

**Università degli Studi di Napoli “Federico II”**

**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**

**Dipartimento delle Scienze Biologiche**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA**

**Indirizzo Biologia Evoluzionistica**

**(XVIII Ciclo)**

**IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI  
PROTEINE REGOLATRICI DEL PROCESSO MEIOTICO IN  
OVOCITI DI *SPARUS AURATA***

**Tutore: Prof. Gaetano Ciarcia**

**Candidata: Dott.ssa Rosaria Ferro**

**Coordinatore: Prof.ssa Silvana Filosa**

# INDICE

<b>INDICE .....</b>	<b>2</b>
<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>4</b>
<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>5</b>
<b>1 - INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
1.1 - IL CICLO CELLULARE.....	7
1.1a - Mitosi .....	9
1.1b - Meiosi .....	13
1.2 - REGOLAZIONE MITOTICA DEL CICLO CELLULARE.....	15
1.2a - Punti di controllo del ciclo cellulare .....	15
1.2b - Complessi Cdk-ciclina.....	17
1.2c - Inibitori di Cdk.....	20
1.3 - REGOLAZIONE MEIOTICA DEL CICLO CELLULARE.....	24
1.3a - Profilo storico.....	24
1.3b - Ovociti e maturazione meiotica .....	25
1.3c - <i>Maturation-inducing substance</i> (MIS) .....	27
1.3d - Composizione e regolazione dell'MPF .....	30
1.3e - Composizione e regolazione del CSF .....	32
1.3f - Regolazione della maturazione meiotica: una visione d'insieme .....	36
1.3g - Ruolo di Cdk2 nel ciclo cellulare meiotico .....	39
1.3h - Fecondazione e attivazione dell'uovo .....	40
1.3i - Regolazione meiotica nei Pesci .....	43
<b>2 - SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>45</b>
<b>3 - MATERIALI E METODI .....</b>	<b>48</b>
3.1 - MODELLO SPERIMENTALE: L'ORATA .....	48
3.2 - MATERIALI .....	51
3.3 - CAMPIONAMENTO .....	51

3.4 - PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	52
3.5 - PURIFICAZIONE DI CDK SU <i>P13SUC1</i> .....	53
3.6 - IMMUNOPRECIPITAZIONE .....	54
3.7 - SAGGI RADIOCHIMICI .....	55
3.8 - WESTERN BLOTTING .....	57
3.9 - ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE .....	59
<b>4 - RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>61</b>
4.1 - ATTIVITÀ CDC2-LIKE IN <i>SPARUS AURATA</i> DURANTE IL COMPLETAMENTO MEIOTICO .....	61
4.2 - IMMUNOREATTIVITÀ DELLE CHINASI CDK-LIKE IN <i>SPARUS AURATA</i> .....	67
4.3 - DETERMINAZIONE DELLE IC <sub>50</sub> DI INIBITORI DI CDK IN <i>SPARUS AURATA</i> .....	82
4.4 - CARATTERIZZAZIONE DI MAPK IN <i>SPARUS AURATA</i> .....	86
4.5 - CARATTERIZZAZIONE DEL PROTEOMA IN UOVA DI <i>SPARUS AURATA</i> DURANTE IL COMPLETAMENTO MEIOTICO .....	89
<b>5 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>98</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>114</b>

## ABBREVIAZIONI

<b>1-MA</b>	<i><u>1-Methyladenine</u></i>
<b>APC</b>	<i><u>Anaphase-Promoting Complex</u></i>
<b>BSA</b>	<i><u>Bovine Serum Albumine</u></i>
<b>cADPR</b>	<i><u>cyclic ADP-Ribose</u></i>
<b>CAK</b>	<i><u>Cyclin-dependent kinase Activating Kinase</u></i>
<b>CaMKII</b>	<i><u>Calmodulin-dependent Protein Kinase II</u></i>
<b>Cdk</b>	<i><u>Cyclin-dependent kinase</u> (chinasi ciclina dipendente)</i>
<b>CDKI</b>	<i><u>Cdk inhibitors</u></i>
<b>cGMP</b>	<i><u>cyclic GMP</u></i>
<b>CKS</b>	<i><u>Cdc28 Kinase Specific</u></i>
<b>CPE</b>	<i><u>Cytoplasmic Polyadenylation Element</u></i>
<b>CPEB</b>	<i><u>Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein</u></i>
<b>CPSF</b>	<i><u>Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor</u></i>
<b>CSF</b>	<i><u>Cytostatic Factor</u></i>
<b>DHP</b>	<i><u>17<math>\alpha</math>,20<math>\beta</math>-dihydro-4-pregnen-3-one</u></i>
<b>DMSO</b>	<i><u>Dimethyl sulfoxide</u></i>
<b>EDTA</b>	<i><u>Ethylenediaminetetraacetic acid</u></i>
<b>FF-MAS</b>	<i><u>Follicular Fluid-Meiosis Activating Sterol</u></i>
<b>GPCR</b>	<i><u>Seven-transmembrane G Protein-Coupled Receptor</u></i>
<b>GV</b>	<i><u>Germinal Vesicle</u> (vescicola germinale)</i>
<b>GVBD</b>	<i><u>Germinal Vesicle Breakdown</u> (rottura della vescicola germinale)</i>
<b>IEF</b>	<i><u>Isolettrofocalizzazione</u></i>
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i><u>Inositolo 1,4,5-triphosphate</u></i>
<b>Kip</b>	<i><u>Kinase inhibitor protein</u></i>
<b>MAPK</b>	<i><u>Mitogenic Activated Protein Kinase</u></i>
<b>MEK1</b>	<i><u>MAPK activating kinase</u></i>
<b>MIS</b>	<i><u>Maturation-inducing substance</u></i>
<b>MOPS</b>	<i>acido 3-(N-Morfolino)-propansulfonico</i>
<b>MPF</b>	<i><u>Maturation-Promoting Factor</u></i>
<b>NAADP</b>	<i><u>Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate</u></i>
<b>NO</b>	<i><u>Nitric oxide</u></i>
<b>PABP</b>	<i><u>Poly(A) Binding Protein</u></i>
<b>PBS</b>	<i><u>Phosphate Buffered Saline</u></i>
<b>PKA</b>	<i><u>Protein kinase A</u></i>
<b>PLC</b>	<i><u>Phospholipase C</u></i>
<b>PMSF</b>	<i><u>Phenylmethylsulphonylfluoride</u></i>
<b>pRb</b>	<i>prodotto del gene <u>Rb</u> (retinoblastom)</i>
<b>Suc1</b>	<i><u>Suppressor of Cdc2 -1</u></i>
<b>THP</b>	<i><u>17<math>\alpha</math>,20<math>\beta</math>,21<math>\alpha</math>-trihydro-4-pregnen-3-one</u></i>
<b>xPlk1</b>	<i><u>Polo-like kinase</u></i>
<b>xPlkk1</b>	<i><u>Polo-like kinase kinase</u></i>

## RIASSUNTO

Nei teleostei, come in altri vertebrati, le uova appena deposte sono bloccate in metafase II. Al momento della fecondazione, lo spermatozoo attiva l'uovo con conseguente completamento della divisione meiotica ed inizio dello sviluppo embrionale. E' universalmente accettato che l'attivazione dell'uovo è regolata da due complessi proteici: il fattore che promuove la maturazione (MPF) ed il fattore citostatico (CSF). Tuttavia, solo pochi studi sono stati eseguiti utilizzando i pesci teleostei come modello sperimentale. Il presente lavoro di tesi riporta una caratterizzazione biochimica e funzionale del completamento meiotico in uova di *Sparus aurata* (orata). E' stata analizzata l'attività e l'espressione di molecole regolatrici del ciclo cellulare meiotico, quali la chinasi Cdc2 (Cdk1), subunità catalitica dell'MPF, la chinasi Cdk2 e MAP chinasi (MAPK), un componente del CSF, con la successiva identificazione dei relativi omologhi in *Sparus aurata*. Sia per Cdc2 che per MAPK è stata misurata l'attività enzimatica e determinata la reattività ad anticorpi in uova a vari tempi dopo la fecondazione. Per Cdc2, in particolare, sono state identificate, mediante immunoprecipitazione e purificazione per affinità (utilizzando il reagente *sepharose-p13Suc1*), due possibili isoforme a differente peso molecolare. Inoltre, l'utilizzo di inibitori organici delle Cdk, quali olomoucina e roscovitina, ha permesso un confronto tra la specificità di substrato della chinasi da *Sparus aurata* rispetto all'omologo umano. Parallelamente allo studio di Cdc2, è stata valutata

l'espressione di Cdk2, anch'essa appartenente alla famiglia Cdk, la cui attività varia durante il ciclo cellulare, similmente a Cdc2. Infine, per identificare eventuali altre proteine coinvolte nel completamento meiotico di *Sparus aurata*, è stato iniziato uno *screening* proteomico in campioni di uova a diversi tempi dalla fecondazione (0-60 min) mediante l'utilizzo dell'elettroforesi bidimensionale.

