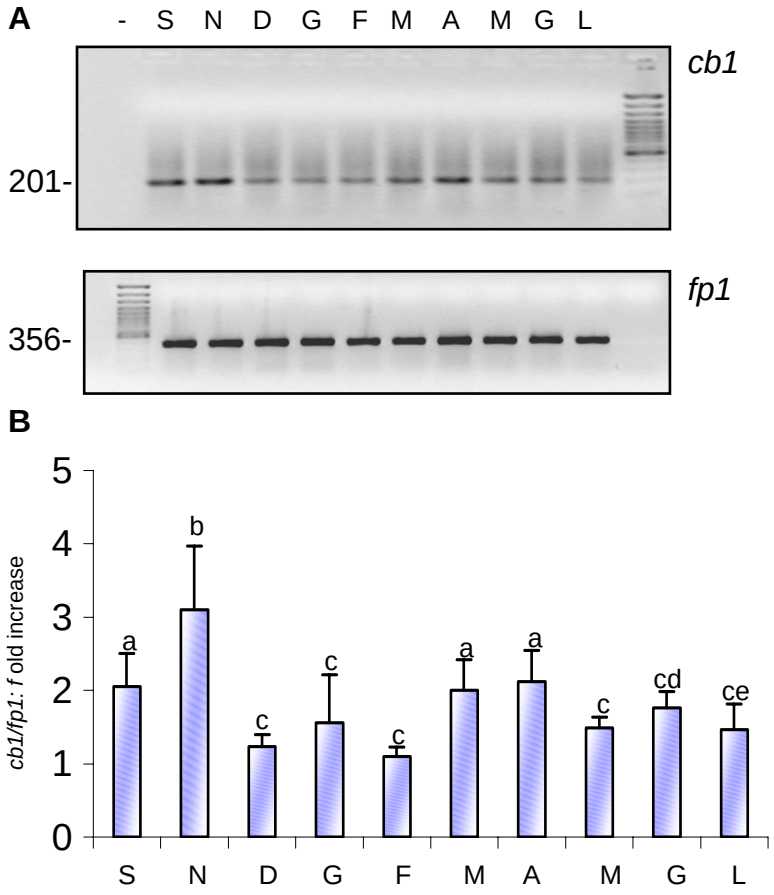


Fig.2.2 A: espressione di *cb1* e *fp1* nel testicolo di rana, durante il ciclo riproduttivo annuale. -, controllo negativo. B: normalizzazione dei segnali osservati per RT-PCR. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo (fold increase) ± *s.e.m.* Intervallo delle osservazioni: 3 - 8. (a *vs* b, a *vs* c, b *vs* c, $P<0.01$; c = d, d *vs* e $P<0.05$).

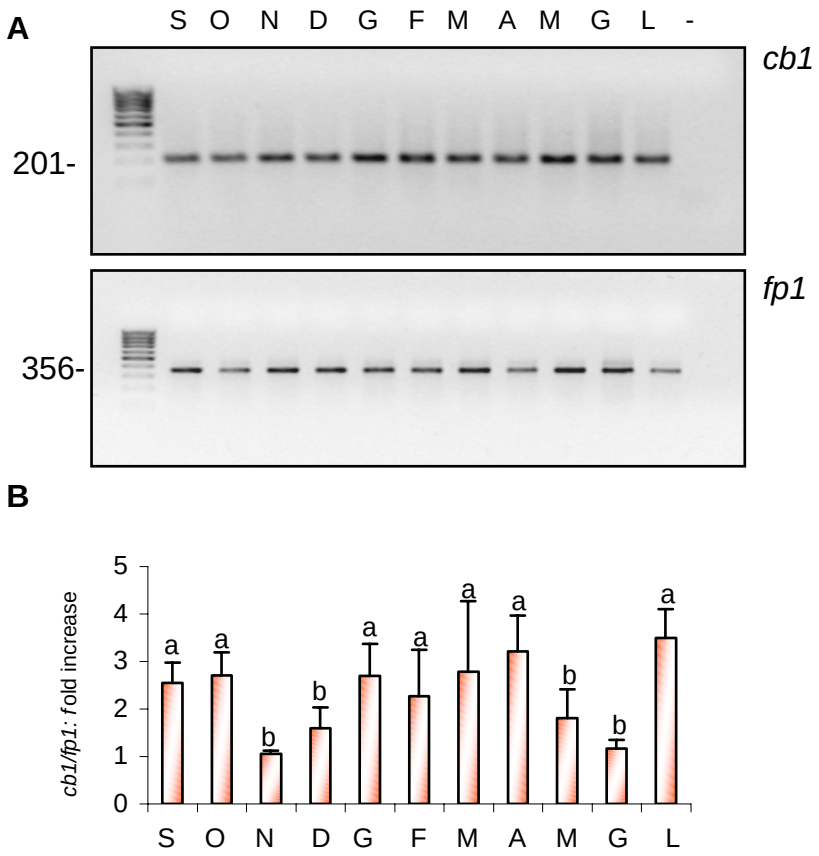


Fig.2.3 A: espressione di *cb1* e *fp1* nell'encefalo *in toto* di rana, durante il ciclo riproduttivo annuale. -, controllo negativo. B: normalizzazione dei segnali osservati mediante RT-PCR. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo (fold increase) ± *s.e.m.* Intervallo delle osservazioni: 3 - 8. (a *vs* b $P<0.05$)

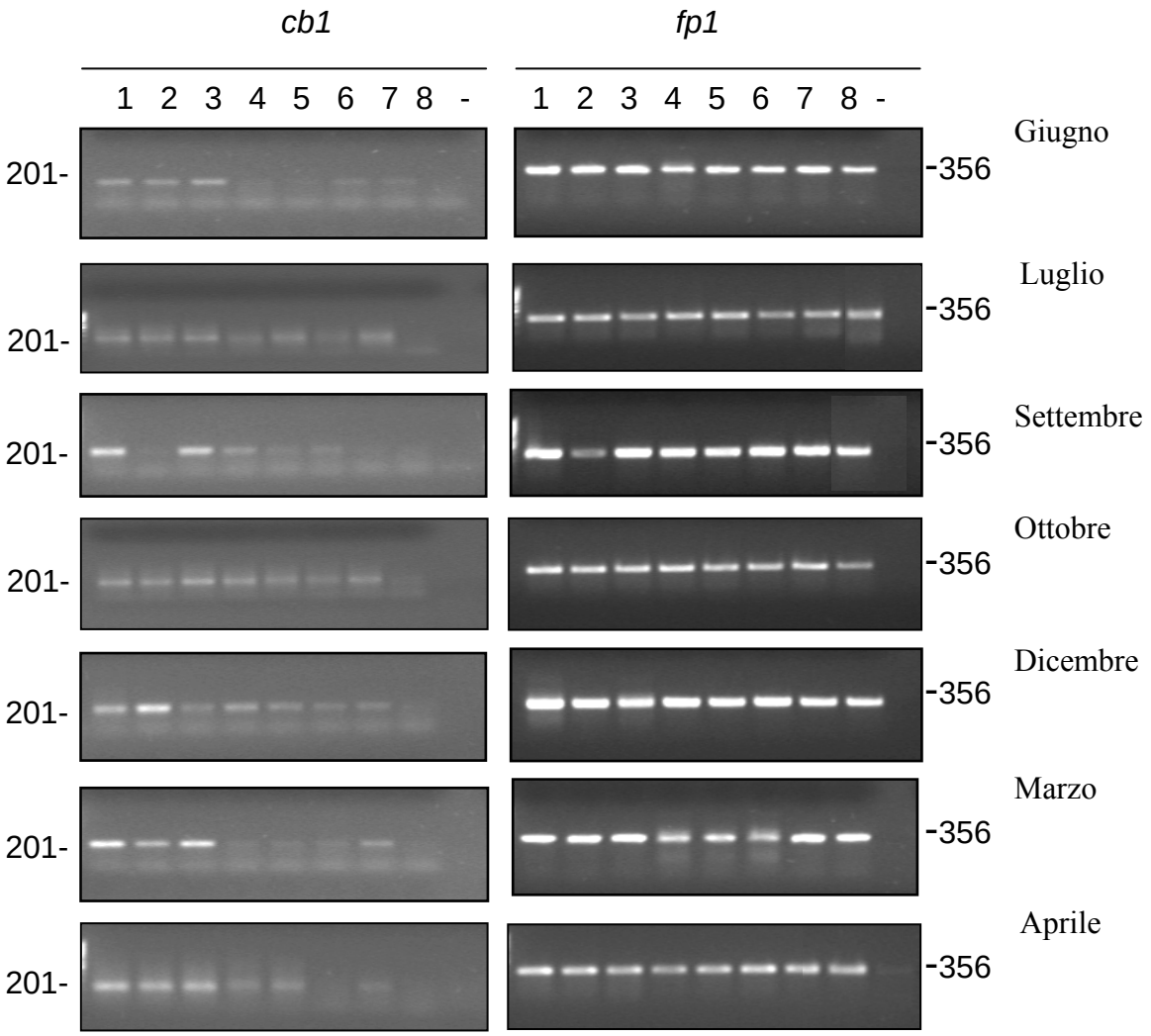


Fig.2.4 Espressione di *cb1* e *fp1* nelle aree encefaliche isolate di rana durante i mesi di giugno, luglio, settembre, ottobre, dicembre, marzo ed aprile. 1, telencefalo; 2, diencefalo; 3, mesencefalo; 4, romboencefalo; 5, tratto cervicale del midollo spinale; 6, tratto toracico del midollo spinale; 7, tratto lombare del midollo spinale; 8, nervi del plesso lombare; -, controllo negativo.

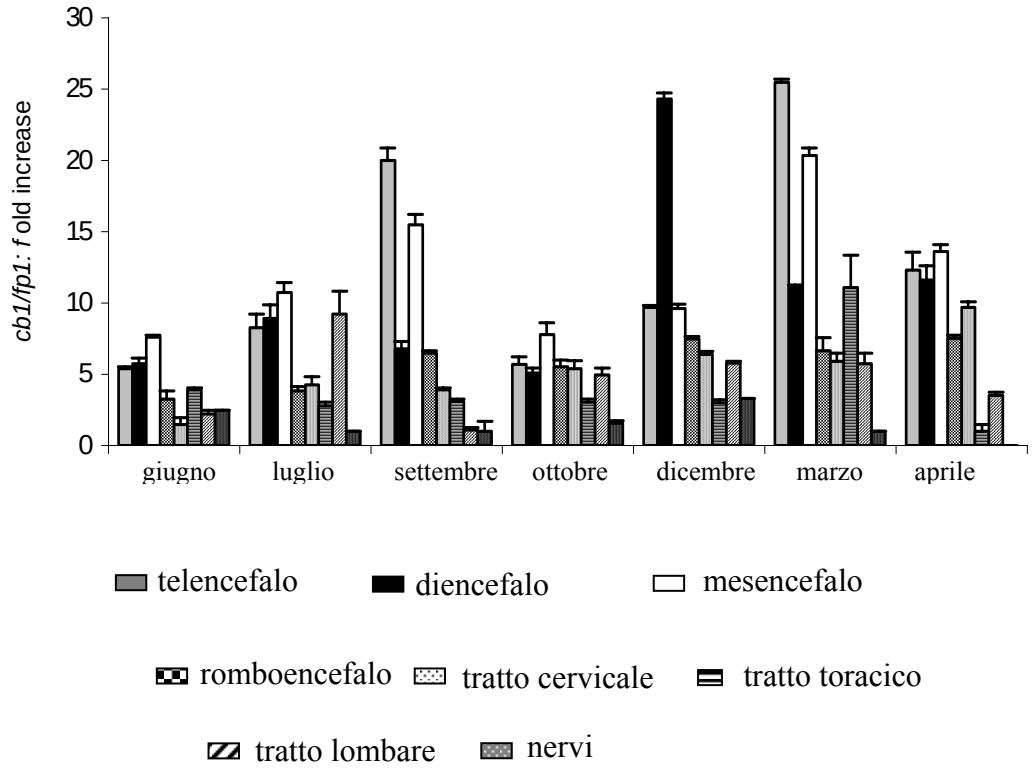


Fig.2.5 Normalizzazione dei segnali osservati per RT-PCR nelle aree encefaliche sezionate, nei tratti isolati del midollo spinale e nei nervi. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo (fold increase) ± *s.e.m.* Intervallo delle osservazioni: 3 - 8.

CAPITOLO 3

RELAZIONE TRA IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE ED IL GnRH1 NEL PROSENCEFALO DELL'ANFIBIO ANURO *Rana esculenta*.

Meccariello R., Franzoni MF., Chianese R., Cottone E., Scarpa D., Donna D., Cobellis G., Guastalla A., Pierantoni R., Fasano S. Interplay between the endocannabinoid system and GnRH-1 in the forebrain of the anuran amphibian *Rana esculenta*. Submitted to *Endocrinology*.

Riassunto

La relazione morfofunzionale tra il sistema endocannabinoide e l'attività del fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH) nella regolazione della riproduzione è stata scarsamente analizzata nei vertebrati.

Date le caratteristiche anatomiche dell'encefalo dei bassi vertebrati, in questo lavoro, abbiamo scelto l'anfibio anuro *R. esculenta* come un valido modello per approfondire alcuni aspetti del controllo centrale della riproduzione.

Usando la metodica di doppia immunofluorescenza, supportata dalla microscopia confocale, abbiamo dimostrato che una sottopopolazione di neuroni ipotalamici GnRH secernenti possiede anche il recettore CB1. Servendoci, inoltre, della metodica di RT-PCR semiquantitativa, abbiamo dimostrato che durante il ciclo riproduttivo annuale le fluttuazioni dell'espressione del *GnRHI* (formalmente conosciuto come "mammalian" GnRH) sono chiaramente opposte a quelle di *cb1*, nell'encefalo *in toto*, così come nel telencefalo e nel diencefalo, le aree encefaliche principalmente coinvolte nel rilascio del GnRH e nel controllo della riproduzione.

Inoltre, abbiamo dimostrato che l'endocannabinoide AEA inibisce la sintesi del *GnRHI* mentre la buserellina (un agonista del GnRH), a sua volta, inibisce la sintesi del *GnRHI* ed induce un incremento della trascrizione di *cb1*.

Le nostre osservazioni sottolineano l'esistenza di una base anatomica morfofunzionale per spiegare una relazione reciproca tra il sistema endocannabinoide e l'attività neuronale del GnRH.

3.1 Introduzione

Gli effetti multipli prodotti nell'uomo e, più generalmente nei mammiferi, dai componenti bioattivi della *Cannabis sativa* sono mediati da recettori per i cannabinoidi accoppiati a proteine G (CB), denominati CB1 nel sistema nervoso centrale dei mammiferi (Devane *et al*., 1998; Matsuda *et al*., 1990) e CB2, nei tessuti periferici (Munro *et al*., 1993). La presenza di questo sistema di "signalling" è stato poi riportato in differenti vertebrati non mammiferi (Howlett *et al*., 1990; Van der Kloot W, 1994; Yamaguchi *et al*., 1996; Soderstrom *et al*., 2000; Soderstrom *et al*., 2000b; Cesa *et al*., 2001) attirando l'attenzione dei neurobiologi verso la filogenesi del sistema cannabinergico. Un numero di studi evolutivi sugli allineamenti di sequenza di *cb1* condotti sia in vertebrati che in invertebrati (Soderstrom *et al*., 2000; Elphick *et al*., 2001; Cottone *et al*., 2003; Elphick *et al*., 2005) ha, quindi, confermato che il recettore CB1 è presente nel sistema nervoso della maggioranza dei vertebrati tanto quanto negli invertebrati deuterostomi. Pertanto, la presenza del sistema cannabinergico in gruppi animali che sono evolutivamente così lontani dai mammiferi definisce gli endocannabinoidi come modulatori di attività fisiologiche fondamentali. A parte per speculazioni evolutive, l'encefalo di bassi vertebrati possiede caratteristiche morfologiche che facilitano lo studio delle relazioni tra differenti sistemi di neurotrasmettitori (Terasawa, 2003). A tal proposito, l'indagine in modelli animali non mammiferi dà l'opportunità di analizzare gli aspetti comparativi e funzionali del sistema di segnale cannabinergico e capire meglio la potenzialità di queste molecole per la salute umana.

Il Δ^9-THC influenza le funzioni riproduttive, sia in modelli animali che nell'uomo (Park *et al*., 2004). Dal momento che il recettore CB1 è localizzato nelle cellule di Leydig del testicolo di topo e che l'AEA sopprime i livelli sierici di LH e di testosterone in animali normali, ma non in quelli knockout per CB1, Wenger *et al*. (2001) hanno ipotizzato che CB1 sia responsabile degli effetti dei cannabinoidi esogeni sulle funzioni riproduttive, sia a livello locale che centrale.

Recentemente, Gammon *et al*. (2005) hanno riportato che i neuroni ipotalamici immortalizzati GnRH secernenti sono capaci di sintetizzare i due principali endocannabinoidi, l'AEA ed il 2-AG ed esprimono il recettore CB1, suggerendo che i cannabinoidi potrebbero influenzare la riproduzione attraverso una diretta azione sui neuroni GnRH secernenti pure *in vivo*.

L'encefalo degli anfibi è un valido modello per studiare gli aspetti centrali della riproduzione, per due ragioni principali: si tratta di un encefalo di tipo laminato, archetipo di quelli più elaborati dei vertebrati superiori (Herrick *et al*., 1948); il ciclo riproduttivo annuale degli anfibi è, inoltre, caratterizzato in entrambi i sessi dall'accumulo di GnRH nel periodo post-riproduttivo e dal suo rilascio, nel periodo pre-riproduttivo (Fasano *et al*., 1993; Cobellis *et al*., 1999; Wang *et al*., 2001).

In rana, specialmente *Rana esculenta* e *Rana ridibunda*, varie forme molecolari di GnRH sono state individuate nell'encefalo (principalmente il GnRHI ed il GnRHII) (Fasano *et al*., 1993; Fasano *et al*., 1998; Conlon *et al*., 1993), nell'ipofisi e nelle gonadi, insieme ai loro recettori (Cariello *et al*., 1989; Fasano *et al*., 1990; Battisti *et al*., 1994; Di Matteo *et al*., 1996).

Inoltre, un importante coinvolgimento del recettore CB1 nell'ambito delle funzioni riproduttive è stato recentemente riportato in questo modello sperimentale da Meccariello *et al*. (2006), sia a livello del sistema nervoso centrale che della gonade, e le fluttuazioni dell'mRNA di *cb1* nelle differenti aree encefaliche e nel testicolo durante l'anno sono state pure evidenziate.

Nel presente lavoro, le relazioni neuroanatomiche e funzionali tra CB1 ed il GnRHI sono descritte nel prosencefalo di *R. esculenta* usando una metodica di doppia immunofluorescenza. Durante il ciclo riproduttivo annuale, le fluttuazioni del trascritto di *cb1*, analizzate mediante RT-PCR, sono chiaramente opposte a quelle del *GnRHI*. Infine, una possibile relazione tra il sistema cannabinergico e quello neurosecretorio del GnRHI è stato dimostrato attraverso incubazioni *in vitro* di encefali di rana con AEA e con un agonista del GnRHI (GnRHa, buserellina).

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Raccolta di animali e di tessuti.

Maschi di *R. esculenta* sono stati catturati mensilmente da settembre a luglio, nelle vicinanze di Napoli. Gli animali sono stati anestetizzati con MS222 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e sacrificati per decapitazione immediatamente dopo la cattura per minimizzare lo stress. Per l'immunofluorescenza, sei encefali/mese sono stati prelevati e fissati tutta la notte in Zamboni o in paraformaldeide al 4%. Sezioni ortogonali e sagittali dello spessore di 12 μm sono state tagliate al criostato, montate su vetrini trattati con 3-aminopropil-trietoxilano (TESPA) e conservate a 4°C fino all'uso. Dieci encefali *in toto*, testicoli, ovari, midolli spinali, milze ed ipofisi /mese sono stati prelevati ed opportunamente conservati a -80°C per l'analisi di RNA; dieci encefali - prelevati da animali del mese di luglio, settembre, ottobre, novembre, dicembre, marzo ed aprile - sono stati, poi, sezionati. Il telencefalo ed il diencefalo sono stati conservati a -80°C fino ad un'analisi di RNA.

Tali mesi sono rappresentativi di un ciclo riproduttivo completo. Infatti, durante il ciclo riproduttivo annuale, il GnRH si accumula nell'encefalo nel periodo post-riproduttivo (maggio-luglio), si riduce nella ripresa (settembre-ottobre) ed è rilasciato durante la stasi invernale (novembre-febbraio) ed all'inizio della primavera, quando si ha la riproduzione (Fasano *et al*., 1993; Di Matteo *et al*., 1996).

Un encefalo di rana/mese ed encefali di ratto sono stati usati per un'analisi di Western blot. Due ratti maschi Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Lecco, Italy) sono stati sacrificati. Gli encefali sono stati prelevati e conservati a -80°C fino al loro utilizzo per un'estrazione proteica e per un'analisi di Western blot.

3.2.2 Reagenti chimici.

Agonista di GnRH1 (GnRHa, buserellina, fornitaci dal Dr. J. Sandow, Hoechst, Francoforte, Germania); antagonista di GnRH1 (GnRH1 Ant; Peninsula Labs., Belmont, CA, USA); anandamide (AEA Sigma-Aldrich); SR141716A (rimonabant, un selettivo antagonista di CB1, Sanofi Research, Montpellier, Francia).

3.2.3 Immunoistochimica.

Singola immunofluorescenza (IFL). Sezioni seriali di encefalo sono state incubate tutta la notte a temperatura ambiente con un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro

la porzione C-terminale del recettore CB1 di ratto (diluizione 1:500; gentilmente fornitoci dal Prof K. Mackie, Indiana University, USA) (Wager-Miller *et al*., 2002), o con un anticorpo monoclonale di topo diretto contro il GnRH1 (diluizione 1:3000, Sternberg Monoclonals INC, Baltimore, MD, USA). Tali sezioni sono state, poi, processate con un anticorpo anti-IgG di coniglio, coniugato con cianina 3 (CY3, 1:500; Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, USA) o con un anticorpo anti-IgG di topo biotinilato (1:200; Vector Labs, Burlingame, USA) e con avidina D fluorescente (1:400; Vector Labs.). Le sezioni di encefalo sono state poi lavate in PBS, montate in 1,4-diazobiciclo-ottano (Dabco, Sigma) ed osservate con un microscopio fluorescente (Olympus Eclipse 80i).

Doppia IFL standard. Le sezioni di encefalo sono state incubate tutta la notte, a temperatura ambiente, con una miscela di anticorpi anti-CB1 (diluizione finale 1:500) ed anti-GnRHI (diluizione finale 1:2000). Dopo vari lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 1h, a temperatura ambiente, con un anticorpo anti-IgG di topo biotinilato (1:200; Vector Labs.) e, poi, per 1h, a temperatura ambiente, con avidina D fluorescente (1:400; Vector Labs.) e con un anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con CY3 (1:800; Jackson ImmunoResearch Labs.).

Le sezioni di encefalo sono state poi lavate in PBS, montate in Dabco (Sigma) ed osservate al microscopio fluorescente (Olympus Eclipse 80i) o analizzate con un sistema di microscopia confocale laser-scanning Olympus Fluoview (LSCM, Olympus, New Hyde Park, NY).

La specificità degli anticorpi anti-CB1 ed anti-GnRH è stata dimostrata incubando le sezioni con gli anticorpi preassorbiti tutta la notte, a temperatura ambiente, con le corrispondenti proteine immunizzate (5 μg/ml). La specificità del metodo è stata valutata omettendo gli anticorpi primari. Entrambe le procedure hanno dato come risultato la completa assenza delle immunoreattività tissutali.

Al fine di valutare la percentuale di cellule con doppia marcatura in funzione del numero totale di neuroni dell'area preottica e del setto immunopositivi al GnRHI, 25 sezioni coronali ed ortogonali di encefalo appartenenti a 5 rane e trattate per una doppia IFL, sono state analizzate con un LSCM. Il numero di cellule GnRHI+ e GnRHI+/CB1+ è stato, così determinato.

3.2.4 Estrazione di proteine e Western blot.

Gli encefali di rana e di ratto sono stati omogeneizzati in un buffer di lisi freddo (10 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1mM EGTA pH 8.1, 0.5 mM spermidina, 12% glicerolo, 0.5 mM DTT) (1 g tessuto/5 ml) contenente inibitori di proteasi [(0.5 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 4 µg/ml leupeptina, 4 µg/ml chimostatina, 4 µg/ml pepstatina A, and 5 µg/ml N-tosil-L-fenilalanina clorometil chetone (TPCK)]. I campioni sono stati, poi, centrifugati a 10000*g* a 4°C, per 30 min, per ottenere un lisato chiarificato. La quantità di proteine totali è stata valutata usando il metodo di Lowry (Lowry *et al*., 1955). Sessanta µg di proteine totali di encefalo di ratto e di encefalo di rana, sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, su un gel all'8% e trasferiti su membrane in PVDF (Amersham Biosciences Europe GmBH, Freiburg, Germania) per 2.5h, a 280 mA ed a 4°C. Le membrane sono state lavate in PBS pH 7.6 (20 mM NaH2PO4, 80 mM Na HPO4, 100 mM NaCl) e trattate per 2h con una soluzione di bloccaggio [(5% latte scremato in polvere in TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.25% Tween-20)]. L'ibridazione è stata condotta usando un anticorpo diretto contro la porzione C-terminale di CB1 di ratto (Wager-Miller *et al*., 2002) diluito 1:1000 in TBS pH 8.0, 4% latte scremato in polvere, tutta la notte, a 4°C. Le membrane sono state lavate 3x15 min in TBS-T ed incubate per 1h a temperatura ambiente con un anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con la perossidasi di rafano (DAKO Corp., Copenhagen, Danimarca). Dopo una serie di lavaggi addizionali, gli immunocomplessi sono stati evidenziati attraverso il sistema ECL per Western blot (Amersham Pharmacia Biotech) e lastre autoradiografiche ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). Le membrane sono state, poi, disibridate in un buffer costituito da 62.5 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 100 mM βmercaptoetanolo, a 60°C per 30 min e reibridate con l'anticorpo primario preassorbito tutta la notte con un largo eccesso (10^{-6} M) dell'antigene corrispondente per verificare la specificità dell'anticorpo.

