



Università degli Studi di Napoli “Federico II”
Stazione Zoologica Anton Dohrn

Dottorato di Ricerca in

“Organismi modello nella ricerca biomedica e veterinaria”

XVIII ciclo

*Il ruolo dell’actina del citoscheletro nella
regolazione della maturazione meiotica e
fecondazione delle uova di echinodermi*

Tutor

Dott.ssa Luigia Santella

Candidata

Dott.ssa Nunzia Limatola

Coordinatore del Dottorato

Prof. Paolo De Girolamo

ANNO ACCADEMICO 2015 – 2016

INDICE

ABBREVIAZIONI	iv
SOMMARIO	pag. 1
CAPITOLO I: INTRODUZIONE: Le uova di stelle e ricci di mare come sistemi modello per lo studio della maturazione e della fecondazione.	pag. 4
1.1. Cenni generali sull'anatomia e sulle modalità riproduttive degli organismi modello.	pag. 6
1.2. Morfologia degli ovociti immaturi.	pag. 9
1.3. La ripresa del ciclo cellulare ad opera dell'1-metiladenina.	pag. 11
1.4. Trasduzione del segnale della ripresa meiotica mediata dall'1-MA.	pag. 14
1.5. Cambiamenti morfologici durante la maturazione meiotica.	pag. 16
1.6. Cambiamenti dell'actina del citoscheletro durante la maturazione degli ovociti di stelle marine.	pag. 18
1.7. Il Calcio: un singolo messaggero per molteplici funzioni.	pag. 21
1.8. L'InsP ₃ come mediatore del rilascio di Ca ²⁺ .	pag. 23
1.9. L'aumento del Ca ²⁺ intracellulare mediato dall'ADP ribosio ciclico.	pag. 26
1.10. NAADP: un emergente secondo messaggero nella trasduzione del segnale Ca ²⁺ .	pag. 27
1.11. Il segnale Ca ²⁺ alla maturazione.	pag. 30
1.12. Il segnale Ca ²⁺ alla fecondazione.	pag. 34
1.13. Trasduzione del segnale Ca ²⁺ alla fecondazione.	pag. 35
1.14. Meccanismi di blocco alla polispermia.	pag. 42
1.15. Il ruolo dell'actina nella regolazione del rilascio di Ca ²⁺ alla fecondazione.	pag. 46
CAPITOLO II: MATERIALI E METODI	pag. 53
2.1. Preparazione dei gameti.	pag. 53
2.2. Microiniezione.	pag. 54
2.3. Ca ²⁺ imaging.	pag. 55
2.4. Microscopia confocale.	pag. 55
2.5. Colorazione della F-actina in cellule viventi.	pag. 56
2.6. Colorazione degli spermatozoi con Hoechst 33342.	pag. 56
2.7. Trattamento con vari agenti chimici.	pag. 56
2.8. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).	pag. 57
2.9. Elaborazione dati.	pag. 57
2.10. Saggio di attività della nicotina e delle <i>actin-binding proteins</i> cofilina e profilina.	pag. 58
CAPITOLO III: Identificazione di un ulteriore segnale Ca²⁺ durante la maturazione degli ovociti di stella di mare al tempo della GVBD.	pag. 60
3.1. Insorgenza di una risposta all'1-MA durante la GVBD negli ovociti di stella di mare.	pag. 60
3.2. La risposta iniziale all'1-MA negli ovociti di stella di mare rappresenta una modalità più rapida di propagazione dell'onda di Ca ²⁺ .	pag. 63

3.3. I picchi tardivi di Ca^{2+} degli ovociti durante la GVBD manifestano caratteristiche comuni ai flash di Ca^{2+} corticali delle uova fecondate.	pag. 64
3.4. I picchi tardivi di Ca^{2+} non sono la causa, ma un risultato della GVBD.	pag. 66
3.5. Gli ovociti maturati in CaFSW anche se fecondati in acqua di mare mostrano considerevoli alterazioni nel successivo sviluppo embrionale.	pag. 68
3.6. Gli inibitori dei canali del Ca^{2+} di tipo L riducono l'ampiezza dei picchi tardivi di Ca^{2+} , lasciando inalterata la loro frequenza.	pag. 69
3.7. Cambiamenti nell'organizzazione dell'actina nella zona corticale degli ovociti influenzano significativamente l'ampiezza e la frequenza dei picchi tardivi di Ca^{2+} .	pag. 74
Discussione per il Capitolo III	pag. 77
CAPITOLO IV: Le prime fasi del processo di fecondazione sono sensibili agli effetti delle molecole organiche che legano l'actina del citoscheletro.	pag. 84
4.1. Gli effetti dei farmaci leganti l'actina sull'organizzazione dinamica del citoscheletro nelle uova di riccio di mare.	pag. 84
4.2. Gli effetti della CYT-B e della LAT-A sull'aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle uova di riccio di mare alla fecondazione.	pag. 86
4.3. Gli effetti del JAS e della PHAL sull'aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle uova di riccio di mare alla fecondazione.	pag. 91
4.4. Gli effetti di sostanze chimiche che specificamente si legano all'actina sul sollevamento della membrana di fecondazione e sull'incorporazione spermatica.	pag. 92
Discussione per il Capitolo IV	pag. 99
CAPITOLO V: Le uova di stelle marine come modello sperimentale per lo studio dei meccanismi dell'invecchiamento ovocitario.	pag. 106
5.1. La fecondazione polispermica può essere legata ai cambiamenti strutturali della zona corticale dell'uovo nella fase post-meiotica.	pag. 106
5.2. L'actina del citoscheletro come un fattore essenziale nel meccanismo di blocco alla polispermia durante la fecondazione.	pag. 112
5.3. I cambiamenti strutturali della regione corticale a cui vanno incontro le uova nel corso del processo maturativo definiscono il normale <i>pattern</i> di rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione.	pag. 117
Discussione per il Capitolo	pag. 122
CAPITOLO VI: L'alterazione delle dinamiche dell'actina del citoscheletro causata dalla nicotina come fattore che induce polispermia.	pag. 127
6.1. La Nicotina induce polispermia nelle uova di riccio di mare secondo una modalità dose dipendente.	pag. 127
6.2. La nicotina altera profondamente la struttura dell'actina del citoscheletro e ne compromette le normali dinamiche alla fecondazione.	pag. 132
6.3. La Nicotina altera le dinamiche di rilascio del Ca^{2+} alla fecondazione.	pag. 136
6.4. La nicotina induce polispermia nelle uova di riccio di mare secondo	pag. 139

un meccanismo indipendente dai AChR.	
6.5. La nicotina interferisce con le dinamiche di polimerizzazione e depolimerizzazione della F-actina <i>in vitro</i> .	pag. 144
Discussione per il Capitolo VI	pag. 148
CONCLUSIONI	pag. 153
BIBLIOGRAFIA	pag. 158
RINGRAZIAMENTI	pag. 191

ABBREVIAZIONI

1-MA: 1-Metiladenina;

β -NAD⁺: piridina nucleotide nicotinammide adenin dinucleotide;

ACh: acetilcolina;

AChR: recettori nicotinici;

ASW: acqua di mare artificiale;

ARIS: sostanza che induce la reazione acrosomiale;

ARC: adenosina difosfato ribosil ciclasi;

BAPTA: glicin, N,N'-[1,2-etanodis (ossi-2,1-fenilene)]bis[N-(carbossimetile)];

cADPr: adenosina 5-difosfato ribosio ciclico;

CaFSW: acqua di mare senza Ca²⁺;

CCD: Charge couple devise, dispositivo ad accoppiamento di carica;

cdc2: chinasi ciclina dipendente di tipo 2;

cGMP: guanosine monofosfato ciclico;

CICR: Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, rilascio di Ca²⁺ indotto dal Ca²⁺;

CYT-B: citocalasina B;

DAG: Diacilglicerolo;

Dil: dialchilcarbocianina;

DMSO: dimetilsolfossido;

DS: deviazione standard;

EGTA: acido tetracetico - N, N, N',N' - (2-amino etile) - etilen glicole;

FC: flash corticale;

FI: fluorescenza istantanea;

FR: fluorescenza relativa;

FSW: acqua di mare filtrata;

GC: granuli corticali;

GDP β S: GDP-guanosina-5'-0-2-tiodisfosfato;

GPN: glicil-L-fenilalanina 2-naptilamide;

GVBD: Germinal vesicle breakdown, dissoluzione dell'involucro nucleare;

GSS: sostanza stimolatrice delle gonadi;

HDP: periodo ormone-dipendente;

IB: tampone di iniezione;

ICSI: iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo;

InsP₃: Inositolo -(1, 4, 5)-trisfosfato.

InsP₃R: recettori per l'inositolo -(1, 4, 5)-trisfosfato;

JAS: Jasplakinolide;

LAT-A: Latrunculina-A;

MF: membrana di fecondazione;

MPF: fattore che promuove la maturazione;

MLA: metil metilcaconitina;

nAChR: recettori nicotinici di tipo neurale

NADP: Nicotinamide adenin dinucleotide fosfato;

NAADP: Nicotin adenin dinucleotide fosfato acido;

PI3K: fosfatidil inositolo 3-chinasi;

PI: fosfatidil-inositolo;

PH: dominio omologo alla plextrina;

PKB: proteina chinasi B;

PLC: fosfolipasi C;

PHAL: falloidina;

PIP₂: fosfatidil inositolo - (4, 5)-bisfosfato;

PIP₃: fosfatidil inositolo -(3, 4, 5)-trisfosfato;

PIP5K: fosfatidil inositolo 5-fosfato 4-chinasi;

PIP5K: fosfatidil inositolo 4-fosfato 5-chinasi;

PP1: proteina fosfatasi 1;

PP2A: proteina fosfatasi 2A;

PTX: tossina della pertosse;

RA: reazione acrosomiale;

RE: reticolo endoplasmatico;

RFP: red fluorescence protein, proteina dalla fluorescenza rossa;

RFU: unità di fluorescenza relativa;

ROI: regione d'interesse;

RyR: recettori rianodinici;

SOC: Store operated channel, canali aperti dallo svuotamento dei depositi intracellulari;

SH2: Src homology domain 2, dominio di omologia Src;

TEM: microscopia elettronica a trasmissione;

TPC: canali voltaggio dipendenti a due pori;

TRPM2: recettori canali cationici che determinano variazioni transitorie di potenziale, sottofamiglia M, membro 2;

VG: vescicola germinale;

*“Non il possesso della conoscenza, della verità irrefutabile, fa l'uomo di scienza,
ma la ricerca critica, persistente e inquieta, della verità.”*

Karl Popper

The Logic of Scientific Discovery, 1959

SOMMARIO

Il processo di interazione dello spermatozoo con la cellula uovo durante la fecondazione rimane uno dei più affascinanti misteri della vita. A seguito della fusione dei due gameti, l'uovo va incontro ad una serie di reazioni, dette di attivazione, che sono necessarie per un normale sviluppo embrionale. I meccanismi di attivazione dell'uovo risultano per molti versi simili a quelli riscontrabili nelle cellule somatiche stimolate da messaggeri primari, come ormoni, fattori di crescita e neurotrasmettitori, e si basano sull'aumento della concentrazione intracellulare dello ione Ca^{2+} . Il normale rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione è dipendente da una serie di cambiamenti morfologici, biochimici ed elettrofisiologici che avvengono durante la maturazione meiotica, che prevede a sua volta la liberazione del Ca^{2+} , un processo indispensabile per il potenziamento della capacità dell'uovo maturo di rilasciare il Ca^{2+} secondo tempi e modalità specifiche alla fecondazione. Sebbene l'aumento di Ca^{2+} nei processi di maturazione e fecondazione sia stato osservato in tutte le uova degli organismi viventi studiati, e sebbene siano stati individuati diversi secondi messaggeri coinvolti nella cascata di eventi della trasduzione del segnale Ca^{2+} (InsP_3 , NAADP, cADPR), il meccanismo preciso attraverso cui tale rilascio possa realizzarsi rimane oscuro. Gran parte della nostra conoscenza scientifica sulla fecondazione proviene da studi effettuati su ricci e stelle di mare, che forniscono un gran numero di gameti. Queste uova, così grandi e trasparenti, rappresentano da sempre ottimi sistemi modello per lo studio dell'attivazione dell'uovo e dello sviluppo embrionale in acqua di mare, un mezzo che è artificialmente riproducibile in laboratorio. Gli ovociti di stella di mare consentono lo studio dei cambiamenti corticali, citoplasmatici e nucleari che hanno luogo durante il processo di maturazione meiotica, che può anche essere indotto *in vitro* mediante stimolazione ormonale. Tali cambiamenti morfologici e biochimici assicurano il successo della fecondazione delle uova, che in questa specie avviene durante il processo di

maturazione e più precisamente tra la dissoluzione dell'involucro nucleare e la fuoriuscita del primo globulo polare. Le uova di riccio di mare, invece, sono fecondate dopo il completamento della meiosi, e sono particolarmente adatte per lo studio dell'interazione spermatozoo-uovo, dei primi eventi dell'attivazione dell'uovo e dello sviluppo embrionale, perché è possibile fecondare, in maniera sincrona, un gran numero di uova mature. Le uova di stelle e ricci di mare subiscono rapidi cambiamenti nell'organizzazione dell'actina del citoscheletro concomitanti con flussi ionici in risposta alla spermatozoo fecondante o ad un qualsiasi altro stimolo esterno. La membrana plasmatica e la zona corticale dell'uovo rappresentano, quindi, "zone eccitabili" della cellula capaci di rispondere rapidamente agli stimoli esterni con rapidi cambiamenti strutturali e variazioni dei livelli di Ca^{2+} . Durante lo svolgimento di questo corso di dottorato ho utilizzato le uova di riccio e stella di mare come modello sperimentale al fine di indagare i meccanismi molecolari che regolano i processi di maturazione e fecondazione, con particolare attenzione al ruolo regolatorio svolto dall'actina del citoscheletro. A tal fine ho adoperato tecniche di microiniezione associate all'uso del microscopio confocale e camere digitali per misurare i cambiamenti della concentrazione citoplasmatica del calcio e seguire in tempo reale i cambiamenti strutturali dell'actina del citoscheletro e tutti gli altri eventi morfologici associati ai processi di maturazione e fecondazione, inclusi l'estrusione dei globuli polari dopo maturazione, l'incorporazione dello spermatozoo e lo sviluppo embrionale. Ho inoltre adoperato tecniche di fissazione per visualizzare, mediante microscopia elettronica, la conformazione ultrastrutturale della zona corticale adiacente alla membrana plasmatica di ovociti e di uova trattate con diversi agenti. Infine ho effettuato saggi biochimici per misurare *in vitro* l'attività della nicotina sui filamenti di actina per compararla con quella delle proteine canoniche come ad es. la cofilina e profilina che si legano all'actina (*actin-binding proteins*), regolandone l'organizzazione strutturale e la sua dinamicità. Nel corso di questo lavoro di tesi presenterò dati che mostrano come i rapidi e dinamici riarrangiamenti dell'actina del citoscheletro nel cortex dell'ovocita/uovo in seguito alla

stimolazione ormonale o spermatica siano fondamentali per la modulazione del segnale Ca^{2+} e per gli altri eventi associati alla fecondazione, come l'esocitosi dei granuli corticali ed il controllo della monospermia. I risultati sperimentali della mia tesi di dottorato hanno evidenziato che le perturbazioni dell'organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro tramite l'utilizzo di vari agenti farmacologici o attraverso il processo fisiologico di invecchiamento ovocitario compromettono seriamente la buona riuscita del processo di fecondazione ed il proseguimento dello sviluppo embrionale.

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

Le uova di stelle e ricci di mare come sistemi modello per lo studio della maturazione e della fecondazione

Da più di cento anni, le uova degli animali marini rappresentano un'eccellente risorsa con cui esplorare i meccanismi di attivazione dell'uovo e del controllo dello sviluppo embrionale. Durante la stagione riproduttiva, un gran numero di ovociti immaturi, in seguito all'inseminazione, rispondono agli spermatozoi con un aumento nei loro livelli di Ca^{2+} intracellulare, ma sono polispermici, incorporano cioè una grande quantità di spermatozoi. È largamente accettato in letteratura che la tendenza alla polispermia che si verifica negli ovociti immaturi sia espressione della loro incapacità di realizzare una corretta esocitosi del contenuto dei granuli corticali nello spazio perivitellino. Come conseguenza del mancato sollevamento della membrana di fecondazione, che fungerebbe da barriera meccanica, numerosi spermatozoi possono entrare nell'ovocita (Schuetz, 1975; Schuetz e Longo, 1981; Dale e Santella, 1985). La capacità delle uova di essere fecondate da un singolo spermatozoo si sviluppa nel processo di maturazione, durante il quale i cambiamenti morfologici nella superficie delle uova coincidono con la dissoluzione dell'involucro del nucleo, denominato *germinal vesicle*, GV (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD). Dopo le prime e più datate descrizioni sulla maturazione ovocitaria (Delage, 1901; Chambers, 1921), il meccanismo di controllo della maturazione nella stella di mare è stato ampiamente studiato grazie all'individuazione dell'ormone responsabile della ripresa meiotica, 1-metiladenina (1-MA), che può essere facilmente aggiunto all'acqua di mare nella quale sono sospesi gli ovociti immaturi (Kanatani, 1973; Meijer e Guerrier, 1984). Pochi minuti dopo stimolazione ormonale si verifica una rapida riorganizzazione dell'actina del citoscheletro sulla superficie dell'ovocita, che è accompagnata da un aumento di Ca^{2+} nella zona corticale e nella GV (Schroeder e Stricker, 1983; Schroeder, 1986; Moreau et al., 1978; Santella e Kyozyuka, 1994; Santella et al.,

1998). Gli eventi successivi del processo di maturazione comprendono la GVBD ed il mescolamento del nucleoplasma con il citoplasma, che è essenziale per innescare gli eventi di maturazione corticale che contribuiscono criticamente al successo dell'attivazione dell'uovo da parte dello spermatozoo. Il periodo ottimale per la fecondazione nelle uova di stella marina è compreso tra la GVBD e l'estrusione del primo globulo polare. Contrariamente ad altri tipi di uova, che hanno una finestra di tempo molto limitata durante la quale la fecondazione è possibile, le uova di stella possono ancora essere fecondate diverse ore dopo l'aggiunta di 1-MA. Ciò permette di utilizzarle per studiare i cambiamenti citoplasmatici che si realizzano nelle uova sottoposte ad invecchiamento e le conseguenze sul processo di fecondazione in condizioni non fisiologiche (Just, 1939; Fujimori e Hirai, 1979; Santella et al., 2014). A differenza delle stelle marine in cui una normale fecondazione avviene allo stadio di ovociti primari, le uova di riccio sono rilasciate e fecondate nell'acqua di mare in una condizione più stabile perché hanno completato la meiosi. Tali cellule hanno espulso i due globuli polari ed il loro nucleo con corredo genetico aploide è pronto a fondersi con quello dello spermatozoo ripristinando così la diploidia. Gran parte delle nostre conoscenze sui processi di interazione spermatozoo-uovo ha origine proprio dagli studi effettuati sulle uova di riccio di mare. Pochi secondi dopo l'aggiunta di spermatozoi, al microscopio ottico sono visibili rapidi cambiamenti strutturali sulla superficie dell'uovo fecondato immediatamente successivi alla liberazione di Ca^{2+} nel citoplasma come il sollevamento della membrana di fecondazione, quest'ultima conseguenza dell'esocitosi dei granuli corticali nello spazio tra la membrana plasmatica e quella vitellina. L'importanza del Ca^{2+} nel processo di maturazione degli ovociti e nella fecondazione è stata ampiamente confermata in numerose specie animali, e molte ipotesi circa il meccanismo di trasduzione del segnale che porta alla liberazione del Ca^{2+} intracellulare durante la stimolazione ormonale e alla fecondazione sono state suggerite proprio da studi condotti su stelle e ricci di mare. Ciò è legato alla grande facilità con cui è possibile reperire i gameti, in quantità abbondante e sincronamente arrestati a stadi diversi

della maturazione meiotica, nonché alle loro caratteristiche morfologiche che li rendono estremamente adatti per indagini sperimentali. Nella stella, in particolare, tutto ciò che occorre fare per ottenere i gameti, è un piccolo taglio sul braccio, in corrispondenza della zona in cui si trovano le gonadi. Una volta che le gonadi sezionate vengono in contatto con l'acqua di mare, dalle estremità tagliate cominciano a fuoriuscire liberamente gli ovociti, arrestati alla profase della prima divisione meiotica. Nel caso del riccio di mare invece è possibile indurre il loro rilascio dalla gonade o mediante scuotimento dell'animale o attraverso un'iniezione intracelomatica di KCl ad una concentrazione di 0.5 M oppure tramite stimolazione elettrica. Tali stimolazioni inducono la contrazione dei muscoli adiacenti le gonadi che vengono compresse provocando il conseguente rilascio del loro contenuto. La microiniezione sia negli ovociti che nelle uova è relativamente facile per le loro dimensioni permissive e dopo fecondazione gli embrioni si sviluppano rapidamente fino a raggiungere la fase dello sviluppo embrionale di 32 blastomeri entro 5 ore. Essendo molto trasparenti come le uova, anche gli embrioni permettono una facile osservazione dei cambiamenti dei caratteri morfologici al microscopio ottico.

1.1. Cenni generali sull'anatomia e sulle modalità riproduttive degli organismi modello.

Gli ovociti di stella di mare che ho utilizzato per condurre gli esperimenti per lo svolgimento della mia tesi di dottorato sono stati prelevati da due diverse specie: *Astropecten aranciacus*, che generalmente vive a 20-30 m di profondità nel mare Mediterraneo, sotto la sabbia; e *Asterina pectinifera*, una stella giapponese. Le uova di riccio di mare sono state ottenute solo dalla specie mediterranea *Paracentrotus lividus*, che invece vive sui fondali rocciosi con praterie di *Posidonia oceanica*, da 0 a 30 metri di profondità (Fig. I, 1). Le stelle ed i ricci di mare appartengono al phylum degli Echinodermi e, sebbene siano animali dalla lunga storia evolutiva, rientrano nel gruppo dei Deuterostomi.

Il corpo delle stelle marine presenta simmetria radiale. Un adulto completamente cresciuto di *A. aranciacus* presenta un diametro di circa 50 cm, ed è costituito da un disco centrale e cinque raggi. La superficie orale contenente la bocca è rivolta verso il basso, in contatto con il substrato, mentre la superficie aborale con madreporite è il punto di ingresso del sistema vascolare in acqua. In ogni braccio, al di sotto delle ghiandole digerenti, si trova un paio di gonadi. Anche il riccio di mare ha simmetria pentaraggiata. Presenta uno scheletro calcareo, impropriamente detto guscio, che può raggiungere i 7 cm di diametro, munito di lunghi aculei mobili e, sulla superficie ventrale, (così come per la stella di mare) di tante piccole estroflessioni con estremità a ventosa, dette pedicelli ambulacrali, che gli consentono di spostarsi. La superficie aborale è rivolta verso l'alto e presenta centralmente l'ano ed un foro per la fuoriuscita dei gameti ed il madreporite. La superficie orale è invece rivolta verso il basso e presenta centralmente la bocca con l'organo per l'alimentazione.

In entrambi i casi gli animali sono a sessi separati e non presentano dimorfismo sessuale.

I gameti sono prodotti e poi liberati nel corso della stagione riproduttiva, la cui insorgenza e durata sono diverse a seconda della specie, che inizia in seguito ad una stimolazione ambientale di natura ancora sconosciuta. Dagli studi condotti dallo scienziato giapponese Kanatani nel lontano 1967 è stato possibile chiarire i meccanismi molecolari che stimolano la ripresa della maturazione degli ovociti nelle stelle di mare. In breve, questi stimoli ambientali inducono i nervi radiali, localizzati in ciascun braccio, a produrre un neuro-ormone chiamato sostanza stimolatrice delle gonadi (Gonad Stimulating Substance, GSS) (Kanatani e Hiramoto, 1967), che a sua volta induce la produzione dell'ormone della maturazione 1-MA nelle cellule follicolari che circondano gli ovociti. Quando l'1-MA raggiunge la superficie dell'ovocita e i recettori specifici sulla membrana plasmatica, il suo trasferimento lungo i processi delle cellule follicolari all'ovocita, induce la ripresa meiotica in tutte le specie di stelle marine (Kanatani e Hiramoto, 1970). Le uova mature prive di cellule follicolari vengono rilasciate in mare dove, sia le stelle che i ricci, si riproducono per fecondazione esterna. È nel mare infatti che gli spermatozoi e le uova vengono liberati

simultaneamente dai gonodotti e dai gonopori, rispettivamente della femmina e del maschio, che nella stella sono localizzati alla base di ogni braccio (Villet et al., 1978).

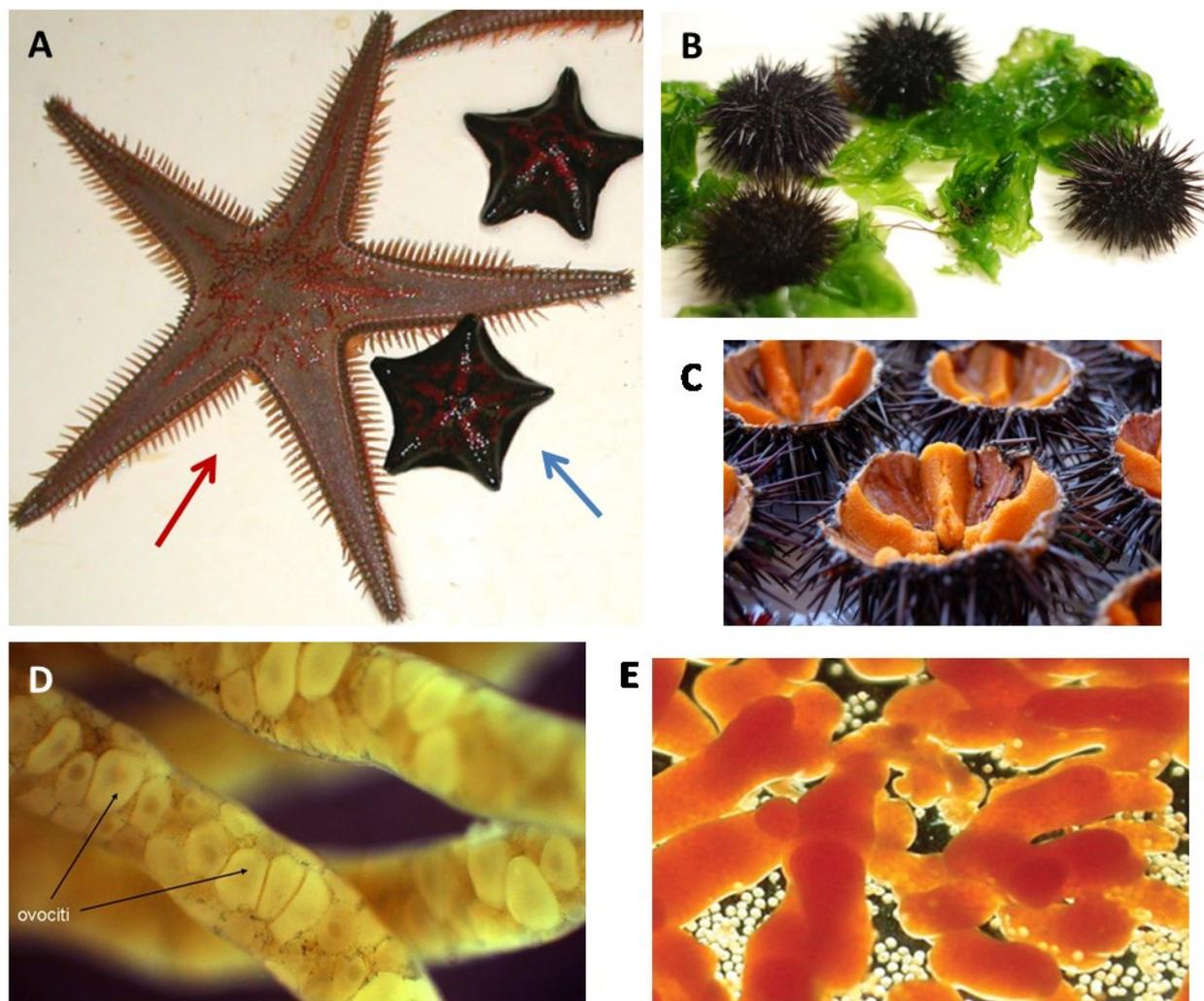


Figura I, 1. (A) Esemplici adulti di *Astropecten aranciacus* (freccia rossa) e *Asterina pectinifera* (freccia blu). (B) Esemplici adulti di *Paracentrotus lividus* (C) Gonadi con uova (freccia) all'interno di una femmina di *P. lividus*. (D) Gonadi di *A. aranciacus* con ovociti strettamente addossati nella struttura tubulare. (E) Gonadi di *A. pectinifera*, con ovociti all'interno. Sul fondo sono visibili ovociti fuoriusciti dalla gonade.

1.2. Morfologia degli ovociti immaturi.

L'arrivo degli stimoli ambientali, che segna l'inizio della stagione riproduttiva, riattiva l'ovogenesi nella gonade che in breve tempo si riempie di ovociti a diversi stadi di accrescimento. L'ovogenesi della stella inizia con la fase di moltiplicazione degli ovogoni e la formazione di piccoli ovociti primari. Questi vanno incontro, quindi, ad un processo di crescita che si divide in primario e secondario, prima di entrare in una fase di quiescenza (Schoenmakers et al., 1981). La fase di accrescimento primario è a carico del citoplasma che è interessato da un'intensa attività di sintesi proteica, dall'aumento delle dimensioni e dal differenziamento. Questo processo viene affiancato da cambiamenti nucleari, legati all'inizio della meiosi, durante la fase di accrescimento secondario. Gli ovociti attraversano i primi due stadi della Profase I, leptotene e zigotene, e allo stadio di pachitene della prima divisione meiotica entrano nella fase di quiescenza (Shirai et al., 1990). A questo punto gli ovociti hanno raggiunto le loro dimensioni definitive, con un diametro di circa 300 μm nella specie *A. aranciacus* e 180 μm in *A. pectinifera*, ed un grande nucleo, denominato vescicola germinale (VG) (Fig. I, 2A), del diametro di 70 μm e 50 μm rispettivamente.

A questo stadio gli ovociti vengono definiti "immaturi" e possono essere isolati dalla gonade per fini sperimentali. Nel caso del riccio di mare *P. lividus*, il diametro delle uova mature nella gonade è di circa 80 μm e raramente possibile trovare ovociti immaturi in seguito alla dissezione delle gonadi.

Gli ovociti sono circondati da due involucri esterni: uno strato gelatinoso glicoproteico, *jelly coat*, e un involucro vitellino. La superficie degli ovociti è ricoperta da numerosi microvilli di 0,3-0,4 μm di lunghezza, e lo strato vitellino è intimamente associato alla membrana plasmatica della superficie dell'ovocita (Schroeder, 1981; Longo et al., 1995). L'involucro vitellino contiene numerose glicoproteine ed è circa 0,5 μm di spessore. Questo è circondato dallo strato gelatinoso, che viene secreto dall'ovocita (Schroeder, 1981; Santella et al., 1983). Esternamente al *jelly coat*, le cellule follicolari circondano gli ovociti disponendosi a circa 15 μm dalla superficie degli stessi. Queste piccole cellule sono

in contatto con la superficie degli ovociti mediante estensioni citoplasmatiche sottili, non ramificate e disposte radialmente. Questi prolungamenti che penetrano il *jelly coat* e l'involucro vitellino, raggiungono la membrana plasmatica grazie a caratteristiche giunzioni intercellulari simili a desmosomi. È stato suggerito che l'1-MA sia trasferito dalle cellule follicolari all'ovocita proprio attraverso questi processi (Schroeder, 1981).

Gli ovociti di stella di mare, al pari delle uova di tutti gli Echinodermi, sono oligolecitici (con pochi granuli di vitello distribuiti uniformemente nel citoplasma), ma a differenza delle uova di riccio di mare, sono polarizzati. Nell'ovocita immaturo l'emisfero animale contiene la VG, o il materiale genetico in quello maturo, mentre la parte opposta è definita emisfero vegetale. Nella VG la cromatina è decondensata ed il nucleolo è ben visibile anche sotto il microscopio ottico, grazie alla notevole trasparenza del citoplasma. La vescicola germinale presenta una forma sferica per lo più regolare, ma la regione dell'involucro nucleare ancorata al cortex in prossimità della membrana plasmatica è altamente convoluta. Questa regione del citoplasma compresa tra la membrana plasmatica e la vescicola germinale è il luogo in cui si trovano i due centrosomi e l'aster pre-meiotico (Myazaki et al., 2000). Il reticolo endoplasmatico (RE) è distribuito uniformemente nel citoplasma (Jaffe e Terasaki, 1994), insieme ad altri organelli intracellulari, come gocce lipidiche, granuli di vitello, granuli corticali, ribosomi, complesso di Golgi e mitocondri. I granuli di vitello occupano circa la metà del volume del citoplasma degli ovociti. Misurano 1-2 μm di diametro e rappresentano i maggiori siti di stoccaggio per le sostanze nutritive, tra cui fosfoglicoproteine derivanti dalla vitellogenina (Wahli, 1988). La maggior parte delle proteine contenute nei granuli di vitello, però, non risulta indispensabile per le prime fasi dell'embriogenesi nelle stelle marine, poiché il loro utilizzo, non è indispensabile per il raggiungimento dello stadio larvale (Reimer e Crawford, 1995). Una parte molto estesa ed organizzata della zona corticale dell'ovocita è rappresentata dal citoscheletro immediatamente contiguo alla membrana plasmatica (Sardet et al., 2002). I filamenti di actina, strettamente impacchettati, sono assenti solo nella porzione in cui la vescicola

germinale è collegata alla membrana plasmatica ed è attraverso questo “corridoio” che vengono espulsi i globuli polari. Mentre i granuli di vitello sono dispersi in tutto il citoplasma, i granuli corticali sono localizzati sulla superficie esterna del citoplasma degli ovociti (Reimer e Crawford, 1995). I granuli corticali hanno un diametro di circa 1 μm , contengono mucopolisaccaridi solfati acidi e proteine e presentano una forma ovoidale irregolare (Sousa e Azevedo, 1989). Essi sono posizionati ad 1-3 μm di distanza dalla membrana plasmatica negli ovociti immaturi e, durante la maturazione meiotica, traslocano verso la superficie immediatamente sotto la membrana plasmatica. Si contano circa 40.000-50.000 granuli corticali negli ovociti delle stelle marine *Pisaster ochraceus* e *A. pectinifera* (Schroeder, 1985). Essi sono importanti per una normale fecondazione e per lo sviluppo embrionale. È noto, infatti, che la loro funzione principale è quella di formare la membrana di fecondazione per esocitosi del loro contenuto nello spazio tra la membrana plasmatica e l’involucro vitellino (spazio perivitellino). Il sollevamento della membrana di fecondazione funge da barriera fisica per bloccare l’ingresso di più spermatozoi (fenomeno della polispermia) (Vacquier et al., 1973; Schuel, 1978). I granuli corticali secernono anche componenti della matrice extracellulare (Reimer e Crawford, 1995). Oltre ai granuli corticali, un’ulteriore classe di vescicole corticali dalle dimensioni di 1-2 μm di diametro chiamate “vescicole acide” va incontro ad esocitosi durante il sollevamento della membrana vitellina in seguito a fecondazione (Vasilev et al., 2012).

1.3. La ripresa del ciclo cellulare ad opera dell’1-metiladenina.

Gli ovociti alla fine della loro crescita e isolati dalla gonade durante la stagione riproduttiva, sono arrestati alla profase della prima divisione. In questa fase, gli ovociti sono fisiologicamente polispermici e possono essere utilizzati per studiare *in vitro* la ripresa del ciclo meiotico mediante l’aggiunta dell’ormone della maturazione 1-MA. L’ormone provoca due successive divisioni citoplasmatiche e nucleari che producono un ovocita primario con un corredo genetico aploide e due piccole abortive, i globuli polari

(Kishimoto, 2003). Infatti, in risposta all'ormone della maturazione, gli ovociti immaturi caratterizzati da un grande nucleo, VG (Fig. I, 2A), riprendono il ciclo meiotico durante il quale l'involucro nucleare si dissolve ed il nucleoplasma si mescola con il citoplasma (GVBD) (Fig. I, 2B). Il lasso di tempo necessario affinché si verifichi GVBD varia da specie a specie, (30 minuti per *A. pectinifera* e 60 minuti per *A. aranciacus*). La concentrazione di 1-MA necessaria per promuovere la maturazione meiotica degli ovociti *in vitro* oscilla tra 1 e 10 μM ed è anch'essa variabile in base alla specie considerata. Il "periodo ormone-dipendente" (Hormonal Dependent Period, HDP) è definito come il tempo minimo necessario di esposizione degli ovociti all'ormone affinché si visualizzino chiari segni di maturazione nel 50% della popolazione ovocitaria (Nemoto, 1982). Esso è fortemente dipendente dalla temperatura (aumenta se la temperatura si abbassa) e non è dipendente dalla concentrazione dell'ormone, ma la sua rimozione durante tale periodo interrompe la maturazione. Una volta superato il HDP, tuttavia, il processo di maturazione procede irreversibilmente anche in assenza di 1-MA nel mezzo (Guerrier e Doree, 1975; Chiba e Hoshi, 1989; Terasaki e Runft, 2010). Per gli ovociti di stella di mare il HDP è stato sperimentato essere di 8 min.

Ad oggi il meccanismo preciso attraverso cui l'1-MA stimoli gli ovociti non è stato pienamente compreso. Tuttavia, è stato dimostrato che l'ormone funziona solo quando viene aggiunto agli ovociti dall'esterno. Gli ovociti microiniettati con l'ormone, infatti, non vanno incontro a maturazione. Tali risultati hanno suggerito il coinvolgimento di un recettore a livello della superficie cellulare. In linea con tale ipotesi, è stato osservato sperimentalmente che quando l'assorbimento dell'ormone all'interno della cellula veniva bloccato, l'ormone era ancora capace di esplicitare la sua attività biologica (Dorée e Guerrier, 1975), suggerendo che il suo effetto fosse mediato da una via di trasduzione del segnale. Infatti, la risposta degli ovociti all'1-MA è significativamente ostacolata dal Triton X-100, un agente permeabilizzante che estrae proteine dalla membrana plasmatica (Morisawa e Kanatani, 1978). Sebbene il recettore per l'1-MA non sia ancora stato

identificato, è plausibile che esso si leghi al suo ligando nell'atomo di azoto in posizione 9 (N9), o nell'interno atomico N7-N9 del nucleo purinico dell'ormone (Kishimoto, 1998).

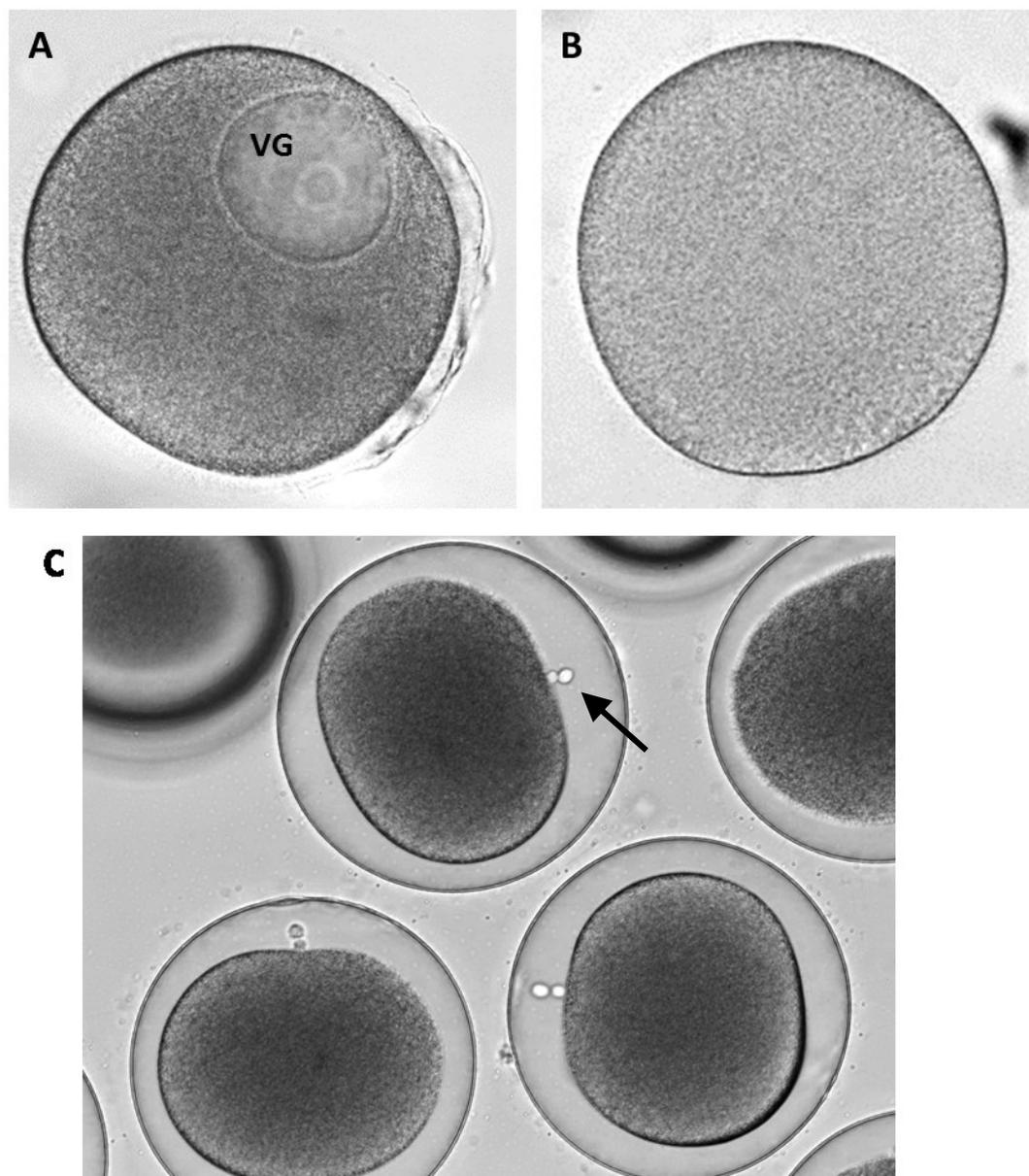


Figura I, 2. Maturazione meiotica e fecondazione delle uova di stella di mare. (A) Ovocita immaturo di *A. pectinifera* arrestato alla profase della prima divisione meiotica. Si notino il nucleo di grandi dimensioni (VG) ed il piccolo nucleolo al suo interno. (B) Uova mature in seguito al trattamento di ovociti immaturi con 1-MA: a questo stadio maturativo, la VG non è più visibile perché ha avuto luogo la GVBD ed il nucleoplasma è mescolato con il citoplasma. (C) Uova fecondate, nella fase di estrusione del secondo globulo polare (freccia): si noti il sollevamento della membrana di fecondazione. È importante sottolineare che, indipendentemente dalla fecondazione, il primo ed il secondo globulo polare vengono espulsi dal polo animale, in questa specie, rispettivamente 70 e 90 min dopo stimolazione ormonale.

1.4. Trasduzione del segnale della ripresa meiotica mediata dall' 1-MA.

È stato suggerito che l'1-MA potrebbe indurre la ripresa meiotica attraverso un recettore accoppiato a proteine G eterotrimeriche di membrana poiché le subunità α , β e γ della proteina G purificate dalla membrana plasmatica degli ovociti di stelle di mare (Tadenuma et al., 1991; Tadenuma et al., 1992), hanno mostrato un'elevata sensibilità alla tossina della pertosse (PTX) (Shilling et al., 1989). L'inibizione della maturazione in seguito alla microiniezione della tossina della pertosse (Shilling et al., 1989) e della $G_{i\alpha}$ sostiene che l'effetto dell'1-MA è mediato dal recettore legato alla proteina G. L'evidenza sperimentale che la microiniezione di $G\beta\gamma$ negli ovociti di stella di mare induce GVBD in assenza di 1-MA ha ulteriormente confermato l'idea che sia proprio tale subunità a dare inizio alla cascata di segnali intracellulari indotti dall'ormone (Jaffe et al., 1993; Chiba et al., 1993). È stato suggerito che gli effettori delle subunità $G\beta\gamma$ siano localizzati nel citoplasma degli ovociti, poiché l'iniezione della subunità $\beta\gamma$ nella regione centrale del citoplasma in prossimità della VG induce GVBD molto più velocemente rispetto ad un'iniezione effettuata in prossimità della membrana plasmatica (Chiba et al., 1993). Il bersaglio principale della subunità $\beta\gamma$ potrebbe essere la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) (Lopez-Illasaca et al., 1997; Stephens et al., 2002), poiché l'utilizzo dei suoi inibitori selettivi, wortmannina e LY294002, blocca sia la meiosi che l'attivazione del MPF durante la maturazione (Sadler e Ruderman, 1998). La PI3K, a sua volta, regola la fosforilazione della proteina p62, che sembra giocare un ruolo fondamentale nel processo di attivazione del MPF e nella ripresa della meiosi (Kishimoto 1999; Okumura et al., 2002).

La scoperta che l'estratto citoplasmatico prelevato da ovociti di rana, precedentemente sottoposti a stimolazione ormonale, potesse stimolare a sua volta la progressione del ciclo cellulare in cellule non trattate con l'ormone (Masui e Markert, 1971), suggerì la presenza di un fattore citoplasmatico sufficiente per indurre la maturazione. Risultati simili vennero ottenuti in ovociti di stella di mare microiniettati con il citoplasma di ovociti trattati con 1-MA. Questi ovociti andavano incontro a GVBD ed estrusione dei globuli polari in

manca di stimolazione con 1-MA (Kishimoto e Kanatani, 1976). Questi risultati dimostrarono l'esistenza del MPF, o Fattore che Promuove la Maturazione, (Masui e Markert, 1971). Il fattore MPF che è responsabile della maturazione ovocitaria indotta da 1-MA, è costituito da un complesso di due proteine: ciclina B e proteina-chinasi Cdc2 o Maturation Promoting Factor (MPF). La chinasi Cdc2 è responsabile dell'attività catalitica dell'enzima, mentre la ciclina B costituisce la subunità regolatoria del complesso proteico. Quest'ultima appartiene alla famiglia delle cicline, proteine non presenti stabilmente nel citoplasma, ma che vengono ciclicamente sintetizzate quando la cellula è pronta a passare ad una nuova fase del ciclo cellulare e poi repentinamente degradate. La ciclina B è responsabile della transizione dalla fase G2 a quella M, per cui MPF attivo si trova solo nelle cellule prossime alla divisione (Norbury et al., 1989; Nigg, 1995; Nigg, 2001).

La via di segnalazione che porta all'attivazione del MPF è stata chiarita in diversi sistemi sperimentali. Negli ovociti immaturi, il complesso ciclina B-Cdc2 è mantenuto in uno stato di inattivazione per mezzo della fosforilazione nei residui di tirosina 15 e treonina 14 della Cdc2 (Picard et al., 1991; Okumura et al., 1996) ad opera della proteina chinasi Myt1 associata alla membrana (Mueller et al., 1995; Okumura et al., 2002). 1-MA attiva in maniera indiretta la chinasi Akt (proteina chinasi B, PKB), che fosforila e riduce l'attività di Myt1. In contemporanea, ad opera di chinasi ancora non note, si ha fosforilazione ed attivazione della Cdc25, una tirosina fosfatasi che attiva MPF defosforilando i residui di tirosina, sensibili alla proteina fosfatasi 1 (PP1) e alla proteina fosfatasi 2A (PP2A) (Masui, 2001; Prigent e Hunt, 2004). Un secondo passaggio di attivazione del MPF è dato da un meccanismo di feedback positivo, operato dallo stesso MPF attivato, che va a rinforzare l'attività di Cdc25 ed indebolire quella di Myt1. MPF è inattivo nel citoplasma degli ovociti immaturi delle stelle marine, ma si accumula nel nucleo dopo l'attivazione nel citoplasma (Ookata et al., 1992) e si pensa che la traslocazione di MPF e Cdc25 sia essenziale per l'attivazione finale dello stesso MPF. Nelle stelle marine, MPF entra nel nucleo dell'ovocita all'emisfero animale (Terasaki et al., 2003). Una volta attivato, MPF

inizia a fosforilare i suoi bersagli, che sono riconosciuti dalla sequenza consenso serina-treonina seguiti da una prolina (Nigg, 1995). MPF fosforila molte proteine strutturali e regolatrici, tra cui chinasi e fosfatasi, anche se il substrato d'elezione è rappresentato dall'istone H1. Il disassemblaggio della lamina nucleare si verifica proprio a causa di una fosforilazione operata dal complesso ciclina B/chinasi Cdc2 (Peter et al., 1990). Inoltre, un'ulteriore fosforilazione ad opera del MPF controlla l'assemblaggio del fuso mitotico e dirige l'interazione dello stesso MPF con i microtubuli (Ookata et al., 1993) e i centrosomi (Perez-Mongiovi et al., 2000). Cdc2 fosforila apparentemente molte proteine implicate nel processo di meiosi, e il nostro laboratorio ha dimostrato che anche gli elementi del citoscheletro, come i filamenti di actina, potrebbero essere modulati dal MPF (Lim et al., 2003).

1.5. Cambiamenti morfologici durante la maturazione meiotica.

Dopo 1-2 minuti di esposizione all'ormone 1-MA, l'actina del citoscheletro corticale subisce una profonda riorganizzazione. Sulla membrana plasmatica compaiono delle proiezioni citoplasmatiche, dette "spicole", costituite da filamenti di actina che va incontro a processi di polimerizzazione e depolimerizzazione (Schroeder e Stricker, 1983). Inoltre, gli ovociti immaturi di stella di mare presentano microvilli relativamente lunghi, costituiti da microfilamenti che partono dalla superficie cellulare e penetrano l'involucro vitellino, che in seguito a trattamento ormonale, diminuiscono in lunghezza e densità. Durante la maturazione meiotica, si evidenzia un cambiamento nelle proprietà meccaniche degli ovociti di stella, in particolare al tempo della GVBD durante il quale si verifica una riduzione della rigidità cellulare (Nakamura e Hiramoto, 1978; Nemoto et al., 1980). Inoltre le cellule follicolari che circondano gli ovociti immaturi migrano verso un unico punto per la distruzione delle giunzioni cellulari simili ai desmosomi che collegano le cellule follicolari agli ovociti. Durante il processo di maturazione, la tensione superficiale degli ovociti diminuisce rapidamente e rimane bassa fino all'espulsione del primo globulo

polare. Successivamente si verifica di nuovo un forte aumento e un brusco decremento della tensione durante la formazione del secondo globulo polare (Hiramoto 1964, 1976; Nakamura e Hiramoto, 1978; Shoji et al., 1978). Le variazioni della tensione superficiale degli ovociti sembrano essere il risultato della mescolanza del nucleoplasma con il citoplasma, perché non si verifica in ovociti maturati in assenza di nucleo (Yamamoto e Yoneda, 1983; Yamamoto 1985). Parallelamente, anche le proprietà elettriche della membrana plasmatica sono soggette ad apprezzabili cambiamenti. Il potenziale di membrana iniziale di riposo di circa -80 mV degli ovociti immaturi al tempo della GVDB si sposta a un livello stabile di -10 a -20 mV (Dale et al., 1979; Miyazaki e Hirai, 1979).

Durante la maturazione meiotica, i granuli corticali (GC) che sono localizzati nella periferia del citoplasma degli ovociti (Longo et al., 1995), si dispongono con il loro asse lungo perpendicolarmente alla membrana plasmatica attraverso un processo che è strettamente dipendente dall'actina del citoscheletro (Santella et al., 1999, Wessel et al., 2002). Nelle uova mature, i granuli corticali sono pronti per esocitare il loro contenuto nello spazio perivitellino in risposta all'aumento intracellulare di Ca^{2+} indotta dallo spermatozoo o da secondi messaggeri, come ad esempio inositol-1, 4, 5- trisfosfato (InsP_3), ADP ribosio ciclico (cADPR) e acido nicotinico adenina dinucleotide fosfato (NAADP) (Picard et al., 1985; Dargie et al., 1990; Lee e Aarhus, 1995) essendo accettato in letteratura che l'aumento intracellulare di Ca^{2+} sia l'unico evento responsabile per l'esocitosi dei GC. È stato stimato che circa il 96% dei GC dell'uovo vanno incontro all'esocitosi quando il Ca^{2+} viene rilasciato dallo spermatozoo durante il processo di fecondazione o in seguito a trattamento con sostanze chimiche (calcio ionoforo) che producono aumenti nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (Longo et al., 1995).

Durante la maturazione meiotica, ha inizio una significativa riorganizzazione del reticolo endoplasmatico (RE), in concomitanza con la GVBD che si conclude al termine della meiosi. I cambiamenti strutturali nelle membrane del RE sono stati studiati in dettaglio da Jaffe e Terasaki (1994), utilizzando il colorante fluorescente lipofilico della carbocianina:

la dialchilcarbocianina o DiI. Il colorante emette una lieve fluorescenza quando non è legato al bersaglio, ma diventa molto luminoso quando si lega alle membrane cellulari e diffondendosi nelle cellule. Ad eccezione del cortex e dell'involucro nucleare, dove il RE sembra essere costituito da una serie di tubuli irregolari, la microiniezione di una goccia di olio saturato con DiI negli ovociti di stella marina ha evidenziato la presenza di una rete di cisterne, distribuite in modo uniforme in tutto il citoplasma. Nelle uova mature, il RE acquisisce la forma di lamelle sferiche che circondano i granuli di vitello a cui sembrano essere intimamente interconnessi (Jaffe e Terasaki, 1994). Alla fecondazione, la continuità delle membrane viene interrotta in maniera transitoria (Terasaki et al., 1996), un fenomeno osservato anche dall'iniezione di 100 μM InsP_3 nel citoplasma. Tali risultati hanno suggerito che la frammentazione del RE è correlata al rilascio di Ca^{2+} da questo organello cellulare (Jaffe e Terasaki, 1994).

1.6 . Cambiamenti dell'actina del citoscheletro durante la maturazione degli ovociti di stelle marine.

Al tempo della GVBD, la somministrazione di 1-MA induce il distacco delle cellule follicolari dalla superficie degli ovociti e loro migrazione e raggruppamento in un solo punto dell'uovo maturo, chiaro indice di una profonda riorganizzazione strutturale del cortex. La gonade della stella isolata in acqua di mare subisce una marcata contrazione per la presenza dei muscoli lisci nella parete ovarica che provoca il rilascio degli ovociti. Infatti come per un qualsiasi processo di contrazione muscolare, tale contrazione non si verifica in assenza di Ca^{2+} in acqua di mare (Meijer e Guerrier, 1984). Come già accennato, gli ovociti immaturi sono polarizzati e l'analisi delle immagini di immunofluorescenza ottenute usando anticorpi anti- α -tubulina ha evidenziato che l'ancoraggio della VG nel cortex del polo animale è controllato dai microtubuli ed è essenziale per il normale svolgimento degli eventi meiotici (Miyazaki et al., 2000). Tuttavia, recenti dati del Laboratorio dove ho svolto la tesi hanno dimostrato che anche

filamenti di actina sono coinvolti nel posizionamento della VG, nel cortex. È interessante notare che la maturazione degli ovociti di stella di mare può anche essere indotta da agenti riducenti (ad esempio il ditiotreitolo) che sono capaci di mimare l'azione dell'1-MA nell'indurre cambiamenti morfologici attraverso l'aumento del contenuto sulfidrilico di proteine localizzate della zona corticale dell'ovocita (Kishimoto et al., 1976). Numerosi studi in microscopia ottica ed elettronica hanno rivelato cambiamenti strutturali corticali già 1 o 2 minuti dopo l'aggiunta di 1-MA, che sono intimamente associati alla riorganizzazione strutturale del citoscheletro. Il riarrangiamento dell'actina filamentosa nella zona corticale è alla base dei cambiamenti delle proprietà meccaniche degli ovociti e nella rigidità della parte più interna del citoplasma. La variazione ciclica dipendente dall'actina della rigidità della superficie durante l'emissione dei globuli polari è essenziale per formare l'anello contrattile al polo animale tra i centrosomi durante l'asimmetrica divisione meiotica che produce un ovocita primario e due cellule abortive di piccole dimensioni, i globuli polari (Hamaguchi et al., 2001). La struttura contrattile di actina nel nucleo sembra essere essenziale per lo spostamento dei cromosomi sul fuso mitotico costituito dai microtubuli durante la prima divisione nucleare della meiosi (Lénart et al., 2005). Le modifiche meccaniche dell'ovocita in maturazione si svolgono sia nella zona corticale sia nella parte più interna del citoplasma, e sono sensibili alla citocalasina, che induce la depolimerizzazione dei filamenti di actina. Di conseguenza i cambiamenti nell'organizzazione strutturale dei filamenti di actina dopo esposizione alla citocalasina B sono responsabili della diminuzione drammatica della rigidità degli ovociti di stella di mare (Nemoto et al., 1980). La caratterizzazione delle variazioni della F-actina durante la maturazione della stella di mare (Fig. I, 3) ha portato all'identificazione di due differenti popolazioni di filamenti di actina corticale: quelli che vanno a costituire i prolungamenti sulla superficie e non (Heil-Chapdelaine e Otto, 1996). La riorganizzazione strutturale della zona corticale dell'ovocita sembra essere correlata ai cambiamenti nella proprietà elettrica della membrana plasmatica. L'aggiunta di 1-MA depolarizza progressivamente il

potenziale di membrana dell'ovocita (0,5 mV/min) fino al momento della GVBD quando si realizza una più brusca depolarizzazione. Questa transizione nella permeabilità agli ioni causata dal processo maturativo necessita del mescolamento del contenuto della VG con il citoplasma (Dale et al., 1979; Yamamoto, 1985). È stato suggerito che la chiusura selettiva dei canali K^+ possa essere responsabile dell'aumento della resistenza di membrana e dello spostamento del potenziale di membrana verso valori di voltaggio meno negativi (Dale et al., 1979; Miyazaki et al., 1975). La causa esatta dei graduali cambiamenti nelle proprietà elettriche della membrana plasmatica durante la maturazione meiotica non è nota, ma è ipotizzabile che la riorganizzazione strutturale dei microvilli e del complesso reticolo di actina in prossimità della membrana plasmatica possano influenzare i canali ionici situati sui microvilli sia mediando il loro riposizionamento oppure attraverso la costituzione di una barriera di diffusione per lo ione Ca^{2+} in prossimità delle aperture dei canali stessi (Lange, 2011).

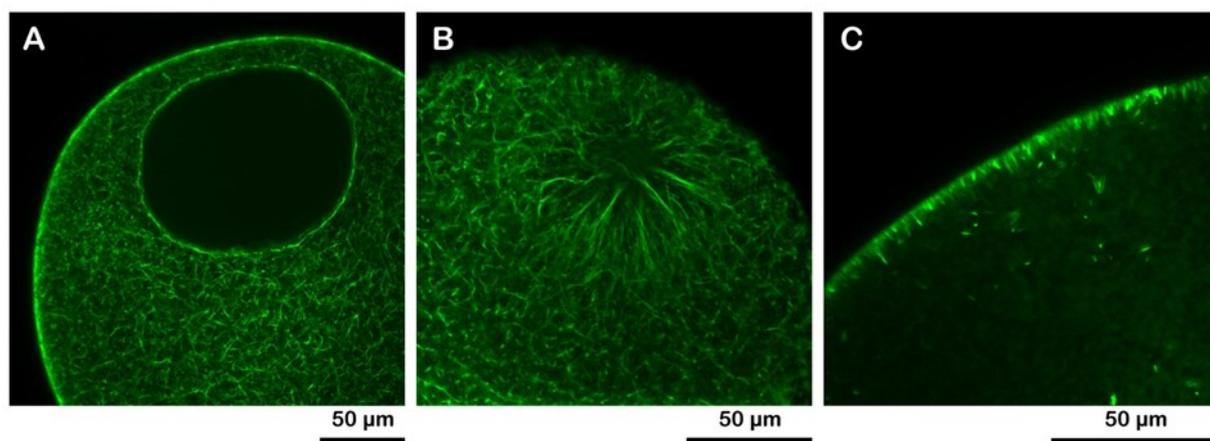


Figura I, 3. Cambiamenti dell'actina del citoscheletro negli ovociti di *A. aranciacus* durante la maturazione meiotica. Gli ovociti immaturi sono stati microiniettati con falloidina Alexa-Fluor488, e le variazioni della F-actina nella cellula *in vivo* sono state monitorate al microscopio confocale durante la maturazione meiotica indotta da 1-MA. (A) A livello della membrana plasmatica così come nel citoplasma dell'ovocita immaturo sono visibili strutture filamentose di actina. Si noti che la F-actina è abbondantemente presente intorno all'involucro nucleare, ma non all'interno della VG. (B) Un'immagine sul piano confocale tangente alla superficie curva della VG localizzata al polo animale dell'ovocita immaturo. Si noti la disposizione radiale delle fibre di F-actina sulla superficie della VG. (C) L'uovo maturo manifesta profondi cambiamenti nell'organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro. Le fibre di actina sono ora visibili soprattutto nelle zone corticali dell'uovo e sono orientate perpendicolarmente alla membrana plasmatica (Modificato da Santella et al., 2015).