## **1 - INTRODUZIONE**

La capacità delle cellule di dividersi rappresenta un processo biologico fondamentale per la vita e lo sviluppo degli organismi viventi. Le prime scoperte su come una cellula si divide si ebbero nella seconda metà del XIX secolo, quando Walther Flemming visualizzò all'interno delle cellule strutture oggi conosciute come cromosomi e ne descrisse i cambiamenti durante la moltiplicazione cellulare, un processo che chiamò mitosi (Flemming, 1965).

Oggi sappiamo che l'obiettivo principale della divisione cellulare è la precisa duplicazione dell'informazione genetica attraverso il processo di replicazione del DNA e la successiva distribuzione di questa informazione nelle due cellule figlie. Difetti in questo processo, come ad esempio una divisione cellulare avvenuta in seguito ad un'incorretta o incompleta duplicazione dei cromosomi, potrebbero risultare in una perdita dell'informazione genetica, ed essere molto dannosi per la cellula stessa e per l'intero organismo. Per ovviare a questi problemi le cellule hanno adottato un sofisticato meccanismo di transizioni per stabilire un ordine nei numerosi eventi che costituiscono il ciclo cellulare.

### **1.1 - IL CICLO CELLULARE**

La vita di una cellula inizia con la sua formazione a partire dalla divisione di una cellula madre, e termina con la produzione, a sua volta, di cellule figlie o, alternativamente, con la propria morte. Gli stadi attraverso i

quali una cellula passa da una divisione alla successiva costituiscono il “ciclo cellulare”.

Il ciclo cellulare consta di due momenti fondamentali: la fase M (M = mitosi) e l'interfase, ognuno dei quali è a sua volta diviso in differenti momenti. La fase M include il processo di mitosi, durante il quale i cromosomi duplicati vengono separati in due nuclei distinti, e la citocinesi, durante la quale l'intera cellula viene fisicamente divisa in due cellule figlie. Nonostante la mitosi sia un evento fondamentale per una cellula, essa rappresenta solo un breve periodo del ciclo cellulare, la cui durata può variare da 30 minuti ad un'ora circa in base agli organismi considerati. La restante parte del ciclo cellulare è costituita dall'interfase, durante la quale la cellula si prepara alla divisione, raddoppiando la sua massa e attivando le sue funzioni metaboliche, tra cui la trascrizione, la traduzione e la replicazione. La maggior parte dei componenti cellulari viene quindi prodotta continuamente durante il periodo di interfase, tra una divisione cellulare e l'altra. Pertanto, è difficile individuare durante l'interfase delle precise tappe di progressione di crescita della cellula. Un'eccezione importante è rappresentata dalla sintesi del DNA che viene duplicato nel nucleo solo durante una parte limitata dell'interfase, detta fase S del ciclo. Il periodo compreso tra la fase M e l'inizio della sintesi del DNA, è detto periodo G1 (*gap 1*) ed il periodo compreso tra il completamento della sintesi del DNA ed il successivo periodo M è detto periodo G2 (*gap 2*). L'interfase risulta quindi composta dalla successione dei periodi G1, S e G2 e, di solito, corrisponde al 90% o più della durata del ciclo

cellulare.

Diversamente dalla fase M, la durata dell'interfase è molto variabile, da poche ore a diverse settimane, in base al tipo cellulare.

I processi di divisione cellulare sono essenzialmente di due tipi: mitosi e meiosi (Alberts, 2004; Darnell e Lodish, 2002).

### **1.1.a - Mitosi**

Da un punto di vista morfologico, la mitosi può essere suddivisa in cinque fasi successive distinguibili principalmente in base alle modificazioni dell'aspetto e del comportamento dei cromosomi. Le cinque fasi sono la profase, la prometafase, la metafase, l'anafase e la telofase (Fig. 1.1).

- Profase. Il passaggio dal periodo G2 al periodo M del ciclo cellulare è un evento non ben definito. La cromatina, che nell'interfase è diffusa, si condensa lentamente in cromosomi ben definiti, il cui numero esatto è caratteristico di ogni specie; ogni cromosoma si è duplicato durante il precedente periodo S ed è formato da due cromatidi fratelli uniti in un punto specifico da una regione detta centromero. Mentre i cromosomi si stanno condensando, il nucleolo inizia a disgregarsi e gradualmente scompare. All'inizio della profase, i numerosi microtubuli citoplasmatici del citoscheletro si disgregano costituendo una grossa riserva di molecole di tubulina. Queste molecole sono poi riutilizzate per la costruzione del componente più importante dell'apparato mitotico, il fuso mitotico. Si tratta di una struttura fibrosa bipolare, composta soprattutto da

microtubuli, che inizialmente si forma fuori dal nucleo. Nella maggior parte delle cellule animali il centro per la formazione del fuso è indicato dai centrioli. La coppia originale di centrioli della cellula si duplica mediante un processo che inizia subito prima del periodo S e dà origine a due coppie di centrioli. Ciascuna coppia entra quindi a far parte di un centro mitotico che costituisce il centro di un'organizzazione a raggiera dei microtubuli, l'aster. All'inizio i due aster si trovano uno di fianco all'altro vicino all'involucro nucleare. A partire dalla tarda profase i fasci di microtubuli polari che interagiscono tra i due aster (e che si vedono al microscopio ottico come fibre polari) si allungano in modo particolare e sembrano far allontanare l'uno dall'altro i due centri lungo la superficie esterna del nucleo. In questo modo si forma un fuso mitotico bipolare.

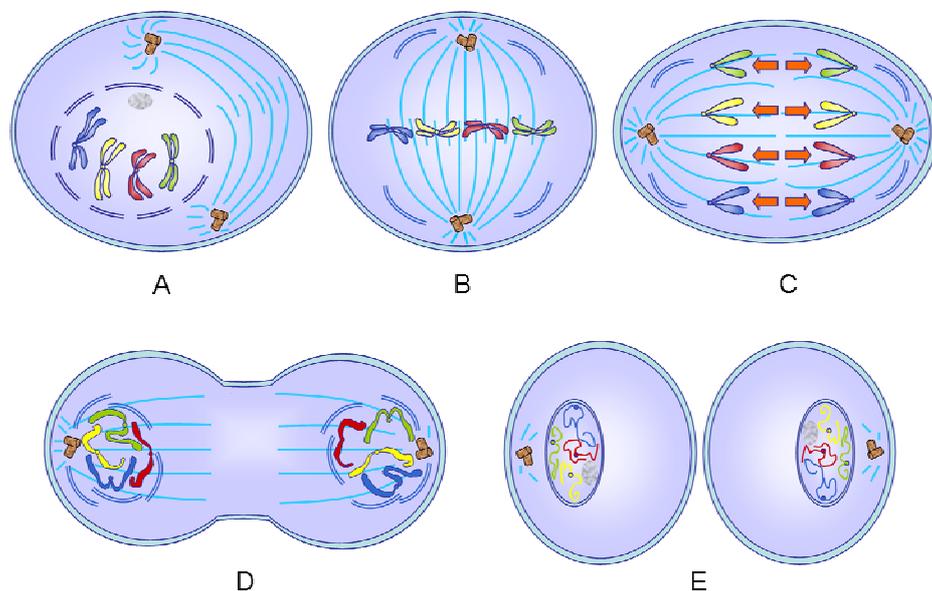
- Prometafase. La prometafase inizia improvvisamente con la disgregazione dell'involucro nucleare che si frammenta e dà origine a cisterne membranose che si distinguono da quelle del reticolo endoplasmatico e durante la mitosi rimangono visibili intorno al fuso. Il fuso, che si è sviluppato fuori dal nucleo, ora può penetrare nell'area nucleare. Strutture specializzate dette cinetocori si formano su entrambe le facce del centromero e si attaccano ad uno speciale gruppo di microtubuli, detti fibre del cinetocore o microtubuli del cinetocore. Queste fibre si irradiano in direzione opposta da ciascun lato di ogni cromosoma ed interagiscono con le fibre del fuso bipolare. I cromosomi divengono preda di movimenti agitati dovuti alle interazioni fra le fibre

dei loro cinetocori e gli altri componenti del fuso.