3.2.5 Estrazione dell'RNA totale e preparazione di cDNA.

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti di *R. esculenta* usando il reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) ed è stato trattato per 30 min a 37°C con *Dnasi*I (10U/campione) (Amersham Biosciences Europe GmbH) per eliminare eventuali contaminanti di DNA genomico. La purezza e l'integrità dell'RNA estratto sono state, poi, determinate mediante analisi allo spettrofotometro a 260/280 nm ed elettroforesi.

In seguito, l'RNA totale è stato retrotrascritto per preparare i cDNA. La reazione di trascrizione inversa è stata eseguita usando 5 µg di RNA totale, 0.5 µg oligo $d(T)_{18}$, 10 mM dNTP, 5 mM DTT, 1X buffer, 40 U RNasi out, 200 U Trascrittasi Inversa SuperScript-III Rnasi H^- (Invitrogen Life Techonologies, UK) in un volume finale di 20 µl, come da protocollo.

3.2.6 Analisi dell'espressione del *GnRHI* e di *cb1* nei tessuti di rana.

Il DNA complementare è stato diluito (1:5) ed usato per l'analisi di PCR. Un frammento di cDNA di rana di 180 bp è stato ottenuto usando primers disegnati sulla sequenza del cDNA precursore del *GnRHI* di *X. laevis* [primer senso: 5'-tgcccagcactggtcctatg-3'; primer antisenso: 5'-tccttccagccagttcatca-3'; numero di accesso in Banca dati: L28040 (Wang *et al*., 2001; Hayes *et al*., 1994)]

La reazione di PCR è stata eseguita usando 1 µl di cDNA diluito, in una mix di reazione [0.2 mM dNTP, 1X buffer PCR, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pMol di primers senso ed antisenso specifici, 1.25 U Taq Polimerasi (Invitrogen Life Technologies)], usando un Termociclatore Applied Biosystem. Le condizioni di PCR seguite sono state le seguenti: 94°C per 5 min, 1 ciclo; 94°C per 1 min, 55°C per 1 min, 73°C per 1 min, 35 cicli; infine, 72°C per 7 min, 1 ciclo.

I prodotti di amplificazione sono stati clonati nel vettore pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI). Cellule competenti DH5α ad alta efficienza sono state trasformate e le colonie ricombinanti sono state identificate mediante screening colorimetrico. Il DNA plasmidico è stato estratto usando il kit di estrazione NucleoBond (Machery-Nagel, Duren, Germania) e la taglia dell'inserto è stata controllata mediante analisi di restrizione con *Eco*RI (Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Germania). Il DNA è stato, poi, sequenziato su entrambi i filamenti dal Servizio di Sequenziamento Primm (Primm srl, Napoli). Sulla base della sequenza nucleotidica, è stata dedotta la sequenza aminoacidica del precursore del GnRHI di *R. esculenta*. La sequenza nucleotidica e la sequenza aminoacidica dedotta del GnRHI di *R. esculenta* sono state allineate con le sequenze dei precursori del GnRHI di altri anfibi, mediante i programmi LALIGN e CLUSTALW.

L'analisi dell'mRNA di *cb1* è stata condotta usando primers specifici per la sequenza di mRNA di *cb1* dell'encefalo di rana (primer senso: 5'-attggggtaaccagtgttct-3'; primer antisenso: 5'-accaggtctttgctaacct-3'; taglia del prodotto di amplificazione: 201 bp; numero di accesso in Banca dati: AM113546) nella mix di reazione precedentemente

descritta. Le condizioni di PCR seguite sono state le seguenti: 94°C per 5 min, 1 ciclo; 94°C per 30 sec, 56°C per 30 sec, 72°C per 30 sec, 30 cicli; infine, 72°C per 7 min, 1 ciclo.

Per poter, poi, normalizzare i segnali ottenuti, è stato amplificato l'mRNA codificante la proteina ribosomale P1 di *R. esculenta* (*fp1*) (primer senso: 5'-tacgagcgtccatcacacac-3'; primer antisenso: 5'- agaccaaagcccatgtcatc-3'; taglia dell'amplificato atteso: 356 bp; numero di accesso in Banca dati: AJ298875). Le condizioni di PCR sono state le seguenti: 94°C per 5 min, 1 ciclo; 94°C per 30 sec, 56°C per 30 sec, 72°C per 30 sec, 22 cicli; infine, 72°C per 7 min, 1 ciclo. Eventuali contaminanti nei campioni sono state valutate usando come controlli negativi campioni preparati senza cDNA.

Infine, 25 µl di prodotto di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su un gel di agarosio all'1.2% nel buffer Tris-borato (TBE) 1X contenenti con 0.5 µg/ml di bromuro d'etidio.

3.2.7 Trattamenti con AEA.

Trentacinque maschi di rana del mese di maggio sono stati anestetizzati e sacrificati per decapitazione, immediatamente dopo la cattura per minimizzare lo stress. Gli encefali sono stati rapidamente rimossi ed i diencefali isolati sono stati immersi nel buffer Krebs Ringer per anfibi (KRB). Come controllo fresco abbiamo utilizzato cinque diencefali, rapidamente conservati a -80°C ed usati, in seguito, per un'estrazione di mRNA. Cinque diencefali sono stati incubati in KRB per 1h. Dieci diencefali sono stati incubati in KRB/AEA 10^{-6} M ed in KRB/AEA 10^{-9} M per 1h (cinque diencefali/tempo di trattamento); dieci diencefali, precedentemente trattati con KRB/SR141716A 10^{-5} o 10^{-8} M per 30 min (cinque diencefali/trattamento), sono stati incubati in KRB/AEA 10^{-6} M ed SR141716A 10^{-5} M ed in KRB/AEA 10^{-9} M ed SR141716A 10^{-8} M per 1h. Infine, cinque diencefali sono stati incubati per 1h con SR141716A 10^{-8} M. Dopo l'incubazione, i tessuti sono stati conservati a -80°C fino al loro utilizzo per un'estrazione di RNA.

Le dosi di AEA sono state scelte sulla base di esperimenti di dose-risposta descritti nel ratto (Scorticati *et al*., 2004).

3.2.8 Trattamenti con GnRHa.

Trenta maschi di rane del mese di settembre sono stati anestetizzati e sacrificati per decapitazione, immediatamente dopo la cattura per minimizzare lo stress. Gli encefali

sono stati rapidamente rimossi ed incubati in KRB o KRB/GnRHa 10^{-6} M per 1h (dieci encefali/trattamento). Dieci encefali, precedentemente incubati per 30 min in KRB contenente GnRHAnt 10^{-5} M, sono stati poi incubati in KRB contenente GnRHa 10^{-6} M e GnRHAnt 10^{-5} M per 1h. Dopo l'incubazione, gli encefali sono stati sezionati e l'area diencefalica è stata conservata a -80°C fino ad un'estrazione di RNA. Le dosi di GnRHa sono state scelte sulla base di esperimenti precedentemente pubblicati (Di Matteo *et al*., 1998).

3.2.9 Statistica.

L'analisi dei livelli di mRNA è stata eseguita mediante il GELDOC 1.00-UV Fluorescent Gel Documentation System (BioRAD, Hercules, CA). Le quantità relative dei segnali sono espresse come incremento rispetto al valore minimo (fold increase) del rapporto *GnRHI* (*cb1)* mRNA/*fp1* mRNA ± *s.e.m.* Il test ANOVA seguito dal test di Duncan per il confronto tra più gruppi è stato condotto per valutare la significatività delle differenze. Intervallo delle osservazioni: 4-6.

3.3 Risultati

3.3.1 Una sottopopolazione di neuroni ipotalamici GnRHI secernenti esprime anche il recettore CB1.

Per valutare la specificità dell'anticorpo di ratto diretto contro la porzione C-terminale di CB1, abbiamo condotto un'analisi di Western blot sull'encefalo di rana. Come atteso (Wager-Miller *et al*., 2002), una banda di alto peso molecolare (~ 170 kDa) è stata osservata in rana e pure nell'encefalo di ratto, usato come controllo positivo (Fig.3.1, A). Il segnale si attenua fortemente o scompare completamente nei filtri disibridati e poi incubati con un antisiero precedentemente trattato con una quantità in eccesso (10^{-6} M) del peptide corrispondente (Fig.3.1, B). E' importante notare che gli allineamenti degli ultimi 73 aa della porzione C-terminale di CB1 di rana e di ratto (numero di accesso in Banca dati: CB1 di rana AM113546; CB1 di ratto U40395), condotti mediante il programma LALIGN, disponibile su Biology Workbench (http://workbench/sdsc.edu/), rivelano un'identità dell'80.8%.

Abbiamo utilizzato la tecnica della singola e doppia immunofluorescenza per esaminare la distribuzione del recettore CB1 e del GnRHI nel prosencefalo ventrale di *R. esculenta*, in modo particolare a livello del setto del telencefalo, dell'area preottica e dell'ipotalamo infundibolare.

La distribuzione delle immunoreattività è schematizzata nella sezione mediale dell'encefalo riportata in alto in Fig.3.2.

Negli anuri, il setto è ben sviluppato e forma un muro emisferico ventro-mediale limitato dorsalmente dal pallio mediale. In rana, osserviamo un fitto reticolo di fibre e terminali nervosi immunopositivi per CB1 attraverso il pallio, così come corpi cellulari diffusi nel setto.

Procedendo caudalmente, verso l'area preottica rostrale, un maggior gruppo bilaterale di cellule piriformi e bipolari, medio-larghe - dal diametro di 15-20 µm - organizzate a formare uno strato sub-ependimale, è risultato immunopositivo insieme con un denso reticolo di fibre dirette ventro-lateralmente (Fig.3.2, A, L). Le sezioni tissutali processate per il controllo di specificità non mostrano alcuna marcatura (Fig.3.2, B). Nell'ipotalamo infundibolare, i corpi cellulari immunopositivi per CB1 (10-15 µm di diametro), caratterizzati frequentemente da processi intraventricolari, sono distribuiti lungo il muro ventricolare (Fig.3.2, C) e proiettano i loro assoni varicosi centralmente verso il pavimento ipotalamico e l'eminenza mediana della neuroipofisi.

Nell'area prosencefalica, il sistema immunoreattivo per il GnRHI generalmente include un gruppo principale di neuroni distribuiti nel setto mediale e ventrale del telencefalo. In rana, i corpi cellulari sono generalmente di forma piriforme o bipolare, bloccati in un denso reticolo di processi e di assoni varicosi (Fig.3.2, D, F, G). Un minor gruppo di cellule è stato osservato pure nell'area preottica rostrale. Un tratto di fibre immunopositive per il GnRHI si proietta dall'ipotalamo caudale all'eminenza mediana. Nessuna immunopositività è stata osservata nei controlli negativi (Fig.3.2, E).

Per valutare le relazioni morfofunzionali tra le immunoreattività di CB1 e di GnRHI attraverso il setto e l'area preottica/ipotalamo, le sezioni encefaliche sono state incubate con gli anticorpi primari anti-CB1 ed anti-GnRHI, così da procedere con una doppia IFL.

Sia nel setto ventro-mediale del telencefalo che nell'area preottica rostrale un numero di corpi cellulari e di terminali contenenti CB1 insieme con cellule e fibre nervose marcate positivamente per il GnRHI sono risultate co-distribuite. I neuroni co-marcati simultaneamente per CB1 e per il GnRHI si osservano nella regione del setto e nell'area preottica (Fig.3.2, G, H, I, M); essi corrispondono al 20% dei neuroni immunopositivi per il GnRHI. Le fibre nervose e le varicosità positive per il GnRHI sono strettamente associate ai neuroni immunopositivi per GnRHI (Fig.3.2, L).

Nell'eminenza mediana della neuroipofisi, fibre e terminali nervosi contenenti CB1 sono generalmente più ventrali rispetto a quelli contenenti il GnRHI, sebbene alcuni di essi mostrano doppia marcatura (Fig.3.2, N).

3.3.2 Clonaggio del *GnRHI* di *R. esculenta* ed analisi della sua espressione tissutale.

Mediante RT-PCR, abbiamo clonato un frammento di cDNA di 180 bp del *GnRHI* di *R. esculenta* codificante: il decapeptide GnRHI; il sito proteolitico (Gly-Lys-Arg); i primi 46 aa del peptide associato al GnRH (GAP) (Fig.3.3, A).

La sequenza nucleotidica del *GnRHI* è stata confrontata a quella degli altri anfibi [gli anuri, *X. laevis, R. catesbeiana* e *R. dybowskii* (rispettivi numeri di accesso in Banca dati: L28040, AF188754, AF139911)] rivelando un'alta identità nucleotidica (70.5% *vs X. laevis*; 95.6% *vs R. catesbeiana;* 92.2% *vs R. dybowskii*). Gli allineamenti delle sequenze aminoacidiche del GnRHI di *R. esculenta* e del GnRHI di altri anfibi sono rappresentati in Fig 3.3, B.

Un'analisi preliminare di espressione del *GnRHI* è stata effettuata tramite RT-PCR semiquantitativa usando dei cDNA prodotti da tessuti di rana quali ipofisi, encefalo,

midollo spinale, testicolo, ovario e milza (Fig.3.3, C). Un prodotto di amplificazione di 180 bp è stato ottenuto dall'ipofisi, dall'encefalo e dalle gonadi, ma non dal midollo spinale e dalla milza, usati come controllo negativo. Una banda di 356 bp è stata osservata per *fp1*, un gene costitutivamente espresso, in tutti i tessuti esaminati ed è stata usata per normalizzare i livelli di espressione del *GnRHI*. Come atteso, la più alta espressione del *GnRHI* è risultata nell'encefalo (Fig.3.3, D; $p<0.01$).

3.3.3 Analisi di espressione di *cb1* e del *GnRHI* durante il ciclo riproduttivo annuale.

Per approfondire le nostre conoscenze circa l'espressione del *GnRHI*, abbiamo prelevato - per un intero ciclo riproduttivo annuale, da settembre a luglio - encefali *in toto* e li abbiamo processati per una RT-PCR semiquantitativa (Fig.3.4, A). In seguito, abbiamo confrontato il profilo di espressione del *GnRHI* con quello di *cb1,* ottenuto dalle stesse preparazioni di encefalo e recentemente pubblicato (Meccariello *et al*., 2006).

Durante il ciclo riproduttivo annuale, il *GnRHI* fluttua nell'encefalo *in toto* (Fig.3.4, B). L'espressione del *GnRHI* incrementa gradualmente da settembre a novembre (settembre *vs* ottobre-novembre $p<0.01$), rimane costante a dicembre e febbraio e raggiunge il più basso livello di espressione a marzo ($p<0.01$). Dopodichè, il *GnRHI* gradualmente incrementa ad aprile-maggio, fino a raggiungere un picco a giugno-luglio ($p<0.01$). Il profilo del *GnRHI*, descritto in questo lavoro, è chiaramente opposto rispetto a quello di *cb1* (Fig 3.4, C), precedentemente pubblicato (Meccariello *et al*., 2006). In particolare, a minimi livelli di espressione di *cb1* a novembre e a giugno corrispondono i picchi di espressione del *GnRHI*.

Focalizzando la nostra attenzione sulle funzioni riproduttive, abbiamo analizzato entrambi i profili di espressione nel prosencefalo, l'area encefalica principalmente coinvolta nel controllo dell'attività riproduttiva. A tale scopo, abbiamo scelto mesi rappresentativi dell'intero ciclo riproduttivo annuale ed abbiamo condotto un'analisi di espressione sui telencefali ed i diencefali isolati (Fig 3.5, A).

In entrambe le aree prosencefaliche, l'espressione di *cb1* è opposta a quella del *GnRHI*. Infatti, nel telencefalo, l'espressione di *cb1* raggiunge un picco a settembre e a marzo ($p<0.01$), mentre l'espressione del *GnRHI* raggiunge un picco a luglio (giugno *vs* luglio $p<0.01$), novembre ed aprile (luglio ed aprile *vs* novembre $p<0.01$) ed ha valori minimi ad ottobre, dicembre e marzo ($p<0.01$) (Fig. 3.5, B).

Nel diencefalo, l'espressione di *cb1* raggiunge un picco ben definito a dicembre ($p<0.01$); livelli significativamente più alti sono osservati anche a novembre ed aprile ($p<0.01$). Al contrario, l'espressione del *GnRHI* incrementa da giugno a luglio ($p<0.01$), rimane costante fino ad ottobre e raggiunge un valore minimo a dicembre ($p<0.01$), proprio quando l'espressione di *cb1* raggiunge un picco.

3.3.4 Trattamenti *in vitro* con AEA.

Per verificare una possibile relazione tra l'espressione di *cb1* e quella del *GnRHI* in un vertebrato non mammifero, i diencefali di rane del mese di maggio, proprio prima che l'espressione del *GnRHI* raggiunga il picco estivo, sono stati incubati con AEA. Dopo un'ora di incubazione con KRB, nessuna differenza statisticamente significativa nel livello di espressione basale del *GnRHI*, valutato come espressione del *GnRHI* in diencefali di maggio non trattati, è stata osservata. Due dosi di AEA, 10^{-6}M e 10^{-9}M, sono state utilizzate.

In un esperimento *in vitro*, condotto nel ratto, è stato riportato che le basse dosi di AEA (10^{-9}M) riducono il rilascio del GnRH dall'ipotalamo medio-basale (Scorticati *et al*., 2004). Nel nostro esperimento, dopo un'ora di incubazione, entrambe le dosi di AEA riducono l'espressione del *GnRHI* rispetto al gruppo di controllo ($p<0.01$); tale effetto è contrastato dall'SR141617A, uno specifico antagonista di CB1 ($p<0.01$ *vs* il trattamento con AEA) (Fig.3.6, A). Possibili effetti dai cannabinoidi endogeni durante il trattamento sono stati valutati mediante incubazioni con il solo antagonista, alla dose di 10^{-8} M; senza alcuna somministrazione di AEA, la sintesi del *GnRHI* nel trattamento con l'SR141716A (10^{-8} M) è ai livelli basali. (Fig.3.6, B).

3.3.5 Trattamenti con GnRHa.

A settembre, quando bassi livelli di GnRHI sono osservati nell'encefalo di rana (Fasano *et al*., 1988; Di Matteo *et al*., 1996), abbiamo verificato la possibilità di una relazione inversa con l'espressione di *cb1* incubando gli encefali *in toto* con GnRHa (10^{-6}M). Dopo un'ora di incubazione con GnRHa, l'espressione di *cb1* incrementa rispetto al controllo ($p<0.01$ *vs* il gruppo di controllo); al contrario, questo trattamento riduce fortemente l'espressione del *GnRHI* ($p<0.01$ *vs* il gruppo di controllo).

Tali effetti sono risultati contrastati dall'antagonista del GnRH ($p<0.01$ *vs* il trattamento con GnRHa) (Fig.3.7).

3.4 Discussione

Negli ultimi anni, il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel controllo delle funzioni riproduttive è stato ipotizzato nei mammiferi di entrambi i sessi (Maccarrone *et al*., 2002; Wang *et al*., 2006). Recentemente, il recettore CB1 è stato clonato in *R. esculenta* (Meccariello *et al*., 2007) ed il suo coinvolgimento nel controllo delle funzioni riproduttive nei maschi è emerso (Meccariello *et al*., 2006; Cobellis *et al*., 2006). Infatti, nel testicolo di rana, l'attivazione di CB1 inibisce la motilità degli SPZ (Cobellis *et al*., 2006). Sebbene nell'encefalo di rana, fluttuazioni dell'mRNA di *cb1* sono state riportate durante il ciclo riproduttivo annuale (Meccariello *et al*., 2006), l'evidenza del diretto coinvolgimento del sistema cannabinergico nel controllo delle funzioni riproduttive, a livello centrale, è ancora mancante. Inoltre, sebbene sia risaputo che l'AEA riduca il rilascio del GnRH nel ratto (Scorticati *et al*., 2004) e che neuroni immortalizzati GnRH secernenti siano capaci sia di sintetizzare endocannabinoidi che di esprimere il recettore CB1 (Gammon *et al*., 2005), un'analisi anatomo-funzionale in grado di correlare gli endocannabinoidi all'attività del GnRH è ancora assente. Quindi, abbiamo tratto vantaggi da un basso vertebrato per chiarire questo punto.

Nel presente studio, servendoci di una tecnica di doppia immunofluorescenza, abbiamo analizzato le relazioni morfofunzionali tra CB1 e GnRHI nel setto, nell'area preottica e nell'ipotalamo, aree encefaliche che controllano la riproduzione in tutti i vertebrati.

Abbiamo usato un anticorpo primario diretto contro la porzione C-terminale di CB1 di ratto. Confrontando l'epitopo di ratto ed i residui aminoacidici della porzione C-terminale di CB1 di rana è evidente un'elevata identità aminoacidica tra queste regioni.

Inoltre, abbiamo condotto un'analisi di Western blot per verificare la specificità dell'anticorpo anti-CB1. Una banda di alto peso molecolare è rilevata sia nell'encefalo di rana che di ratto, usato come controllo positivo. Come riportato da Wager-Miller *et al*. (2002), nel ratto, questo anticorpo riconosce specificamente una proteina ad alto peso molecolare che potrebbe rappresentare una forma dimerica del recettore.

I nostri risultati di doppia immunofluorescenza dimostrano una stretta contiguità tra il sistema di segnale del GnRH e quello di CB1 e, specificamente, la presenza del recettore CB1 in una sottopopolazione di neuroni del setto e preottici GnRHI secernenti (pari ad un 20% del numero totale di neuroni immunopositivi per il GnRHI) che proiettano i loro assoni nella zona vascolare dell'eminenza mediana.

Per stabilire meglio tali dati morfofunzionali, il confronto tra l'espressione del precursore del *GnRHI* e quella di *cb1* è stato condotto durante il ciclo riproduttivo annuale della rana. Al di là dei mammiferi, in cui i neuroni secernenti il GnRH sono piuttosto diffusi nell'encefalo ed il rilascio pulsatile del GnRH è piuttosto rapido, in questo modello sperimentale, così come in altri bassi vertebrati (Chieffi *et al*., 1991), il GnRH si accumula lentamente nell'encefalo durante il ciclo riproduttivo annuale ed è lentamente rilasciato durante la stasi invernale (Fasano *et al*., 1993; Di Matteo *et al*., 1996) per sostenere la produzione di gonadotropine, responsabile dell'inizio di una nuova ondata riproduttiva (Polzonetti-Magni *et al*., 1998).

In questo lavoro, mediante clonaggio molecolare, abbiamo ottenuto un cDNA parziale codificante il precursore del *GnRHI*. L'analisi di espressione, condotta in vari tessuti di rana, conferma la presenza del *GnRHI* nell'encefalo e nelle gonadi (Cariello *et al*., 1999) e l'assenza del trascritto nel midollo spinale. E' stato interessante notare una debole espressione del *GnRHI* nell'ipofisi, dato in accordo con quelli riportati nei pesci e nei mammiferi (Pierantoni *et al*., 2002; Mohamed *et al*., 2005). L'espressione del precursore del *GnRHI* nell'encefalo è modulata in maniera stadio-specifica durante il ciclo riproduttivo annuale della rana ed è simile al profilo della proteina precedentemente descritto in questa specie (Fasano *et al*., 1988; Di Matteo *et al*., 1996). Infatti, l'incremento del *GnRHI* osservato a marzo-aprile (periodo post-riproduttivo) ed i suoi più alti livelli di espressione trovati a maggio-luglio (periodo post-riproduttivo) sono legati all'accumulo del peptide GnRHI nell'encefalo; poi, quando il peptide si riduce nell'encefalo (settembre-novembre; ripresa) ed è finalmente rilasciato (novembre-marzo; stasi invernale) per sostenere il rilascio delle gonadotropine, l'mRNA del *GnRHI* rimane piuttosto costante (novembre-febbraio) e raggiunge un valore minimo a marzo. L'espressione del *GnRHI* durante il ciclo riproduttivo annuale è opposta al profilo di espressione di *cb1*, precedentemente analizzato in questo modello sperimentale (Meccariello *et al*., 2006).

Il presente lavoro chiaramente dimostra che l'opposizione tra i due profili di espressione persiste durante il ciclo riproduttivo annuale nel telencefalo e nel diencefalo isolati, aree importanti nel controllo delle funzioni riproduttive e nel rilascio del GnRH. Recentemente, il coinvolgimento degli endocannabinoidi nel controllo della funzione riproduttiva è stato suggerito. Al di là dell'effetto locale sulla motilità degli SPZ e sulla reazione acrosomale nei maschi ed il coinvolgimento degli endocannabinoidi nell'impianto dell'embrione nelle femmine (Schuel *et al*., 1994; Schuel *et al*., 2002;

Paria *et al*., 1996), l'effetto negativo sulla regolazione neuroendocrina della secrezione ormonale ipofisaria è stato riportato (Murphy *et al*., 1998).