1.7. Il Calcio: un singolo messaggero per molteplici funzioni.

Il funzionamento degli organismi pluricellulari si basa sullo scambio integrato di molteplici segnali tra le cellule al fine di modulare e coordinare la loro attività. Durante l'evoluzione, esse hanno sviluppato e perfezionato un sistema estremamente complesso e funzionale per generare ed elaborare le informazioni. Negli anni, numerosi studi hanno messo in risalto il ruolo dello ione calcio come secondo messaggero per eccellenza, a causa della sua estrema versatilità nel trasferire alle proteine "sensori" l'informazione per la regolazione fine di numerosi processi cellulari. L'aumento della concentrazione di calcio presiede non solo all'inizio della vita di un nuovo organismo, ma anche al processo di morte programmata, o apoptosi. La divisione cellulare, l'espressione genica, la contrazione muscolare, l'esocitosi di ormoni e neurotrasmettitori, la plasticità sinaptica sono altri esempi di funzioni cellulari altamente specializzate che vengono mediate dal calcio (Carafoli, 2002). Se il processo evolutivo ha selezionato proprio questo ione come modulatore di così tanti e tanto cruciali eventi della vita cellulare è perché esso presenta delle caratteristiche chimico-fisiche speciali che lo rendono il messaggero biologico ideale. Il calcio, infatti, grazie alla sua conformazione atomica, che non richiede una rigida geometria di legame, può inserirsi nelle cavità irregolari delle proteine, modulandone l'organizzazione tridimensionale, l'attività e l'interazione con gli altri componenti cellulari. La via di trasduzione del segnale che porta al rilascio di Ca^{2+} intracellulare di solito inizia con stimoli esterni (neurotrasmettitori, ormoni, fattori di crescita) o spermatozoi che interagiscono con i recettori sulla superficie cellulare per innescare la sintesi di fattori diffusibili (secondi messaggeri) all'interno delle cellule. Questi a loro volta si legano a recettori-canale permeabili al Ca^{2+} ligando-dipendenti, inducendone l'apertura e la conseguente liberazione dello ione dai depositi interni. Gli stimoli esterni possono anche causare un ingresso di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare (Berridge, 1993), stimolato dal differente gradiente di concentrazione. La concentrazione di Ca^{2+} libero all'esterno delle cellule, infatti, è molto superiore (nell'ordine delle mMoli) se confrontata con quella

interna, mantenuta costantemente a livelli nanomolari. Ciò è estremamente importante in quanto nel citoplasma è presente una considerevole quantità di fosfati derivanti dal metabolismo energetico cellulare ed il calcio, per le sue caratteristiche, può facilmente legarsi anche a composti inorganici, come appunto carbonati e fosfati, e formare precipitati insolubili, molto dannosi per la cellula.

Il Ca^{2+} non diffonde liberamente attraverso la membrana plasmatica (solo ad una certa quantità è consentito di entrare attraverso canali ionici accuratamente regolati) perciò i livelli all'interno delle cellule sono mantenuti a concentrazioni molto basse. La concentrazione libera di Ca^{2+} in condizioni fisiologiche si aggira intorno ai 100 nM nel citosol, ma può salire a 1-10 μM pochi secondi dopo stimolazione. Diversi fattori contribuiscono al mantenimento della concentrazione ottimale del Ca^{2+} citosolico. Come accennato, lo ione Ca^{2+} forma complessi a bassa affinità con piccoli composti quali fosfati, ATP, aminoacidi e fosfolipidi acidi, ma può anche formare complessi ad alta affinità legando reversibilmente i siti specifici di proteine che legano al Ca^{2+} , le *Ca^{2+} -binding proteins* (Carafoli et al, 2001). Queste molecole fungono da tampone primario per il Ca^{2+} nel citosol e costituiscono un efficace meccanismo mediante il quale la concentrazione locale del Ca^{2+} intracellulare cambia rapidamente anche se la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} è primariamente regolata dal ciclo del suo rilascio e riassorbimento nei depositi intracellulari. Infatti i livelli di Ca^{2+} citosolico aumentano per il rilascio dello ione da questi depositi o dall'ambiente extracellulare, mentre il surplus di Ca^{2+} può essere rimosso attraverso l'azione di pompe intracellulari o degli scambiatori e attraverso il legame ed il successivo sequestro da parte delle *Ca^{2+} -binding proteins*. La spesa energetica delle pompe ioniche ATP-dipendenti ripristina i livelli del Ca^{2+} citosolico ai valori di riposo precedenti la stimolazione trasportandolo, contro gradiente, nel lume degli organelli (RE, involucro nucleare, complesso di Golgi, mitocondri e lisosomi) e nello spazio extracellulare. Pertanto la concentrazione citoplasmatica dello ione calcio è mantenuta costante dall'equilibrio strettamente regolato tra la sua liberazione e il suo riassorbimento.

Nelle cellule eucariotiche, i canali del Ca^{2+} localizzati sulla membrana plasmatica sono regolati principalmente dalle variazioni del potenziale di membrana, dal legame con gli specifici ligandi, o dallo svuotamento dei depositi di Ca^{2+} intracellulari. Ad oggi sono stati caratterizzati tre diversi messaggeri intracellulari capaci di mobilizzare il Ca^{2+} : l'inositolo-1, 4, 5- trisfosfato (InsP_3), l'adenosina-5-difosfato ribosio ciclico (cADPr) e il nicotin adenin di nucleotide fosfato acido (NAADP) (Berridge et al., 1994; Lee, 2002; Guse, 2002). InsP_3 è finora il secondo messaggero, la cui azione è meglio caratterizzata, che induce il rilascio di Ca^{2+} dopo il suo legame ai recettori specifici sul RE (InsP_3R) (Streb et al., 1983). L' InsP_3 agisce anche su altri depositi cellulari, come ad esempio l'apparato di Golgi (Pinton et al., 1998), i lisosomi (Haller et al., 1996; Srinivas et al., 2002), i granuli di secrezione (Gerasimenko et al., 1996; Quesada et al., 2001) e l'involucro nucleare (Gerasimenko et al., 1995; Hennager et al., 1995; Santella e Kyojuka, 1997). Il cADPR è un altro secondo messaggero che media il rilascio del Ca^{2+} intracellulare dal RE, mentre è stato dimostrato che NAADP induce la liberazione del Ca^{2+} da depositi diversi dal RE, proponendo le vescicole acide come un possibile deposito cellulare aggiuntivo sensibile a tale molecola.

1.8. L' InsP_3 come mediatore del rilascio di Ca^{2+} .

La storia dell' InsP_3 inizia nel lontano 1953, quando si constatò che l'interazione dell'acetilcolina con i recettori muscarinici sulla membrana plasmatica delle cellule pancreatiche stimolava l'incorporazione del [^{32}P] fosfato nel fosfolipide fosfatidil-inositolo (Hokin e Hokin, 1953). Poi, 30 anni più tardi, Michael Berridge e colleghi (1983) identificarono l' InsP_3 nelle cellule pancreatiche quale prodotto solubile del turnover dei lipidi inositolici, dimostrando che era responsabile dell'aumento del Ca^{2+} intracellulare (Streb et al., 1983). Oltre all' InsP_3 , si scoprì che il turnover dei fosfolipidi inositolo portava alla produzione di diacilglicerolo (DAG), che rimaneva nella membrana plasmatica, ma poteva fungere anche da messaggero intracellulare, attivando la proteina chinasi C (Takai

et al., 1979; Kishimoto et al., 1980). Da allora, sono stati condotti numerosi studi e si è giunti alla conclusione che l'InsP₃ sia un secondo messaggero universale, capace di indurre il rilascio di Ca²⁺ in un vasto numero di tipi cellulari e organismi, a partire dai funghi, per arrivare ad animali e piante (Berridge, 2007).

L'InsP₃ è prodotto per idrolisi del suo precursore, il fosfatidilinositolo 4, 5-bisfosfato (PIP₂), localizzato sulla membrana plasmatica, ad opera dell'enzima fosfolipasi C (PLC). Poi, l'InsP₃ diffonde nel citoplasma e si lega agli InsP₃R sulle membrane del RE per promuovere il rilascio di Ca²⁺. Nei mammiferi, sono stati identificati tre tipi di InsP₃R (InsP₃R1, InsP₃R2 e InsP₃R3) (Furuichi et al., 1989; Furuichi et al., 1994). La sequenza amminoacidica della proteina recettore può essere divisa in tre domini: un dominio breve C-terminale idrofobo che contiene la porzione transmembranaria, il grande dominio regolatore al centro, e il dominio N-terminale flessibile che sporge nel citoplasma e che è responsabile del legame con l'InsP₃ (Mikoshiha, 1997). Il recettore è stato identificato anche nell'involucro nucleare (Nicotera et al., 1990), e alcune evidenze sperimentali suggeriscono che possa essere coinvolto nel rilascio di Ca²⁺ dalle vescicole secretorie (Petersen, 1996) e dal complesso di Golgi (Pinton et al., 1998). Oltre che dall'InsP₃, l'attività del canale del InsP₃R può essere regolata dallo stesso ione Ca²⁺, dall'ATP, e dal suo stato di fosforilazione o defosforilazione (Berridge, 1995).

La famiglia dei fosfoinositidi è composta da sette derivati del fosfatidil-inositolo (PI) che si formano dalla fosforilazione in posizione 3, 4 e 5 dell'anello inositolo (Van de Bout e Divecha, 2009). Il PIP₂ può essere sintetizzato mediante l'azione di due fosfoinositidi chinasi distinte. La fosfatidilinositolo 5-fosfato 4-chinasi (PIP4K) fosforila il fosfatidilinositolo 5-fosfato in posizione 4, mentre la fosfatidilinositolo 4-fosfato 5-chinasi (PIP5K) fosforila il fosfatidilinositolo 4-fosfato in posizione 5 per formare in entrambi i casi il PIP₂. Il livello di PIP₂ è strettamente regolato dalle chinasi di cui sopra e da specifiche fosfomonoesterasi che defosforilano il PIP₂ in PI(4)P e PI (Van de Bout e Divecha, 2009). Il PI e suoi derivati fosfoinositidici costituiscono circa il 10% del totale

dei lipidi cellulari nella maggior parte delle cellule. PIP₂ è ampiamente presente nel foglietto interno della membrana plasmatica ed è stimato essere il derivato fosforilato più abbondante del PI. Nei mammiferi, infatti, esso può rappresentare dallo 0,3 al 1,5% dei fosfolipidi localizzati sulla membrana plasmatica degli eritrociti, dei linfociti e degli epatociti (Saarikangas et al., 2010). Il PIP₂ e fosfatidilinositolo 3, 4, 5-trisfosfato (PIP₃) nella membrana plasmatica presiedono a molte reazioni importanti, come la generazione di secondi messaggeri intracellulari, l'esocitosi, l'endocitosi, e la riorganizzazione del citoscheletro (De Matteis e Godi, 2004; Di Paolo e De Camilli, 2006; Odorizzi et al., 2000). L'interazione del PIP₂ con varie proteine della membrana può indurre la formazione di microdomini costituiti da *clusters* di PIP₂ con proteine specifiche (ad esempio, le *actin-binding proteins* MARCKS, Ezrin, dinamina e MIM) con la funzione di disciplinare il traffico di membrana e le vie di trasduzione del segnale mediate dai recettori (Saarikangas et al., 2010). La presenza di diversi tipi di PI e di fosfatidilinositoli capaci di legarsi a loro volta ad *actin-binding proteins* nel nucleo suggeriscono che i fosfoinositidi possano prendere parte anche nella regolazione delle ancora poco conosciute dinamiche dell'actina nucleare (Irvine, 2003; Vartiainen, 2008). Oltre alla membrana plasmatica, sono stati trovati depositi addizionali di PI anche negli endosomi precoci e nei corpi multivescicolari (Gillooly et al., 2000; Gillooly et al., 2003), nonché nel Golgi, negli endosomi tardivi e nei lisosomi (D'Angelo et al., 2008; Michell et al., 2006).

Come già accennato, l'idrolisi del PIP₂ per produrre InsP₃ e DAG viene effettuata dalla PLC (Rhee, 2001). Il rilascio del Ca²⁺ mediato dal legame con l'InsP₃ può essere causato sia da recettori accoppiati a proteine G sia da recettori tirosina-chinasici. Esistono più isoenzimi della PLC, che sono raggruppati in almeno sei sottofamiglie (β , γ , δ , ϵ , ζ and η) (Saunders et al., 2002; Nakahara et al., 2005). Le subunità β , γ e δ della PLC sono state individuate prima nelle uova di riccio di mare (De Nadai et al., 1998) e successivamente anche nella stella (Runft et al., 2004). La struttura della PLC contiene combinazioni di vari domini regolatori che includono il dominio pleckstrin homolgy (PH), il dominio Src

homology 2 (SH2), i motivi EF-hand e il dominio C2. Il sito attivo dell'enzima è composto dai domini X e Y, che si associano per formare il sito di idrolisi del PIP₂. È stato proposto che il dominio PH sia responsabile dell'ancoraggio dell'enzima alla membrana plasmatica e quindi mantenga l'associazione alla superficie lipidica, facilitandone l'accesso al substrato PIP₂. Sembra che i domini PH provenienti da diversi isoenzimi della PLC possano interagire con PIP₂ e PIP₃, e con le subunità βγ delle proteine G eterotrimeriche (Camps et al., 1992). D'altra parte, il dominio SH2 interagisce con le tirosina chinasi (Noh et al., 1995; Weiss, 1993). Nelle uova di stella di mare, è stato dimostrato che i due domini γ-SH2 della PLC sono coinvolti nel rilascio intracellulare di Ca²⁺ mediato dall'InsP₃ al momento della fecondazione (Runft et al., 2004).

1.9. L'aumento del Ca²⁺ intracellulare mediato dall'ADP ribosio ciclico.

I Recettori rianodinici (RyR) rappresentano l'altra classe di canali permeabili al Ca²⁺ presenti sulle membrane del RE. Furono trovati per la prima volta nel reticolo sarcoplasmatico del muscolo cardiaco e scheletrico (Fleischer et al., 1985), ma adesso la loro presenza è ben documentata anche nelle cellule non muscolari. Il nome del recettore deriva dal nome della pianta alcaloide ryanodine che causa la contrazione del muscolo scheletrico (Jenden e Fairhurst, 1969). Successivamente, il recettore è stato isolato e purificato ed ha dimostrato di possedere attività di canale permeabile allo ione Ca²⁺ in membrane composte da doppio strato lipidico (Lai et al., 1988).

Il cADPR fu identificato come il secondo messaggero deputato alla liberazione del Ca²⁺ dai RyR mediante studi condotti sugli omogenati di riccio di mare (Clapper et al., 1987). Il cADPR è il metabolita a basso peso molecolare della piridina nucleotide nicotinammide adenin dinucleotide (β-NAD⁺) sintetizzato dall'enzima ADP-ribosil ciclastasi (ARC) (Lee, 1999). Nelle uova di riccio di mare, diverse isoforme attive di ARC sono presenti all'interno di vescicole acide ed esocitotiche, dove il loro substrato β-NAD⁺ viene trasportato al fine di produrre il cADPR (Davis et al., 2008). Quest'ultimo viene

considerato un secondo messaggero di prim'ordine, chiamato a svolgere un ruolo di grande importanza nel rilascio di Ca^{2+} indotto dallo spermatozoo al momento della fecondazione delle uova di riccio e stella di mare (Kuroda et al., 2001; Nusco et al., 2002; Leckie et al., 2003). L'iniezione del cADPR nelle uova di riccio di mare, infatti, induce un aumento di Ca^{2+} simile alla risposta ottenuta alla fecondazione, nonché il sollevamento della membrana di fecondazione e la sintesi di DNA (Dargie et al., 1990). Al contrario, l'inibizione del meccanismo di rilascio del Ca^{2+} mediato dal cADPR, altera drammaticamente il segnale Ca^{2+} alla fecondazione (Galione et al., 1993; Lee et al., 1993). Più precisamente grazie a studi condotti su uova di echinodermi ed in linea con i risultati prodotti in altri tipi cellulari è stato dimostrato che il cADPR regola la propagazione del segnale Ca^{2+} indotto dallo spermatozoo fecondante piuttosto che nel suo avvio (Leckie et al., 2003; Moccia et al., 2006). Tuttavia, il meccanismo con cui il cADPR riesca ad indurre un aumento del Ca^{2+} intracellulare non è ancora stato completamente chiarito.

C'è da aggiungere che la propagazione del Ca^{2+} intracellulare regolato dallo stesso Ca^{2+} secondo un meccanismo di Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release, (CICR) è mediato sia dai RyR e dai InsP_3R (Galione et al., 1991; Lee, 1993). Inoltre, il cADPR può indurre un influsso di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare in alcuni tipi cellulari (come neutrofili e cellule β pancreatiche), che può verificarsi tramite la stimolazione di recettori canale cationici che determinano variazioni transitorie di potenziale, come quelli della sottofamiglia M, membro 2 (TRPM2) localizzati sulla membrana plasmatica (Partida-Sanchez et al., 2001; Togashi et al., 2006).

1.10. NAADP: un emergente secondo messaggero nella trasduzione del segnale Ca^{2+} .

L'acido nicotinico adenina dinucleotide fosfato (NAADP) fu identificato per la prima volta come composto biologico nel 1980, ma solo 10 anni più tardi si comprese la sua funzione di secondo messaggero capace di mobilitare il Ca^{2+} . Questo grazie ai risultati ottenuti sui microsomi isolati delle uova di riccio di mare (Lee e Aarhus, 1995). Il NAADP, un derivato del fosfato nicotinamide adenin dinucleotide (NADP), è prodotto dall'ARC che

è lo stesso enzima che produce il cADPR. ARC catalizza la conversione del gruppo ammidico nicotinammide del comune metabolita NADP in un gruppo carbossilico. Un esempio di ARC nei mammiferi è rappresentato dal CD38 di cui si è dimostrato il coinvolgimento anche nel catalizzare l'idrolisi del NAADP.

I canali bersaglio del NAADP sono diversi da quelli già noti. L'aumento di Ca^{2+} dipendente dal NAADP, è insensibile agli inibitori dei meccanismi di rilascio di Ca^{2+} intracellulare mediati dall'InsP₃ e cADPr (Clapper et al., 1987). L'unico modo per bloccare il rilascio di Ca^{2+} mediato da NAADP è di desensitizzare il recettore a cui si lega utilizzando basse concentrazioni di NAADP (Aarhus et al., 1996; Genazzani et al., 1996). E' stato dimostrato, mediante frazionamento di omogenati di uova di riccio di mare, che il NAADP esplica la sua azione di agente mobilizzante del Ca^{2+} su depositi intracellulari diversi dal RE. Gli organelli sensibili al NAADP si distribuivano sul fondo del gradiente di Percoll, ben separati dalle porzioni del RE sensibili al cADPR, disposti in cima alla colonna densitometrica (Lee, 1993). In seguito, mediante la stratificazione *in situ* di uova intatte di riccio, è stato definitivamente dimostrato che i depositi cellulari sensibili al NAADP erano situati presso un polo cellulare (dove erano localizzati gli organelli), ben separato e addirittura opposto a quello in cui erano invece disposti i componenti cellulari sensibili al cADPr e all'InsP₃ (Lee e Aarhus, 2000). Questi organelli sono stati successivamente identificati come granuli di riserva, organelli simili ai lisosomi di cui rappresentano l'equivalente funzionale nelle uova di riccio di mare (Churchill et al., 2002), la cui scoperta è stata poi confermata anche nelle cellule di mammifero (Kinnear et al., 2004). In seguito è stato suggerito che il recettore del NAADP potesse risiedere sulla membrana degli organelli a contenuto acido, dal momento che il rilascio di Ca^{2+} indotto dal NAADP veniva inibito dall'utilizzo di agenti che perturbavano in qualche modo lo stoccaggio dello ione negli organelli acidi, ad esempio, l'inibitore della pompa protonica bafilomicina e l'agente lisosomotropo glicil-L-fenilalanina-2-naftilamide (GPN) (Churchill et al., 2002). Di recente, i canali voltaggio dipendenti a due pori (TPC) espressi sulle

membrane lisosomiali ed endosomiali sono stati proposti come potenziali recettori del NAADP (Calcraft et al., 2009).

Ulteriori informazioni sul meccanismo di rilascio di Ca^{2+} indotto dal NAADP sono state ottenute utilizzando le uova di stella di mare come modello sperimentale. È stato dimostrato che il NAADP provoca un aumento dei livelli intracellulari dello ione Ca^{2+} selettivamente nella regione corticale delle uova di questo animale (Flash Corticale; FC) e che tale risposta dipende dall'influsso di calcio esterno. Ciò ha portato alla scoperta dell'attivazione di una corrente di Ca^{2+} , diretta verso l'interno regolata dal NAADP (Moccia et al., 2003). In seguito, è stato suggerito che l'aumento del Ca^{2+} indotto dall'azione del NAADP potrebbe essere mediato dai canali permeabili al calcio regolati dallo svuotamento dei depositi intracellulari (SOC), in quanto lo svuotamento degli stessi tramite tapsigargina, promuove il medesimo influsso di Ca^{2+} . Infine, si fa sempre più strada l'ipotesi che proprio il NAADP possa essere l'iniziatore della risposta del Ca^{2+} dell'uovo indotta dallo spermatozoo amplificata successivamente dal cADPR e dall'InsP₃. Infatti, nelle uova di stella di mare alla fecondazione la prima risposta al calcio avviene a livello del cortex dell'uovo (FC) ed è mediata da un influsso di calcio esterno (Lim et al., 2001; Moccia et al., 2003; 2006).

1.11. Il segnale Ca^{2+} alla maturazione.

Quando gli ovociti immaturi sono iniettati con coloranti sensibili al Ca^{2+} ed esposti all'azione dell'1-MA, e anche se si visualizza un aumento transitorio dei livelli di Ca^{2+} nel citoplasma e nel nucleo nel giro di pochi minuti, l'importanza del segnale Ca^{2+} nella ripresa del ciclo meiotico è stata oggetto di un acceso dibattito. La prima evidenza sperimentale che l'ormone della maturazione 1-MA fosse capace di indurre un aumento di Ca^{2+} intracellulare negli ovociti di stella di mare risale agli studi effettuati su *Marthasterias glacialis* (Moreau et al., 1978). Questi ovociti manifestavano un aumento di Ca^{2+} anche in assenza dello ione nell'acqua di mare in cui erano incubati, indicando che la sua provenienza era da ricercarsi nei depositi intracellulari, contrariamente a quanto dimostrato successivamente per altre specie (Deguchi, 2007; Cheon et al., 2013). A smentire l'ipotesi sull'importanza del calcio per la ripresa della maturazione meiotica erano stati i risultati sulla mancanza di rilevare alcun aumento di Ca^{2+} dopo stimolazione ormonale ovociti di altre specie di stella di mare come *Asterias forbesi* e *Asterina miniata* (Dorée et al., 1990). Insieme ai dati sperimentali che l'aumento artificiale del Ca^{2+} intracellulare mediante microiniezione di InsP_3 esogeno non induceva la ripresa del ciclo meiotico in assenza di 1-MA (Picard et al., 1985). Così come l'inibizione selettiva dei recettori per l' InsP_3 con un peptide specifico (*InsP₃-sponge*) che sequestrava l' InsP_3 eventualmente prodotto non aveva influenzato il processo di maturazione (Iwasaki et al., 2002). Che l'aumento di Ca^{2+} da 1-MA non rivestiva un ruolo decisivo nella maturazione meiotica degli ovociti fu provato mediante l'uso di agenti tampone del Ca^{2+} , come il BAPTA ed EGTA che microiniettati negli ovociti e pur sequestrando il calcio non inibivano la maturazione meiotica indotta da 1-MA negli ovociti di *Asterina miniata* (Witchel e Steinhardt, 1990). D'altra parte, la microiniezione del BAPTA direttamente nel nucleo impediva la GVBD e la continuazione della maturazione meiotica negli ovociti di *A. pectinifera* (Santella e Kyojuka, 1994). Questi risultati hanno evidenziato la cruciale importanza del Ca^{2+} nucleare ed in particolare del suo aumento nel controllo della meiosi (Santella e Carafoli, 1997; Santella et al., 1998).

Di recente, analisi spazio-temporali dell'aumento di calcio indotta da 1-MA, hanno dimostrato che l'onda di Ca^{2+} si propaga negli ovociti con un meccanismo che è diverso da quello dell'onda di Ca^{2+} innescata dal contatto con lo spermatozoo alla fecondazione. Innanzitutto, l'aumento di Ca^{2+} indotto che si osserva pochi minuti dopo l'aggiunta di 1-MA ha sempre origine all'emisfero vegetale dell'ovocita, anche se l'intera superficie è esposta all'ormone e si propaga solo attraverso la porzione corticale. In secondo luogo, l'onda da 1-MA arriva all'emisfero animale molto più velocemente (meno di 20 s) rispetto all'onda di Ca^{2+} generata alla fecondazione (80 s) (Kyozyuka et al., 2008). In terzo luogo, è stato chiarito che il secondo messaggero NAADP non contribuisce a questo aumento di Ca^{2+} poiché il NAADP, negli ovociti di stella di mare, promuove un ingresso di Ca^{2+} dall'esterno, mentre 1-MA libera il Ca^{2+} intracellulare anche in acqua di mare artificiale che non contiene calcio (Moccia et al., 2003). Allo stesso modo, si è escluso il contributo del cADPR in quanto gli ovociti di *A. pectinifera* non manifestano alcuna risposta in termini di rilascio di Ca^{2+} dopo l'*uncaging* di tale messaggero (Kyozyuka et al., 2008). Infine, risultati sperimentali aggiuntivi hanno messo in discussione il coinvolgimento dell'InsP₃ nella liberazione di calcio, perché è stato dimostrato che sia l'U73122 (un inibitore della sintesi di InsP₃) che l'eparina (un inibitore del recettore dell'InsP₃) alterano profondamente la struttura dell'actina del citoscheletro corticale. La riorganizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro nella regione corticale degli ovociti gioca un ruolo cruciale nella regolazione delle modalità spazio-temporali di rilascio di Ca^{2+} indotta dall'ormone, come evidenziato dalle alterazioni della risposta al calcio dopo trattamento con 1-MA quando venivano utilizzati vari agenti che promuovono la polimerizzazione o la depolimerizzazione dell'actina del citoscheletro tra cui, ad esempio, la latrunculina-A (LAT-A), l'eparina, il jasplakinolide (JAS) e inibitori delle proteine G (Kyozyuka et al., 2008; Kyozyuka et al., 2009). Inoltre la riorganizzazione dell'actina del citoscheletro, operata mediante pre-iniezione nel citoplasma degli ovociti di stella di mare della cofilina, una proteina che si lega all'actina influenzandone la sua struttura, induceva un rilascio di

Ca²⁺ corticale con un'ampiezza due volte maggiore di quella del controllo (Nusco et al., 2006).

Durante la maturazione meiotica degli ovociti di stella di mare, i meccanismi di rilascio di Ca²⁺ intracellulare, al fine di produrre un'appropriata risposta di Ca²⁺ alla fecondazione, vanno anch'essi incontro ad un processo di maturazione. Le uova mature nel loro periodo ottimale per la fecondazione rilasciano una quantità maggiore di Ca²⁺ in risposta all'azione dei secondi messaggeri InsP₃, NAADP, cADPR e dello spermatozoo se comparate al calcio liberato dagli ovociti immaturi (Chiba et al., 1990; Nusco et al., 2002; Santella et al., 2000). Pertanto la microiniezione della stessa quantità di InsP₃ induce un maggiore rilascio di Ca²⁺ nelle uova mature se confrontate agli ovociti immaturi. Infatti, più lungo è il tempo di esposizione degli ovociti ad 1-MA, maggiore è la quantità di Ca²⁺ liberata (Lim et al., 2003). Negli ovociti di mammifero la maggiore sensibilità degli *stores* di calcio all'InsP₃ delle uova mature è dovuto alla maggiore espressione e alla redistribuzione degli InsP₃R (Fujiwara et al., 1993). Invece negli ovociti di stella di mare l'aumentata risposta al Ca²⁺ stimolata dall'InsP₃ non è causata né dalla diversità di espressione e localizzazione degli InsP₃R (Iwasaki et al., 2002), né dalla maggiore quantità di Ca²⁺ depositato nel RE, in quanto anche gli ovociti immaturi non trattati con 1-MA sono in grado di rilasciare la stessa quantità di Ca²⁺ delle uova mature se si microinietta nel citoplasma una quantità di InsP₃ 100 volte maggiore (Chiba et al., 1990; Lim et al., 2003). Nella specie mediterranea di stella di mare utilizzata nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato, l'apparente sensibilizzazione verso l'InsP₃ appare legata allo stato funzionale dell'actina del citoscheletro. A riprova di quanto affermato, quando il processo di maturazione veniva indotto in presenza del farmaco depolimerizzante LAT-A, il rilascio di Ca²⁺ stimolato dall'InsP₃ risultava fortemente inibito (Lim et al., 2003). In linea con un ruolo cruciale dell'actina del citoscheletro nella modulazione del rilascio di calcio intracellulare, il trattamento delle uova mature di *A. aranciacus* con LAT-A è capace di indurre sia l'ingresso del Ca²⁺ dall'esterno (FC) sia la sua liberazione dai depositi interni circa 10

minuti dopo l'incubazione (Lim et al., 2002). Il massiccio rilascio di Ca^{2+} indotto da LAT-A caratteristico delle uova mature, non è stimolato negli ovociti immaturi. Occorre sottolineare che in aggiunta ad una riorganizzazione del RE durante la maturazione degli ovociti di stella di mare, anche l'actina del citoscheletro subisce drammatici cambiamenti nella sua struttura e che tale ristrutturazione raggiunge il culmine al momento della GVDB (Jaffe e Terasaki, 1994). È plausibile pertanto che la maggiore sensibilità all'InsP₃ delle uova mature si verifichi parallelamente ai cambiamenti morfologici del RE, che sono dipendenti dalla riorganizzazione dei microfilamenti (Fitzharris et al., 2007) così come dai microtubuli (Whitaker, 2006). La comparsa di questa maggiore sensibilità all'InsP₃ manifestava un ritardo di 30 minuti negli ovociti di stelle marine preincubate con Roscovitina, un inibitore specifico di MPF (Lim et al., 2003). Nella stella, a differenza di altre specie animali, MPF non fosforila direttamente gli InsP₃R (Machaca et al., 2007; Lim et al., 2003). E l'inibizione del rilascio di Ca^{2+} indotto da LAT-A mediante incubazione con Roscovitina è una chiara indicazione che la sensibilizzazione all'InsP₃ potrebbe dipendere dal riarrangiamento dell'actina del citoscheletro in seguito ad es. alla fosforilazione della cofilina ad opera del MPF (Lim et al., 2003).

Durante la maturazione meiotica, anche i meccanismi di rilascio del Ca^{2+} dipendenti dal cADPr e dal NAADP risultano sensibilizzati. La fotoattivazione del *caged* cADPR iniettato negli ovociti di stella di mare induce multipli rilasci di Ca^{2+} nella regione corticale che successivamente diffonde all'intera cellula. Nelle uova mature, invece, la fotoattivazione del *caged* cADPR induce un aumento di Ca^{2+} da uno o due siti, che è seguito dal flash corticale e dall'ulteriore propagazione dell'onda in tutto l'uovo (Nusco et al., 2002). Anche il rilascio di Ca^{2+} (che è fortemente dipendente dalla presenza Ca^{2+} all'esterno) indotto dal NAADP liberato intracellularmente è maggiore nelle uova mature di stella rispetto agli ovociti immaturi. Inoltre, la risposta al Ca^{2+} indotta dal NAADP nelle uova mature è più sensibile agli inibitori dei canali voltaggio dipendenti di tipo L rispetto agli ovociti immaturi. Questi risultati sono in linea con i cambiamenti delle proprietà

elettriche della membrana plasmatica che si verificano durante la maturazione meiotica degli ovociti (Santella et al., 2000).

1.12. Il segnale Ca^{2+} alla fecondazione.

L'interazione spermatozoo-uovo inizia con una serie di eventi morfologici e fisiologici, che coinvolgono il riconoscimento, l'adesione e la fusione tra gameti. Alla fecondazione un massiccio rilascio di Ca^{2+} costituisce uno tra i primi eventi che si verificano nel citoplasma delle uova fecondate in tutte le specie studiate, dagli invertebrati ai mammiferi marini. L'aumento di calcio attiva l'uovo fecondato e lo zigote può cominciare a svilupparsi in embrione (Ciapa e Chiri, 2000). Nelle uova di stella e riccio di mare l'aumento intracellulare di Ca^{2+} origina in maniera simultanea dapprima a livello della superficie. Questo aumento di Ca^{2+} corticale è seguito da un'onda di Ca^{2+} che origina dal sito di interazione con lo spermatozoo e attraversa il citoplasma dell'uovo fino a raggiungere il polo opposto dell'uovo (Fig. I, 4). A seconda delle specie, questa onda di Ca^{2+} può avere la forma di un singolo picco transitorio, come nei ricci e nelle stelle di mare, o di oscillazioni ripetute, come nei topi, nei criceti, nei bovini, nei ratti e nell'uomo (Ciapa e Chiri, 2000; Santella et al., 2004). La fecondazione negli invertebrati marini di solito si verifica al di fuori del corpo degli animali, e quindi richiede un meccanismo estremamente sensibile e coordinato di chemiotassi tra le uova e gli spermatozoi che in un preciso periodo dell'anno vengono rilasciati a mare (Santella e Chun, 2011). Il riconoscimento e l'interazione delle molecole presenti sulla superficie spermatica e nel *jelly coat* dell'uovo rappresentano il primo passo della fecondazione specie-specifica che successivamente porta all'attivazione reciproca degli spermatozoi e delle uova. Quando lo spermatozoo prende contatto con il *jelly coat*, i componenti specie-specifici di quest'ultimo innescano la reazione acrosomiale (RA) nello spermatozoo. Negli echinodermi, si tratta dell'esocitosi di una vescicola acrosomiale presente nella testa dello spermatozoo che è Ca^{2+} -mediata. La vescicola

acrosomiale contiene una grande varietà di enzimi digestivi, che scavano letteralmente una via d'accesso attraverso l'altrimenti inaccessibile reticolo di glicoproteine del *jelly coat* sulla superficie dell'uovo. Durante la RA, la testa dello spermatozoo estende una lunga struttura tubulare, definita per l'appunto processo acrosomiale, riempito di filamenti di actina. I tre componenti del *jelly coat* noti per il loro ruolo nell'innescare la RA nelle stelle di mare sono: ARIS (AR-Inducing Substance, ossia sostanza che induce la RA), co-ARIS, e asterosap (Hoshi et al., 2000). ARIS è una glicoproteina solfatata ad elevato peso molecolare, che per funzionare richiede un cofattore diffusibile, la saponina steroidea co-ARIS. Nel riccio e nelle stelle di mare, asterosap lavora come agente chemiotattico che stimola la guanilato ciclasi (il recettore per asterosap) che si trova sulla membrana plasmatica del flagello e stimola la motilità dello spermatozoo (Hoshi et al., 2000; Matsumoto et al., 2008).

1.13. Trasduzione del segnale Ca^{2+} alla fecondazione.

L'attivazione dell'uovo da parte dello spermatozoo o da altri agenti rientra nel fenomeno generale definito eccitazione cellulare (Carafoli et al., 2001). Numerosi studi sulle uova stimolate di animali marini hanno sottolineato la necessità di un'adeguata organizzazione strutturale della zona corticale dell'uovo, che rappresenta la parte più delicata ed eccitabile della cellula (Wilson e Heilbrunn, 1952; Allen, 1953; Byrnes e Newman, 2014). Le uova di riccio e stella di mare hanno fornito prove sperimentali essenziali che hanno evidenziato l'importanza della zona corticale nell'avvio di una cascata di reazioni legate ad eventi elettrici della membrana plasmatica e al segnale Ca^{2+} . Nel 1937 Mazia, fu il primo a ipotizzare un aumento di Ca^{2+} alla fecondazione delle uova di riccio di mare (Mazia, 1937), e tale incremento fu visualizzato con l'equorina direttamente nelle uova di Medaka da Ridgway solo nel 1977 (Ridgway et al., 1977). Gli spermatozoi attivati e con il processo acrosomiale, innescano un rilascio di Ca^{2+} corticale ed un'onda di Ca^{2+} che attraversa l'uovo di stella e riccio di mare dal sito di interazione con lo spermatozoo fino al polo opposto.

L'aumento di Ca^{2+} induce così l'esocitosi dei granuli corticali localizzati al di sotto della membrana plasmatica, e il rilascio del loro contenuto nello spazio perivitellino che porta al sollevamento della membrana di fecondazione.

Anche se da molti decenni lo ione Ca^{2+} è stato ampiamente riconosciuto come protagonista nel processo di attivazione dell'uovo alla fecondazione, ben poco si sa sulla via di trasduzione del suo segnale e sulla natura del rilascio del Ca^{2+} dai depositi interni. Ad oggi sono state proposte tre ipotesi principali sulla modalità con cui lo spermatozoo fecondante dà inizio al massiccio rilascio di Ca^{2+} all'interno delle uova. Il primo modello si basa sull'idea che lo spermatozoo possa immettere direttamente Ca^{2+} durante la fusione dei gameti (Jaffe 1983, 1991), in quanto i canali permeabili allo ione presenti sulla superficie dello spermatozoo lo renderebbero un condotto ideale per l'ingresso del Ca^{2+} dall'esterno (Creton e Jaffe, 2001). Una volta entrato, il Ca^{2+} potrebbe quindi agire come ulteriore innesco per il rilascio dai depositi mediante il meccanismo di CICR dentro l'uovo (Jaffe, 1991). Nonostante la constatazione che la fusione spermatozoo-uovo sia nel riccio di mare che nei topi precede sempre il rilascio di Ca^{2+} nell'uovo (McCulloh e Chambers, 1992; Lawrence et al., 1997), una serie di studi hanno gettato dubbi sulla validità di questo modello, in quanto l'iniezione diretta di Ca^{2+} nelle uova di riccio di mare, di ascidie, o di mammiferi non riesce ad indurre un ulteriore rilascio di Ca^{2+} (Whitaker e Swann, 1993; Swann e Ozil, 1994). Inoltre, nel topo non si registra alcun aumento della concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} durante la fusione dei gameti (Jones et al., 1998).

Il secondo modello proposto si basa sull'idea che lo spermatozoo introduca un fattore citoplasmatico solubile nell'uovo al momento della fecondazione. Questa ipotesi è basata sulla scoperta che la microiniezione di estratti citoplasmatici dello spermatozoo inducono aumenti dei livelli del Ca^{2+} citosolico nelle uova dei ricci di mare (Dale e Santella, 1985), dei vermi marini (Stricker, 1997), delle ascidie (Kyoizuka et al., 1998) e di diverse specie di mammiferi (Swann, 1990; Wu et al, 1997), incluso l'uomo (Homa e Swann, 1994), mimando quanto avviene alla fecondazione. La natura del fattore sembra, comunque,

variare tra i diversi *phyla*. Nelle ascidie esso sembra essere una proteina, poiché è termolabile e sensibile all'azione delle proteasi (Kyojuka et al., 1998). Nei ricci di mare si è inizialmente pensato che i fattori putativi rilasciati dallo spermatozoo potessero essere l'InsP₃ e il NAADP (Whitaker e Irwine, 1984; Churchill et al., 2003), mentre nelle uova di topo è stata proposta quale possibile fattore spermatico, una proteina solubile come l'oscillina, che si diffonde nel citoplasma dell'uovo dopo la fusione dei gameti (Parrington et al., 1996). Più di recente, nei mammiferi è stata individuata una specifica isoforma della PLC, la PLC ζ , presente nel citoplasma dello spermatozoo ad una concentrazione sufficiente a produrre oscillazioni ed un normale sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti (Saaunders et al., 2002). È stata perciò proposta come potente fattore spermatico in grado di fungere da agente fisiologico nell'attivazione dell'uovo nei mammiferi (Swann et al., 2006).

La terza ipotesi suggerisce che il ligando presente sulla superficie dello spermatozoo possa interagire con il recettore sulla superficie dell'uovo ed innescare un'ulteriore produzione di InsP₃ mediante l'attivazione della PLC, a sua volta mediata dal legame con recettori associati a proteine G. Questo modello è sostenuto dalle analisi sulla tempistica della rottura dei granuli corticali nelle uova di riccio di mare in seguito alla microiniezione di InsP₃ e dalla considerazione che l'inibitore delle proteine G, il GDP-guanosina-5'-0-2-tiodifosfato (GDP β S), impedisce l'attivazione delle uova indotta dallo spermatozoo (Turner et al., 1986; Mohri e Hamaguchi, 1989). Tuttavia, gli effetti inibitori del GDP β S non sono stati del tutto verificati in quanto potrebbe agire in maniera aspecifica, date le alte concentrazioni utilizzate (Crossley et al., 1991). Un'altra versione leggermente diversa del modello di attivazione dell'uovo tramite recettore suggerisce il coinvolgimento della via di trasduzione del segnale mediata dalle tirosina chinasi, che attiva l'isoforma γ della PLC. La PLC γ si attiva quando i suoi due domini Src homology-2 (SH2) interagiscono con le tirosin-chinasi. Esistono diverse evidenze sperimentali che suggeriscono che una Src-chinasi sia responsabile dell'attivazione della PLC γ nelle uova di stella di mare e in altri

animali. L'attivazione della PLC in questa via di segnalazione può portare alla produzione dell'InsP₃ ed il successivo aumento di Ca²⁺ durante l'attivazione dell'uovo alla fecondazione (Runft et al., 2002; Townley et al., 2006). Questa ipotesi è supportata dalla scoperta che la microiniezione della proteina Src umana non fosforilata nelle uova di stella, induce un aumento di Ca²⁺ e la sintesi del DNA (Giusti et al., 2000). Inoltre proteine ricombinanti contenenti i due domini SH2 della PLC γ che inibiscono specificamente questa isoforma, ma non la PLC β , bloccano completamente il rilascio di Ca²⁺ alla fecondazione, suggerendo l'attivazione della PLC γ con la conseguente formazione di InsP₃ (Carroll et al., 1997). Quindi, mentre il ruolo centrale nell'attivazione delle uova di stella di mare è stato attribuito alla PLC γ , restano ancora da identificare il potenziale recettore dello spermatozoo e i componenti della via di trasduzione del segnale che culmina nell'attivazione della Src-chinasi.

Per lungo tempo, l'aumento iniziale del Ca²⁺ citosolico al momento della fecondazione è stato considerato come un evento scatenato principalmente in risposta alla sintesi di InsP₃ (Runft et al., 2002; Whitaker, 2006; Miyazaki, 2007; Ducibella e Fissore, 2008). I primi studi sui ricci di mare hanno documentato un aumento sostanziale di polifosfoinositidi nelle uova fecondate (Turner et al., 1984), e la generazione di InsP₃ in concomitanza con la comparsa dell'onda di Ca²⁺ (Ciapa et al., 1992). In linea con l'idea che l'InsP₃ svolga un ruolo fondamentale nello sviluppo della risposta al Ca²⁺ nelle uova fecondate, si è aggiunta l'evidenza che nelle uova di topo in cui gli InsP₃R venivano inibiti mediante legame con anticorpi specifici non si visualizzavano le caratteristiche oscillazioni di Ca²⁺ in seguito al contatto con lo spermatozoo (Miyazaki et al., 1992). Una simile inibizione del segnale Ca²⁺ alla fecondazione è stata osservata nei topi dopo ablazione della PLC ζ (Nomikos et al., 2005), suggerendo il ruolo indispensabile dell'InsP₃ nel processo. Tuttavia, al contrario dei mammiferi, il ruolo preponderante dell'InsP₃ alla fecondazione non è completamente chiaro negli echinodermi. Esperimenti condotti sulle uova di riccio di mare non hanno mostrato alcuna coincidenza temporale tra il momento di maggiore aumento della

concentrazione di InsP_3 e la generazione dell'onda di Ca^{2+} ; piuttosto, l'inizio dell'incremento del Ca^{2+} coincideva con l'innalzamento della concentrazione di un altro secondo messaggero, il cGMP, ma precedeva l'aumento di cADPR e InsP_3 , in quanto il notevole aumento dei livelli di InsP_3 avveniva solo dopo che il rilascio di Ca^{2+} si era avviato (Kuroda et al., 2001). Inoltre, monitorando le variazioni dei livelli di PIP_2 sulla membrana plasmatica nelle cellule viventi in tempo reale, mediante l'uso del dominio PH della PLC- $\delta 1$, reso visibile mediante marcatura con RFP, è stato possibile osservare che nelle uova di stella di mare il PIP_2 sulla membrana plasmatica iniziava a diminuire 10 secondi dopo l'avvio dell'onda di Ca^{2+} ad opera dallo spermatozoo fecondante (Chun et al., 2010). Quindi, questi risultati gettano dubbi sul ruolo dell' InsP_3 come innesco primario del segnale Ca^{2+} nelle uova di echinodermi alla fecondazione.

Sebbene il cGMP e il cADPR inducano un aumento intracellulare del Ca^{2+} quando iniettati nelle uova di molte specie in cui i RyR sono presenti, è stato possibile confermare il contributo del cADPR nel rilascio di Ca^{2+} al momento della fecondazione solo nelle uova di riccio di mare, in cui il cADPR viene generato dopo l'avvio dell'onda per sostenere la durata del transiente di Ca^{2+} (Leckie et al., 2003). Infatti l'inibizione dei RyRs tramite rutenio rosso o una grande quantità di rianodina (Gerasimenko e Gerasimenko, 2004), non compromette la genesi dell'onda di Ca^{2+} (Moccia et al., 2006).

Nella stella di mare, i risultati che l'inibizione dei RyRs con 8- NH_2cADPr , (che blocca specificamente il rilascio di Ca^{2+} mediato dal cADPR), non manifesta alcun effetto sul segnale Ca^{2+} alla fecondazione, ha messo in discussione il ruolo del cADPr nel meccanismo di CICR della risposta al Ca^{2+} alla fecondazione. Anzi è stato dimostrato per la prima volta che la risposta corticale all'*uncaging* del cADPr che dovrebbe agire sui RyRs localizzati sul RE è fortemente dipendente dalla presenza di Ca^{2+} nell'acqua di mare in cui i gameti sono sospesi (Nusco et al., 2002).

Il terzo secondo messaggero che può rilasciare Ca^{2+} alla fecondazione nelle uova di echinodermi è il NAADP. La fotoattivazione del *caged* NAADP sia negli ovociti immaturi

che nelle uova mature di stelle marine induce l'aumento di Ca^{2+} uniformemente distribuito in corrispondenza della zona periferica delle cellule, sotto forma di un flash corticale che poi si propaga centripetamente come un'onda (Lim et al., 2001; Santella, 2005). Questo flash corticale prodotto dal NAADP, che ricorda molto quello indotto dallo spermatozoo, risulta essere strettamente dipendente dalla presenza di Ca^{2+} nell'acqua di mare circostante ed è completamente inibito dagli antagonisti dei canali del Ca^{2+} di tipo L. Il Laboratorio dove ho svolto questa tesi ha dimostrato che il NAADP può indurre l'ingresso di Ca^{2+} dall'acqua di mare attraverso un canale ionico voltaggio dipendente. Siccome la risposta al NAADP viene bloccata anche da concentrazioni più basse di inibitori dei SOC, è stato suggerito che esso possa agire attraverso un canale simile ai TRP, recettori canale che determinano variazioni transitorie di potenziale. Inoltre, l'evidenza sperimentale che il NAADP può simulare l'effetto dello spermatozoo fecondante innescando la depolarizzazione della membrana plasmatica dell'uovo, causa primaria dell'influsso di Ca^{2+} , ha suggerito che il NAADP possa essere coinvolto nella generazione del FC. Infatti la desensitizzazione dei recettori del NAADP con bassissime dosi di ligando impediva alla fecondazione l'insorgenza del potenziale di fecondazione nelle uova di stella di mare (Moccia et al., 2006), e riduceva l'ampiezza sia del flash corticale che delle onde di Ca^{2+} nelle uova di riccio di mare (Churchill et al., 2003). Nella stella di mare la risposta di Ca^{2+} al NAADP non è influenzata dallo svuotamento del contenuto lisosomiale con bafilomicina A1 o GPN, o da altri agenti che bloccano l'attivazione dei recettori per InsP_3 e RyR (Moccia et al., 2006). Poiché il NAADP è responsabile anche della genesi del FC nelle uova di riccio di mare, è stato proposto come possibile fattore spermatico inoculato dallo spermatozoo nel citoplasma dell'uovo al momento della fecondazione (Churchill et al., 2003). Ipotesi giustificata dal ritrovamento di alte concentrazioni di NAADP nello spermatozoo attivato, di ben 5 volte maggiori rispetto ai corrispettivi privi del processo acrosomale (Billington et al., 2002). Tuttavia, l'identità e la natura dei depositi di Ca^{2+} sensibili al NAADP sono ancora oggetto di dibattito. È stato proposto che il NAADP possa

agire su organelli simili ai lisosomi, a contenuto acido, per indurre il rilascio di Ca^{2+} , e che la loro localizzazione in prossimità del reticolo endoplasmatico possa amplificare l'onda (Churchill et al., 2003). Si è ipotizzato poi che gli organelli acidi su cui agisce il NAADP contengano una nuova classe di canali permeabili al calcio. Sono state proposte tre isoforme di canali a due pori (TPC) come recettori per il NAADP, ed è stato dimostrato che tutte sono localizzate nella zona corticale degli ovociti e delle uova di stella di mare (Ramos et al., 2014). Anche se i TPC possono essere associati ad endosomi e lisosomi, tuttavia, il loro coinvolgimento nel rilascio di Ca^{2+} sotto l'influenza di NAADP è stato recentemente messo in discussione dall'evidenza che tali canali sono in realtà permeabili al sodio e la loro apertura regolata dall' InsP_3 (Wang et al., 2012). Infatti, in accordo con tale tesi, il *knock down* dei TPC nella stella di mare non riesce a influenzare in modo significativo la risposta di Ca^{2+} indotta dallo spermatozoo (Ramos et al., 2014). Un supporto all'idea che i lisosomi siano organelli coinvolti nel meccanismo di rilascio del calcio è stato fornito dall'evidenza che le isoforme β e γ di ARCs, che sintetizzano cADPR a partire dal NAD^+ e NAADP dal NADP, sono localizzate nel lume dei granuli corticali nelle uova di riccio di mare. È stato dimostrato che il cADPR viene sintetizzato localmente nel lume dei granuli a contenuto acido coinvolti nell'esocitosi e rilasciato nel citosol per generare il segnale Ca^{2+} e guidare l'esocitosi (Davis et al., 2008).

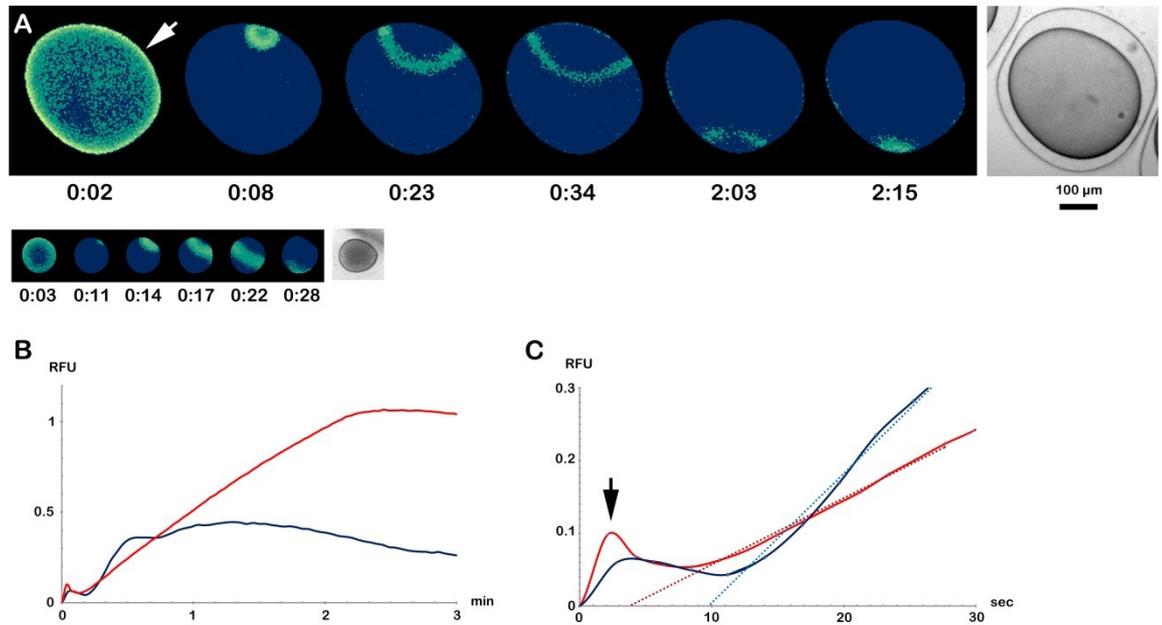


Figura I, 4. Aumenti di Ca^{2+} intracellulare nelle uova fecondate di stella e riccio di mare. Le uova di *A. aranciacus* e *P. lividus* state microiniettate con coloranti per il calcio e poi fecondate al fine di monitorare i cambiamenti dei livelli intracellulari dello ione. (A) Le immagini in pseudo-colore corrispondono al momentaneo aumento dei livelli di Ca^{2+} nel tempo dopo l'aggiunta degli spermatozoi. Le immagini al microscopio ottico il sollevamento della membrana di fecondazione nelle uova che sono state attivate dallo spermatozoo. Per dare un'idea della differente grandezza dei gameti, le uova di stelle (in alto) e ricci di mare (in basso) sono state rappresentate nelle loro reali dimensioni. (B) Grafici che mostrano l'andamento degli aumenti di Ca^{2+} delle uova fecondate di stella (rosso) e riccio di mare (blu). (C) Le stesse curve sono state tracciate su una scala temporale diversa per illustrare il momento di inizio del rilascio di Ca^{2+} . L'inizio dell'onda globale è stata stimata estrapolando le porzioni lineari delle curve per l'asse del tempo (linee tratteggiate). Si noti che il primo spot di Ca^{2+} si osserva molto prima nella stella rispetto al riccio di mare in relazione alla comparsa del flash corticale (freccie). (Modificato da Santella et al., 2015)

1.14. Meccanismi di blocco alla polispermia.

Per un normale sviluppo embrionale è essenziale che un solo spermatozoo penetri l'uovo. Pertanto in natura la maggior parte delle specie animali ha sviluppato meccanismi diversi per bloccare l'entrata di più spermatozoi nelle uova. Nelle uova degli echinodermi il sollevamento della membrana di fecondazione come risultato dell'esocitosi dei granuli corticali è da sempre considerato un meccanismo fisiologico di prevenzione dell'attivazione delle uova da parte di più spermatozoi con conseguenze letali per lo

sviluppo embrionale (Schuel, 1985). Una prima convincente ipotesi sulla sequenza di eventi che blocca l'ingresso di più spermatozoi nelle uova di riccio di mare fu elaborata da E.E. Just, che riteneva responsabile del meccanismo di blocco alla polispermia non già il sollevamento della membrana di fecondazione per sé, (data la lentezza con cui la reazione corticale avveniva), quanto piuttosto il cambiamento strutturale a cui l'uovo va incontro affinché tale sollevamento abbia luogo. Pertanto tale blocco non era da ritenersi una mera barriera meccanica data dall'ostacolo fisico della membrana di fecondazione, poiché esso si realizzava molto prima che tale membrana si fosse sollevata (Just, 1939). Egli suggerì che le uova di ricci nelle loro condizioni fisiologiche ottimali non sono mai polispermeiche, ma lo diventano soltanto in seguito a trattamenti capaci di arrecare danni alle loro zone corticali. Alla fecondazione subiscono un cambiamento strutturale rapidissimo che si estende dal punto di contatto del primo spermatozoo all'intera superficie dell'uovo che respinge tutti i successivi (Just, 1919; 1930; 1939). L'idea che il blocco alla polispermia possa repentinamente stabilirsi entro 1-3 secondi dall'interazione con lo spermatozoo ha portato al suggerimento che il blocco veloce alla polispermia sia dovuto alle rapide variazioni del potenziale elettrico della membrana plasmatica dell'uovo. Infatti il tasso di rifecondazione nelle uova di riccio di mare si riduce di un fattore di 20 (Rothschild e Swann, 1950). Nel 1976, Jaffe ha suggerito che il blocco veloce per la polispermia nelle uova di riccio di mare potesse essere mediato da cambiamenti elettrici del potenziale di membrana (Jaffe 1976). Così come i neuroni e le cellule muscolari, gli ovociti e le uova sono cellule elettricamente eccitabili. Pertanto è noto da tempo che gli ovociti degli echinodermi possono generare potenziali di azione in risposta ad un'ampia gamma di stimoli (Tyler et al., 1956). Nelle uova di riccio di mare, il potenziale di membrana a riposo delle uova subisce una rapida depolarizzazione dopo la fecondazione. Questo rapido cambiamento del potenziale di membrana è costituito da tre fasi distinte. La prima risposta può assumere la forma di un piccolo "gradino di depolarizzazione" come dimostrato nelle uova con un basso potenziale di riposo (circa -30 mV), o di un massiccio potenziale

d'azione nelle uova ad alto potenziale di riposo (circa -80 mV). In entrambi i casi, la risposta elettrica iniziale è seguita da una depolarizzazione sostenuta, definita “potenziale di attivazione” o “potenziale di fecondazione”, che rimane normalmente a livelli positivi per più di 5 minuti fino a quando inizia a diminuire di nuovo fino a raggiungere i valori iniziali del potenziale di riposo entro 10 minuti (Dale et al., 1978; Hinkley et al., 1986; McCulloch e Chambers, 1992). Nel riccio *Strongilocentrotus purpuratus* il potenziale di attivazione viene raggiunto entro i 3 secondi successivi all'apparente contatto con lo spermatozoo, una tempistica plausibile a giustificare l'esistenza di un meccanismo per un blocco veloce alla polispermia. L'idea di un blocco elettrico alla polispermia è stata sostenuta da molti altri studi in cui l'ingresso degli spermatozoi veniva impedito mantenendo i potenziali di membrana a valori positivi in diverse specie, come ricci di mare, rane e vermi marini (Gould-Somero et al., 1979; Cross e Elinson, 1980; Lynn e Chambers, 1984). Tuttavia, nessun altro sperimentatore è riuscito successivamente a confermare alcun blocco veloce nelle uova di *S. purpuratus* (Byrd e Collins, 1975), perciò ancora oggi l'esistenza del blocco veloce negli echinodermi rimane controversa (Dale e Monroy, 1981). Pertanto l'idea dell'insorgenza di un blocco veloce alla polispermia è stata ampiamente contestata (Just, 1939; Dale e Monroy, 1981; Dale e De Felice, 2011; Dale, 2014). Infatti quando l'incorporazione dello spermatozoo nell'uovo veniva interrotta mediante l'aggiunta di acqua di mare calda contenente un detergente, 20 secondi dopo la fecondazione, si riusciva sorprendentemente a fecondare nuovamente le uova in prossimità delle zone precedentemente non coinvolte nel processo, una chiara indicazione che il blocco alla polispermia fosse maggiormente legato ai cambiamenti locali nella corteccia dell'uovo (Allen e Hagström, 1955). Un'altra prova contraria all'idea del blocco elettrico alla polispermia è stata fornita dall'evidenza sperimentale che, tenendo artificialmente il potenziale di membrana delle uova di riccio di mare a valori negativi, si riusciva comunque ad ottenere una fecondazione monospermica, e non polispermica (Dale e De Felice, 2011). Studi fisiologici e morfologici hanno suggerito che gli ovociti immaturi di riccio di mare

sono più ricettivi agli spermatozoi rispetto alle uova mature. Secondo l'idea corrente gli ovociti immaturi non sperimentando l'esocitosi riescono ad essere attivati e penetrati da un gran numero di spermatozoi, anche se il primo spermatozoo induce comunque un aumento del potenziale di circa 50 mV di ampiezza (Dale e Santella, 1985). Tale risultato sottolinea l'importanza della differenza nell'organizzazione strutturale del cortex degli ovociti e delle uova mature nel regolare la fecondazione monospermica, e suggerisce la potenziale esistenza di un numero limitato di siti di interazione sulla superficie dell'ovocita che possono diventare meno ricettivi nel corso della maturazione meiotica. Inoltre la differente organizzazione strutturale del cortex delle uova di riccio e di stella di mare è che sono fecondati a stadi diversi della maturazione meiotica è responsabile della variazione nel *pattern* dell'aumento di calcio in risposta allo spermatozoo. Ad es. nel riccio di mare il flash corticale, che rappresenta il primo cambiamento rilevabile dei livelli di Ca^{2+} , che precede la più definita e ben nota onda di Ca^{2+} , dura circa 8 secondi (Chun et al., 2014). Tenendo conto che la risoluzione temporale del sistema di rilevamento del Ca^{2+} è inferiore a quella utilizzata per l'elettrofisiologia, questo intervallo di tempo tra i due eventi di rilascio dello ione Ca^{2+} , rispecchia perfettamente il periodo di latenza di 13 secondi misurato con tecniche elettrofisiologiche (Dale et al., 1981). Data la sua rapida comparsa sincrona in tutta la superficie dell'uovo, si ritiene che il flash corticale nelle uova fecondate di riccio e stella di mare possa essere causato dall'influsso di Ca^{2+} dall'ambiente esterno, che è dipendente dalla organizzazione strutturale dei microvilli sulla cui superficie sono inseriti i canali del Ca^{2+} sensibili ai cambiamenti di voltaggio, e quindi inibiti dalla nifedipina (Shen e Buck, 1993; Nusco et al., 2002). Il flash corticale nelle uova fecondate di stella di mare è molto più piccolo e di breve durata (circa 2-5 secondi), ed è a volte difficile da rilevare anche mediante metodi elettrofisiologici. Così, tra le uova di riccio e quelle di stella di mare esistono differenze nella generazione e durata del segnale Ca^{2+} , che viaggia in parallelo con quello dei cambiamenti elettrici della membrana plasmatica che sono intimamente legati alla morfologia del cortex delle uova. Tali differenze potrebbero

derivare dalla natura intrinseca delle zone corticali delle uova, che infatti mostrano una diversa organizzazione strutturale nelle due specie esaminate (Dale et al., 1981; Puppo et al., 2008; Chun et al., 2014).