- Metafase. A causa dei loro movimenti durante la prometafase i cromosomi assumono una disposizione tale che i loro centromeri si trovano tutti su uno stesso piano. Sembra che la responsabilità dell'allineamento dei cromosomi, a metà strada tra i poli del fuso, e del loro orientamento con l'asse maggiore, disposto ad angolo retto rispetto all'asse del fuso, sia da attribuire alle fibre del cinetocore. Ciascun cromosoma è mantenuto in tensione a livello della piastra metafasica dalla sua coppia di cinetocori, le cui fibre si dirigono verso gli opposti poli del fuso.
- Anafase. Spesso la metafase dura molto tempo. Come se fosse innescata da uno speciale segnale, l'anafase inizia bruscamente quando i due cinetocori di ogni cromosoma si separano, per cui ogni cromatidio può essere lentamente trascinato verso un polo del fuso. Tutti i cromatidi vengono spostati (in direzione del polo verso il quale sono rivolti) alla stessa velocità, che è di circa 1 mm al minuto. Durante questi movimenti dell'anafase, le fibre del cinetocore si accorciano man mano che i cromosomi si avvicinano ai poli. Quasi contemporaneamente le fibre del fuso si allungano ed i due poli del fuso polare si allontanano reciprocamente. Di solito l'anafase dura solo pochi minuti.
- Telofase. Quando i cromatidi figli che si sono separati arrivano ai poli, le fibre del cinetocore scompaiono. Le fibre polari si allungano ulteriormente e si riforma un nuovo involucro nucleare attorno a ciascun

gruppo di cromatidi figli. La cromatina condensata si espande ancora una volta, i nucleoli ricompaiono e la mitosi termina.

In questa fase avviene anche la citocinesi (o citodieresi), durante la quale la membrana, che circonda la zona mediana della cellula secondo un piano perpendicolare all'asse del fuso e che si trova tra i due nuclei figli, viene trascinata verso l'interno e forma il solco di divisione, che gradualmente si approfonda finché incontra i pochi resti del fuso mitotico presenti tra i due nuclei. Questo stretto ponte o corpo intermedio, può rimanere per un certo tempo prima di strozzarsi e infine rompersi alle due estremità dando origine a due cellule figlie complete e distinte.



**Figura 1.1** - Fasi della mitosi. A: profase; B: metafase; C: anafase; D: telofase e citocinesi; E: due cellule figlie.

### 1.1.b - Meiosi

La meiosi è una divisione cellulare specializzata che produce cellule germinali aploidi. Essa prevede un ciclo di replicazione del DNA cromosomico seguito da due divisioni nucleari consecutive (fasi MI e MII) non intervallate da una sintesi di DNA (fase S).

Ogni divisione meiotica è formalmente divisa in profase, metafase, anafase e telofase. Di queste la più lunga e complessa è la profase I, la quale a sua volta è suddivisa in leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi.

#### ➤ Profase I

*Leptotene.* I cromosomi diventano visibili ed hanno l'aspetto di lunghi e sottili filamenti. Lungo i cromosomi compaiono piccole aree di ispessimento, dette cromomeri, che danno al cromosoma l'aspetto di una collana di perle.

*Zigotene.* In questa fase si assiste all'appaiamento dei cromosomi singoli e dei cromosomi omologhi, mediante il processo della sinapsi, una complessa struttura proteica che assomiglia ad una cerniera. Si formano così i bivalenti, cioè l'insieme di quattro cromatidi derivanti a due a due da ciascun cromosoma omologo. Il fenomeno dell'appaiamento non ha luogo durante il processo di mitosi.

*Pachitene.* Questo stadio, che corrisponde al completamento della sinapsi, è caratterizzato da un marcato processo di compattamento che riduce la lunghezza dei cromosomi a meno di un quarto rispetto a quella di partenza. La stretta vicinanza dei cromosomi omologhi consente lo scambio fisico di segmenti di DNA attraverso un processo detto *crossing over*, il quale è

fondamentale per la ricombinazione genetica. Spesso in questo stadio i nucleoli sono assai pronunciati.

*Diplotene.* Durante questa fase i cromosomi omologhi iniziano a respingersi e, durante la loro separazione, diventano visibili delle strutture poste a croce tra i due cromatidi non fratelli dette chiasmi. Ogni chiasma è la manifestazione visibile del *crossing over* avvenuto nello stadio precedente. Per ogni coppia di cromosomi sono evidenziabili uno o più chiasmi.

*Diacinesi.* I cromosomi giungono al massimo compattamento. I centromeri dei cromosomi omologhi si separano ulteriormente e i chiasmi rimangono gli ultimi punti di contatto tra gli omologhi. In questa fase si ha inoltre la scomparsa dei nucleoli, la formazione del fuso e la frammentazione dell'involucro nucleare.

- Metafase I. Al contrario di quanto accade nella mitosi, i centromeri non si dividono in questo stadio della meiosi. I due centromeri di ogni coppia di omologhi si attaccano alle fibre del fuso provenienti dai due poli opposti.
- Anafase I. Come nella mitosi, l'anafase ha inizio quando i cromosomi cominciano a muoversi verso i poli: i due membri di ciascuna coppia di omologhi vanno verso poli opposti, tirati dai microtubuli dei cinetocori. In questo modo ciascun polo riceve un corredo aploide di cromosomi.
- Telofase I. I cromosomi giungono ai poli del fuso; essi sono costituiti da due cromatidi fratelli attorno ai quali si formano gli involucri nucleari ed inizia la citocinesi. In molti organismi, però, questa fase e quella

successiva, l'interfase, sono molto brevi o non esistono affatto, cioè la membrana nucleare non si riforma e la cellula procede direttamente verso la meiosi II.

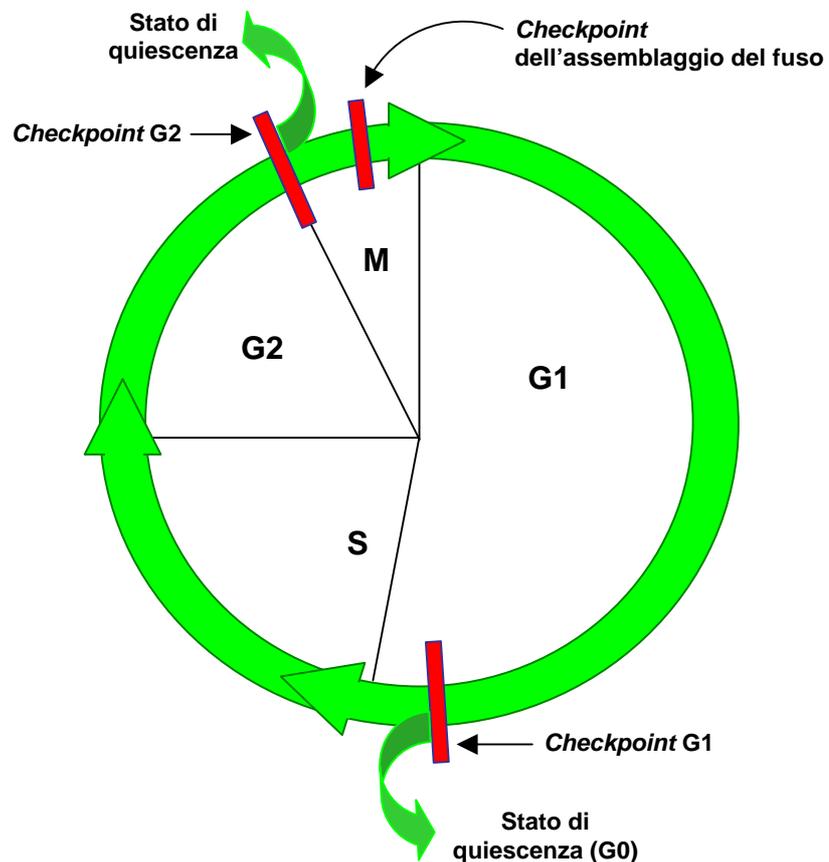
- Profase II. Questo stadio è caratterizzato da cromosomi contratti, nei quali è facilmente verificabile il numero aploide.
- Metafase II. I cromosomi si collocano sul piano equatoriale. Una differenza rispetto alla mitosi è rappresentata dal fatto che i cromatidi spesso si dissociano in parte l'uno dall'altro invece di essere strettamente associati come nella mitosi.
- Anafase II. I centromeri si dividono e i cromatidi sono attratti ai poli opposti dalle fibre del fuso.
- Telofase II. In corrispondenza dei due poli si ha la formazione dei nuclei attorno ai cromosomi.