Non è ancora chiaro se gli endocannabinoidi inibiscono il rilascio del GnRH nella circolazione portale attraverso un'azione diretta sugli stessi neuroni secernenti il GnRH oppure indirettamente attraverso la regolazione di altri neurotrasmettitori. Le cellule GT1 immortalizzate sono capaci di produrre endocannabinoidi e possiedono il recettore CB1 (Gammon *et al*., 2005); in contrasto, i neuroni GnRH secernenti non presentano una significativa quantità di CB1, ma sono capaci di secernere endocannabinoidi e sono vicini alla popolazione neuronale che esprime CB1 (Gammon *et al*., 2005). I trattamenti dei diencefali di rana, condotti in questo studio, chiaramente dimostrano che in questo modello sperimentale l'AEA inibisce la sintesi del *GnRHI*; questo effetto è marcato dopo un'ora di incubazione, usando basse dosi di AEA (10^{-9}M). Anche nelle femmine di ratto, la stessa dose di AEA riduce il rilascio del GnRH dall'ipotalamo medio-basale (Scorticati *et al*., 2004). E' interessante notare che l'SR141716A alla dose 10^{-8} M riporta la sintesi del *GnRH1* sopra i livelli di controllo. Al momento, non abbiamo una spiegazione per questo fenomeno, ma ipotizziamo che questo effetto sia dovuto a proprietà intrinseche della molecola SR141716A. D'altra parte, sia l'AEA che l'SR141716A influenzano l'attività del recettore dei vanilloidi (TRPV1) (De Petrocellis *et al*., 2001).

Inoltre, abbiamo tenuto conto della produzione endogena di cannabinoidi durante l'esperimento mediante incubazioni con il solo SR141716A, usato alla dose di 10^{-8} M; l'inibizione del recettore CB1 non altera la sintesi del *GnRHI*, in assenza della somministrazione di AEA. Ulteriori esperimenti serviranno a chiarire questo punto.

Per stabilire come il sistema cannabinergico possa influenzare il circuito del GnRHI, gli encefali *in toto* sono stati incubati con un agonista specifico del GnRHI, la buserellina e gli effetti sia sul livello di espressione di *cb1* nel diencefalo che sulla sintesi del *GnRHI* sono stati valutati. E' stato interessante notare come, ancora una volta, sia emersa una relazione tra il sistema cannabinergico ed il sistema neurosecretorio del GnRH: infatti, la buserellina inibisce la sintesi del *GnRHI* ed induce la trascrizione di *cb1*, un modulatore negativo dell'attività neuronale del GnRH.

Pertanto, i livelli del GnRHI potrebbero regolare le loro stesse concentrazioni attraverso l'attività di CB1. In tal senso, un controllo a "feedback" sulla funzione del GnRH potrebbe essere esercitato attraverso l'attivazione del sistema endocannabinoide, con una conseguente "upregolazione" del recettore CB1.

Nel loro complesso, i nostri risultati indicano l'esistenza di una relazione anatomo-funzionale tra gli endocannabinoidi ed il GnRHI, mediata da CB1 e suggeriscono che il controllo esercitato da questo sistema di "signalling" sui neuroni GnRH secernenti, che proiettano i loro terminali nervosi verso l'eminenza mediana, potrebbe essere di significativa importanza in termini di fine regolazione delle funzioni gonadotropiche dell'ipofisi.

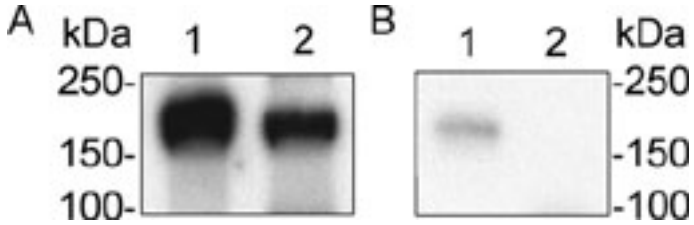


Fig.3.1 A) Analisi di Western blot condotta su proteine totali estratte dall'encefalo di ratto (1), usato come controllo positivo, e dall'encefalo di rana (2). Una banda ad alto peso molecolare (~170 kDa) è visibile in entrambe le lanes, probabilmente legata alla formazione di strutture dimeriche del recettore CB1. B) I segnali scompaiono completamente o si attenuano fortemente usando un antisiero precedentemente trattato con un largo eccesso (10^{-6} M) del peptide corrispondente.

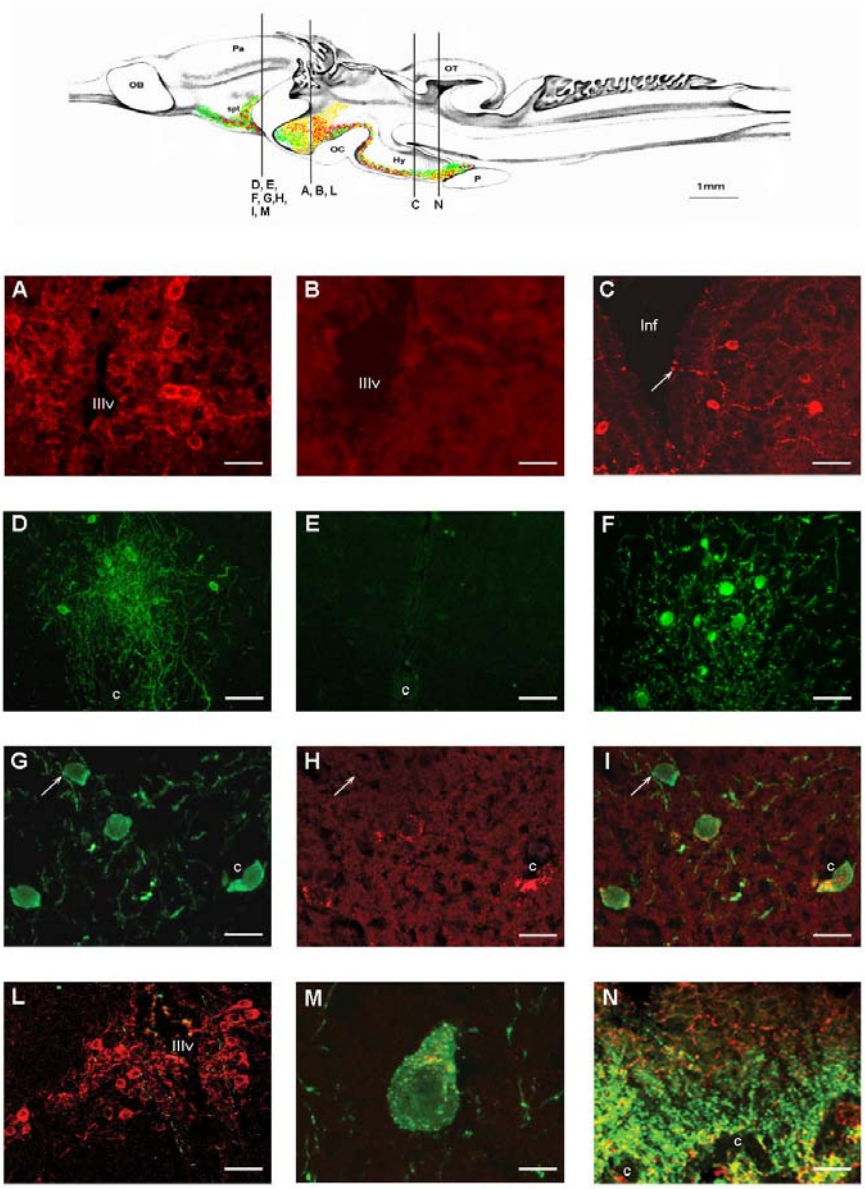

Pa
OB
OT
spf
OC
Hy
P
D, E,
F, G,H,
I, M
A, B, L
C
N
1mm
A
IIIv
B
IIIv
C
Inf
D
c
E
c
F
G
c
H
c
I
c
L
IIIv
M
N
c
c

Fig.3.2 Parte in alto: vista mediale dell'encefalo di rana schematizzato (modificato da Ten Donkelar, 1998); l'area colorata indica le regioni prosencefaliche ventrali rispettivamente contenenti corpi cellulari e fibre nervose CB1+ (rosso), GnRHI+ (verde) e CB1+/GnRHI+ (giallo). Abbreviazioni: Hy = ipotalamo; OB = bulbi olfattivi; OC = chiasma ottico; OT = tetto ottico; P = ipofisi; Pa = pallio; spt = setto. Le quattro linne verticali indicano i livelli dei fotomicrografi mostrati sotto.

A) Area preottica. Il gruppo bilaterale periventricolare di neuroni immunoreattivi per CB1 in posizione subependimale. IIIv = terzo ventricolo, sezione ortogonale. B) Una sezione consecutiva di A) processata per il controllo di specificità non mostra alcuna immunoreattività. IIIv = terzo ventricolo C) Ipotalamo infundibolare. I neuroni immunomarcati per CB1 circondano il muro infundibolare. Alcuni neuroni mostrano processi intraventricolari (freccia). Sezione coronale. Inf = infundibulo. D) Neuroni e fibre immunopositivi per il GnRHI nel setto del telencefalo. C = capillare. Sezione ortogonale. E) Una sezione consecutiva di D) processata per il controllo di specificità non mostra alcuna immunoreattività. c = capillare. F) Gruppo di neuroni immunopositivi per il GnRHI nel setto del telencefalo. Sezione ortogonale. G) Standard doppia immunofluorescenza. Quattro neuroni immunoreattivi per il GnRHI nel setto ventrale, tre dei quali H) sono pure immunopositivi per CB1. Il neurone immunopositivo per il GnRHI in alto a sinistra (freccia) non mostra alcuna marcatura per CB1. I) Merging di G) ed H). c = capillare. LSCM. Sezione coronale. L) Standard doppia immunofluorescenza. Fibre e varicosità positive per il GnRHI (fluorescenza verde) tra neuroni positivi per CB1 (fluorescenza rossa) nell'area preottica. LSCM. Sezione orizzontale, M) Standard doppia immunofluorescenza. Neurone piriforme preottico co-marcato con GnRHI (verde) e CB1 (rosso). LSCM. Sezione coronale. N) Standard doppia immunofluorescenza. Un dettaglio della zona esterna dell'eminenza mediana dove un numero di fibre e terminali nervosi sono co-marcati (giallo) con GnRHI (verde) e CB1 (rosso). LSCM. Sezione coronale. *Scala*: 30 µm (A, B), 40 µm (C, D, E, F, L, N), 20 µm (G, H, I), 10 µm (M).

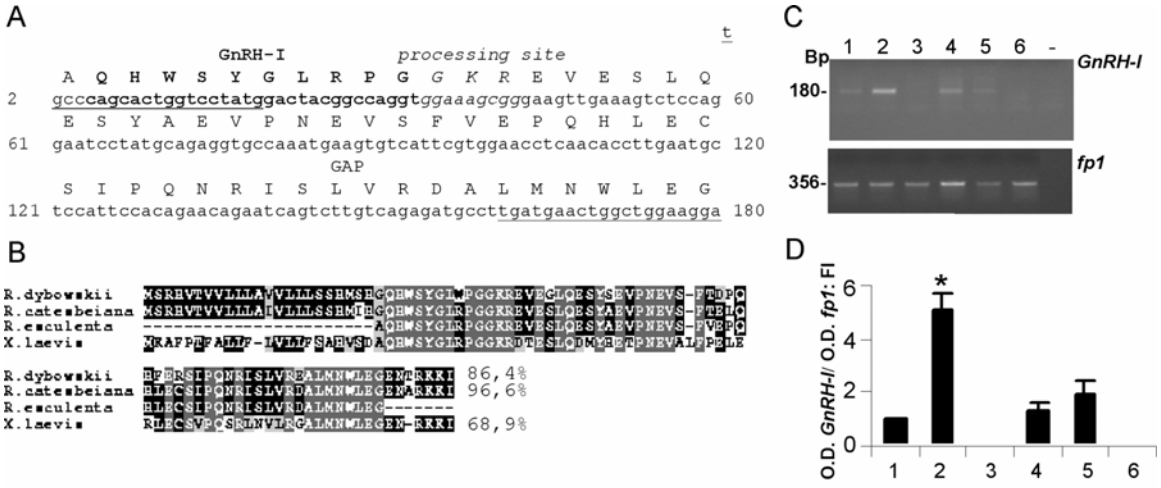


Fig.3.3 A) Sequenza nucleotidica e sequenza aminoacidica dedotta di un frammento parziale del cDNA codificante il precursore del *GnRHI*. I caratteri in grassetto indicano il peptide GnRHI; i caratteri italici indicano il "processing site" conservato; i primers disegnati sulla sequenza di *X. laevis* sono sottolineati. B) Allineamenti dei precursori del *GnRHI* conosciuti negli anfibi. I residui aminoacidici completamente conservati sono in grigio scuro; i residui aminoacidici identici sono in nero; i residui aminoacidici simili sono in grigio chiaro. La percentuale d'identità tra il precursore di *R. esculenta* ed il precursore di altri anfibi è indicata. C) Espressione del *GnRHI* e di *fp1* nei tessuti di rana. 1 = ipofisi; 2 = encefalo *in toto*; 3 = midollo spinale; 4 = testicolo; 5 = ovario; 6 = milza; - = controllo negativo. D) Normalizzazione dei segnali osservati per RT-PCR. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo del rapporto *GnRHI/fp1* (fold increase) ± *s.e.m.*(p<0.01).

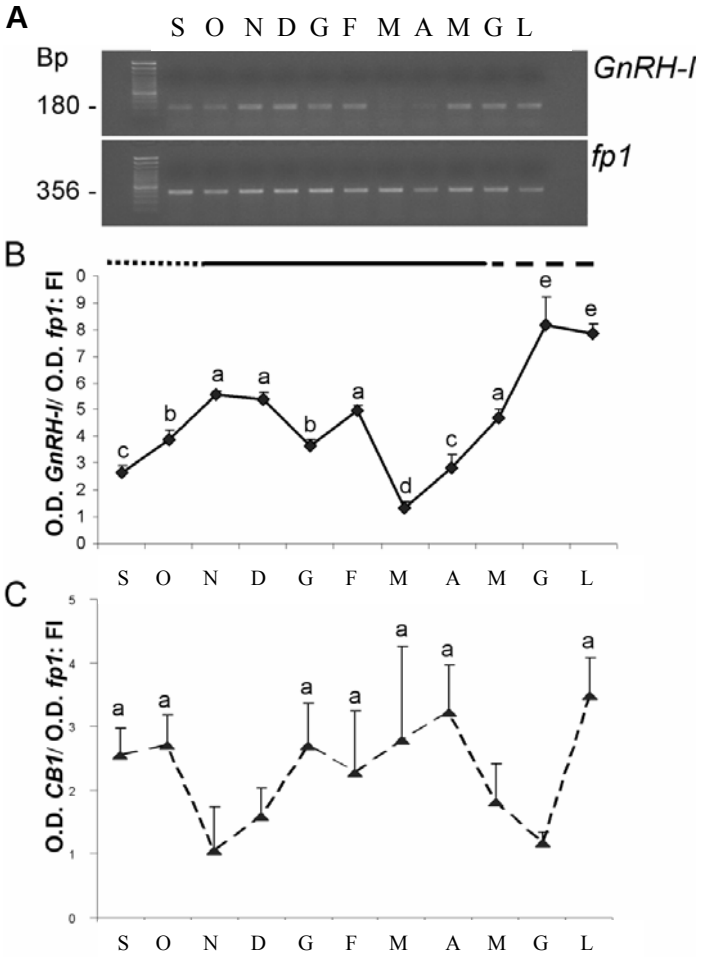


Fig.3.4 A) Espressione del *GnRHI* nell'encefalo di rana durante il ciclo riproduttivo annuale. B) Normalizzazione dei segnali osservati per RT-PCR. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo del rapporto *GnRHI/fp1* ± *s.e.m.* (a vs b $p>0.05$; $p<0.01$ in tutti gli altri casi). Le linee rappresentano il contenuto del *GnRHI* osservato nell'encefalo; linea punteggiata = basso livello del GnRH; linea nera = rilascio del GnRH; linea tratteggiata = accumulo del GnRH. C) Espressione di *cb1* nell'encefalo di rana durante il ciclo riproduttivo annuale ($p<0.01$).

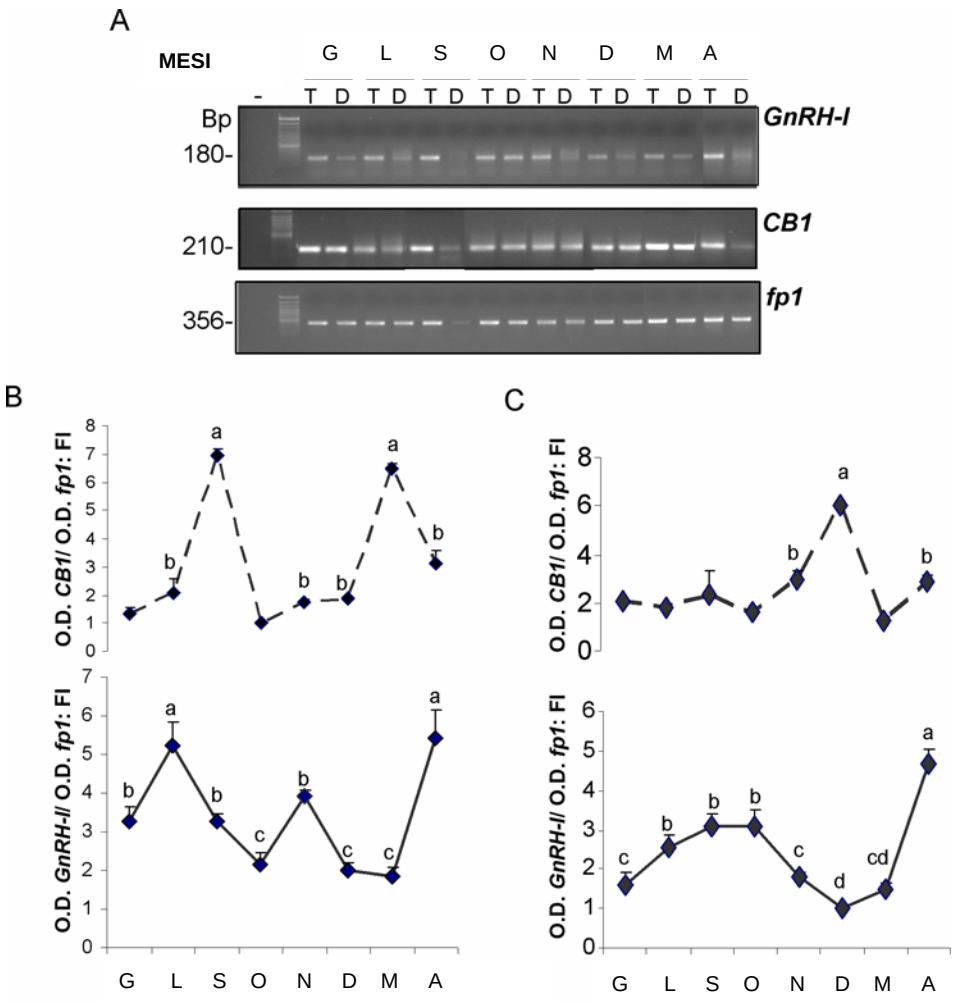


Fig.3.5 A) Espressione del *GnRHI* e di *cb1* nei telencefali (T) e nei diencefali (D) di rana, durante il ciclo sessuale annuale. B) Normalizzazione dei segnali osservati mediante RT-PCR nei telencefali e C) nei diencefali. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo del rapporto *GnRHI/fp1* (*CB1/ fp1*) ± *s.e.m.* ($p<0.05$ almeno).

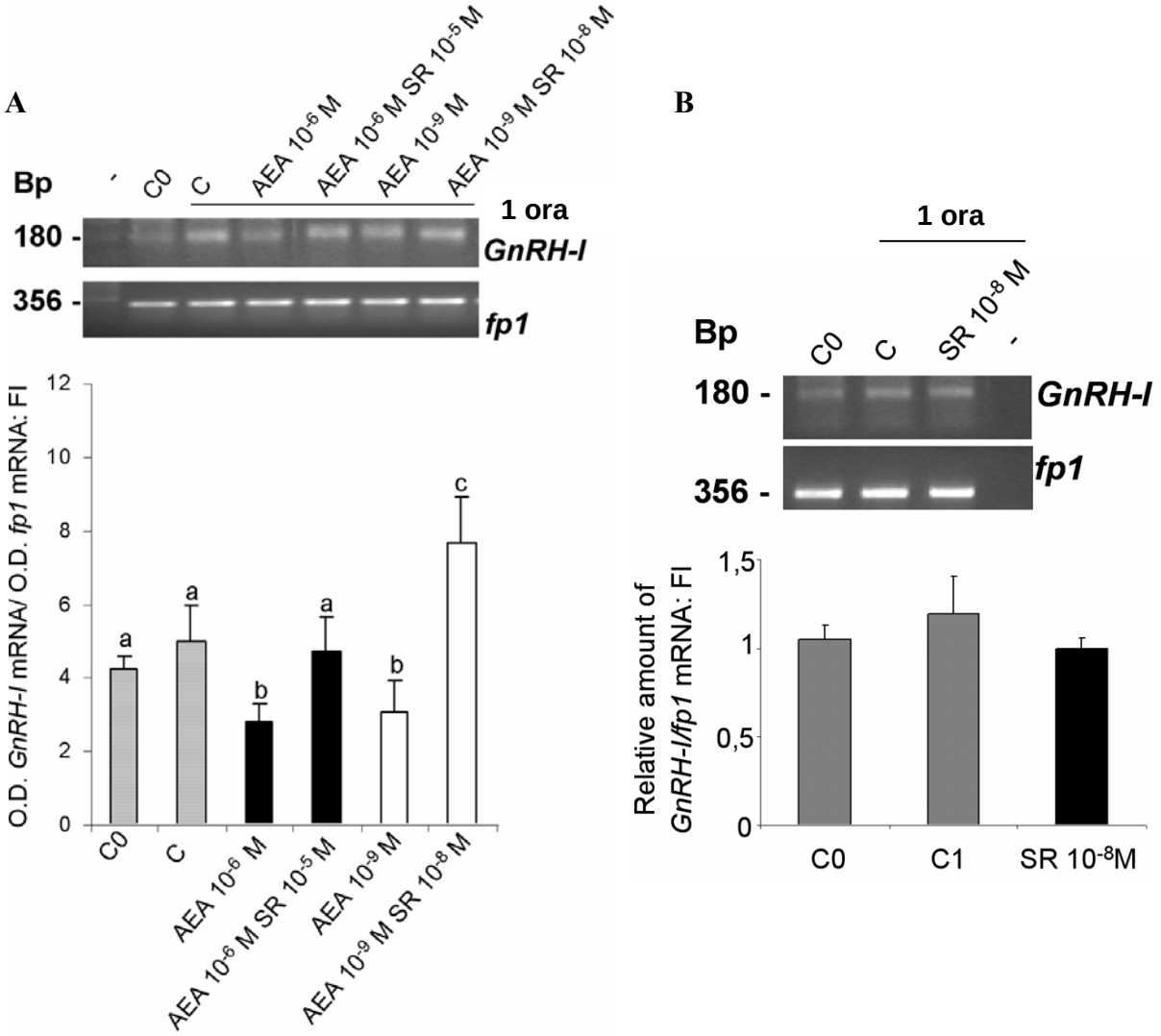


Fig.3.6 A) Effetti di AEA (10^{-6} e 10^{-9} M) usata da sola o in combinazione con SR141716A (10^{-5} e 10^{-8} M) sull'espressione del *GnRHI* nei diencefali (n = 5) prelevati da animali del mese di maggio. - = controllo negativo; Co = diencefali non trattati di rane del mese di maggio (controllo fresco); C = diencefali incubati con KRB, per 1h (gruppo di controllo). I segnali osservati per RT-PCR sono stati normalizzati rispetto all'espressione del gene *fp1* costitutivamente espresso. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo del rapporto *GnRHI/fp1* ± *s.e.m.* ($p<0.01$). B) Effetti dell'SR141716A (10^{-8} M) sull'espressione del *GnRHI* nei diencefali (n = 5) prelevati da animali del mese di maggio; Co = controllo fresco; C = gruppo di controllo. I segnali osservati per RT-PCR sono stati normalizzati rispetto all'espressione del gene *fp1* costitutivamente espresso. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come incremento rispetto al valore minimo del rapporto *GnRHI/fp1* ± *s.e.m.* ($p<0.01$).

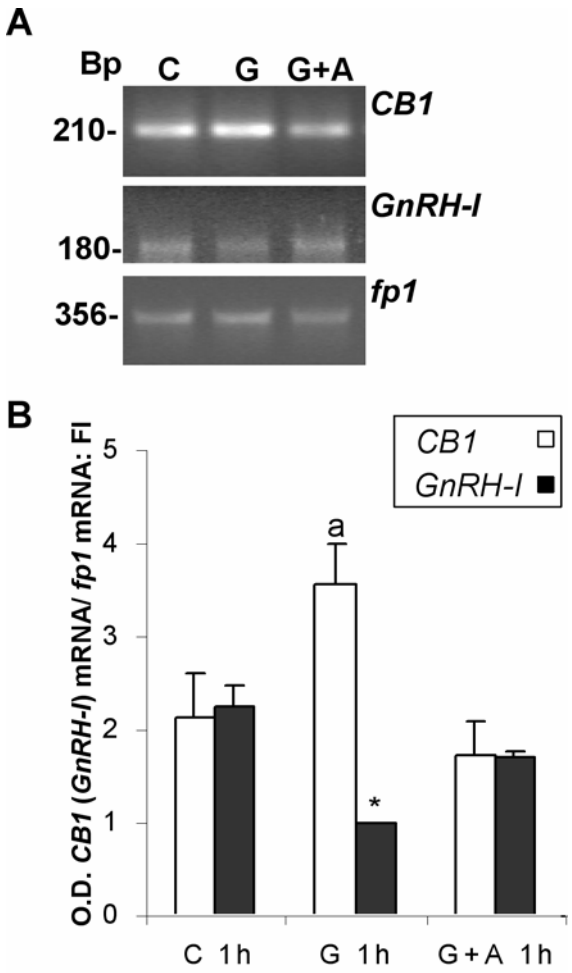


Fig.3.7 A) Effetti della buserellina (GnRHa) (10^{-6}M) sull'espressione di *cb1* e del *GnRHI* nei diencefali (n=5) prelevati da animali di settembre. B) I segnali osservati per RT-PCR sono stati normalizzati rispetto all'espressione del gene *fp1* costitutivamente espresso. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come fold increase rispetto al minimo rapporto *reGnRHI/fp1* (*Cb1/fp1*) ± *s.e.m.* ($p<0.01$). C = gruppo di controllo; G = gruppo trattato con il GnRHa; G+A = gruppo trattato con GnRHa 10^{-6}M e l'antagonista del GnRH1 10^{-5}M.