1.15. Il ruolo dell'actina nella regolazione del rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione.

L'actina è una proteina di 42 kDa che è altamente abbondante e rigorosamente conservata in tutte le cellule eucariotiche. I filamenti di actina insieme con i microtubuli e i filamenti intermedi costituiscono il citoscheletro. Essa è implicata nella regolazione di diverse funzioni cellulari come la motilità, il trasporto intracellulare, l'assistenza meccanica, la secrezione, la fagocitosi e la citochinesi, mentre l'actina nucleare può regolare l'espressione genica e la regolazione della trascrizione (Gieni e Hendzel, 2009).

La prova che i filamenti di actina dell'uovo sono coinvolti nell'incorporazione dello spermatozoo è nota da decenni. Nelle uova di riccio di mare, l'actina si polimerizza tutto intorno al sito di legame con lo spermatozoo per formare una protuberanza citoplasmatica corticale (cono di fecondazione), una struttura specializzata che facilita l'incorporazione dello spermatozoo (Cline et al., 1983; Hamaguchi e Mabuchi, 1988; Kyozuka e Osanai, 1988). Tale processo avviene in concomitanza con la traslocazione delle fibre di actina verso il centro delle uova fecondate (Terasaki, 1996). Nel verme marino Annelida (*Pseudopotamilla ocellata*), lo spermatozoo interagisce con i lunghi microvilli che attraversano la membrana vitellina dell'uovo a causa della polimerizzazione dell'actina che si realizza all'attivazione ovocitaria, e questo porta alla formazione del cono di fecondazione che incorpora lo spermatozoo (Nakano et al., 2014). La formazione del cono di fecondazione è preceduta da un aumento di Ca^{2+} nella zona corticale del citoplasma in corrispondenza del sito di interazione con lo spermatozoo, ma il Ca^{2+} non propaga nel resto dell'uovo. Solo dopo l'incorporazione dello spermatozoo, si manifesta alla periferia dell'uovo un secondo aumento di Ca^{2+} in forma di flash corticale che si propaga verso il centro della cellula. La scoperta interessante è che l'aumento locale di Ca^{2+} precede

l'influsso dello stesso ione dall'esterno, che solitamente rappresenta la prima risposta di Ca^{2+} all'attivazione dell'uovo in molte specie, o in alcuni casi l'unica manifestazione di un aumento del Ca^{2+} intracellulare (Deguchi, 2007). L'aumento del Ca^{2+} citoplasmatico nelle uova fecondate di *P. ocellata* viene inibito dal U73122 e dall'eparina, che riesce a bloccare anche l'incorporazione dello spermatozoo guidata dai microfilamenti. Poiché U73122 ed eparina possono influenzare l'organizzazione della F-actina corticale nella stella di mare (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008), sarebbe interessante verificare se l'inibizione dell'aumento iniziale citoplasmatico di Ca^{2+} ad opera di questi inibitori della via di trasduzione del segnale PLC/InsP₃R possa essere in parte attribuito alla perturbazione dell'actina del citoscheletro nelle uova fecondate di *P. ocellata* (Nakano et al., 2014).

Il dogma centrale del Ca^{2+} *signalling* è che i secondi messaggeri che mobilizzano il Ca^{2+} agiscono sui corrispondenti canali ionici per rilasciare lo ione dal lume dei depositi intracellulari, come il RE, in risposta a vari stimoli. Mentre è universalmente accettato che l'aumento intracellulare di Ca^{2+} induce cambiamenti nell'actina del citoscheletro (Forscher, 1989), si sa poco circa i cambiamenti nelle dinamiche del citoscheletro che possano influenzare a loro volta il segnale Ca^{2+} intracellulare. Negli ovociti di stelle marine, il citoscheletro può svolgere un ruolo cruciale nella regolazione della fecondazione monospermica (Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010; Vasilev et al., 2012).

Alla fecondazione della stella di mare, un lungo filamento acrosomiale fuoriesce dalla testa dello spermatozoo in seguito alla sua interazione con lo strato esterno del *jelly coat* dell'uovo (Just, 1929; Dan, 1954). Questo evento morfologico ha permesso di seguire le dinamiche spazio-temporali del rilascio di Ca^{2+} indotto dallo spermatozoo e della sua incorporazione. Lo spermatozoo è in grado di innescare un aumento di Ca^{2+} nel cortex dell'uovo quando la sua testa si trova molto lontano dalla membrana plasmatica (Puppo et al., 2008). Si è constatato che, oltre ad impedire l'ingresso degli spermatozoi, l'alterazione dell'organizzazione strutturale dell'actina corticale del citoscheletro ad opera di agenti farmacologici come JAS, LAT-A ed eparina che interferiscono con l'equilibrio dinamico

della F-actina ha ripercussione non solo sull'aumento dei livelli di Ca^{2+} indotto da 1-MA (Kyojuka et al., 2008) ma anche sulle modalità di rilascio di Ca^{2+} stimolato dallo spermatozoo, così come in quasi tutti gli altri eventi associati al processo di fecondazione. Il caso più emblematico riguarda il trattamento con l'eparina. Si è constatato che la superficie delle uova preiniettate con eparina, che è normalmente usata come inibitore degli InsP_3Rs , rispondeva lentamente al contatto del primo spermatozoo, non riusciva a produrre un flash corticale ed a prevenire la polispermia. Inoltre, l'ampiezza della successiva onda di Ca^{2+} risultava ridotta mentre la sua propagazione era addirittura interrotta. Molte uova fecondate erano polispermiche; e nonostante ciò, la diffusione delle molteplici onde di Ca^{2+} era molto più lenta e richiedeva più tempo per percorrere tutta la superficie dell'uovo. La forma dei coni di fecondazione era anormale, suggerendo che l'eparina potesse aver influenzato lo stato funzionale dell'actina del citoscheletro nella zona corticale delle uova mature. La visualizzazione della F-actina ha dimostrato che l'eparina induce effettivamente una iperpolimerizzazione dell'actina corticale. Sulla base di queste osservazioni, si delinea un interessante interrogativo sulla possibilità che l'eparina possa sopprimere il segnale Ca^{2+} esclusivamente come un inibitore farmacologico specifico dei recettori sensibili all' InsP_3 , o come risultato della sua capacità di indurre modifiche nella organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro. La perdita totale del flash corticale che è legato all'influsso di calcio dall'esterno, ma dipendente dall'organizzazione strutturale della F-actina dei microvilli, in molte uova iniettate con eparina sembra supportare quest'ultima ipotesi (Puppo et al., 2008). All'interno ed all'esterno delle cellule il citoscheletro, formato da un sistema di strutture filamentose, costituisce non solo l'impalcatura delle cellule ma contribuisce in maniera dinamica allo svolgimento delle loro funzioni. A tale riguardo l'actina, uno dei componenti del citoscheletro, può essere presente come monomero (G-actina), o in forma polimerizzata a costituire dei lunghi filamenti (F-actina). Questi ultimi subiscono costantemente un processo dinamico di *treadmilling*. Circa la metà dell'actina presente nelle cellule viventi esiste in forma

monomeric (Forscher, 1989), e l'equilibrio tra F-actina e G-actina è ottenuto principalmente attraverso l'azione coordinata di proteine che legano l'actina (*actin-binding proteins*) come la profilina, (Wolven et al., 2000), la destrina (Ono, 2007), e la gelsolina (Sun et al., 1999). Questa classe di proteine regola lo stato dell'actina del citoscheletro mediante meccanismi finemente regolati di taglio, torsione e formazione di legami crociati dei filamenti di actina (Dos Remedios et al., 2003). L'attività delle *actin-binding proteins* nel controllare lo stato dell'actina può essere fortemente regolato dal PIP₂ (Lassing e Lindberg, 1985; Janmey e Stossel, 1987; Sechi e Wehland, 2000; Yin e Janmey, 2003). Come già accennato, il PIP₂ è una delle molecole chiave nella via di trasduzione del segnale Ca²⁺ intracellulare dal momento che funge da substrato per la PLC nella produzione del secondo messaggero mobilizzatore del Ca²⁺, InsP₃ (Rhee, 2001). Inoltre, lo stesso PIP₂ può essere considerato un secondo messaggero con molte funzioni cellulari (McLaughlin et al., 2002; Di Paolo e De Camilli, 2006). Interagendo con le *actin-binding proteins* (Hilpela et al., 2004), il PIP₂ è in grado di modulare la loro attività e la loro posizione all'interno della cellula, e potrebbe indurre cambiamenti locali dell'actina del citoscheletro attraverso le proteine che regolano l'assemblaggio e il disassemblaggio dell'actina stessa (Sechi e Wehland, 2000; Yin e Janmey, 2003). D'altra parte, una volta legato alle *actin-binding proteins*, come la profilina (Witke, 2004), il livello effettivo di PIP₂ può essere modulato localmente e temporalmente al fine di limitare la sua accessibilità alla PLC. Quindi, le *actin-binding proteins* sono in grado di regolare le dinamiche del citoscheletro e modulare il segnale Ca²⁺ intracellulare. Il Ca²⁺ a sua volta potrebbe indurre cambiamenti nell'actina del citoscheletro influenzando lo stato delle *actin-binding proteins* sensibili al Ca²⁺, come la gelsolina.

I filamenti di actina possono regolare la concentrazione citosolica del Ca²⁺ libero modulando l'efficacia dei canali del Ca²⁺ intracellulari, direttamente o attraverso i cambiamenti secondari nella struttura del RE. In quest'ottica, la riorganizzazione del RE durante la maturazione meiotica e la fecondazione può essere in parte causata dai

cambiamenti dell'actina del citoscheletro. Se lo stato dell'actina può indurre cambiamenti significativi nella conformazione curva della membrana, esso potrebbe anche causare un'attivazione meccanica dei canali ionici sul RE mediante la genesi di una tensione da allungamento (Jaffe e Terasaki, 1994; Chun e Santella, 2009). Il collegamento diretto tra i filamenti di actina e gli InsP₃R è stata dimostrata anche in cellule murine dove si è trovato che essi regolano l'attività e la distribuzione cellulare dei recettori (Turvey et al., 2005). Quindi, alterando la struttura dell'actina, è possibile che le cellule possano sia inibire che aumentare il rilascio di Ca²⁺ dai depositi interni. Il ruolo regolatore dei filamenti di actina è stato dimostrato sia nel fenomeno di ingresso di Ca²⁺ dall'esterno sia nel rilascio ligando-dipendente dello ione attraverso il RE (Rosado et al., 2000; Furuyashiki et al., 2002; Sabala et al., 2002; Wang et al., 2002a e b).

Nel quadro generale dei meccanismi di segnalazione del Ca²⁺ intracellulare e dell'importanza di una corretta organizzazione della F-actina nella zona corticale affinché essi si realizzino senza intoppi, può essere utile menzionare l'effetto del calcio ionoforo ionomicina negli ovociti di stella di mare. La ionomicina è spesso usata nelle tecniche di fecondazione assistita umana dopo l'iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi (ICSI) (Yanagida et al., 2008; Ebner et al., 2015; Santella e Dale, 2015) e durante la fecondazione *in vitro* di varie specie animali (Swann e Ozil, 1994). Una breve esposizione degli ovociti immaturi di stella di mare alla ionomicina aumenta i livelli intracellulari di Ca²⁺, facilitando il trasporto dello ione attraverso la membrana plasmatica e dai depositi intracellulari. Allarmante, però, è stata la scoperta che la ionomicina induce anche drastiche alterazioni ultrastrutturali rapide ed irreversibili nella zona corticale dell'ovocita, che comprendono la retrazione dei microvilli e la fusione dei granuli corticali con altre vescicole. Analogamente alle uova di *A. aranciacus* attivate con LAT-A (Lim et al., 2002), le uova portate a maturazione dopo breve trattamento con ionomicina, se fecondate, manifestano una riduzione della lunghezza dei microvilli nello spazio perivitellino, la cui normale estensione è indice dei segnali fisiologici della normale attivazione dell'uovo

(Tilney e Jaffe, 1980). Alla fecondazione, le uova pretrattate con ionomicina esibiscono un lieve aumento di Ca^{2+} , e non riescono né a sollevare la membrana di fecondazione né tantomeno a manifestare la caratteristica traslocazione centripeta delle fibre di actina corticale. Queste alterazioni strutturali sono anche causa di un più alto tasso di sviluppo anormale degli zigoti, anche quando la ionomicina viene aggiunta solo dopo la fecondazione (Vasilev et al., 2012).

Infine, un'ipotesi più radicale suggerisce che l'actina stessa sia funzionale allo stoccaggio del Ca^{2+} nonché del suo rilascio mediante il processo di polimerizzazione e depolimerizzazione dei filamenti (Lange, 1999). Le molecole di actina in effetti legano il Ca^{2+} e altri cationi bivalenti con elevata affinità (Kasai e Oosawa 1968, 1969). Secondo questa ipotesi, gli ioni Ca^{2+} legati alla F-actina diventerebbero praticamente inaccessibili per lo scambio con gli ioni esterni, in quanto il tempo di ritenzione del Ca^{2+} verrebbe aumentato fino a 3000 volte. In questo modo, la F-actina potrebbe funzionare come un potenziale deposito di Ca^{2+} (Lange, 1999). D'altra parte, i monomeri associati al Ca^{2+} sarebbero pronti a rilasciare lo ione in cambio di Mg^{2+} che è 1000 volte più concentrato nel citosol. Così, la depolimerizzazione dei microfilamenti carichi di Ca^{2+} può fungere da meccanismo per rilasciare lo ione in determinati e specifici compartimenti cellulari. In effetti, la distruzione dei filamenti di actina carichi di Ca^{2+} , mediante trattamento con ultrasuoni o incubazione con profilina, è in grado di produrre il rilascio di Ca^{2+} *in vitro* (Lange e Brandt, 1996; Lange, 1999). A favore dell'ipotesi che il citoscheletro sia coinvolto nella regolazione della liberazione del Ca^{2+} intracellulare, ad oggi la più forte evidenza sperimentale deriva dai risultati ottenuti sulle uova mature di stella di mare *A. aranciacus* che, se incubate con LAT-A, manifestano aumenti di Ca^{2+} nella zona corticale, che poi si propaga per tutto il citoplasma sotto forma di un'onda centripeta. Questi picchi ripetuti di Ca^{2+} sono stati osservati solo nelle uova mature e continuano per 3 ore fino a quando l'organizzazione dei microvilli sulla superficie non collassa del tutto per l'azione della LAT-A che, sequestrando i monomeri di actina, impedisce la formazione di

microfilamenti (Lim et al., 2002). Diversamente dalle uova mature, l'incubazione di ovociti immaturi di stella di mare con le stesse concentrazioni della droga depolimerizzante i filamenti di actina, non induce alcun rilascio di Ca^{2+} . Questi risultati implicano che la responsività alla LAT-A è correlata alle differenze strutturali e funzionali dell'actina del citoscheletro negli ovociti non trattati con l'ormone e nelle uova mature (Lim et al., 2003). Il risultato che le oscillazioni di Ca^{2+} indotte da LAT-A sono bloccate dall'eparina, potrebbe suggerire che il rilascio di Ca^{2+} da LAT-A sia mediato dall'InsP₃ ma l'interpretazione di tale fenomeno si complica perché l'eparina iperpolimerizza l'actina corticale (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008). Pertanto sarà interessante capire se il trattamento con LAT-A rende le uova mature ipersensibili al livello basale di InsP₃, oppure se la stimolazione con LAT-A attiva una cascata di eventi che porta alla formazione di InsP₃. Oppure dimostrare che l'aumentato tasso di depolimerizzazione indotto da LAT-A possa aver causato il rilascio di Ca^{2+} dalla dissociazione dei monomeri di actina che precedentemente avevano incorporato lo ione.

CAPITOLO II: MATERIALI E METODI

2.1. Preparazione dei gameti.

Le stelle di mare *A. aranciacus* e *A. pectinifera* sono state raccolte durante la loro stagione riproduttiva nel Golfo di Napoli da gennaio a maggio e nella Mutsu Bay in Giappone da settembre a novembre, e stabulati in vasche con acqua di mare a temperatura costante (16°C). Gli animali mantenuti in cattività non emettono gameti per mancanza di stimoli ambientali. Il prelievo delle gonadi sia femminili che maschili è stato ottenuto mediante un taglio sulla superficie delle braccia in prossimità del disco centrale. Tramite un leggero scuotimento, le gonadi femminili, riconoscibili dal colore arancione, rilasciano spontaneamente gli ovociti immaturi contenenti la VG che sono filtrati varie volte delicatamente per non rimuovere il *jelly coat*, e incubati in acqua di mare naturale filtrata (FSW) o in ASW (acqua di mare artificiale: 449,9 mM NaCl, 9.4 mM KCl, 48.2 MgSO₄.7H₂O mM, 10.2 CaCl₂.2H₂O mM, 5,4 mM NaHCO₃, pH 8,2), per almeno 30 minuti prima di iniziare gli esperimenti. Alcuni esperimenti sono stati eseguiti utilizzando invece CaFSW (acqua di mare priva di calcio: 460,3 mM NaCl, 9.4 mM KCl, 48,2 MgSO₄.7H₂O mM, 5,4 NaHCO₃ mM, pH 8,2). Ciò per evitare l'utilizzo di gameti che hanno iniziato spontaneamente la maturazione e che potranno essere facilmente riconosciuti (per la mancanza della VG) e scartati. Le gonadi maschili, di colore bianco, sono state raccolte in una Eppendorf a secco e conservate a 4°C. Nel caso di *A. aranciacus*, gli spermatozoi adoperati per gli esperimenti di fecondazione sono preparati diluendo 2 µl di sperma secco in 1 ml di acqua di mare naturale e poi 20 µl di questa sospensione sono stati aggiunti ad 1ml di acqua di mare contenente gli ovociti o le uova per ottenere una diluizione finale dello sperma di 1: 25000. Per *A. pectinifera*, invece, la diluizione finale è di 1:50000.

I ricci di mare adulti *Paracentrotus lividus* sono stati raccolti nel Golfo di Napoli durante la stagione riproduttiva (che inizia a gennaio e termina alla fine di maggio) e stabulati a

16°C in vasche con acqua di mare circolante. L'induzione della deposizione delle uova in laboratorio è stata ottenuta attraverso l'iniezione intracelomatica di 0,5 M KCl nelle femmine mentre lo sperma è stato rimosso chirurgicamente dalla gonade maschile. Per gli esperimenti di fecondazione, gli spermatozoi sono stati usati ad una densità finale di $3.7 \cdot 10^6$ per ogni ml di acqua di mare contenente le uova.

La maturazione meiotica è stata indotta *in vitro* mediante l'aggiunta dell'ormone 1-metiladenina (1-MA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ad una concentrazione finale di 1 μ M per gli ovociti di *A. pectinifera* e 10 μ M per gli ovociti di *A. aranciacus*. Come già detto, le uova di riccio di mare che sono isolate dalla gonade hanno già completato la meiosi e quindi non necessitano di alcuna stimolazione ormonale per indurre la maturazione dopo la dissezione delle gonadi. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a 18°C.

2.2. Microiniezione.

La microiniezione di sostanze fluorescenti per la misura dei cambiamenti di calcio e per la visualizzazione della struttura dell'actina del citoscheletro così come di altri attivatori ed inibitori della cascata del segnale calcio è stata effettuata con un microiniettore programmabile (Narishige PM-300) o con un Transjector Eppendorf 5246 accoppiato ad un microscopio ottico Zeiss dotato di micromanipolatore. Le sostanze sono state rilasciate mediante micropipette di vetro borosilicato (1,0 millimetro di diametro esterno; 0,58 millimetri di diametro esterno, e muniti di un filamento interno, Sutter Instrument, Novato, CA), e provviste di una punta sottile del diametro di un micron che sono state preparate con il Puller PN-30 (Narishige, Japan). La concentrazione finale delle sostanze iniettate all'interno delle cellule è fino a 50-100 volte inferiore rispetto alla loro concentrazione nella micropipetta di iniezione ed il volume del materiale iniettato è stimato essere l'1% del volume della cellula. Ovociti e uova con il *jelly coat* intatto sono stati microiniettati con una leggera pressione dell'apparecchiatura per evitare un qualsiasi stress meccanico.

2.3. Ca²⁺ imaging.

I livelli di Ca²⁺ sono stati monitorati iniettando negli ovociti o uova il colorante fluorescente sensibile ai cambiamenti di concentrazione di questo ione, il Calcium green 488 coniugato ad una molecola di destrano da 10 kDa (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) ad una concentrazione di 5 mg/ml nella pipetta e sospeso nel buffer di iniezione (IB: HEPES 10 mM, 100 mM L-Asp a pH 7.0). Nella maggioranza degli esperimenti, al fine di eliminare eventuali cambiamenti nel segnale della fluorescenza dovuti al movimento o a variazioni di volume della cellula durante l'acquisizione, ho iniettato il Calcium green 488 insieme alla rodamina (5mg/ml), (Rhodamin Red, Molecular Probes, Eugene, OR) che è insensibile alle variazioni citoplasmatiche dei livelli di Ca²⁺. Tali cambiamenti sono stati rilevati utilizzando due diverse camere digitali (CCD raffreddate a -20°C) per ridurre le interferenze dovute a radiazioni termiche: una MicroMax, Princeton Instruments, Inc., Trenton, NJ, montata su un microscopio Zeiss Axiovert 200 con un obiettivo Plan-Neofluar 20x / 0.50 con una risoluzione temporale di circa 2 secondi, controllata dal software MetaMorph (Universal Imaging Corporation); ed una CoolSnap MYO, Photometrics, montata su un microscopio Eclipse Nikon Ti-E con un obiettivo CFI60, controllata dal software NIS Elements (Nikon Instruments Europe BV) in continuo. Le ruote dei filtri di eccitazione ed emissione (Sutter Instruments, Co, Novato, CA) sono state controllate utilizzando uno shutter collegato ad un computer (Lambda 10-2, Sutter Instruments).

2.4. Microscopia confocale.

I campioni microiniettati con sonde fluorescenti sono stati osservati mediante l'ausilio di due diversi microscopi confocali: uno di tipo laser-scanning Zeiss LSM 510 META (Jena, Germania), con eccitazione a 488/520 nm ed emissione a 500/555 e 560 nm, equipaggiato con un obiettivo Plan-Neofluar 25x/0,80; l'altro di tipo spinning disk CrEST X-Light equipaggiato con gli stessi obiettivi e filtri. Le immagini sono state catturate come *files*

digitali e l'analisi della fluorescenza è stata effettuata utilizzando il software di analisi delle immagini MetaMorph Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA).

2.5. Colorazione della F-actina in cellule viventi.

Ovociti a diversi stadi di maturazione sono stati microiniettati con la falloidina 488- o 568- coniugata ad Alexa Fluor (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) diluita in metanolo o IB, ad una concentrazione nella pipetta di microniezione di 50 μ M per le stelle di mare e 10 μ M nel caso dei ricci. Dopo ogni microiniezione, le cellule sono state poi incubate in acqua di mare per 5-10 minuti e posizionate in camere apposite preparate per l'osservazione al microscopio confocale o telecamera CCD.

2.6. Colorazione degli spermatozoi con Hoechst 33342.

Dopo aver diluito lo sperma secco in acqua di mare, è stata utilizzata una concentrazione finale di 5 mM Hoechst 33342 (Sigma) un colorante vitale del DNA per visualizzare gli spermatozoi. Lo sperma è stato incubato con Hoechst 33342 per 1 minuto a 17 °C prima di essere utilizzato per inseminare le uova. Il numero degli spermatozoi incorporati nelle uova è stato contato in epifluorescenza, utilizzando luce UV (330 nm).

2.7. Trattamento con vari agenti chimici.

Tutte le sostanze chimiche che alterano la struttura dell'actina: Latrunculina A (LAT-A) (BIOMOL Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA), Cytochalasin B (Molecular Probes), Jasplakinolide (JAS) (Calbiochem, LaJolla, CA, Stati Uniti d'America), ed il mezzo in cui erano sospese (0,05% DMSO, concentrazione finale) sono state usate a diverse concentrazioni (si vedano i Capitoli III e IV per i dettagli) incubando le cellule per 20 minuti nell'acqua di mare e poi rimosse mediante lavaggi prima di effettuare gli esperimenti.

La Falloidina, una sostanza chimica che induce la polimerizzazione dei filamenti di actina, non fluorescente (Sigma-Aldrich) è stata diluita in DMSO, ed è stata microiniettata nelle uova ad una concentrazione finale di 1 mM nella pipetta. Le uova sono state utilizzate per gli esperimenti 15 minuti dopo la microiniezione di falloidina. Le uova di controllo sono state microiniettate con il DMSO e utilizzate per gli esperimenti 15 minuti dopo.

Gli inibitori dei canali del calcio di tipo L, Verapamil e Diltiazem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sono stati diluiti in acqua distillata ed aggiunti agli ovociti durante la maturazione (si veda il Capitolo III per i dettagli) ad una concentrazione di 100 μ M.

La Nicotina e tutti gli agonisti (Acetilcolina e Carbacolo) e antagonisti (Mecamylamine, Hexamethonium e MLA) (Sigma Aldrich) sono stati diluiti in acqua distillata e aggiunti a diverse concentrazioni (si veda il Capitolo VI per i dettagli) nell'acqua di mare contenente le uova per circa 5-10 minuti di incubazione prima di effettuare la fecondazione.

2.8. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Gli ovociti immaturi sono stati trattati con 1 μ M di 1-MA in CaFSW o in ASW per 30 min. Gli ovociti in maturazione e, in altri casi le uova, sono stati poi fissati con glutaraldeide allo 0,5% (pH 8,0) in acqua di mare filtrata per 1 h, e trattati con 1% tetrossido di osmio per un'altra ora. I campioni sono stati disidratati in concentrazioni crescenti di alcool ed inclusi in EPON 812. Dopo essere stati trattati con UAR-EMS (Electron Microscope Science) per 30 minuti, e 0,3% di citrato di piombo per 30 secondi, i campioni sono stati esaminati al microscopio elettronico a trasmissione LEO 912 AB.

2.9. Elaborazione dati.

Le serie temporali di immagini fluorescenti sono state analizzate mediante il programma MetaMorph Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) e processate in modo da ottenere immagini di fluorescenza relativa, di fluorescenza istantanea e la conversione dei livelli di luminosità in numeri usati per l'analisi statistica

mediante il programma Excel di Microsoft Office 2010. La fluorescenza relativa (F_{rel}) è stata calcolata sull'immagine intera della cellula, per evidenziare l'effettivo aumento di Ca^{2+} nei vari compartimenti della cellula (regione corticale e citoplasma) con calcoli ottenuti mediante il software MetaMorph. Per la realizzazione dei grafici sono state selezionate le "regioni di interesse" (Region Of Interest, ROI) che includevano l'intera cellula o parte di essa. Salvo dove diversamente specificato, le ROIs degli esperimenti presentati in questa tesi sono state posizionate sulla cellula intera. Per quantificare il segnale Ca^{2+} in un determinato punto nel tempo è stata adoperata la seguente formula matematica: $F_{rel} = [F - F_0] / F_0$, normalizzando per il valore di fluorescenza basale F_0 , dove F rappresenta il livello medio della fluorescenza della cellula considerata. Ciò significa che al valore di fluorescenza registrato per ogni immagine (F) è sottratto quello della fluorescenza iniziale di riferimento (F_0) e tale differenza viene sempre divisa per il valore di fluorescenza basale in modo da ottenere la normalizzazione dei valori ottenuti e renderli paragonabili. Nel caso in cui sono stati usati due coloranti per misurare l'aumento di Ca^{2+} (Calcium Green e Rhodamin Red) la fluorescenza relativa è stata calcolata secondo la formula $F_{rel} = [F_{REL(verde)} - F_{REL(rosso)}] / F_{RATIO}$, dove la fluorescenza relativa registrata per il rosso, $F_{REL(rosso)} = F - F_0/F_0$ è stata sottratta alla fluorescenza relativa per il verde, $F_{REL(verde)} = F - F_0/F_0$ e poi normalizzati mediante il rapporto delle immagini di riferimento per Verde e Rosso acquisiti un istante precedente al primo segnale Ca^{2+} rilevabile, $F_{RATIO} = F_{0(verde)} / F_{0(rosso)}$. In entrambi i casi F_{rel} è stata definita come RFU (Relative Fluorescence Unit, unità di fluorescenza relativa) per tracciare le traiettorie del Ca^{2+} nei grafici presenti in questa tesi. Per compensare la variabilità del segnale Ca^{2+} tra le popolazioni cellulari delle gonadi di animali diversi, i valori delle ampiezze del picco dell'onda di Ca^{2+} e del flash corticale di ogni uovo sono stati normalizzati con le medie dei corrispondenti valori nelle uova di controllo della stessa popolazione di appartenenza. Per visualizzare l'aumento istantaneo nella concentrazione di Ca^{2+} fotogramma per fotogramma, e quindi seguire la propagazione del segnale nel tempo nelle zone della cellula, dove il rilascio dello ione sta

avvenendo, è stato analizzato il livello di fluorescenza istantanea secondo la formula: $F_{INST} = [(F_t - F_{t-1}) / F_{t-1}]$ (Kidd e Thorn, 2000). La media e la variazione dei dati numerici ottenuti dall'analisi quantitativa sono stati riportati come “media \pm deviazione standard (DS)”. ANOVA e t-test sono stati effettuati con l'uso di Prism 3.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), e sono stati considerati statisticamente significativi valori di $P < 0.05$.

2.10. Saggio di attività della nicotina e delle *actin-binding proteins* cofilina e profilina.

Gli effetti sull'actina da parte della nicotina sono stati testati mediante saggi di polimerizzazione e depolimerizzazione *in vitro* di filamenti fluorescenti di actina-pirene. Sono stati studiati gli effetti della nicotina sull'attività depolimerizzante della cofilina, espressa come diminuzione del segnale fluorescente emesso dalla actina fluorescente, e di inibizione della polimerizzazione della profilina, indicato dal decremento nella velocità di aumento della fluorescenza dovuto alla polimerizzazione dei monomeri. Tutto il materiale necessario per la realizzazione del test, (comprese le *actin-binding proteins*), è stato fornito e preparato secondo le istruzioni del kit BK003 della ditta Cytoskeleton e la fluorescenza è stata misurata con il fluorimetro FlexStation 3 (Molecular Devices, CA, USA) alle lunghezze d'onda di 350 ± 4 nm per l'eccitazione e 430 ± 7.5 nm per l'emissione; e con il fluorimetro TECAN Infinite F200 PRO alle lunghezze d'onda di 340 ± 35 nm per l'eccitazione e 430 ± 35 nm per l'emissione.

CAPITOLO III

Identificazione di un ulteriore segnale Ca^{2+} durante la maturazione degli ovociti di stella di mare al tempo della GVBD

Risultati

3.1. Insorgenza di una risposta all'1-MA durante la GVBD negli ovociti di stella di mare.

Da lungo tempo è nota l'insorgenza di un aumento transitorio dei livelli di Ca^{2+} intracellulare in corrispondenza di specifici stadi di divisione mitotica, come durante la rottura dell'involucro nucleare, la transizione metafase-anafase e la divisione cellulare (Poenie et al., 1985; 1986). Contrariamente all'onda di Ca^{2+} che si manifesta alla fecondazione il segnale Ca^{2+} che insorge nel corso dei vari stadi della mitosi non si manifesta universalmente, in tutti i tipi cellulari, presumibilmente per le sue caratteristiche intrinseche, che lo rendono difficile da individuare con le tecnologie odierne, come ad es. la durata molto più breve ed un'ampiezza marcatamente più bassa. Un aumento simile di Ca^{2+} intracellulare potrebbe realizzarsi anche nel corso della meiosi, ma la sua visualizzazione potrebbe essere complicata dal fatto che l'induzione artificiale della maturazione è impossibile se non si conosce l'identità dell'ormone responsabile della ripresa del ciclo meiotico nella specie considerata. In secondo luogo, in alcune specie, ad esempio nelle ascidie, la meiosi si completa solo dopo la fecondazione, quindi i piccoli incrementi nei livelli di Ca^{2+} intracellulare, imputabili a stadi meiotici tardivi, sarebbero inevitabilmente mascherati dalla genesi dell'imponente onda di Ca^{2+} indotta dallo spermatozoo (Russo et al., 1996). Nonostante ciò, in letteratura sono stati riportati sporadicamente episodi di momentanei aumenti del Ca^{2+} intracellulare generati nel corso della progressione meiotica degli ovociti di diverse specie, tra cui stelle di mare (Moreau et al., 1978), *Xenopus* (Wasserman et al., 1980) e topi (Carroll et al., 1994). La maggioranza

degli studi concentrata sull'individuazione di un incremento dei livelli di Ca^{2+} in concomitanza della ripresa del ciclo meiotico è stata però effettuata sugli ovociti di stella di mare, in quanto il processo di maturazione può essere facilmente indotto nella semplice acqua di mare, a cui si aggiunge l'ormone della maturazione, 1-MA, e indipendentemente dalla specie considerata (Kanatani et al., 1969). Il ruolo biologico dell'aumento del Ca^{2+} intracellulare nei primi stadi della ripresa meiotica negli ovociti di stella di mare è più volte stato oggetto di dibattito (Guerrier et al., 1978; Eisen e Reynolds, 1984; Witchel e Steinhardt, 1990; Kikuyama e Hiramoto, 1991; Santella e Kyozyuka, 1994) e ad oggi il suo significato fisiologico rimane oscuro. Al fine di monitorare i cambiamenti dei livelli di Ca^{2+} intracellulare durante la maturazione meiotica, ho microiniettato gli ovociti di *Asterina pectinifera* con Calcium Green e successivamente li ho incubati con 1-MA. Oltre alla già citata e ben nota onda di Ca^{2+} che si origina all'emisfero vegetale pochi minuti dopo l'esposizione ad 1-MA (Kyozyuka et al., 2008), ho osservato per la prima volta un rilascio di Ca^{2+} che si realizzava più tardivamente e, precisamente, in una fase che coincide con la progressione della GVBD, cioè 20 -40 min dopo l'aggiunta di 1-MA (Fig. III, 1). Questa risposta tardiva consisteva di una serie di molteplici picchi di Ca^{2+} visualizzabili in prossimità della membrana plasmatica (Fig. III, 1A), ed era fortemente dipendente dai livelli di Ca^{2+} extracellulare, poiché tali picchi erano totalmente eliminati in acqua di mare senza calcio (Fig. III, 1A e B). È interessante notare che, a seguito della mancanza di questi picchi, il livello basale di Ca^{2+} citosolico in questi ovociti, stimolati a maturare in acqua di mare senza calcio, era nettamente inferiore a quello degli ovociti la cui esposizione ad 1-MA era invece avvenuta in acqua di mare artificiale (Fig. III, 1B). A differenza di questo rilascio di Ca^{2+} tardivo, però, la risposta di Ca^{2+} iniziale scatenata pochi minuti dopo l'esposizione all'ormone, non era affatto influenzata dalla mancanza di Ca^{2+} nell'ambiente extracellulare, in quanto l'ampiezza del picco dell'onda di Ca^{2+} degli ovociti maturati in acqua di mare artificiale (0.62 ± 0.20 RFU, $n = 16$) era praticamente

uguale a quella degli ovociti maturati in acqua di mare senza calcio ($0,62 \pm 0,12$ RFU, $n = 17$; $P = 0,9365$).

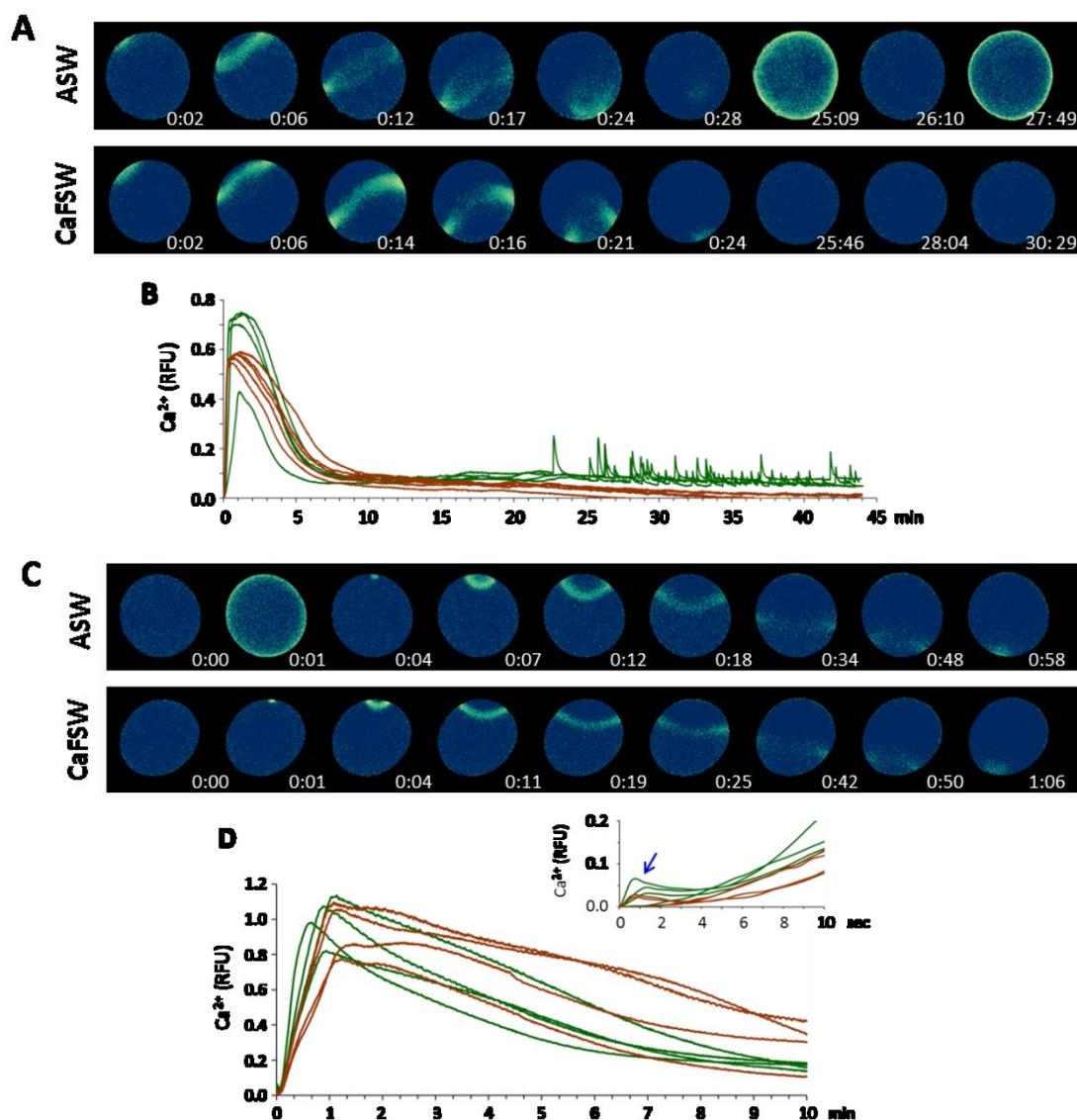


Figura III, 1. Cambiamenti dei livelli di Ca^{2+} intracellulare negli ovociti in maturazione e nelle uova fecondate di stelle marine. Gli ovociti di *A. pectinifera* microiniettati con Calcium Green sono stati esposti all'1-MA in ASW o in CaFSW alla concentrazione di $1\mu M$. (A) In fluorescenza relativa sono rappresentati graficamente i momentanei aumenti di Ca^{2+} durante la maturazione. Il tempo immediatamente precedente al primo segnale di Ca^{2+} rilevabile è stato impostato come $t = 0$ per facilitare la comparazione. (B) Le variazioni del livello citosolico di Ca^{2+} negli ovociti durante la maturazione in ASW mostrano una duplice risposta all'1-MA: un'onda rapida nella fase iniziale e dei flash corticali di breve durata nella fase tardiva. Quest'ultima risposta è totalmente assente negli ovociti maturati in CaFSW. (C) Immagini di fluorescenza relativa che rappresentano i momentanei aumenti di Ca^{2+} nelle uova fecondate in intervalli di tempo selezionati. Le uova maturate in ASW o in CaFSW sono state trasferite in ASW e fecondate 5 minuti dopo. (D) I cambiamenti dei livelli di Ca^{2+} nelle uova fecondate, maturate in ASW (curve di colore verde) o in CaFSW (curve di colore marrone). Nel riquadro: le stesse curve rappresentate su una scala temporale diversa per mostrare meglio il flash corticale (freccia blu) e il primo aumento di Ca^{2+} .

3.2. La risposta iniziale all'1-MA negli ovociti di stella di mare rappresenta una modalità più rapida di propagazione dell'onda di Ca^{2+} .

Una caratteristica evidente e particolarmente degna di riflessione riguarda la prima onda di Ca^{2+} rilasciata nel cortex degli ovociti stimolati a riprendere la maturazione meiotica che si propaga con una velocità molto maggiore rispetto a quelle osservate nelle uova fecondate della stessa specie. Come ho già accennato, il primo segnale Ca^{2+} rilevabile si origina sempre nell'emisfero vegetale in prossimità della membrana plasmatica per poi propagarsi verso il polo animale degli ovociti dove è situato il nucleo. Tale momentaneo aumento di Ca^{2+} è limitato alle aree corticali, immediatamente sottostanti la membrana plasmatica, e non coinvolge altri compartimenti citoplasmatici interni, così come nel caso della fecondazione, per cui la discrepanza nella velocità di propagazione tra le due onde di Ca^{2+} può essere spiegata proprio in termini di differente modalità con cui il Ca^{2+} è rilasciato da due messaggeri primari che sono diversi l'uno dall'altro: 1-MA e spermatozoo, (Fig. III, 1A). Misurando il tempo di attraversamento dell'onda di Ca^{2+} , che inizia nella regione corticale dell'ovocita al polo vegetale ed arriva al polo opposto, nel caso della maturazione ho ottenuto una media di 17.9 ± 7.6 sec ($n = 160$), mentre alla fecondazione il tempo necessario affinché l'onda, partita dal punto di interazione tra l'uovo e lo spermatozoo, completasse il suo percorso fino all'altra estremità era notevolmente superiore, registrando una media di $57,5 \pm 12,6$ sec, ($n = 127$; $P < 0.0001$) (Fig. III, 1C). Infatti il tempo di propagazione dell'onda di Ca^{2+} negli ovociti fecondati nella fase VG era praticamente lo stesso ($56,6 \pm 16,8$ sec, $n = 37$), di quello delle uova mature fecondate. Pertanto, considerando il diametro medio degli ovociti ($222 \mu\text{m}$), la velocità planare dell'onda di Ca^{2+} che si genera nella fase iniziale della maturazione era $12,4 \mu\text{m}/\text{sec}$, che è più di tre volte superiore alla velocità dell'onda di Ca^{2+} delle uova fecondate ($3,9 \mu\text{m}/\text{sec}$).

3.3. I picchi tardivi di Ca^{2+} degli ovociti durante la GVBD manifestano caratteristiche comuni ai flash di Ca^{2+} corticali delle uova fecondate.

In seguito ad un'analisi più accurata delle caratteristiche di questi picchi tardivi di Ca^{2+} , ho potuto notare come somigliassero ai flash corticali che si manifestano nelle uova degli echinodermi al momento della fecondazione (Moccia et al., 2006; Chun et al., 2014), originandosi in modo sincrono lungo l'intera regione del citoplasma al di sotto della membrana plasmatica e con una durata molto breve (< 2 sec). Inoltre, entrambi risultavano essere fortemente dipendenti dal Ca^{2+} esterno, in quanto, come già detto prima, l'eliminazione del Ca^{2+} dal mezzo era in grado di abolire la comparsa dei picchi negli ovociti in maturazione (Fig. III, 1B). D'altro canto, quando le uova venivano fecondate in acqua di mare con un'elevata concentrazione di Ca^{2+} (30 mM), l'ampiezza del flash corticale diventava diverse volte maggiore rispetto alle uova fecondate nell'acqua di mare con una normale concentrazione di Ca^{2+} (10 mM) (Tabella III, 1). In aggiunta, quando effettuavo l'inseminazione in acqua di mare con una bassa concentrazione di Ca^{2+} (1 mM) in 4 delle 5 uova testate la fecondazione non avveniva, indicando che la necessità di un dosaggio minimo di Ca^{2+} per l'attivazione degli spermatozoi di riccio di mare (Sano e Kanatani, 1980) può applicarsi anche al caso della stella marina. Sebbene l'ampiezza del picco dell'onda globale di Ca^{2+} in questo unico uovo fecondato in acqua di mare con 1 mM Ca^{2+} fosse praticamente la stessa di quella delle uova fecondate nell'acqua di mare con una normale concentrazione di Ca^{2+} , il flash corticale non si manifestava (dati non mostrati). Appare perciò plausibile ipotizzare che l'ampiezza del flash corticale nelle uova fecondate di stella sia determinata dal differente gradiente di concentrazione del Ca^{2+} tra i due versanti della membrana plasmatica. Considerata l'abolizione dei picchi tardivi di Ca^{2+} negli ovociti maturati in acqua di mare senza calcio, ho pensato che gli ovociti avessero perso anche la capacità di manifestare il flash di Ca^{2+} corticale alla fecondazione. Al fine di verificare tale ipotesi, gli ovociti esposti a 1-MA in acqua di mare senza calcio sono stati trasferiti in acqua di mare naturale e ivi fecondati dopo 5 minuti di incubazione.

Curiosamente l'ampiezza del flash corticale era significativamente ridotta rispetto alle uova maturate in acqua di mare artificiale (CaFSW, $0,006 \pm 0,01$ RFU, $n = 17$; ASW, $0,070 \pm 0,078$ RFU, $n = 16$; $P < 0,01$). (Fig. III, 1C e D), mentre la media dell'ampiezza del picco dell'onda globale rimaneva praticamente la stessa (CaFSW, $0,84 \pm 0,16$ RFU, ASW, $0,83 \pm 0,19$ RFU; $P = 7.868$). Tuttavia, quando fecondati 10 minuti dopo essere stati trasferiti in acqua di mare naturale, gli ovociti maturati in acqua di mare senza calcio esibivano un normale flash corticale ($0,039 \pm 0,0038$, $n = 6$) rispetto alle uova fecondate dopo soli 5 minuti ($0,006 \pm 0,01$ RFU, $n = 17$; $P < 0,0001$). Pertanto, questi risultati dimostrano che per l'occorrenza del flash di Ca^{2+} corticale alla fecondazione in ovociti maturati in acqua di mare senza calcio e fecondati dopo il loro trasferimento in acqua di mare normale sia necessaria la loro incubazione in acqua di mare contenente Ca^{2+} per almeno 5-10 min. Questo suggerisce che il flash corticale non è legato ad un influsso di ioni Ca^{2+} dall'esterno, bensì alla sua liberazione da compartimenti specifici sulla superficie dell'uovo dove il legame con loro aveva avuto il tempo di avvenire.

Tabella III, 1. L'ampiezza del picco di rilascio di Ca^{2+} nelle uova di *A. pectinifera* fecondate in acqua di mare con una normale (10 mM) e una maggiore (30 mM) concentrazione di Ca^{2+} .

	10 mM Ca^{2+}	30 mM Ca^{2+}	t-test
Flash di Ca^{2+} corticale	0.020 ± 0.022 RFU (n=5)	0.16 ± 0.015 RFU (n=5)	$P < 0.0001$
Onda globale di Ca^{2+}	0.83 ± 0.082 RFU (n=5)	0.79 ± 0.072 RFU (n=5)	$P = 0.4199$

3.4. I picchi tardivi di Ca^{2+} non sono la causa, ma un risultato della GVBD.

Come accennato sopra, anche se gli ovociti maturati in acqua di mare senza calcio non mostravano i picchi tardivi di Ca^{2+} 20-40 minuti dopo l'esposizione ad 1-MA (Fig. III, 1B), la dissoluzione dell'involucro nucleare (GVBD) procedeva normalmente. Ciò suggeriva che questi picchi tardivi non fossero necessari per la GVBD e quindi per il proseguimento della maturazione. Ho quindi indagato sul ruolo della vescicola germinale e sul contributo della sua scomparsa nella genesi dei picchi di Ca^{2+} rimuovendo con sottili aghi la VG prima della stimolazione con 1-MA. Gli ovociti enucleati rispondevano lo stesso all'ormone, presentando un aumento iniziale dei livelli basali di Ca^{2+} simile sia nella cinetica che nell'ampiezza, ma al tempo della GVBD erano quasi privi dei picchi tardivi di Ca^{2+} (Fig. III, 2A). Mentre il numero medio dei picchi tardivi di Ca^{2+} durante i 45 minuti del periodo di maturazione negli ovociti intatti era $27,0 \pm 11,5$ ($n = 8$), il numero degli stessi negli oociti enucleati scendeva drasticamente a $6,0 \pm 11,4$ ($n = 9$, $P < 0.01$) con una notevole riduzione dell'ampiezza. Queste uova enucleate mantenevano comunque la capacità di essere fecondate, e l'ampiezza del picco dell'onda globale di Ca^{2+} al momento della fecondazione ($0,74 \pm 0,11$ RFU, $n = 9$) era quasi indistinguibile da quella delle uova intatte ($0,79 \pm 0,24$ RFU, $n = 8$; $P = 0,5663$). Tuttavia, la cinetica del decadimento del segnale Ca^{2+} era considerevolmente alterata nelle uova enucleate (Fig. III, 2B), suggerendo che la rimozione del nucleo potrebbe aver causato sottili cambiamenti nei compartimenti cellulari deputati al riassorbimento del Ca^{2+} dal citoplasma. In effetti, dopo la prima risposta all'ormone, il livello di Ca^{2+} citosolico globale negli ovociti enucleati risulta assestarsi ad un livello basale più elevato rispetto agli ovociti intatti (Fig. III, 2A). Questi risultati suggeriscono che i componenti del materiale nucleare mescolato al citoplasma dopo maturazione possano giocare un ruolo nella regolazione del processo di riassorbimento del Ca^{2+} citoplasmatico. Un ulteriore dato interessante da considerare è la significativa riduzione nel numero e nell'ampiezza dei flash corticali nelle uova enucleate rispetto alle uova intatte (Fig. III, 2B, riquadro). Nel complesso questi risultati

suggeriscono che i picchi tardivi di Ca^{2+} sono strettamente dipendenti dal mescolamento del nucleoplasma con il citoplasma, mentre la risposta iniziale all'ormone è un evento puramente corticale, la cui genesi è indipendente dal contributo del nucleo.

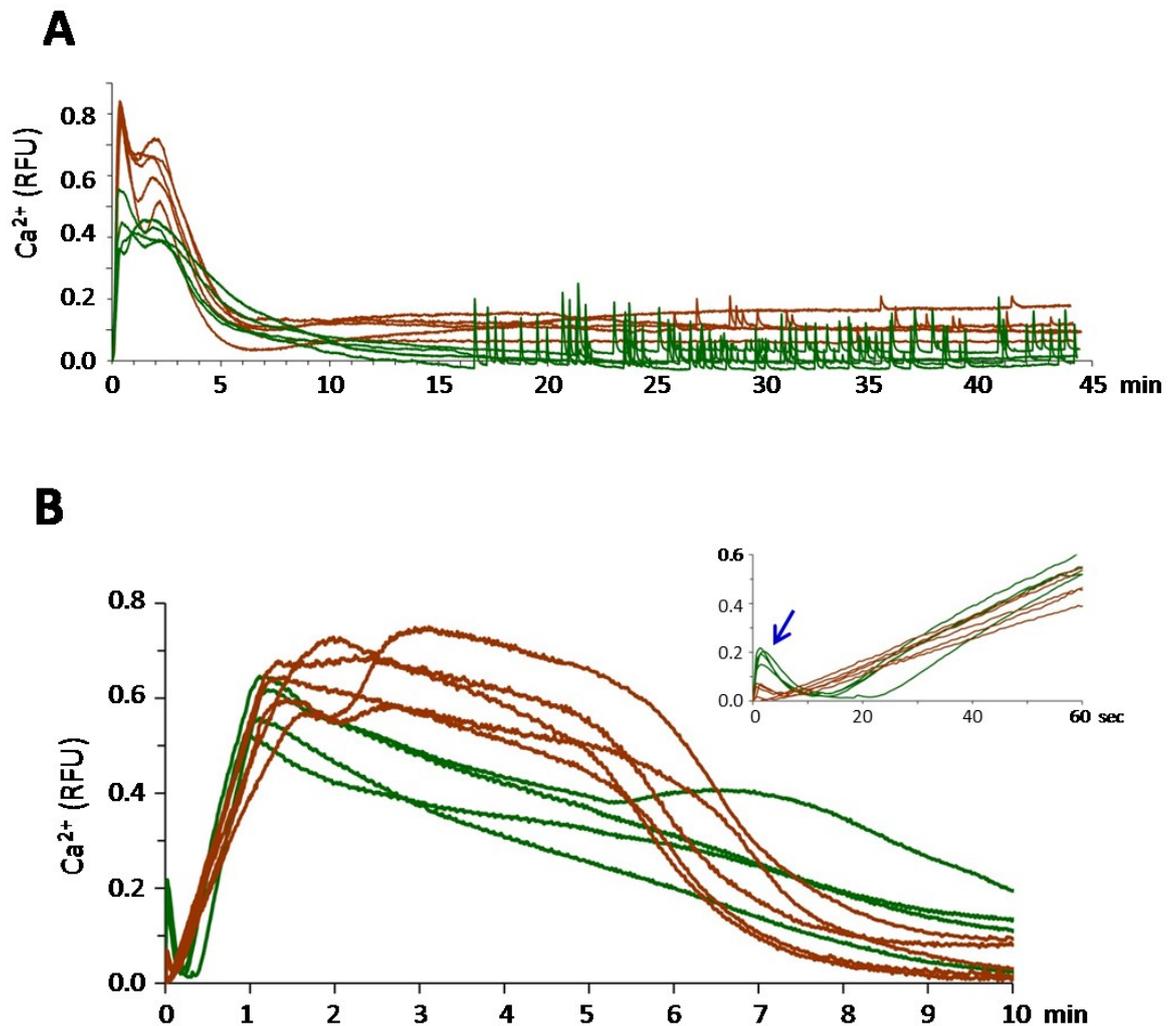


Figura III, 2. Gli ovociti enucleati conservano la capacità di propagare le onde di Ca^{2+} , ma non riescono a produrre i picchi tardivi. La VG è stata rimossa con sottili aghi dagli ovociti di *A. pectinifera*, e gli ovociti enucleati così ottenuti sono stati microiniettati con il colorante del calcio ed esposti ad 1-MA al fine di monitorare i cambiamenti dei livelli intracellulari di Ca^{2+} . (A) Il rilascio di Ca^{2+} negli ovociti enucleati (curve di colore marrone) ed intatti (curve di colore verde) durante la stimolazione ormonale. Si noti che i caratteristici picchi di Ca^{2+} manifestati dagli ovociti intatti nella fase tardiva della maturazione meiotica sono in gran parte assenti negli ovociti enucleati. (B) Le risposte delle uova intatte (curve di colore verde) e in quelle enucleate (curve di colore marrone) allo spermatozoo fecondante. Nel riquadro: le stesse curve di Ca^{2+} rappresentate su una scala temporale diversa per mostrare a più forte ingrandimento il flash corticale (freccia blu) e l'inizio dell'onda di Ca^{2+} . Il flash corticale di Ca^{2+} al momento della fecondazione è severamente represso nelle uova enucleate al momento della fecondazione.

3.5. Gli ovociti maturati in CaFSW anche se fecondati in acqua di mare mostrano considerevoli alterazioni nel successivo sviluppo embrionale.

In seguito all'esposizione ad 1-MA in acqua di mare senza calcio, gli ovociti di *A. pectinifera* sembrano, almeno in apparenza, riprendere e completare la maturazione meiotica in maniera del tutto simile ai controlli, differenziandosi esclusivamente per l'assenza dei picchi tardivi di Ca^{2+} durante la fase di dissoluzione dell'involucro nucleare. Tuttavia, ad un esame più attento, emergono sottili differenze. In primo luogo, l'ultrastruttura della corteccia dell'ovocita risulta essere leggermente modificata. Negli ovociti maturati in acqua di mare artificiale, sia i granuli corticali che le vescicole non electron dense nel cortex si trovano strettamente al di sotto della membrana plasmatica (Fig. 3A). Quando gli ovociti vengono maturati in acqua di mare senza calcio invece, queste vescicole si dispongono ad una distanza molto maggiore dalla membrana (Fig. III, 3B). In secondo luogo, la cinetica della progressione meiotica appare leggermente diversa. In acqua di mare senza calcio, la prima fase della meiosi ovocitaria progredisce normalmente come indicato dall'inizio della GVBD (ASW, a 15.3 ± 3.2 min dopo il trattamento con 1-MA, $n = 16$; CaFSW, a $16,8 \pm 1,1$ min, $n = 16$, $P = 0,0883$) e dal tempo che occorre affinché la GVBD si completi (ASW, $17,8 \pm 4,6$ min; CaFSW, $20,0 \pm 1,9$ min, $P = 0,0835$). Invece le fasi successive della meiosi hanno luogo molto prima. Mentre l'estrusione del primo globulo polare negli ovociti maturati in acqua di mare artificiale avviene circa 77.5 ± 2.1 minuti ($n = 6$) dopo l'esposizione a 1-MA, i tempi dello stesso evento in acqua di mare senza calcio si aggirano intorno ai $70,7 \pm 3,2$ min ($n = 6$, $P < 0.01$). Analogamente, il secondo globulo polare è espulso dopo circa $127,0 \pm 1,8$ min in acqua di mare artificiale, e dopo 109 ± 1.4 min in acqua di mare senza calcio ($n = 4$, $P < 0,0001$). Così, nelle uova maturate in acqua di mare senza calcio e fecondate poi in acqua di mare artificiale dopo 5 min dal trasferimento, i due eventi di estrusione dei globuli polari erano accelerati rispettivamente di 10 e 15 minuti. In acqua di mare senza calcio, inoltre, i due globuli polari sembravano all'apparenza anche meno strettamente legati tra loro (Fig.