## **1.2 - REGOLAZIONE MITOTICA DEL CICLO CELLULARE**

### **1.2.a - Punti di controllo del ciclo cellulare**

Ogni cellula è dotata di un sistema di controllo che regola la progressione del ciclo cellulare, affinché tutti i processi associati con le diverse fasi del ciclo siano portati a termine nella corretta sequenza, ed ogni fase sia correttamente completata prima che inizi la successiva. Questo monitoraggio cellulare è eseguito in una serie di *checkpoint* (punti di controllo). Il primo *checkpoint* si ha alla fine della fase G1 e consiste in un controllo di danni al DNA o, nel caso delle cellule di lievito, della presenza di

nutrienti e della dimensione cellulare. Un secondo *checkpoint* si trova tra la fase G2 e la fase M, per garantire che la sintesi del DNA sia stata completata prima che la cellula inizi il processo di divisione. Il terzo *checkpoint* è detto dell' "assemblaggio del fuso" e serve per verificare che tutti i cromosomi siano correttamente attaccati al fuso prima che la cellula passi dalla metafase all'anafase (Fig. 1.2).

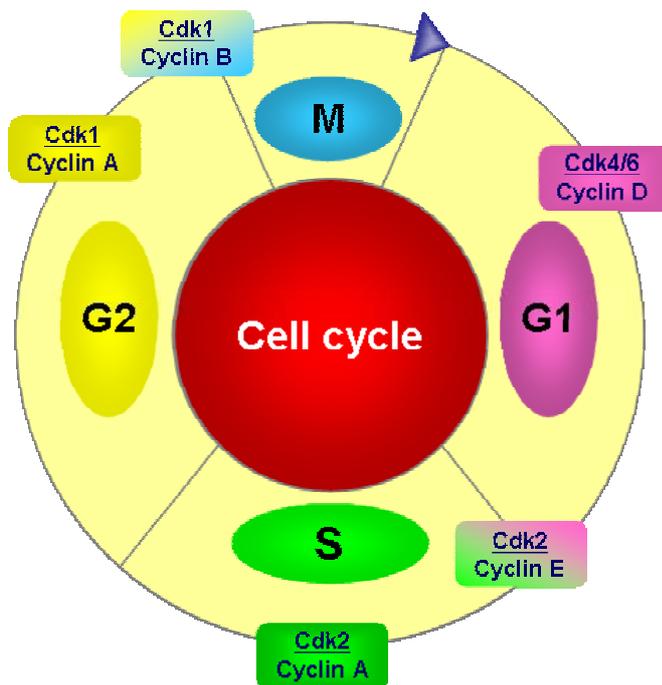


**Figura 1.2** - Punti di controllo del ciclo cellulare.

### 1.2.b - Complessi Cdk-ciclina

Numerosi studi hanno dimostrato che nella regolazione del ciclo cellulare sono coinvolte proteine appartenenti alla famiglia delle Cdk (*Cyclin-dependent kinase*). Le Cdk sono proteine chinasi altamente conservate che fosforilano fattori proteici su residui di serina e treonina in substrati proteici. Nel lievito, il ciclo cellulare è regolato da una sola Cdk (Cdc2 nel lievito a scissione *Schizosaccharomyces pombe* e Cdc28 nel lievito a gemmazione *Saccharomyces cerevisiae*). Nell'uomo, a tutt'oggi, sono state scoperte tredici Cdk, di cui sette sono quelle coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare: Cdk1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 (Knockaert *et al.*, 2002). L'attività delle Cdk durante il ciclo cellulare è finemente regolata da un sofisticato meccanismo di attivazione, che coinvolge il legame della Cdk con una subunità regolatrice, conosciuta come "ciclina" (Evans *et al.*, 1983). Il termine ciclina deriva dal fatto che l'espressione di queste proteine "oscilla" in maniera ciclica durante il ciclo cellulare, a differenza delle Cdk, la cui espressione durante il ciclo rimane relativamente costante.

Nelle cellule eucariotiche, durante il ciclo cellulare, agiscono numerosi complessi Cdk/ciclina specifici per ogni fase (Fig. 1.3). Ad esempio, all'inizio della fase G1, le cicline di tipo D si legano alle Cdk4 e Cdk6 formando dei complessi che fosforilano e inattivano la proteina del retinoblastoma (pRb), con il conseguente rilascio dei fattori di trascrizione E2F e DP1, che controllano l'espressione dei geni richiesti per la transizione G1/S e per la progressione nella fase S (Ezhevsky *et al.*, 1997; Dyson, 1998).

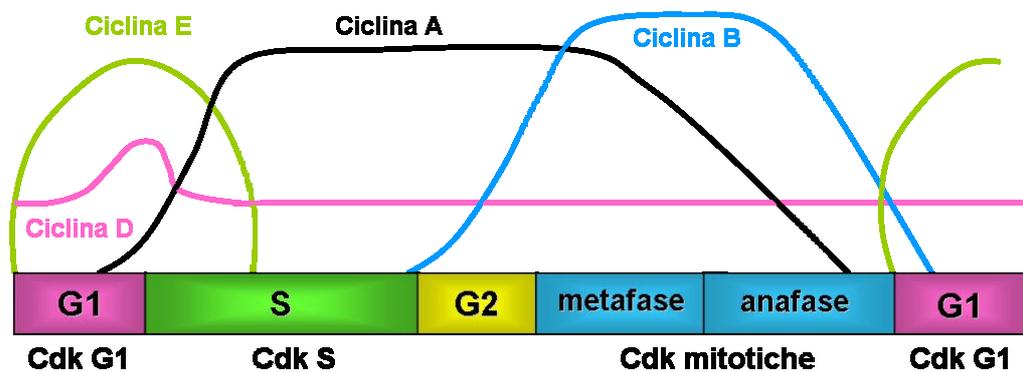


**Figura 1.3** - Complessi Cdk/ciclina nel ciclo cellulare.

Il complesso Cdk2-ciclina E, invece, è responsabile non solo della transizione G1/S, ma anche della duplicazione dei centrosomi (Hinchcliffe e Sluder, 2001). Inoltre, durante la fase S, il complesso Cdk2-ciclina A fosforila vari substrati permettendo la duplicazione del DNA e l'inattivazione dei fattori di trascrizione G1 (Meraldi *et al.*, 1999). Infine, Cdk1 si associa prima con la ciclina A durante la transizione S/G2, e più tardi con la ciclina B; la formazione del complesso Cdk1/ciclina B provoca la transizione G2/M mediante la fosforilazione di un gran numero di substrati, tra cui il complesso che promuove l'anafase (APC, *anaphase-promoting complex*), responsabile

del passaggio dalla metafase all'anafase e del completamento della fase M (Peters, 2002). Come vedremo in seguito, in ovociti di vertebrati e invertebrati il complesso Cdk1/ciclina B è storicamente definito come MPF (*maturation-promoting factor*).

Le cicline sono proteine meno conservate delle Cdk e, nell'ambito delle diverse specie, la loro similarità è ristretta ad una regione interna di circa 100 amminoacidi detta "*cyclin box*". Il livello di ogni ciclina è finemente regolato dalla trascrizione genica e dalla degradazione che avviene mediante il sistema dell'ubiquitina-proteasoma (Hochstrasser, 1995) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4** - Variazione dei livelli di cicline durante la progressione del ciclo.

Le cicline G1, ad esempio, contengono sequenze PEST (ricche di prolina, acido glutammico, serina e treonina) che sembrano conferire una certa instabilità a queste proteine, che hanno quindi una vita molto breve

(Rechsteiner e Rogers, 1996). Le cicline mitotiche (E, A e B), invece, contengono una sequenza all'estremità N-terminale detta “*destruction box*” per il riconoscimento da parte dell'APC (Yamano *et al.*, 2004; Kraft *et al.*, 2005).

Sebbene ogni Cdk richieda il legame con una ciclina per svolgere la sua funzione catalitica, l'attivazione e l'inattivazione del complesso Cdk/ciclina è ulteriormente controllato anche a livello post-traduzionale, mediante meccanismi di fosforilazione e defosforilazione. Infine, a completare il complesso sistema regolativo delle Cdk contribuisce una classe di proteine inibitrici dell'attività chinasi capaci di legare le Cdk indipendentemente dalle cicline.