APPENDICE A

ANALISI DI UNA POSSIBILE INFLUENZA DA PARTE DEL MOTIVO "NPxxY" SULLA FUNZIONALITA' DEL RECETTORE CB1.

Studio condotto presso i laboratori del Prof. K. Mackie, Dip. di Anestesiologia e Fisiologia, Università di Washington. 16 maggio - 1 novembre 2006.

Riassunto

La presenza di motivi aminoacidici altamente conservati in varie classi di recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs) lascia ipotizzare un loro ruolo importante nella regolazione dell'attività e della funzionalità dei recettori.
"NPxxY" è uno dei motivi più conservati nel settimo dominio transmembrana dei GPCRs. La precisa funzione svolta da questi residui è, ad oggi, controversa. La variabilità dei risultati - ottenuti da esperimenti di mutagenesi sito-specifica – è in funzione del tipo di recettore studiato, nonché dell'ambiente cellulare in cui il recettore è espresso.
Dall'analisi di sequenza è emersa la presenza di tale motivo anche nella struttura del recettore CBI.
Per capire quale influenza potessero avere tale residui aminoacidici sulla funzionalità del recettore, abbiamo modificato ciascuno di essi - singolarmente - ad alanina, mediante la metodica di mutagenesi sito-diretta. I costrutti così prodotti sono stati trasfettati in maniera stabile in cellule umane di rene embrionale (HEK).
Usando la tecnica di On cell western, abbiamo condotto dei saggi di internalizzazione dipendente da ligando, stimolando le cellule con CP55940, un agonista di CB1, in un esperimento di dose-risposta e di "time course". Una chiara influenza del residuo di asparagina (N) 394 è stata evidenziata, data la totale incapacità del mutante corrispondente di internalizzare.
Quindi, abbiamo valutato il possibile coinvolgimento del motivo "NPxxY" nell'attività di riciclo del recettore CB1 utilizzando l'antagonista specifico del recettore, l'SR141617A. Un'evidente influenza da parte del residuo di prolina (P) 395 è emerso; un suo effetto sul normale traffico vescicolare del recettore è stato pure ipotizzato.
Al contrario, la mutazione del residuo di tirosina (Y) 398 non produce alcun effetto significativo, dal momento che il mutante corrispondente si comporta esattamente come il recettore wild-type (WT).
Mentre per molti recettori la desensibilizzazione e la down-regolazione sono eventi indipendenti, per altri esiste un'importante correlazione tra questi fenomeni.
Il saggio delle MAPK da noi condotto per valutare la capacità del recettore CB1 WT e mutato di interagire con le proteine G, ha dimostrato che l'incapacità dei mutanti N394A e P395A di internalizzare regolarmente, si riflette pure nella loro incapacità di attivare le MAPK.

Il presente studio ha, dunque, evidenziato un coinvolgimento del motivo “NPxxY” nella regolazione della funzionalità del recettore CB1, valutata in termini di internalizzazione, riciclo ed interazione con le proteine G.

A.1 Introduzione

Quando una cellula viene esposta per un tempo prolungato ad un agonista riduce la sua risposta, scatenata dall'attivazione dei recettori GPCRs. Pertanto, una maggiore quantità di agonista è necessaria per generare la stessa risposta cellulare, un processo chiamato desensibilizzazione. I processi di desensibilizzazione/risensibilizzazione ed internalizzazione/riciclo dei recettori sono spesso intimamente legati.

Sono stati discriminati due principali meccanismi di regolazione del recettore: la desensibilizzazione omologa (agonista-specifica) e quella eterologa (agonista-non specifica) (Xiang *et al*., 2001). In contrasto alla prima - mediata dall'attività delle chinasi GRK - la desensibilizzazione eterologa è tradizionalmente definita come uno stato di refrattarietà cellulare ad agonisti multipli e dipende dalla fosforilazione del recettore ad opera di protein chinasi, attivate da secondi messaggeri o da altri recettori (Hsieh *et al*., 1999).

Il processo di desensibilizzazione è stato ben analizzato per molti GPCRs; uno studio approfondito ha interessato, in particolare, il recettore degli oppioidi. In seguito a stimolazione, esso viene rapidamente fosforilato; tale modificazione comporta il suo disaccoppiamento dalle proteine G, il suo legame con le β-arrestine ed un suo successivo trasporto nel compartimento intracellulare, evento questo che ne causa la down-regolazione. Pertanto, la fosforilazione del recettore sembra essere lo step iniziale del processo di desensibilizzazione (Huttenrauch *et al*., 2005).

Mentre un'esposizione prolungata all'agonista causa la degradazione del recettore, dirigendolo ai lisosomi, una più breve esposizione ne determina il riciclo, attraverso il trasporto in vescicole a basso pH. In questo modo il ligando può staccarsi prima che il recettore sia riportato sulla membrana.

Il meccanismo cellulare coinvolto nel recupero del recettore, in seguito alla rimozione dell'agonista, non è ben noto come quello dell'internalizzazione. Si ritiene che, dopo l'internalizzazione, l'acidificazione delle vescicole endosomali induca un cambiamento conformazionale del recettore, responsabile della sua defosforilazione e, dunque, del suo riciclo (Huttenrauch *et al*., 2005).

Nell'ultimo decennio, centinaia di recettori accoppiati alle proteine G sono stati clonati e sequenziati in differenti specie. Sebbene tutti i GPCRs possiedano i tipici sette domini transmembrana, essi condividono solo un numero limitato di residui aminoacidici conservati - (la maggior parte dei quali localizzati nei domini transmembrana) -

specialmente in regioni implicate nel legame con il ligando e nell'interazione con le proteine G. Inoltre, è generalmente accettato che recettori internalizzanti contengano motivi o "codici" riconosciuti da proteine adattatrici - responsabili di mediare l'aggregazione del complesso recettore/ligando alle vescicole rivestite da clatrina. Ad ogni modo, un alto grado di conservazione suggerisce che un residuo o un segmento giochi un ruolo strutturale e funzionale importante per l'attività del recettore.

Un motivo così conservato è "NPxxY", trovato nel settimo dominio transmembrana della maggior parte dei GPCRs. Le posizioni degli aminoacidi asparagina (N), prolina (P) e tirosina (Y) sono piuttosto invariabili all'interno del motivo. I due residui più interni sono generalmente di natura idrofobica, mentre i residui che fiancheggiano la tirosina e l'asparagina possono variare (Probst *et al*., 1992). La sequenza "NPxxY" è simile alla sequenza "NPxY" trovata nella porzione citoplasmatica dei recettori a singolo dominio transmembrana (il recettore per le lipoproteine a bassa densità, il recettore per l'insulina o il fattore di crescita epidermica) (Chen *et al*., 1990). Tale motivo funziona per questi recettori come un segnale internalizzante, importante sia per l'endocitosi costitutiva che per quella indotta da ligando. In particolare, la sequenza "NPxY" risulta direttamente coinvolta nell'associazione del recettore con la proteina adattatrice HA-2, coinvolta nel processo di endocitosi clatrina dipendente.

Al contrario, un'ipotesi - postulata da Kalatskaya *et al*. (2004) - circa il ruolo di "NPxxY" nella regolazione dell'internalizzazione del recettore umano per la bradichinina β_2 spiega come questo motivo non serva all'interazione diretta con l'apparato endocitotico, ma regoli l'internalizzazione del recettore attraverso la fosforilazione di residui di serina/treonina presenti nella sua coda.

Il motivo "NPxxY" potrebbe, quindi, giocare un ruolo decisivo nella regolazione di numerose funzioni dei GPCRs quali l'attivazione, la fosforilazione, l'internalizzazione e, dunque, il sequestro del recettore - presumibilmente - controllando l'affinità del recettore alle proteine G.

Il ruolo di alcuni residui aminoacidici conservati è stato pure analizzato per il recettore CB1. Molti studi hanno dimostrato che l'eliminazione della coda C-terminale del recettore incrementa la sua capacità di ancorarsi alle proteine G. L'effetto opposto è prodotto dalla mutazione dell'aspartato (D) nel secondo dominio transmembrana; il mutante CB1-D164N è, infatti, incapace di sequestrare le proteine G (Nie *et al*., 2001). Si ipotizza che questo residuo conservato di aspartato interagisca con quello di asparagina nella settima elica transmembrana e che la mutazione dell'aspartato distrugga tale

interazione (Roche *et al*., 1999).

Il mutante CB1 è incapace d'internalizzare dopo esposizione al ligando, ma è ancora capace di attivare il pathway delle MAPK - meglio del WT - suggerendo che l'internalizzazione non sia richiesta per l'attivazione della cascata delle MAPK.

Scopo di questo lavoro è stato definire il ruolo del motivo "NPxxY" per il recettore CB1, attraverso la mutazione dei residui N394, P395 e Y398 ad alanina (residui evidenziati in Fig.A.1). Di questi mutanti, abbiamo, poi, valutato la capacità d'internalizzare dopo trattamento con CP55940 e di riciclare verso la membrana dopo stimolazione con l'antagonista specifico di CB1, SR141617A. L'accoppiamento di questi mutanti con le proteine G è stato pure analizzato attraverso l'analisi dell'attivazione della cascata delle MAPK. Inoltre, abbiamo mostrato la localizzazione dei mutanti in cellule HEK adottando la tecnica di immunofluorescenza supportata dalla microscopia confocale.

Tabella A Schematizzazione delle principali funzioni svolte dal motivo "NPxxY" nell'attività di vari recettori accoppiati alle proteine G.

Tipo di recettore	Mutazione	Effetto	Referenza
Recettore β2-adrenergico	Y326A	Inibizione dell'internalizzazione e della risensibilizzazione	Barak *et al.* (1994)
Recettore dell'angiotensina di tipo II	Y302A	Nessun effetto sull'internalizzazione	Thomas *et al.* (1995)
Recettore della somatostatina umana tipo 5	Y304A	Riduzione dell'affinità del recettore al ligando	Hukovic *et al.* (1998)
Recettore del formil peptide	N297A	Regolazione dell'internalizzazione, dell'attivazione delle MAPK e della chemiotassi	Rong *et al*. (2001)
Recettore della vasopressina tipo 2	Y325A	Inibizione dell'internalizzazione	Bouley *et al.* (2003)
Recettore 5-HT2	N376D	Variazione della preferenza di "binding" al ligando	Johson *et al*. (2006)

A.2 Materiali e metodi

A.2.1 Costrutti di DNA e saggio di mutagenesi *in vitro.*

Il plasmide pcDNA3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenente il recettore CB1 nella forma WT, preceduto all'N terminale da un singolo epitopo di emoagglutinina (HA) - MGYPYDVPDYAGS - è stato modificato usando il saggio QuikChange di mutagenesi specifica sito-diretta *in vitro* (Stratagene, La Jolla, CA). In breve, oligonucleotidi, disegnati per mutare i residui N394, P395 e Y398 ad alanina nel DNA WT, sono stati aggiunti al plasmide denaturato. Il templato di DNA parentale, metilato, non modificato, è stato digerito con *Dpn*I e, poi, usato per trasformare cellule competenti DH5α ad alta efficienza. Le colonie ricombinanti sono state identificate mediante screening colorimetrico ed il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit Qiagen (Turnberry Lane, Valencia, CA). Il sequenziamento è stato effettuato con il sequenziatore automatico ABI Prism 3000 (Applied Biosystem).

A.2.2 Colture cellulari e trasfezione.

Cellule umane di rene embrionale (HEK) - al 60% di confluenza - sono state incubate con un reagente lipidico cationico LipofectAMINE (Invitrogen Life Technologies) e 2 μg di costrutti di DNA plasmidico - descritti sopra - per tre ore e mezzo, a 37°C. La reazione è stata interrotta con l'aggiunta del mezzo DMEM (HyClone Laboratories, South Logan, UT), tutta la notte a 37°C. Il giorno seguente, è stato aggiunto DMEM fresco e le cellule sono state trasferite in piastre dal diametro di 10 cm. Un trattamento con antibiotici è stato eseguito per due settimane; colonie resistenti alla zeocina e contenenti il DNA ricombinante - con le forme del recettore CB1 modificate - sono state. Colonie stabilmente trasfettate, esprimenti livelli uniformi e moderati di recettore, sono state usate per gli esperimenti successivi.

A.2.3 Saggio di On-cell western (OCW).

Dopo una diluizione a $1x10^6$cellule/ml, le cellule sono state messe a crescere a 37°C ed in condizioni di CO_2 pari al 5%. La densità cellulare è stata monitorata fino al raggiungimento di una confluenza del 90-95%. Le cellule sono state poi trasferite in piastre da 96 pozzetti.

Dopo un lavaggio con 200 μl 1X HBS/0.2 mg/ml BSA (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA), le cellule sono state incubate con CP55940, un agonista di CB1, a

37°C - per 30 min, in un esperimento di dose-risposta o per un tempo compreso tra 15 e 90 min, in un esperimento di "time course" - ed immediatamente fissate con 4% formaldeide, in 1X PBS, per 20 min, a temperatura ambiente. Le cellule sono state, poi, lavate 5 volte con 1X PBS, 5 min/lavaggio, e sottoposte ad una reazione di bloccaggio con l'aggiunta di 125 µl di LI-COR Odyssey Blocking Buffer/pozzetto (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska USA). Dopo 90 min di bloccaggio, è stata aggiunta la soluzione contenente l'anticorpo primario (MouseαHA11 1:150; Covance Research Products, Berkeley, CA) in Odyssey Blocking Buffer; la piastra è stata così incubata tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente, le cellule sono state lavate 5 volte con TBS-Tween20, per 5 min/lavaggio, a temperatura ambiente. La soluzione contenente l'anticorpo secondario (GoatαMouse IRDye 1:200 dilution, Rockland Immunochemicals) è stata aggiunta alle cellule. Tale reazione è stata eseguita a temperatura ambiente per 60 min. Le cellule sono state lavate 4X5 min, in 1X TBS-Tween 20, a temperatura ambiente e poi in 1X TBS, per 5 min. La piastra è stata, infine, sottoposta a scansione usando un mezzo ad alta qualità, una risoluzione di 169 µm, un fuoco di 4.0125 mm ed un'intensità di 3 canali da 700 nm ciascuno.

A.2.4 Esperimenti di riciclo.

Le cellule, lasciate crescere in una piastra da 96 pozzetti fino ad una confluenza del 90-95%, sono state utilizzate per esperimenti di riciclo.

Esperimento 1. A) Le cellule HEK, esprimenti il recettore WT ed i mutanti, sono state stimolate con 100 nM del ligando CP55940, con 100 nM CP55940 in combinazione con 1 µM dell'antagonista SR141617A e con 1 µM SR da solo, per 90 min, a 37°C.

B) Le cellule HEK, esprimenti il mutante P395A, sono state stimolate con 1 µM SR, per 30 e 90 min, per valutare la possibile influenza del buffer HBS/BSA, usato per preparare la soluzione 1 µM SR, sull'effetto prodotto dall'antagonista.

Esperimento 2. Per verificare se l'effetto dell'SR sul mutante P395A sia transitorio o stabile, abbiamo stimolato le cellule HEK per 90 min con 1 µM SR, le abbiamo lavate con 200 µl di 1X PBS ed abbiamo aggiunto 100 µl di HBS-BSA, per un tempo compreso tra 5 e 90 min. Nel controllo, le cellule sono state trattate con il solo buffer HBS-BSA. I vari trattamenti sono stati seguiti dalla fissazione delle cellule e dalla loro incubazione con l'anticorpo primario e secondario, come descritto sopra.

A.2.5 Analisi di immunofluorescenza, supportata dalla microscopia confocale.

Cellule HEK, stabilmente trasfettate - esprimenti il recettore CB1 WT o con il motivo "NPxxY" modificato - sono state cresciute su vetrini coprioggetto rivestiti di polilisina.

Dopo un lavaggio con 1X HBS/0.2 mg/ml BSA, abbiamo trattato le cellule con 100 nM CP55940, usato da solo o in combinazione con 1 μM SR , per 30 min, a 37°C. Nel controllo, è stato aggiunto il solo buffer HBS/BSA.

Dopo tale stimolazione, le cellule sono state fissate con formaldeide al 4%, lavate 3 volte con 0.1 M PB e 3 volte con 1X PBS e permeabilizzate per 1h in PBS, 5% DDS e 0.1% saponina.

Le cellule sono state incubate tutta la notte a 4°C con la soluzione contenente l'anticorpo primario (MouseαHA11 1:500; RabbitαCB1 1:500). Il giorno seguente, dopo 6 lavaggi in 1X PBS, le cellule sono state incubate con la soluzione contenente l'anticorpo secondario (DonkeyαMouse 1:150, coniugato a FITC), per un'ora a temperatura ambiente. Dopo aver lavato le cellule 3 volte con 1X PBS, 2 volte con 0.1 M PB e 3 volte con acqua, abbiamo seccato e montato i vetrini coprioggetto con il Vector Vectashield (CliniSciences laboratories, Henri Ginoux, Montrouge). Le cellule sono state, infine, osservate al microscopio confocale (MRC600; Biorad, Hercules, CA). Per limitare l'osservazione alla membrana plasmatica, l'intero esperimento è stato ripetuto omettendo lo step della permeabilizzazione in saponina.

A.2.6 Analisi del pathway delle MAPK mediante In-cell western (ICW).

Dopo aver verificato il raggiungimento di una confluenza cellulare del 90%, abbiamo trattato le cellule con il solo buffer HBS/BSA per 5 min. Abbiamo, poi, stimolato le cellule con 100 nM CP, per un tempo compreso tra 3 e 20 min.

Le cellule sono state, in seguito, fissate con formaldeide al 4%, in ghiaccio per 15 min e per altri 30 min addizionali, a temperatura ambiente. La soluzione di formaldeide è stata, poi, rimossa e le cellule sono state incubate con 100 μl di metanolo freddo a -20°C, tutta la notte. Sia per la soluzione di bloccaggio che per quella con l'anticorpo primario abbiamo usato TBS contenente 5 mg/ml BSA.

Dopo aver rimosso il metanolo, abbiamo incubato la piastra per 1h, a temperatura ambiente, con 50 μl/pozzetto di TBS/BSA. L'anticorpo primario (CST phosphor-erk1/erk2) è stato diluito 1:200 in TBS/BSA e l'incubazione è stata effettuata tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente, le cellule sono state lavate 6 volte (15 min/lavaggio) a temperatura ambiente con TBS-Tween 20 ed incubate con la soluzione contenente

l'anticorpo secondario (DonkeyαRabbit 1:1000), per 90 min a temperatura ambiente. Dopo una serie di lavaggi, la piastra è stata, infine, sottoposta a scansione usando un mezzo ad alta qualità, una risoluzione di 169 μm, un fuoco di 4.0125 mm ed un'intensità di 4 canali da 800 nm ciascuno.

A.2.7 Analisi statistica.

La percentuale dei recettori rimasti sulla membrana cellulare è stata determinata calcolando la media integrata dell'intensità dei segnali fluorescenti per ciascun trattamento farmacologico. I valori finali sono stati normalizzati sulla base delle intensità fluorescenti dei controlli e sono espressi come media ± *s.e.m.*

Tutti i grafici e le analisi statistiche sono state ottenute usando il programma GraphPad Prism (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

Il test ANOVA - per il confronto tra più gruppi - è stato condotto per valutare la significatività delle differenze. Intervallo delle osservazioni: 4-8.

A.3 Risultati

A.3.1 Effetti delle mutazioni N394A, P395A, Y398A sull'internalizzazione di CB1.

Per valutare il ruolo del motivo "NPxxY" nell'attività del recettore CB1, abbiamo mutato i residui N394, P395 ed Y398 ad alanina ed abbiamo utilizzato questi costrutti per trasfettare in modo stabile cellule HEK.

Quindi, abbiamo eseguito esperimenti di internalizzazione indotta da ligando, stimolando le cellule HEK con 100 nM CP55940, in un esperimento di "time course" (5-90 min).

Il mutante N394A perde completamente la capacità di internalizzare, comparando la percentuale del recettore rimanente su membrana alla forma CB1 WT ($P<0.01$, per tutti i tempi); il mutante P395A internalizza normalmente nei primi 5 e 15 min di trattamento, ma a partire da 30 min ($P<0.05$), il suo livello di espressione sulle cellule incrementa significativamente ($P<0.01$ per il trattamento a 60 e 90 min). Il mutante Y398A, invece, internalizza regolarmente, tranne che a 90 min di trattamento ($P<0.05$) (Fig.A.2, A). Un esperimento di dose risposta è stato, poi, eseguito, stimolando le cellule HEK con CP per 30 min. A basse concentrazioni di CP, tutti i mutanti mostrano un profilo di internalizzazione piuttosto simile al WT. Aumentando le dosi di ligando (31.6 e 100 nM CP), i profili d'internalizzazione dei mutanti diversificano da quello del WT. Il mutante P395A, infatti, riduce la sua efficienza di internalizzazione ($P<0.05$), mentre il mutante N394A è espresso sulla membrana ($P<0.01$); il mutante Y398A, d'altro canto, continua ad internalizzare come il recettore WT (Fig.A.2, B).

Mediante immunofluorescenza (IFL) ed analisi al microscopio confocale, abbiamo mostrato la localizzazione del recettore WT o mutante in cellule HEK, dopo stimolazione con 100 nM CP o con CP in combinazione con 1 μM SR, per 30 min, a 37°C; come controllo sono state utilizzate cellule trattate con il solo buffer HBS/BSA.

Il segnale di membrana corrispondente a CB1 WT è ridotto dopo stimolazione con l'agonista (Fig.A.3, A2), rispetto al controllo (Fig.A.3, A1); il trattamento con SR inibisce efficientemente l'internalizzazione del recettore (Fig.A.3, A3).

Nel controllo, il mutante N394A risulta uniformemente distribuito sulla membrana cellulare (Fig.A.3, B1); dopo la stimolazione con CP, nessun cambiamento di localizzazione del recettore è visibile (Fig.A.3, B2) a dimostrare una totale incapacità del mutante di internalizzare.

Nel controllo, il mutante P395A non è localizzato sulla membrana cellulare come il WT, ma forma numerose piccole vescicole diffuse nel citoplasma (Fig.A.3, C1). Dopo la

stimolazione con 100 nM CP, le piccole vescicole - precedentemente diffuse nel citoplasma - si assemblano su un lato delle cellule (Fig.A.3, C2). Quando il trattamento con CP viene condotto in presenza di 1 μM SR, il segnale immunoreattivo per il mutante P395A è sostanzialmente distribuito sulla membrana cellulare, anche se in alcune cellule sembra comunque polarizzato come in A.3, C2 (Fig.A.3, C3).
Riguardo al mutante Y398A, mentre nel controllo il segnale immunoreattivo risulta collocato sulla membrana cellulare (Fig.A.3, D1), il trattamento con CP induce un'internalizzazione significativa del recettore, simile a quella del WT (Fig.A.3, D2), bloccata dal doppio trattamento ligando-antagonista (Fig.A.3, D3).

A.3.2 Analisi dell'effetto delle mutazioni N394A, P395A, Y398A sull'attività di riciclo del recettore CB1.

Le cellule HEK, esprimenti sia il recettore CB1 WT che le forme mutate, sono state trattate con 100 nM CP, con CP in combinazione con 1 μM SR e con SR da solo, per 90 min. Il recettore WT internalizza significativamente ($P<0.01$) in seguito al trattamento con il ligando CP; l'SR, sia usato in combinazione con CP che da solo, alla dose di 1 μM, riporta la percentuale basale di recettore ai livelli di controllo. Un profilo piuttosto simile al WT è stato osservato per il mutante Y398A, data la sua internalizzazione, dopo stimolazione con il ligando ($P<0.01$) ed il suo riciclo, indotto dall'antagonista SR. Nessuna riduzione del segnale relativo al recettore è stato, invece, osservato per il mutante N394A. Sorprendentemente, il trattamento con 1 μM SR, sia se eseguito da solo che in combinazione con 100 nM CP, aumenta significativamente il segnale relativo al mutante P395A, riportandolo ad un livello superiore rispetto al segnale di controllo (Fig.A.4, A).
Per definire quest'ultimo l'effetto, abbiamo focalizzato la nostra attenzione solo sul WT e sul mutante P395A, verificando la possibilità di un'azione a lungo termine del buffer d'incubazione HBS/BSA e la stabilità dell'incremento indotto dall'SR, nel corso dell'esperimento.
Per verificare la prima ipotesi, le cellule HEK sono state stimolate con 1 μM SR, in un esperimento di "time course" (30-90 min). Nessun incremento di segnale è stato osservato dopo un trattamento con il solo buffer HBS/BSA, per 90 min. Mentre il segnale relativo a CB1 WT è piuttosto costante nel corso del trattamento, quello per il mutante P395A incrementa a partire da 45 fino a 90 min (Fig.A.4, B).