III, 4A, freccia). È interessante notare che gli zigoti risultanti mostravano un tasso di divisione cellulare nelle prime fasi dello sviluppo embrionale significativamente ridotto. Dopo 2 ore dalla fecondazione, si osservava una normale progressione della divisione cellulare nel 72,7% (n = 66) delle uova maturate in acqua di mare naturale, e nel 73,3% (n = 30) delle uova maturate in acqua di mare artificiale. Al contrario, nelle uova maturate in acqua di mare senza calcio solo il 42,1% della popolazione mostrava un normale sviluppo embrionale (n = 57). Tale anomalia che maggiormente si riscontrava nelle uova maturate in acqua di mare senza calcio era da imputarsi al fallimento della citochinesi (Fig. III, 4B, freccia) piuttosto che alla condizione di polispermia. Infatti, le uova maturate in acqua di mare senza calcio manifestano una forte tendenza alla monospermia al momento della fecondazione (20 su 20 uova), come dimostrato dal conteggio del numero degli spermatozoi incorporati nelle uova attraverso la colorazione con Hoechst 33342 (dati non mostrati). Complessivamente questi risultati suggeriscono che il cambiamento nell'omeostasi del Ca^{2+} e l'eliminazione dei picchi durante la maturazione meiotica sono espressione di sottili cambiamenti nella citologia cellulare che comportano una successiva alterazione nella tempistica dapprima degli eventi meiotici in corrispondenza della GVBD e poi mitotici durante lo sviluppo embrionale.

3.6. Gli inibitori dei canali del Ca^{2+} di tipo L riducono l'ampiezza dei picchi tardivi di Ca^{2+} , lasciando inalterata la loro frequenza.

L'assenza dei picchi tardivi di Ca^{2+} negli ovociti maturati in acqua di mare senza calcio lascia supporre che tale fenomeno coinvolga l'influsso dello ione dall'esterno della cellula. Per verificare questa possibilità, agli ovociti in maturazione sono stati somministrati inibitori specifici dei canali del calcio di tipo L, circa 8 minuti dopo l'esposizione iniziale ad 1-MA, cioè al termine del cosiddetto "periodo ormone-dipendente" (Nemoto, 1982) che costituisce il tempo minimo di somministrazione dell'ormone perché il processo di maturazione si completi. Dopo che gli ovociti avevano manifestato l'onda precoce indotta

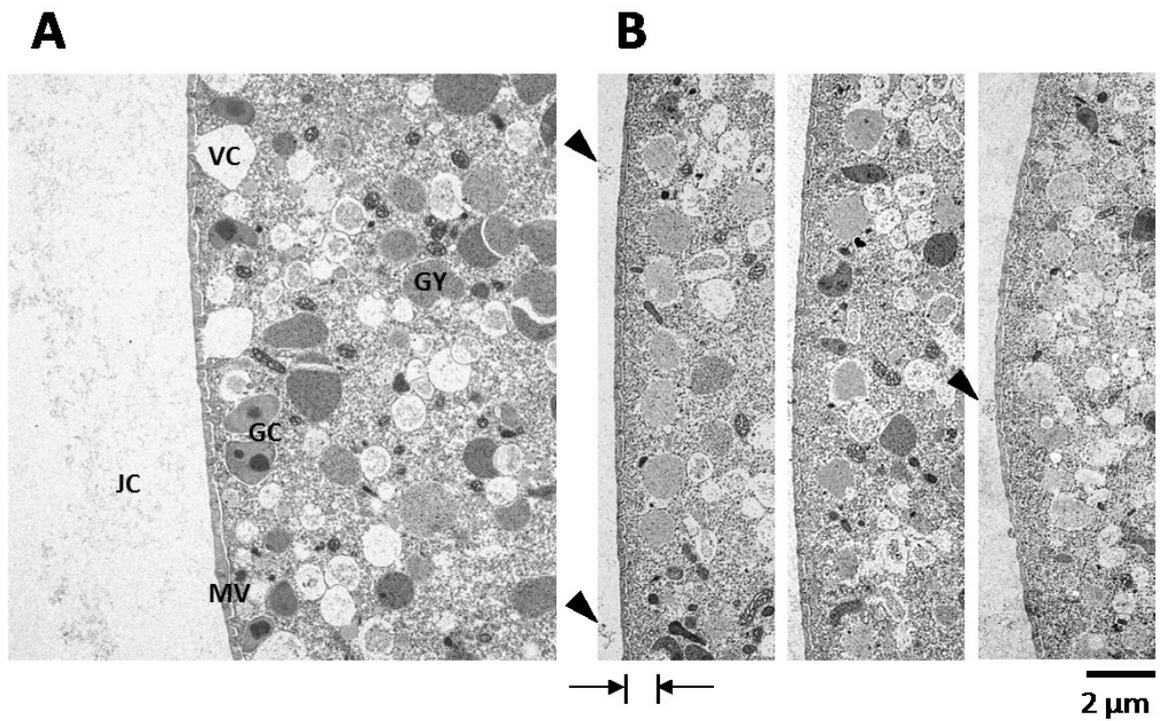
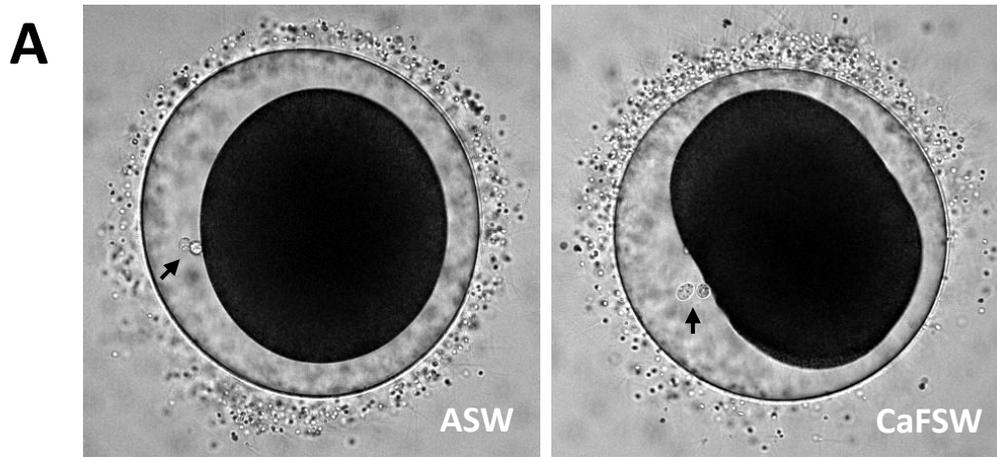


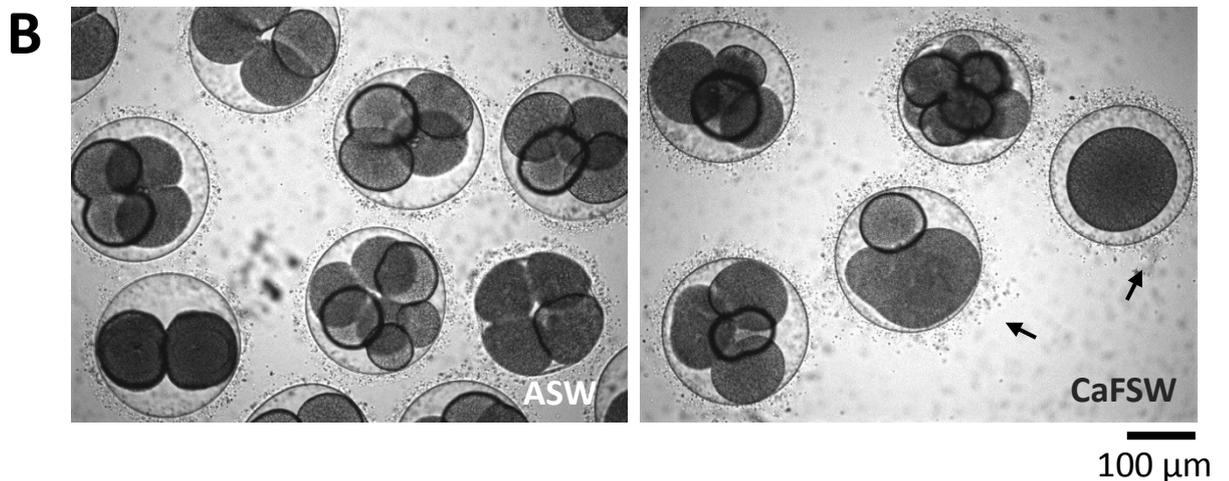
Figura III, 3. Gli oociti maturati in assenza di Ca^{2+} extracellulare mostrano sottili differenze strutturali nella zona corticale dopo 30 min dall'aggiunta dell'1-MA.

Gli oociti di *A. pectinifera* sono stati incubati con $1 \mu\text{M}$ 1-MA sia in ASW o CaFSW. (A, B) Immagini TEM degli oociti (aree corticali) fissati 30 minuti dopo l'aggiunta di 1-MA in ASW (A) o CaFSW (B). Abbreviazioni: JC (jelly coat), MV (microvilli), GC (granuli corticali), VC (vescicole chiare), GY (granuli di yolk). Negli oociti maturati in CaFSW, il jelly coat è stato in gran parte eliminato tranne che per alcuni piccoli residui (freccette). È anche interessante notare che questi ultimi presentavano una zona quasi sgombra di vescicole (circa $1 \mu\text{m}$ di profondità, contrassegnata dalle due frecce opposte) al di sotto della membrana plasmatica.



a

Tempo di espulsione dei globuli polari		
	1° gp	2° gp
ASW	77.5±2.1 min (n=6)	127.0±1.8 min (n=4)
CaFSW	70.7±3.2 min (n=6)	109±1.4 min (n=4)



b

Sviluppo embrionale degli zigoti monospermici dopo 2 ore		
	Sollevamento MF	Sviluppo normale
ASW	100%	73,3% (n=30)
CaFSW	100%	42,1% (n=57)

Figura III, 4. Gli ovociti maturati in CaFSW dimostrano differenze funzionali nel proseguimento della meiosi e dello sviluppo embrionale. Gli ovociti di *A.pectinifera* sono stati incubati con 1 μ M 1-MA sia in ASW o CaFSW. (A) Formazione dei globuli polari nello spazio perivitellino (freccie). Dopo essere state maturate in ASW o CaFSW per 50 minuti, le uova sono state trasferite in ASW e fecondate 5 minuti dopo. Le immagini sono state scattate rispettivamente 80 e 60 minuti dopo la fecondazione. (a) Media del tempo di espulsione dei globuli polari in ASW e CaFSW. (B) Embrioni (2h dopo la fecondazione) sviluppati dalle uova maturate rispettivamente in ASW o CaFSW. (b) Sommario del sollevamento della membrana di fecondazione e sullo sviluppo embrionale degli zigoti monospermici in ASW e CaFSW.

da 1-MA, ho aggiunto il verapamil o il diltiazem nel mezzo, entrambi ad una concentrazione finale di $100\mu\text{M}$ (Fig. III, 5, frecce blu), ed ho provveduto a conteggiare e confrontare il numero dei picchi di Ca^{2+} ivi ottenuti con quello degli ovociti di controllo, in cui avevo aggiunto unicamente il mezzo in cui erano disciolte le due sostanze, ossia acqua distillata. Ho quindi scoperto che né il verapamil né il diltiazem cambiavano il numero totale dei picchi in confronto a quello degli ovociti di controllo nell'ambito dei 45 minuti di maturazione: in acqua distillata, contavo una media di $7,6 \pm 8,6$ picchi ($N = 13$); in verapamil, $8,2 \pm 6,7$ picchi ($N = 12$); in diltiazem, $9,3 \pm 1,6$ picchi ($N = 8$), Test ANOVA, $P = 0,8529$). Tuttavia, quando ho esaminato l'incremento dei livelli di Ca^{2+} per ogni picco, è apparso evidente che sia il verapamil che il diltiazem sopprimevano significativamente l'ampiezza media dei picchi rispettivamente del 50 e 66%, rispetto agli ovociti di controllo (Fig. III, 5C). Questa profonda riduzione dell'ampiezza dei picchi tardivi di Ca^{2+} negli ovociti trattati con verapamil e diltiazem non è però imputabile ad una generale incapacità delle uova nell'aumentare i livelli di Ca^{2+} intracellulare, come dimostrato dall'analisi dell'ampiezza del picco dell'onda iniziale di Ca^{2+} all'1-MA nelle tre diverse condizioni sperimentali, che essendo indipendente dal Ca^{2+} esterno non ha mostrato differenze significative: in acqua distillata, $0,54 \pm 0,24$ RFU ($N = 13$, dove N indica il numero di ovociti esaminati); in verapamil, $0,64 \pm 0,11$ RFU ($N = 12$); in diltiazem, $0,62 \pm 0,14$ RFU ($n = 8$), $P = 0,3907$. Questi risultati suggeriscono che verapamil e diltiazem possono inibire le attività dei canali ionici responsabili della genesi dei picchi di Ca^{2+} durante la fase tardiva della maturazione meiotica senza inibire completamente la loro comparsa.

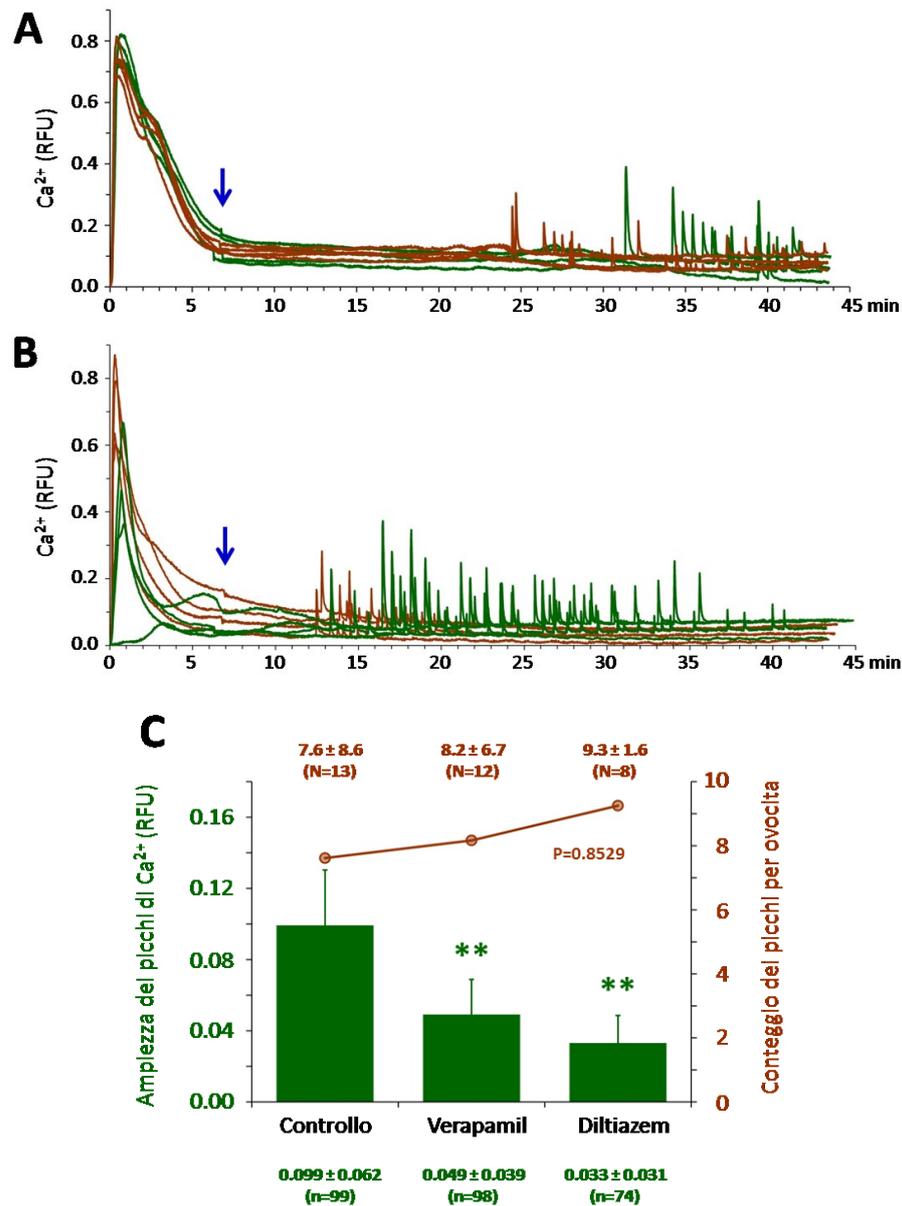


Figura III, 5. Inibitori dei canali del calcio di tipo L sopprimono l'ampiezza dei picchi tardivi di Ca²⁺, ma non la loro frequenza. Gli oociti di *A.pectinifera* sono stati microiniettati con il colorante del calcio, e incubati in acqua di mare naturale. Otto minuti dopo il trattamento con 1-MA, è stato aggiunto verapamil o diltiazem ad una concentrazione finale di 100 μ M (frecche blu) e acqua distillata nei controlli. I cambiamenti del livello di Ca²⁺ citosolico sono stati continuamente monitorati per valutare l'effetto del verapamil (A) e diltiazem (B) sui picchi tardivi (in corrispondenza della GVBD) di Ca²⁺ indotti da 1-MA. In entrambi i casi, i livelli di Ca²⁺ del controllo e degli esperimenti sono stati rappresentati rispettivamente con curve di colore verde e marrone. Il tempo immediatamente precedente al primo segnale Ca²⁺ rilevabile (circa 1 min dopo l'aggiunta di 1-MA) è contrassegnato come t = 0. (C) Quantificazione dei picchi di Ca²⁺ in termini di picchi totali durante il periodo di incubazione di 45 min (grafico linea marrone e numeri) e ampiezza del segnale Ca²⁺ per ogni picco (istogramma verde e numeri). La deviazione standard media \pm è indicata in prossimità dei dati nello stesso codice colore. 'N' tra parentesi si riferisce al numero di oociti testati, e 'n' al numero di picchi per ovocita. **Statisticamente significativa rispetto al controllo (P < 0,01 in test di Tukey HSD).

3.7. Cambiamenti nell'organizzazione dell'actina nella zona corticale degli ovociti influenzano significativamente l'ampiezza e la frequenza dei picchi tardivi di Ca^{2+} .

Durante la maturazione dell'ovocita, l'actina del citoscheletro va incontro ad estensivi cambiamenti soprattutto in prossimità della membrana plasmatica e dei microvilli (Schroeder, 1981; Lim et al., 2002). Poiché l'attività dei canali ionici è spesso modulata proprio dall'actina del citoscheletro (Cantiello et al., 1991; Furukawa et al., 1997; Nusco et al., 2006), mi sono chiesta se i picchi tardivi di Ca^{2+} in corrispondenza della GVBD potessero essere in qualche modo influenzati dallo stato di polimerizzazione dell'actina citoscheletrica a livello della zona corticale. A tal fine, gli ovociti in maturazione sono stati esposti ad agenti farmacologici che promuovono la depolimerizzazione (LAT-A) oppure la stabilizzazione (JAS) dei filamenti di actina. Come previsto, LAT-A e JAS inducevano rispettivamente una netta depolimerizzazione e iperpolimerizzazione dell'actina corticale al di sotto della membrana plasmatica a differenza degli ovociti controllo in cui si osservava un normale reticolo di filamenti (Fig. III, 6A). Quando la LAT-A è stata aggiunta nell'acqua di mare 8 min dopo l'esposizione ad 1-MA, ho constatato la sua forte capacità di bloccare significativamente i picchi tardivi in maniera dose-dipendente, come dimostrato dal conteggio del numero totale dei picchi nei 45 minuti di maturazione (Fig. 6B, grafico a linee in marrone, $P < 0,01$). D'altra parte, quando l'impalcatura strutturale dell'actina è stata alterata con il JAS, durante lo stesso periodo di maturazione i picchi non scomparivano, anzi il numero degli stessi risultava marginalmente aumentato (Fig. III, 6C, grafico lineare in marrone, $P = 0,5121$). Da ciò si deduce che la transizione meiotica degli ovociti verso uno stato che consente la genesi dei picchi di Ca^{2+} nel periodo di GVBD sembra richiedere come condizione necessaria la polimerizzazione dell'actina corticale. È interessante notare che, sebbene 1 μ M LAT-A avesse ampiamente diminuito il numero dei picchi tardivi di Ca^{2+} , l'ampiezza media dell'aumento di Ca^{2+} ad ogni picco era significativamente superiore rispetto a quella degli ovociti di controllo (Fig. III, 6B, istogramma in verde). Allo stesso modo, un simile trattamento degli ovociti in maturazione

con un agente dall'effetto opposto sull'actina corticale (1 μ M JAS) sopprimeva significativamente l'ampiezza dell'aumento di Ca^{2+} per ogni singolo picco considerato (Fig. III, 6C, istogramma in verde). Quindi in conclusione, l'ampiezza dei picchi tardivi di Ca^{2+} sembra essere sostanzialmente influenzata dallo stato di polimerizzazione dell'actina corticale del citoscheletro.

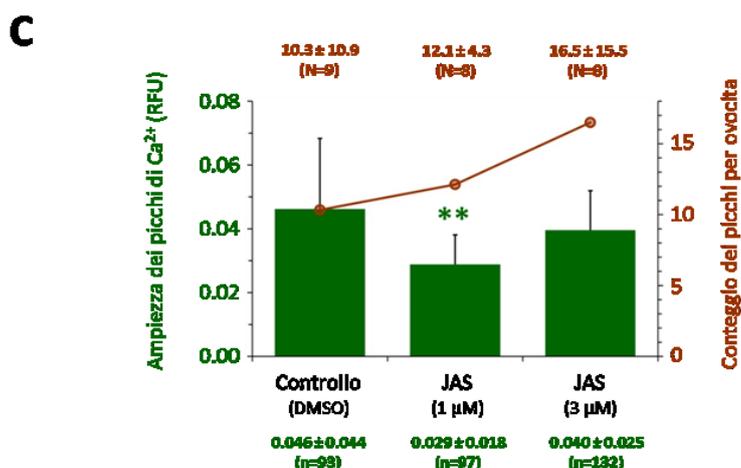
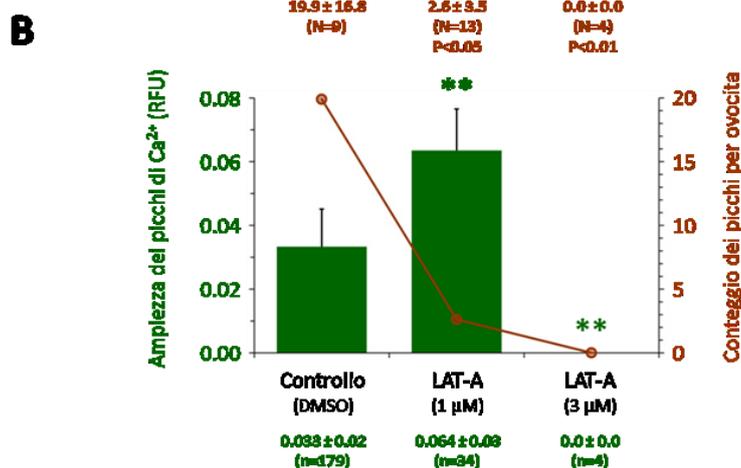
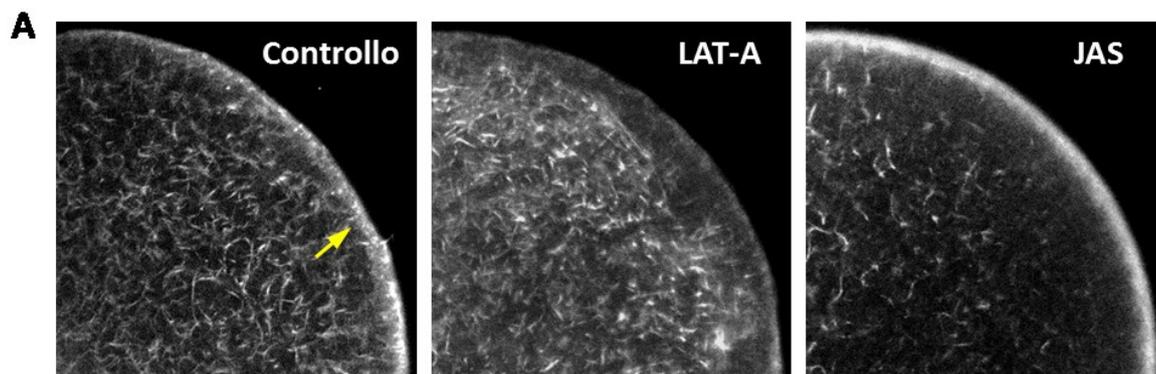


Figura 6. I cambiamenti dell'actina nella regione sottocorticale degli ovociti influenzano la frequenza e l'ampiezza dei picchi tardivi di Ca²⁺. (A) Effetti della Latrunculina A (LAT-A) e del jaspilakinolide (JAS) sui filamenti di actina in prossimità della membrana plasmatica (freccia). La F-actina è stata visualizzata in microscopia confocale utilizzando Alexa488-phalloidin precedentemente iniettata negli ovociti di *A.pectinifera* (50 μM in pipetta) prima dell'incubazione con LAT-A (3 μM), JAS (6 μM) o 0,05% DMSO (controllo) per 20 min. Dal confronto con il controllo, LAT-A induce una depolimerizzazione apprezzabile del reticolo di actina nei pressi della membrana plasmatica, mentre JAS induce iperpolimerizzazione. (B, C) Effetti di LAT-A (B) e JAS (C) sui picchi tardivi di Ca²⁺ in termini di numero di picchi totali durante il periodo di incubazione di 45 min (grafico linea marrone e numeri) e ampiezza del segnale Ca²⁺ per ogni picco (istogramma verde e numeri).

Discussione per il Capitolo III

I meccanismi di rilascio di Ca^{2+} intracellulare che si verifica negli ovociti stimolati a riprendere la maturazione meiotica non sono stati oggetto di studi approfonditi se paragonati a quelli sulle onde di Ca^{2+} della fecondazione. Dai miei esperimenti ho potuto accertare l'esistenza di due diverse tipologie di aumenti di Ca^{2+} che hanno luogo negli ovociti di *Asterina pectinifera* al momento della ripresa del ciclo meiotico. Il primo segnale di Ca^{2+} è rappresentato da una singola rapida onda che ha luogo appena pochi minuti dopo l'aggiunta di 1-MA, e il secondo da una risposta tardiva composta da un insieme di oscillazioni (picchi multipli di Ca^{2+}) in corrispondenza della dissoluzione dell'involucro nucleare. Sebbene fosse già noto che un breve aumento di Ca^{2+} è un evento che si accompagna alla mitosi, non era mai stato documentato un aumento di Ca^{2+} intracellulare all'atto della rottura delle membrane nucleari (GVBD). Per quanto riguarda la prima risposta di Ca^{2+} all'inizio della ripresa meiotica, mi preme porre l'attenzione su tre punti in particolare. In primo luogo, questa iniziale onda di Ca^{2+} origina sempre dall'emisfero vegetale nonostante sia stato dimostrato in precedenza che i recettori dell' InsP_3 sono più funzionali al polo animale (Lim et al., 2003; Kyojuka et al., 2008). In secondo luogo, questa risposta iniziale di Ca^{2+} negli ovociti di *Asterina pectinifera* è indipendente dalla concentrazione di Ca^{2+} esterna alla membrana plasmatica (Fig. 1A), come già suggerito in un'altra stella di mare, *Marthasterias glacialis* (Guerrier et al., 1978) a conferma che il Ca^{2+} visualizzato deve essere necessariamente mobilizzato dai compartimenti interni della cellula. Allo stesso modo la capacità degli ovociti di stella marina di riprendere e completare la maturazione meiotica in assenza di Ca^{2+} esterno conferma quanto già dimostrato per gli ovociti di topo e di *Xenopus* (Tombes et al., 1992; Sun e Machaca, 2004). Infine, il punto forse più interessante è che la prima onda di Ca^{2+} manifesta una straordinaria velocità di propagazione. Sulla scia delle precedenti osservazioni (Santella et al., 1998; Kyojuka et al., 2008), ho quantificato la velocità dell'onda di Ca^{2+} al momento della sua comparsa, che è cruciale per la ripresa meiotica. Come già accennato, ho scoperto

che questa onda negli ovociti in maturazione si propaga tre volte più velocemente (12,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$) rispetto all'onda di Ca^{2+} nelle uova fecondate (3,9 $\mu\text{m}/\text{sec}$). Ho inoltre potuto constatare che tale fenomeno non era limitato esclusivamente agli ovociti della specie giapponese *A. pectinifera*, poiché anche per gli ovociti della specie mediterranea, *Astropecten aranciacus*, le onde indotte dall'aggiunta di 1-MA nell'acqua di mare si propagano molto più velocemente ($11,7 \pm 4,7 \mu\text{m}/\text{sec}$, $n = 7$) rispetto alle rispettive onde Ca^{2+} nell'uovo maturo alla fecondazione ($2,8 \pm 0,37 \mu\text{m}/\text{sec}$, $n = 29$, $P < 0,0001$). In considerazione del fatto che gli ovociti di stella marina in fase GV sono molto meno sensibili delle uova mature all'azione dei secondi messaggeri che inducono il rilascio di Ca^{2+} come ad es. l'InsP₃ (Chiba et al., 1990; Lim et al., 2003) e NAADP (Santella et al., 2000), che un'onda di Ca^{2+} possa propagarsi ad una velocità così alta negli ovociti immaturi e meno sensibili all'azione degli agenti che rilasciano calcio, costituisce un fenomeno rilevante ma che non è prerogativa solo dei gameti di stella di mare. In *Xenopus*, l'InsP₃ può produrre un'onda di Ca^{2+} molto più veloce negli ovociti immaturi (23 $\mu\text{m}/\text{sec}$) che nelle uova mature (8 $\mu\text{m}/\text{sec}$), anche se l'ampiezza del picco raggiunto può essere inferiore (Machaca, 2004). Sono state formulate diverse ipotesi al fine di spiegare i cambiamenti nella velocità di propagazione delle onde in ovociti di *Xenopus*, tra cui quello basato sul raggruppamento dei recettori per l'InsP₃, ma il dibattito resta aperto (Ullah et al., 1993). Il meccanismo molecolare attraverso cui gli ovociti delle stelle marine riescano a promuovere un'onda veloce di Ca^{2+} intracellulare e poi a far sì che essa si propaghi ad una velocità così elevata è ancora lontano dall'essere decifrato. Una grande quantità di dati raccolti ha suggerito che la maturazione meiotica degli ovociti di stella marina è mediata dalle subunità $\beta\gamma$ delle proteine G presumibilmente associate al recettore dell'1-MA (Chiba et al., 1993; Jaffe et al., 1993), e che anche il segnale Ca^{2+} possa essere generato mediante l'attivazione di una fosfolipasi C regolata dalle proteine G e tramite la sintesi di InsP₃ per idrolisi del PIP₂ di membrana. A supporto di tale ipotesi, è stato dimostrato che l'onda di Ca^{2+} indotta da 1-MA risulta completamente abolita da un classico inibitore del recettore

per l'InsP₃, ossia l'eparina, e dall'U73122, un inibitore della PLC (Kyozyuka et al., 2008). In linea con il ruolo svolto dalle proteine G nell'indurre la ripresa meiotica, il GTPγS che è un attivatore delle G-proteine quando microiniettato, mima perfettamente l'azione dell'ormone 1-MA in quanto è in grado di generare una veloce onda di Ca²⁺ negli ovociti di *A. pectinifera*. Così come l'inibitore delle proteine G, il GDPβS, blocca il segnale Ca²⁺ indotto dall'ormone (Kyozyuka et al., 2009). Tuttavia, l'interpretazione di questi dati diviene più complessa se si pensa che tutti gli agenti sopra menzionati (eparina, U73122, e GDPβS) causano un'iperpolimerizzazione dell'actina corticale. Inoltre, il trattamento degli ovociti con jasplakinolide, che induce anch'esso un'iperpolarizzazione dell'actina corticale, inibisce il rilascio di Ca²⁺ indotto dall'1-MA (Kyozyuka et al., 2008; 2009). È interessante notare che sia il rilascio di Ca²⁺ indotto da 1-MA negli ovociti immaturi che quello stimolato dallo spermatozoo alla fecondazione delle uova dopo 1 ora di trattamento con 1-MA è particolarmente sensibile allo stato dinamico dell'actina corticale del citoscheletro, (Kyozyuka et al., 2008; Puppo et al., 2008). L'unica differenza fondamentale è tra le modalità con cui le onde di Ca²⁺ si propagano durante la ripresa meiotica e al momento della fecondazione, per non parlare della triplice differenza nella loro velocità planare. Allo stato attuale, non è possibile spiegare precisamente come l'onda di Ca²⁺ indotta da 1-MA sia in grado di viaggiare da un polo all'altro degli ovociti molto più velocemente rispetto all'onda generata dallo spermatozoo fecondante. Anche se appare plausibile escludere il contributo del calcio esterno nella modulazione del *pattern* dell'onda di Ca²⁺, perché il calcio da 1-MA aumenta anche in assenza di Ca²⁺ esterno, c'è da osservare che in tre esperimenti dedicati, le onde di Ca²⁺ indotte da 1-MA completano il loro percorso verso il polo animale entro 20.1 ± 6.9 sec (n = 17) in acqua di mare senza calcio, al contrario il tempo necessario affinché ciò avvenga in acqua di mare artificiale è di $26,3 \pm 11,2$ sec (n = 15, P = 0,0683). Poiché la velocità planare dell'onda di Ca²⁺ indotta da 1-MA è tre volte superiore rispetto a quella della fecondazione negli ovociti indipendentemente dallo stato di maturazione (vedi sopra), appare plausibile ipotizzare che

possano essere autocataliticamente trasmessi sotto forma di un'onda nella matrice intracellulare eccitabile degli ovociti seguendo percorsi separati. A questo proposito, è da notare che i recettori rianodinici sono principalmente localizzati subito al di sotto alla membrana plasmatica mentre i recettori dell'InsP₃ sono piuttosto ampiamente distribuiti negli ovociti e nelle uova degli echinodermi (McPherson et al., 1992; Iwasaki et al., 2002). A sostegno dell'idea che l'onda di Ca²⁺ indotta da 1-MA possa preferenzialmente viaggiare attraverso le regioni corticali, alcuni studi condotti su frazioni ovocitarie di stelle marine (in particolare *M. glacialis*) hanno mostrato che la frazione corticale della membrana plasmatica rispondeva ad 1-MA con un maggiore rilascio di Ca²⁺ rispetto alla frazione contenente il reticolo endoplasmatico ed i mitocondri (Dorée et al., 1978). Poiché la distruzione dei granuli corticali con A23187 non sembrava compromettere il rilascio di Ca²⁺ nella frazione composta dalla membrana plasmatica, rimane ancora da accertare l'identità del compartimento cellulare deputato al deposito di Ca²⁺ localizzato nella regione corticale e molto sensibile allo stato dell'actina del citoscheletro. La reciproca influenza esercitata tra i canali del calcio e l'actina del citoscheletro delle zone adiacenti ad essi potrà certamente essere un interessante oggetto di indagine futura. Così come sarà interessante identificare i meccanismi molecolari che regolano il segnale Ca²⁺ al momento della dissoluzione dell'involucro nucleare (Fig. III, 1A) che è stato da me evidenziato per la prima volta, e che ancora una volta risulta fortemente dipendente dallo stato dell'actina corticale del citoscheletro (Fig. III, 6).

Studi precedenti sulle proprietà elastiche delle cellule hanno dimostrato che la tensione superficiale degli ovociti di stelle di mare (*A. pectinifera*) diminuisce quasi ad una velocità lineare (0,25-0,3 dyn/cm² per minuto) dopo pochi minuti dall'aggiunta di 1-MA, e raggiunge il suo livello minimo al momento della dissoluzione della membrana nucleare (Nemoto et al., 1980). Questo è attribuito principalmente ai graduali cambiamenti strutturali dell'actina del citoscheletro nel cortex e nei microvilli degli ovociti di stelle marine in corso di maturazione (Schroeder e Stricker, 1983; Heil-Chapdelaine e Otto,

1996). La perdita di aree sulla superficie della membrana delle cellule a causa dell'accorciamento dei microvilli può portare alla rimozione selettiva dei canali del potassio (Moody e Bosma, 1985). Presumibilmente a causa di questo, il potenziale di membrana (da -70 a -90 mV) degli ovociti di stella marina (specie *A. aranciacus*) va incontro ad una progressiva depolarizzazione durante la maturazione alla velocità di 0.5 mV/min fino a quando non viene bruscamente dirottato verso un'altro stato stabile che va da -10 a -20 mV al momento della rottura dell'involucro nucleare, dopo una breve fase di impennata (Dale et al., 1979). Quindi, questo brusco cambiamento elettrico in corrispondenza della fase di dissoluzione della membrana nucleare rispecchia perfettamente i picchi tardivi di Ca^{2+} sopracitati. Infatti, ho osservato il verificarsi dei picchi tardivi di Ca^{2+} negli ovociti in maturazione di *A. aranciacus* durante la fase di rottura delle membrane nucleari ($40,5 \pm 18,9$ min dopo l'aggiunta di 1-MA, $n = 14$), anche se il numero medio dei picchi era molto minore (1,4 per ovocita) rispetto agli ovociti di *A. pectinifera*. Tali risultati suggeriscono che questa risposta tardiva di Ca^{2+} in questa determinata fase di maturazione non sia un fenomeno circoscritto esclusivamente ad una specie, ma è probabile che si realizzi negli ovociti in corso di maturazione di altre specie di stelle marine, e suggeriscono che tali picchi di Ca^{2+} possano essere in relazione con le variazioni del potenziale di membrana descritte in precedenza. In questo studio, ho dimostrato che questi aumenti di Ca^{2+} nel corso della maturazione ovocitaria sono dovuti ad un ingresso dello ione dal mezzo esterno, come dimostrato dalla loro eliminazione in acqua di mare senza calcio (Fig. III, 1A) e dall'inibizione operata da inibitori specifici dei canali del Ca^{2+} di tipo L (Fig. III, 5). È probabile che durante questa fase della maturazione, in cui molte modificazioni strutturali si verificano a livello del cortex delle cellule, sia necessario uno scambio con l'ambiente esterno per consentire, tramite l'apertura dei canali voltaggio dipendenti, l'ingresso di calcio dall'esterno che è visualizzato dalla comparsa dei picchi (Nusco et al., 2002).

Un aspetto notevole nel mio studio è stata la scoperta che i canali ionici responsabili di tali picchi di Ca^{2+} tardivi sono influenzati dall'actina del citoscheletro secondo due differenti modalità. In primo luogo, sembra che sia proprio l'actina del citoscheletro a determinare la frequenza dei picchi di Ca^{2+} . Quando gli ovociti sono stati esposti alla LAT-A, un agente che depolimerizza l'actina e previene la sua polimerizzazione, prima della fase di dissoluzione dell'involucro nucleare, nel corso dei 45 minuti di maturazione, il numero dei picchi era significativamente ridotto secondo uno schema dose-dipendente (Fig. III, 6B). In secondo luogo, nonostante la diminuzione del numero, l'ampiezza del segnale massimo misurata nei picchi rimasti era al contrario aumentata (Fig. III, 6B istogramma, barre verdi). Allo stesso modo, ma con una sottile differenza, i picchi tardivi di Ca^{2+} sono stati ridotti in numero e dell'ampiezza quando il nucleo è stato rimosso con aghi sottili prima dell'esposizione a 1-MA (Fig. III, 2A). Pertanto, si evince che la partecipazione di un fattore nucleare e la corretta regolazione dell'actina del citoscheletro sembrano essere necessari per la genesi dei picchi tardivi. Infatti, il fattore che promuove la maturazione (MPF) è attivato nel nucleo durante la maturazione (Kishimoto et al., 1981; Picard e Dorée, 1984), ed è noto che la cofilina, una proteina che regola l'organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro che è anche presente nel nucleo, è inattivata quando è fosforilata (Enserink e Kolodner, 2010). L'ampiezza dei singoli picchi di Ca^{2+} risulta essere incrementata con l'esposizione a LAT-A, ma significativamente abbassata con il JAS. Quindi, i due farmaci aventi effetti opposti sullo stato di polimerizzazione dell'actina corticale del citoscheletro (Fig. III, 6A) hanno dimostrato effetti coerentemente opposti sulle attività dei canali ionici. L'assunzione che questi risultati riflettano semplicemente l'indebolimento ed il rafforzamento della barriera di diffusione per gli ioni Ca^{2+} intorno all'apertura dei canali ionici oppure una modulazione più diretta delle attività dei canali ionici causata dai cambiamenti dell'actina del citoscheletro è ancora tutta da chiarire e necessita di ulteriori e più approfondite indagini. Al fine di utilizzare un modo quanto meno invasivo per chiarire il ruolo di questi picchi di Ca^{2+} , ho indotto la maturazione

meiotica degli ovociti in acqua di mare senza calcio. Con l'eliminazione specifica di questi eventi tardivi, gli ovociti maturano normalmente almeno in apparenza, con l'eccezione di fini cambiamenti strutturali nelle aree immediatamente al di sotto della membrana plasmatica (Fig. III, 3) e della tempistica del rilascio dei globuli polari (Fig. III, 4). Tuttavia, tali ovociti maturati in acqua di mare senza calcio ma fecondati e incubati in acqua di mare naturale, mostrano un aumento del tasso di fallimento nella divisione cellulare (Fig. III, 4B), suggerendo la possibilità che in questa fase di maturazione meiotica, l'influsso di Ca^{2+} dall'esterno possa avere un effetto importante sulla divisione cellulare. Tuttavia, una tale conclusione necessita di studi approfonditi. A tale proposito varrebbe la pena verificare se l'effetto dell'acqua di mare senza calcio sia dovuto all'inibizione dell'ingresso dello ione attraverso canali del calcio voltaggio-dipendenti di per sé oppure, da altri effetti collaterali dell'acqua di mare senza calcio. Inoltre, in considerazione del fatto che l'ingresso intracellulare di Ca^{2+} svolge un ruolo importante nelle prime fasi dello sviluppo embrionale (Yazaki et al., 2015), sarebbe interessante indagare se questi picchi tardivi di Ca^{2+} rappresentano semplicemente una manifestazione anticipata dell'attività dei canali ionici che saranno poi utilizzati in fasi di sviluppo successive o direttamente svolgono un ruolo più incisivo durante la progressione meiotica.

CAPITOLO IV

Le prime fasi del processo di fecondazione sono sensibili agli effetti delle molecole organiche che legano l'actina del citoscheletro

Risultati

4.1. Gli effetti dei farmaci leganti l'actina sull'organizzazione dinamica del citoscheletro nelle uova di riccio di mare.

Il laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato ha ampiamente dimostrato che l'actina del citoscheletro svolge un ruolo fondamentale nel modulare numerosi aspetti del rilascio di Ca^{2+} intracellulare sia nell'ovocita in maturazione, sia nelle uova mature che interagiscono con lo spermatozoo fecondante o iniettate con secondi messaggeri responsabili della mobilitazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Ciò è stato evidenziato più volte attraverso l'impiego di svariati approcci, come la microiniezione della *actin-binding protein* cofilina (Nusco et al., 2006), dell'anticorpo con funzione inibitoria per la depactina (Chun et al., 2013), degli inibitori per le proteine G (Kyojuka et al., 2009), o con il sequestro del PIP2 sulla membrana con il dominio PH della PLC- δ 1 (Chun et al., 2010), ognuno dei quali capace di provocare cambiamenti nell'organizzazione strutturale dell'actina in maniera diretta o indiretta. Tutti questi risultati, ottenuti nella stella di mare, sono avvalorati dall'evidenza diretta che anche i farmaci che legano l'actina, manifestano effetti simili sul segnale Ca^{2+} nelle uova di questa specie (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008), sottolineando ancora una volta il ruolo cruciale dell'actina del citoscheletro non solo nella regolazione del segnale Ca^{2+} , ma anche nell'esocitosi dei granuli corticali e nell'incorporazione spermatica nelle uova di stella di mare. Al fine di comprendere se il ruolo regolatorio della F-actina sia svolto unicamente in questa specie o sia esteso anche alle uova di altri echinodermi, ho investigato il ruolo dell'actina del citoscheletro alla fecondazione anche del riccio di mare *P. lividus*. Siccome l'actina del citoscheletro è una

struttura dinamica sottoposta a continui cambiamenti anche in un uovo quiescente, ci si aspetta che i farmaci che si legano specificamente all'actina causino cambiamenti strutturali al citoscheletro interferendo con il naturale fenomeno di *treadmilling*. Per dimostrare innanzitutto l'efficacia di sostanze chimiche che, in maniera specifica, si legano all'actina alterandone la struttura e per verificare i loro effetti sulla struttura del citoscheletro nelle uova di riccio di mare, ho microiniettato le singole uova con una piccola quantità di falloidina AlexaFluor568 che di per sé non interferisce con il processo della fecondazione. Cinque minuti più tardi, le uova sono state trattate con quattro diverse sostanze chimiche che legano l'actina o incubate, come controllo, soltanto con i corrispettivi mezzi in cui erano disciolte. Ho monitorato i cambiamenti strutturali del citoscheletro nelle uova *in vivo* mediante microscopia confocale ad intervalli di cinque minuti. Come mostrato in Fig. IV, 1A, le uova di controllo trattate con 0,4% DMSO mantengono il reticolo di actina corticale formato da una moltitudine di filamenti fluorescenti nel citoplasma per un periodo di 20 min. Nelle uova trattate con 2 μ M Citocalasina B (CYT-B), invece i filamenti di actina hanno cominciato a scomparire dopo 5 minuti dal trattamento ed erano scarsamente visibili nel citoplasma dopo 15 minuti. Allo stesso modo, le uova trattate con 3 μ M LAT-A manifestano una riduzione nella colorazione dei filamenti di actina dopo 5 minuti, ma alcuni di essi sono ancora visibili nel citoplasma dopo 20 minuti. Inoltre in queste uova l'actina del citoscheletro sembrava essere modificata globalmente, a giudicare dalla perdita della forma perfettamente sferica delle cellule intorno ai 5 minuti, riflesso di un sostanziale cambiamento nella rigidità cellulare. Al contrario della CYT-B e LAT-A che tendono a promuovere una netta depolimerizzazione dei filamenti di actina, gli altri due farmaci noti per stabilizzare tali filamenti, consolidano fortemente la struttura del reticolo di actina in prossimità della membrana plasmatica. Nelle uova esposte a 12 μ M jasplakinolide (JAS), lo strato corticale dei filamenti di actina è diventato visibilmente più spesso dopo 5 minuti (Fig. IV, 1A, freccia). Allo stesso modo, le uova microiniettate con 1 mM falloidina (PHAL)

manifestano un'intensa iperpolimerizzazione dell'actina nella regione immediatamente al di sotto del cortex dopo 5 min dalla microiniezione (Fig. IV, 1B, freccia), con una concomitante depolimerizzazione nella parte interna del citoplasma. Così, tutte e quattro le sostanze chimiche che agiscono sull'actina a determinate dosi causano cambiamenti strutturali apprezzabili dell'actina citoscheletrica in specifiche regioni cellulari.

4.2. Gli effetti della CYT-B e della LAT-A sull'aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle uova di riccio di mare alla fecondazione.

Ho poi esaminato in che misura la fecondazione potesse essere influenzata da due sostanze chimiche che si legano in maniera specifica all'actina promuovendone una netta depolimerizzazione. Innanzitutto ho indagato sui loro effetti nel rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione. Come mostrato in Fig. IV, 2 e 3, CYT-B e LAT-A inducono effetti estremamente simili sotto molti aspetti. L'elemento più evidentemente alterato della risposta Ca^{2+} nella uova pretrattate con CYT-B (2 μ M, 10 min) era che l'intervallo di tempo tra la genesi del flash corticale e la rilevazione del primo aumento di Ca^{2+} in corrispondenza del sito di interazione con lo spermatozoo, definito come "periodo di latenza", risultava distintamente aumentato ($12,3 \pm 4,9$ sec, $n = 47$) in confronto a quello delle uova di controllo ($7,8 \pm 3,3$ sec, $n = 36$; $P < 0.0001$), anche se l'ampiezza dello stesso flash corticale rimaneva praticamente invariata: $111.0 \pm 30.8\%$ nelle uova pretrattate con CYT-B contro $100,0 \pm 19,4\%$ nelle uova di controllo trattate con 0,1% DMSO, $P = 0,2223$ (Fig. IV, 2). Allo stesso tempo, il periodo di latenza nelle uova pretrattate con LAT-A (100 nM, 15 min) era anche significativamente aumentato ($9,1 \pm 2,6$ sec, $n = 18$) rispetto al controllo ($7,4 \pm 2,5$ sec, $n = 22$; $P < 0.01$). L'ampiezza del flash corticale di queste uova manifestava un'elevata variabilità, ma non era significativamente diversa da quella del controllo ($90,9 \pm 56,0\%$ contro $100,0 \pm 22,2\%$; $P = 0,4400$) (Fig. IV, 3). D'altra parte, l'ampiezza del picco dell'aumento globale di Ca^{2+} era significativamente diminuita in entrambi i casi. Il picco di Ca^{2+} raggiunto nelle uova pretrattate con CYT-B era $90,8 \pm$

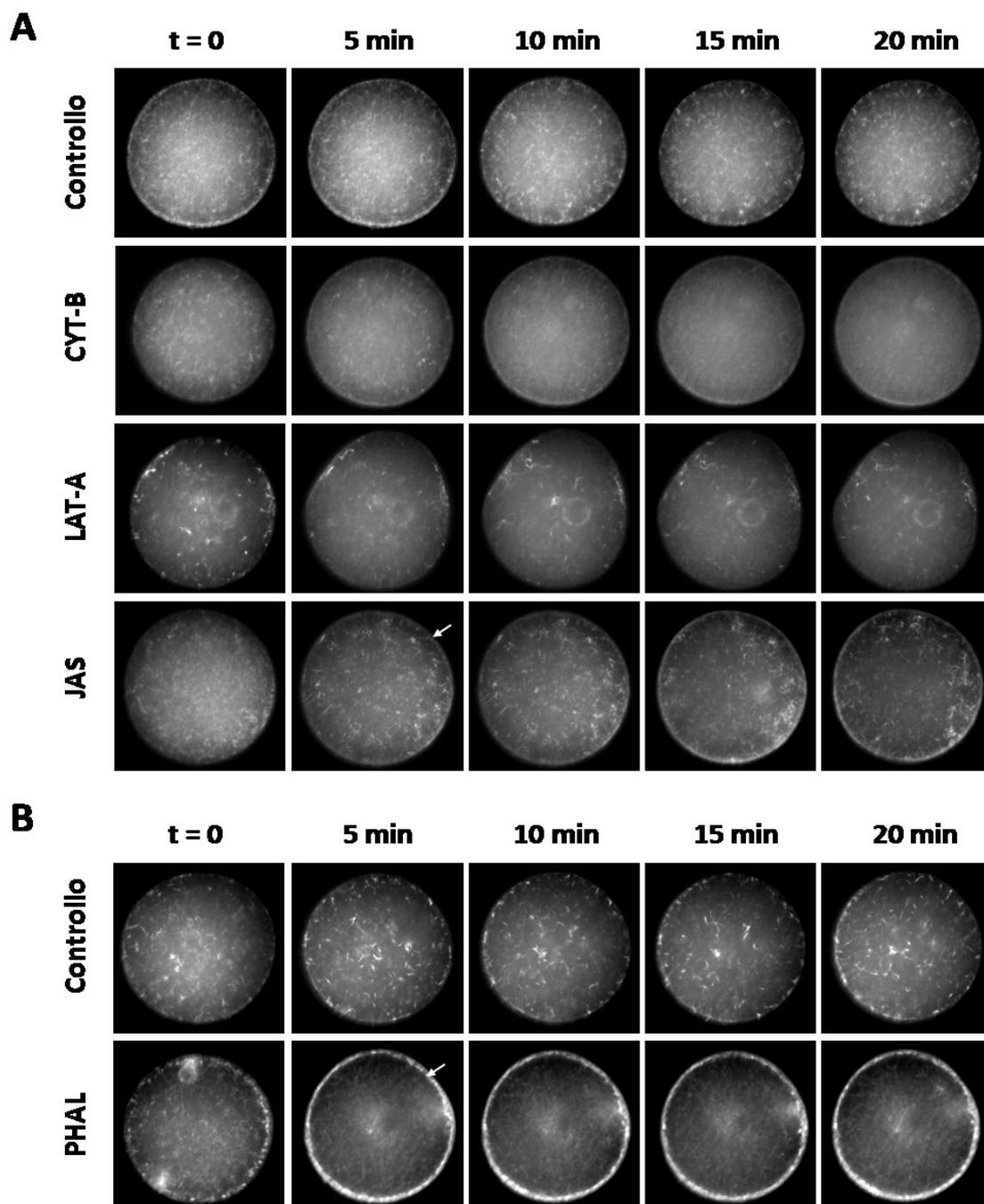


Figura IV, 1. Alterazione dell'actina del citoscheletro nelle uova di riccio di mare trattate con sostanze chimiche che si legano all'actina. Le uova di *P. lividus*, microiniettate con falloidina-Alexa Fluor568 (10 μ M nella pipetta), sono state trattate con 4 diverse sostanze chimiche che agiscono sulla struttura dell'actina. (A) Le uova iniettate sono state incubate in acqua di mare contenente 0,4% DMSO (controllo) o: CYT-B (2 μ M), LAT-A (3 μ M), e JAS (12 μ M). Per ogni trattamento, il momento immediatamente prima dell'aggiunta del farmaco è indicato come t = 0, e le immagini della visualizzazione dell'actina nei successivi intervalli di tempo sono state scattate al microscopio confocale in corrispondenza del piano equatoriale delle uova. (B) Essendo incapace di attraversare la membrana, la PHAL, (1 mM nella pipetta) è stata somministrata tramite una seconda microiniezione dopo 10 min di recupero, mentre le uova di controllo sono state microiniettate con DMSO. Le frecce indicano lo strato corticale dove l'actina è stata prontamente iperpolimerizzata dopo il trattamento.

22,0% (n = 47, P < 0.05) rispetto al controllo (100,0 ± 11,4%, n = 36), e il picco di Ca²⁺ nelle uova pretrattate con LAT-A era semplicemente 74,1 ± 14,8% (n = 18, P < 0,0001) rispetto alle uova di controllo (100,0 ± 14,6%, n = 22). Un'altra notevole osservazione sulle uova pretrattate con LAT-A era che l'onda di Ca²⁺, che si origina nel punto di interazione con lo spermatozoo, non è riuscita a propagarsi fino al polo opposto del 72,2% dei casi (n = 18), mentre nelle uova controllo si realizzava sempre una completa propagazione (n = 22). Le uova pretrattate con LAT-A manifestavano spesso *patterns* irregolari di rilascio di Ca²⁺ che iniziava in siti multipli ma che si esaurivano prima di riuscire a svilupparsi come un'onda coordinata (Fig. IV, 3, frecce rosse). In aggiunta a questi aumenti di Ca²⁺ localizzati e aberranti, quando le uova pretrattate con LAT-A venivano fecondate presentavano picchi multipli per una durata temporale maggiore, che di solito avevano origine in diverse aree della superficie della cellula che si sviluppavano talvolta come un'onda parziale (Fig. IV, 3, curve in grassetto). In misura minore, le onde di Ca²⁺ nelle uova pretrattate con CYT-B riuscivano a raggiungere il polo opposto nel 23,4% dei casi (n = 47). È interessante notare che, anche nel caso in cui l'onda di Ca²⁺ riusciva a propagarsi con successo nelle uova pretrattate con CYT-B, il lasso di tempo tra il primo aumento di Ca²⁺ e l'ultimo rilevabile all'antipode (definito come "tempo di traversata") era significativamente aumentato (22,3 ± 4,4 sec, n = 36) rispetto a quello della uova controllo (17,8 ± 3,1 sec, n = 35; P < 0,0001). Di conseguenza, la velocità planare dell'onda di Ca²⁺ era significativamente ridotta nelle uova pretrattate con CYTB (circa 3,6 μm/sec, rispetto a 4,5 μm/sec nel controllo). Seppure in minor misura, anche il tempo di traversata dell'onda di Ca²⁺ nelle uova pretrattate con LAT-A risultava aumentato (20,0 ± 5,3 sec, n = 5), ma la sua differenza dai valori nel controllo (18,2 ± 2,2 sec, n = 22) non ha raggiunto significatività statistica. Nel complesso, le uova pretrattate con CYT-B o LAT-A condividono somiglianze significative in quasi tutti gli aspetti del rilascio di Ca²⁺ alla fecondazione (Fig. IV, 2 e 3) in accordo con i loro effetti comparabili sulla struttura dell'actina del citoscheletro (Fig. IV, 1).