### **1.2.c - Inibitori di Cdk**

#### Proteine inibitorie

L'attività delle Cdk è negativamente controllata dalla diretta interazione con proteine chiamate “inibitori delle Cdk” (CDKI). Tali inibitori possono essere divisi in due grandi famiglie: INK4 e Cip/Kip, in base alla similarità di sequenza e al meccanismo di azione (Lees, 1995). Alla famiglia INK4 appartengono p16<sup>ink4a</sup> e tre polipeptidi strutturalmente simili, p15<sup>ink4b</sup>, p18<sup>ink4c</sup> e p19<sup>ink4d</sup>, ognuno contenente quattro ripetizioni *ankyrin-like* che mediano il legame con altre proteine. Queste molecole inibiscono i complessi formati dalle Cdk4/6 con la ciclina D. Ad esempio, l'aggiunta di p16<sup>ink4a</sup> ai complessi Cdk4/ciclina D provoca la dissociazione del complesso, così come il legame di

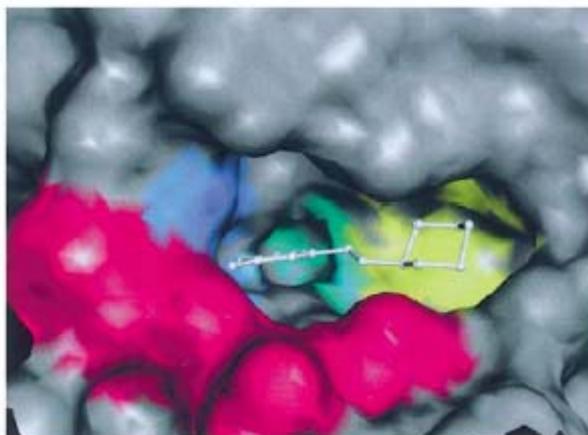
p16<sup>ink4a</sup> alla Cdk4 monomerica previene l'associazione di quest'ultima con la ciclina D (Della Ragione *et al.*, 1996).

La famiglia di inibitori Cip/Kip (*kinase inhibitor protein*) comprende tre distinti prodotti genici: p21<sup>cip1/waf1</sup>, p27<sup>kip1</sup> e p57<sup>kip2</sup>, che inibiscono la maggior parte delle Cdk grazie ad una regione conservata all'estremità N-terminale (Lees, 1995; Dai e Grant, 2003). Tali inibitori mostrano un ampio spettro di specificità, e sono in grado di inibire i complessi Cdk-ciclina G1 e in maniera meno efficace anche i complessi Cdk-ciclina B. Diversamente dagli inibitori INK4, i p21 mostrano una maggiore affinità per i complessi Cdk-ciclina che per le Cdk monomeriche (Lees, 1995).

### Inibitori organici

Nel corso degli anni, un'intensa attività di ricerca ha riguardato l'identificazione di possibili "piccole" molecole in grado di inibire l'attività chinasi delle Cdk, al fine non solo di caratterizzarle meglio dal punto di vista enzimatico, ma anche per utilizzare tali inibitori come potenziali agenti anti-tumorali (Knockaert *et al.*, 2002). Infatti, in linea teorica, inibire le Cdk comporterebbe l'arresto della divisione delle cellule tumorali. Fino ad oggi sono state identificate più di cinquanta molecole (naturali o sintetiche) inibitrici delle Cdk, raggruppabili in tre classi: quelle non selettive per una specifica Cdk, quelle specifiche per le Cdk4 e 6, e quelle che inibiscono le Cdk1, 2, 5 (e probabilmente 7). Non sono stati scoperti inibitori specifici per le singole Cdk a causa della presenza, nella loro struttura del sito di legame per

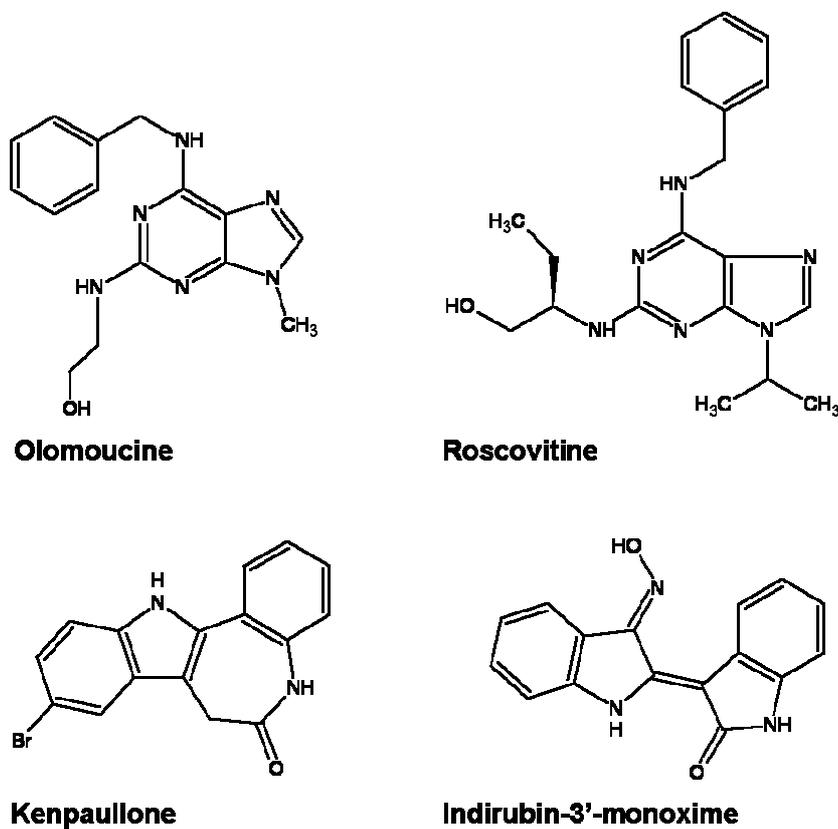
l'ATP costituito da una sequenza di amminoacidi molto conservata (Fig. 1.5) (Knockaert *et al.*, 2002).



**Figura 1.5** - Rappresentazione del sito di legame per l'ATP di Cdk2. Regione cardine (blu), Phe80 (verde), ribosio/fosfato (giallo) e superficie specifica (rosso). (Da: Davies *et al.*, 2002)

Nel gruppo di inibitori per Cdk1, 2 e 5, il primo ad essere scoperto fu l'olomoucina (Fig. 1.6), una molecola avente nella propria struttura un anello purinico in grado di competere con il sito di legame per l'ATP. L'olomoucina agisce a concentrazioni micromolari ed è in grado di arrestare le cellule alla transizione G1/S e G2/M (Hardcastle *et al.*, 2002). Successivamente fu scoperto un derivato dell'olomoucina, la roscovitina (Fig. 1.6), che mostra una selettività per le Cdk simile all'olomoucina, ma è circa dieci volte più efficace. Alte concentrazioni di roscovitina possono anche bloccare la sintesi di RNA e DNA (Ljungman e Paulsen, 2001; Vitali *et al.*, 2002). Altre due classi di

inibitori selettivi verso le Cdk1, 2 e 5 sono quelle dei paulloni e indolinoni. I primi mostrano uno spettro d'azione simile a quello degli inibitori basati sulle purine, perché competono per il legame con l'ATP. Tra i membri di questa classe, il kenpaullone (Fig. 1.6) ha una maggiore affinità per il complesso Cdk1/ciclina B (Bain *et al.*, 2003). Tra gli indolinoni, l'indirubin-3'-monoxime (Fig. 1.6) è più efficace verso Cdk1 e Cdk5 (Marko *et al.*, 2001).



**Figura 1.6** - Struttura di alcuni potenti inibitori di Cdk.

## 1.3 - REGOLAZIONE MEIOTICA DEL CICLO CELLULARE

### 1.3.a – Profilo storico

Negli ultimi dieci anni, grossi progressi sono stati fatti nello studio dei meccanismi che regolano il ciclo cellulare grazie alla produttiva competizione scientifica tra genetisti, fisiologi ed embriologi. I primi hanno generato ed analizzato mutazioni che arrestano le cellule somatiche in “fasi” specifiche del ciclo. Embriologi e fisiologi, dal canto loro, hanno studiato “i momenti fisiologici” in cui il ciclo si arresta e le molecole che rimuovono tale blocco consentendo la progressione dello sviluppo cellulare (Nomoto *et al.*, 1999; Masui, 2000). L’approccio genetico ha utilizzato come modello di studio del ciclo cellulare i lieviti. I gruppi di Hartwell (1978) prima, e di Nurse (Lee e Nurse, 1988) poi, hanno descritto il ciclo come una sequenza di reazioni dipendenti l’una dal completamento della precedente. Le specie di lievito utilizzate sono state due: *Saccharomyces cerevisiae* (lievito del pane o lievito della birra, detto *budding yeast* in quanto si divide per gemmazione) e *Schizosaccharomyces pombe* (ovvero *fission yeast* o lievito a scissione in quanto si divide per scissione mediale della cellula madre).