Per capire se l'incremento del livello di espressione del mutante P395A - indotto da SR - sia un effetto stabile o solo transitorio, abbiamo trattato le cellule HEK con 1 μM SR, per 90 min, le abbiamo lavate con 200 μl 1X PBS ed abbiamo aggiunto 100 μl HBS/BSA, in un esperimento di "time course" (5-90 min) (Fig.A.4, C). Inaspettatamente, un lavaggio di 5 min cancella l'effetto dell'SR e causa una riduzione dei livelli del recettore. Questo effetto è stabile fino a 30 min ed è poi seguito da un nuovo incremento del segnale a partire da 45 min di trattamento ($P<0.01$).

L'effetto dell'SR sul mutante P395A è stato pure valutato attraverso un esperimento di IFL, seguito da un'analisi di microscopia confocale.

L'esperimento è stato condotto sia in presenza di saponina, un agente permeabilizzante che ha consentito di localizzare il segnale relativo ai recettori all'interno delle cellule, che in assenza di saponina, così da limitare l'osservazione alla membrana plasmatica.

Il segnale relativo a CB1 WT è prevalentemente localizzato sulla membrana cellulare, nel controllo (Fig.A.5, A1); l'internalizzazione del recettore è stata osservata dopo una stimolazione con 100 nM CP, per 90 min (Fig.A.5, A2) ed è completamente inibita dal trattamento con 1 μM SR (Fig.A.5, A3). L'internalizzazione del recettore WT (Fig.A.5, B2), rispetto al controllo (Fig.A.5, B1) ed il suo riciclo (Fig.A.5, B3) sono chiaramente visibili anche nell'esperimento eseguito in assenza di saponina.

Come per il WT, abbiamo condotto un trattamento con e senza saponina per l'analisi dell'internalizzazione del mutante P395A. Nel controllo, in presenza di saponina, il segnale relativo al mutante P395A è localizzato in piccole vescicole abbondanti, vicine alla membrana plasmatica (Fig.A.5, C1). Dopo 90 min di stimolazione con CP, vescicole di grandezza superiore sono visibili nelle cellule (Fig.A.5, C2); questo effetto è quasi del tutto bloccato dal trattamento con 1 μM SR (Fig.A.5, C3).

Nell'esperimento condotto in assenza di saponina, un segnale relativo al mutante P395A è localizzato sulla membrana delle cellule HEK di controllo, a livelli inferiori rispetto a quelli relativi al WT (Fig.A.5, D1). Dopo la stimolazione con 100 nM CP, per 90 min, è stato osservato un debole decremento del segnale, data l'internalizzazione del recettore (Fig.A.5, D2); la stimolazione con 1 μM SR produce, infine, un forte incremento del segnale sulla membrana plasmatica (Fig.A.5, D3).

A.3.3 Ruolo del motivo “NPxxY” nell’accoppiamento del recettore alle proteine G, attraverso l’analisi dell’attivazione delle MAPK.

Per verificare un possibile ruolo del motivo “NPxxY” nella desensibilizzazione del recettore CB1, abbiamo condotto il saggio delle MAPK, stimolando le cellule HEK con 100 nM CP, in un esperimento di “time course” (3-20 min) ed osservando i picchi di espressione in un esperimento di In cell western.

Il picco di attivazione delle MAPK è stato osservato nei primi 3 e 5 min di stimolazione con 100 nM CP per il recettore WT.

Un picco di più debole intensità è stato osservato per il mutante Y398A - che abbiamo visto internalizzare come il WT. Nessuna attivazione di queste chinasi è stata osservata per i mutanti N394A e P395A (Fig.A.6).

A.4 Discussione

I recettori accoppiati alle proteine G condividono una comune struttura molecolare, organizzata in sette domini transmembrana, ed un numero limitato di residui aminoacidici conservati, specialmente in regioni implicate nel "binding" con il ligando e nell'interazione con le proteine G, tanto quanto nella regolazione dell'internalizzazione. Uno di questi è il motivo "NPxxY", trovato nel settimo dominio transmembrana di molti GPCRs.

Numerosi dati circa la funzione di questa sequenza, ottenuti mediante studi di mutagenesi *in vitro*, hanno dimostrato un suo coinvolgimento nella regolazione dell'attivazione, fosforilazione, internalizzazione e sequestro del recettore - presumibilmente - controllando l'affinità del recettore con le proteine G.

In questo lavoro, ci siamo proposti di esaminare la funzione del motivo "NPxxY" nella regolazione del traffico del recettore CB1, mediante esperimenti di mutagenesi sito-specifica; abbiamo, dunque, mutato i residui N394, P395 ed Y398 ad alanina ed abbiamo utilizzato questi recettori mutati per trasfettare stabilmente cellule HEK.

Una delle prime funzioni investigate per questi mutanti è stata quella dell'internalizzazione. A tale scopo, abbiamo condotto esperimenti di dose-risposta e di time course, servendoci del ligando CP.

Il risultato ottenuto è stato veramente interessante dal momento che la mutazione N394A inibisce completamente l'internalizzazione del recettore, mentre la mutazione Y398A non altera l'efficienza di questo processo.

Il mutante P395A ha un normale profilo di internalizzazione nei primi minuti del trattamento, poi il suo segnale incrementa, probabilmente a causa di un più rapido riciclo verso la membrana.

Servendoci della metodica di immunofluorescenza, supportata dalla microscopia confocale, abbiamo localizzato il recettore WT ed i mutanti in cellule HEK ed abbiamo valutato i loro profili di internalizzazione. Come negli esperimenti di On cell western, nessuna internalizzazione è visibile per il mutante N394A ed un'internalizzazione efficiente quanto quella del WT è evidente per il mutante Y398A.

Circa la mutazione P395A, abbiamo ipotizzato che essa possa aver danneggiato il normale traffico del recettore verso la membrana, data la localizzazione del mutante in larghe vescicole citoplasmatiche, piuttosto che sulla membrana plasmatica, come il WT.

Il trattamento con l'antagonista SR determina, inoltre, un forte incremento del segnale

immunoreattivo, relativo al mutante P395A, sulla membrana cellulare, probabilmente aumentandone l'efficienza di riciclo.

Questa ipotesi è stata supportata da un secondo esperimento - condotto trattando le cellule con 1 μM SR, in un esperimento di "time course". A differenza del recettore WT, il mutante P395A risponde all'antagonista con un'efficienza maggiore, a partire da 45 min di stimolazione con SR (Fig.A.4, B).

La stabilità di questo incremento è stata valutata in un esperimento in cui le cellule sono state stimolate con l'antagonista SR per 90 min e, poi, sottoposte ad un lavaggio con il buffer HBS/BSA, in un "time corse". Dopo una riduzione del segnale relativo al mutante P395A, in seguito ai primi 30 min di lavaggio, un nuovo incremento è stato osservato a partire da 45 min di stimolazione (Fig.A.4, C), probabilmente dovuto ad un pool di molecole di SR ancorate alla membrana e responsabile di questo effetto ritardato.

L'effetto dell'antagonista sul mutante P395A è stato, in seguito, valutato mediante immunofluorescenza. Un esperimento condotto senza saponina ci ha permesso di limitare l'osservazione del segnale alla membrana plasmatica: il livello basale del mutante P395A, nel controllo, è risultato più basso del WT, dando valore alla nostra ipotesi circa un traffico vescicolare danneggiato verso la membrana plasmatica. Dopodichè, la stimolazione con l'antagonista incrementa significativamente il livello di espressione di questo mutante rispetto al controllo, confermando la nostra ipotesi circa una più efficiente attività di riciclo.

Per molti recettori, la desensibilizzazione e l'internalizzazione sono fenomeni dissociati, mentre per altri recettori, ciascuno di questi meccanismi è essenziale per il corretto evolversi dell'altro. A tal proposito, ci siamo proposti di capire se per il recettore CB1 l'inibizione dell'internalizzazione possa corrispondere ad un danneggiato "binding" con le proteine G e, dunque, ad una ridotta stimolazione delle MAPK, un effettore a valle.

A tale scopo, abbiamo condotto il saggio delle MAPK: le cellule HEK sono state stimolate con 100 nM CP, in un esperimento di "time corse" e l'attivazione delle protein chinasi è stata analizzata tramite un esperimento di In cell western. Mentre il recettore WT raggiunge un picco di attivazione delle chinasi dopo 3 e 5 min di stimolazione con il ligando, il mutante Y398A raggiunge un picco di minore intensità, non diverso da quello del WT. I mutanti N394A e P395A, incapaci di internalizzare regolarmente, mostrano dei picchi di attivazione delle protein chinasi ridotti rispetto al WT.

I nostri esperimenti sono serviti, dunque, a dimostrare che la posizione N394 è estremamente importante nella regolazione del meccanismo d'internalizzazione del recettore. Il residuo Y398, al contrario, non influenza l'attività di CB1, come osservato dalla regolare funzionalità del mutante, sia in termini di internalizzazione/riciclo che in termini di attivazione delle MAPK.

Infine, il residuo P395 si è rivelato importante nel controllo di varie funzioni del recettore. Il mutante P395A mostra, infatti, una ridotta efficienza d'internalizzazione, sia quando viene stimolato ad alte concentrazioni di ligando sia se viene stimolato per un periodo di tempo prolungato. Il suo traffico vescicolare verso la membrana potrebbe, inoltre, essere danneggiato - probabilmente a causa di un "misfolding" che localizza il recettore in strutture reticolo simili. Ancora, tale mutante risponde al trattamento con l'antagonista SR più efficientemente del WT, riciclando più velocemente verso la membrana.

Pertanto, l'analisi di specifici siti aminoacidici - mediante studi di mutagenesi *in vitro* - rappresenta un utile ed interessante approccio per la valutazione del loro ruolo nel controllo della corretta funzionalità del recettore.

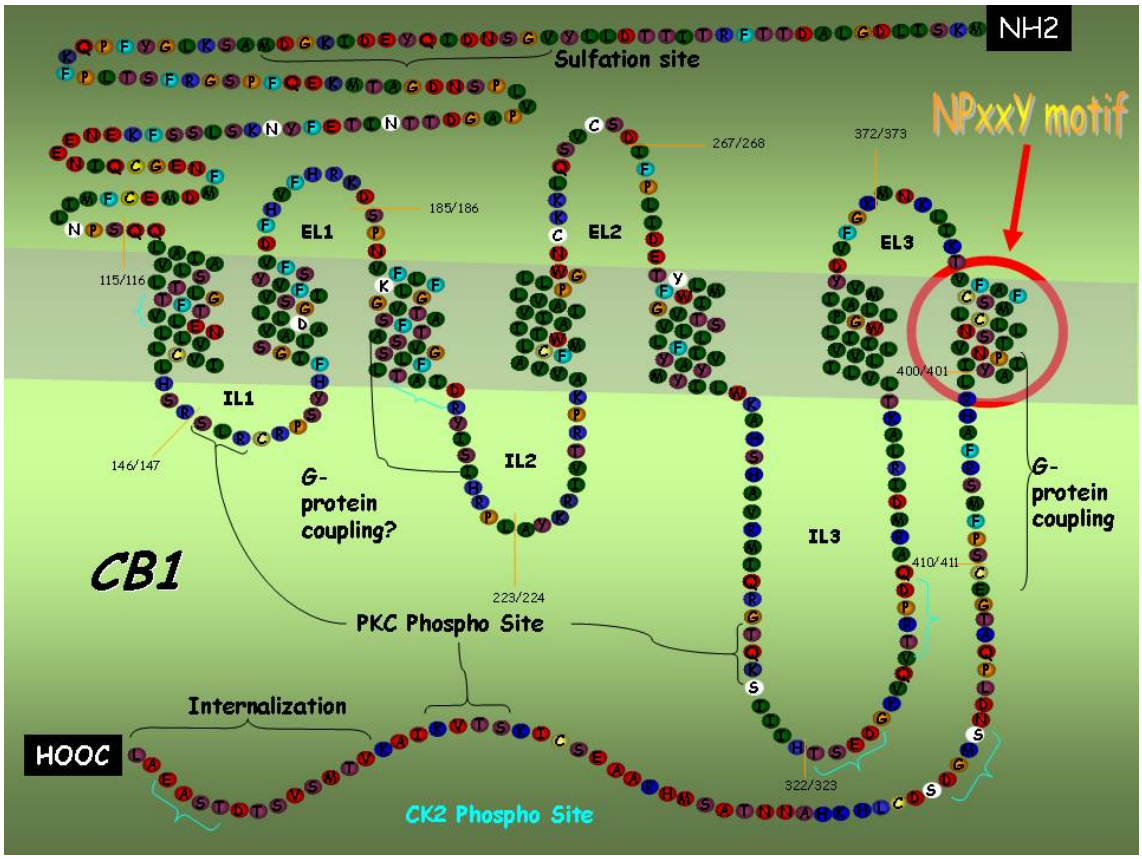


Fig.A.1 Rappresentazione schematica della struttura del recettore CB1. La posizione dei residui N394, P395 ed Y398 che abbiamo modificato ad alanina, mediante saggi di mutagenesi sito-diretta, è stata cerchiata in rosso. Siti del recettore sottoposti a fosforilazione ad opera di chinasi come PKC o CK2 e domini importanti per la sua internalizzazione o il suo accoppiamento alle proteine G sono stati pure evidenziati.

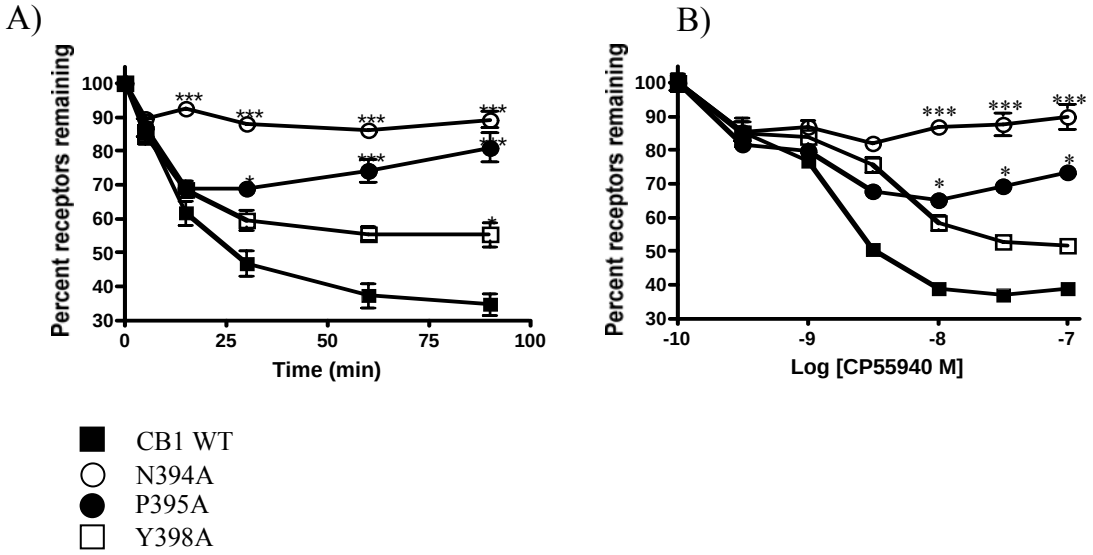


Fig.A.2 Esperimenti di internalizzazione indotta da ligando condotti su cellule HEK, esprimenti il recettore CB1 WT o i mutanti N394A, P395A, Y398A. Le cellule sono state stimolate con 100 nM CP, in un esperimento di "time course" (5-90 min) (A).
B) Esperimento di dose-risposta eseguito stimolando le cellule con il ligando CP, per 30 min, a 37°C.
I dati sono stati analizzati mediante l'ANOVA test, comparando i valori del WT a quelli dei mutanti (*, $P<0.05$; ***, $P<0.01$).
Essi sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come percentuale di recettore rimanente su membrana ± *s.e.m.*

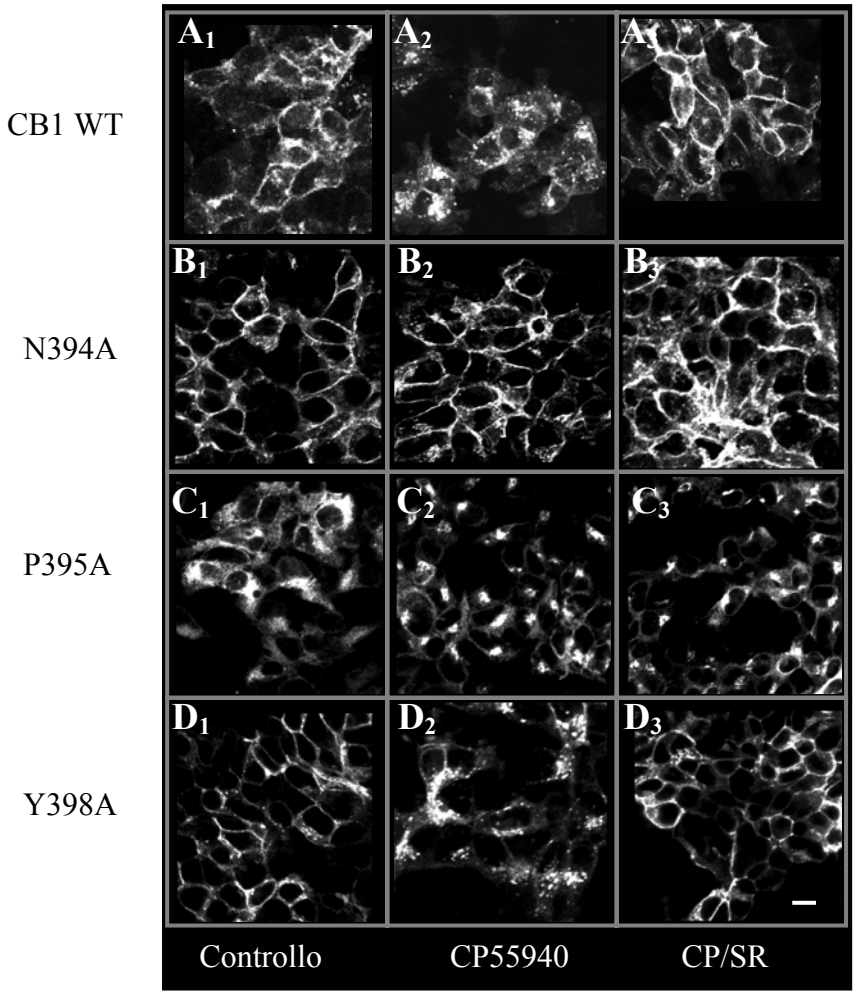


Fig.A.3 Esperimento di immunofluorescenza, seguito da analisi al microscopio confocale. Le cellule HEK sono state stimolate per 30 min, con 100 nM di CP, a 37°C o con 100 nM CP in combinazione con 1 μM SR. Nel controllo, le cellule sono state trattate con il solo buffer HBS/BSA. *Scala*: 40 μm.

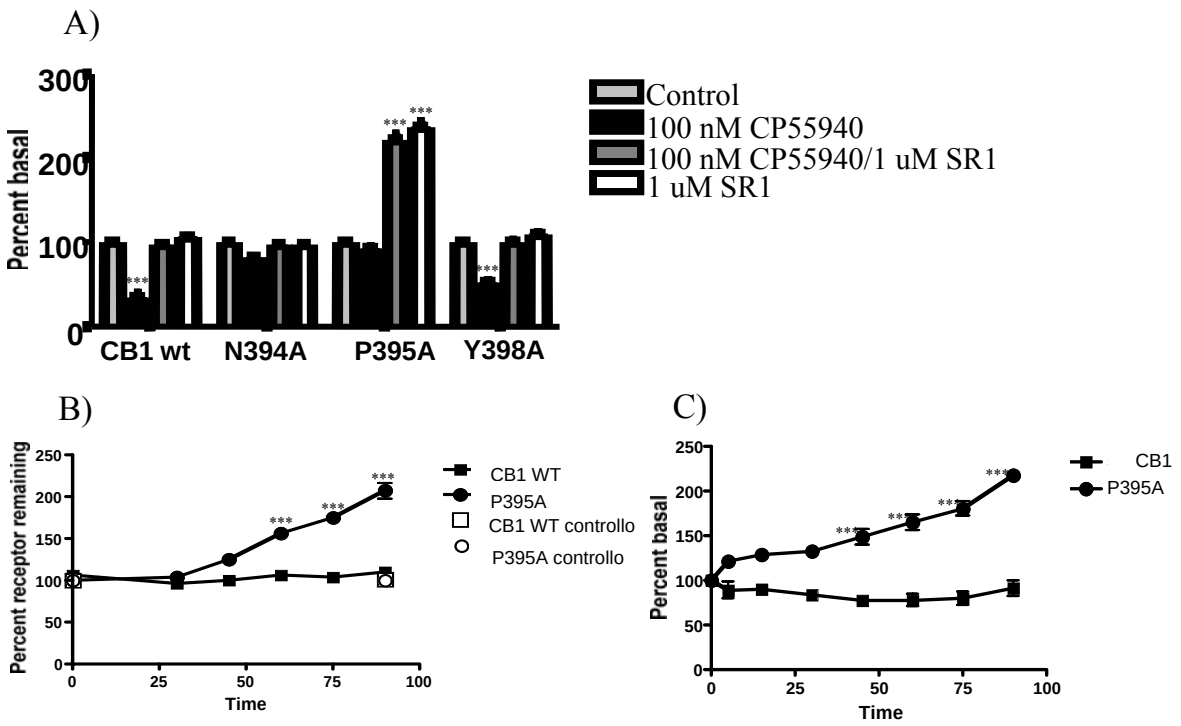


Fig.A.4 Le cellule HEK, esprimenti il recettore WT ed i mutanti, sono state stimolate con 100 nM CP, con CP in combinazione con 1 μM SR e con 1 μM SR da solo, per 90 min, a 37°C (A). L'effetto dell'SR sul mutante P395 è stato valutato mediante un trattamento con l'antagonista, alla dose di 1 μM, in un esperimento di "time course" (B). La stabilità dell'incremento del livello del mutante P395A, indotto dal trattamento con 1 μM SR, per 90 min, è stata analizzata mediante lavaggi con HBS/BSA, in un esperimento di "time course" e comparando l'intensità del segnale a quello del WT (C).

I dati sono stati analizzati mediante l'ANOVA test, comparando i valori del WT a quelli dei mutanti (*, $P<0.05$; ***, $P<0.01$).

Essi sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come percentuale di recettore rimanente su membrana ± *s.e.m.*

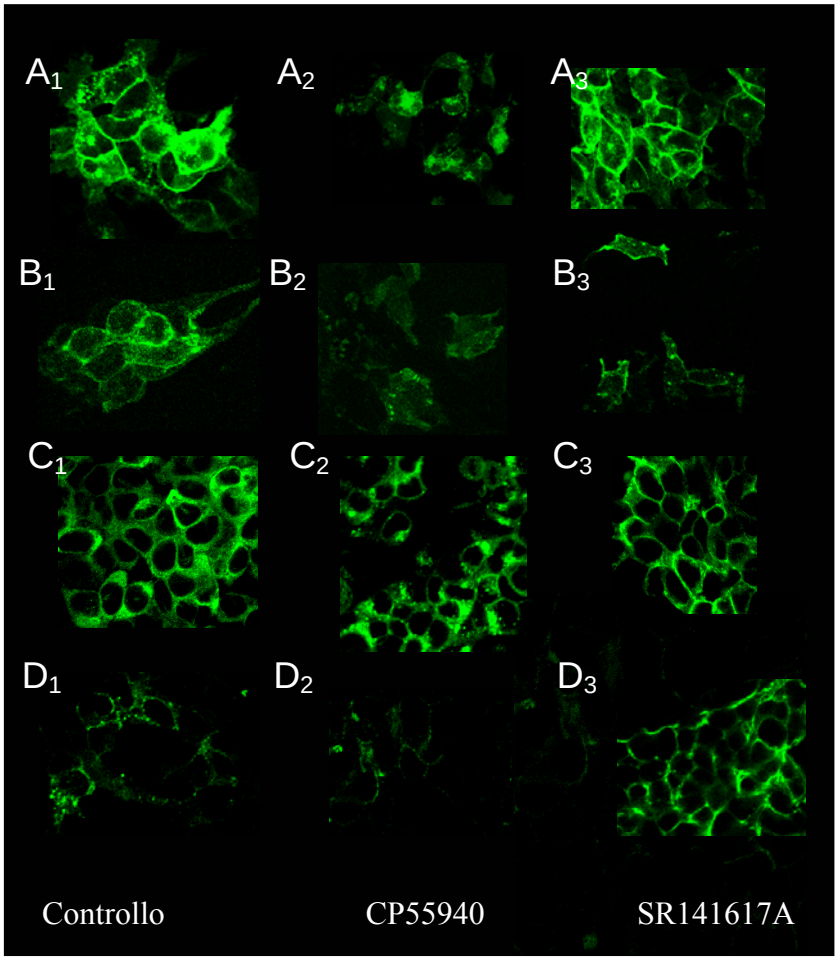


Fig.A.5 Trattamento permeabilizzante con saponina (pannelli A e C) e senza saponina (pannelli B e D). Dopo la stimolazione delle cellule HEK con 100 nM CP, per 90 min, numerose vescicole endocitotiche sono risultate immunopositive per CB1 WT (A2); il recettore ricicla sulla membrana in seguito al trattamento con 1 μM SR (A3). L'efficienza dei processi di endocitosi e di riciclo del recettore è evidenziata nel trattamento senza saponina (B2; B3). I pannelli A1 e B1 rappresentano il controllo, in cui le cellule HEK sono state trattate con il solo buffer HBS/BSA.

Il trattamento con saponina nel mutante P395A non permette di distinguere chiaramente l'endocitosi (C2) dal riciclo del recettore (C3), rispetto al controllo (C1). Il trattamento condotto in assenza di saponina evidenzia, invece, un segnale di minore intensità sulla membrana cellulare nel controllo (D1), una riduzione del segnale dopo stimolazione con 100 nM CP (D2) ed un forte incremento del segnale in seguito a stimolazione con 1 μM SR (D3). *Scala*: 40 μm.