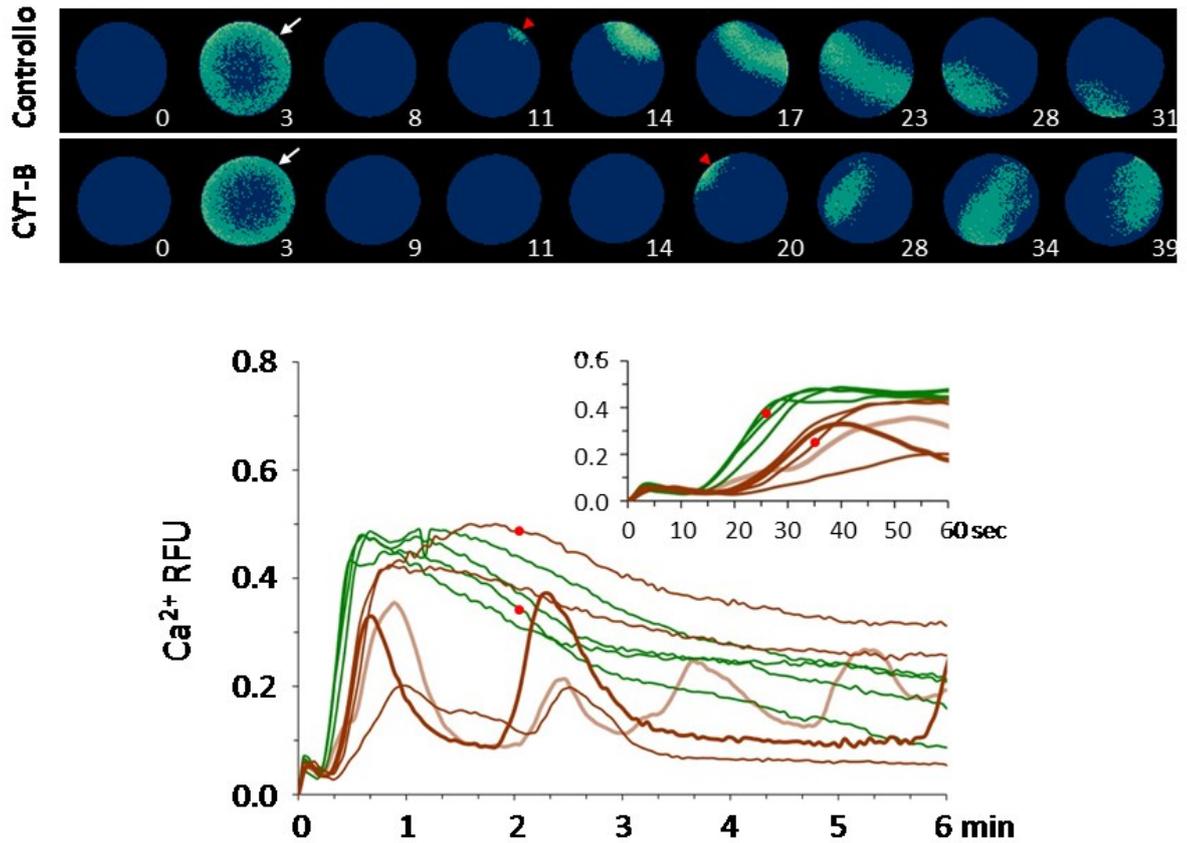


Figura IV, 2. Effetti della CYT-B sull'aumento di Ca^{2+} intracellulare delle uova di riccio di mare alla fecondazione. Le uova di *P. lividus* sono state microiniettate con coloranti per il calcio e incubate in acqua di mare contenente 2 μM CYT-B o 0,1% DMSO (controllo). Dieci minuti più tardi, le uova sono state accuratamente sciacquate e fecondate in acqua di mare fresca. I cambiamenti del livello intracellulare di Ca^{2+} sono stati monitorati dopo l'aggiunta degli spermatozoi nel controllo (curve di colore verde) e nelle uova pretrattate con CYT-B (curve di colore marrone). Le immagini di fluorescenza relativa in pseudo-colori in alto rappresentano i siti degli aumenti momentanei di Ca^{2+} nei tempi chiave (i numeri si riferiscono ai "secondi" dopo $t = 0$), e le curve di Ca^{2+} nel grafico tracciano i cambiamenti globali dei livelli dello ione in riferimento a quelli basali. In questa e nelle figure successive, il lasso di tempo immediatamente precedente al primo segnale Ca^{2+} rilevabile è stato impostato come tempo zero ($t = 0$). Qui di seguito i risultati di uno di cinque esperimenti indipendenti. Per facilitare la distinzione visiva, le due curve di Ca^{2+} che mostrano schemi ripetitivi sono stati evidenziate in grassetto con sfumature diverse. Nel riquadro, la stessa curva rappresentata su una scala temporale diversa per descrivere il cambiamento di Ca^{2+} iniziale. Il flash corticale e gli spot di Ca^{2+} iniziali nei presunti siti di contatto con lo spermatozoo sono stati contrassegnati rispettivamente dalle frecce e da punte di freccia. Le curve delle uova le cui onde di Ca^{2+} sono rappresentate nel pannello sono state evidenziate con piccoli cerchi rossi.

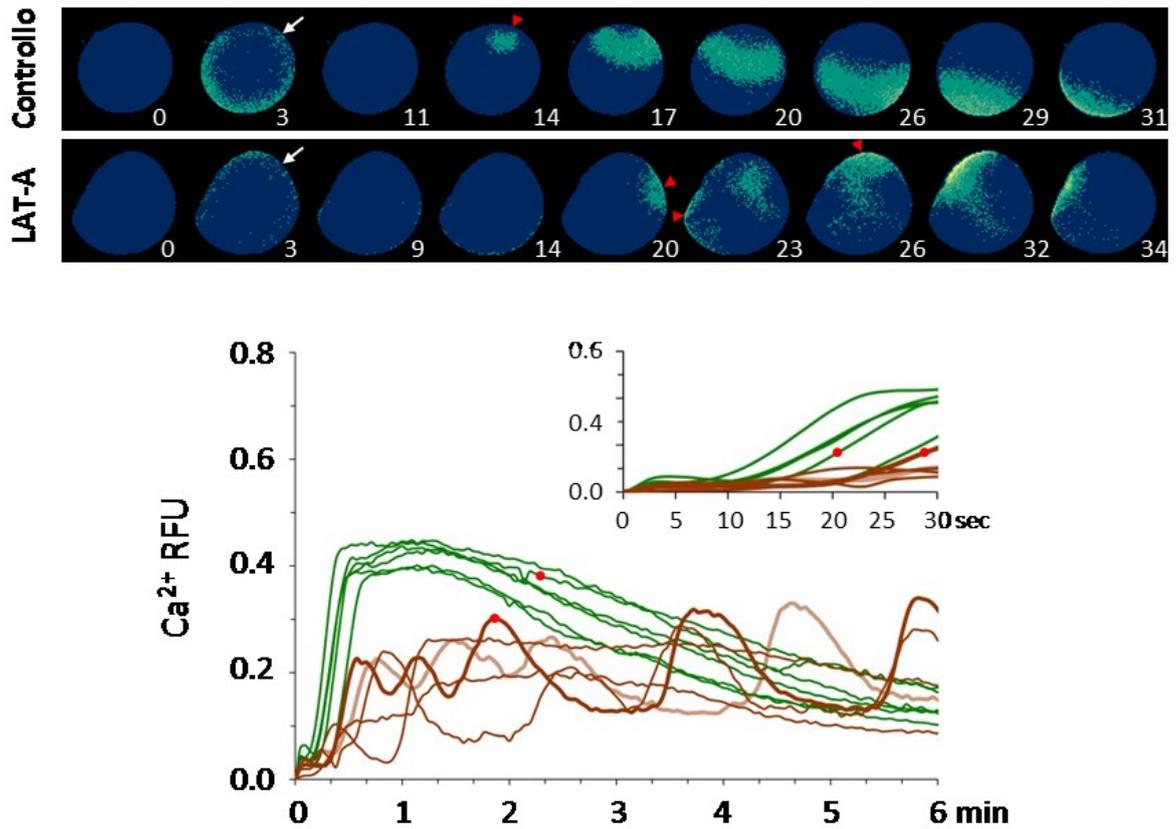


Figura IV, 3. Effetti della LAT-A sull'aumento di Ca^{2+} intracellulare delle uova di riccio di mare alla fecondazione. Qui di seguito sono stati presentati i dati provenienti da un lotto rappresentativo di uova nell'ambito di tre esperimenti indipendenti e sono mostrati i risultati di un esperimento comparabile a quello presentato nella figura precedente, ma con pretrattamento di 15 min con 100 nM LAT-A o 0,1% DMSO (controllo). Dieci minuti dopo, le uova sono state accuratamente sciacquate e fecondate in acqua di mare fresca. I cambiamenti del livello intracellulare di Ca^{2+} sono stati monitorati dopo l'aggiunta degli spermatozoi nel controllo (curve di colore verde) e nelle uova pretrattate con LAT-A (curve di colore marrone) e presentati con immagini di fluorescenza relativa in pseudocolori e con curve di Ca^{2+} , come descritto nella legenda della figura IV, 2.

4.3. Gli effetti del JAS e della PHAL sull'aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle uova di riccio di mare alla fecondazione.

Ho anche esaminato in che modo la fecondazione delle uova di riccio di mare potesse risentire dell'esposizione all'altra classe di sostanze chimiche, JAS e PHAL, che legandosi all'actina del citoscheletro, inducono la stabilizzazione dei filamenti di actina nelle aree corticali immediatamente sotto la membrana plasmatica (Fig. IV, 1). A differenza di quanto osservato con CYT-B e LAT-A, le uova pretrattate con JAS (12 μM , 20 min) o microiniettate con 1 mM PHAL (20 min di incubazione) non evidenziano alcuna differenza significativa rispetto alle uova di controllo in termini di periodo di latenza. Le uova pretrattate con JAS esibiscono una media di 8.8 ± 4.0 sec ($n = 24$), molto simile a $8,1 \pm 1,7$ sec delle uova di controllo esposte a 0,4% DMSO ($n = 22$, $p = 0,2485$). Anche le uova iniettate con PHAL si aggirano intorno ai 7.5 ± 2.4 sec ($n = 29$), un valore non molto diverso dai 7.0 ± 1.3 s riscontrato nelle uova controllo iniettate con DMSO ($n = 24$, $P = 0,3975$) (Fig. IV, 4 e 5). Tuttavia, queste due sostanze provocano effetti significativi sul flash corticale, sebbene in modo del tutto opposto. Infatti, mentre il JAS riduceva leggermente l'ampiezza del flash corticale ($82,9 \pm 22,3\%$ vs. $100 \pm 22,5\%$ del controllo, $P < 0,05$), la PHAL la incrementava fortemente ($162,7 \pm 100,3\%$ contro $100 \pm 27,6\%$ del controllo, $P < 0,01$). Per quanto riguarda l'aumento globale di Ca^{2+} alla fecondazione, il pretrattamento delle uova di riccio di mare con il JAS non ha prodotto una differenza significativa in termini di ampiezza del picco raggiunto, misurando $90,6 \pm 23,8\%$ rispetto al controllo ($100 \pm 19,4\%$, $P = 0,2142$) (Fig. IV, 4). In contrasto con questi risultati, il picco di Ca^{2+} nelle uova preiniettate con 1 mM PHAL ($n = 30$) ha mostrato un forte aumento: $140,6 \pm 59,3\%$ rispetto al controllo, $100,0 \pm 13,3\%$ ($n = 26$, $P < 0,01$) (Fig. IV, 5). Nonostante queste differenze sottili, tuttavia, il pretrattamento delle uova di riccio di mare con JAS o PHAL generava effetti sorprendentemente simili nella fase di decadimento del segnale Ca^{2+} . Mentre il segnale Ca^{2+} in tutte le uova controllo trattate con DMSO continuava a diminuire dopo il picco (Fig. IV, 4 e 5, curve di colore verde), la diminuzione

del segnale Ca^{2+} nelle uova trattate con JAS e PHAL apparentemente si arrestava rispettivamente dopo circa 5 e 3 minuti, (Fig. IV, 4 e 5, curve di colore marrone). Come risultato, i livelli di Ca^{2+} in queste uova raggiungevano un plateau, mantenendosi significativamente più elevati rispetto ai livelli delle uova di controllo corrispondenti. Per quantificare questo dato, ho estrapolato i due tratti lineari nella fase di caduta delle curve prima e dopo il brusco cambiamento di direzione all'inizio del plateau, ottenendo così il livello di Ca^{2+} nel punto di incontro delle due rette e normalizzando poi con l'ampiezza del picco di Ca^{2+} . Il valore del plateau così definito era significativamente più alto nelle uova pretrattate con JAS ($0,406 \pm 0,086$, $n = 17$) rispetto alle uova controllo ($0,175 \pm 0,039$, $n = 22$; $P < 0,0001$), così come nelle uova preiniettate con PHAL ($0,455 \pm 0,089$, $n = 30$) in confronto alle rispettive uova di controllo ($0,231 \pm 0,102$, $n = 26$; $P < 0,0001$). Quindi, sembra che gli ioni Ca^{2+} mobilizzati alla fecondazione siano riassorbiti dal citosol con meno efficienza o capacità nelle uova pretrattate con sostanze chimiche che inducono l'iperpolimerizzazione dell'actina nelle regioni corticali e al di sotto della membrana plasmatica.

4.4. Gli effetti di sostanze chimiche che specificamente si legano all'actina sul sollevamento della membrana di fecondazione e sull'incorporazione spermatica.

In normali condizioni sperimentali, la fecondazione delle uova di *P. lividus* manifesta quasi sempre una condizione di monospermia (Just, 1939) ed il pieno sollevamento della membrana di fecondazione, quest'ultima causata dall'esocitosi dei granuli corticali. Ho testato quindi se il sollevamento della membrana di fecondazione e l'ingresso dello spermatozoo potessero essere in qualche modo influenzati dalle sostanze chimiche che modificano la struttura dell'actina in maniera dose-dipendente. A tal fine, ho lavato abbondantemente le uova di *P. lividus* pretrattate con concentrazioni crescenti delle suddette sostanze e le ho fecondate con spermatozoi colorati con Hoechst 33342. Ho poi contato per ogni uovo il numero di spermatozoi incorporati (Fig. IV, 6 e 7), e la frequenza

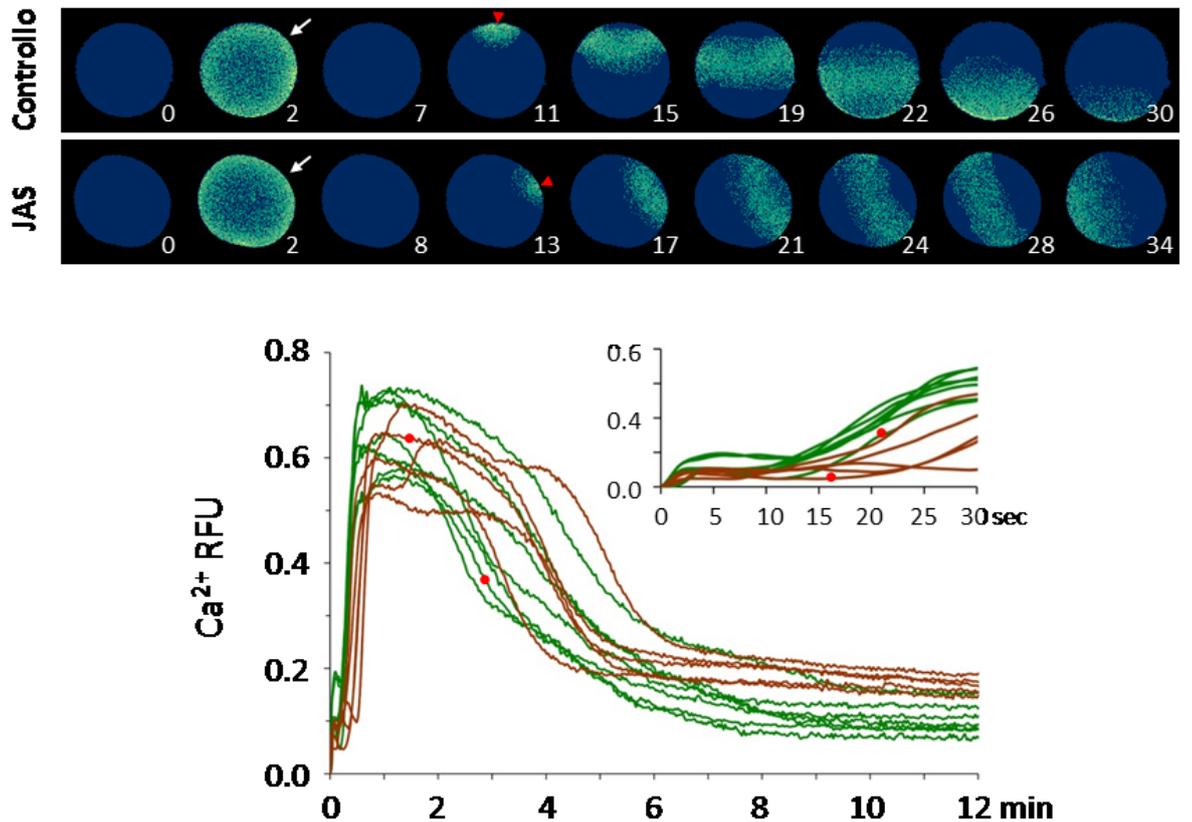


Figura IV, 4. Effetti del JAS sull'aumento di Ca^{2+} intracellulare delle uova di riccio di mare alla fecondazione. Le uova di *P. lividus* sono state microiniettate con coloranti per il calcio e incubate in acqua di mare contenente 12 μM JAS o 0,4% DMSO (controllo). Venti minuti più tardi, le uova sono state abbondantemente risciacquate in acqua di mare fresca e sono stati aggiunti gli spermatozoi. I cambiamenti del livello intracellulare di Ca^{2+} sono stati monitorati dopo l'aggiunta degli spermatozoi nel controllo (curve di colore verde) e nelle uova pretrattate con JAS (curve di colore marrone), e presentati con immagini di fluorescenza relativa in pseudo-colori e con curve di Ca^{2+} , come descritto nella legenda della Fig. IV, 2. Qui di seguito i risultati di uno di tre esperimenti indipendenti.

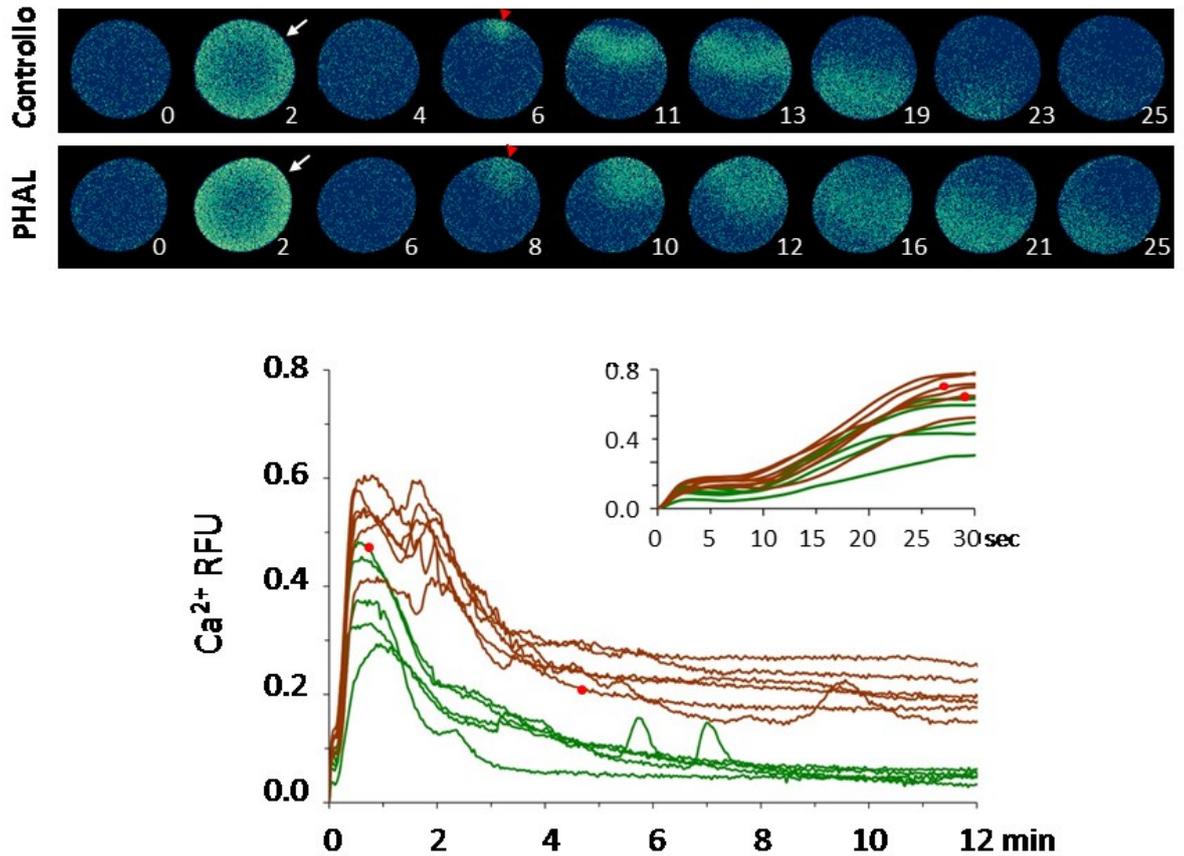


Figura IV, 5. Effetti della PHAL sull'aumento di Ca^{2+} intracellulare delle uova di riccio di mare alla fecondazione. Le uova di *P. lividus* sono state microiniettate con coloranti per il calcio miscelato con 1 mM PHAL (concentrazione nella pipetta) o DMSO (controllo). Dopo 20 minuti di incubazione, le uova sono state fecondate, e la risposta è stata monitorata e presentata come descritto nella legenda della Fig. IV, 2. Le curve di Ca^{2+} nel controllo e nelle uova microiniettate con PHAL sono rappresentate rispettivamente con curve di colore verde e marrone. Qui di seguito i risultati di uno di quattro esperimenti indipendenti.

delle uova che manifestavano un completo sollevamento della membrana di fecondazione per ciascuna dose della sostanza chimica utilizzata, ottenuta dalla media dei risultati di 4-6 esperimenti indipendenti ognuno eseguito su 20-40 uova. Come mostrato in figura IV, 7 (punti e linee di colore marrone), la percentuale media delle uova con un completo sollevamento calava progressivamente con dosi crescenti delle quattro sostanze che si legano all'actina modificandone la sua organizzazione strutturale. In parallelo, anche il numero degli spermatozoi incorporati nelle uova diminuiva (Fig. IV, 7, barre di colore verde), suggerendo che le quattro sostanze somministrate alle uova prima della fecondazione, generalmente inibivano l'ingresso degli spermatozoi. Tuttavia, ho notato che una dose più bassa di CYT-B ($0,4 \mu\text{M}$, 10 min) al contrario aumentava il numero di spermatozoi incorporati dalle uova ($1,2 \pm 0,51$ per uovo, $n = 60$) in confronto alle uova di controllo ($1,03 \pm 0,18$ per uovo, $n = 87$; $P < 0.01$). Questo piccolo ma significativo aumento della polispermia nelle uova pretrattate con CYT-B non poteva però essere attribuito ad un sollevamento incompleto o aberrante della membrana di fecondazione, poiché tutte le uova polispermiche (9 su 60), avevano incorporato un numero variabile di 2-3 spermatozoi, nonostante la membrana di fecondazione fosse completamente e perfettamente sollevata (Fig. IV, 6, notare i tre spermatozoi internalizzati in un uovo pretrattato con CYT-B). Viceversa, tutte le uova che esibivano un sollevamento incompleto della membrana di fecondazione (14 su 60) erano monospermiche. Sorprendentemente ho riscontrato una simile tendenza all'aumento della polispermia con una dose bassa anche nelle uova microiniettate con PHAL ($3 \mu\text{M}$, la concentrazione stimata nel citoplasma), che presentavano 1.31 ± 1.27 spermatozoi per uovo ($n = 80$, $P < 0,05$) rispetto a 1.01 ± 0.11 ($n = 80$) delle uova di controllo microiniettate con DMSO (Fig. IV, 7, PHAL). È interessante sottolineare che la PHAL è stata microiniettata direttamente nel citoplasma delle uova a differenza degli altri tre farmaci, che sono stati somministrati mediante una semplice incubazione, e che la microiniezione del solo veicolo (DMSO) in cui era disciolta la PHAL già riduceva significativamente la frequenza delle uova con un

completo sollevamento della membrana di fecondazione ($80,0 \pm 24,8\%$, $N = 4$). Ciò nonostante, solo 1 su 80 uova microiniettate con DMSO aveva incorporato più spermatozoi, suggerendo che la presenza o l'assenza di un completo sollevamento della membrana di fecondazione non è il fattore determinante la polispermia nelle uova di riccio di mare. Nonostante la mancanza della barriera meccanica e un'apparente aderenza degli spermatozoi alla superficie esterna (Fig. IV, 6), le uova pretrattate con le dosi più alte dei quattro farmaci sono state in grado di incorporare più spermatozoi solo blandamente, a giudicare dalla drastica riduzione della media del numero di spermatozoi incorporati nelle uova pretrattate con CYT-B ($0,05 \pm 0,22$, $n = 60$), LAT-A ($0,11 \pm 0,34$, $n = 120$), JAS ($0,0 \pm 0,0$, $n = 60$), e PHAL ($0,013 \pm 0,11$, $n = 80$) rispetto alle corrispondenti uova di controllo ($P < 0.0001$ in tutti i casi) (Fig. IV, 7). Tutti questi risultati insieme indicano che le sostanze che modificano l'actina utilizzate in questo studio provocano degli effetti che sono dose-dipendenti sull'incorporazione degli spermatozoi. In particolare, a dosi più elevate, tutte le sostanze inibiscono il meccanismo di incorporazione degli spermatozoi nelle uova; ma a basse concentrazioni CYT-B e PHAL aumentano il tasso di polispermia.

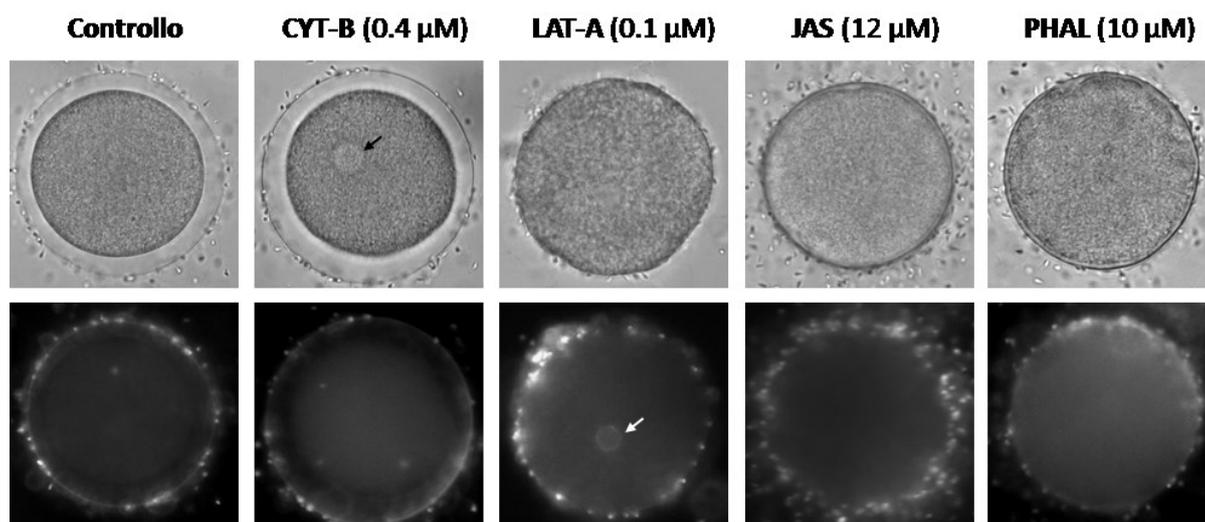


Figura IV, 6. Effetti delle sostanze che si legano all'actina sul sollevamento della membrana di fecondazione e sull'incorporazione dello spermatozoo. Le uova di *P. lividus* sono state trattate con dosi crescenti di sostanze chimiche che si legano specificamente all'actina e fecondate con spermatozoi colorati con Hoechst 33342 e sono stati monitorati i loro effetti sulla fecondazione valutando il numero di spermatozoi incorporati e la percentuale delle uova che dimostravano un completo sollevamento della membrana di fecondazione. Tempo di incubazione: CYT-B, 10 min; LAT-A, 15 min; JAS, 20 min; PHAL, 20 min. Circa 5 min dopo l'inseminazione, sono stati esaminati il sollevamento della membrana di fecondazione e il numero di spermatozoi incorporati rispettivamente in campo chiaro (in alto) e in epifluorescenza (in basso). Le frecce indicano i pronuclei delle uova casualmente a fuoco.

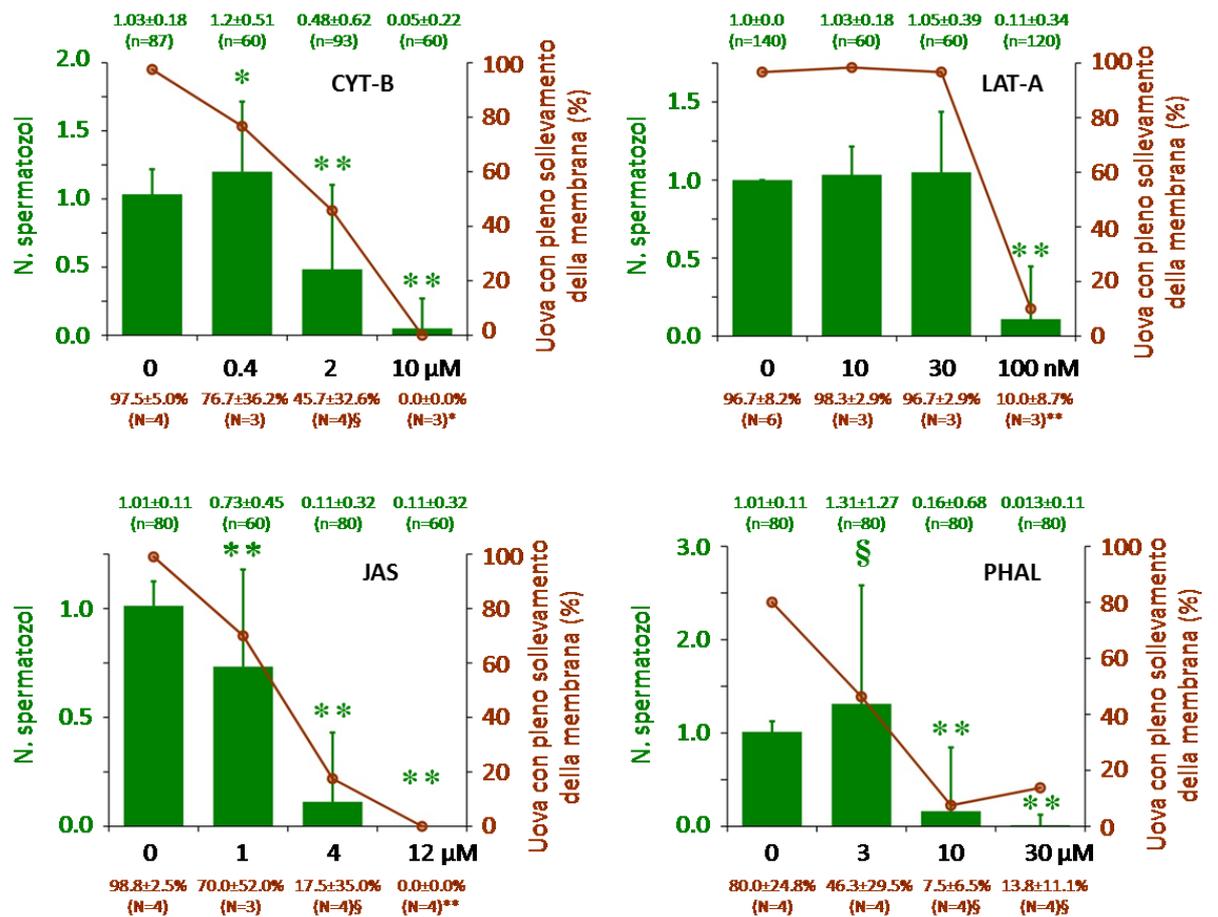


Figura IV, 7. Sintesi grafica degli effetti dose-dipendenti delle sostanze chimiche che si legano all'actina sulla fecondazione. La frequenza media delle uova che manifestano il completo sollevamento della membrana di fecondazione è stata illustrata mediante punti e linee di colore marrone, e la media esatta ± DS e il numero (N) di esperimenti indipendenti sono stati indicati sotto la concentrazione della sostanza corrispondente. Il numero medio di spermatozoi incorporati è stato calcolato in base ai dati relativi alla determinata dose di ciascuna sostanza, ed è stato presentato con l'istogramma di colore verde. La media esatta ± DS ed il numero delle uova fecondate esaminate (n) sono stati indicati sopra alle corrispondenti barre dell'istogramma. I risultati che indicavano una differenza significativa dai valori controllo sono stati segnati con simboli speciali: §P < 0.05, * P < 0.01, ** P < 0,0001.

Discussione per il Capitolo IV

In questo lavoro di tesi ho dimostrato che le sostanze chimiche che specificamente si legano all'actina alterandone le proprietà strutturali e dinamiche, pre-somministrate alle uova di riccio di mare provocano effetti sostanziali sul segnale Ca^{2+} , sull'esocitosi dei granuli corticali, e sull'ingresso dello spermatozoo durante la fecondazione. Le uova di riccio di mare pretrattate con CYT-B o LAT-A, che promuovono una netta e generale depolimerizzazione dell'actina corticale (Fig. IV, 1), manifestano diverse caratteristiche comuni nell'alterato aumento di Ca^{2+} alla fecondazione. In primo luogo, l'intervallo di tempo tra il flash corticale e la comparsa dell'inizio dell'onda di Ca^{2+} nell'uovo fecondato rilevabile al sito di interazione con lo spermatozoo, (ossia il "periodo di latenza"), era significativamente prolungato del 57% e del 23% quando le uova sono state pretrattate con CYT-B e LAT-A, rispettivamente (Fig. IV, 2 e 3). Anche se molto inferiori in termini di risoluzione temporale, questi risultati confermano i precedenti dati elettrofisiologici che hanno dimostrato che l'intervallo tra il gradino iniziale di depolarizzazione della membrana plasmatica ed il potenziale di fecondazione aumentava di quasi due volte in seguito a trattamento con citocalasina (Dale e De Santis, 1981). Così, il flash corticale e il primo spot di Ca^{2+} al sito di interazione con lo spermatozoo possono corrispondere rispettivamente al gradino iniziale e all'inizio del potenziale di fecondazione. Tuttavia, il significato fisiologico esatto del periodo di latenza e del suo aumento causato dalla citocalasina non è ancora chiaro (Dale e De Santis, 1981; Dale et al., 1978). Considerando le storiche ed accreditate teorie sulla modalità con cui gli spermatozoi attivano le uova (Lillie, 1913; Loeb, 1914; Santella et al., 2004), il periodo di latenza potrebbe indicare il tempo necessario affinché lo spermatozoo riesca ad infondere una sostanza direttamente all'interno dell'uovo attraverso un condotto oppure a far partire una cascata di segnali attraverso un recettore localizzato sulla superficie della cellula. Quale che sia il percorso, CYT-B e LAT-A sembrano ritardarlo significativamente (Fig. IV, 2 e 3). I risultati della mia tesi di dottorato evidenziano che l'actina corticale del citoscheletro sia implicata in

questo processo ancora sconosciuto che porta alla generazione del primo segnale Ca^{2+} dopo l'interazione dello spermatozoo con la superficie dell'uovo. L'altra caratteristica distintiva che si osserva di frequente nelle uova pretrattate con CYT-B o LAT-A è la presenza di picchi multipli di Ca^{2+} alla fecondazione (Fig. IV, 2 e 3). Durante i primi 6 minuti della risposta, le uova pretrattate con LAT-A producono ben 3.8 ± 2.1 picchi ($n = 18$) rispetto alle uova di controllo (1.05 ± 0.21 , $n = 22$; $P < 0.0001$). In misura minore, le uova pretrattate con CYT-B producono 1.8 ± 0.95 picchi ($n = 47$) nello stesso intervallo di tempo, a differenza dei 1.19 ± 0.47 picchi presenti nelle uova di controllo ($n = 36$, $P < 0.01$). Il verificarsi di molteplici picchi di Ca^{2+} alla fecondazione è risultato estremamente sensibile alla LAT-A, poiché la minima dose capace di indurre il fenomeno partiva da 1 nM. Questi molteplici aumenti di Ca^{2+} prodotti così facilmente dalla LAT-A riportano alla mente in qualche modo gli aumenti spontanei di Ca^{2+} trovati nelle uova di *A.aranciacus* quando sono incubate in presenza della sola LAT-A (Lim et al., 2002), ma chiaramente sono di natura diversa. Innanzitutto, la LAT-A da sola, senza spermatozoi, non induce un aumento di Ca^{2+} nelle uova di *P. lividus*, ed in secondo luogo in un esperimento simile condotto utilizzando LAT-A ed un Ca^{2+} ionoforo è stato liberato Ca^{2+} sotto forma di un singolo picco e non oscillazioni (dati non riportati). In virtù di quanto appena detto perciò, questi molteplici aumenti di Ca^{2+} , che generalmente originano da diverse aree della superficie dell'uovo e si sviluppano in un'onda parziale, sono molto probabilmente il risultato visibile delle interazioni di molti spermatozoi. Tuttavia, ho riscontrato che nelle stesse condizioni sperimentali (100 nM LAT-A, 15 min), raramente è possibile trovare spermatozoi incorporati nelle uova (Fig. IV, 6). L'insorgenza di molteplici picchi di Ca^{2+} dovuti all'interazione con gli spermatozoi, però, non si limitava esclusivamente alle uova pretrattate con sostanze chimiche che esercitano un effetto depolimerizzante sull'actina. Anche nelle uova pretrattate con JAS (che stabilizza i filamenti di actina) è possibile osservare la presenza di picchi (1.63 ± 1.10 , $n = 24$), più numerosi rispetto a quelli riscontrati nelle uova di controllo (1.05 ± 0.21 , $n = 22$, $P < 0.05$). Una tendenza simile è

stata osservata anche nelle uova preiniettate con PHAL (1.40 ± 0.56 , $n = 30$), ma la differenza, con i valori delle uova di controllo preiniettate con DMSO, non ha raggiunto una significatività statistica (1.23 ± 0.51 , $n = 26$; $P = 0,2026$). Così, si è evidenziato che le uova pretrattate con sostanze che si legano specificamente all'actina diventano in qualche modo più permissive verso gli spermatozoi, consentendo loro di innescare molteplici onde di Ca^{2+} da punti diversi sulla superficie. Sebbene il segnale Ca^{2+} dell'onda globale nelle uova pretrattate con JAS fosse altamente paragonabile a quella delle uova di controllo in termini di ampiezza (Fig. IV, 4), le uova trattate nelle stesse condizioni ($12 \mu M$, 20 min) manifestavano un'avversione verso gli spermatozoi, poiché raramente era possibile trovarne incorporati nelle suddette uova (Fig. IV, 7). Sorprendentemente nelle uova che presentavano un singolo picco di Ca^{2+} era occasionalmente possibile trovare più spermatozoi (dati non mostrati). Da qui si deduce che un singolo evento di Ca^{2+} alla fecondazione non è né necessario né sufficiente per garantire l'ingresso ad un unico spermatozoo nelle uova di riccio di mare, ma al contrario è lo stato strutturale o funzionale dell'actina del citoscheletro nelle uova ad essere strettamente correlato alla regolazione dell'ingresso degli spermatozoi (Fig. IV, 6 e 7). Il fallimento generale nel permettere l'ingresso degli spermatozoi mostrato dalle uova pretrattate con queste sostanze non è certo attribuibile ad un effetto potenzialmente deleterio degli agenti chimici sulla motilità degli stessi spermatozoi perché le uova di controllo non pretrattate, presenti nella stessa camera con uova precedentemente sottoposte al trattamento con le sostanze in oggetto, sono state fecondate con successo (dati non mostrati). Inoltre la possibilità che possano entrare più spermatozoi in uova che manifestano un completo sollevamento della membrana di fecondazione, unita alla mancanza di spermatozoi all'interno di uova che invece non esibiscono tale sollevamento (Fig. IV, 6), dimostra che la formazione di questa membrana di fecondazione potrebbe non avere alcuna utilità pratica verso il blocco alla polispermia (Santella et al., 2014). Quindi, la fecondazione monospermica nelle uova di riccio di mare può probabilmente essere garantita da un meccanismo più veloce, come suggerito per la

prima volta dallo scienziato americano E.E. Just (Just, 1939), che successivamente si è ipotizzato potesse basarsi su una rapida depolarizzazione del potenziale di membrana dell'uovo alla fecondazione (Jaffe, 1976). Mentre il meccanismo esatto con cui tale blocco veloce alla polispermia possa attuarsi è ancora oggetto di un acceso dibattito, (Dale, 2014; Dale e DeFelice, 2011), i risultati del mio studio hanno indicato che il perfetto coordinamento dell'actina del citoscheletro è un prerequisito fondamentale per una corretta interazione dello spermatozoo con la cellula uovo (ricordo a tal proposito gli anomali picchi multipli di Ca^{2+} nelle uova pretrattate con LAT-A e CYT-B) ed anche nella sua successiva internalizzazione, che potrebbe collegarsi alla regolazione di un qualche meccanismo che consenta l'ingresso ad un singolo spermatozoo, assicurando la monospermia (Fig. IV, 6 e 7). A sostegno dell'idea che il citoscheletro giochi un ruolo dominante nel controllo della monospermia indipendente dal sollevamento della membrana di fecondazione, sono i risultati prodotti sulle uova di molluschi, che non manifestano sostanzialmente tale sollevamento in condizioni normali, nonostante un'elevata percentuale di polispermia alla fecondazione in seguito al pretrattamento con CYT-B (Ziomek e Epel, 1975). Un altro punto importante di questo studio è che in tutte le 60 uova pretrattate con JAS nessuna riesce a manifestare neanche un minimo sollevamento della membrana di fecondazione (Fig. IV, 6 e 7), anche se nella stessa condizione sperimentale (12 μ m, 20 min) è ancora rilevabile una massiccia onda di Ca^{2+} comparabile alle uova di controllo (Fig. IV, 4). Tutti gli altri agenti utilizzati inducono essenzialmente lo stesso effetto: il mancato innesco dell'esocitosi dei granuli corticali nonostante un incremento dei livelli di Ca^{2+} intracellulari avesse normalmente avuto luogo. Quindi, è evidente che l'aumento di Ca^{2+} da solo non è sufficiente per l'esocitosi dei granuli corticali alla fecondazione del riccio di mare, ma invece necessita di una precisa organizzazione dell'actina del citoscheletro. Questi risultati corroborano quelli precedentemente ottenuti con le uova di stella di mare (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010; Vasilev et al., 2012).

Per quanto concerne gli effetti generali degli agenti che modificano l'organizzazione strutturale dell'actina che a sua volta altera il rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione, l'ampiezza del flash corticale, che è espressione dell'ingresso di Ca^{2+} tramite canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, c'è da sottolineare che tutti questi eventi che si verificano in sequenza durante il processo di fecondazione sono fortemente influenzati dalle sostanze che stabilizzano i filamenti di actina (Fig. IV, 4 e 5). D'altra parte, l'ampiezza del picco dell'onda globale era moderatamente repressa nelle uova pretrattate con CYT-B e LAT-A del 9% e 26%, rispettivamente, ma era più alta del 41% nelle uova pretrattate con PHAL. Al contrario di quanto appena detto per la PHAL, le uova pretrattate con JAS non mostravano praticamente alcun cambiamento significativo nell'ampiezza del picco delle onde di Ca^{2+} in confronto alle uova di controllo (Fig. IV, 4). Queste sottili differenze tra JAS e PHAL nei loro effetti sul segnale Ca^{2+} sono difficili da spiegare in quanto le loro influenze precise sui filamenti di actina in specifici loci cellulari intorno al reticolo endoplasmatico e nei microvilli sono in gran parte sconosciuti. Tuttavia, ho notato che sia JAS che PHAL avevano un effetto simile sulla fase di decadimento delle curve del Ca^{2+} (Fig. IV, 4 e 5). Dopo essere stati liberati dai depositi intracellulari, gli ioni Ca^{2+} devono legarsi a proteine che vengono così attivate o riassorbiti nuovamente nei depositi, o anche estrusi fuori dalla cellula. Viceversa ho trovato con sorpresa che la rimozione del Ca^{2+} citosolico arriva prima al punto di saturazione nelle uova pretrattate con JAS e PHAL (Fig. IV, 4 e 5). Questo fenomeno non è stato trovato nelle uova pretrattate con le sostanze ad azione depolimerizzante sull'actina, ma è risultato più evidente nelle uova pretrattate con PHAL (Fig. IV, 5) che induce effetti iperpolimerizzanti estremamente forti sull'actina corticale (Fig. IV, 1). I meccanismi molecolari attraverso i quali l'iperpolimerizzazione dell'actina corticale possa attenuare il buffering o il recupero di Ca^{2+} in queste uova non sono chiari. In considerazione del fatto che i canali ionici e le pompe presenti sulla membrana plasmatica e sul reticolo endoplasmatico sono strettamente associati all'actina del citoscheletro, è plausibile che le attività di mobilitazione del Ca^{2+} siano modulati dallo

stato dell'actina del citoscheletro attraverso la regolazione del posizionamento dei canali deputati al transito dello ione (Smani et al., 1838; Fujimoto et al., 1995; Patterson et al., 1999; Sugiyama et al., 2000; Fukatsu et al., 2004) . Per lo stesso motivo, è possibile che l'iperpolimerizzazione dell'actina corticale ad opera di PHAL e JAS potrebbe avere influenzato negativamente il recupero di Ca^{2+} da parte delle Ca^{2+} -ATPasi presenti sul reticolo endoplasmatico e sulla membrana plasmatica ed elevato il livello di Ca^{2+} basale (Fig. IV, 4 e 5). Infatti, è stato dimostrato che il trattamento dei neuroni dell'ippocampo con JAS agisce in sinergia con la taspigargina che aumenta i livelli di Ca^{2+} citosolico principalmente inibendo il suo assorbimento attraverso la Ca^{2+} -ATPasi sul reticolo endoplasmatico (Wang et al., 2002b). In alternativa, questo maggiore livello di Ca^{2+} misurato nella fase decadente della risposta potrebbe essersi verificato per l'esaurimento delle riserve di actina monomerica nel citoplasma in seguito alla massiva iperpolimerizzazione corticale. Il legame del Ca^{2+} alla G-actina e la sua integrazione nei filamenti potrebbe servire come meccanismo supplementare per riassorbire il Ca^{2+} per diminuire localmente ed in maniera tempestiva la sua concentrazione (Lange, 1999; Lange e Gartzke, 2006; Chun e Santella, 2009; Santella e Chun, 2011; Vasilev et al., 2012). Quindi, la marcata stabilizzazione dei filamenti di actina da parte di PHAL e JAS potrebbe aver represso il processo di rimozione del Ca^{2+} sopprimendo il *treadmilling*. Tuttavia, i meccanismi funzionali e gli effetti delle sostanze che si legano all'actina sono così altamente intricati, che è difficile spiegare tutte le mie osservazioni esclusivamente sulla base di una tendenza alla polimerizzazione o depolimerizzazione. Pertanto chiarire in che modo l'actina del citoscheletro possa influire sui fondamentali processi biologici di rilascio di Ca^{2+} e di incorporazione dello spermatozoo richiede certamente ulteriori indagini in diversi sistemi modello. Infine, ho scoperto che il lasso di tempo affinché l'onda potesse viaggiare dal sito di interazione con lo spermatozoo al polo opposto è risultato significativamente aumentato, non solo in seguito a trattamento con CYT-B o LAT-A (vedi risultati), ma anche con PHAL e JAS. Il “tempo di traversata” nelle uova pretrattate

con PHAL era di $20,3 \pm 2,9$ sec ($n = 29$) rispetto a $16,8 \pm 2,0$ sec delle uova di controllo ($n = 25$, $P < 0,0001$). Analogamente, il tempo di traversata nelle uova pretrattate con JAS era molto più lungo ($25,6 \pm 3,3$ sec, $n = 15$) rispetto al rispettivo controllo ($19,8 \pm 2,8$ sec, $n = 22$; $P < 0,0001$). Così, la velocità planare dell'onda di Ca^{2+} nelle uova pretrattate con PHAL e JAS alla fecondazione è stato ridotto del 17% e 23%, rispettivamente, in confronto ai corrispondenti controlli. Nel loro insieme, questi risultati ottenuti nelle uova di riccio di mare indicano ancora una volta che l'actina del citoscheletro svolge un ruolo chiave durante le prime fasi dell'attivazione ovocitaria, intervenendo nella regolazione dell'eccitabilità delle zone corticali e della matrice citoplasmatica dell'uovo e contribuendo alla sua ricettività nei confronti dello spermatozoo al momento della fecondazione.

CAPITOLO V

Le uova di stelle marine come modello sperimentale per lo studio dei meccanismi dell'invecchiamento ovocitario

Risultati

5.1. La fecondazione polispermica può essere legata ai cambiamenti strutturali della zona corticale dell'uovo nella fase post-meiotica.

È ormai ampiamente noto che affinché si realizzi una reciproca interazione ed attivazione funzionale tra i gameti, la cellula uovo deve essere fecondata ad un preciso stadio meiotico, o stadio maturativo, ottimale per la fecondazione, che è caratteristico di ciascuna specie. Gli ovociti dei mammiferi, ad esempio, conservano piena competenza per lo sviluppo per un periodo di diverse ore dopo l'ovulazione, arrestando il loro ciclo meiotico alla metafase II (Fissore et al., 2002). Se non fecondati entro tale periodo però, siano essi negli ovidotti o coltivati *in vitro*, gli ovociti vanno incontro ad un deterioramento della loro qualità che è dipendente dal tempo. Tale deterioramento implica alterazioni nella loro originaria struttura citoplasmatica e nucleare, che si riflette sulla loro capacità di attivazione, perché vanno incontro all'invecchiamento o *aging* ovocitario. Gli ovociti invecchiati, pertanto, manifestano la capacità di interagire e fondersi con più spermatozoi e la polispermia conduce ad un aberrante sviluppo embrionale.

Alla nascita una donna possiede un milione di cellule uovo potenzialmente progenitrici, tuttavia, solo circa 500 di queste saranno poi rilasciate come uova mature e le cellule rimanenti subiranno un processo di degradazione e morte cellulare. Questa graduale diminuzione che si verifica con l'età e che interessa sia la quantità che la qualità dei gameti si associa ad una progressiva diminuzione della fertilità femminile e ad una maggiore probabilità di insorgenza di numerose patologie fetali.

Purtroppo fino a oggi il processo fisiologico dell'invecchiamento degli ovociti non è stato completamente compreso ed appare perciò di fondamentale importanza far luce sulle cause che lo inducono.

Nelle gonadi femminili delle stelle di mare, gli ovociti, caratterizzati dalla presenza di un grande nucleo definito “vescicola germinale” (VG) sono bloccati alla prima profase della meiosi. L'esposizione di questi ovociti, allo stadio di profase della prima divisione meiotica, all'1-MA porta alla ripresa del ciclo meiotico e alla transizione verso la metafase I. Pertanto il meccanismo che rende le uova di stella di mare competenti per essere fecondate con successo da un singolo spermatozoo, il cosiddetto “processo di maturazione”, ha luogo con cambiamenti morfologici caratteristici che sono facilmente osservabili al microscopio ottico, come ad es. la dissoluzione dell'involucro nucleare (GVBD) e la scomparsa del nucleo il cui contenuto si mescola con il citoplasma. Durante la ripresa del ciclo meiotico, l'actina del citoscheletro subisce un significativo riassetto specialmente in prossimità della regione sottostante la membrana plasmatica, il cortex. Contemporaneamente alla riorganizzazione dell'actina, il posizionamento perpendicolare alla superficie dei granuli corticali immediatamente sotto la membrana plasmatica che è essenziale per innescare l'esocitosi del loro contenuto nello spazio perivitellino, in seguito all'interazione con lo spermatozoo. L'esocitosi dei granuli corticali porta al sollevamento dell'involucro vitellino ed alla formazione della membrana di fecondazione, che da sempre si ritiene responsabile del blocco lento contro la polispermia.

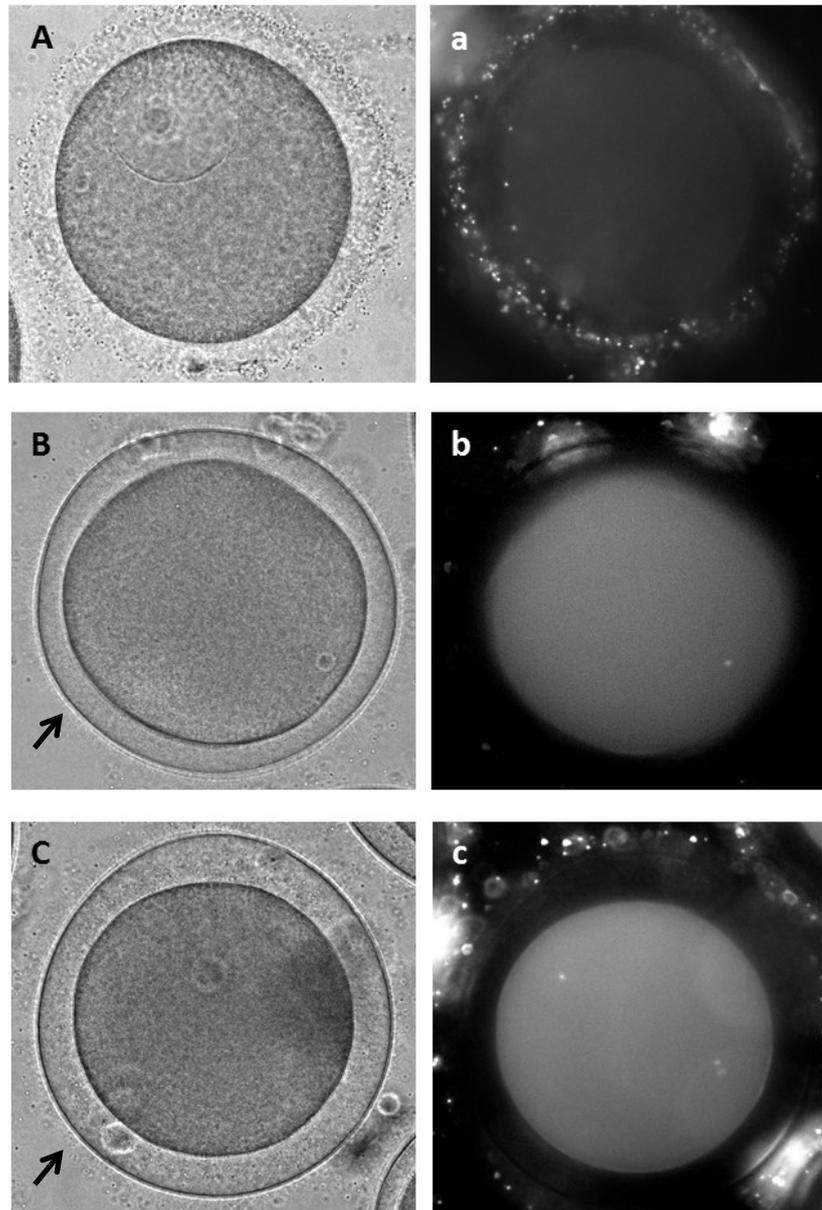
In considerazione della facilità con cui è possibile simulare il processo di *aging*, e cioè lasciando semplicemente le uova in acqua di mare per un periodo di diverse ore dopo la somministrazione dell'1-MA, ho utilizzato uova di stella di mare post-meiotiche per studiare gli effetti dell'invecchiamento delle uova sui meccanismi cellulari e molecolari della fecondazione, con particolare riguardo alla relazione tra il rilascio di calcio intracellulare, i cambiamenti nello stato dell'organizzazione dell'actina citoscheletrica, e il

blocco alla polispermia, in cellule a differenti stadi maturativi, cioè che erano state incubate per molte ore con 1-MA.

Il periodo ottimale affinché si realizzi una fecondazione monospermica nelle uova di stella di mare è quello che intercorre tra la scomparsa del nucleo (GVBD) e l'estrusione del primo globulo polare (Fujimori e Hirai, 1979). Se la fecondazione, infatti, è effettuata al di fuori di questo lasso di tempo, si evidenzia una maggiore tendenza alla polispermia che inevitabilmente porta ad uno sviluppo embrionale anormale. Al fine di verificare la relazione tra la polispermia e lo stadio maturativo delle uova, ho esaminato il numero di spermatozoi che venivano incorporati dopo inseminazione di cellule uovo di *Astropecten aranciacus* nei tre differenti stadi di maturazione: 1) ovociti immaturi allo stadio VG notoriamente polispermici; 2) uova mature nel periodo ottimale di fecondazione (circa 1 ora e 10 minuti dopo l'aggiunta dell'1-MA); 3) uova sovramature (trattate per 6 ore con 1-MA). Per fare ciò, ho incubato gli spermatozoi in una soluzione con Hoechst 33342 per circa 1 minuto, dopodiché li ho aggiunti nell'acqua di mare contenente gli ovociti e le uova da fecondare e infine dopo circa 10 minuti ho osservato i campioni con la fotocamera CCD mediante filtro per la luce UV. Come previsto, negli ovociti allo stadio VG che non sperimentano il sollevamento della membrana di fecondazione, molti spermatozoi (6.53 ± 2.47 , $n = 60$) riuscivano a penetrare la membrana plasmatica ed entrare nel citoplasma (Fig. V, 1A e Fig. V, 2A). Al contrario, le uova maturate per un'ora ed esposte alla stessa concentrazione di spermatozoi incorporavano, nella maggioranza dei casi, un singolo spermatozoo (Fig. V, 1B e b). D'altra parte, quando ho fecondato le uova che erano state maturate per 6 ore nonostante il normale e completo sollevamento della membrana di fecondazione, ho potuto constatare la presenza di più spermatozoi all'interno dell'uovo (Fig. V, 1C e c). Mentre le uova di controllo fecondate nella giusta finestra temporale erano principalmente monospermiche $1,12 \pm 0,3$, ($n = 60$), le uova fecondate 6 ore dopo l'inizio dell'esposizione ad 1-MA, mostravano un numero di spermatozoi incorporati di 2.6 ± 1.11 ($n = 60$), statisticamente significativo rispetto al controllo ($P < 0.001$) (Fig. V, 2A).

Quindi, i miei dati sono in linea con quanto si afferma in letteratura (Fujimori e Hirai, 1979), che la frequenza di polispermia negli ovociti immaturi (100%) e nelle uova maturate per 6 ore ($91.7 \pm 5.77\%$) è significativamente superiore ($P < 0.001$) rispetto alle uova mature che sono state fecondate nel corretto intervallo di tempo ($8,5 \pm 2,3 \%$) (Fig. V, 2B). Inoltre al fine di valutare l'esistenza di eventuali differenze nelle dinamiche del processo di formazione della membrana di fecondazione che potessero giustificare questa discrepanza nel numero di spermatozoi incorporati nelle uova mature ed in quelle maturate per 6 ore, ho provveduto a misurare la velocità di sollevamento dell'involucro vitellino, intesa come tempo necessario affinché sia possibile osservare anche al microscopio ottico il formarsi di questa membrana per tutta la lunghezza della superficie dell'uovo. Quindi, considerando come $t = 0$ il momento in cui inizia a visualizzarsi il sollevamento in una data regione della superficie e terminando il conteggio quando la membrana è sollevata in maniera equidistante per tutta la sua estensione, ho misurato una velocità di sollevamento pressoché invariata nelle uova sovramature (108.9 ± 26.8 sec, $n = 16$) rispetto a quella misurata nei controlli (106.3 ± 22.8 sec, $n = 17$) (Fig V, 1D).

Pertanto questa condizione di polispermia che si realizza a fronte del pieno sollevamento della membrana di fecondazione nelle uova sovramature dimostra chiaramente che la formazione di questa membrana non è un fattore sufficiente a garantire l'ingresso di un solo spermatozoo negli echinodermi e che perciò potrebbe esistere un meccanismo aggiuntivo e più veloce per impedire l'ingresso di spermatozoi soprannumerari al momento della fecondazione.



Velocità di sollevamento MF

D	Uova mature (controllo)	106.3 ± 22.8 sec, n = 17
	Uova sovramature (6 ore)	108.9 ± 26.8 sec, n = 16

Figura V, 1. La fecondazione monospermica si realizza solo nelle uova fecondate nella giusta finestra temporale durante la maturazione. Immagini a luce trasmessa scattate con la fotocamera CCD 10 minuti dopo la fecondazione di (A) ovociti immaturi allo stadio VG, (B) uova mature (1 ora e 10 minuti dopo l'aggiunta di 1-MA) e (C) uova sovramature (6 ore dall'aggiunta di 1-MA). Si noti il pieno sollevamento della membrana di fecondazione in (B) e (C) (frecche nere), del tutto assente in (A). Immagini con luce UV delle stesse cellule dove si visualizzano gli spermatozoi pre-incubati con Hoechst-33342 sotto forma di puntini fluorescenti di (a) fecondazione polispermica tipica degli ovociti immaturi (si notino 6 spermatozoi incorporati); (b) entrata di un singolo spermatozoo nell'uovo maturo; (c) fecondazione polispermica nelle uova sovramature (3 spermatozoi incorporati). (D) Sintesi della velocità media di sollevamento della membrana di fecondazione nelle uova mature e sovramature. I dati si riferiscono ad una serie di tre esperimenti indipendenti, ossia condotti su gonadi provenienti da tre diversi animali (N = 3).