Embriologi e fisiologi, invece, hanno scelto come modello sperimentale organismi marini (esempio, echinodermi) e anfibi, ritenendo che gli ovociti e le uova di tali organismi rappresentassero il più semplice modello di studio del ciclo cellulare in quanto cellule programmate per dividersi rapidamente. Inoltre, in tali ovociti: 1. si può indurre facilmente la maturazione *in vitro*; 2. sono disponibili in grandi quantità; 3. hanno una taglia appropriata per la

manipolazione sperimentale.

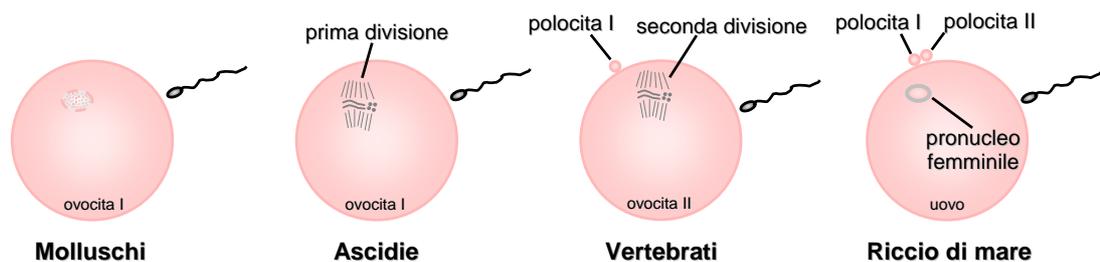
Nei successivi paragrafi, se non diversamente specificato, saranno presi in considerazione gli ovociti di anfibi, in particolare di *Xenopus laevis*.

### **1.3.b - Ovociti e maturazione meiotica**

Gli ovociti di molte specie di vertebrati arrestano il loro processo meiotico in due punti, alla profase della prima divisione meiotica (PI) e alla metafase della seconda divisione meiotica (MII), prima di essere fecondati. Durante l'arresto in PI, gli ovociti crescono mediante l'accumulo di tuorlo e altre sostanze necessarie per l'embriogenesi. In concomitanza con la crescita dell'ovocita, definita vitellogenesi, anche il nucleo si ingrandisce e viene chiamato vescicola germinale (GV, *germinal vesicle*). Gli RNA sintetizzati nella GV non possono ancora essere tradotti e vengono conservati come messaggi materni mascherati, insieme agli RNA ribosomali, indispensabili per la sintesi proteica. La GV contiene anche diverse proteine, come la nucleoplasmina che è coinvolta nella formazione del pronucleo durante la fecondazione (Katagiri e Ohsumi, 1994). Dopo la vitellogenesi, in seguito allo stimolo LH, si ha il rilascio di un ormone steroideo da parte delle cellule follicolari. Tale ormone, specie-specifico, induce l'ovulazione degli ovociti bloccati in PI (detti *fully grown oocytes*), i quali riprendono la meiosi e raggiungono la fase MII. Il periodo tra la PI e la MII è detto maturazione meiotica ed è accompagnato da alcuni cambiamenti morfologici, come la rottura della vescicola germinale (GVBD, *germinal vesicle breakdown*),

condensazione cromosomica, formazione del fuso ed estrusione del primo corpo polare. Al termine del periodo di maturazione l'ovocita è pronto per essere fecondato. L'entrata dello spermatozoo induce la seconda divisione meiotica e l'inizio dell'embriogenesi.

Diversamente dai vertebrati, la maturazione degli ovociti di molti invertebrati può arrestarsi in stadi differenti (Fig. 1.7). Ad esempio, nei molluschi l'ovulazione avviene soltanto in seguito alla penetrazione dello spermatozoo. Nelle ascidie la meiosi si blocca alla metafase I e solo dopo la penetrazione dello spermio viene completata. Nel riccio di mare, invece, lo spermatozoo penetra nell'uovo solo dopo che la meiosi è stata completata. In ogni caso, il nucleo dello spermio, detto anche pronucleo maschile, attende il termine della meiosi prima di fondersi con il pronucleo femminile.

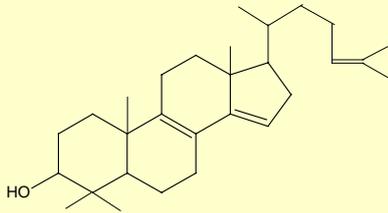
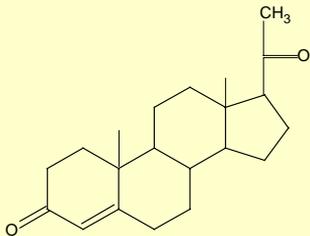
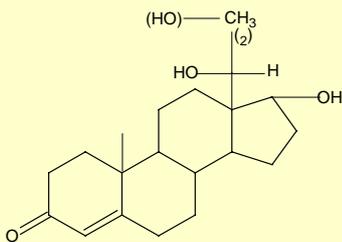
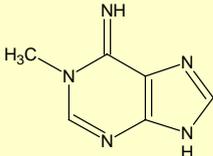


**Figura 1.7** - Diversi stadi di maturazione del gamete femminile al momento della fecondazione.

### **1.3.c - Maturation-inducing substance (MIS)**

Gli stimoli che inducono gli ovociti ad entrare in meiosi possono essere di diverso tipo in base alle specie considerate (Tab. 1.1), includendo la fecondazione in *Spisula solidissima* e un fattore proteico secreto dallo spermatozoo, come in *Caenorhabditis elegans* (Miller *et al.*, 2001). Negli echinodermi, in particolare in tutte le specie di stella di mare, l'induzione alla maturazione è dovuta ad un derivato dell'adenina, la 1-metiladenina (1-MA) (Kanatani, 1969; Schuetz, 1971) che, tuttavia, non mostra alcun effetto in altri echinodermi, tra cui il riccio di mare (Smiley, 1990). In molti vertebrati, invece, le sostanze che inducono la maturazione (MIS, *maturation-promoting substance*) sono state identificate in ormoni steroidei. Nei pesci, l'attività MIS è dovuta a due derivati progestinici, *17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydro-4-pregnen-3-one* (DHP) e *17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21 $\alpha$ -trihydro-4-pregnen-3-one* (THP) (Petrino *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2002). Negli anfibi, la maturazione comincia in seguito al rilascio di progesterone, un ormone sintetizzato e rilasciato dalle cellule follicolari che circondano l'ovocita, sebbene sia stata riportata una simile attività anche per alcuni androgeni (Lutz *et al.*, 2001). Nei mammiferi, invece, la molecola che induce la meiosi è il 4,4-dimetil-5 $\alpha$ -cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (FF-MAS), un composto intermedio nella biosintesi del colesterolo (Byskov *et al.*, 1995).

**Tabella 1.1** – Strutture delle MIS nelle varie specie.

Specie	Nome MIS	Struttura MIS
Mammiferi	4,4-dimetil-5 $\alpha$ -cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (FF-MAS)	
Anfibi	Progesterone	
Pesci	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidro-4-pregnen-3-one (DHP); 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21 $\alpha$ -trihidro-4-pregnen-3-one (THP) (in parentesi)	
Stella di mare	1-Metiladenina	

Nel 1972, Dumont divise il periodo di crescita dell'ovocita in sei stadi, facendo corrispondere il VI stadio agli ovociti *fully-grown*. Successivamente, Reynhout e collaboratori (1975) dimostrarono che nessun trattamento con steroidi poteva indurre la ripresa meiotica dalla profase I se l'ovocita era ancora in crescita, cioè se non aveva raggiunto il VI stadio. Infatti, l'iniezione

di MPF (vedi paragrafo successivo) in ovociti al IV stadio provocava la GVBD, ma non la formazione del fuso. Ciò poteva avere un duplice significato: 1. in questo stadio il recettore degli steroidi è assente; 2. la cascata di trasduzione del segnale è inefficace.

In passato sono stati condotti studi *in vivo* ed *in vitro* su ovociti di *Xenopus* per identificare il/i recettore/i del progesterone (Tso *et al.*, 1982). Oggi si sa che tale ormone funziona mediante uno, o forse due, recettori. Il primo, definito XPR1/xPR, è un convenzionale recettore trascrizionale in grado di iniziare anche una via di segnale citoplasmatico (Bayaa *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2000). Il secondo è un recettore steroideo associato alla membrana recentemente identificato, detto GPCR (*seven-transmembrane G protein-coupled receptor*) (Zhu *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2003b), che ha stretti omologhi nei mammiferi. Legandosi al suo GPCR, il progesterone inibisce l'enzima adenilato ciclastasi in una maniera GTP-dipendente (Finidori-Lepicard *et al.*, 1981; Sadler e Maller, 1981; Zhu *et al.*, 2003a) e diminuisce il livello di cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) in pochi minuti, a causa della riassociazione della subunità catalitica di PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) con la sua subunità regolatoria (Maller e Krebs, 1977; Speaker e Butcher, 1977). PKA è dunque un potente inibitore della maturazione meiotica e una sua inibizione è sufficiente ad indurre la maturazione degli ovociti di *Xenopus* (Schmitt e Nebreda, 2002a). Una simile risposta è stata descritta anche in topi, ratti e pesci; al contrario, gli ovociti di maiali, pecore e conigli esibiscono un transitorio aumento e non una diminuzione dei livelli di cAMP

(Schmitt e Nebreda, 2002b); infine, anche nelle meduse l'aumento di cAMP può indurre la maturazione degli ovociti (Schmitt e Nebreda, 2002b).