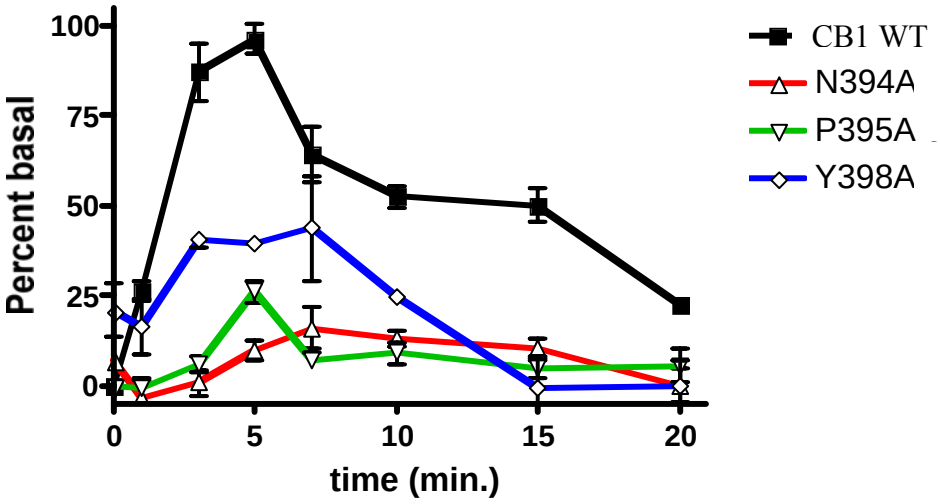


Fig.A.6 Il saggio delle MAPK è stato eseguito per analizzare la capacità del recettore CB1 WT e con il motivo"NPxxY" mutato di interagire con le proteine G. Le cellule sono state stimolate con 100 nM CP, in un esperimento di "time course" (3-20 min); l'attivazione delle MAPK è stata valutata tramite un esperimento di In cell western.

I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come percentuale di recettore rimanente su membrana ± *s.e.m.*

APPENDICE B

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELL'ENZIMA DEUBIQUITINANTE mUBPy DURANTE LA SPERMATOGENESI DI *Rana esculenta*.

Meccariello R., Chianese R., Scarpa D., Berruti G., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S. (2007). UBPy/MSJ-1 system during male germ cell progression in the frog, *Rana esculenta. Gen Comp Endocrinol* **153**: 275-279.

Riassunto

Il “folding” proteico, un processo altamente regolato all’interno delle cellule, permette ad una determinata catena polipeptidica di acquisire una specifica conformazione tridimensionale. La proteina - in una forma attiva - riesce, così, ad espletare la propria funzione in un determinato distretto cellulare. Tale processo risulta modulato dagli chaperoni e dal sistema ubiquitina/proteasoma. La fine regolazione del “folding” appare fondamentale per la sopravvivenza cellulare, soprattutto in vista dei numerosi studi atti a dimostrare che le catene polipeptidiche “misfolded”, sfuggendo al controllo di qualità, possono depositarsi nel citoplasma sottoforma di aggregati citotossici, come nel caso di numerose patologie neurodegenerative.

La spermatogenesi, soprattutto durante la fase di spermioistogenesi, prevede la formazione di nuove strutture cellulari, nonché importanti cambiamenti nella composizione delle proteine. Appare, così chiara la richiesta di un’attività altamente coordinata tra le proteine HSP70/DNAJ ed il macchinario di ubiquitinazione in tale processo.

mUBPy (mouse ubiquitin processing protease) è un enzima deubiquitinante, espresso nel testicolo e nell’encefalo di topo. Nel testicolo, esso interagisce con MSJ-1 (mouse sperm cell specific DnaJ first homologue), una tipica proteina DNAJ, espressa negli spermatidi e negli spermatozoi.

Avendo precedentemente dimostrato la presenza di MSJ-1 nel testicolo e nel sistema nervoso centrale di *Rana esculenta*, abbiamo voluto dimostrare che anche l’enzima deubiquitinante mUBPy sia conservato nel nostro modello sperimentale.

Mediante Western blot, abbiamo osservato un segnale specifico di 126 kDa nel testicolo e negli spermatozoi isolati. Durante il ciclo riproduttivo annuale, il segnale aumenta gradualmente appena riprende la spermatogenesi, dopo la stasi invernale. Usando l’analisi immunocitochimica, abbiamo localizzato la proteina negli spermatidi e negli spermatozoi.

In conclusione, il sistema UBPy/MSJ-1 è presente nel testicolo di *R. esculenta*, suggerendo una funzione conservata fondamentale nella spermatogenesi e nella formazione degli spermatozoi.

B.1 Introduzione

Il controllo della qualità delle proteine è un processo fondamentale per la vita delle cellule. L'azione concertata del macchinario molecolare costituito dagli chaperoni e dal sistema ubiquitina/proteasoma regola il bilancio tra il "folding" e la degradazione proteica.

Il "folding" proteico è un processo altamente regolato. La catena aminoacidica lineare deve essere convertita in un'unica struttura tridimensionale che definisce lo stato biologico attivo della proteina (Esser *et al*., 2004).

Il "misfolding" proteico è un processo che è stato associato a patologie umane, caratterizzate da un deposito abnorme di polipeptidi erroneamente ripiegati. Tra queste, si ricordano alcune patologie neurodegenerative gravi, come il morbo di Alzheimer, la corea di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (Taylor *et al*., 2002). Sebbene non sia chiaro se la presenza di questi aggregati proteici nei neuroni danneggiati sia la causa o la conseguenza delle patologie cellulari sopra menzionate, c'è un'ampia evidenza che la tendenza di polipeptidi "misfolded" di aggregarsi con parti della propria catena o con catene di altre proteine possa alterare gravemente le funzioni cellulari causando citotossicità (Horwich, 2002).

Non è dunque sorprendente che si siano evoluti meccanismi molecolari responsabili di controllare e prevenire l'accumulo di polipeptidi "misfolded". In tal senso, due differenti strategie si sono sviluppate: proteine non-native possono essere riconosciute dagli chaperoni molecolari - come le proteine heat shock (HSP) - che coordinati dalle proteine DNAJ promuovono il "refolding" ad uno stato nativo - quando possibile - oppure possono essere rimosse dal macchinario proteolitico rappresentato dal sistema ubiquitina/proteasoma. Quest'ultimo processo solitamente comporta l'attacco di una catena poliubiquitinica al substrato proteico target.

L'ubiquitina (Ub) è una proteina altamente conservata di 8 kDa che si lega covalentemente a residui di lisina presenti sulla proteina target. Le modificazioni ubiquitina dipendenti possono essere di diverso tipo ed innescano differenti risposte cellulari. Quando si ha monoubiquitinazione una singola molecola di Ub si attacca ad un singolo residuo di lisina, tale fenomeno si osserva durante il processo di endocitosi, il riparo del DNA danneggiato, la regolazione istonica; multipli eventi di mono-ubiquitinazione determinano, invece, una multi-ubiquitinazione, modificazione osservata soprattutto durante l'endocitosi. La poli-ubiquitinazione, infine, consiste

nell'attacco di una catena di più molecole di Ub ad uno o più residui di lisina. In quest'ultimo caso, se la catena di molecole di Ub si lega ad un residuo di lisina 48 della proteina target, quest'ultima sarà destinata alla degradazione proteosomica; se, invece, tale catena si lega alla lisina 63 della proteina target, il segnale ottenuto determina il riparo del DNA o l'attivazione di proteine chinasi (Fig.3) (Haglund *et al*., 2005).

La coniugazione delle molecole di Ub al substrato proteico richiede l'intervento di almeno tre differenti enzimi. Il primo è l'enzima attivante l'ubiquitina o E1, responsabile dell'attivazione ATP-dipendente della porzione C-terminale dell'Ub; tale enzima forma con la molecola di Ub un legame covalente.

L'Ub viene poi trasferita ad un residuo di cisteina presente nel sito attivo del secondo enzima E2. Infine, un terzo fattore E3 catalizza il trasferimento dell'Ub ad un residuo di lisina presente nel substrato proteico (Amerik *et al*., 2004).

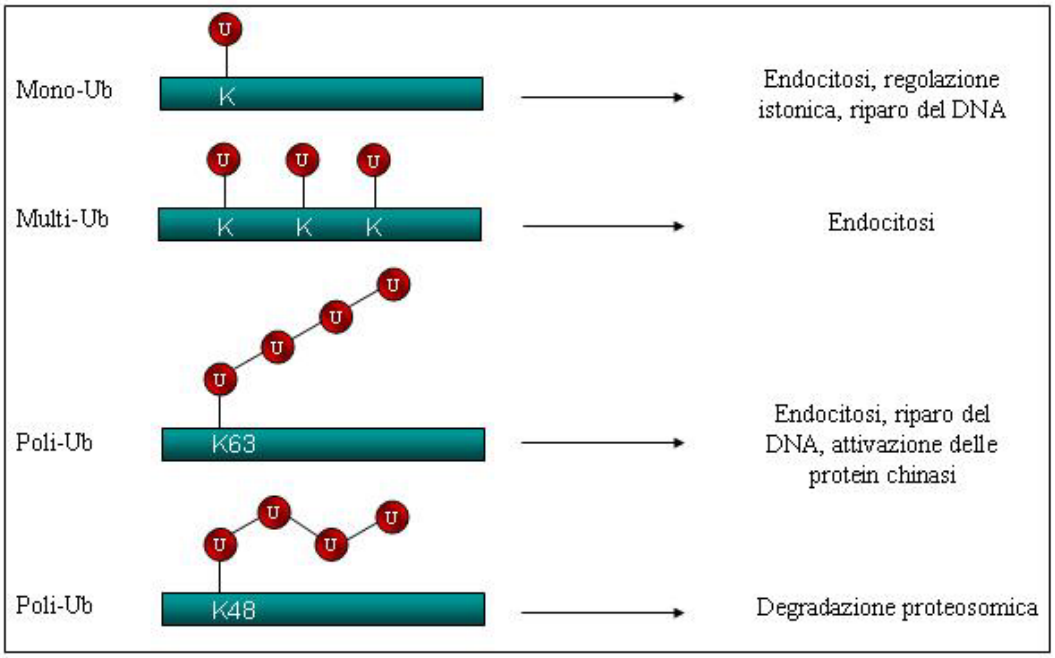


Fig.3 Rappresentazione schematica dei diversi tipi di ubiquitinazione ed elenco dei processi in cui è possibile che tali modificazioni si verifichino.

La rimozione di molecole di Ub dalle proteine ad esse coniugate è mediata dall'intervento degli enzimi deubiquitinanti (DUBs) che agiscono prima che la proteolisi del substrato possa aver luogo. Tali enzimi sono distinti in cinque gruppi sulla

base dell'omologia di sequenza: le idrolasi C-terminali Ub-dipendenti (UCHs) e le proteasi Ub-specifiche (UBPs) sono gli enzimi più noti (Wilkinson *et al*., 1997).

La spermatogenesi è un evento complesso consistente in proliferazione mitotica, divisione meiotica e rimodellamento cellulare (Kierszenbaum, 1994). Specialmente durante la spermiogenesi, nuove strutture come l'acrosoma ed il flagello si sviluppano ed altre sono degradate; in tal senso, cambiamenti importanti nella composizione delle proteine hanno luogo. Come conseguenza di ciò, un'attività altamente coordinata tra le proteine HSP70 e DNAJ ed il macchinario di ubiquitinazione è richiesta. Alcuni difetti nell'espressione degli chaperoni o nel sistema di ubiquitinazione sono stati associati ad alterazioni della spermatogenesi (Kwon *et al*., 2005).

Mediante screening molecolare di una cDNAteca di embrione murino è stato recentemente identificato un nuovo enzima deubiquitinante, chiamato mUBPy o USP8. Anche se presente prevalentemente nel sistema nervoso centrale del topo, mUBPy è espresso ad alti livelli negli spermatociti (SPC) e negli spermatidi (SPT) tondi e permane negli SPT allungati e negli spermatozoi (SPZ) (Gnesutta *et al*., 2001).

Negli SPZ epididimali, mUBPy assume una localizzazione periacrosomale e centriolare; un debole segnale è visibile anche nel segmento principale del flagello. Un saggio di immunoprecipitazione, infine, ha evidenziato la formazione di un complesso tra l'enzima mUBPy e la proteina DNAJ, MSJ-1. Un'ipotesi interessante indica mUBPy, da solo o in associazione con MSJ-1, come un enzima coinvolto nella formazione di un centro di organizzazione microtubulare funzionante nello zigote dei mammiferi (Berruti *et al*., 2005).

Interessante è stato lo studio di Row *et al.* (2006) basato sull'analisi dell'effetto dell'inattivazione del sito catalitico di UBPy nel traffico endosomale. Il mutante UBPy risulta localizzato nei primi endosomi, oltre che nel citosol e sulla membrana plasmatica di cellule HeLa e causa un incremento dei livelli di proteine ubiquitinate sulle vescicole endosomali. Il "knockdown" di UBPy promuove, inoltre, l'accumulo di strutture multivescicolari aberranti nell'area perinucleare, strettamente associate tra loro a formare dei gruppi tetramerici.

Avendo precedentemente identificato un gene *msj-1*-like nel nostro modello sperimentale, *R. esculenta* (Meccariello *et al*., 2004), per verificare la possibilità che tale DNAJ possa formare un sistema con l'enzima mUBPy e che tale sistema possa essere conservato tra i vertebrati, abbiamo analizzato il profilo della proteina mUBPy nel testicolo di rana, durante il ciclo riproduttivo annuale. La sua localizzazione è stata

pure dimostrata in cisti di spermatidi e negli SPZ prelevati dalla cloaca, mediante un approccio istologico.

B.2 Materiali e metodi

B.2.1 Raccolta di animali e tessuti.

Quindici maschi di *R. esculenta* sono stati catturati mensilmente da novembre a maggio nelle vicinanze di Napoli; cinque animali aggiuntivi sono stati catturati a luglio. Le rane sono state anestetizzate con MS222 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ed uccise per decapitazione immediatamente dopo la cattura per minimizzare lo stress. I testicoli sono stati rimossi e conservati immediatamente a -80°C per un'analisi proteica o fissati nel fissativo di Bouin per l'immunocitochimica. Questa ricerca è stata approvata dal Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica.

B.2.2 Estrazione di proteine totali.

I testicoli sono stati delicatamente omogeneizzati in un buffer di lisi freddo (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, pH 8.1, 0.5 mM spermidina, 12% glicerolo e 0.5 mM DTT) (1 g tessuto/5ml) contenente inibitori di proteasi [0.5 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 4 µg/ml leupeptina, 4 µg/ml chimostatina, 4 µg/ml pepstatina A e 5 µg/ml N-tosillfenilalaninacrolometilchetone (TPCK)]. I campioni sono stati, poi centrifugati a 10.000*g*, a 4°C per 30 min per ottenere un lisato chiarificato. La quantità delle proteine totali estratte è stata valutata mediante il metodo di Lowry (Lowry *et al*., 1955).

B.2.3 Western blot.

Venticinque microgrammi di proteine totali/mese da testicoli e spermatozoi di rana sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, su un gel al 9%. La parte inferiore del gel (contenente proteine della taglia compresa tra 40 e 25 kDa) è stata tagliata e colorata con Blu di Comassie per valutare i livelli di proteine sul gel. La parte superiore del gel è stata, invece, trasferita su membrane in PVDF (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) per 2.5 h a 280 mA, a 4°C. Le membrane sono state lavate in PBS, pH 7.6 (20 mM NaH_2PO_4, 80 mM Na_2HPO_4 e 100 mM NaCl) e trattate per 2 h con la soluzione di bloccaggio [5% latte scremato in polvere in TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl e 0.25 % Tween 20)]. L'ibridazione è stata effettuata usando un anticorpo anti-mUBPy diluito 1:3000 in PBS con il 4% di latte scremato in polvere, tutta la notte, a 4°C. Le membrane sono state lavate 3x15 min in TBS-T ed incubate per 1h a temperatura ambiente con un anticorpo di coniglio coniugato con perossidasi di rafano

(Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) diluito 1:1200 in TBS, 1% Siero Suino Normale (NSS) (Dako Cytomation). Dopo una serie aggiuntiva di lavaggi, gli immunocomplessi sono stati analizzati usando il sistema di detection ECL per Western blot (Amersham Pharmacia Biotech). Le membrane sono state disibridate in un buffer di strippaggio (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoetanolo) a 60°C per 30 min e reibridate con l'anticorpo primario pre-assorbito con un largo eccesso (10^{-6} M) del corrispondente antigene [(una proteina di fusione tra GST e 119 aa di mUBPy nelle posizioni tra 542-660)] (Gnesutta *et al*., 2001) per valutare la specificità dell'anticorpo.

B.2.4 Anticorpo.

Un anticorpo policlonale mUBPy è stato prodotto nel coniglio contro una proteina ricombinante ottenuta dalla fusione di una glutatione S trasferasi (GST) ed i residui aminoacidici 542-660 della proteina mUBPy di topo (Gnesutta *et al*., 2001).

B.2.5 Raccolta di spermatozoi.

La spermiazione è stata indotta iniettando nel sacco dorsale delle rane un agonista del GnRH (GnRHa, buserellina), 10^{-5} M in 100 µl di buffer Krebs-Ringer per anfibi (KRB) (Minucci *et al*., 1989). Due ore dopo l'iniezione, gli spermatozoi sono stati raccolti dalla cloaca con una pipetta pasteur. Gli spermatozoi appena raccolti sono stati immediatamente processati per un'estrazione di proteine o strisciati su vetrini rivestiti di poli-L-lisina, seccati, fissati con 50% etanolo, 50% acetone e processati per un'analisi immunocitochimica.

B.2.6 Estrazione di proteine da spermatozoi.

Gli spermatozoi appena raccolti sono stati lisati in un buffer freddo (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% sodio deossicolato e 0.1% SDS) contenente inibitori di proteasi. Il lisato è stato sonicato due volte per 15 sec ed è stato messo in agitazione per 1h a 4°C; l'estratto proteico chiarificato è stato raccolto dopo una centrifugata a 10,000*g* per 15 min a 4°C. La concentrazione proteica è stata valutata mediante il metodo di Lowry (Lowry *et al*., 1955).

B.2.7 Immunocitochimica.

I testicoli di rana sono stati fissati nel fissativo di Bouin per l'osservazione istologica. L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita in PBS 0.01 M, pH 7.1 e 0.3% H_2O_2

per 15 min. Per prevenire una colorazione di background, le sezioni di testicolo (5 µm) e gli spermatozoi sono stati lavati con PBS in una camera umida a temperatura ambiente. Le sezioni sono state incubate 16h a 4°C in una camera umida con l'anticorpo primario mUBPy diluito 1:150 in PBS, 3% BSA e 1% NSS (Dako Cytomation). Dopo un lavaggio in PBS, le sezioni sono state processate con il Quick kit sistema universale Vectastain ABC (Vector Laboratories, Inc., Burlinghane, CA), come da protocollo. I prodotti di immunoreazione sono stati visualizzati usando la 3,3'-diaminobenzidina tetracloruro (Sigma-Aldrich) e 0.3% H_2O_2 in Tris buffer 0.05 M.
Per valutare la specificità delle immunoreazioni, i controlli sono stati trattati omettendo uno step della reazione o usando l'anticorpo primario pre-assorbito con un largo eccesso (10^{-6} M) del peptide corrispondente.

B.2.8 Statistica.

Le autoradiografie di Western blot sono state quantizzate tramite analisi densitometrica allo scanner usando Ultroscan XL, LKB (Svezia). Il segnale di mUBPy è stato corretto sulla base del contenuto proteico (segnali di mUBPy/contenuto proteico) valutato tramite colorazione con Blu di Comassie. I dati sono riportati come incremento della densità ottica (OD), rispetto al valore minimo. La quantità relativa dei segnali è espressa come media dell'incremento rispetto al valore minimo (fold increase) ± *s.e.m.*. Il test ANOVA, seguito dal test di Duncan per il confronto tra più gruppi è stato condotto per valutare la significatività delle differenze.

B.3 Risultati

Usando un anticorpo anti-mUBPy, abbiamo evidenziato, mediante Western blot, una banda di 126 kDa nel testicolo di rana (Fig.B.1, A). La specificità del segnale è stata dimostrata attraverso l'incubazione del filtro con l'anticorpo primario pre-assorbito con un largo eccesso del corrispondente peptide (Fig.B.1, B).

Per valutare possibili fluttuazioni mensili dei livelli di mUBPy, abbiamo analizzato il suo profilo d'espressione da novembre a maggio (Fig.B.1, A e C). Tale periodo è stato scelto in quanto rappresentativo in *R. esculenta* di tutte le fasi della spermatogenesi (Rastogi *et al*., 1976). Il segnale di mUBPy è basso nell'autunno avanzato (novembre-dicembre) - quando il testicolo di rana è ricco di cellule germinali post-meiotiche che si stanno differenziando in spermatozoi - ed incrementa gradualmente da gennaio a maggio, quando si verificano la degenerazione di stadi post-meiotici (stasi invernale), la spermiazione e la ripresa della spermatogenesi (Rastogi *et al*., 1976).

In contrasto, il pattern di espressione di MSJ-1 raggiunge un picco in autunno, si riduce durante la stasi invernale ed è ancora basso quando la spermatogenesi riprende (Fig.B.1, C). Durante il ciclo riproduttivo annuale di *R. esculenta*, la spermatogenesi raggiunge un plateau nel periodo primavera-estate; in particolare, tutte le cellule germinali - dagli spermatogoni agli spermatidi - sono presenti nel testicolo da maggio ad agosto. Dal momento che siamo particolarmente interessati alla comparsa degli stadi post-meiotici, per localizzare mUBPy nel testicolo, sono stati scelti gli animali di novembre e luglio. La quantità della proteina mUBPy negli animali di novembre e di luglio è stata analizzata mediante Western blot. A novembre una ridotta immunoreattività è osservabile in cisti di spermatidi e negli spermatozoi (Fig.B.2, A); una più forte immunoreattività è mostrata negli stessi tipi cellulari del testicolo di luglio (Fig.B.2, B). La specificità della reazione è stata dimostrata omettendo l'incubazione con l'anticorpo primario o usando un anticorpo precedentemente preassorbito con un largo eccesso (10^{-6}M) del corrispondente antigene (Fig.B.2, C). L'analisi di Western blot - condotta usando proteine estratte dai testicoli utilizzati per l'immunocitochimica - conferma una più alta produzione di mUBPy a luglio (Fig.B.2, D, lanes 1 e 2). Per valutare la presenza dell'enzima mUBPy negli spermatozoi maturi, abbiamo indotto la spermiazione con un trattamento di GnRHa. L'analisi di Western blot, eseguita sul lisato degli spermatozoi, rivela una banda specifica, di 126 kDa di debole intensità (Fig.B.2, D, lane 3).

L'analisi immunocitochimica, eseguita su spermatozoi appena raccolti dalla cloaca, conferma la presenza di mUBPy negli spermatozoi maturi. L'immunoreattività è ristretta ad un sottile anello nella testa degli spermatozoi (Fig.B.2, E). La specificità della reazione è stata dimostrata usando l'anticorpo primario preassorbito con un eccesso del peptide corrispondente (10^{-6} M) (dati non mostrati)

B.4 Discussione

In questo lavoro, abbiamo riportato il pattern di espressione della proteina mUBPy in un basso vertebrato, l'anfibio anuro *R. esculenta*. Infatti, usando un antisiero mUBPy, mediante analisi di Western blot, una banda specifica di circa 126 kDa è stata osservata nel testicolo di rana. La taglia è la stessa di quella trovata nel topo (Berruti *et al*., 2005). Similmente alle ubiquitine, gli enzimi deubiquitinanti hanno domini catalitici altamente conservati nella maggioranza degli eucarioti, inclusi gli invertebrati (Wilkinson *et al*., 1997); recentemente, la sequenza dell'mRNA di una specifica proteasi 8 dell'ubiquitina di *X. laevis* è stata depositata in Banca dati (numero di accesso BC043910). Questo cDNA codifica una proteina di 1063 aa con un'identità aminoacidica compresa tra il 57 ed il 60%, come emerso dal confronto con altre specie (*M. musculus, C. familiaris, P. troglodytes, M. mulatta, H. sapiens*).

Nel testicolo di rana, il profilo di mUBPy nel periodo novembre-marzo si sovrappone parzialmente al profilo di MSJ-1, precedentemente descritto (Meccariello *et al*., 2004). La produzione di mUBPy è alta a luglio e precede il picco di espressione di MSJ-1. Infine, mUBPy è stato localizzato nel testicolo di rana, a novembre ed a luglio, mesi rappresentativi di livelli di sintesi minimi ed alti, rispettivamente. In entrambi i mesi, mUBPy è localizzato in spermatidi rotondi ed allungati, così come negli spermatozoi, gli stessi tipi cellulari immunopositivi anche per MSJ-1 (Meccariello *et al*., 2004).

MSJ-1 è down-regolata nel testicolo del topo wobbler (Meccariello *et al*., 2002), un modello sperimentale affetto sia da degenerazione dei motoneuroni dell'encefalo e del midollo spinale che da una spermatogenesi difettosa (Heimann *et al*., 1991). Il fenotipo wobbler è dovuto ad una mutazione missenso L967Q nel gene *vsp 54*, codificante un membro del complesso retrogrado di proteine associate al Golgi (GARP) (Conibear *et al*., 2003). Inoltre, alterazioni nell'espressione dell'enzima deubiquitinante UCHL1 (Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1) sono correlate ad una spermatogenesi difettosa; la sua overespressione, infatti, causa l'arresto della meiosi I in topi transgenici (Wang *et al*., 2005). In contrasto, in topi *gad* mutanti, un modello sperimentale generato da una delezione del gene UCHL1 (responsabile dell'accumulo di aggregati proteici ubiquitinati nei terminali nervosi e della neurodegenerazione), si verifica il blocco della prima ondata apoptotica delle cellule germinali e manca il controllo di qualità degli SPZ (Kwon *et al*., 2005).