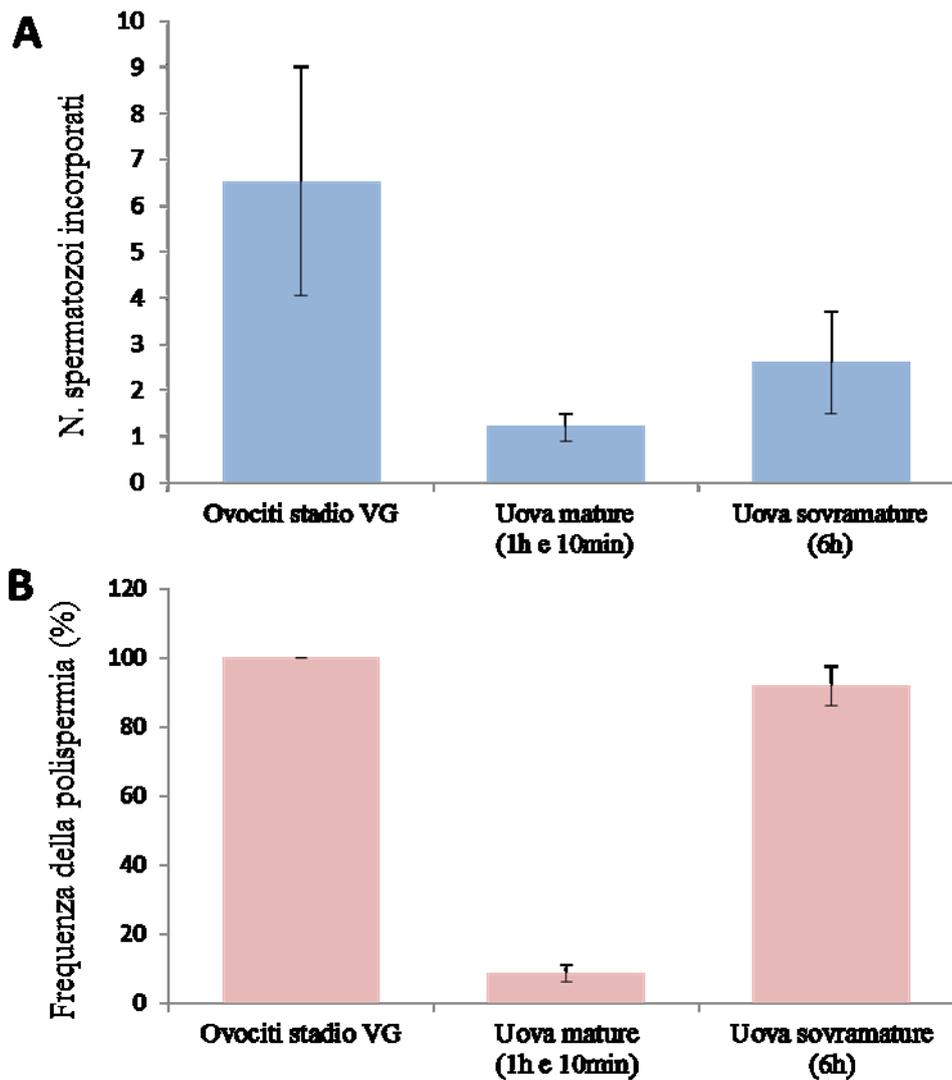


Figura V, 2. Alta frequenza di polispermia negli ovociti allo stadio VG e nelle uova sovramature (6 ore) alla fecondazione. Gli ovociti allo stadio VG, le uova mature e le uova sovramature sono state fecondate con spermatozoi precedentemente colorati con Hoechst 33342, al fine di renderli visibili alla luce UV per sottoporli al conteggio tramite fotocamera CCD. (A) Il numero di spermatozoi incorporati negli ovociti (6.53 ± 2.47 , $n = 60$) è significativamente diverso da quello nelle uova mature ($1,12 \pm 0,3$, $n = 60$; $P < 0.001$), parallelamente al numero degli spermatozoi nelle uova sovramature (2.6 ± 1.11 , $n = 60$; $P < 0.001$) che è statisticamente significativo rispetto alle uova fecondate nel loro periodo ottimale. (B) Frequenza della polispermia negli ovociti (100%), nelle uova mature ($8,5 \pm 2,3$ %) e nelle uova sovramature ($91.7 \pm 5.77\%$). I dati si riferiscono ad una serie di tre esperimenti indipendenti, ossia condotti su gonadi provenienti da tre diversi animali ($N = 3$).

5.2. L'actina del citoscheletro come un fattore essenziale nel meccanismo di blocco alla polispermia durante la fecondazione.

L'actina del citoscheletro degli ovociti di stella di mare va incontro ad una riorganizzazione strutturale finemente regolata sia durante la ripresa meiotica che la fecondazione (Lim et al., 2003; Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008). Alla fecondazione delle uova di stella e riccio di mare, l'actina del citoscheletro corticale dell'uovo partecipa attivamente al processo di interazione con lo spermatozoo, stabilendo un contatto tra il filamento acrosomale (che concontiene F-actina) dello spermatozoo e strutture di filamenti di actina nel citoplasma dell'uovo. Lo stabilirsi di questo forte ancoraggio è una condizione essenziale perché lo spermatozoo venga incorporato nell'uovo fecondato (Puppo et al., 2008). Infatti quando la struttura del citoscheletro di actina è alterata con agenti farmacologici e la sua funzione dinamica è compromessa, anche il numero e la modalità di entrata degli spermatozoi risulta inficiata (Puppo et al., 2008; Vasilev et al., 2012). Sulla base di queste informazioni, ho esaminato la distribuzione di F-actina nella corteccia di ovociti immaturi, di uova controllo e di uova sovramature al fine di correlare l'organizzazione strutturale dell'actina corticale con la risposta delle uova allo spermatozoo a stadi maturativi diversi e condizioni patologiche come nel caso delle sovramature. Per la visualizzazione dei filamenti di actina nelle cellule *in vivo*, ho iniettato falloidina fluorescente come descritto in precedenza negli ovociti immaturi, nelle uova di controllo mature, dopo 50 minuti dall'aggiunta dell'ormone (subito dopo GVBD), ed in quelle maturate per 5 ore e 50 minuti. Come si osserva nelle immagini di microscopia confocale in Fig V, 3. i lunghi filamenti di actina visibili nel citoplasma degli ovociti immaturi (A), risultano quasi del tutto assenti nelle uova mature (B) microiniettate con falloidina subito dopo la GVBD. La comparazione delle immagini al microscopio confocale dei filamenti di actina negli ovociti immaturi ed i maturi di controllo evidenziano un sottile reticolo corticale di filamenti irregolarmente interconnessi in prossimità della membrana plasmatica degli ovociti immaturi che nei maturi è costituito

da fasci di actina disposti ordinatamente perpendicolari alla superficie dell'uovo e marcatamente più visibili. Invece la colorazione con falloidina delle uova maturate per circa 6 ore, mostra un'evidente perdita della caratteristica struttura ordinata: la F-actina della regione sub corticale risulta massicciamente depolarizzata poiché non si osserva alcuna colorazione, mentre nel citoplasma si osservano dei piccoli fasci di nuova sintesi (Fig. V, 3C). Alla fecondazione nelle uova di controllo ho potuto osservare il fenomeno di migrazione centripeta delle fibre di actina localizzate in corrispondenza della regione corticale delle uova mature (Fig V, 5b), fenomeno del tutto assente sia negli ovociti immaturi (Fig V, 5a) che nelle uova sovramature (Fig V, 5c). Così come ho potuto constatare grande diversità nella morfologia dei coni di fecondazione, che spesso assumevano forme anormali, essendo più filiformi negli ovociti allo stadio VG, o comunque irregolari nelle uova sottoposte ad invecchiamento, rispetto al caratteristico cono tondeggiate delle uova mature (Fig. V, 4). Infine, nelle uova sovramature che venivano penetrate da più di uno spermatozoo nonostante il normale sollevamento della membrana di fecondazione, non era evidente alcuna formazione di F-actina nella zona corticale dell'uovo in corrispondenza dei multipli coni di fecondazione (Fig. V, 5). Ciò in netto contrasto con i cambiamenti morfologici dell'uovo maturo di controllo, e quindi monospermico, in cui nella zona di formazione dell'unico cono, era chiaramente visibile una polimerizzazione delle fibre di actina a formare una struttura filamentosa molto estesa (Fig. V, 5). Infine quando ho fecondato gli ovociti immaturi che sono polispermici, la zona corticale in corrispondenza dei molteplici coni di fecondazione osservabili, era costituita sempre da F-actina, anche se organizzata diversamente a formare strutture più tozze e spesse. Quindi mentre la naturale polispermia degli ovociti immaturi può essere attribuita all'effettiva mancanza del sollevamento della membrana di fecondazione, per assenza dell'esocitosi dei granuli corticali, nelle uova sovramature la polispermia, che si realizza nonostante abbia luogo il sollevamento della membrana vitellina, potrebbe essere attribuita ai cambiamenti strutturali dell'actina corticale per effetto dell'invecchiamento delle cellule.

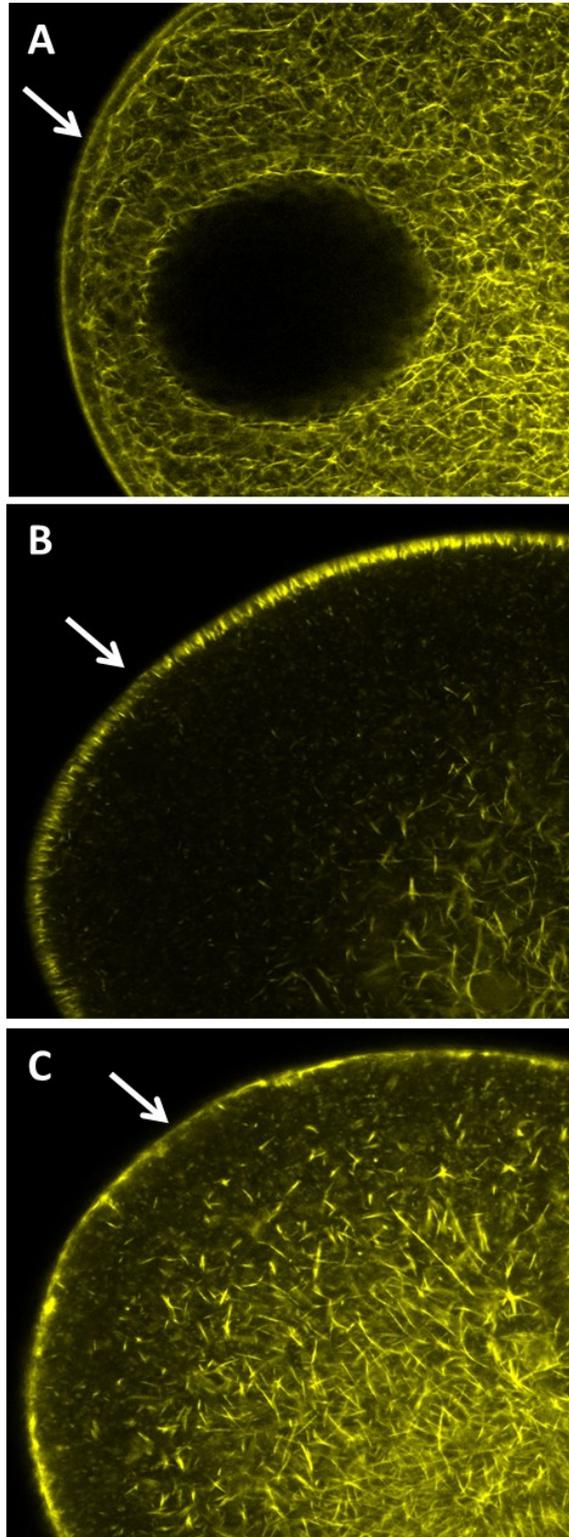


Figura V, 3. Riorganizzazione dinamica dell'actina del citoscheletro nelle uova di stella di mare durante la maturazione meiotica. Mediante la microiniezione di falloidina Alexa Flour 568 negli ovociti di *A.aranciacus* a diversi stadi di maturazione ed osservazione al microscopio confocale è stato possibile visualizzare la differente disposizione della F-actina in (A) ovocita immaturo in profase I (stadio VG); (B) uovo maturo, 60 min dall'aggiunta dell'ormone; (C) uovo sovramaturo, 6 ore dall'aggiunta dell'ormone, con particolare riferimento alla zona corticale, indicata dalle frecce.

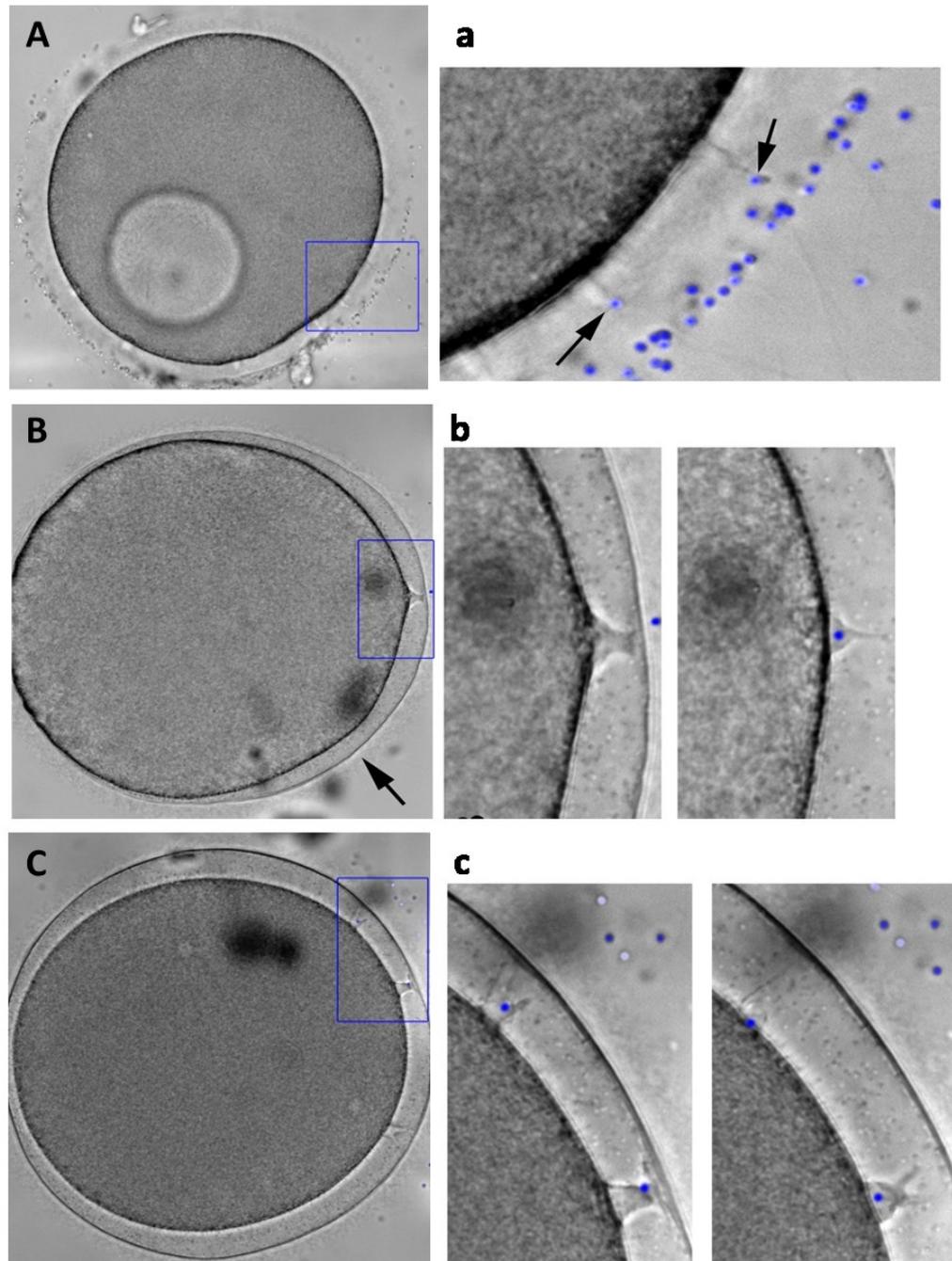


Figura V, 4. Differenze morfologiche dei coni di fecondazione in cellule a diversi stadi maturativi. Immagini a luce trasmessa sovrapposte a immagini a luce UV per visualizzare gli spermatozoi colorati con Hoechst 33342 durante la fecondazione di (A) ovociti immaturi allo stadio VG, (B) uova mature nel periodo ottimale, (C) uova sovramature. (a, b e c) Ingrandimento della zona compresa nei riquadri blu di ciascuna immagine per rendere più facile la visualizzazione delle differenze morfologiche dei coni di fecondazione: si noti la forma irregolare negli ovociti immaturi (a), le frecce indicano i siti di interazione funzionale con gli spermatozoi) e nelle uova invecchiate (c) rispetto a quella più sferica del controllo (b).

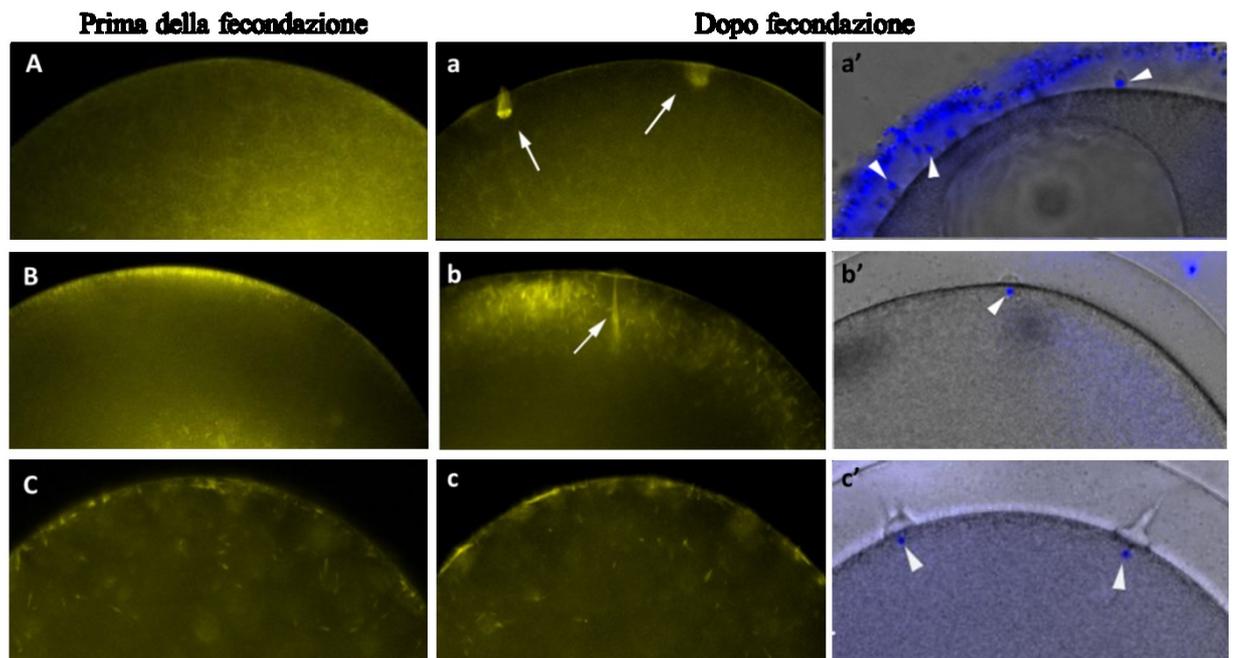


Figura V, 5. Cambiamenti dell'actina del citoscheletro durante la fecondazione di uova di stella di mare a diversi stadi di maturazione. In seguito alla microiniezione di falloidina Alexa Flour 568 negli ovociti di *A.aranciacus* a diversi stadi di maturazione ed osservazione mediante CCD camera è stato possibile seguire i cambiamenti morfologici della F-actina prima della fecondazione in (A) ovocita immaturo in profase I (stadio VG); (B) uovo maturo, 70 min dall'aggiunta dell'ormone; (C) uovo sovramaturo, 6 ore dall'aggiunta dell'ormone e dopo circa 15 minuti dalla fecondazione (a, b e c). Si notino la differente modalità di polimerizzazione della F-actina nel sito di interazione spermatica dell'ovocita immaturo (a) rispetto al lungo filamento visualizzabile nelle uova fecondate nel periodo ottimale (b) e la totale assenza di polimerizzazione in prossimità dei siti di interazione nelle uova sottoposte ad invecchiamento (c). (a', b', c') Immagini a luce trasmessa sovrapposte alla luce UV per visualizzare gli spermatozoi colorati con Hoechst 33342 scattate nello stesso intervallo di tempo. Gli spermatozoi incorporati sono indicati dalle frecce.

5.3. I cambiamenti strutturali della regione corticale a cui vanno incontro le uova nel corso del processo maturativo definiscono il normale *pattern* di rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione.

Anche se in tutte le specie animali l'interazione tra spermatozoo e cellula uovo dà inizio ad una serie di meccanismi di trasduzione del segnale nell'ambito dei quali, lo ione Calcio sembra svolgere un ruolo chiave nell'attivazione delle uova, si sa ancora relativamente poco circa le modalità che regolano il rilascio di calcio. Studi condotti nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato hanno ampiamente dimostrato che, nelle uova di echinodermi, l'actina del citoscheletro svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della liberazione del calcio intracellulare e che la perturbazione dell'organizzazione strutturale dell'actina con diversi agenti quali ad esempio la cofilina, la profilina, il jasplakinolide, la latrunculina-A, l'eparina e la ionomicina induce polispermia. (Nusco et al., 2006, Puppo et al., 2008, Chun et al., 2010; Vasilev et al., 2012; Chun et al., 2014; Santella et al., 2014). In particolare, i risultati ottenuti con la ionomicina, assumono un significato molto importante se si pensa all'utilizzo di questo ed altri calcio ionofori, per promuovere l'attivazione artificiale della cellula uovo in seguito ad iniezione spermatica, nelle tecniche di fecondazione assistita quando sussistono problemi di infertilità maschile, ad esempio legata alla ridotta motilità o all'esiguo numero di spermatozoi.

Inoltre alcuni studi suggeriscono che il minore successo di un corretto sviluppo embrionale derivante dalla fecondazione *in vitro* di ovociti invecchiati potrebbe derivare dai danni dovuti proprio ad una anormale omeostasi del Calcio (Takahashi et al., 2009) che include anche variazioni nella modalità e della frequenza di rilascio di questo ione alla fecondazione (Igarashi et al., 1997).

Nella stella di mare è stato osservato che gli ovociti allo stadio di vescicola germinale (VG) mostrano una minore abilità nel rilasciare calcio se fatti interagire con gli spermatozoi, rispetto a quella indotta quando l'uovo viene fecondato dopo maturazione, mentre mancano in letteratura dati riguardanti cellule sovramature. Al fine di colmare questa

lacuna e valutare se i cambiamenti nell'organizzazione strutturale del cortex osservati nelle uova invecchiate dal punto di vista della loro maturazione, potessero avere degli effetti significativi sulle dinamiche di rilascio del Ca^{2+} , ho misurato i cambiamenti dei livelli intracellulare dello ione in oggetto alla fecondazione delle uova nei diversi stadi maturativi. Come si osserva in Figura V, 6, essendo polispermici, gli ovociti immaturi manifestano la genesi di più onde di Ca^{2+} in corrispondenza dei siti di interazione funzionali con diversi spermatozoi (con una media di 4.61 ± 0.94 , $n = 32$), ma quest'onda non viene preceduta dal flash corticale nella maggioranza dei casi (in 30 ovociti su 32 esaminati), risultando del tutto assente (in 10 su 32). Ho anche osservato la formazione del flash corticale in una fase successiva all'inizio dell'onda durante la sua propagazione al polo opposto (in 17 su 32) e solo raramente contemporanea al primo spot (in 3 su 32). Nel caso delle uova maturate per 6 ore, anch'esse generalmente polispermiche, sono generate onde multiple (4.06 ± 1.12 , $n = 16$) rispetto alle uova mature di controllo in cui la presenza di onde addizionali è rara (1.82 ± 0.88 , $n = 17$, $P < 0.001$), però diversamente dagli ovociti allo stadio VG, si visualizza quasi sempre l'occorrenza del flash corticale (in 47 su 49 uova esaminate), sempre precedente l'inizio dell'onda di calcio, similmente a quanto riscontrato nelle uova mature e fecondate nella giusta finestra temporale (40 su 50 uova esaminate). Sorprendentemente, analizzando i dati relativi all'ampiezza del flash corticale ove presente, ho evidenziato che essa è mediamente molto più alta nelle uova sovramature (0.14 ± 0.05 RFU) che in quelle maturate fisiologicamente (0.05 ± 0.03 RFU, $P < 0.001$). Anche negli ovociti immaturi, l'ampiezza media dei flash corticali risulta maggiore (0.17 ± 0.18 RFU, $P < 0.001$). C'è da dire però che la corretta definizione del valore del picco del flash corticale di Ca^{2+} se si guarda al tempo di comparsa di questo fenomeno è complicata dal concomitante aumento dei livelli dello ione imputabili all'onda di Ca^{2+} che segue il flash corticale.

Per quanto riguarda l'onda di Ca^{2+} , in conformità con quanto atteso sulla base dei dati presenti in letteratura, le curve delle risposte di calcio dopo l'aggiunta degli spermatozoi

gli ovociti allo stadio VG mostrano un'ampiezza minore (0.81 ± 0.19 RFU) ed un tempo maggiore per il raggiungimento del picco massimo di ampiezza (380.6 ± 181.2 sec) rispetto alle misure delle variazioni di calcio nelle uova fecondate dopo una normale maturazione (1.00 ± 0.16 RFU e 99.84 ± 25.07 sec, $P < 0.001$). Questi risultati indicano una minore responsività degli *stores* di Ca^{2+} citoplasmatici alla stimolazione dei secondi messaggeri che liberano il calcio e che sono sintetizzati dopo fecondazione (Fig. V, 6A). Nel caso delle uova sovramature, invece non si registrano variazioni apprezzabili di questi parametri (1.17 ± 0.13 RFU e 131.2 ± 48.42 sec, Fig. V, 6B). Inoltre se si considera il tempo di traversata, inteso come il tempo necessario affinché l'onda si propaghi dal punto di origine al polo opposto della cellula, nelle uova sovramature si registrano valori medi di 95.83 ± 17.21 sec, estremamente simili a quelli misurati nelle uova mature di controllo (95.46 ± 20.34 sec) e la situazione non varia calcolando la velocità dell'onda tramite il rapporto tra la distanza percorsa (in termini di diametro dell'uovo) ed il tempo impiegato per percorrerla. Infatti le uova sovramature mostrano un valore medio di 3.52 ± 0.51 $\mu\text{m}/\text{sec}$, altamente paragonabile a quello ottenuto per le uova mature di controllo (3.42 ± 0.59 $\mu\text{m}/\text{sec}$, $P < 0.01$).

Presi complessivamente, questi dati suggeriscono che le dinamiche di rilascio dello ione Ca^{2+} alla fecondazione risultano essere influenzate dalla diversa architettura strutturale del cortex dell'uovo che è fortemente legata al suo stato maturativo. In maniera particolare il *pattern* di rilascio di calcio del flash corticale, che rappresenta la prima parte della risposta allo spermatozoo, è significativamente alterato, ed in misura minore anche quello dell'onda successiva. Alla luce dei dati raccolti sulla diversa conformazione dell'actina del citoscheletro delle uova prima, durante e dopo la maturazione, questi risultati sottolineano una stretta correlazione tra la capacità di risposta delle uova agli spermatozoi e lo stato della regione corticale delle uova in condizioni fisiologiche e patologiche rispetto al loro stadio di maturazione. Il meccanismo mediante il quale ciò possa realizzarsi sarà oggetto di studi futuri.

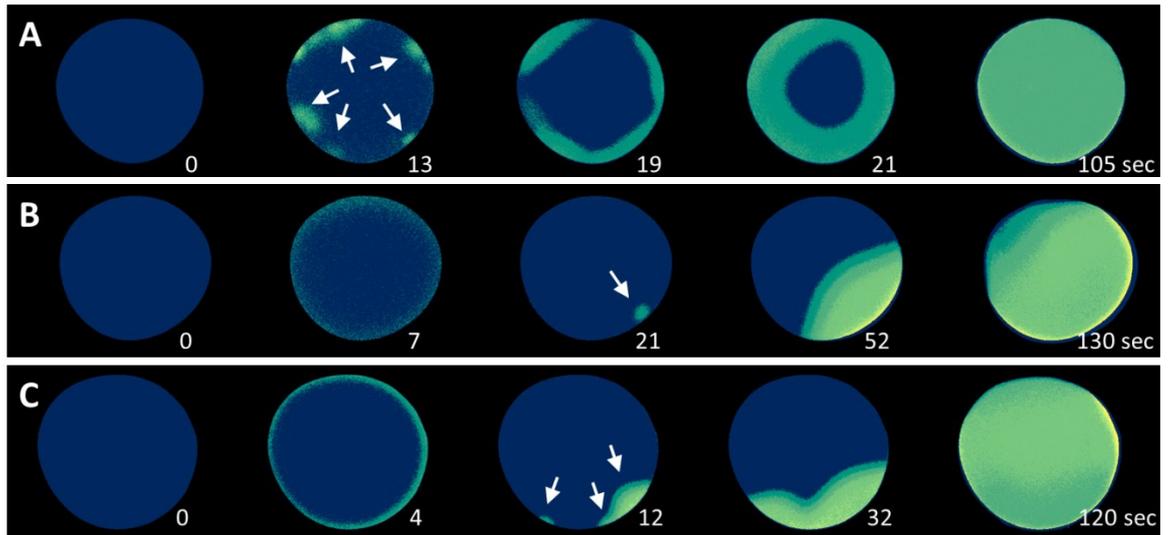


Figura V, 6. Sequenza temporale dei cambiamenti dei livelli di Ca^{2+} intracellulare delle uova di stella di mare a vari stadi di maturazione. Gli ovociti e le uova di *A. aranciacus* sono stati microiniettati con una miscela di Calcium Green e Rhodamine Red circa 10 minuti prima di effettuare l'esperimento (quindi 1 ora e 5 ore e 50 minuti dopo l'aggiunta di 1-MA rispettivamente nelle uova mature e sovramature) e poi fecondati al fine di misurare i cambiamenti nei livelli di Ca^{2+} nel tempo mediante fotocamera CCD. Le immagini di fluorescenza relativa rappresentano la somma complessiva degli aumenti di Ca^{2+} in seguito all'interazione con gli spermatozoi in intervalli di tempo selezionati di un ovocita immaturo (A), di un uovo maturo (B), e di un uovo sovramaturo (C). Il tempo immediatamente precedente al primo segnale Ca^{2+} rilevabile è stato impostato come $t = 0$ per facilitare la comparazione. I siti di interazione spermatica corrispondenti ai punti di partenza dell'onda sono evidenziati dalle frecce. Si noti l'assenza del flash corticale prima della genesi dell'onda in (A).

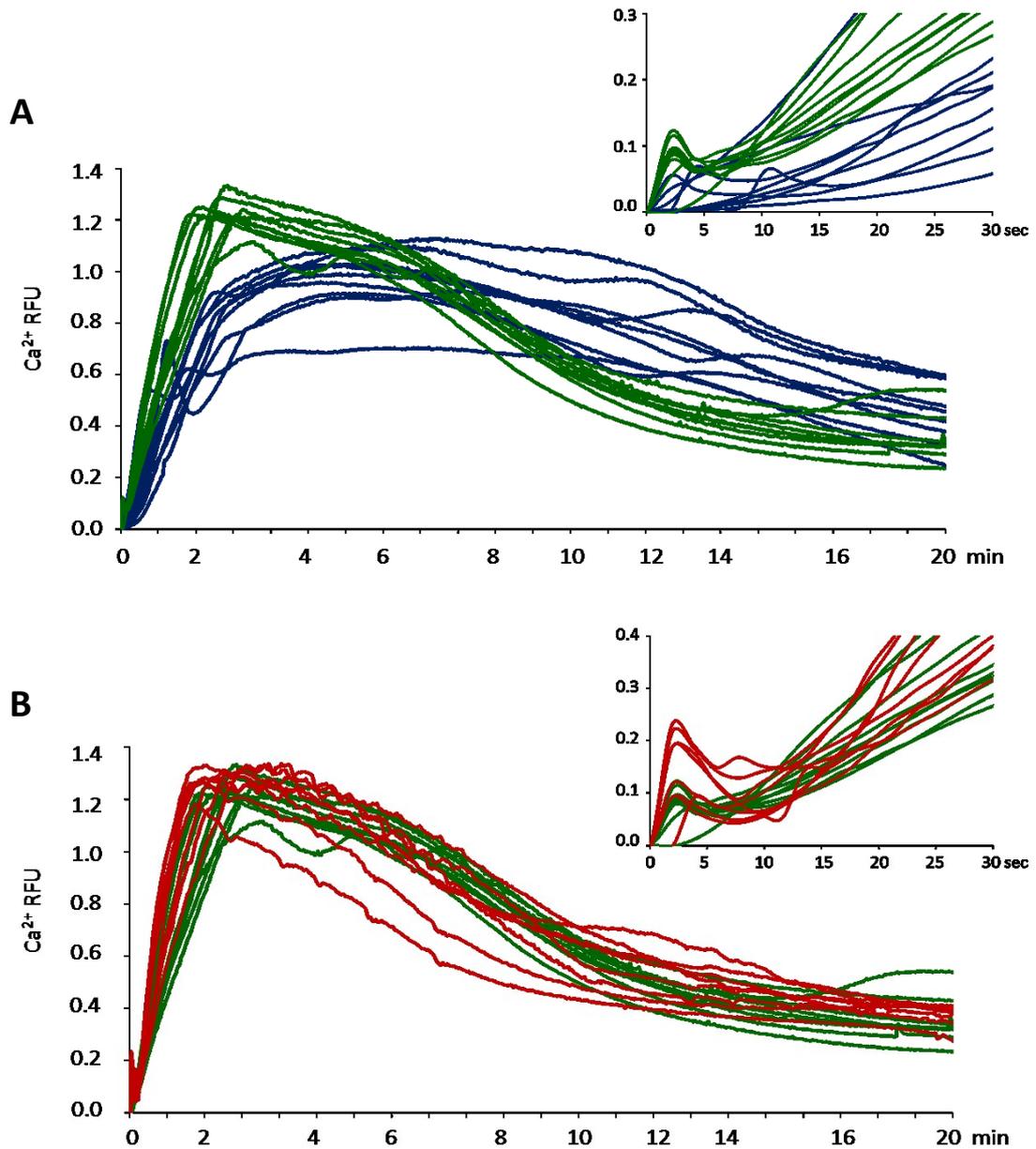


Figura V, 7. Differenze nelle dinamiche del rilascio di Ca²⁺ nelle uova a diversi stadi di maturazione. I cambiamenti dei livelli di Ca²⁺ alla fecondazione di ovociti immaturi (curve di colore blu) uova mature (curve di colore verde) o uova sovramature (curve di colore rosso). Nei riquadri: le stesse curve rappresentate su una scala temporale diversa per mostrare meglio il flash corticale e il primo aumento di Ca²⁺. Comparazione tra l'entità del rilascio di Ca²⁺ alla fecondazione alle uova maturate e fecondate nel periodo ottimale (ossia 1 ora e 10 minuti dall'aggiunta di 1-MA) rispetto agli ovociti immaturi, (A) o ad uova sovramature (ossia fecondate dopo 6 ore dall'aggiunta dell'ormone, B).

Discussione per il Capitolo V

L'idea che la polispermia, caratteristica sia di ovociti non sottoposti a stimolazione ormonale sia di uova invecchiate, possa essere legata alla particolare anatomia di una data regione sulla superficie dell'uovo, (cortex), è stata chiaramente dimostrata negli ovociti di stella di mare dove la fecondazione è stata effettuata su uova a diversi stadi della maturazione meiotica. Come accennato, la morfologia dell'ovocita cambia drasticamente nel corso della progressione meiotica, come evidenziato dalla visualizzazione della differente struttura dei microvilli e dell'actina corticale del citoscheletro. Gli ovociti immaturi arrestati allo stadio VG sono inclini alla polispermia quando fecondati e poiché non sono in grado di sollevare la membrana di fecondazione (Fig. V, 1A e 2), difettano di un efficace blocco meccanico alla polispermia (Santella et al., 2012). Anche il progredire della maturazione citoplasmatica negli ovociti di riccio di mare è accompagnato da modifiche strutturali dello strato superficiale che favoriscono la fecondazione monospermica (Runnström e Monné, 1945; Runnström, 1963). Tuttavia, la maggior parte delle uova sovramature di stella di mare, che sono quindi fecondate dopo l'estrusione del secondo globulo polare, vanno incontro ad una fecondazione polispermica, nonostante la loro capacità di sollevare correttamente la membrana di fecondazione (Fujimori e Hirai, 1979; Fig. V, 1C e 2). La spiegazione per la polispermia in queste uova sovramature potrebbe essere duplice. In primo luogo, la tendenza a manifestare polispermia potrebbe essere legata alle proprietà elettriche della membrana plasmatica. Il potenziale di riposo delle uova mature di *A. pectinifera* nella finestra temporale ottimale è molto meno negativo (- 30 mV) rispetto a quello di un ovocita immaturo allo stadio VG (- 70 mV) e delle uova sovramature (- 55 mV). È stato dimostrato in letteratura che la permeabilità della membrana al K^+ diminuisce durante la GVBD ma viene ripristinata progressivamente se la maturazione viene protratta di diverse ore oltre il periodo ottimale (Miyazaki et al., 1975). Anche il picco del potenziale di attivazione nelle uova sovramature alla fecondazione (- 4 mV) non riesce a raggiungere valori positivi come nelle uova mature nel periodo ottimale

(+ 12 mV). Quindi una immatura o alterata organizzazione strutturale della superficie che è responsabile della regolazione del potenziale di riposo di membrana degli ovociti allo stadio VG o delle uova sovramature, potrebbe rispondere al primo spermatozoo con cambiamenti lenti e non rapidi del potenziale elettrico della membrana plasmatica, inficiando il meccanismo di blocco elettrico rapido alla polispermia e favorendo l'entrata di spermatozoi sopranumerari (Miyazaki e Hirai, 1979; Dale et al., 1979; Moody e Bosma, 1985). In secondo luogo, la maggiore tendenza alla polispermia riscontrata nelle uova fecondate dopo il "periodo ottimale" potrebbe essere causata dalla mancata preparazione fisiologica da parte del citoplasma dell'uovo. Studi classici hanno indicato che la dispersione e la mescolanza del contenuto nucleare con quello del citoplasma e della zona corticale rappresentano un prerequisito essenziale per la maturazione citoplasmatica (Delage, 1901; Chambers, 1921). Terminata la GVDB, un segnale o una sostanza diffusibile precedentemente imprigionata nel nucleo, potrebbe interagire con la zona corticale dell'uovo e indurre le appropriate modifiche strutturali, essenziali affinché si realizzi una corretta attivazione dell'uovo e l'incorporazione di un singolo spermatozoo. Infatti il rilascio di Ca^{2+} dipendente dall'InsP₃ richiedeva più tempo per realizzarsi e non si accompagnava all'esocitosi dei granuli corticali nelle uova mature di *A. pectinifera* da cui era stata rimossa la VG prima dell'aggiunta di 1-MA. Così come uova maturate senza nucleo rispondevano allo spermatozoo con una risposta al calcio alterata (Hirai et al., 1971; Lim et al., 2001). Inoltre le uova sottoposte a maturazione esclusivamente nella zona corticale, attraverso la somministrazione di dosi basse di 1-MA, al di sotto della soglia necessaria per stimolare la normale ripresa meiotica, manifestavano un maggiore tasso di polispermia (Hirohashi et al., 2008). Queste uova non andavano incontro a GVBD ma esibivano normale sollevamento della membrana di fecondazione. Quindi, è ipotizzabile che sia la sottoesposizione che la sovraesposizione a segnali di origine nucleari durante la maturazione, eseguita nei tempi canonici o protratta per diverse ore, possa provocare sottili

differenze nella struttura e quindi nella funzione dell'ectoplasma delle uova, che possono rivelarsi cruciali nell'indirizzare le uova verso la polispermia.

Il posizionamento dei granuli corticali e delle altre vescicole che popolano la zona sottostante la membrana plasmatica, che si attua durante la maturazione meiotica degli ovociti può contribuire alla creazione di quel meccanismo protettivo che scherma efficacemente le uova dagli attacchi di più spermatozoi (Longo et al., 1995). Al momento della fecondazione, questi granuli e vescicole secernono il loro contenuto nello spazio perivitellino e l'estrusione del loro materiale dà luogo al pieno sollevamento della membrana di fecondazione (Fig. V, 1B). Tuttavia, evidenze sperimentali pubblicate nel laboratorio dove ho svolto la tesi, incluse quelle del mio lavoro di dottorato, dimostrano che la polispermia può avvenire anche a fronte del normale sollevamento della membrana di fecondazione, ad esempio nelle uova sovramature. Tali risultati hanno chiaramente indicato che il cosiddetto blocco meccanico apposto dal sollevamento della membrana di fecondazione non è sufficiente a garantire l'entrata di un solo spermatozoo. Possiamo ipotizzare che il meccanismo veloce e meccanico (blocco elettrico e membrana di fecondazione) deputato ad impedire l'ingresso di spermatozoi in soprannumero in queste uova possa essere stato danneggiato e non essere più pienamente funzionale. Come già detto, questo potrebbe essere causato dalla mancata o alterata riorganizzazione strutturale e quindi funzionale del cortex dell'uovo durante la maturazione dell'ovocita. Infatti una delle conseguenze morfologiche più evidenti della maturazione meiotica è rappresentata dagli estensivi cambiamenti dell'actina del citoscheletro nel cortex delle uova (Fig. V, 3). Sebbene il preciso meccanismo molecolare che conduce a tale riorganizzazione strutturale non possa essere spiegato dai risultati di questo lavoro di tesi, risulta quanto mai evidente la grande rilevanza del ruolo dell'actina nel controllo dell'interazione con lo spermatozoo e nella sua susseguente incorporazione. A fronte della diversa conformazione dei filamenti di actina a ridosso della superficie delle uova, gli ovociti polispermici allo stadio VG, le uova fecondate nella giusta finestra temporale e quindi monospermiche e le uova invecchiate

polispermiche, manifestano un differente comportamento alla fecondazione, non soltanto in termini di spermatozoi incorporati, ma anche nelle stesse dinamiche organizzative dei filamenti di actina. Nel controllo essi finiscono con il partecipare più o meno attivamente al processo di incorporazione spermatica, attuando una migrazione centripeta ed una diversa polimerizzazione in corrispondenza dei siti di ingresso degli spermatozoi, mentre gli ovociti immaturi e le uova invecchiate non sperimentano nessuno di questi fenomeni (Fig. V, 5).

I microvilli localizzati sulla superficie delle uova possono essere coinvolti nello stabilire la ricettività spermatica, in quanto negli ovociti umani invecchiati, il loro numero risulta gravemente ridotto (Santella et al., 1992). Nella stella di mare, già in passato è stata evidenziata una drastica riduzione nelle interazioni funzionali adeguate tra lo spermatozoo e le uova sottoposte al processo di invecchiamento (Chambers, 1921; Just, 1939). Studi recenti sulle uova di stella di mare hanno indicato che l'alterazione dell'organizzazione strutturale dei filamenti di actina nella zona corticale rende la superficie dell'uovo meno reattiva al primo spermatozoo fecondante e più ricettiva verso quelli successivi (Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010; Vasilev et al., 2012). Uova che presentano una iperpolimerizzazione dell'actina nella regione sottostante la membrana plasmatica, sperimentano la formazione di numerosi coni di fecondazione di forma irregolare come risultato dell'attivazione da parte di più spermatozoi. Allo stesso tempo mostrano l'instaurarsi di un legame più labile ed inefficiente con lo spermatozoo che previene la sua incorporazione nell'uovo, confermando un ruolo diretto dell'actina nell'interazione e incorporazione spermatica (Puppo et al., 2008).

Come accennato, l'actina ha un ruolo di modulazione sul rilascio di Ca^{2+} sia dai depositi intracellulari che nel suo ingresso dall'esterno (Lim et al., 2002; Nusco et al., 2006; Kyojuka et al., 2008; Chun et al., 2010), così come occorre sottolineare che l'actina del citoscheletro è anche un fattore critico nel controllo dell'esocitosi dei granuli corticali. A tale riguardo, che l'aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} fosse il solo fattore importante

per l'esocitosi (Steinhardt e Epel, 1974; Vacquier, 1975; Whitaker e Baker, 1983), è stato recentemente messo in discussione dai risultati del laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato che hanno dimostrato che, quando l'actina del citoscheletro nel cortex non si trova nella sua conformazione ottimale, l'esocitosi dei granuli corticali non si realizza nonostante si sia verificato un normale rilascio di Ca^{2+} (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010).

I risultati ottenuti in questo capitolo evidenziano una significativa differenza nelle dinamiche di rilascio di Ca^{2+} in risposta all'interazione con lo spermatozoo di uova fecondate ad un diverso stadio di maturazione. Il più delle volte i due eventi caratteristici del segnale Ca^{2+} alla fecondazione, cioè il flash corticale e la successiva onda di Ca^{2+} , sono sempre presenti, ma si evidenziano profonde discrepanze nel tempo di comparsa e di persistenza degli stessi. Avvalorando l'ipotesi dell'acquisizione di una maggiore capacità di rilasciare il Ca^{2+} con la maturazione, gli ovociti immaturi esibiscono una mancata capacità di manifestare il flash corticale nel giusto tempo, e una riduzione sia dell'ampiezza sia della velocità di propagazione dell'onda di calcio. A fronte delle numerose evidenze accumulate in letteratura (Nusco et al., 2006; Chun et al., 2010; Vasilev et al., 2012) e dei dati raccolti in questo lavoro di tesi (si vedano anche i Capitoli III e IV), l'actina del citoscheletro si configura come un candidato ideale per assicurare la normale sequenza degli eventi che caratterizza la risposta dell'uovo alla sua attivazione e che è necessaria per una normale fecondazione e sviluppo embrionale.

CAPITOLO VI

L'alterazione delle dinamiche dell'actina del citoscheletro causata dalla nicotina come fattore che induce polispermia

Risultati

6.1. La Nicotina induce polispermia nelle uova di riccio di mare secondo una modalità dose dipendente.

Nelle uova di riccio e stella di mare, è ormai ampiamente dimostrato che l'actina del citoscheletro nella regione corticale sperimenta una migrazione centripeta verso la parte interna del citoplasma durante il sollevamento della membrana vitellina alla fecondazione (Terasaki, 1996; Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010; Capitolo V). Se questa migrazione è bloccata, lo spermatozoo spesso non riesce a penetrare l'uovo (Vasilev et al., 2012). Dopo l'attivazione dell'uovo da parte dello spermatozoo, sulla superficie dell'uovo viene a formarsi una struttura specializzata chiamata "cono di fecondazione" che serve proprio a catturare lo spermatozoo e a guidarlo nel suo ingresso nella cellula. Il cono di fecondazione è costituito da una estroflessione della membrana plasmatica che contiene una grande quantità di F-actina che è in continuità con i lunghi fasci filamentosi di actina all'interno del citoplasma. Questi a loro volta stabiliscono un forte contatto con il processo acrosomiale dello spermatozoo attivato (Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010). In concomitanza con il sollevamento della membrana vitellina, si evidenzia la formazione di prolungamenti sottili della membrana plasmatica costituite da microfilamenti, che attraversano lo spazio perivitellino come a formare un'impalcatura atta a sorreggere tale membrana (Chun et al., 2010). Da ciò si deduce che l'actina del citoscheletro nella zona corticale dell'uovo svolge un ruolo chiave anche nel sollevamento della membrana di fecondazione. È interessante notare che, la perturbazione della struttura dell'actina corticale nelle uova di stella di mare con vari agenti, induce sempre interazioni multiple di

più spermatozoi con la superficie delle uova attivate (Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010). Nelle uova pre-iniettate con eparina, ad esempio, si osserva una formazione anomala della morfologia dei coni di fecondazione (a forma conica e non tonda come nei controlli), mentre le uova incubate con JAS non manifestano il normale sollevamento della membrana di fecondazione nonostante le molteplici interazioni degli spermatozoi con la superficie e un aumento dell'onda di Ca^{2+} intracellulare normale. Allo stesso modo, modificazioni dell'actina corticale causate da invecchiamento fisiologico delle uova di stella di mare, comportano una condizione di polispermia che si associa ancora una volta ad un'alterazione nella formazione dei coni di fecondazione e nel rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione (si veda Capitolo V). Appare evidente che la regolazione fine dei cambiamenti della struttura dell'actina del citoscheletro, che si verificano normalmente nel cortex di tutte le uova durante la fecondazione, possa svolgere un ruolo fondamentale nel guidare l'esocitosi dei granuli corticali e l'ingresso dello spermatozoo fecondante. Pertanto, sarà interessante studiare ed approfondire in che modo la regolazione dello stato dell'actina del citoscheletro contribuisce ad assicurare una fecondazione monospermica. A tal proposito fin dalla prima scoperta che la nicotina potesse indurre la polispermia, (Hertwig e Hertwig, 1887) questo agente è stato ampiamente utilizzato per studiare i meccanismi che controllano l'ingresso degli spermatozoi nelle uova perché è possibile, a causa del grande numero di spermatozoi, seguire la loro massiccia incorporazione nelle uova trattate (Hagstrom, 1956; Rothschild e Swann, 1950; Longo e Anderson, 1970). Purtroppo fino ad oggi il preciso meccanismo attraverso cui la polispermia si realizzi in seguito al trattamento con nicotina non è ancora noto.

Alla luce di quanto detto finora, quindi, il mio obiettivo è stato quello di indagare su una possibile interazione tra lo stato funzionale dell'actina e la polispermia indotta dalla nicotina, utilizzando come modello le uova di riccio di mare della specie *P. lividus*.

In primo luogo, ho confermato i dati presenti in letteratura (Rothschild, 1952; Longo e Anderson, 1970; Dale, 1985), che il trattamento con la nicotina induce una fecondazione

polispermica nelle uova di riccio di mare (Fig VI, 1). Infatti, come mostrato in Fig. VI, 1A, l'esposizione delle uova ad una concentrazione di nicotina pari a 6 mM induce un alto tasso di polispermia, come visualizzato dal numero di spermatozoi colorati con Hoechst 33342 incorporati nelle uova, rispetto al controllo incubato con semplice acqua distillata (il mezzo in cui la nicotina è disciolta), dove si osserva un solo spermatozoo. Ho inoltre approfondito le osservazioni sperimentali utilizzando diverse concentrazioni di nicotina, per valutare se la polispermia potesse essere influenzata in maniera dose dipendente. In effetti rispetto al controllo, (1.07 ± 0.14 , $n = 240$), il numero di spermatozoi incorporati nelle uova che subiscono un pretrattamento di 5 minuti con nicotina, risultava aumentare progressivamente all'aumentare della dose di nicotina somministrata: 1.14 ± 0.20 con 100 μM ($n = 50$); 1.23 ± 0.20 con 200 μM ($n = 50$); 1.23 ± 0.25 con 500 μM ($n = 30$, $P < 0.01$); 1.86 ± 0.54 con 1 mM ($n = 30$, $P < 0.0001$); 2.2 ± 0.59 con 1.5 mM ($n = 30$, $P < 0.0001$); 5.01 ± 2.02 con 2 mM ($n = 80$, $P < 0.0001$); 7.2 ± 1.26 con 6 mM ($n = 40$, $P < 0.01$); e infine 11.1 ± 1.94 con 20 mM ($n = 40$, $P < 0.0001$, Fig. VI, 1B).

Inoltre, mentre in tutte le uova di controllo esaminate ($n = 240$) si realizzava sempre un pieno e completo sollevamento della membrana di fecondazione (100% di frequenza), il pretrattamento con la nicotina sembrava compromettere l'esocitosi dei granuli corticali e la conseguente formazione della membrana di fecondazione. In aggiunta, mantenendo sempre una forte dipendenza dalla concentrazione di nicotina utilizzata, tutte le uova esaminate ($n = 200$) mostravano un'inibizione totale del sollevamento della membrana di fecondazione per dosi superiori a 1.5 mM (2, 6 e 20 mM, con una frequenza dello 0% per tutte le concentrazioni) e un blocco parziale per tutte le dosi utilizzate inferiori a questa soglia. Più precisamente, la frequenza di uova che manifestavano un pieno sollevamento della membrana di fecondazione diminuiva progressivamente al 50 % per uova trattate con 100 μM ($n = 50$), al 24 % con 200 μM ($n = 50$), per poi scomparire del tutto con dosi di 500 μM e 1 mM ($n = 60$), e ripresentarsi con un blando 3.3 % con un trattamento di 1.5 mM ($n = 30$). Le restanti percentuali erano talvolta rappresentative di uova che

manifestavano un incompleto o ridotto sollevamento (18 % per uova trattate con 100 μ M; 22 % con 200 μ M; 33.3 % con 500 μ M; 13.3 % con 1 mM; 6.6 % con 1.5 mM), (Fig VI, 1B).

Sulla base di questi dati, la tendenza alla polispermia causata dall'esposizione alla nicotina non può essere semplicemente conseguente al mancato sollevamento della membrana vitellina, poiché in tutte le uova esaminate, dove il sollevamento della membrana era completamente bloccato con concentrazioni uguali o superiori a 2 mM, il numero degli spermatozoi incorporati non era lo stesso ma continuava ad aumentare all'aumentare della concentrazione. Ciò suggerisce che la nicotina possa interferire con un meccanismo addizionale per il blocco alla polispermia, diverso da quello considerato.

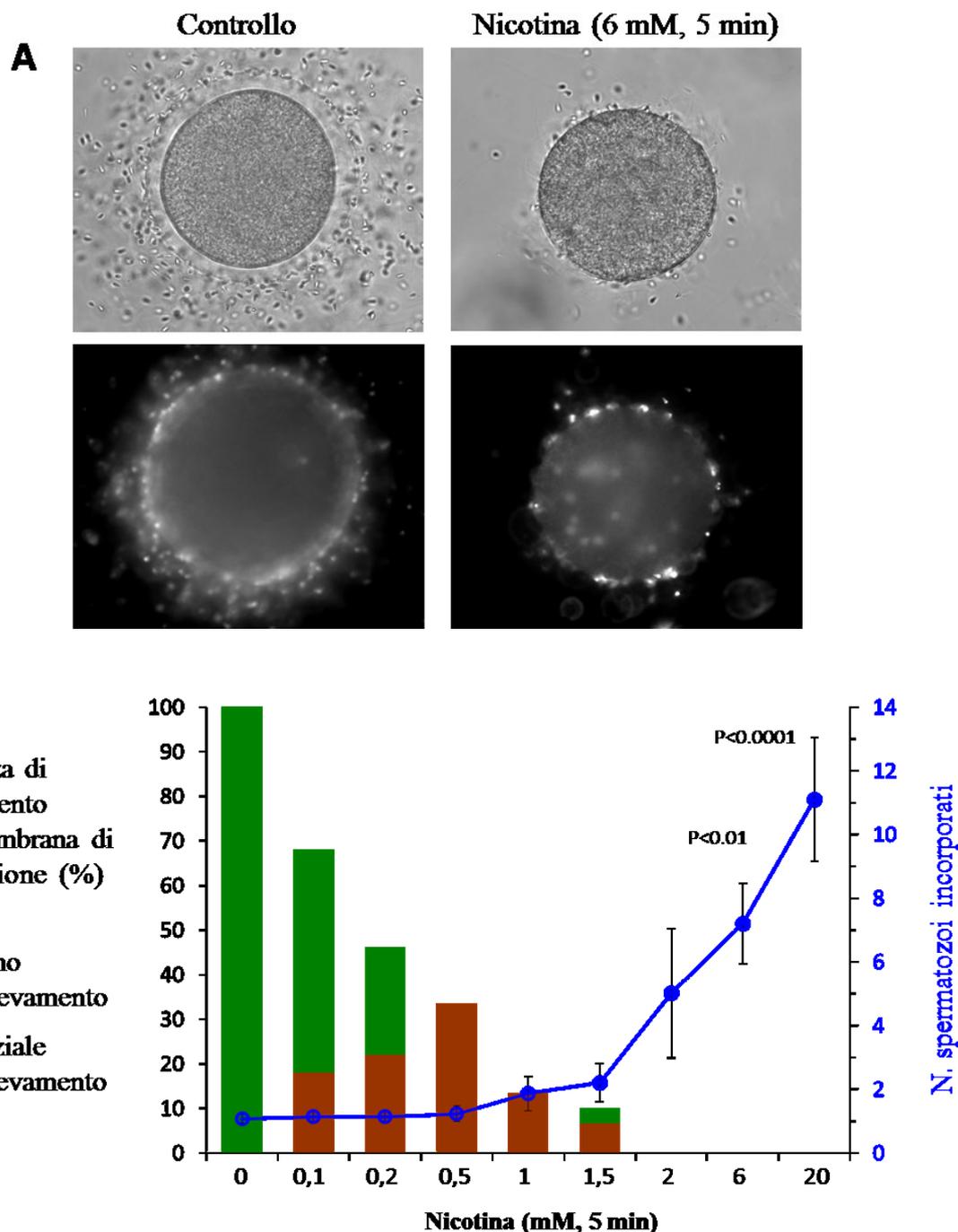


Figura VI, 1. La Nicotina induce polispermia nelle uova di *P. lividus* in maniera dose dipendente. (A) Le uova di riccio trattate con nicotina (6 mM) per 5 min, sono state fecondate con spermatozoi pre-incubati con Hoechst 33342 in presenza di nicotina (6 mM), e monitorati con fotocamera CCD. Gli spermatozoi incorporati sono stati visualizzati con luce UV (330 nm) nei riquadri in basso mentre immagini a luce trasmessa evidenziano l'assenza del sollevamento della membrana di fecondazione nelle uova trattate rispetto al controllo (riquadri in alto). Si noti che le uova trattate con nicotina presentano un maggior numero di spermatozoi incorporati (pannello di destra), mentre le uova controllo non trattate hanno un solo spermatozoo (pannello a sinistra). (B) Gli istogrammi mostrano la percentuale di uova che manifestano un pieno (barre verdi) o parziale (barre rosse) sollevamento della membrana di fecondazione in seguito al trattamento con concentrazioni crescenti di nicotina per un tempo fisso (5 min), mentre il grafico a linee indica il numero di spermatozoi incorporati alla corrispondente concentrazione.

6.2. La nicotina altera profondamente la struttura dell'actina del citoscheletro e ne compromette le normali dinamiche alla fecondazione.