Nel 1983, Mulner e collaboratori mostrarono che il progesterone induceva una diminuzione di cAMP anche negli ovociti al IV stadio e inibiva *in vitro* l'adenilato ciclastasi legata alla membrana. Ciò significa che gli ovociti al IV stadio già possiedono un recettore steroideo capace di regolare i livelli di cAMP. Nonostante ciò, la diminuzione di cAMP non comportava l'attivazione del MPF (Sadler e Maller, 1983). Pertanto, l'interazione tra queste due *pathway* non è ancora stabilita, confermando l'ipotesi di un'inefficace cascata di trasduzione del segnale negli ovociti al IV stadio (Jesus e Ozon, 2004).

### **1.3.d – Composizione e regolazione dell'MPF**

La scoperta dell'MPF avvenne nel 1971, quando Masui e Markert mostrarono che l'iniezione del citoplasma di ovociti maturi di rana in ovociti immaturi causava la completa maturazione di questi ultimi, anche in assenza di progesterone. Ciò suggeriva che c'era una discreta base enzimatica nel processo di maturazione. Questa attività, chiamata *maturation-promoting factor* (MPF), fu successivamente purificata e caratterizzata; si dimostrò trattarsi di una proteina chinasi composta da una subunità catalitica, la chinasi Cdk1 (detta anche Cdc2, perché omologa ad una proteina codificata dal gene *cdc2* che controlla il ciclo cellulare in *S. pombe*) e una subunità regolatrice, la ciclina B (Lohka *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1988, 1990). Si notò subito che l'attività MPF in meiosi I era molto maggiore di quella microiniettata,

suggerendo una sintesi endogena di tale fattore (Gerhart *et al.*, 1984). Diversamente dagli ormoni gonadotropici, l'MPF non mostra specie-specificità e agisce non solo inducendo la maturazione, ma anche come regolatore universale della transizione G2/M nel ciclo cellulare di tutti gli eucarioti.

L'attività di MPF è controllata da eventi di fosforilazione e defosforilazione a carico della chinasi Cdc2 su specifici residui amminoacidici, treonina 14 (T14), tirosina 15 (Y15) e treonina 161 (T161), in seguito alla formazione di un complesso con la ciclina B (Lew e Kornbluth, 1996). Mentre la funzione di MPF nel promuovere la maturazione dell'ovocita è ubiquitaria, ci sono invece differenze specie-dipendenti nei meccanismi che conducono alla sua attivazione (Yamashita *et al.*, 2000).

In *Xenopus* gli ovociti immaturi contengono una forma inattiva di MPF (detta pre-MPF), formata dalla ciclina B legata ad una Cdc2 fosforilata sia su T14/Y15 che su T161, e Cdc2 monomeriche presenti in quantità 10-100 volte maggiori di quella legata alla ciclina B (Kobayashi *et al.*, 1991). La fosforilazione inibitoria su T14/Y15 è catalizzata dagli enzimi appartenenti alla famiglia Wee1, che comprende Wee1 (presente in tutti gli eucarioti), Myc1 (nel lievito a scissione) e Myt1 (nei metazoi) (Okamoto, 2002). Mentre Myt1, una chinasi con duplice specificità associata alla membrana, fosforila sia la Thr14 che la Tyr15 di Cdc2 (Mueller, 1995), Wee1 e Myc1, chinasi nucleari, fosforilano esclusivamente la Tyr15 (Featherstone e Russell, 1991; Watanabe *et al.*, 1995). La fosforilazione attivante su T161 è catalizzata dal

complesso CAK (*cyclin-dependent kinase activating kinase*) (Fesquet *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 1993). Il progesterone stimola la fosfatasi Cdc25C a defosforilare T14/Y15, rendendo attivo l'MPF (Fig. 1.9A). Diversi studi hanno dimostrato che in altri anfibi, come *Rana japonica*, *Bufo japonicus* e *Cynopus pyrrhogaster*, l'attivazione dell'MPF avviene in maniera differente rispetto a quella osservata in *Xenopus* (Tanaka e Yamashita, 1995; Sakamoto *et al.*, 1998; Ihara *et al.*, 1998). Tale attivazione risulta, invece, molto simile a quella osservata nei pesci, pertanto sarà descritta nel paragrafo 1.3i.

Sin dall'inizio della sua scoperta fu chiaro che l'attività MPF non fosse rilevabile alla fine della meiosi I ma appariva e restava stabilmente elevata nelle cellule bloccate in metafase II, lasciando presumere che l'MPF fosse associato con lo stato di metafase. Oggi l'MPF è considerato un “sistema bistabile”, in cui i due stati stabili coincidono rispettivamente con l'interfase, in cui Cdc2 e Cdc25 sono inattivi e Wee1 e Myt1 sono attivi, e l'inizio della divisione mitotica o meiotica (fino all'anafase), in cui Cdc2 e Cdc25 sono attivi e Wee1 e Myt1 sono inattivi (Pomerening *et al.*, 2003).

### **1.3.e - Composizione e regolazione del CSF**

Nel 1971, Masui e Markert oltre a descrivere l'attività MPF, riportarono anche i risultati di un trasferimento di citoplasma da ovociti maturi (uova non fecondate) in un blastomero di un embrione a due cellule. Ciò che ottennero fu un arresto della segmentazione alla successiva mitosi. Masui chiamò questa

attività CSF (*cytostatic factor*) e postulò che fosse responsabile dell'arresto in MII nelle uova non fecondate di vertebrati (Tunquist e Maller, 2003). Successivamente si vide che questa attività appariva durante la meiosi II e scompariva subito dopo la fecondazione, diversamente dall'attività MPF, che ricompariva ad ogni metafase dal lievito all'uomo (Nurse, 1990). Nel 1988, Vande-Woude e collaboratori identificarono uno dei componenti chiave alla base dell'attività biologica del CSF (Sagata *et al.*, 1988). Si trattava della chinasi Mos, una proteina di nuova sintesi codificata dal proto-oncogene *c-mos* in seguito allo stimolo del progesterone e specifica delle cellule germinali. L'idea che Mos fosse richiesta per l'attività CSF era sostenuta dal fatto che la degradazione dell'mRNA codificante per Mos e della proteina stessa coincideva con la perdita di attività CSF. In seguito a tale scoperta, non fu semplice capire quale fosse il reale meccanismo di arresto CSF, poiché ancora non si conosceva il substrato di Mos. Successivamente, si vide che negli ovociti immaturi di *Xenopus* era espressa una proteina chinasi di 42kDa, chiamata MAPK (*mitogenic activated protein kinase*), che veniva fosforilata e attivata in seguito al trattamento con progesterone (Ferrell *et al.*, 1991; Gotoh *et al.*, 1991; Jesus *et al.*, 1991; Posada e Cooper, 1992), rimaneva attiva durante la maturazione dell'ovocita e si disattivava dopo la fecondazione/attivazione dell'ovocita maturo. Divenne chiaro che Mos era responsabile dell'attivazione di MAPK durante la maturazione dell'ovocita. Ciò fu dimostrato non solo in *Xenopus* in cui, in assenza di Mos, una forma costitutivamente attiva di MAPK mostrava attività CSF nel saggio di iniezione