Recentemente, un enzima deubiquitinante, UCH/CeUBP130, è stato clonato in *C. elegans* e la sua inattivazione negli spermatozoi impedisce la formazione del fuso nelle uova fecondate (Lee *et al*., 2001), suggerendo un nuovo ruolo degli enzimi deubiquitinanti nella formazione dell'aster degli SPZ, basato sui microtubuli.

Con questo scopo, dal momento che abbiamo osservato mUBPy nel testicolo di *R. esculenta*, riteniamo che una funzione fondamentale, conservata dal punto di vista evolutivo, possa essere esercitata dalla proteina DNAJ e dall'enzima deubiquitinante durante la spermatogenesi. In tal senso, un'indagine ulteriore sarà condotta per identificare una possibile interazione diretta tra UBPy ed MSJ-1, al fine di trarre una più profonda conclusione circa il ruolo funzionale di questo enzima.

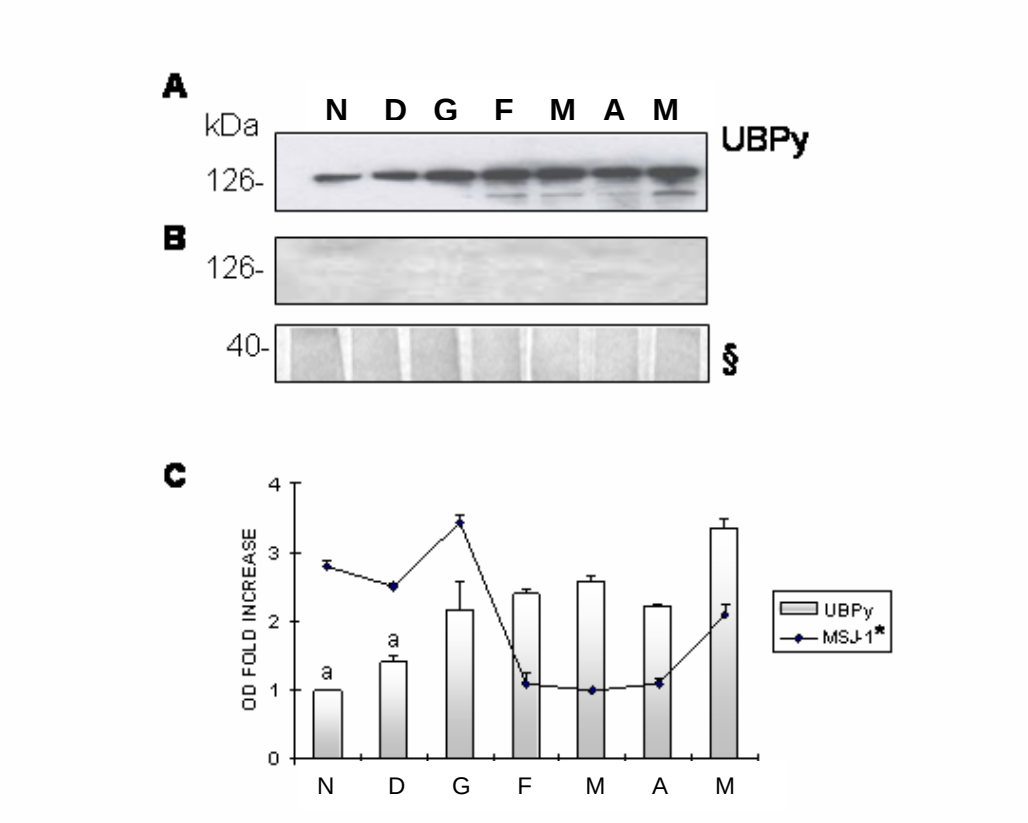


Fig.B.2 A) Analisi di Western blot della proteina mUBPy eseguita su proteine totali (25 µg) estratte da testicoli di *R. esculenta,* prelevati mensilmente da novembre a maggio. Un segnale di 126 kDa incrementa gradualmente con la ripresa della spermatogenesi. B) Saggio di specificità dell'anticorpo: la banda di 126 kDa scompare usando l'anticorpo mUBPy preassorbito con un largo eccesso dell'antigene corrispondente (10^{-6}M). § = parte del gel - contenente proteine della taglia compresa tra 40 e 25 kDa - tagliata e colorata con Blu di Comassie per valutare la quantità di proteine caricate su gel. C) Analisi densitometrica delle autoradiografie di Western blot. I dati sono espressi come media dell'incremento rispetto al valore minimo (fold increase) ± *s.e.m.* e sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti (p<0.01). * Dati da Meccariello *et al.*, 2004.

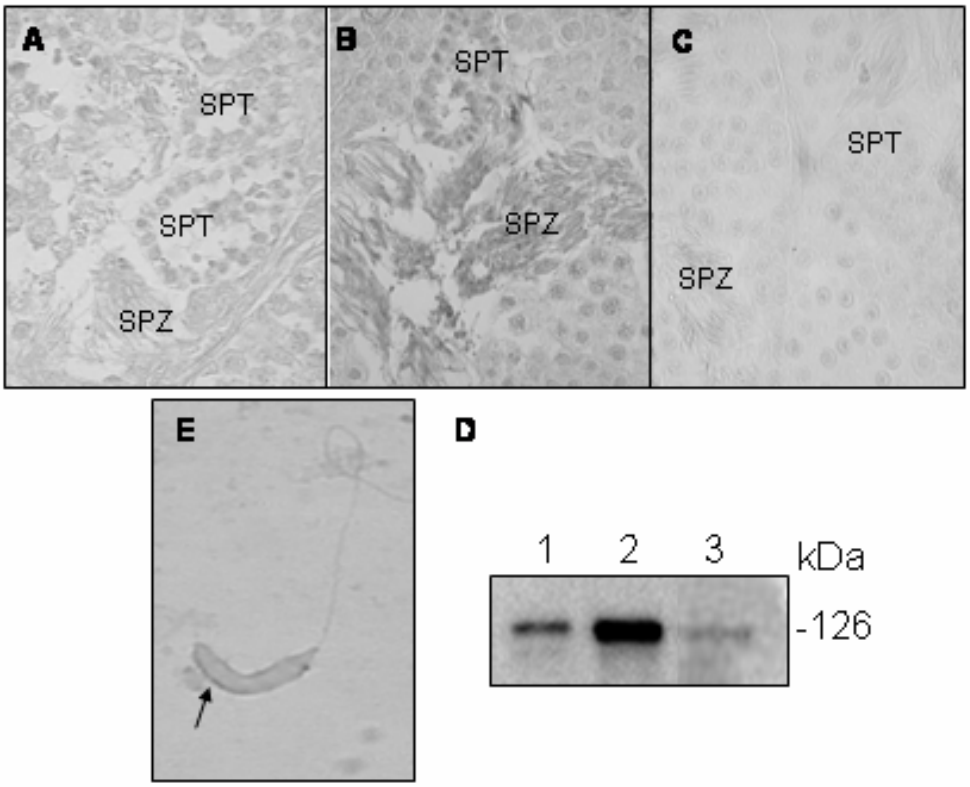


Fig.B.3 A e B) Immunolocalizzazione di mUBPy nel testicolo di rana del mese di novembre (A) e luglio (B). L'immunoreattività per mUBPy è ristretta a cisti di SPT ed agli spermatozoi. C) Testicolo di luglio. La specificità della reazione è stata testata usando l'anticorpo primario preassorbito con un largo eccesso del peptide corrispondente (10^{-6}M). SPT, spermatidi; SPZ, spermatozoi. D) Analisi di Western blot eseguita su proteine estratte dal testicolo di rana (novembre, lane 1; luglio, lane 2) e spermatozoi (lane 3) raccolti dopo un trattamento con l'analogo del GnRH. Un segnale debole di 126 kDa è osservato negli SPZ. E) Immunolocalizzazione di mUBPy negli SPZ di *R. esculenta*. L'immunoreattività è ristretta ad un sottile anello citosolico nella testa degli SPZ (freccia). Questi risultati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. Ingrandimento: A-C 400X; E 1000X.

Conclusioni

L'analisi di sistemi molecolari complessi è un importante obiettivo della ricerca scientifica, finalizzato alla comprensione di processi fisiologici fondamentali per gli organismi viventi e caratterizzati da differenti pathways molecolari, distinti tra le specie. Tra tali sistemi, quello dei cannabinoidi è stato a lungo studiato per i suoi molteplici effetti, sia a livello del sistema nervoso centrale che dei tessuti periferici.

L'idea circa l'esistenza di specifici siti di "binding" per i cannabinoidi nei tessuti mammiferi, così come si verifica nel caso degli oppioidi, è nata nei primi anni '70.

In tale ambito, l'attenzione degli studiosi si è focalizzata, inizialmente, sul Δ^9-THC - il maggiore componente psicoattivo della marijuana - risultato responsabile di indurre riduzione dell'attività motoria, analgesia e danno alla memoria a breve termine (Sugiura *et al*., 2002). Successivamente, l'utilizzo di cannabinoidi sintetici, marcati radioattivamente, ha permesso di estendere gli studi di "binding" e di rivelare una specifica interazione con un possibile recettore nell'encefalo di ratto (Devane *et al*., 1988).

Il clonaggio molecolare dei due recettori dei cannabinoidi, definiti CB1 e CB2 (Matsuda *et al*., 1990; Munro *et al*., 1993) ha, dunque, messo in luce l'esistenza di un sistema molecolare molto più complesso di quello immaginato in origine, comprendente non solo i ligandi, ma anche specifici recettori di membrana in grado di riconoscerli e da essi attivati. Certamente, l'isolamento di lipidi endogeni, regolarmente funzionanti nei tessuti viventi come mediatori e con meccanismi d'azione analoghi a quelli del Δ^9-THC, ha esteso il raggio d'azione di queste molecole ed ha complicato l'indagine circa la loro funzione negli organismi viventi.

L'idea, poi, che questi mediatori potessero funzionare nell'ambito del sistema nervoso centrale come messaggeri intracellulari ha posto la necessità di una loro produzione "su richiesta" da parte della cellula. Una fine regolazione della loro concentrazione nello spazio extracellulare è risultata sotto il controllo di specifici trasportatori di membrana, in grado di regolare il loro "uptake" all'interno della cellula e di un complesso apparato enzimatico, responsabile della loro degradazione (van der Stelt *et al*., 2005). A questa scoperta ha fatto seguito l'individuazione di un altrettanto articolato apparato biosintetico.

Il sistema endocannabinoide, con i suoi vari componenti, è coinvolto in numerosi processi fisiologici.

In qualità di biologi della riproduzione, ci siamo interessati principalmente del ruolo di questi mediatori lipidici nell'ambito dell'attività riproduttiva.

I dati di partenza a nostra disposizione sono risultati congrui ed interessanti. Negli anni '60 è stata riportata "una riduzione della fertilità nei ratti dovuta alla somministrazione cronica di marijuana" (Miras, 1965). L'influenza da parte del THC sul comportamento riproduttivo risulta articolata su livelli multipli. Nei maschi, infatti, il THC sopprime la spermatogenesi, riduce il peso degli organi riproduttivi, diminuisce la concentrazione degli ormoni sessuali circolanti nel plasma ed altera alcuni aspetti del comportamento sessuale. Nelle femmine, il THC prolunga il ciclo estrale, altera l'ovulazione così come la finestra d'impianto dell'embrione.

Da anni, numerosi studi hanno dimostrato che alcune molecole ed i loro recettori corrispondenti siano preservati durante l'evoluzione. Gli studi comparati hanno da sempre provvisto nuovi modelli sperimentali, utili per la comprensione del ruolo fisiologico svolto da determinate molecole nei mammiferi. Generalmente, l'utilizzo di bassi vertebrati, come modello sperimentale, facilita tale comprensione, data la rilevante semplicità della loro organizzazione anatomica, rispetto al modello mammifero. Per tale motivo, convinti del fatto che se un sistema molecolare svolga una funzione importante e basilare nei mammiferi debba essere conservato in un basso vertebrato, ci siamo avvalsi dell'anfibio anuro *Rana esculenta* per l'analisi molecolare di uno dei componenti del sistema endocannabinoide, il recettore CB1.

Nella prima parte dei nostri studi, ci siamo occupati del clonaggio molecolare del recettore dall'encefalo e dal testicolo di rana. La presenza di motivi aminoacidici, analizzati da molti per essere importanti siti di regolazione del recettore, nel modello rana ha confermato l'ipotesi da cui è nato questo studio. Ci ha sorpreso riconoscere differenze nucleotidiche tra la sequenza di cDNA dell'encefalo e quella del testicolo. Per questo, abbiamo clonato la regione codificante di *cb1* anche dal DNA genomico, confermando le differenze nucleotidiche precedentemente viste. Solo due variazioni nucleotidiche sono responsabili di cambiamenti aminoacidici; esse interessano il sito di N-glicosilazione e la coda citoplasmatica, coinvolta nel controllo dell'interazione tra il recettore e le proteine G_i, nel ratto.

Sebbene negli ultimi tempi si sia spesso parlato dell'esistenza di forme polimorfiche del gene *cb1*, soprattutto in correlazione con disagi psicologici - come la schizofrenia - o con patologie metaboliche - come l'obesità (Chakrabarti *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2004), nel nostro caso, escludiamo una simile possibilità dal momento che il DNA

genomico è stato estratto dagli stessi pool di animali utilizzati per la preparazione dei cDNA e dato che le sequenze, per almeno cinque diversi campioni, sono state sempre confermate. Piuttosto, abbiamo ipotizzato un fenomeno di "editing" per il nostro modello. Quest'ultimo potrebbe controllare la struttura secondaria dell'RNA, dunque la sua stabilità ed il suo turnover.

Non conosciamo al momento il motivo per cui si debba verificare un cambiamento di sequenza nel passaggio dal DNA genomico al trascritto. Per dare una spiegazione a tali risultati, trasfetteremo le sequenze di cDNA e di DNA genomico di *cb1* in cellule HEK ed utilizzeremo tali cellule per studi di "binding" con ligandi noti, di interazione con le proteine G, di internalizzazione e di riciclo.

Dati questi primi risultati, abbiamo, inoltre, pensato che il recettore possa presentare una diversa conformazione a seconda del tessuto analizzato. In tal senso, stiamo conducendo il suo clonaggio molecolare da diversi tessuti di rana e stiamo confrontando le sequenze di cDNA a quelle di DNA genomico, estratto dalle stesse preparazioni. La scoperta di forme molecolari diverse potrebbe essere impiegata, in futuro, soprattutto da un punto di vista farmacologico, per la produzione di agonisti ed antagonisti tessuto-specifici.

Differenze nucleotidiche nella sequenza del recettore, simili a quelle già analizzate in questo lavoro, potrebbero, inoltre, verificarsi nell'encefalo e nel testicolo, in fasi distinte del ciclo riproduttivo annuale. Un clonaggio molecolare mensile ci consentirebbe, dunque, di evidenziare tali differenze, eventualmente responsabili di indurre variazioni conformazionali del recettore.

Inoltre, i nostri studi condotti sull'anfibio *R. esculenta* sono serviti a dimostrare la presenza del recettore nel sistema nervoso centrale, ma anche in altri tessuti periferici, sebbene con livelli più bassi di espressione. In particolare, tra questi ultimi, le gonadi mostrano un segnale del trascritto di maggiore intensità. Questo pattern rassomiglia a quello già descritto in altri vertebrati (Galiegue *et al*., 1995; Shire *et al*., 1995).

Una possibile regolazione del processo riproduttivo da parte degli endocannabinoidi è stata ipotizzata alla luce di esperimenti che dimostrano un'inibizione del rilascio di LH e di prolattina, indotta da tali mediatori lipidici, (Scorticati *et al*., 2002; Fernandez-Solari *et al*., 2003), effetti che risultano essere a monte dell'ipofisi.

Poiché il GnRH è il principale regolatore delle funzioni riproduttive, si è ritenuto che gli endocannabinoidi perturbino la riproduzione esercitando la propria azione direttamente sui neuroni ipotalamici GnRH secernenti, probabilmente attraverso interazioni di tipo autocrino o paracrino. Già gli studi di Gammon *et al*. (2005) indicano che neuroni

ipotalamici immortalizzati secernenti il GnRH contengano un sistema cannabinergico completo e funzionale.

In questo lavoro, avvalendoci di un modello sperimentale non-mammifero, quale l'anfibio anuro *R. esculenta*, abbiamo cercato di evidenziare l'esistenza di una relazione anatomica morfofunzionale tra il sistema cannabinergico e quello neurosecretorio del GnRH.

La metodica di doppia immunofluorescenza, supportata dall'analisi microscopica confocale, ha evidenziato corpi cellulari contenenti CB1 e fibre o cellule nervose immunopositive per il GnRHI co-distribuite nel setto ventro-mediale del telencefalo e nell'area preottica. I neuroni contemporaneamente marcati per CB1 ed il GnRHI corrispondono al 20% del numero totale di neuroni GnRHI secernenti. Nell'eminenza mediana della neuroipofisi, le fibre contenenti CB1 sono generalmente più ventrali rispetto a quelle contenenti il GnRHI, sebbene molte di esse mostrino entrambe le immunomarcature.

Il profilo di espressione di *cb1* è chiaramente opposto a quello del *GnRHI*, sia a livello dell'encefalo *in toto*, che del telencefalo e del diencefalo isolati, durante il ciclo riproduttivo annuale. Inoltre, mediante studi *in vitro* abbiamo dimostrato che l'AEA inibisce l'espressione del *GnRHI* e che tale effetto è bloccato dallo specifico antagonista di CB1, l'SR141716A. D'altro canto, un analogo del GnRH, la buserellina, inibisce la sua stessa produzione ed incrementa l'espressione di *cb1*, che potrebbe essere un suo regolatore negativo.

Il recettore CB1, come gli altri membri della famiglia GPCRs, presenta motivi altamente conservati, funzionanti come siti di regolazione. Tra questi, abbiamo individuato, nel settimo dominio transmembrana, il motivo "NPxxY". Il ruolo di quest'ultimo è, ad oggi, controverso. La variabilità dei risultati dipende dal tipo di recettore studiato e dall'ambiente cellulare in cui il recettore è espresso.

L'utilizzo della metodica di mutagenesi *in vitro* ci ha permesso di riconoscere il residuo asparagina 394 del motivo come un importante sito di regolazione dell'internalizzazione del recettore. Il residuo di prolina 395 è risultato, invece, fondamentale per il controllo del "folding" del recettore - data la localizzazione del mutante, prevalentemente, in vescicole intracellulari piuttosto che su membrana. Un'evidente influenza di tale residuo sull'attività di riciclo del recettore verso la membrana è pure dimostrata.

D'altro canto, il mutante Y398A si comporta similmente al recettore WT, sia in termini di internalizzazione che di riciclo.

Nell'ambito del processo della spermatogenesi, la nostra attenzione è stata, infine, rivolta, ad un altro sistema molecolare, quello costituito dagli chaperoni HSP, dalle proteine DNAJ e dagli enzimi deubiquitinanti. Avendo precedentemente caratterizzato la proteina MSJ-1, una proteina DNAJ, nel modello rana, abbiamo voluto ancora una volta dimostrare che sistemi regolatori importanti da un punto di vista fisiologico siano evolutivamente conservati.

Abbiamo, allora, analizzato il profilo dell'enzima mUBPy nel testicolo di rana, confrontandolo a quello di MSJ-1, precedentemente pubblicato (Meccariello *et al.*, 2004). La localizzazione dell'enzima è limitata a cisti di spermatidi ed a spermatozoi. In questi ultimi, prelevati dalla cloaca, dopo trattamento con buserellina, un analogo del GnRH, l'enzima risiede intorno al nucleo, sottofoma di un sottile anello citoplasmatico. Ipotizziamo che questo enzima, così come tutto il sistema di cui fa parte, sia coinvolto nella regolazione del "folding" - un processo altamente regolato durante la spermatogenesi, quando nuove strutture si originano ed altre vengono degradate - e del traffico vescicolare.

Il clonaggio molecolare dell'enzima dal testicolo di rana costituirà, poi, la base di un'analisi filogenetica, importante per stabilire quanto conservato sia questo gene lungo la scala evolutiva. Il suo profilo di espressione sarà, infine, analizzato tanto a livello del sistema nervoso centrale quanto a livello periferico e sarà confrontato al profilo della proteina, descritto in questo lavoro.

Bibliografia

- Abadji V., Lucas-Lenard JM., Chin C., Kendall DA. (1999). Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem* **72**: 2032-2038.
- Abood ME., Ditto KE., Noel MA., Showalter VM., Tao Q. (1997). Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. *Biochem Pharmacol* **53**: 207-214.
- Amerik A., Hochstrasser M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Bioch Biophys Acta* **1695**: 189-207.
- Barak L., Tiberi M., Freedman N., Kwatra M., Lefkowitz R., Caron M. (1994). A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated β_2-adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem*. **269**: 2790-2795.
- Battisti A., Vallarino M., Carnevali O., Fasano S., Polzonetti-Magni A., Pierantoni R. (1994). Detection and localization of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-like material in the frog, *Rana esculenta* ovary. *Comp. Biochem. Physiol* **109A**: 1047-1103.
- Bauman J. (1980). Marijuana and female reproductive system. *Health Consequence of Marijuana Use*. US Government Printing Office: Washington DC. pp 85-97.
- Berruti G., Martegani E. (2005). The deubiquitinating enzyme mUBPy interacts with the sperm specific molecular chaperone MSJ-1: the relation with the proteasoma, acrosome and centrosome in mouse male germ cells. *Biol Reprod* **72**: 14-21.
- Blanc V., Davidson NO. (2003). C to U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J Biol Chem* **278**: 1395-1398.
- Bouley R., Sun T., Chenard M., McLaughlin M., McKee M., Lin H., Brown D., Ausiello D. (2003). Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells. *American Journal of Physiology* **285**: 750-762.
- Brown S., Wager-Miller J., Mackie K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 255-264.

- Cariello L., Romano G., Spagnuolo A., Zanetti L., Fasano S., Minucci S., Di Matteo L., Pierantoni R., Ghieffi G. **(**1989). Molecular forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in hypothalamus and testis of the frog, *Rana esculenta*. *Gen Comp Endocrinol* **75**: 343-348.
- Cesa R., Mackie K., Beltramo M., Franzoni MF. (2001). Cannabinoid receptor CB1-like and glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in the brain of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* **306**: 391-398.
- Cesa R., Guastalla A., Cottone E., Mackie K., Beltramo M., Franzoni MF. (2002). Relationships between CB1 cannabinoid receptors and pituitary endocrine cells in *Xenopus laevis*: an immunohistochemical study. *Gen Comp Endocrinol* **25**: 17-24.
- Chakrabarti B., Kent L., Suckling J., Bullmore E., Baron S. (2006). Variations in the human cannabinoid receptor gene modulate striatal responses to happy faces. *Eur J Neurosci* **23**: 1944-1948.
- Chang M., Berkery D., Schuel R., Laychock S., Zimmerman AM., Zimmerman S., Schuel H. (1993). Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm and its role in blockade of the acrosome reaction. *Mol Repr Dev* **36**: 507-516.
- Chen WJ., Goldstein JL., Brown MS. (1990). NPxY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 3116- 3123.
- Chieffi G., Pierantoni R., Fasano S. (1991). Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extra-hypothalamic areas. *Int Rev Cytol* **127**: 1-55.
- Chin CN., Lucas-Lenard J., Abadji V., Kendall DA. (1998). Ligand binding and modulation of cyclic AMP levels depend on the chemical nature of residue 192 of the human cannabinoid receptor 1. *J Neurochem* **70**: 366-373.
- Clayton N., Marshall FH., Bountra M. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. (2002). *Pain* **96**: 253-260.
- Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S. (1997). *c-fos* and *c-jun* like mRNA expression in frog (*Rana esculenta*) testis during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* **106**: 23-29.
- Cobellis G., Vallarino M., Meccariello R., Pierantoni R., Masini MA., Mathieu M., Pernas-Alonso R., Chieffi P., Fasano S. (1999) Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of the frog, *Rana esculenta*, brain: an

analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms. *J Neuroendocrinol* **11**:725-735.

- Cobellis G., Meccariello R., Pierantoni R., Fasano S. (2003). Intratesticular signals for progression of germ cell stages in vertebrates. *Gen and Comp Endocrinol* **134**: 220-228.
- Cobellis G., Cacciola G., Scarpa D., Meccariello R., Chianese R., Franzoni MF., Mackie K., Pierantoni R., Fasano S. (2006). Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. *Biol of Reprod* **75**:82-89.
- Conibear E., Cleck NJ., Stevens TH. (2003). Vsp51p mediates the association of the GARP (Vsp52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p. *Mol Biol Cell* **14**: 1610-1623.
- Conlon JM., Collin F., Chiang YC., Sower SA., Vaudry H. (1993). Two molecular forms of gonadotropin releasing hormone from the brain of the frog *Rana ridibunda*: purification, characterization and distribution. *Endocrinology* **132**: 2117-2123.
- Cottone E., Salio C., Conrath M., Franzoni MF. (2003). *Xenopus laevis* CB1 cannabinoid receptor: molecular cloning and mRNA distribution in the central nervous system. *J Comp Neurol* **464**: 487-496.
- Cottone E., Forno S., Campantico E., Guastalla A., Viltono L., Mackie K., Franzoni MF. (2005). Expression and distribution of CB1 cannabinoid receptors in the central nervous system of the African cichlid fish *Pelvicachromis pulcher*. *J Comp Neurol* **485**: 293-303.
- Cravatt BF., Giang DK., Mayfield SP., Boger DL., Lemer RA., Gilula NB. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty acid amides. *Nature* **394**: 83-87.
- de Miguel R., Romero J., Munoz MR., Garcia GL., Gonzalez S., Villanna MA., Makriyannis A., Ramos JA., Fernandez-Ruiz JJ. (1998). Effects of cannabinoids on prolactin and gonadotropin secretion: involvement of changes in hypothalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) inputs. *Biochem Pharmacol* **56**: 1331-1338.