Come precedentemente dimostrato (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008; Capitolo III), il mancato sollevamento della membrana di fecondazione implica spesso una possibile alterazione dell'organizzazione strutturale dell'actina corticale del citoscheletro. Pertanto, per ottenere ulteriori delucidazioni in merito al ruolo che la F-actina potrebbe svolgere nella regolazione del blocco alla polispermia nelle uova di riccio di mare, ho esaminato se il trattamento con nicotina potesse aver in qualche modo apportato modifiche alla struttura dell'actina del citoscheletro. A tal fine, le uova sono state microiniettate con falloidina coniugata con AlexaFluor 568 (10 μ M, concentrazione nella pipetta) e monitorate nel tempo per rilevare eventuali cambiamenti nella struttura dell'actina del citoscheletro mediante il microscopio confocale. Infatti, le immagini in fluorescenza acquisite pochi minuti dopo la microiniezione hanno rivelato un drammatico riarrangiamento dell'actina del citoscheletro nella zona adiacente la membrana plasmatica (Fig. VI, 2). Le fibre di actina nel cortex presentano una massiva polimerizzazione, con un ispessimento evidente già dopo soli 5 minuti dall'aggiunta della nicotina (20 mM) (Fig. VI, 2 pannello inferiore, freccia). Questa riorganizzazione del citoscheletro era del tutto assente nelle uova di controllo osservate dopo 5 minuti dall'aggiunta soltanto di acqua di mare e la situazione rimaneva pressoché immutata dopo che erano trascorsi 30 minuti (Fig. VI, 2, pannello superiore). Infatti non si osservava alcun accenno di polimerizzazione corticale delle fibre di actina, ma solo un reticolo disorganizzato di filamenti nel citoplasma. Ho osservato un ispessimento più marcato nella zona corticale delle uova trattate anche quando ho utilizzato una concentrazione più bassa di nicotina (2mM). L'ispessimento corticale si realizzava più tardivamente, rendendosi apprezzabile intorno ai 45 minuti di incubazione e manifestamente evidente dopo 1 ora (dati non mostrati). Queste osservazioni mi hanno indotto ad ipotizzare che l'alterazione strutturale dell'actina del citoscheletro nella regione

corticale delle uova trattate con la nicotina potesse essere in qualche modo collegata alla marcata polispermia manifestata alla fecondazione. Al fine di testare questa possibilità, ho microiniettato le uova con falloidina-AlexaFluor 568 ad una concentrazione (10 μ M nella pipetta), che non interferisce con le normali dinamiche di polimerizzazione e depolimerizzazione dei filamenti di actina, ed ho monitorato i cambiamenti nel tempo mediante l'uso del microscopio confocale, in corrispondenza del piano equatoriale delle uova. Prima di fecondare, però, ho trasferito le uova, trattate con nicotina (20 mM) o acqua distillata (il mezzo in cui la nicotina è disciolta) per 5 minuti, in acqua di mare fresca per evitare l'effetto nocivo dell'agente sugli spermatozoi. Come si osserva in Fig. VI, 3, il coordinato movimento centripeto delle fibre di actina, polimerizzate in cicli ripetuti nella zona corticale e caratteristico della fecondazione delle uova di controllo, scompariva del tutto nelle uova trattate con nicotina, che non mostravano alcuna polimerizzazione corticale. D'altra parte si osservava sulla superficie delle uova la formazione di protuberanze citoplasmatiche di notevoli dimensioni (i coni di fecondazione), prodotti da un'intensa polimerizzazione dei filamenti di actina in corrispondenza dei siti di ingresso dei numerosi spermatozoi, in maniera disorganizzata e apparentemente priva di regolazione. Questi risultati evidenziano una profonda alterazione della struttura dell'actina del citoscheletro, in particolare nella zona sotto corticale, delle uova trattate con nicotina che diventano polispermiche. Infatti tale alterazione inficia la bontà delle dinamiche strutturali e quindi funzionali che normalmente accompagnano la fecondazione monospermica.

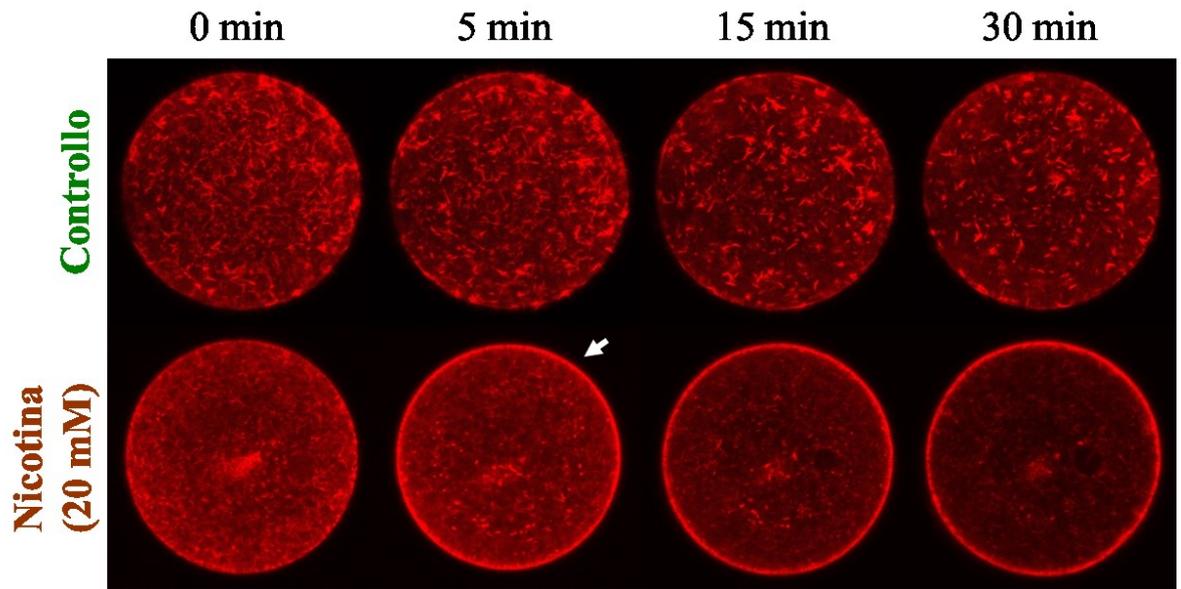
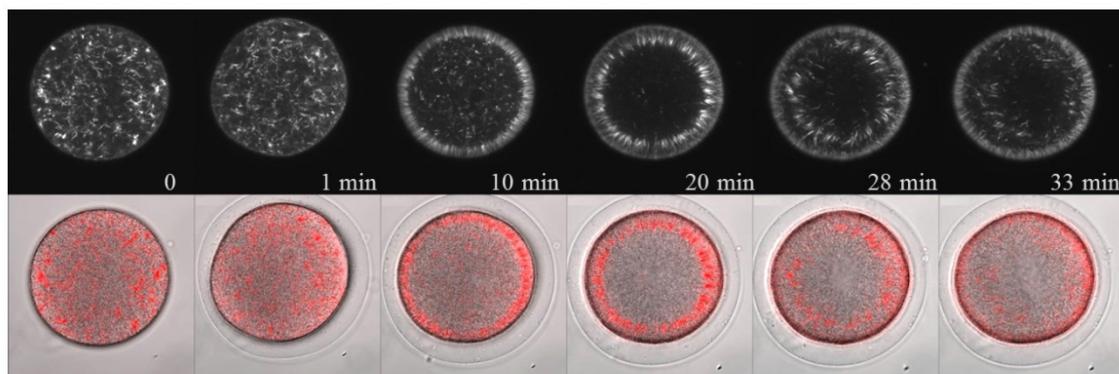


Figura VI, 2. L'incubazione delle uova con nicotina induce cambiamenti apprezzabili nella struttura dell'actina del citoscheletro del cortex delle uova di riccio di mare. Le uova di *P. lividus*, microiniettate con falloidina-AlexaFluor 568 (10 μ M nella pipetta), sono state trattate con 20 mM nicotina e acqua distillata come controllo per valutarne gli effetti. Per entrambi i trattamenti, il momento immediatamente precedente l'aggiunta della sostanza è indicato come $t = 0$, e le immagini dell'actina nei successivi intervalli di tempo sono state acquisite col microscopio confocale in corrispondenza del piano equatoriale. Si noti che in seguito al trattamento con nicotina l'actina dello strato corticale è rapidamente iperpolimerizzata dopo soli 5 minuti di incubazione, mentre nel controllo non si evidenziano significative differenze nel corso del tempo.

A Controllo



B Nicotina (20 mM)

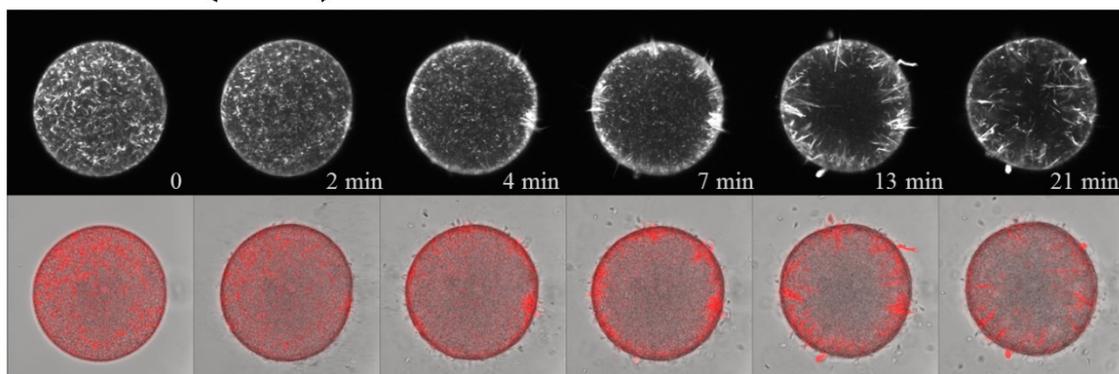


Figura VI, 3. L'incubazione delle uova con nicotina perturba profondamente le dinamiche di riorganizzazione strutturale dell'actina alla fecondazione delle uova di *P. lividus*. Le uova di *P. lividus*, microiniettate con falloidina-AlexaFluor 568 (10 μ M nella pipetta), sono state incubate con 20 mM nicotina o con acqua distillata (come controllo) per 5 min e, trasferite in acqua di mare fresca, sono state fecondate dopo 5 min. Immagini in microscopia confocale dei cambiamenti strutturali dell'actina del citoscheletro negli intervalli di tempo indicati in un uovo controllo (A, pannello superiore) e un uovo trattato con 20 mM nicotina per 5 min prima di essere fecondato (B, pannello superiore); nei pannelli inferiori sovrapposizione delle immagini confocali e di quelle a luce trasmessa delle stesse uova negli stessi tempi chiave. La fine riorganizzazione dei filamenti di actina risulta gravemente compromessa nelle uova sottoposte al trattamento con nicotina (B). Si notino inoltre le numerose protuberanze sulla superficie prodotte dalla polimerizzazione dell'actina nei siti di ingresso degli spermatozoi in corrispondenza dei coni di fecondazione.

6.3. La Nicotina altera le dinamiche di rilascio del Ca^{2+} alla fecondazione.

Considerati gli effetti dell'esposizione delle uova alla nicotina sulla struttura stessa dell'actina del citoscheletro e sulle dinamiche di incorporazione spermatica, ho voluto indagare le conseguenze di queste alterazioni strutturali sulle modalità di attivazione delle uova trattate con nicotina. A tal fine ho incubato le uova con diverse dosi di nicotina, sempre in un lasso di tempo breve (5 min) e ho analizzato i cambiamenti nei livelli di Ca^{2+} intracellulare dopo l'aggiunta degli spermatozoi all'acqua di mare contenente nicotina in cui le uova erano sospese. La polispermia indotta dalla nicotina, ampiamente documentata nel paragrafo precedente, si traduce nella genesi di onde multiple di Ca^{2+} solo raramente e in maniera non significativa con 1.3 ± 0.57 onde con 500 μM nicotina ($n = 3$), 1.6 ± 0.57 onde con 1 mM ($n = 3$) e 1.31 ± 0.63 onde con 6 mM ($n = 13$) rispetto al controllo con una sola onda ($n = 16$). Al contempo il numero delle uova capaci di manifestare il flash corticale rimane alto per un trattamento con 500 μM o 1 mM (Fig VI, 4A), salvo subire un drastico decremento con 6 mM, dove solo 4 uova su 13 manifestano tale rilascio di Ca^{2+} corticale.

Analizzando i dati relativi all'ampiezza del flash corticale, si osserva una significativa riduzione nelle uova trattate con 1 mM nicotina (0.039 ± 0.003 RFU, ossia $55.43 \pm 4.4\%$, $n = 3$) rispetto al controllo (0.07 ± 0.007 RFU, inteso come $100 \pm 16.1\%$, $n = 17$), e osservando i dati ottenuti con le altre concentrazioni, si evince un generale decadimento dipendente dalla concentrazione di nicotina utilizzata. Infatti, come si osserva dalle Fig. VI, 4B e 4C, il valore raggiunto dalle uova incubate con 500 μM nicotina era leggermente superiore a quello precedente, ($82.9 \pm 8.2\%$, $n = 3$), mentre il valore raggiunto dalle uova trattate con 6 mM nicotina calava drasticamente fino al $4.9 \pm 4.2\%$, ($n = 13$, $P < 0.01$). Per quanto riguarda la successiva onda di Ca^{2+} , ho misurato invece un lieve aumento della sua ampiezza massima nelle uova trattate con 1 mM nicotina (0.64 ± 0.02 RFU, o $117.9 \pm 4.2\%$) rispetto ai valori misurati nel controllo (0.54 ± 0.03 RFU, o $100 \pm 8.3\%$, $P < 0.01$), ma nessuna alterazione significativa per le altre concentrazioni esaminate. Un aspetto

interessante riguarda il tempo di decadimento del segnale Ca^{2+} che nelle uova di controllo si realizzava generalmente dopo circa 10 minuti (592.8 ± 19.3 sec, Fig. VI, 4B curve di colore verde) dall'inizio del primo aumento rilevabile, mentre nelle uova sottoposte a trattamento con nicotina risultava più veloce e si arrestava dopo circa 2 minuti (117.58 ± 4.2 sec, $P < 0.0001$, Fig. VI, 4B curve di colore marrone). Come risultato, i livelli di Ca^{2+} in queste uova raggiungevano un plateau, mantenendosi significativamente più elevati rispetto ai livelli delle uova di controllo corrispondenti. Per quantificare questo dato, ho estrapolato i due tratti lineari nella fase di caduta delle curve prima e dopo il brusco cambiamento di direzione all'inizio del plateau, ottenendo così il livello di Ca^{2+} nel punto di incontro delle due rette e normalizzando poi con l'ampiezza del picco di Ca^{2+} . Il valore del plateau così definito era significativamente più alto nelle uova pretrattate con 1 mM nicotina (0.25 ± 0.03) rispetto alle uova controllo (0.06 ± 0.02 , $P < 0.01$), indicando che gli ioni Ca^{2+} mobilizzati alla fecondazione sono riassorbiti dal citosol con meno efficienza o capacità nelle uova pretrattate con quella concentrazione di nicotina. Per quanto riguarda le altre due concentrazioni prese in esame (500 μM e 6 mM), non è stato possibile osservare il verificarsi dello stesso fenomeno. Complessivamente, questi dati dimostrano che il trattamento delle uova di riccio di mare con nicotina incide profondamente sulle dinamiche di rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione.

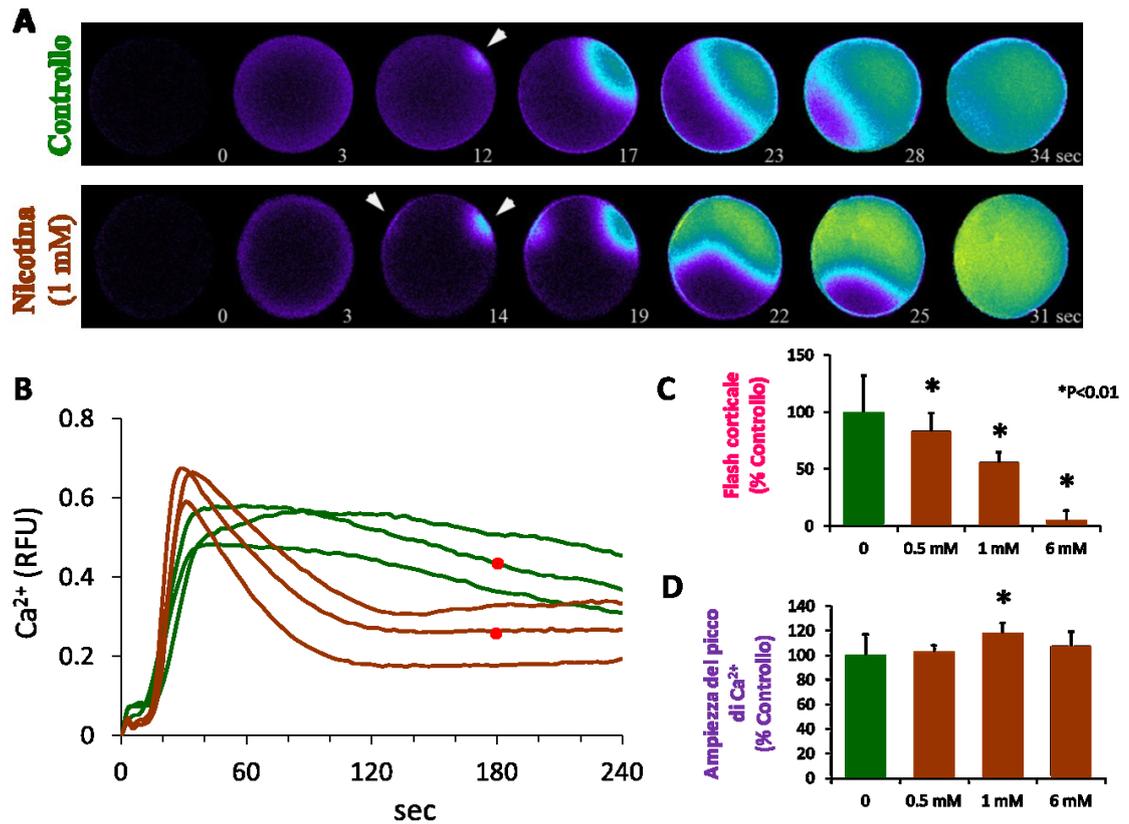


Figura VI, 4. La Nicotina altera le dinamiche di rilascio di Ca²⁺ alla fecondazione delle uova di *P. lividus*. Le uova di riccio di mare sono state microiniettate con una miscela di Calcium Green e Rhodamine Red circa 10 minuti prima di effettuare l'esperimento e, dopo 5 min di incubazione con la nicotina, fecondati nello stesso mezzo al fine di misurare i cambiamenti nei livelli di Ca²⁺ nel tempo mediante fotocamera CCD. (A) Le immagini di fluorescenza relativa rappresentano la somma complessiva degli aumenti di Ca²⁺ in seguito all'interazione con gli spermatozoi in intervalli di tempo selezionati di un uovo controllo e di un uovo trattato con 1 mM di nicotina per 5 min. Il tempo immediatamente precedente al primo segnale Ca²⁺ rilevabile è stato impostato come t = 0 per facilitare la comparazione. I siti di interazione spermatica corrispondenti ai punti di partenza dell'onda sono evidenziati dalle frecce. (B) I cambiamenti del livello intracellulare di Ca²⁺ nel tempo sono stati monitorati dopo l'aggiunta degli spermatozoi nel controllo (curve di colore verde) e nelle uova pretrattate con 1 mM nicotina (curve di colore marrone). Le curve delle uova le cui onde di Ca²⁺ sono rappresentate nel pannello A sono state evidenziate con piccoli cerchi rossi. (C) Gli istogrammi rappresentano in percentuale l'ampiezza del flash corticale delle uova trattate con concentrazioni crescenti di nicotina rispetto al controllo (100 ± 16.1 %), che risulta diminuire in maniera dose dipendente. (D) Gli istogrammi rappresentano l'ampiezza del picco dell'onda in percentuale delle uova trattate con concentrazioni crescenti di nicotina rispetto al controllo (100 ± 8.3 %).

6.4. La nicotina induce polispermia nelle uova di riccio di mare secondo un meccanismo indipendente dai AChR.

Le vie di trasduzione del segnale mediate dai recettori colinergici e tutti i relativi componenti, sono presenti non solo negli individui adulti ma anche nei tessuti embrionali sia degli invertebrati che dei vertebrati ben prima della differenziazione delle cellule nervose e muscolari (Buznikov 1984, 1987; Falugi, 1993). I dati a sostegno di questa idea si basano su misurazioni elettrofisiologiche degli effetti dell'applicazione dell'acetilcolina (ACh) sulla superficie cellulare di ovociti di *Xenopus* e umani (Kusano et al., 1982; Dascal e Landau, 1980; Eusebi et al., 1984), e soprattutto dati che segnalano la presenza di componenti del sistema colinergico in stadi embrionali precoci, come la presenza di ACh e dell'enzima acetilcolina esterasi nello stadio della prima divisione, di blastula e di gastrula degli embrioni di pesce (Fluck e Shih, 1981; Fluck, 1982). Così come la presenza di acetilcolina esterasi nella regione periferica dell'uovo e dei blastomeri nei primi stadi embrionali del riccio di mare (Falugi et al., 1989). Inoltre la somministrazione di ACh negli embrioni di pollo allo stadio di gastrula comportava l'aumento dei livelli di GMP ciclico e di Ca^{2+} , testimoniando l'esistenza di recettori muscarinici in questa specie (Laasberg et al., 1987). Infine è stata dimostrata l'esistenza di recettori nicotinici funzionali di tipo neurale (nAChR) sulla membrana plasmatica delle uova di riccio di mare (Ivonne e Chambers, 1997).

In considerazione di questi dati e dei risultati precedentemente mostrati, che evidenziano il potenziale ruolo regolatorio dei neurotrasmettitori durante la fecondazione, nelle fasi iniziali di divisione cellulare, nonché nelle fasi successive dell'embriogenesi, la capacità della nicotina di indurre polispermia potrebbe ricondursi ad un meccanismo di trasduzione del segnale mediante il legame con i recettori nicotinici e muscarinici localizzati sulla superficie delle uova. Pertanto ho voluto testare la capacità di due agonisti per gli AChR, l'acetilcolina ed il carbacolo, di alterare le normali dinamiche di incorporazione spermatica nelle uova di riccio di mare, al pari di quanto fatto dalla nicotina.

Come mostrato in Fig. VI, 5, l'esposizione delle uova ad alte concentrazioni di ACh e carbacolo non incrementa significativamente il numero di spermatozoi incorporati rispetto al controllo incubato con acqua distillata, dove si evidenzia una totale monospermia in tutte le uova esaminate ($n = 40$). Si contano infatti 1.03 ± 0.08 spermatozoi incorporati in seguito ad un pretrattamento di 5 minuti con 6 mM ACh ($n = 40$), 1.12 ± 0.32 spermatozoi con 20 mM ACh ($n = 40$) e totale monospermia per le altre concentrazioni utilizzate (1 mM ACh, 1mM e 6 mM Carbacolo, $n = 120$). Un caso emblematico è rappresentato dai risultati ottenuti con la dose più alta di Carbacolo, ossia 20 mM, dove l'incorporazione spermatica talvolta fallisce facendo precipitare il numero medio di spermatozoi incorporati a 0.57 ± 0.25 , ($n = 40$, $P < 0.0001$), e parallelamente si ha una riduzione della frequenza delle uova con il pieno sollevamento della membrana di fecondazione (32.5 % e 5 % solo parziale). Anche osservando gli altri dosaggi, però, si evince che la frequenza di sollevamento dello strato vitellino è virtualmente la stessa rispetto al controllo esaminato (80 % e 20 % parziale) e nel caso in cui essa si riduca, come nel pretrattamento con 6 mM ACh (15 % e 32.5 % parziale), ancora una volta non si accompagna ad un aumento del numero di spermatozoi incorporati. Alla luce di questi riscontri negativi sulla possibilità di riprodurre la polispermia indotta dalla nicotina attraverso la somministrazione degli agonisti dei recettori nicotinici, ho provato a verificare l'effetto contrario, ossia se l'inibizione di questi recettori potesse in qualche modo bloccare o comunque alleviare l'eccessiva incorporazione di spermatozoi soprannumerari nelle uova sottoposte a trattamento inibitorio. A tal proposito ho utilizzato due inibitori dei recettori colinergici di tipo neurale, il Mecamylamine e lo Hexamethonium, ed un inibitore per il tipo muscolare, il methyl methyllycaconitine o MLA. Come si osserva in Fig. VI, 6A la somministrazione dei soli inibitori 5 minuti prima della fecondazione non induceva polispermia in nessuna delle due concentrazioni selezionate, registrando una media di 1.07 ± 0.017 e 1.05 ± 0.11 spermatozoi incorporati con 10 e 100 μ M Hexamethonium rispettivamente; di 1.02 ± 0.08 con 10 μ M MLA; e di totale monospermia con 100 μ M MLA ed ambedue le dosi di

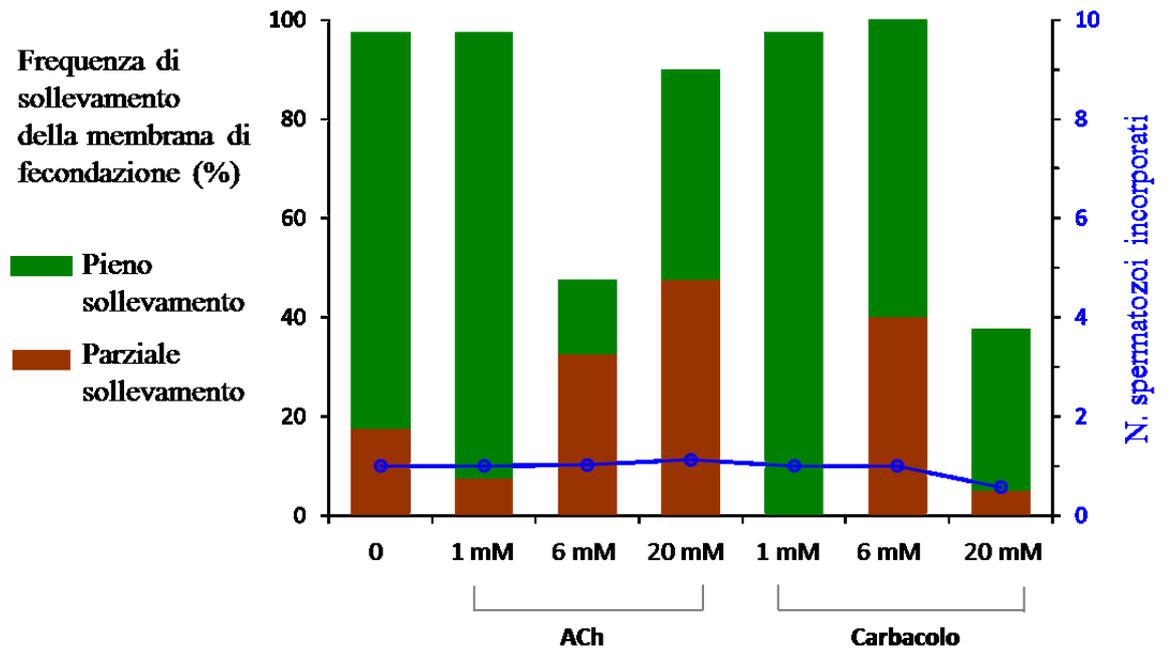


Figura VI, 5. I classici agonisti dei AChR (Acetilcolina e Carbacolo) non riproducono la tendenza alla polispermia indotta dall'esposizione alla Nicotina. Gli istogrammi mostrano la percentuale di uova che manifestano un pieno (barre verdi) o parziale (barre rosse) sollevamento della membrana di fecondazione in seguito al trattamento con concentrazioni crescenti di 2 agonisti classici dei AChR per un tempo fisso (5 min), mentre il grafico a linee indica il numero di spermatozoi incorporati alla corrispettiva concentrazione. Si noti che nonostante i composti abbiano un parziale effetto sull'incidenza di un completo sollevamento della membrana di fecondazione, il numero di spermatozoi incorporati rimane pressoché invariato rispetto al controllo.

Mecamylamine. Anche guardando al sollevamento della membrana, non si registravano inibizioni significative, eccezion fatta per la dose più alta di MLA dove appariva totalmente compromesso, ma ancora una volta questo fenomeno non si accompagnava ad una condizione di polispermia.

A questo punto ho provveduto a testare l'effetto inibitorio di queste sostanze sulla manifesta polispermia causata dalla somministrazione di nicotina, scegliendo una concentrazione di 2 mM, è quella più bassa capace di inibire totalmente il sollevamento della membrana di fecondazione e contemporaneamente indurre un alto tasso di polispermia (Fig. VI, 1B). Quindi, ho prima incubato le uova con una delle due dosi selezionate di ciascun inibitore per 5 minuti, dopodiché ho aggiunto nel mezzo la nicotina (2 mM) ed ho aggiunto gli spermatozoi dopo altri 5 minuti di incubazione.

Come mostrato in Fig. VI, 6B, la somministrazione preventiva di nessuno di questi inibitori riusciva a ridurre il numero di spermatozoi incorporati se comparata alla sola somministrazione di 2 mM Nicotina (8.55 ± 1.27 , $n = 120$), sia nel caso di 100 μM (10.23 ± 1.68 , $n = 40$, $P < 0.01$) o 10 μM Mecamylamine (9.48 ± 1.52 , $n = 40$); sia nel caso di 100 μM (9.83 ± 1.49 , $n = 40$) o 10 μM Hexamethonium (8.7 ± 1.69 , $n = 40$); e sia nel caso di 100 μM (7.15 ± 1.19 , $n = 40$) o 10 μM MLA (7.1 ± 1.13 , $n = 40$, $P < 0.01$). Inoltre permaneva la totale inibizione del sollevamento della membrana di fecondazione operata dalla nicotina (dati non mostrati).

Complessivamente questi risultati suggeriscono che gli effetti della nicotina sull'incorporazione spermatica e sull'esocitosi dei granuli corticali non sono dovuti al legame della stessa con i recettori nicotinici localizzati sulla superficie delle uova, ma sono imputabili ad un altro meccanismo di azione indipendente.

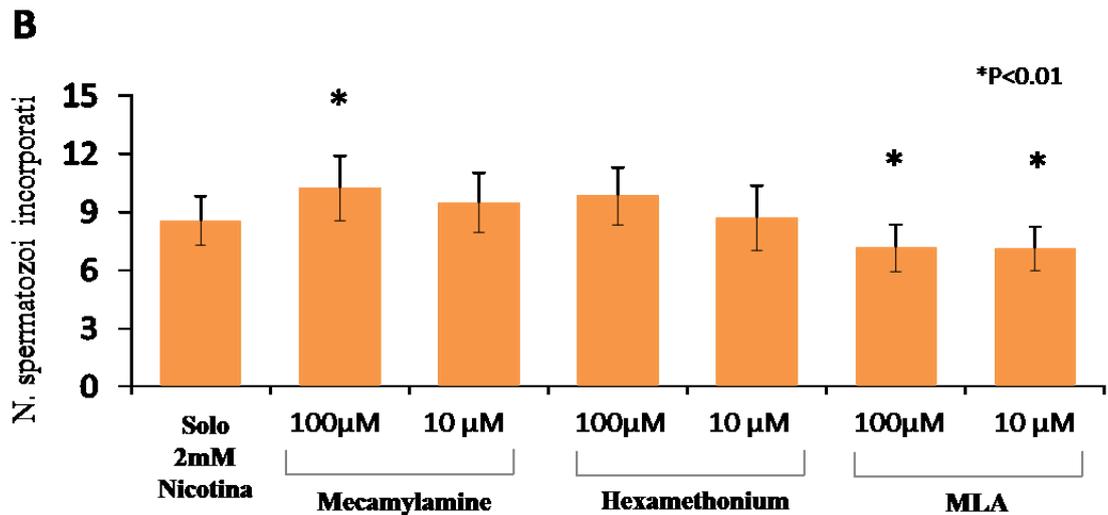
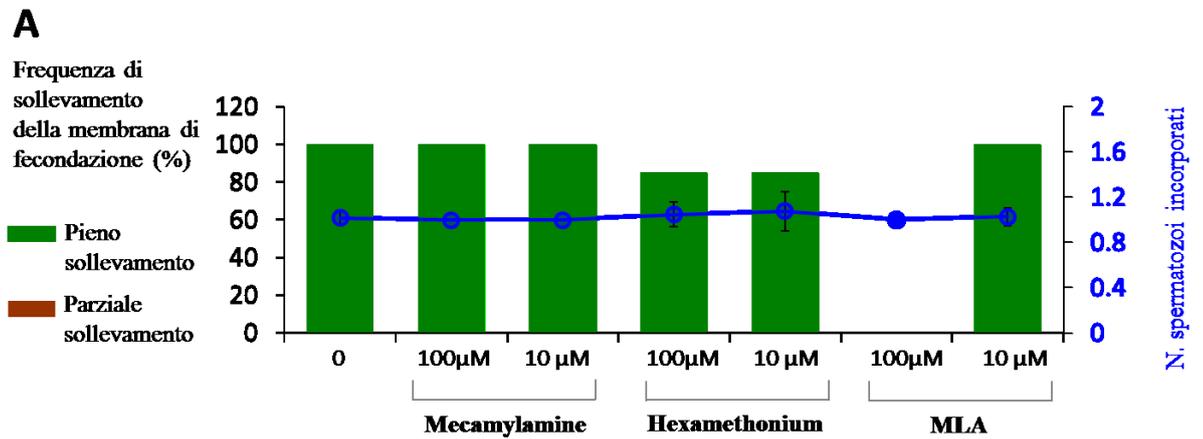


Figura VI, 6. La somministrazione di 3 inibitori dei AChR non induce polispermia di per sé e non è in grado di bloccare la tendenza alla polispermia causata dal trattamento con la Nicotina. (A) Gli istogrammi mostrano la percentuale di uova che manifestano un pieno (barre verdi) o parziale (barre rosse) sollevamento della membrana di fecondazione in seguito al trattamento con due diverse concentrazioni (100 e 10 μ M) di 3 antagonisti dei AChR per un tempo fisso (5 min), mentre il grafico a linee indica il numero di spermatozoi incorporati alla corrispettiva concentrazione. Si noti che in seguito al trattamento con questi composti, il sollevamento efficiente della membrana di fecondazione non risulta inficiato (ad eccezione del caso di 100 μ M MLA, dove si osserva una totale inibizione), ma il numero di spermatozoi incorporati rimane pressoché invariato rispetto al controllo (1.02 ± 0.06 , $n = 120$). (B) Le uova di *P. lividus* sono state incubate con i diversi inibitori alle concentrazioni indicate per 5 min dopodiché è stata aggiunta la nicotina (2 mM) e dopo altri 5 min sono state fecondate nello stesso mezzo. Gli istogrammi rappresentano il numero di spermatozoi incorporati in ciascun esperimento.

6.5. La nicotina interferisce con le dinamiche di polimerizzazione e depolimerizzazione della F-actina *in vitro*.

Alla luce dei risultati negativi ottenuti con gli agonisti e gli antagonisti dei AChR, che escludono il coinvolgimento di questi ultimi nella capacità della nicotina di indurre polispermia, e in virtù dell'evidenza sperimentale che vede l'actina del citoscheletro subire profonde modifiche in seguito al trattamento con la nicotina, ho indagato la possibilità dell'esistenza di un meccanismo d'azione alternativo alla via di trasduzione del segnale mediato dai recettori colinergici, che coinvolgesse proprio l'actina del citoscheletro.

A tal proposito, ho verificato la capacità della nicotina di interferire con il processo di polimerizzazione e depolimerizzazione dei filamenti di actina mediante un saggio *in vitro*. Per prima cosa ho condotto un test di polimerizzazione dei filamenti di actina pirene, preparando una soluzione di monomeri di G-actina, secondo le istruzioni riportate nel kit della ditta Cytoskeleton utilizzato per il saggio, e misurando l'aumento della fluorescenza emessa in seguito all'avvenuta polimerizzazione mediante un fluorimetro collegato ad un computer, fornito di un software specifico per l'acquisizione dei dati. Ho così confrontato l'effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di nicotina nell'alterazione delle dinamiche di polimerizzazione rispetto all'*actin-binding protein* profilina, che *in vitro* ha un'azione inibitoria solo se aggiunta in un rapporto di molarità pari a quello del substrato, e del semplice buffer di reazione che non interferisce con il normale processo di polimerizzazione. Come si osserva dalla Fig. VI, 7A usando una concentrazione bassa di nicotina (2.4 μ M) il valore massimo di fluorescenza raggiunto era di 12263 ± 728.62 RFU (n = 3), quindi leggermente più alto di quello raggiunto dalla profilina (9549.67 ± 651.57 RFU, n = 3) e dal buffer (9676.67 ± 278.25 RFU, n = 3, P < 0.05). Inoltre il tempo necessario a raggiungere il *plateau* rimaneva pressoché invariato, segnando 4.7 ± 0.17 minuti rispetto ai 4.3 ± 0.16 minuti della profilina e i 4.7 ± 0.09 minuti nel caso del buffer. Esaminando però i dati ottenuti con una concentrazione molto alta di nicotina, (20 mM), che è capace di causare quei drammatici cambiamenti nella struttura organizzativa

dell'actina anche durante la fecondazione (Fig. VI, 2 e 3), risultava evidente che il valore massimo di fluorescenza raggiunto era molto più basso (4848.33 ± 359 RFU, $n = 3$, $P < 0.001$) e richiedeva un tempo molto maggiore (7.65 ± 0.86 minuti, $P < 0.05$), indicando una marcata azione nell'alterare le dinamiche di polimerizzazione dell'actina. Al fine di valutare gli effetti della nicotina anche sulla depolimerizzazione dei filamenti di actina, ho effettuato un ulteriore saggio *in vitro*, in cui l'avvenuta depolimerizzazione viene evidenziata dal decadimento del segnale di fluorescenza emesso. Ho usato come controllo l'*actin-binding protein* cofilina, una proteina che legandosi all'actina è responsabile dell'accelerazione del processo di depolimerizzazione *in vitro*. In questo caso, la somministrazione della sola nicotina non sembrava influenzare la depolimerizzazione, in quanto la diminuzione progressiva della fluorescenza misurata era del tutto paragonabile a quella che avveniva per il decadimento spontaneo del segnale emesso in seguito all'aggiunta del buffer, come si evidenzia dall'analisi della velocità massima di decadimento di -4022 ± 111 RFU/min nel caso di $2.4 \mu\text{M}$ nicotina ($n = 6$) e di -3437.5 ± 209 RFU/min nel caso di $200 \mu\text{M}$ nicotina ($n = 6$) rispetto a quella del buffer (-3271.4 ± 163.9 RFU/min, $n = 11$). Utilizzando la cofilina, invece, si assisteva ad una veloce diminuzione del segnale con il raggiungimento di una fase di *plateau*, in corrispondenza della quale tutta l'actina del campione originava un livello basale di fluorescenza, dopo circa 12 minuti dall'inizio dell'esperimento, perché presente in forma monomericamente (-2002.5 ± 66.1 RFU/min, $n = 4$, Fig. VI, 7B curva di colore giallo). È interessante notare che quando ho aggiunto queste concentrazioni di nicotina un minuto prima della somministrazione della cofilina, ho registrato una diminuzione della velocità di decadimento della curva (-2089 ± 299.81 RFU/min, $n = 4$, $P < 0.0001$) che ha richiesto un tempo molto più lungo per arrivare al *plateau* (40 min circa), Quando invece la cofilina è stata aggiunta allo stesso tempo della nicotina non si sono osservate differenze rispetto ai dati ottenuti con la somministrazione della sola cofilina (-1974 ± 35 RFU/min, $n = 4$, $P < 0.001$, Fig. VI, 7B curve di colore rosso e viola). L'effetto depolimerizzante della cofilina

veniva inibito anche attraverso l'utilizzo di una dose più elevata di nicotina (20 mM) che sembrava addirittura stabilizzare il filamento e spingerlo verso la polimerizzazione, sia quando aggiunta 1 minuto prima della cofilina (2637.65 ± 137.5 RFU/min, $n = 4$), come eseguito per le altre concentrazioni, sia se somministrata singolarmente (383.06 ± 643.5 RFU/min, $n = 4$, $P < 0.0001$) (Fig. VI, 7C). I risultati ottenuti suggeriscono una possibile interazione della nicotina in prossimità del sito di legame della cofilina sul filamento stesso, tale da impedirgli l'accesso, oppure in alternativa la nicotina potrebbe interagire in qualche modo con la stessa cofilina rendendola inattiva ed incapace di occupare il suo sito specifico sul filamento. Tali ipotesi non possono essere però confermate sulla base di questi esperimenti e necessitano di ulteriori indagini per essere chiarite. Tuttavia sulla base dei risultati descritti, è lecito affermare che la nicotina alteri significativamente le dinamiche di depolimerizzazione e polimerizzazione dei filamenti di actina anche *in vitro*. L'actina del citoscheletro si dimostra pertanto un possibile candidato coinvolto nel meccanismo alla base dell'induzione della polispermia operata dalla nicotina nelle uova di riccio di mare.

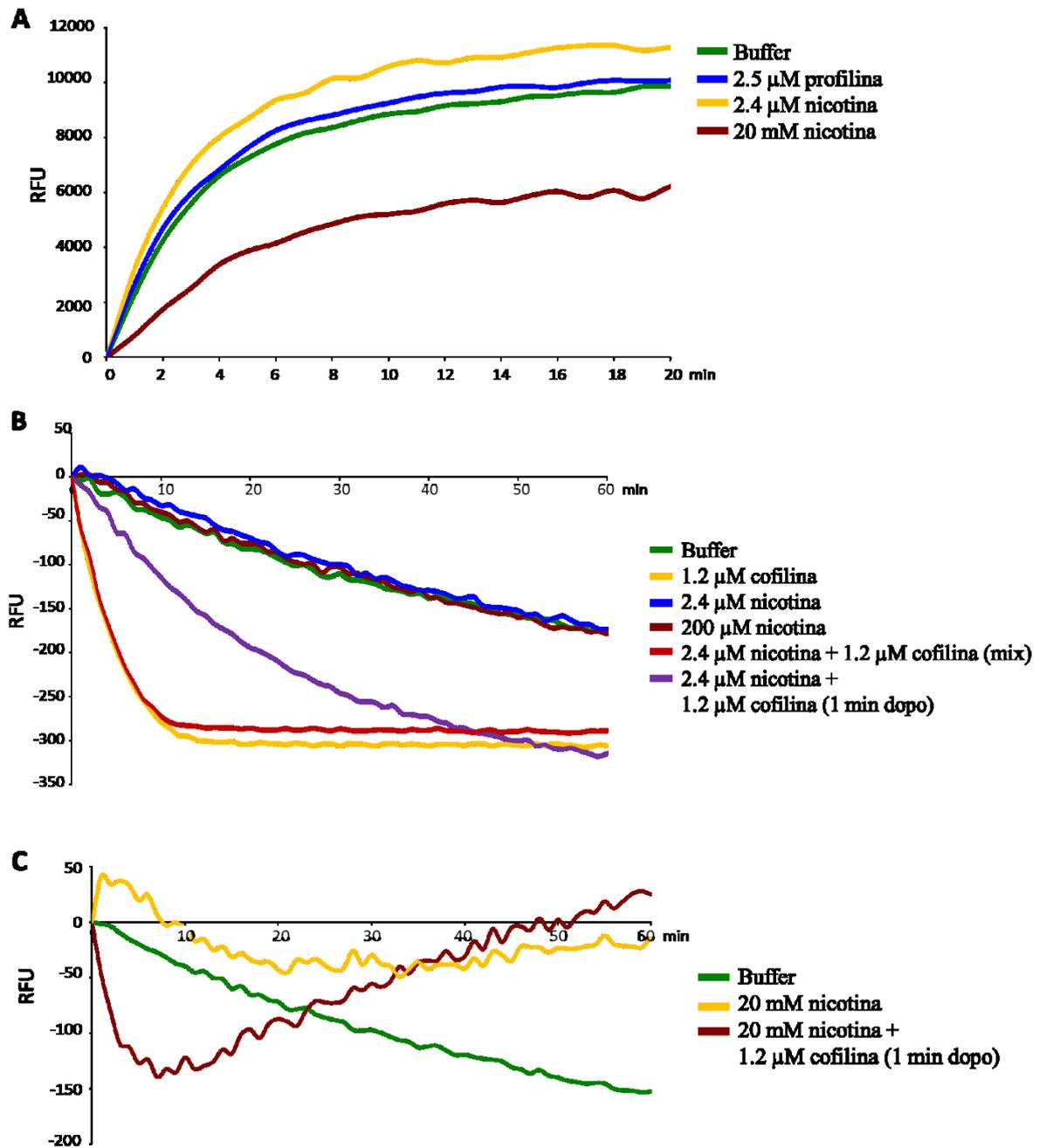


Figura VI, 7. La nicotina influenza la polimerizzazione dell'actina e inibisce la depolimerizzazione operata dalla cofilina *in vitro*. (A) La polimerizzazione dell'actina pirene viene lievemente stimolata da basse concentrazioni di nicotina (2.4 μM , curva di colore giallo), ma è rallentata con un'alta concentrazione (20 mM, curva di colore marrone); (B) La fluorescenza dell'actina pirene diminuisce in seguito all'aggiunta di cofilina (curva di colore giallo); mentre l'aggiunta della nicotina in due diverse concentrazioni (2.4 μM curva di colore blu; 200 μM curva di colore marrone) determina una variazione della fluorescenza paragonabile al decadimento spontaneo misurato dall'aggiunta del buffer (curva di colore verde). La nicotina compromette l'azione depolimerizzante della cofilina sulla F-actina se aggiunta 1 minuto prima della stessa (curva di colore rosso), ma non se aggiunta allo stesso tempo (curva di colore viola); (C) Una concentrazione di 20 mM nicotina (curva di colore giallo) compromette il naturale decadimento della fluorescenza osservato in presenza del buffer (curva di colore verde) ed inibisce l'azione depolimerizzante della cofilina se aggiunta 1 min prima (curva di colore marrone).

Discussione per il Capitolo VI

In questo capitolo della mia tesi viene proposta l'ipotesi che la perturbazione delle dinamiche dell'actina del citoscheletro corticale nelle uova esposte alla nicotina sia responsabile dell'incremento nell'incidenza di polispermia.

Le fasi iniziali della fecondazione nelle uova degli echinodermi sono caratterizzate da una depolarizzazione della membrana plasmatica che provoca un influsso di calcio dall'esterno e da un significativo aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare che si propaga come un'onda dal sito di interazione con lo spermatozoo verso il polo opposto dell'uovo. L'aumento del Ca^{2+} intracellulare è poi seguito dall'esocitosi del contenuto dei granuli corticali che porta al sollevamento dell'involucro vitellino e infine alla formazione della membrana di fecondazione. Negli echinodermi, è stato ipotizzato che quest'ultimo evento serva come meccanismo per bloccare meccanicamente l'entrata di spermatozoi soprannumerari dopo la fecondazione. Come descritto nei Risultati, però, i risultati della mia tesi di dottorato hanno messo in evidenza che la condizione di polispermia si realizza anche a fronte di un completo sollevamento della membrana di fecondazione indicando l'esistenza di un ulteriore meccanismo di controllo e blocco alla polispermia che si attiva molto prima che l'involucro vitellino venga completamente sollevato. La spiegazione del meccanismo di base anche di un blocco veloce alla polispermia è controversa in letteratura. Mentre rimane ancora tecnicamente impossibile fornire una dimostrazione dell'esistenza di velocissime modifiche strutturali della superficie dell'uovo, è stato suggerito che i cambiamenti elettrici della membrana plasmatica (depolarizzazione del potenziale di membrana) in seguito al contatto dello spermatozoo fecondante, possano essere responsabili del blocco veloce alla polispermia (Jaffe, 1976). Sebbene questa idea del blocco elettrico alla polispermia sia stata confermata in diverse altre specie (Gould-Somero et al., 1979), non è stata unanimemente accettata da altri sperimentatori, che invece sostengono che la depolarizzazione del potenziale di membrana dell'uovo potrebbe essere semplicemente la conseguenza elettrica dell'esocitosi dei granuli corticali (Dale e Russo, 1984). Pertanto, la

questione è ancora oggetto di controversia in letteratura (Dale e Monroy, 1981; Dale e DeFelice, 2010; Santella e Chun, 2011).

Il primo lavoro ad aver suggerito l'esistenza del blocco veloce, eseguito su uova di ricci di mare, (Jaffe, 1976) ha dimostrato che in seguito alla prima interazione tra spermatozoo ed uovo, si manifesta un piccolo step di depolarizzazione della membrana plasmatica di breve entità che precede di parecchi secondi una seconda e più significativa depolarizzazione del potenziale di membrana, il cosiddetto potenziale di fecondazione, che raggiunge così valori positivi. È stato suggerito che l'iniziale cambiamento elettrico indotto dallo spermatozoo sulla superficie dell'uovo possa ridurre la probabilità di ingresso ad altri spermatozoi di un fattore 20 (Rothschild e Swann, 1950), mentre la successiva e più lenta depolarizzazione, (di circa 60 secondi), riduce praticamente a zero la probabilità di un'ulteriore interazione funzionale con l'uovo. Tuttavia, l'evidenza sperimentale che nell'ambito degli svariati secondi del periodo di latenza e prima che il potenziale di fecondazione raggiunga la massima ampiezza, molti spermatozoi possono ancora legarsi e fondersi con l'uovo (Dale, 1985), così come la dimostrazione che mantenendo le uova di riccio di mare ad un potenziale di membrana negativo si realizza lo stesso una fecondazione monospermica, (Dale e DeFelice, 2010), getta dubbi sulla reale esistenza di questo blocco veloce nel prevenire l'entrata di più spermatozoi. Perplexità legittime se si pensa che la scoperta del blocco elettrico veloce alla polispermia, documentato nei ricci di mare (Jaffe, 1976) non è stato confermato da altri autori (Byrd e Collins, 1975) che hanno usato la stessa specie di riccio ed altre specie come ad esempio in uova di topo, criceto, o coniglio (Miyazaki e Igusa, 1982;. Jaffe et al., 1983; McCalloh et al., 1983).

In questo capitolo, è stato intrapreso uno studio morfologico per ottenere ulteriori delucidazioni in merito al ruolo dell'actina del citoscheletro come potenziale candidato nella regolazione dell'ingresso di un singolo spermatozoo alla fecondazione delle uova di riccio di mare. Ho trovato che l'agente convenzionale utilizzato per indurre polispermia, la nicotina, evoca lo stesso effetto sulla fecondazione delle uova di *P. lividus* (Fig. VI, 1)

secondo una modalità dose dipendente. Cioè il numero di spermatozoi incorporati continua ad aumentare progressivamente a partire da concentrazioni superiori a 2 mM, nonostante l'assenza di esocitosi dei granuli corticali in tutte le concentrazioni usate. Ciò suggerisce chiaramente l'esistenza di un meccanismo di blocco diverso dalla semplice barriera meccanica. I risultati di questa tesi dimostrano per la prima volta che la nicotina causa profonde alterazioni nell'organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro delle uova. Pertanto, alla luce delle conclusioni precedenti che collegavano le perturbazioni nelle normali dinamiche dell'actina alla polispermia (Puppo et al., 2008, Chun et al., 2010, Capitolo V), è plausibile che la maggiore incidenza di polispermia indotta dalla nicotina potrebbe anche essere attribuita all'alterazione della struttura nel cortex dell'uovo (Fig. VI, 2 e 3). Inoltre il trattamento delle uova con la nicotina induce anche un anomalo rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione, e cioè una progressiva abolizione del rilascio di calcio corticale all'aumentare della concentrazione usata, che però non intacca l'ampiezza della quantità di calcio liberata nell'onda successiva che risulta del tutto pari, se non più elevata, rispetto a quella del controllo. Quest'ultimo aspetto è di particolare importanza se si pensa che a fronte di una paragonabile liberazione di Ca^{2+} , l'esocitosi del contenuto dei granuli corticali non si realizza nelle uova sottoposte al trattamento con nicotina. È quindi ipotizzabile che la polispermia in queste uova trattate con nicotina possa essere il risultato della deregolazione di un meccanismo actina-dipendente responsabile della creazione di siti specifici per l'interazione e l'ingresso degli spermatozoi. In ogni caso, appare evidente che il processo di esocitosi dei granuli corticali e il conseguente sollevamento della membrana di fecondazione siano fortemente dipendenti dalla regolazione fine dell'actina del citoscheletro (Kyojuka et al., 2008; Puppo et al., 2008; Chun et al., 2010; Vasilev et al., 2012).

Il meccanismo tramite cui la nicotina induce polispermia non è del tutto chiaro ed è tutt'ora oggetto di un acceso dibattito in letteratura. Nei ricci di mare, si pensa che la causa di tale fenomeno possa essere dovuta (Hagstrom e Allen, 1956) o non (Longo e Anderson, 1970)

ad alterazioni della reazione corticale, legate alla mancanza del blocco veloce alla polispermia (Rothschild, 1952, 1954) oppure a cambiamenti sulla superficie dei gameti responsabili di un aumento della probabilità di un'interazione funzionale tra spermatozoo e uovo (Rothschild e Swann, 1950; Hagstrom e Allen, 1956). Per quanto riguarda il blocco veloce alla polispermia che avviene nei primissimi millisecondi successivi all'interazione spermatozoo-uovo, è stato dimostrato che la nicotina può ridurre l'ampiezza del potenziale di fecondazione della membrana plasmatica indotta dagli spermatozoi nel riccio di mare (Jaffe, 1980), e in virtù di questo, indurre polispermia. A seconda della concentrazione utilizzata (da 250 μ M fino a 2,5 mM in ricci di mare della specie *Arbacia punctulata*), essa anche se può bloccare o meno il sollevamento dell'involucro vitellino al momento della fecondazione, induce sempre e comunque polispermia (Longo e Anderson, 1970). Ciò è stato ampiamente confermato in questo lavoro di tesi su uova di riccio di mare della specie *P. lividus*. Inoltre è stato dimostrato che sebbene le uova di riccio di mare posseggano AChR di tipo neurale (nAChR) funzionali (Ivonnet e Chambers, 1997), l'effetto di induzione della polispermia operato dalla nicotina non è determinato dall'attivazione di un meccanismo di trasduzione del segnale mediato dal legame con questi recettori, in quanto la somministrazione sia di agonisti (acetilcolina e carbacolo) che di antagonisti (Mecamylamine, Hexamethonium ed MLA) non induce una fecondazione polispermica nelle uova testate, né riesce ad inibire l'azione della nicotina. Nelle uova di *L. variegatus*, l'ACh induce una corrente diretta verso l'interno, che è in gran parte dovuta all'influsso di Na^+ , che veniva bloccata da inibitori specifici del sottotipo neurale del recettore nicotinico. Siccome gli stessi inibitori non sono stati capaci di bloccare la polispermia nelle uova della specie di riccio del mediterraneo da me testate, i dati sperimentali indicano che la polispermia indotta dalla nicotina può non essere dipendente dall'afflusso di Na^+ indotto dall'ACh, ma potrebbe essere mediata da un meccanismo indipendente dai nAChR.

I risultati delle modificazioni morfologiche evidenziati mediante microiniezione di sonde fluorescenti per la F-actina, hanno indicato che la nicotina induce grandi cambiamenti

nell'organizzazione strutturale dell'actina, e che questo cambiamento della superficie dell'uovo può alterare la ricettività della stessa nei confronti degli spermatozoi. Inoltre, tramite i dati ottenuti con il saggio *in vitro*, è stato possibile appurare che queste modifiche strutturali sono riconducibili ad un'azione diretta della nicotina sui monomeri e sui filamenti polimerizzati di actina, in quanto essa è capace di interferire con la normale attività depolimerizzante dell'*actin-binding protein* cofilina (Fig. VI, 7).

Così, alla luce degli effetti della nicotina sull'alterazione delle proprietà strutturali e funzionali del cortex delle uova, questo studio suggerisce per la prima volta l'interessante ipotesi di un coinvolgimento del meccanismo di regolazione fine dell'actina citoscheletro come fattore cruciale nel controllo del blocco veloce alla polispermia.

CONCLUSIONI

Anche se è largamente accettato che un normale aumento di Ca^{2+} intracellulare il cui *pattern* è diverso a seconda delle specie animali è essenziale per l'attivazione dell'uovo e l'entrata di un solo spermatozoo alla fecondazione, i meccanismi molecolari della via di trasduzione del segnale che regola tale processo sono tuttora sconosciuti. Finora il consenso generale è che l'aumento di Ca^{2+} derivi principalmente dalla sua fuoriuscita dal RE, che è il principale deposito dello ione nel citoplasma. Questo *store* rilascia Ca^{2+} attraverso i recettori dell' InsP_3 che si attivano quando l' InsP_3 è prodotto per idrolisi del PIP2 sulla membrana plasmatica di tutte le cellule stimulate, incluse le uova. Nelle uova di riccio di mare, è stata suggerita anche l'esistenza di meccanismi di rilascio di Ca^{2+} indipendenti dall' InsP_3 , e sono stati identificati due secondi messaggeri supplementari, vale a dire, il NAADP e il cADPR, con ruoli specifici nel processo di attivazione. Il NAADP potrebbe essere l'iniziatore dell'aumento di Ca^{2+} a livello corticale o agendo sul suo canale bersaglio specifico (TPC) localizzato su organelli acidi, mentre il cADPR potrebbe sostenere la propagazione dell'onda di Ca^{2+} attraverso un meccanismo convenzionale di CICR che vede coinvolti i RyR. È stato anche suggerito che altri organelli acidi diversi dai lisosomi, ossia i granuli corticali, possano sintetizzare il cADPR al loro interno e trasferirlo ai RyR vicini per promuovere il rilascio globale del Ca^{2+} . Comunque la natura dello *store* su cui agirebbe il NAADP rimane controversa. Infatti è stato dimostrato che il NAADP induce un ingresso di Ca^{2+} dall'esterno negli ovociti di stella di mare per l'attivazione di un canale per il Ca^{2+} localizzato sulla membrana plasmatica, e per quanto riguarda il cADPR ci sono evidenze che non svolga alcun ruolo nel sostenere l'onda di Ca^{2+} nelle uova di stella di mare. È interessante notare che, anche nel mammifero, le vescicole intracellulari possono svolgere un ruolo nel produrre l' InsP_3 , in quanto è stato trovato il PIP2 al loro interno.

L'obiettivo primario di questa tesi è stato quello di chiarire il ruolo svolto dall'actina corticale del citoscheletro nel mediare vari aspetti del processo di maturazione e fecondazione delle uova di stella e riccio di mare. È noto che i livelli intracellulari di Ca^{2+} aumentano in maniera transitoria in fasi specifiche della mitosi così come durante la rottura dell'involucro nucleare e nel passaggio metafase-anafase. Comparabili aumenti intracellulari di Ca^{2+} possono avere luogo anche durante la meiosi, come è stato riportato per gli ovociti di topo, di *Xenopus*, e di stella di mare. Nella maggior parte delle specie di stelle marine, gli ovociti in maturazione mostrano un aumento di Ca^{2+} entro pochi minuti dall'aggiunta dell'ormone della maturazione, 1-metiladenina (1-MA). Sebbene questi ovociti manifestino un aumento di Ca^{2+} anche al momento dell'espulsione del globulo polare, un ulteriore aumento di Ca^{2+} non è mai stato osservato durante la dissoluzione dell'involucro nucleare (GVBD). In questo lavoro di tesi è riportata, per la prima volta, l'esistenza di risposta di Ca^{2+} aggiuntiva negli ovociti in maturazione di *A. pectinifera* in corrispondenza della GVBD. Al contrario del primo ed immediato rilascio di Ca^{2+} in risposta all'1-MA, che è indipendente dalla concentrazione esterna dello ione ed assume la forma di un'onda intracellulare di Ca^{2+} tre volte più veloce rispetto a quella delle uova fecondate, questa risposta tardiva è costituita da un insieme di picchi, espressione dell'influsso di Ca^{2+} dall'esterno. Questi picchi di Ca^{2+} al tempo della GVBD che erano perlopiù eliminati quando il nucleo veniva rimosso dagli ovociti prima dell'aggiunta di 1-MA, hanno suggerito essere una conseguenza della GVBD. A sostegno dell'idea che questi picchi di Ca^{2+} abbiano un ruolo fisiologico, gli ovociti maturati in acqua di mare priva di calcio manifestano un più alto tasso di fallimento di divisione cellulare 2 ore dopo la fecondazione in acqua di mare naturale. Gli inibitori specifici dei canali del Ca^{2+} di tipo L, verapamil e diltiazem, sopprimono notevolmente l'ampiezza dei picchi di Ca^{2+} , ma non la loro frequenza. Inoltre la Latrunculina A (LAT-A), che promuove una netta depolimerizzazione dell'actina del citoscheletro, ha un duplice effetto su questo rilascio di Ca^{2+} tardivo. Quando aggiunta immediatamente dopo il periodo ormone-dipendente, la

LAT-A riduce la frequenza dei picchi in maniera dose-dipendente, ma non l'ampiezza dei picchi di Ca^{2+} rimanenti, che è al contrario significativamente aumentata. Questi risultati suggeriscono che l'actina corticale del citoscheletro e alcuni fattori nucleari possono giocare un ruolo nel regolare le attività dei canali ionici durante questa fase di progressione meiotica.

Anche nell'ambito della fecondazione, ho ottenuto dati che dimostrano il forte contributo dell'actina corticale del citoscheletro in molti eventi associati a tale processo.