- De Petrocellis L., Melck D., Bisogno T., Milone A., Di Marzo V. (1999). Finding of the endocannabinoid signalling system in *Hydra*, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience* **92**: 377-387.
- De Petrocellis L., Bisogno T., Maccarrone M., Davis JB., Finazzi-Agrò A., Di Marzo V. (2001). The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem* **276**: 12856-12863.
- De Petrocellis L., Cascio MG., Di Marzo V. (2004). The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* **141**: 765-774.
- Devane WA., Dysarz FA., Johnson MR., Melvin LS., Howlett AC. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **34**: 605-613.
- Devane WA. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**: 1946-1949.
- Dey SK., Lim H., Das SK., Reese J., Paria BC., Daikoku T. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* **25**:341-373.
- Dey SK. (2005). Riproductive biology: fatty link to fertility. *Nature* **45**: 34-35.
- Di Marzo V. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**: 686-691.
- Di Marzo V., De Petrocellis L., Fezza F., Ligresti A., Bisogno T. (2002). Anandamide receptors. *Prost Leuk Ess Fatty Acids* **66**: 377-391.
- Di Matteo L., Minucci S., Fasano S., Pierantoni R., Variale B., Chieffi G. (1988). A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist decreases androgen production and spermatogonial multiplication in frog *Rana esculenta*: indirect evidence for the existence of GnRH or GnRH-like material receptors in the hypophysis and testis. *Endocrinology* **122**: 62-67.
- Di Matteo L., Vallarino, Pierantoni R. (1996). Localization of GnRH molecular forms in the brain, pituitary , and testis of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool* **274**: 33-40.
- d'Istria M., Delrio G., Borre V., Chieffi G. (1974). Radioimmunoassay of testosterone, 17beta-oestradiol and oestrone in the male and female plasma of *Rana esculenta* during sexual cycle. *Steroids Lipids Res* **5**: 42-48.

- Duan J., Wainwright MS., Comeron JM., Saitou N., Sanders AR., Gelernter J., Gejman PV. (2003). Synonymous mutations in the human *dopamine receptor* D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* **12**: 205-216.
- Elphick MR., Egertovà M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 381-408.
- Elphick MR., Satou Y., Satoh N. (2003). The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of the vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis. Gene* **302**: 95-101.
- Elphick MR., Egertova M. (2005). The phylogenetic distribution and evolutionary origins of endocannabinoid signalling. *Handb Exp Pharmacol* **168**: 283-297.
- Esser C., Alberti S., Hohfeld J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasoma system. *Bioch Biophys Acta* **1695**: 171-188.
- Fasano S., Minucci S., Pierantoni R., Fasolo A., Di Matteo L., Basile C., Varriale B., Chieffi G. (1988) Hypothalamus-hypophysis and testicular GnRH control of gonadal activity in the frog, *Rana esculenta*: seasonal GnRH profiles and annual variation of in vitro androgen output by pituitary-stimulated testis. *Gen Comp Endocrinol* **790**: 31-40.
- Fasano S., de Leeuw R., Pierantoni R., Chieffi G., van Oordt PG. (1990). Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in the pituitary and testis of the frog, *Rana esculenta*. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 923-932.
- Fasano S., D'Antonio M., Pierantoni R. (1991). Sites of action of local estradiol feed back mechanism in the frog (*Rana esculenta*) testis. *Gen Comp Endocrinol*. **81**: 492-499.
- Fasano S., Goos GJ., Janssen C., Pierantoni R. (1993). Two GnRHs fluctuate in correlation with androgen levels in the male frog *Rana esculenta*. *J Exp Zool* **266**: 277-283.
- Fernandez-Ruiz JJ., Munoz RM., Romero J., Villanna MA., Makriyannis A., Ramos JA. (1997). Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotropin secretion: evidence for the presence of CB1

receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem Pharmacol* **53**: 1919-1927.

- Fernandez-Solari J., Scorticati C., Mohn C., De Laurentis A., Billi S., Franchi A., McCann S., Rettori V. (2003). Alcohol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone release by activating the endocannabinoid system. *PNAS* **101**: 3264-3268.
- Freund TF., Katona I., Piomelli D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* **83**: 1017-1066.
- Fried PA., Watkinson B., Willan A. (1984). Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *Am J Obstet Gynecol* **150**: 23-27.
- Fride E. (2002). Endocannabinoids in the central nervous system: an overview. *Prost Leu Ess Fatty Acids* **66**: 221-233.
- Galgano M. (1936). Intorno all'influenza del clima sulla spermatogenesi di *Rana esculenta*. *Arch. Ital. Anat. Embriol*. **35**: 1-31.
- Galiegue S., Mary S., Marchand J., Dussossoy D., Carriere D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., Le Fur G., Casellas P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* **232**: 54-61.
- Gammon M., Freeman GM. Jr, Xie W., Peterson SL., Wetsel WC. (2005). Regulation of gonadotropin-releasin hormone secretion by cannabinoids. *Endocrinology* **146**: 4491-4499.
- Garcia DE., Brown S., Hille B., Mackie K. (1998). Protein kinase C disrupts cannabinoid action by phosphorylation of the cannabinoid receptor. *J Neurosci* **18**: 2834-2841.
- Gnesutta N., Ceriani M., Innocenti I., Mauri R., Zippel E., Sturani B., Borgonovo G., Berruti G., Martegani E. (2001). Cloning and characterization of mouse UBPy, a deubiquitining enzyme that interacts with the ras guanine nucleotide exchange factor CDC25 (Mm)/Ras-GRF1. *J Biol Chem* **276**: 39448-39454.
- Guo Y., Wang H., Okamoto Y., Ueda N., Kingsley P., Marnett L., Schmid H., Das S., Dey S. (2005). N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation. *J Biol Chem* **280**: 23429-23432.

- Habayeb OMH., Bell SC., Konye JC. (2002). Endogenous cannabinoids: metabolism and thei role in reproduction. *Life Sci* **70**: 1963-1977.
- Haglund K., Dikic I. (2005). Ubiquitylation and cell signalling. *The EMBO J* **24**: 3353-3359.
- Hayes WP., Wray S., Battey JF. (1994). The frog gonadotropin-releasing hormone I (GnRH1) gene has a mammalian-like expression pattern and conserved domains in the GnRH associated peptides, but brain onset is delayed until metamorphosis. *Endocrinology* **134**: 1835-1845.
- Heimann P., Laage S., Jockusch H. (1991). Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse wobbler. *Differentiation* **47**: 77-83.
- Hembree WC., Nahas GG., Zeidenberg P. (1978). Changes in human spermatozoa associated with high dose marihuana smoking. *Adv Biosci* **23**: 429-439.
- Herkenham M. (1995). Localization of cannabinoid receptors in brain and periphery in *Cannabinoid Receptors*. Academic Press, pp.45-166, London.
- Herrick CJ. (1948). The brain of the *Tiger Salamander*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Horwich A. (2002). Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J Clin Invest* **110**: 1221-1232.
- Howlett AC., Bidaut-Russel M., Devane WA., Melvin LS., Johnson MR., Herkenham M. (1990). The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioural characterization. *Trends Neurosci* **13**: 420-423.
- Howlett AC., Barth F., Bonner TI., Cabral G., Casellas P., Devane WA., Felder CC., Herkenham M., Mackie K., Martin BR., Mechoulam R., Pertwee RG. (2002). International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* **54**: 161-202.
- Hsieh C., Brown S., Derleth C., Mackie K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* **73**: 493-501.
- Hukovic N., Panetta R., Kumar U., Rocheville M., Patel Y. (1998). The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *J. Biol. Chem*. **273**: 21416-21422.

- Huttenrauch F., Pollok-Kopp B., Oppermann M. (2005). G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and β-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. *J Biol Chem* **280**: 37503-37515.
- Issidorides MR. (1978). Observations in chronic hashish users: nuclear aberrations in blood and sperm and abnormal acrosomes in spermatozoa. *Adv Biosci* **23**: 377-388.
- Jin W., Brown S., Roche JP., Hsieh C., Celver JP., Kovoor A., Chavkin C., Mackie K. (1999). Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurochem* **73**: 493-501.
- Johnson M., Robertson D., Holland P., Lutz E., Mitchell R. (2006). Role of the conserved NPxxY motif of the 5-HT_{2A} receptor in determining selective interaction with isoforms of ADP-ribosylation factor (ARF). *Cellular Signalling* 1-8.
- Kalatskaya I., Schussler S., Blaukat A., Ester W., Jochum M., Proud D., Faussner A. (2004). Mutation of tyrosine in the conserved NPxxY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human β_2-bradykinin receptor. *J. Biol. Chem*. **279**: 31268-31276.
- Kierszenbaum A. (1994). Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* **15**: 116-134.
- Kolodny RC., Masters WH., Kolodner RM., Toro G. (1974). Depression of plasma testosterone levels during the human ovulatory cycle. *Gynecol Endocrinol* **18**: 212-218.
- Kwon J., Mochida K., Wang YL., Sekiguchi S., Sankai T., Aoki S., Ogura A., Yoshikawa Y., Wada K. (2005). Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm qualità control during spermatogenesis. *Biol Reprod* **73**: 29-35.
- Lee J., Jee C., Lee JI., Lee MH., Koo HS., Chung CH., Ahnn J. (2001). A deubiquitining enzyme UCH/CeUBP 130, has an essential role in the formation of a functional microtubule-organizing centre (MTOC) during early cleavage in *C. elegans*. *Genes Cells* **6**: 899-908.

- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. (1955). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lutz B. (2002). Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prost Leu Ess Fatty Acids* **66**: 123-142.
- Maccarrone M., Valverde O., Barbaccia ML., Castane A., Maldonado R., Ledent C., Parmentier M., Finazzi-Agrò A. (2002). Age-related changes of anandamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: correlation with behaviour. *Eur J Neurosci* **15**: 1178-1186.
- Maccarrone M., Finazzi-Agrò A. (2004). Anandamide hydrolase: a guardian angel of human reproduction? *Trends Pharmacol Sci* **25**: 353-357.
- Mackie K. (2005). Cannabinoid receptor homo and heterodimerization. *Life Sci* **77**: 1667-1673.
- Martin BR., Compton DR., Thomas BF., Prescott WR., Little PJ., Randam RK., Johnson MR., Melvin LS., Mechoulam R., Ward SJ. (1991). Behavioural, biochemical and molecular modelling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav* **40**: 471-478.
- Mathews DH., Sabina J., Zuker M., Turner DH. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**: 911-940.
- Matias I., McPartland JM., Di Marzo V. (2005). Occurrence and possibile biological role of the endocannabinoid system in the sea squirt *Ciona intestinalis. J Neurochem* **93**: 1141-1156.
- Matsuda LA., Lolait SJ., Brownstein MJ., Young AC., Bonner TI. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**: 561-564.
- Matsuda LA., Bonner TI., Lolait SJ. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* **327**: 535-550.
- McPartland JM., Glass M. (2003). Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates and invertebrates. *Gene* **312**: 297-303.
- McPartland J., Matias I., Di Marzo V., Glass M. (2006). Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* **370**: 64-74.

- Meccariello R., Cobellis G., Scarpa D., Finga G., Pierantoni R., Fasano S. (2004). Detection of msj-1 gene expression in the frog *Rana esculenta* testis, brain and spinal cord. *Mol Reprod Dev* **68**: 149-158.
- Meccariello R., Mathieu M., Cobellis G., Vallarono M., Buzzone F., Fienga G., Pierantoni R., Fasano S. (2004). Jun localization in cytosolic and nuclear compartments in brain-pituitary system of the frog *Rana esculenta*: an analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocr* **135**: 310-323.
- Meccariello R., Chianese R., Cacciola G., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S. (2006). Type-1 cannabinoid receptor expression in the frog, *Rana esculenta*, tissues: a possible involvement in the regulation of testicular activity. *Mol Reprod Dev* **73**: 551-8.
- Meccariello R., Chianese R., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S. (2007). Cloning of type-1 cannabinoid receptor in *Rana esculenta* reveals differences between genomic sequenze and cDNA. *FEBS J* **274**: 2909-2920.
- Mechoulam R., Devane WA., Glaser R. (1992). Cannabinoid geometry and biological activity in *Marijuana/Cannabinoids*: *Neurobiology and Neurophysiology*, pp.1-33, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mechoulam R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* **50**: 83-90.
- Mechoulam R. (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their roles in neuroprotection and aggression. *Prost Leuk Ess Fatty Acids* **66**: 93-99.
- Minucci S., Di Matteo L., Chieffi-Baccari G., Pierantoni R. (1989). A gonadotropin releasing hormone analog induces spermiation in intact and hypophysectomized frogs *Rana esculenta. Experientia* **45**: 1118-1121.
- Miras CJ. (1965). Some aspects of cannabis action (Little, Brown, Boston).
- Mohamed JS., Thomas P., Khan IA. (2005). Isolation, cloning and expression of three prepro-GnRH mRNAs in Atlantic croaker brain and pituitary. *J Comp Neurol* **488**: 384-395.

- Mukhopadhyay S., Shim JY., Assi AA., Norford D. Howlett AC. (2002). CB1 cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chemistry and Physics of Lipids* **121**: 91-109.
- Munro S., Thomas KL., Abu-Shaar M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**: 61-65.
- Murphy LL., Steger RW., Smith MS., Bartke A. (1990). Effects of the Δ^9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol, alone and in combinations, on luteinizing hormone and prolactin release and on hypothalamic neurotransmitters in the male rat. *Neuroendocrinology* **53**: 316-321.
- Murphy LL., Munoz RM., Adrian BA., Villanua MA. (1998). Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiol Dis* **5**: 432-446.
- Nie J., Lewis DL. (2001). Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J Neurosci* **21**: 8758-8764.
- Okamoto Y., Morishita J., Tsuboi T., Tonai T., Ueda N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* **279**: 5298-5305.
- Pagotto U., Marsicano G., Fezza F., Theodoropoulou Y., Stalla J., Arzeberger T., Milone A., Losa M., Di Marzo V., Lutz B., Stalla GK. (2001). Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J Clin Endocrinol Met* **86**: 2687-2695.
- Paria BC., Deutsch DD., Dey SK. (1996). The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: differential profiles during the pre-implantation period. *Mol Reprod Dev* **45**: 183-192.
- Paria B., Dey SK. (2000). Ligand-receptor signalling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids* **108**: 211-220.
- Park B., McPartlan JM., Glass M. (2004). Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prost Leuk Ess Fatty Acids* **70**: 189-197.

- Persuad TV., Ellington AC. (1967). Cannabis in early pregnancy. *Lancet* **2**: 1306.
- Pertwee RG., Ross RA. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prost Leu Ess Fatty Acids* **66**: 101-121.
- Pierantoni R., Cobellis G., Meccariello R., Palmiero C., Fienga G., Minucci S., Fasano S. (2002). The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **132**: 131-139.
- Piomelli D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-884.
- Polzonetti-Magni AM., Mosconi G., Carnevali O., Yamamoto K., Hanaoka Y., Kikuyama S. (1998). Gonadotropins and reproductive function in the anuran amphibian *Rana esculenta*. *Biol Reprod* **55**: 88-93.
- Probst WC., Snyder LA., Schuster DI., Brosius J., Sealfon SC. (1992). Sequence alignment of the G protein-coupled receptor superfamily. *DNA Cell. Biol*. **11**: 1-9.
- Qazi QH., Mariano E., Beller E. (1985). Abnormalities in offspring associated with prenatal marijuana exposure. *Dev Pharmacol Ther* **8**: 141-148.
- Rastogi RK. (1976). Seasonal cycle in anuran (Amphibia) testis: the endocrine and environmental control. *Boll Zool* **43**: 151-172.
- Rastogi R.K., Iela L., Saxena P.K., Chieffi G. (1976). The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta. J Exp Zool* **196**: 151-166.
- Rastogi R.K., Iela L. (1980). Steroidogenesis and spermatogenesis in anuran amphibia: a brief survey. *Steroids and Their Mechanism of Action in Nonmammalian Vertebrates*. 131-143.
- Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Neliat G., Caput D., Ferrara P., Soubrie P. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* **350**: 240-244.
- Roche JP., Bounds S., Brown S., Mackie K. (1999). A mutation in the second transmembrane region of the CB1 receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization. *Mol Pharmacol* **56**: 611-618.

- Rong H., Browning D., Ye R. (2001). Differential roles of the NPxxY motif in formyl peptide receptor signaling. *Amer Assoc of Immunol* **166**: 4099-4105.
- Rossato M., Ion Popa I., Ferigo M., Clari G., Foresta C. (2005). Human sperm express cannabinoid receptor CB1, the activation of which inhibits motilità, acrosome reaction and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Met* **90**: 984-991.
- Row P., Prior A., McCullough J., Clague M., Urbè S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPy regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor downregulation. *J Biol Chem* **281**: 12618-12624.
- Ryberg E., Vu H., Lorsson N., Groblewski T., Hjorth S., Elebring T., Sjogren S., Greasley P. (2005). Identification and characterization of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Letters* **579**: 259-264.
- Salio C., Cottone E., Conrath M., Franzoni MF. (2002). CB1 cannabinoid receptors in amphibian spinal cord: relationships with some nociceptio markers. *J Chem Neuroanat* **24**: 153-162.
- Salzet M., Stefano GB. (2002). The endocannabinoid system in invertebrates. *Pros Leuk Ess Fatty Acids* **66**: 353-361.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd edn, pp.280-281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schlicker E., Kathmann M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 565-572.
- Schmid H., Goldstein E., Mechoulam R., Zimmermann AM. (1994). Anandamide, a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *PNAS* **91**: 7678-7682.
- Schmid PC., Paria BC., Krebsbach RJ., Schmid HH., Dey SK. (1997). Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *PNAS* **94**: 4188-4192.
- Schmitt T., Drepper C., Mubmann A., Hahn P., Kuhlmann M., Thiel C., Hafner M., Leingelin A., Heimann P., Jones JM., Meisler MH., Jockusch H. (2005). Mutation of Vsp54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. *Nat Genet* **37**: 1213-1215.

- Schuel H., Goldstein E., Mechoulam R., Zimmerman AM., Zimmerman S. (1994). Anandamide, a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *PNAS* **91**: 7678-7682.
- Schuel H., Burkman J., Lippes J., Crickard K., Forester E., Piomelli D., Giuffrida A. (2002). N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phy Lipids* **121**: 211-227.
- Schuel H., Burkman L., Lippes J., Cricklard K., Mahony M., Giuffrida A., Picone R., Makriyannis A. (2002a). Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod Dev* **63**: 376-387.
- Schuel H., Burkman L. (2005). A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol Reprod* **73** (6): 1078-1086.
- Scorticati C., Mohn C., De Laurentis A., Vissio P., Solari J., Seilicovich A., McCann S., Rettori V. (2002). The effects of anandamide on prolactin secretion is modulated by estrogen. *PNAS* **100**: 2134-2139.
- Scorticati C., Fernandez-Solari J., De Laurentiis A., Mohn C., Prestifilippo JP., Lasaga M., Seilicovich A., Billi S., Franchi A., McCann S., Rettori V. (2004). The inhibitory effect of anandamide on luteinizing hormone-releasing hormone secretion is reversed by oestrogen. *PNAS* **32**: 11891-11896.
- Seeburg PH. (2002). A to I editing: new and old sites, functions and speculations. *Neuron* **35**: 17-20.
- Seeburg PH., Hartner J. (2003). Regulation of ion channel/neurotrasmitter receptor function by RNA editing. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 279-283.
- Shire D., Carillon C., Kaghad M., Calandra N, Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Caput D., Ferrara P. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* **270**: 3726-3731.
- Shire D., Calandra M., Rinaldi-Carmona M., Oustric D., Pessegue B., Bonnin-Cabanne O., Le Fur G., Caput P., Ferrara P. (1996). Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* **1307**: 132-136.

- Smith CG., Almirez RG., Berenberg J., Asch RH. (1983). Tolerance develops to the disruptive effects of Δ^9-THC on primate menstrual cycle. *Science* **219**: 1453-1455.
- Soderstrom K., Leid M., Moore FL., Murray TF. (2000). Behavioral, pharmacological and molecular characterization of an amphibian cannabinoid receptor. *J Neurochem* **75**: 413-423.
- Soderstrom K., Johnson F. (2001). Zebra finch CB1 cannabinoid receptor pharmacology and *in vivo* and *in vitro* effects of activation. *J Pharmacol Exp Ther* **297**: 189-197.
- Solomon J., Cocchia AM., Di Martino R. (1977). Effect of Δ^9-THC on uterine and vaginal cytology of ovariectomized rats. *Science* **195**: 875-877.
- Song ZH., Bonner TI. (1996). A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Mol Pharmacol* **49**: 891-896.
- Sugiura T. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* **215**: 89-97.
- Sugiura T., Waku K. (2002). Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem* **132**: 7-12.
- Swift S., Leger A., Talavera J., Zhang L., Bohom A., Kuliopulos A. (2006). Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling. *J. Biol. Chem.* **281**: 4109-4116.
- Taylor JP., Hardy J., Fischbeck KH. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**: 1991-1995.
- Ten Donkelaar HJ. (1998). Anurans. In: The central nervous system of vertebrates. Eds Nieuuwenhuys R., Ten Donkelaar HJ., Nicholson C. Pp 1151-1314. Vol.2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Terasawa E. (2003). Gonadotropin-releasing hormone II: is this neuropeptide important for mammalian reproduction? *Endocrinology* **144**: 3-4.
- Thomas W., Baker K., Motel T., Thekkumkara TJ. (1995). Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem*. **270**: 22153-22159.

- Tian X., Guo J., Yao F., Yang D., Makriyannis A. (2005). The conformation, location and dynamic properties of the endocannabinoid ligand anandamide in a membrane bilayer. *J Biol Chem* **280**: 29788-29795.
- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena MC, Mackie K., Walker JM. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci* **83**: 393-411.
- Valenti M., Cottone E., Martinez R., De Pedro N., Rubio M., Viveros MP., Franzoni MF., Delgrado MJ., Di Marzo V. (2005). The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possibile role in the control of food intake. *J Neurochem* **95**: 662-672.
- Van der Kloot W. (1994). Anandamide, a naturally-occurring agonist of the cannabinoid receptor, blocks adenylate cyclase at the frog neuromuscular junction. *Brain Res* **649**: 181-184.
- van der Stel M., Di Marzo V. (2005). Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prost Lipid Med* **77**: 111-122.
- van der Stelt M., Trevisani M., Vellani V., De Petrocellis L., Schiano Morello A., Campi B., McNaughton P., Geppetti P., Di Marzo V. (2005). Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca (2+) influx via TRPV1 channels. *EMBO J* **24**: 3517-3528.
- Van Sickle M., Duncan M., Kingsley P., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J., Marnett., Di Marzo V., Pittman Q., Patel K., Sharkey K. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**: 329-332.
- Wager-Miller J., Westenbrock R., Mackie K. (2002). Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids* **121**: 83-89.
- Wang YL., Liu W., Sun YJ., Kwon J., Setsuie R., Osaka H., Noda S., Aoki S., Yoshikawa Y., Wada K. (2005). Over-expression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. *Mol Reprod Dev* **73**: 40-49.
- Wang L., Yoo MS., Kang HM., Im WB., Choi HS., Bogerd J., Kwon HB. (2001). Cloning and characterization of cDNAs encoding the GnRH1 and GnRH2 precursors from bullfrog (*Rana catesbeiana). J Exp Zool* **289**: 190-201.

- Wang H., Matsumoto H., Guo Y., Paria B., Roberts RL., Dey SK. (2003). Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signalling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *PNAS* **100**: 14914-14919.
- Wang H., Dey SK., Maccarrone M. (2006). Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev* **27**: 427-448.
- Wedekind JE., Dance GSC., Soweden MP., Smith HC. (2003). Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* **19**: 207-216.
- Wenger T., Ledent C., Csernus V., Gerendai I. (2001). The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 363-368.
- Wei B., Mikkelsen T., McKinney M., Lander E., Cravatt BF. (2006). A second fatty acid hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem* **281**: 36569-36578.
- Wiley JL., Martin BR. (2002). Cannabinoid pharmacology: implications for additional cannabinoid receptors subtypes. *Chem Phys Lipids* **121**: 57-63.
- Wilkinson KD. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* **11**: 1245-1256.
- Wilson RI., Nicoll RA. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**: 588-592.
- Xiang B., Yu GH., Guo J., Chen L., Hu W., Pei G., Ma L. (2001). Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of δ-opioid receptor at serine 344, resulting in β-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *J Biol Chem* **276**: 4709-4716.
- Yamaguchi F., Macrae AD., Brenner S. (1996). Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. *Genomics* **35**: 603-605.
- Yang ZM., Paria BC., Dey SK. (1996). Activation of brain-type cannabinoid receptors interferes with pre-implantation mouse embryo development. *Biol Reprod* **55**: 756-761.
- Zhang PW., Ishiguro H., Ohtsuki T., Hess J., Carillo F., Walther D., Onaivi ES., Arinami T., Uhl GR. (2004). Human cannabinoid receptor 1: 5'exons, candidate

regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* **9**: 916-931.

- Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.