Il primo evento fortemente dipendente dall'organizzazione dell'actina corticale del citoscheletro è l'aumento di Ca^{2+} che assume la forma di un flash corticale. Perturbazioni dell'organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro nella zona corticale, sia mediante trattamento farmacologico con diversi agenti, sia attraverso un processo di invecchiamento fisiologico, alterano significativamente l'ampiezza e la durata del rilascio di Ca^{2+} in questa regione dell'uovo. Inoltre, anche le dinamiche dell'onda globale di Ca^{2+} risultano influenzate. I successivi eventi chiave del processo di fecondazione, ossia l'esocitosi dei granuli corticali ed il sollevamento della membrana di fecondazione, che finora erano stati considerati esclusivamente dipendenti dall'aumento del Ca^{2+} intracellulare, sono anch'essi fortemente influenzati dall'actina corticale del citoscheletro: sono infatti aboliti anche in presenza di un aumento convenzionale dello ione Ca^{2+} , una volta che l'organizzazione dinamica dell'actina del citoscheletro nella zona corticale è stata perturbata. Al fine di testare l'idea che sia lo stato fisiologico dell'actina corticale del citoscheletro a determinare la buona riuscita della fecondazione, le uova di *P. lividus* sono state incubate con quattro diverse sostanze che si legano all'actina, che promuovono sia la polimerizzazione (jasplakinolide e falloidina) o la depolimerizzazione (Citocalasina B e Latrunculina A) dei filamenti. Al momento della fecondazione, le uova pre-trattate con Citocalasina B rispondono alla stimolazione dello spermatozoo con un flash corticale e il primo aumento di Ca^{2+} localizzato nel sito di interazione con lo spermatozoo, in linea con la precedente osservazione elettrofisiologica del prolungato periodo di latenza (Dale e De

Santis, 1981). La Citocalasina B aumenta l'incidenza della polispermia a basse concentrazioni, ma inibisce l'entrata degli spermatozoi se somministrata in concentrazioni elevate, come osservato per le altre sostanze leganti l'actina utilizzate. I risultati che ho ottenuto sulle uova di riccio di mare pre-trattate con sostanze che si legano all'actina hanno messo in discussione le nostre conoscenze sul ruolo svolto dal segnale Ca^{2+} alla fecondazione. Le uova di riccio di mare pre-incubate con jaspilkinolide non vanno incontro all'esocitosi dei granuli corticali, nonostante il normale aumento di Ca^{2+} intracellulare. Senza il sollevamento della membrana di fecondazione, mi sarei aspettata di trovare uova polispermiche, ma, contrariamente alle previsioni, ho constatato che riuscivano difficilmente ad incorporare anche un solo spermatozoo. Inoltre, le uova pretrattate con LAT-A spesso manifestavano più onde di Ca^{2+} , ma nessuno spermatozoo veniva incorporato, mentre in altre uova in cui si evidenziava una singola onda di Ca^{2+} , venivano incorporati moltissimi spermatozoi. Quindi, la membrana di fecondazione non è il fattore che blocca la polispermia, così come il segnale Ca^{2+} globale alla fecondazione non assicura la corretta entrata dello spermatozoo nelle uova degli echinodermi. Conclusione avvalorata dai dati ottenuti su uova sovramature di stella di mare, ossia maturate per diverse ore con l'ormone 1-MA e perciò fecondate in ritardo rispetto alla giusta finestra temporale che assicura la fecondazione monospermica. Queste uova manifestano una marcata tendenza alla polispermia, in seguito ad un'alterazione dell'organizzazione strutturale dell'actina in prossimità della zona corticale dell'uovo e nonostante il normale sollevamento della membrana di fecondazione. L'importanza dell'integrità strutturale e funzionale dell'actina del citoscheletro come fattore coinvolto nel controllo della polispermia alla fecondazione è stata dimostrata anche mediante gli esperimenti condotti sulle uova di riccio di mare, sottoposte al trattamento con la nicotina. Queste uova, oltre alla già prevista incorporazione di un gran numero di spermatozoi, evidenziano alterazioni significative nelle dinamiche di rilascio di Ca^{2+} e profonde modifiche nell'organizzazione strutturale dell'actina corticale che sono strettamente

dipendenti dalle concentrazioni di nicotina usate. Ho dimostrato che la polispermia non è mediata dai sistemi colinergici, (come dimostrato dai risultati negativi ottenuti da vari agonisti ed antagonisti dei recettori nicotinici), quanto piuttosto alla capacità della stessa nicotina di legarsi ai filamenti di actina e modificarli irreversibilmente come confermato dai risultati ottenuti dai saggi *in vitro*. Tutto ciò sottolinea ancora una volta che il corretto sollevamento della membrana di fecondazione non è sufficiente ad impedire l'ingresso di spermatozoi in soprannumero e che i filamenti di actina svolgono un ruolo cruciale nel regolare non solo questo processo ma tutti gli altri eventi della fecondazione. Infine, non è da escludere l'interessante possibilità che l'actina del citoscheletro possa svolgere la funzione di deposito di Ca^{2+} durante la maturazione e la fecondazione delle uova di stelle e ricci di mare. Allo stato attuale, però, questa idea rimane una mera speculazione e necessita di ulteriori approfondimenti per essere avvalorata.

BIBLIOGRAFIA

- Aarhus, R., Dickey, D.M., Graeff, R.M., Gee, K.R., Walseth, T.F., Lee, H.C. (1996). Activation and inactivation of Ca^{2+} release by NAADP⁺. *J. Biol. Chem.* 271:8513-8516.
- Allen, R.D. (1953). Fertilization and artificial activation in the egg of the surf clam *Sp. Solidissima*. *Biol. Bull.*, 105:213–239.
- Allen, R., Hagström, B. (1955). Interruption of the cortical reaction by heat. *Exp. Cell Res.*, 9:157-167.
- Berridge, M. (1993). Cell signaling. A tale of two messengers. *Nature*, 365: 388-9.
- Berridge, M. (2007). Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochem. Soc. Symp.*, 74: 1-7.
- Berridge, M.J., Dupont G. (1994). Spatial and temporal signalling by calcium. *Curr Opin Cell Biol.*, 6:267-74.
- Berridge, M.J. (1995). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 766:31-43.
- Billington, R.A., Ho, A., Genazzani, A.A. (2002). Nicotinic acid adenine denucleotide phosphate (NAADP) is present at micromolar concentrations in sea urchin spermatozoa. *J. Physiol.*, 544:107-112.
- Byrnes, W.M., Newman, S.A. (2014). Ernest Everett Just: egg and embryo as excitable systems. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. E*, 322:191–201.
- Buznikov, G.A. (1984). The activation of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis. *Pharmac. Ther.*, 25:23-59.
- Buznikov, G.A. (1987). Acetylcholine and biogenic monoamines as intracellular regulators of early embryogenesis. *Sov. Sci. Rev. F. Physiol. Gen. Biol.*, 1:137-96.
- Byrd, E.W. Jr, Collins, F.D. (1975). Absence of fast block to polyspermy in eggs of sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Nature*, 257:675-7.

- Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K.T., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C.N., Parrington, J., Ma, J., Evans, A.M., Galione, A., Zhu, M.X. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459:596-600.
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature*, 360:684-686.
- Cantiello, H.F., Stow, J.L., Prat, A.G., Ausiello, D.A. (1991). Actin filaments regulate epithelial Na⁺ channel activity. *Am. J. Physiol.*, 261:C882-C888.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 36:107-260.
- Carafoli, E. (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99:1115-1122.
- Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, M. (1994). Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca²⁺]_i oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes, *Development*, 120:3507-3517.
- Carroll, D.J., Ramarao, C.S., Mehlmann, L.M., Roche, S., Terasaki, M., Jaffe, L.A. (1997) Calcium release at fertilization in starfish eggs is mediated by phospholipase Cgamma. *J. Cell. Biol.*, 138:1303-11.
- Chambers, R. (1921). Microdissection studies. II. Some problems in the maturation and fertilization of the echinoderm egg. *Biol. Bull.*, 41:318–350.
- Cheon, B., Lee, H.C., Wakai, T., Fissore, R.A. (2013). Ca²⁺ influx and the store-operated Ca²⁺ entry pathway undergo regulation during mouse oocyte maturation. *Mol. Biol. Cell*, 24:1396–1410.
- Chiba, K., Hoshi, M. (1989). Three phases of cortical maturation during meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Dev. Growth Differ.*, 31:447–451.

- Chiba, K., Kado, R.T., Jaffe, L.A. (1990). Development of calcium release mechanisms during starfish oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 140:300-306.
- Chiba, K., Kontani, K., Tadenuma, H., Katada, T., Hoshi, M. (1993). Induction of starfish oocytes maturation by the beta gamma subunit of starfish G protein and possible existence of the subsequent effector in cytoplasm. *Mol. Biol. Cell*, 4:1027-1034.
- Chun, J.T., Santella, L. (2009). Roles of the actin-binding proteins in intracellular Ca^{2+} signaling. *Acta Physiol.*, 195:61-70.
- Chun, J.T., Puppo, A., Vasilev, F., Gragnaniello, G., Garante, E., Santella, L. (2010). The biphasic increase of PIP_2 in the fertilized eggs of starfish: new roles in actin polymerization and Ca^{2+} signaling. *PLoS One*, 5:e14100.
- Chun, J.T., Vasilev, F., Santella L. (2013). Antibody against the actin-binding protein depactin attenuates Ca^{2+} signaling in starfish eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441:301–307.
- Chun, J.T., Limatola, N., Vasilev, F., Santella, L. (2014). Early events of fertilization in sea urchin eggs are sensitive to actin-binding organic molecules. *Biochem Biophys Res Commun.*, 450:1166-1174.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., Galione, A. (2002). NAADP mobilizes Ca^{2+} from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*, 111:703-708.
- Churchill, G. C., O'Neill, J.S., Masgrau, R., Patel, S., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Galione, A. (2003). Sperm deliver a new second messenger: NAADP. *Curr. Biol.*, 13:125-128.
- Ciapa, B., Chiri, S. (2000). Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal. *Biol. Cell*, 92:215-33.
- Ciapa, B., Borg, B., Whitaker, M. (1992). Polyphosphoinositide metabolism during the fertilization wave in sea urchin eggs. *Development*, 115:187-195.

- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J., Lee, H.C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 262:9561-9568.
- Cline, C.A., Schatten, H., Balczon, R., Schatten, G. (1983). Actin-mediated surface motility during sea urchin fertilization. *Cell. Motil.*, 3:513-524.
- Creton, R., Jaffe, L. (2001). Chemiluminescence microscopy as a tool in biomedical research. *Biotechniques*, 31:1098-100, 1102-5.
- Crossley, I., Whalley, T., Whitaker, M. (1991). Guanosine 5'-thiotriphosphate may stimulate phosphoinositide messenger production in sea urchin eggs by a different route than the fertilizing sperm. *Cell Regul.*, 2:121-33.
- Cross, N.L., Elinson, R.P. (1980). A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. *Dev. Biol.*, 75:187-98.
- D'Angelo, G., Vicinanza, M., Di Campli, A., De Matteis, M.A. (2008). The multiple roles of PtdIns(4)P- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. *J. Cell Sci.*, 121:1955-1963.
- Dale, B., De Felice, L.J., Taglietti, V. (1978). Membrane noise and conductance increase during single spermatozoon-egg interactions. *Nature*, 275:217-9.
- Dale, B., De Santis, A., Hoshi, M. (1979). Membrane response to 1-methyladenine requires the presence of the nucleus. *Nature*, 282:89-90.
- Dale, B., De Santis, A. (1981). The effect of cytochalasin B and D on the fertilization of sea urchins. *Dev. Biol.*, 83:232-7.
- Dale, B., Monroy, A. (1981). How is polyspermy prevented? *Gamete Res.*, 4:151-169.
- Dale, B., Russo, P. (1984). Electrical response to fertilization in starfish eggs and oocytes. *Cell Biol. Int. Rep.*, 8:1015.
- Dale, B., Dan-Sohkawa, M., De Santis, A., Hoshi, M. (1981). Fertilization of the starfish *Astropecten aurantiacus*. *Exp. Cell. Res.*, 132:505-510.
- Dale, B., Santella, L. (1985). Sperm- oocyte interaction in the sea-urchin. *J. Cell Sci.*, 74:153-67.

- Dale, B. (1985). Sperm receptivity in sea urchin oocytes and eggs. *J. Exp. Biol.*, 118:85-97.
- Dale, B., DeFelice, L. (2011). Polyspermy prevention: facts and artifacts? *J. Assist. Reprod. Genet.*, 28:199-207.
- Dale, B. (2014). Is the idea of a fast block to polyspermy based on artifact? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450:1159–1165.
- Dan, J.C. (1954). Studies on the acrosome. II acrosome reaction in starfish spermatozoa. *Biol. Bull.*, 107:203–218.
- Dargie, P.J., Agre, M.C., Lee, H.C. (1990). Comparison of Ca^{2+} mobilizing activities of cyclic ADP-ribose and inositol triphosphate. *Cell. Regul.*, 1:279-90.
- Dascal, N., Landau, E.M. (1980). Types of muscarinic response in *Xenopus* oocytes. *Life Sci.*, 27:1423-8.
- Davis, L.C., Morgan, A.J., Ruas, M., Wong, J.L., Graeff, R.M., Poustka, A.J., Lee, H.C., Wessel, G.M., Parrington, J., Galione, A. (2008). Ca^{2+} signaling occurs via second messenger release from intraorganelle synthesis sites. *Curr. Biol.*, 18:1612-1618.
- Deguchi, R., (2007). Fertilization causes a single Ca^{2+} increase that fully depends on Ca^{2+} influx in oocytes of limpets (Phylum Mollusca, Class Gastropoda). *Dev. Biol.*, 304:652–663.
- Delage, Y. (1901). Études expérimentales sur la maturation cytoplasmique et sur la parthénogénèse artificielle chez les échinoderms. *Arch. de Zool. Exp. et Gen.*, IX (ser. 3 T), pp. 285–326.
- De Matteis, M.A., Godi, A. (2004). PI-3-kinase membrane traffic. *Nat Cell Biol.* 6:487-492.
- De Nadai, C., Cailliau, K., Epel, D., Ciapa, B. (1998). Detection of phospholipase C γ in sea urchin eggs. *Dev. Growth Differ.*, 40:669-676.
- Di Paolo, G., De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443:651-657.

- Dorée, M., Guerrier, P. (1975). Site of action of 1-methyladenine in inducing oocyte maturation in starfish. Kinetic evidence for receptors localized on the cell membrane. *Exp. Cell Res.*, 91:296-300.
- Dorée, M., Moreau, M., Guerrier, P. (1978). Hormonal control of meiosis. In vitro induced release of calcium ions from the plasma membrane in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.*, 115:251-260.
- Dorée, M., Cavadore, J.C., Picard, A. (1990). Facts and hypotheses of calcium regulation of MPF activity during meiotic maturation of starfish oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 42:135-140.
- Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.*, 83:433–473.
- Ducibella, T., Fissore, R. (2008). The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev. Biol.*, 315:257-79.
- Ebner, T., Montag, M., Oocyte Activation Study Group, Montag, M., Van der Ven, K., Van der Ven, H., Ebner, T., Shebl, O., Oppelt, P., Hirchenhain, J., Krüssel, J., Maxrath, B., Gnoth, C., Friol, K., Tigges, J., Wunsch, E., Luckhaus, J., Beerkotte, A., Weiss, D., Grunwald, K., Struller, D., Etien, C., (2015). Live birth after artificial oocyte activation using a ready-to-use ionophore: a prospective multicentre study. *Reprod. Biomed.*, Online 30:359–365.
- Eisen, A., Reynolds, G.T. (1984). Calcium transients during early development in single starfish (*Asterias forbesi*) oocytes. *J. Cell. Biol.*, 99:1878-1882.
- Enserink, J.M., Kolodner, R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.*, 13:5:11.
- Eusebi, R., Pasetto, N., Siracusa, G. (1984). Acetylcholine receptors in human oocytes. *J. Physiol.*, 346:321-30.

- Falugi, C., Pera, C., Prestipino, G. (1989). Localization of alpha-bungarotoxin receptors and AChE activity in eggs and embryos of *Paracentrotus lividus* LMK. *Ada Embryol. Morphol. Exp.*, NS10:113-19.
- Falugi, C. (1993). Localization and possible role of molecules associated with the cholinergic system during 'nonnervous' developmental events. *Eur. J. Histochem.*, 37:287-94.
- Fissore, R.A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. (2002). Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, 124:745-54.
- FitzHarris, G., Marangos, P., Carroll, J. (2007). Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev. Biol.*, 305:133-44.
- Fleischer, S.E., Ogunbunmi, E.M., Dixon, M.C., Fleer, E.A. (1985). Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 82:7256-7259.
- Fluck, R.A., Shih, T.M. (1981). Acetylcholine in embryos of *Oryzias latipes*, a teleost: gas chromatographic-mass spectrometric assay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70C:129-30.
- Fluck, R.A. (1982). Localization of acetylcholinesterase activity in young embryos of the medaka *Oryzias latipes*, a teleost. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C:59-64.
- Forscher, P. (1989). Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *Trends Neurosci.*, 12:468-474.
- Fujimoto, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J. Cell Sci.*, 108:7-15.
- Fujimori, T., Hirai, S. (1979). Differences in starfish oocyte susceptibility to polyspermy during the course of maturation. *Biol. Bull.*, 157:249-257.

- Fujiwara, T., Nakada, K., Shirakawa, H., Miyazaki, S. (1993). Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev. Biol.*, 156:69-79.
- Fukatsu, K., Bannai, H., Zhang, S., Nakamura, H., Inoue, T., Mikoshiba, K. (2004). Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. *J. Biol. Chem.*, 279:48976–48982.
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., Mikoshiba, K. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*, 342:32-38.
- Furuichi, T., Kohda, K., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. (1994). Intracellular channels. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4:294-303.
- Furukawa, K., Fu, W., Li, Y., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Mattson, M.P. (1997). The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 17:8178-86.
- Furuyashiki, T., Arakawa, Y., Takemoto-Kimura, S., Bito, H. Narumiya, S. (2002). Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14458–14463.
- Galione, A., Lee, H.C., Busa, W.B. (1991). Ca²⁺- induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*, 253:1143-6.
- Galione, A., McDougall, A., Busa, W.B., Willmott, N., Gillot, I., Whitaker, M. (1993). Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science*, 261:348-352.
- Genazzani, A.A., Empson, R.M., Galione, A. (1996). Unique inactivation properties of NAADP-sensitive Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.*, 271:11599-11602.

- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., and Petersen, O.H. (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell*, 80:439-444.
- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Belan, P.V., Petersen, O.H.(1996). Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell*, 84:473-480.
- Gerasimenko, O., Gerasimenko, J. (2004). New aspects of nuclear calcium signaling. *J. Cell Sci.*, 117:3087-3094.
- Gieni, R.S., Hendzel, M.J. (2009). Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem. Cell Biol.*, 87:283-306.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton R.G., Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO Journal*, 19:4577–4588.
- Gillooly, D.J., Raiborg, C., Stenmark, H. (2003). Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes. *Histochem. Cell Biol.*, 120:445–453.
- Giusti, A.F., Xu, W., Hinkle, B., Terasaki, M., Jaffe, L.A. (2000). Evidence that fertilization activates starfish eggs by sequential activation of a Src-like kinase and phospholipase $\text{C}\gamma$. *J. Biol. Chem.*, 275:16788-16794.
- Gould-Somero, M., Jaffe, L.A., Holland, L.Z. (1979). Electrically mediated fast polyspermy block in eggs of the marine worm, *Urechis caupo*. *J. Cell Biol.*, 82:426-40.
- Guerrier, P., Dorée, M. (1975). Hormonal control of reinitiation of meiosis in starfish. The requirement of 1-methyladenine during nuclear maturation. *Dev. Biol.*, 47:341–348.
- Guerrier, P., Moreau, M., Dorée, M. (1978). Control of meiosis reinitiation in starfish: calcium ion as the primary effective trigger. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18:441-452.

- Guse, A.H. (2002). Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca^{2+} -signaling and cell function. *Curr. Mol. Med.*, 2:273-282.
- Hagström, B.E., Allen, R.D. (1956). The mechanism of nicotine-induced polyspermy. *Exp. Cell Res.*, 10:14-23.
- Haller, T., Volkl, H., Deetjen, P., Dietl, P. (1996). The lysosomal Ca^{2+} pool in MDCK cells can be released by $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -dependent hormones or thapsigargin but does not activate store-operated Ca^{2+} entry. *Biochem. J.*, 319:909-912.
- Hamaguchi, Y., Mabuchi, I. (1988). Accumulation of fluorescently labeled actin in the cortical layer in sea urchin eggs after fertilization. *Cell. Motil. Cytoskelet.*, 9:153–163.
- Hamaguchi, Y., Satoh, S.K., Numata, T., Hamaguchi M.S. (2001). Response of the cortex to the mitotic apparatus during polar body formation in the starfish oocyte of *Asterina pectinifera*. *Cell. Struct. Funct.*, 26:627–631.
- Heil-Chapdelaine, R.A., Otto, J.J. (1996). Characterization of changes in F-actin during maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 177:204-216.
- Hennager, D.J., Welsh, M.J., DeLisle, S. (1995). Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1, 4, 5- trisphosphate levels can control nuclear Ca^{2+} concentration. *J. Biol. Chem.*, 270:4959-62.
- Hertwig, O., Hertwig R. (1887). Über den Befruchtungsund Teilungsvorgang des Tierischen Eies unter dem Einfluss äusserer Agentien. *Jena. Zschr. Naturwiss.* 20:120.
- Hilpela, P., Vartiainen, M.K., Lappalainen, P. (2004). Regulation of the actin cytoskeleton by $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ and $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 282:117–163.
- Hinkley, RE, Wright, B.D., Lynn, J.W. (1986). Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Dev. Biol.*, 118:148-54.

- Hirai, S., Kubota, J., Kanatani, H. (1971). Induction of cytoplasmic maturation by 1-methyladenine in starfish oocytes after removal of the germinal vesicle. *Exp. Cell Res.*, 68:137-143.
- Hirohashi, N., Harada, K., Chiba, K. (2008). Hormone-induced cortical maturation ensures the slow block to polyspermy and does not couple with meiotic maturation in starfish. *Dev. Biol.*, 318:194-202.
- Hiramoto, Y. (1964). Mechanical properties of starfish oocytes during maturation divisions. *Biol. Bull.*, 127:373-374.
- Hiramoto, Y. (1976). Mechanical properties of starfish oocytes. *Dev. Growth Differ.*, 18:205-209.
- Hokin, M.R., Hokin, L.E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of P⁵³ into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.*, 203:967-977.
- Homa, S.T., Swann, K. (1994). A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum. Reprod.*, 9:2356-2361.
- Hoshi, M., Nishigaki, T., Kawamura, M., Ikeda, M., Gunaratne, J., Ueno, S., Ogiso, M., Moriyama, H., and Matsumoto, M. (2000). Acrosome reaction in starfish: signal molecules in the jelly coat and their receptors. *Zygote*, 8:S26-27.
- Igarashi, H., Takahashi, E., Hiroi, M., Doi, K. (1997). Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 48:383-90.
- Irvine, R.F. (2003). Nuclear lipid signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4:349-360.
- Ivonnet, P.I., Chambers, E.L. (1997). Nicotinic acetylcholine receptors of the neuronal type occur in the plasma membrane of sea urchin eggs. *Zygote*, 5:277-87.
- Iwasaki, H., Chiba, K., Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Suzuki, F., Ikeda, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (2002). Molecular characterization of the starfish inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and its role during oocyte maturation and fertilization. *J. Biol. Chem.*, 277:2763-2772.

- Jaffe, L.A. (1976). Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature*, 261:68-71.
- Jaffe, L.A. (1980). Electrical polyspermy block in sea urchins: nicotine and low sodium experiments. *Dev. Growth Differ.*, 22:503-507.
- Jaffe, L.A. Sharp, A.P., Wolf, D.P. (1983). Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. *Dev. Biol.*, 96:317-23.
- Jaffe, L.A., Gallo, C.J., Lee, R.H., Ho, Y.K., Jones, T.L. (1993). Oocyte maturation in starfish is mediated by the beta gamma-subunit complex of a G-protein. *J. Cell Biol.*, 121:775-783.
- Jaffe, L.A., Terasaki, M. (1994). Structural changes in the endoplasmic reticulum of starfish oocytes during meiotic maturation and fertilization. *Dev. Biol.*, 164:579-587.
- Jaffe, L.F. (1983). Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev. Biol.*, 99:265-276.
- Jaffe, L.F. (1991). The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9883-9887.
- Janmey, P.A., Stossel, T.P. (1987). Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature*, 325:362-364.
- Jenden, D.J., Fairhurst, A.S. (1969). The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol. Rev.*, 21:1-25.
- Jones, K.T., Soeller C., Cannell M.B. (1998). The passage of Ca²⁺ and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development*, 125:4627-35.
- Just, E.E. (1919). The fertilization –reaction in *Echinarachnius parma*. I. Cortical response of the egg to insemination. *Biol. Bull.*, 36:1.
- Just, E.E. (1930). The present status of the fertilizin theory of fertilization. *Protoplasma*, 10:300-342.

- Just, E.E. (1939). *The Biology of the Cell Surface*. P. Blakiston's son & co., inc. Philadelphia, 1-392.
- Kanatani, H., Hiramoto, Y. (1967). In vitro production of meiosis inducing substance by nerve extract in ovary of starfish. *Nature*, 216:284-286.
- Kanatani, H., Shirai, H., Nakanishi, K., Kurokawa, T. (1969). Isolation and identification on meiosis inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature*, 221:273-274.
- Kanatani, H., Hiramoto, Y. (1970). Site of action of 1-methyladenine in inducing oocyte maturation in starfish. *Exp. Cell Res.*, 61:280-284.
- Kanatani, H. (1973). Maturation-inducing substance in starfishes. *Int. Rev. Cytol.*, 35:253-298.
- Kasai, M., Oosawa, F. (1968). The exchangeability of actin-bound calcium with various divalent cations. *Biochim Biophys Acta*, 154:520-8.
- Kasai, M., Oosawa, F. (1969). Behavior of divalent cations and nucleotides bound to F-actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 172:300-310.
- Kidd, J.F., Thorn, P. (2000). Intracellular Ca^{2+} and Cl^{-} channel activation in secretory cells. *Annu. Rev. Physiol.*, 62:493-513.
- Kikuyama, M., Hiramoto, Y. (1991). Change in intracellular calcium maturation in starfish oocytes ions upon develop. *Growth & Differ.*, 33:633-638.
- Kinney, N.P., Boittin, F.X., Thomas, J.M., Galione, A., Evans, A.M. (2004). Lysosome-Sarcoplasmic Reticulum Junctions A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J. Biol. Chem.*, 279:54319-2.
- Kishimoto, T., Kanatani, H. (1976). Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocytes. *Nature*, 260:321-322.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.*, 255:2273-2276.

- Kishimoto, T., Cayer, M.L., Kanatani H., (1976). Starfish oocyte maturation and reduction of disulfide-bond on oocyte surface. *Exp. Cell. Res.*, 101:104–110.
- Kishimoto, T., Hirai, S., Kanatani, H. (1981). Role of germinal vesicle material in producing maturation-promoting factor in starfish oocyte. *Dev. Biol.*, 81:177-181.
- Kishimoto, T. (1998). Cell cycle arrest and release in starfish oocytes and eggs. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 9:549-557.
- Kishimoto, T. (1999). Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 214:1-8.
- Kishimoto, T. (2003). Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:654-663.
- Kuroda, R., Kontani, K., Kanda, Y., Katada, T., Nakano, T., Satoh, Y., Suzuki, N., Kuroda, H. (2001). Increase of cGMP, cADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate preceding Ca^{2+} transients in fertilization of sea urchin eggs. *Development*, 128:4405-4414.
- Kusano, K., Miledi, R., Stinnakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol.*, 328:143-70.
- Kyozuka, K., Osanai, K. (1988). Fertilization cone formation in starfish oocytes: the role of the egg cortex actin microfilaments in sperm incorporation. *Gamete Res.*, 20:275–285.
- Kyozuka, K., Deguchi, R., Mohri, T., Miyazaki, S. (1998). Injection of sperm extract mimics spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} responses and progression of meiosis at fertilization of ascidian oocytes. *Development*, 125:4099-4105.
- Kyozuka, K., Chun, J.T., Puppo, A., Gragnaniello, G., Garante, E., Santella, L. (2008). Actin cytoskeleton modulates calcium signaling during maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 320:426-435.

- Kyozuka, K., Chun, J.T., Puppo, A., Gragnaniello, G., Garante, E., Santella, L. (2009). Guanine nucleotides in the meiotic maturation of starfish oocytes: regulation of the actin cytoskeleton and of Ca^{2+} signaling. *PLoS One*, 4:e6296.
- Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q.-Y., Leissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 331:315-319.
- Lange, K., Brandt, U. (1996). Calcium storage and release properties of F-actin: evidence for the involvement of F-actin in cellular calcium signaling. *FEBS Lett.*, 395:137-142.
- Lange, K. (1999). Microvillar Ca^{2+} signaling: a new view of an old problem. *J. Cell Physiol.*, 180:19–34.
- Lange, K., Gartzke, J. (2006). F-actin-based Ca^{2+} signaling—a critical comparison with the current concept of Ca^{2+} signaling. *J. Cell Physiol.*, 209:270-287.
- Lange K. (2011). Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J. Cell. Physiol.*, 2226:896–927.
- Laasberg, T., Pedak, A., Neuman, T. (1987). The muscarinic receptor-mediated action of acetylcholine in the gastrulating chick embryo. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C:313-16.
- Lassing, I., Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314:472–474.
- Lawrence, Y., Whitaker, M., Swann, K. (1997). Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development*, 124:233-241.
- Leckie, C., Empson, R., Becchetti, A., Thomas, J., Galione, A., Whitaker, M. (2003). The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *J Biol. Chem.*, 278:12247-54.

- Lee, H.C. (1993). Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 268:293-9.
- Lee, H.C., Aarhus, R., Walseth, T.F. (1993). Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs. *Science*, 261:352-355.
- Lee, H.C., Aarhus, R. (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 270:2152-2157.
- Lee, H.C. (1999). A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol. Chem.*, 380:785-793.
- Lee, H.C., Aarhus, R. (2000). Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *J. Cell Sci.*, 113:4413-4420.
- Lee, H.C., Munshi, C.B., Graeff, R. (2002). ADP-ribosyl cyclases – a family of cADPR and NAADP metabolizing enzymes. In “Cyclic ADP-ribose and NAADP: structure, metabolism and functions”. Edr. Lee HC. Kluwer Academic Publishers Group. 1-460.
- Lénárt, P., Bacher, C.P., Daigle, N., Hand, A.R., Eils, R., Terasaki, M., Ellenberg, J. (2005). A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature*, 436:812-8.
- Lillie, F.R. (1913). The mechanism of fertilization. *Science*, 38:524–528.
- Lim, D., Kyojuka, K., Gragnaniello, G., Carafoli, E., Santella, L. (2001). NAADP⁺ initiates the Ca²⁺ response during fertilization of starfish oocytes. *FASEB J.*, 15:2257-2267.
- Lim, D., Lange, K., Santella, L. (2002). Activation of oocytes by latrunculin A. *FASEB J.*, 16:1050-1056.
- Lim, D., Ercolano, E., Kyojuka, K., Nusco, G.A., Moccia, F., Lange, K., Santella, L. (2003). The M-phase-promoting factor modulates the sensitivity of the Ca²⁺ stores

- to inositol 1,4,5-trisphosphate via the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 278:42505-42514.
- Loeb, J. (1914). On some non-specific factors for the entrance of the spermatozoon into the egg. *Science*, 40:316–348.
- Longo, F.J, Anderson, E. (1970). The effects of nicotine on fertilization in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *J. Cell Biol.*, 46:308-25.
- Longo, F.J., Woerner, M., Chiba, K., Hoshi, M. (1995). Cortical changes in starfish (*Asterina pectinifera*) oocytes during 1-methyladenine-induced maturation and fertilisation/activation. *Zygote*, 3:225-239.
- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MARK signaling pathway through PI3-kinase gamma. *Science*, 275:394-397.
- Lynn, J.W., Chambers, E.L. (1984). Voltage clamp studies of fertilization in sea urchin eggs. Effect of clamped membrane potential on sperm entry, activation and development. *Dev. Biol.*, 102:98-109.
- Machaca, K. (2004). Increased sensitivity and clustering of elementary Ca²⁺ release events during oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 275:170-182.
- Machaca, K. (2007). Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. *J. Cell Physiol.*, 213:331-40.
- Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*, 69:1–17.
- Masui, Y., Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177:129-145.
- Matsumoto, M., Kawase, O., Islam, M.S., Naruse, M., Watanabe, S.N., Ishikawa, R., Hoshi M. (2008). Regulation of the starfish sperm acrosome reaction by cGMP, pH, cAMP and Ca²⁺. *Int. J. Dev. Biol.*, 52:523-6.

- Mazia, D. (1937). The release of calcium in Arbacia eggs on fertilization. *J. Comp. Physiol.*, 10:291–304.
- McCulloh, D.H., Chambers, E.L. (1992). Fusion of membranes during fertilization. Increase of the sea urchin egg's membrane capacitance and membrane conductance at the site of contact with the sperm. *J. Gen. Physiol.*, 99:137-175.
- McCulloh, D.H., Rexroad, C.E., Levitan, J.H. (1983). Insemination of rabbit eggs is associated with slow depolarization and repetitive diphasic membrane potentials. *Dev. Biol.*, 95:372-7.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. Murray, D. (2002). PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 31:151–175.
- McPherson, S.M., McPherson, P.S., Mathews, L., Campbell, K.P., Longo, F.J. (1992). Cortical localization of a calcium release channel in sea urchin eggs. *J. Cell Biol.*, 116:1111-1121.
- Meijer, L., Guerrier, P. (1984). Maturation and fertilization in starfish oocytes. *Int. Rev. Cytol.*, 86:129–196.
- Michell, R., Heath, V.L., Lemmon, M.A., Dove, S.K. (2006). Phosphatidylinositol 3, 5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Bioch. Sci.*, 31:52-63.
- Mikoshiha, K. (1997). The InsP₃ receptor and intracellular Ca²⁺ signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7:339-345.
- Miyazaki, A., Kamitsubo, E., Nemoto, S. (2000). Premeiotic aster as a device to anchor the germinal vesicle to the cell surface of the presumptive animal pole in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 218:161–171.
- Miyazaki, S., Hirai, S. (1979). Fast polyspermy block and activation potential. Correlated changes during oocyte maturation of a starfish. *Dev. Biol.*, 70: 327-40.
- Miyazaki, S.I., Ohmori, H., Sasaki S. (1975). Potassium rectifications of the starfish oocyte membrane and their changes during oocyte maturation. *J. Physiol.*, 246:55–78.

- Miyazaki, S., Igusa, Y. (1982). Ca^{2+} -mediated activation of a K current at fertilization of golden hamster eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:931-5.
- Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Sirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., Mikoshiba, K.(1992). Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillations by antibody to the inositol 1.4.5-triphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, 257:251-255.
- Miyazaki, S. (2007). Intracellular Ca^{2+} oscillations in mammalian eggs at fertilization. *J. Physiol.*, 584:713-4.
- Moccia, F., Lim, D., Nusco, G.A., Ercolano, E., Santella, L. (2003). NAADP activates a Ca^{2+} current that is dependent on F-actin cytoskeleton. *FASEB J.*, 17:1907-1909.
- Moccia, F., Nusco, G.A., Lim, D., Kyozuka, K., Santella, L. (2006). NAADP and InsP_3 play distinct roles at fertilization in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 294:24-38.
- Moody, W.J., Bosma, M.M. (1985). Hormone-induced loss of surface membrane during maturation of starfish oocytes: differential effects on potassium and calcium channels. *Dev. Biol.*, 112:396-404.
- Mohri, T., Hamaguchi, Y. (1989). Analysis of the breakdown of cortical granules in echinoderm eggs by microinjection of second messengers. *Cell Struct. and Funct.*, 14:429-438.
- Moreau, M., Guerrier, P., Doree, M., Ashley, C.C. (1978). Hormone- induced release of intracellular Ca^{2+} triggers meiosis in starfish oocytes. *Nature*, 272:251-253.
- Morisawa, M., Kanatani, H. (1978). Oocyte- surface factor responsible for 1-methyladenine-induced oocyte maturation in starfish. *Gamete Res.*, 1:157-164.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., Dunphy, W.G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*, 270:86-920.

- Nakahara, M., Shimozawa, M., Nakamura, Y., Irino, Y., Morita, M., Kudo, Y., Fukami, K. (2005). A novel phospholipase C, PLC(zeta)2, is a neuron-specific isozyme. *J. Biol. Chem.*, 280:29128-29134.
- Nakamura, S., Hiramoto, Y. (1978). Mechanical properties of the cell surface in starfish eggs. *Dev. Growth Differ.*, 24:429-442.
- Nakano, T., Deguchi, R., Kyojuka, K. (2014). Intracellular calcium signaling in the fertilized eggs of Annelida. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450:1188–1194.
- Nemoto, S-I., Yoneda, M., Uemura, I. (1980). Marked decrease in the rigidity of starfish oocytes induced by 1-methyladenine. *Dev. Growth Differ.*, 22:315-325.
- Nemoto, S-I. (1982). Nature of the 1-methyladenine- requiring phase of starfish oocytes. *Dev. Growth Differ.*, 24:429-442.
- Nicotera, P., Orrenius, S., Nilsson, T., Berggren, P.O. (1990). An inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6858-6862.
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, 17:471-480.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews: Mol. Cell Biol.*, 2:21-32.
- Norbury, C., Nurse, P. (1989). Control of the higher eukaryote cell cycle by p34^{cdc2} homologues. *Biochim. Biophys. Acta*, 989:85-95.
- Noh, D.Y., Shin, S.H., and Rhee, S.G. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1242:99-113.
- Nomikos, N.M., Blayney, L.M., Larman, M.G., Campbell, K., Rossbach, A., Saunders, C.M., Swann, K., Lai, F.A. (2005). Role of phospholipase C-zeta domains in Ca^{2+} -dependent phosphatidylinositol 4, 5- bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca^{2+} oscillations. *J. Biol. Chem.*, 280:31011-8.

- Nusco, G.A., Lim, D., Sabala, P., Santella, L. (2002). Ca²⁺ response to cADPr during maturation and fertilization of starfish oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290:1015-1021.
- Nusco, G.A., Chun, J.T., Ercolano, E., Lim, D., Gragnaniello, G., Kyojuka, K., Santella, L. (2006). Modulation of calcium signaling by the actin-binding protein cofilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348:109-114.
- Odorizzi, G., Babst, M., Emr, S.D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, 25:229-35.
- Okumura, E., Sekiai, T., Hasanaga, S., Tachibana, K., Kishimoto, T. (1996). Initial triggering of M-phase in starfish oocytes: a possible novel component of maturation promoting factor besides cdc2 kinase. *J. Cell Biol.*, 132:125-135.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signaling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat. Cell Biol.*, 4:111-116.
- Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int. Rev. Cytol.*, 258:1-82.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K., Kishimoto, T. (1992). Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO. J.*, 11:1763-1772.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okumura, E., Kishimoto, T. (1993). Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes. *J. Cell Sci.*, 105:873-881.
- Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., Lai, F.A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 379:364-368.
- Partida-Sánchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T.D.,

- Lund, F.E. (2001). Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nature Med.*, 7:1209–1216
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Gill, D.L. (1999). Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*, 98:487–499.
- Perez-Mongiovi, D., Beckhelling, C., Cang, P., Ford, C.C., Houliston, E. (2000). Nuclei and microtubule asters stimulate maturation/M phase promoting factor (MPF) activation in *Xenopus* eggs and egg cytoplasmic extracts. *J. Cell. Biol.*, 150:963-74.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., Nigg, E.A. (1990). *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 61:591-602.
- Petersen, O.H. (1996). Can Ca^{2+} be released from secretory granules or synaptic vesicles? *Trends Neurosci.*, 19:411-413.
- Picard, A., Doree, M. (1984). The role of the germinal vesicle in producing maturation-promoting factor (MPF) as revealed by the removal and transplantation of nuclear material in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 104:357-365.
- Picard, A., Giraud, F., Le Bouffant, F., Sladeczek, F., Le Peuch, C., Doree, M. (1985). Inositol 1,4,5-triphosphate microinjection triggers activation, but not meiotic maturation in amphibian and starfish oocytes. *FEBS Lett.*, 182:446-450.
- Picard, A., Labbe, J.C., Barakat, H., Cavadore, J.C., Doree, M. (1991). Okadaic acid mimics a nuclear component required for cyclin B-cdc2 kinase microinjection to drive starfish oocytes into M phase. *J. Cell Biol.*, 115:337-344.
- Pinton, P., Pozzan, T., Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, 17:5298-5308.
- Prigent, C., Hunt, T. (2004). Oocyte maturation and cell cycle control: a farewell symposium for Pr. Marcel Dorée. *Biol. Cell*, 96:181-5.

- Poenie, M., Alderton, J., Tsien, R.Y., Steinhardt, R.A. (1985) Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle, *Nature*, 315:147-149.
- Poenie, M., Alderton, J., Steinhardt, R.A. Tsien, R.Y. (1986). Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science*, 233:886-889.
- Puppo, A., Chun, J.T., Gragnaniello, G., Garante, E., Santella, L. (2008). Alteration of the cortical actin cytoskeleton deregulates Ca²⁺ signaling, monospermic fertilization, and sperm entry. *PLoS ONE*, 3:e3588.
- Quesada, I., Chin, W. C., Steed, J., Campos-Bedolla, P., Verdugo, P. (2001). Mouse mast cell secretory granules can function as intracellular ionic oscillators. *Biophys. J.*, 80:2133-2139.
- Ramos, I., Reich, A., Wessel, G.M. (2014). Two-pore channels function in calcium regulation in sea star oocytes and embryos. *Development*, 141:4598–4609.
- Reimer, C.L., Crawford, B.J. (1995). Identification and partial characterization of yolk and cortical granule proteins in eggs and embryos of the starfish, *Pisaster ochraceus*. *Dev. Biol.*, 167:439-457.
- Rhee, S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:281-312.
- Ridgway, E.B., Gilkey, J.C., Jaffe, L.F. (1977). Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 74:623-627.
- Rosado, J.A., Jenner, S. Sage, S.O. (2000). A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformational coupling. *J. Biol Chem.*, 275:7527–7533.
- Rothschild, L., Swann, M.M. (1950). The fertilization reaction in the sea-urchin egg; the effect of nicotine. *J. Exp. Biol.*, 27:400-6.
- Rothschild, L. (1952). The fertilization reaction in the sea-urchin. The induction of polyspermy by nicotine. *J. Exp. Biol.*, 30:57-67.
- Rothschild, L. (1954). Polyspermy. *Q. Rev. Biol.*, 29:332-42.

- Runft, L.L., Carroll, D.J., Gillett, J., Giusti, A.F., O'Neill, F.J., Foltz, K.R. (2004). Identification of a starfish egg PLC-gamma that regulates Ca^{2+} release at fertilization. *Dev. Biol.*, 269:220-236.
- Runft, L.L., Jaffe, L.A., Mehlmann, L.M. (2002). Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev. Biol.*, 245:237-254.
- Runnström, J., Monné, L. (1945). On some properties of the surface layers of immature and mature sea urchin eggs, especially the changes accompanying nuclear and cytoplasmic maturation. *Ark. Zool.*, 36A:1-26.
- Runnström, J. (1963). Sperm-induced protrusions in sea urchin oocytes: a study of phase separation and mixing in living cytoplasm. *Dev. Biol.*, 7:38-50.
- Russo, G.L., Kyozuka, K., Antonazzo, L., Tosti, E., Dale, B. (1996). Maturation promoting factor in ascidian oocytes is regulated by different intracellular signals at meiosis I and II, *Development*, 122:1995-2003.
- Saarikangas, J., Zhao, H., Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol. Rev.*, 90:259-89.
- Sabała, P., Targos, B., Caravelli, A., Czajkowski, R., Lim, D., Gragnaniello, G., Santella, L., Barańska, J. (2002). Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296:484-91.
- Saaunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., Lai F.A. (2002). PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129:3533-44.
- Sadler, K.C., Ruderman, J.V. (1998). Components of the signaling pathway linking the 1-methyladenine receptor to MPF activation and maturation in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 197:25-38.
- Sano, K., Kanatani, H. (1980). External calcium ions are requisite for fertilization of sea urchin eggs by spermatozoa with reacted acrosomes. *Dev Biol.*, 78:242-246.

- Santella, L., Monroy, A., Rosati, F. (1983). Studies on the differentiation of egg envelopes. *Dev. Biol.*, 99:473-481.
- Santella, L., Alikani, M., Talansky, B.E., Cohen, J., Dale, B. (1992). Is the human oocyte plasma membrane polarized? *Hum. Reprod.* 7:999-1003.
- Santella, L., Kyojuka K. (1994). Reinitiation of meiosis in starfish oocytes requires an increase in nuclear Ca^{2+} . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203:674-680.
- Santella, L., Kyojuka, K. (1997). Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca^{2+} transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium*, 22:11-20.
- Santella, L., Carafoli, E., (1997). Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J.*, 11:1091-1109.
- Santella, L., De Riso, L., Gragnaniello, G., Kyojuka, K. (1998). Separate activation of the cytoplasmic and nuclear calcium pools in maturing starfish oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252:1-4.
- Santella, L., De Riso, L., Gragnaniello, G., Kyojuka, K. (1999). Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by $InsP_3$ -mediated Ca^{2+} release. *Exp. Cell Res.*, 248:567-574.
- Santella, L., Kyojuka, K., Genazzani, AA, De Riso L., Carafoli, E. (2000). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced Ca^{2+} release. Interactions among distinct Ca^{2+} mobilizing mechanisms in starfish oocytes. *J. Biol. Chem.*, 275:8301-8306.
- Santella, L., Lim, D., Moccia, F. (2004). Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends Biochem. Sci.*, 29:400-408.
- Santella, L. (2005). NAADP: a new second messenger comes of age. *Mol. Interv.*, 5:70-72.
- Santella, L., Puppo, A., Chun, J.T. (2008). The role of the actin cytoskeleton in calcium signaling in starfish oocytes. *Int. J. Dev. Biol.*, 52:571-584.

- Santella, L., Chun, J.T. (2011). Actin, more than just a housekeeping protein at the scene of fertilization. *Sci. China Life Sci.*, 54:733-743.
- Santella, L., Vasilev, F., Chun, J.T. (2012). Fertilization in Echinoderms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425:588-94.
- Santella, L., Limatola, N., Chun J.T. (2014). In: *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. Edition: 978-4-43154588-0, Chapter: 13 H. Sawada, N. Inoue, M. Iwano (Eds.), Actin Cytoskeleton and Fertilization in Starfish Eggs, Publisher: Springer Verlag, pp. 141–155.
- Santella, L., Limatola, N., Chun, JT., (2015) Calcium and actin in the saga of awakening oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 460:104-13.
- Santella, L., Dale, B. (2015). Assisted yes, but where do we draw the line? *Reprod. Biomed. Online*, 31:476-8.
- Sardet, C., Prodon, F., Dumollard, R., Chang, P., Chenevert, J. (2002). Structure and function of the egg cortex from oogenesis through fertilization. *Dev. Biol.*, 241:1-23.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., Lai, F.A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129:3533-3544.
- Schroeder, T.E. (1981). Microfilament-mediated surface change in starfish oocytes in response to 1-methyladenine: implications for identifying the pathway and receptor sites for maturation-inducing hormones. *J. Cell Biology*, 90:362-371.
- Schroeder, T.E., Stricker, S.A. (1983). Morphological changes during maturation of starfish oocytes: surface ultrastructure and cortical actin. *Dev. Biol.*, 98:373-384.
- Schroeder, T.E. (1985). Cortical expressions of polarity in the starfish oocyte. *Develop. Growth and Differ.*, 27:311-321.
- Schroeder, T.E.(1986). The egg cortex in early development of sea urchins and starfish. *Dev. Biol.*, 2:59–100.

- Schuel, H. (1978). Secretary functions of egg cortical granules in fertilization and development: a critical review. *Gamete Res.*, 1:299-382.
- Schuel, H. (1985). Functions of egg cortical granules. In: *Biology of Fertilization*. The fertilization response of the egg. Vol 3 Eds. C.B. Metz and A. Monroy. Acad. Press, Inc., 1-31.
- Schuetz, A.W. (1975). Cytoplasmic activation of starfish oocytes by sperm and divalent ionophore A-23187. *J. Cell Biol.*, 66:86-94.
- Schuetz, A.W., Longo F.J. (1981). Hormone-cytoplasmic interactions controlling sperm nuclear decondensation and male pronuclear development in starfish oocytes. *J. Exp. Zool.*, 215:107-111.
- Sechi, A.S., Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.*, 113:3685-3695.
- Shen, S.S., Buck, W.R. (1993). Sources of calcium in sea urchin eggs during the fertilization response. *Dev. Biol.*, 157:57-69.
- Shilling, F., Chiba, K., Hoshi, M., Kishimoto, T., Jaffe, L.A. (1989). Pertussis toxin inhibits 1-methyladenine-induced maturation in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 133:605-608.
- Shoenmakers, H.J., Colenbrander, P.H., Peute, J., Van Oordt, P.G. (1981). Anatomy of the ovaries of the starfish *Asterias rubens* (Echinodermata). A histological and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.*, 217:577-597.
- Shirai, H., Hosoya, N., Sawada, T., Nagahama, Y., Mohri, H. (1990). Dynamics of mitotic apparatus formation and tubulin content during oocyte maturation in starfish. *Development Growth and Differentiation* 32:521-529.
- Shoji, Y., Hamaguchi, M., Hiramoto, Y. (1978). Mechanical properties of the endoplasm in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.*, 117:79-87.

- Smani, T., Dionisio, N., López, J.J., Berna-Erro, A., Rosado, J.A. (1838). Cytoskeletal and scaffolding proteins as structural and functional determinants of TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014:658–664.
- Sousa, M., Azevedo, C. (1989). Starfish sperm-oocyte jelly binding triggers functional changes in cortical granules: A study using acid phosphatase and ruthenium red ultrastructural histochemistry. *Histochemistry*, 90:353-357.
- Srinivas, S.P., Ong, A., Goon, L., Goon, L., Bonanno, J.A. (2002). Lysosomal Ca^{2+} stores in bovine corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43:2341-2350.
- Steinhardt, R.A., Epel D. (1974). Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1915-1919.
- Stephens, L., Ellson, C. Hawkins, P. (2002). Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:203-213.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306:67-69.
- Stricker, S.A. (1997). Intracellular injections of a soluble sperm factor trigger calcium oscillations and meiotic maturation in unfertilized oocytes of a marine worm. *Dev. Biol.*, 186:185-201.
- Sugiyama, T., Matsuda, Y., Mikoshiba, K. (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor associated with focal contact cytoskeletal proteins. *FEBS Lett.*, 466:29–34.
- Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., Yin, H.L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, 274:33179-33182.
- Sun, L., Machaca, K. (2004). $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ negatively regulates the initiation of oocyte maturation. *J. Cell. Biol.*, 165:63-75.
- Swann, K., Ozil, J.P. (1994). Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cyt.*, 152:183-222.

- Swann, K. (1990). A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 110:1295-1302.
- Swann, K., Saunders, C.M., Rogers, N.T., Lai, F.A. (2006). PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 17:264-273.
- Tadenuma, H., Chiba, K., Takahashi, K., Hoshi, M., Katada, T. (1991). Purification and characterization of a GTP-binding protein serving as pertussis toxin substrate in starfish oocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 290:411-417.
- Tadenuma, H., Takahashi, K., Chiba, K., Hoshi, M., Katada, T. (1992). Properties of 1-methyladenine receptor in starfish oocytes membranes: Involvement of pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in the receptor mediated signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186:114-121.
- Takahashi, T., Igarashi, H., Kawagoe, J., Amita, M., Hara, S., Kurachi, H. (2009). Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biol. Reprod.*, 80:493–502.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., Nishizuka, Y. (1979). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91:1218-1224.
- Terasaki, M. (1996). Actin filament translocations in sea urchin eggs. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 34:48-56.
- Terasaki, M., Jaffe, L.A., Hunnicut, G.R., Hammer III, J.A. (1996). Structural change of the endoplasmic reticulum during fertilization: evidence for loss of membrane continuity using green fluorescent protein. *Dev. Biol.*, 179:320-328.
- Terasaki, M., Okumura, E., Hinkle, B., Kishimoto, T. (2003). Localization and Dynamics of Cdc2-Cyclin B during Meiotic Reinitiation in Starfish Oocytes. *Mol. Biol. Cell*, 14:4685–4694.

- Terasaki, M., Runft, L. (2010). Two-stage dependence for 1-methyladenine induced reinitiation of meiotic maturation in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.*, 316:2654-2663.
- Tilney, L.G., Jaffe, L.A. (1980). Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *J. Cell. Biol.*, 87:771-782.
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.*, 25:1804-15.
- Tombes, R.M., Simerly, C., Borisy, G.G., Schatten, G. (1992). Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J. Cell. Biol.*, 117:799-811.
- Townley, I.K., Roux, M.M., Foltz, K.R. (2006). Signal transduction at fertilization: the Ca^{2+} release pathway in echinoderms and other invertebrate deuterostomes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 17:293-302.
- Turner, P.R., Sheetz, M.P., Jaffe L.A. (1984). Fertilization increases the polyphosphoinositide content in sea urchin egg. *Nature*, 310:414-5.
- Turner, P.R., Jaffe, L.A., Fein, A. (1986). Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1, 4, 5- triphosphate and GTP-binding protein. *J. Cell Biol.*, 102:70-76.
- Turvey, M.R., Fogarty, K.E., Thorn, P. (2005). Inositol (1, 4, 5)-trisphosphate receptor links to filamentous actin are important for generating local Ca^{2+} signals in pancreatic acinar cells. *J. Cell Sci.*, 118:971-980.
- Tyler, A., Monroy, A., Kao, C.Y., Grundfest, H. (1956). Membrane potential and resistance of the starfish egg before and after fertilization. *Biol. Bull.*, 111:153-177.

- Ullah, A., Jung, P., Ullah, G., Machaca, K. (2014). The role of IP₃ receptor channel clustering in Ca²⁺ wave propagation during oocyte maturation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 123:83-101.
- Vacquier, V.D., Tegner, M.J., Epel, D. (1973). Protease released from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy. *Exp. Cell Res.*, 80:111-119.
- Vacquier, V.D. (1975). The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge. *Dev. Biol.*, 43:62-74.
- Van den Bout I., Divecha N. (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J. Cell Sci.*, 122:3837-50.
- Vartiainen, M.K. (2008). Nuclear actin dynamics—from form to function. *FEBS Lett.*, 582:2033–2040.
- Vasilev, F., Chun, J.T., Gragnaniello, G., Garante, E., Santella, L. (2012). Effects of Ionomycin on egg activation and early development in starfish. *J. PLoS ONE* 7:e39231.
- Villet, C.A., Walcker, W.F., Barnes, R.D. (1978). *Zoologica Generale*, 5th edn. Editoriale Grasso pp.851-859.
- Wahli, W. (1988). Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends. Genet.*, 4:227-232.
- Wang, Y.J., Gregory, R.B., Barritt, G.J. (2002a). Regulation of F-actin and endoplasmic reticulum organization by the trimeric G-protein Gi2 in rat hepatocytes. Implication for the activation of store-operated Ca²⁺ inflow. *J. Biol. Chem.*, 275:22229-37.
- Wang, Y., Mattson, M.P., Furukawa, K. (2002b). Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J. Neurochem.*, 82:945–952.
- Wang, X., Zhang, X., Dong, X.P., Samie, M., Li, X., Cheng, X., Goschka, A., Shen, D., Zhou, Y., Harlow, J., Zhu, M.X., Clapham, D.E., Ren, D., Xu, H. (2012). TPC

- proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell*, 151:372–383.
- Wasserman, W.J., Pinto, L.H., O'Connor, C.M., Smith, L.D. (1980). Progesterone induces a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$ in of *Xenopus laevis* oocytes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77:1534-1536.
- Weiss, A. (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell*, 73:209-212.
- Wessel, G.M., Conner, S.D., Berg, L. (2002). Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, 129:4315-4325.
- Whitaker, M., Baker, P.F. (1983). Calcium-dependent exocytosis in an in vitro secretory granule plasma membrane preparation from sea urchin eggs and the effects of some inhibitors of cytoskeletal function. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 218:397-413.
- Whitaker, M., Irvine, R.F. (1984). Inositol 1, 4, 5- trisphosphate microinjection activates sea urchin eggs. *Nature*, 312:636 – 639.
- Whitaker, M., Swann, K. (1993). Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117:1-12.
- Whitaker, M. (2006). Calcium at fertilization and in early development. *Physiol. Rev.*, 86:25-88.
- Wilson, W.L., Heilbrunn, L.V. (1952). The protoplasmic cortex in relation to stimulation. *Biol. Bull.*, 103:139–144.
- Wolven, A.K., Belmont, L.D., Mahoney, N.M., Almo, S.C., Drubin, D.G. (2000). In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J. Cell Biol.*, 150:895–904.
- Witchel, H.J., Steinhardt, R.A. (1990). 1-Methyladenine can consistently induce a fura-detectable transient calcium increase which is neither necessary nor sufficient for maturation in oocytes of the starfish *Asterina miniata*. *Dev. Biol.*, 141:393-8.

- Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.*, 14:461–469.
- Wu, H., He, C.L., Fissore, R.A. (1997). Injection of porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:176-189.
- Yamamoto, K., Yoneda, M. (1983). Cytoplasmic cycle in meiotic division of starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 96:166-172.
- Yamamoto, K. (1985). Germinal vesicle contents are required for the cytoplasmic cycle during meiotic division of starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 107:213-9.
- Yanagida, K., Fujikura, Y., Katayose, H. (2008). The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology. *Reprod. Med. Biol.*, 7:133–142.
- Yazaki, I., Tsurugaya, T., Santella, L., Chun, J.T., Amore, G., Kusunoki, S., Asada, A., Togo, T., Akasaka, K. (2015). Ca²⁺ influx-linked protein kinase C activity regulates the β -catenin localization, micromere induction signalling and the oral-aboral axis formation in early sea urchin embryos. *Zygote*, 23:426-446.
- Yin, H.L., Janmey, P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.*, 65:761-89.
- Ziomek, C.A., Epel D. (1975). Polyspermy block of *Spisula* eggs is prevented by cytochalasin B. *Science*, 189:139–141.

RINGRAZIAMENTI

Un enorme grazie alla Dott.ssa Luigia Santella per avermi concesso l'opportunità di svolgere il Dottorato nel suo Laboratorio, per aver creduto costantemente nelle mie capacità e avermi spronato sempre a dare il massimo, lavorando al mio fianco, lei per prima, senza sosta per perseguire la ricerca della conoscenza, lontana da altre meno nobili ambizioni. Grazie per avermi trasmesso l'entusiasmo e la passione di fare Scienza, la capacità di gioire delle scoperte e di affrontare con perseveranza le difficoltà incontrate lungo il percorso. Grazie per avermi resa una ricercatrice ed una persona migliore.

Grazie anche a tutti gli altri membri del Laboratorio, per avermi accolta gentilmente nel gruppo e avermi supportata, ognuno a suo modo, durante tutti questi anni creando un ambiente piacevole e stimolante, fonte di riflessioni ed ispirazioni continue. Grazie al Dott. Jong Tai Chun, al Dott. Filip Vasilev, a Ezio Garante, a Gianni Gagnaniello. Grazie inoltre ad Alessandro Manfredonia per aver rallegrato i nostri coffe-break e a Davide Caramiello per il suo supporto e la sua pazienza instancabile nella cura degli animali.

Il mio lavoro non sarebbe stato lo stesso senza tutti voi!

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, pilastri insostituibili della mia vita, per il sostegno smisurato e l'amore incondizionato che mi hanno sempre dimostrato, per avermi insegnato ad affrontare ogni cosa con coraggio e determinazione, a lottare strenuamente per raggiungere i miei obiettivi con onestà e coerenza e avermi permesso di dedicarmi serenamente ai miei studi, senza addossarmi mai una sola preoccupazione.

E infine grazie ad Alfonso, che ha saputo sopportare con pazienza i miei momenti bui e le mie assenze, incoraggiandomi e sostenendomi sempre, fiero ed orgoglioso dei miei successi e pronto a credere in me quando la mia stessa fiducia vacillava. Grazie per l'amore con cui mi hai sempre spronato a realizzare i miei sogni senza ostacoli e condizioni. Grazie infinitamente per tutto questo e per molto altro ancora.