dei blastomeri (Haccard *et al.*, 1993), ma anche nei mammiferi, in cui si osservò che MAPK non veniva attivata in topi *mos*<sup>-/-</sup> (Verlhac *et al.*, 1996). Fu anche dimostrato che femmine di topi mutanti *mos*<sup>-/-</sup> presentavano una ridotta fertilità, a causa del mancato arresto durante la meiosi. Ovociti *mos*<sup>-/-</sup> andavano incontro a GVBD ed estrusione di entrambi i corpi polari, in alcuni casi seguita da progressione nella segmentazione. Questi risultati dimostravano che il maggiore ruolo di Mos è quello di prevenire l'attivazione partenogenetica delle uova non fecondate (Colledge *et al.*, 1994). Ulteriori studi indicarono che la presenza di Mos non comportava l'arresto CSF se MAPK veniva disattivata (Kosako *et al.*, 1994a,b; Gotoh e Nishida, 1995). MAPK era, dunque, necessaria e sufficiente per l'arresto CSF. Durante questo periodo fu identificata una proteina chinasi, chiamata MEK1 (*MAPK activating kinase*), in grado di fosforilare e attivare MAPK durante la maturazione degli ovociti di *Xenopus*, fosforilandola in Thr183 e Tyr185 (Crews *et al.*, 1992; Kosako *et al.*, 1992). Iniezioni di MEK1 in ovociti immaturi causavano attivazione di MAPK e inibizioni di MEK1 impedivano la maturazione dell'ovocita indotta dal progesterone. Pertanto, Mos attiva MEK1 fosforilandola su due residui di serina conservati: Ser218 e Ser222, e MEK1, a sua volta, fosforila e attiva MAPK. Inoltre, è stato dimostrato che: 1. negli ovociti di *Xenopus* esistono almeno due fosfatasi di MAPK attive durante la meiosi, una la defosforila sulla Thr183 e l'altra sulla Tyr185 (Sohaskey e Ferrell, 1999); 2. molecole di MAPK fosforilate solo sulla treonina sono meno stabili di quelle fosforilate solo sulla tirosina (Sohaskey e Ferrell, 1999); 3. in

ovociti di topo, Mos regola le treonina fosfatasi inibendo la defosforilazione sulla Thr183 e, quindi, stabilizzando MAPK (Verlhac *et al.*, 2000). In conclusione, Mos attiva MAPK attraverso due diverse *pathway*: attivazione di Mek1 e inibizione di una fosfatasi.

Sia in *Xenopus* che in altri sistemi, MAPK fosforila e attiva una proteina chinasi S6 ribosomale di 90 kDa, detta p90<sup>Rsk</sup> (Frodin e Gammeltoft, 1999). Nei mammiferi sono state identificate tre diverse isoforme di p90<sup>Rsk</sup>, chiamate Rsk1, Rsk2 e Rsk3, rispetto alle due isolate in *Xenopus* (Rsk1 e Rsk2), entrambe presenti e attive durante la maturazione dell'ovocita (Erikson e Maller, 1989; Bhatt e Ferrell, 2000). Come MEK1 e MAPK, anche p90<sup>Rsk</sup> è capace di indurre la maturazione dell'ovocita in assenza di progesterone (Gross *et al.*, 2001) ed esperimenti effettuati mediante l'utilizzo di proteine ricombinanti (Bhatt e Ferrell, 1999) hanno dimostrato che p90<sup>Rsk</sup> è necessaria e sufficiente per l'arresto CSF. In conclusione, a livello molecolare l'attività CSF segue una precisa via di trasduzione del segnale, la via Mos/MEK/MAPK/p90<sup>Rsk</sup>. In seguito alla fecondazione/attivazione dell'ovocita, Mos viene degradata e l'mRNA deadenilato, così da innescare un meccanismo di disattivazione della *pathway* di MAPK. MEK1, MAPK e p90<sup>Rsk</sup>, invece, non sono soggette a degradazione, ma sono disattivate mediante una defosforilazione che avviene subito dopo l'aumento della concentrazione di ioni calcio (Ca<sup>2+</sup>) provocato dalla fecondazione/attivazione. L'attività di MAPK rimarrà bassa per la restante parte del ciclo cellulare e durante le prime fasi dello sviluppo embrionale (Hartley *et al.*, 1994).

### **1.3.f - Regolazione della maturazione meiotica: una visione d'insieme**

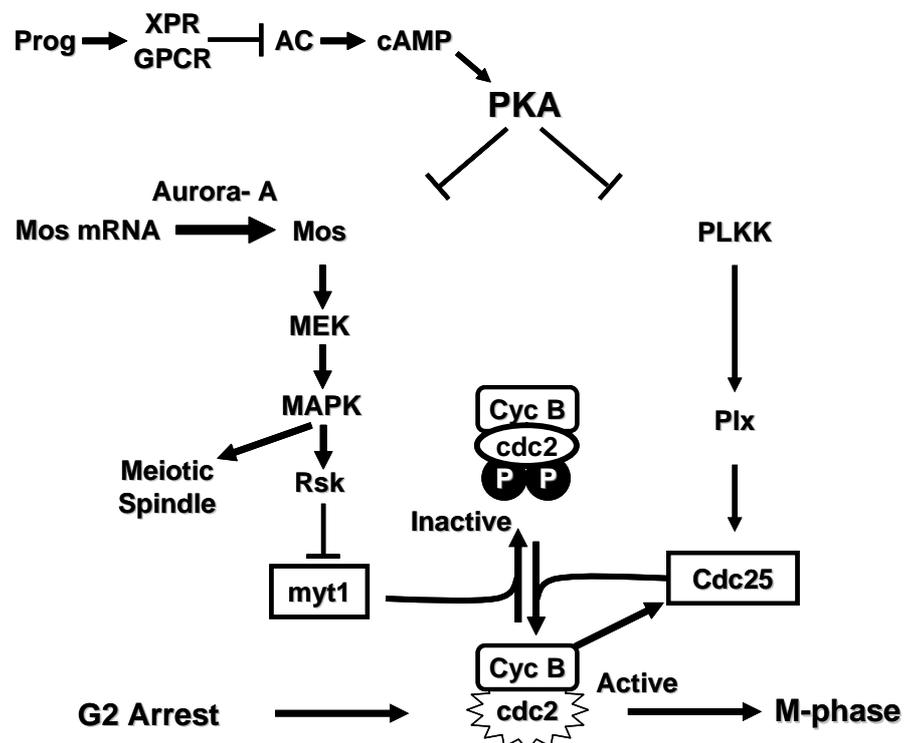
Il rilascio di progesterone causa la sintesi di nuove proteine a partire dall'mRNA materno, una serie di fosforilazioni sia a monte che a valle dell'attivazione dell'MPF e la progressione attraverso la fase M. Come mostrato in figura 1.8, questi eventi sono mediati da almeno due vie di segnale convergenti tra loro (Crane *et al.*, 2003). La prima via coinvolge l'attivazione della fosfatasi Cdc25 che, come già detto, catalizza l'attivazione dell'MPF mediante la diretta defosforilazione di Thr14 e Tyr15. Le proteine appartenenti alla famiglia delle Cdc25 presentano una doppia specificità in quanto defosforilano residui di tirosina e treonina con conseguente attivazione delle Cdk (Dunphy e Kumagai, 1991). Nei vertebrati, esistono tre isoforme di Cdc25: Cdc25A, Cdc25B e Cdc25C. Cdc25A è coinvolta nella transizione G1/S, nella fase S e nella transizione G2/M del ciclo cellulare mitotico. Essa è inattivata per degradazione mediata dal complesso dell'APC/C. Cdc25B si accumula alla fine della fase S e all'inizio della fase G2, con picchi di attività alla transizione G2/M; anch'essa viene degradata dall'APC/C. Cdc25C, invece, è attiva durante la fase M sia del ciclo cellulare mitotico che meiotico e, a differenza delle altre due isoforme, non viene degradata dall'APC/C, ma inattivata mediante meccanismi di fosforilazione (Donzelli e Draetta, 2003). L'attivazione di Cdc25 è catalizzata in *Xenopus* da xPlk1 o Plx1 (*polo-like kinase*), che a sua volta è attivata, a monte, da un'altra chinasi, la xPlkk1 (*polo-like kinase kinase*) o chinasi omologhe nei mammiferi (Abrieu *et al.*, 1998; Roshak *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2002; Kelm *et al.*, 2002). E' stato

inoltre dimostrato che Cdc2 fosforila Cdc25 che, a sua volta, defosforila ed attiva Cdc2 in Thr14 e Tyr15 secondo un meccanismo regolativo a *feedback* positivo (Karaiskou *et al.*, 2001).

La seconda via coinvolge l'attivazione della *pathway* Mos/MEK/MAPK/p90<sup>Rsk</sup>. L'mRNA che codifica per Mos contiene una breve coda di poli-A inattiva all'estremità 3'; pertanto il trascritto di *mos*, per essere tradotto, deve prima essere adenilato da una polimerasi poli(A) citoplasmatica (Richter, 2000; Wickens *et al.*, 2000). L'adenilazione richiede la presenza di due convenzionali elementi al 3'UTR: una sequenza esanucleotidica, AAUAAA, e un elemento di poliadenilazione citoplasmatico ricco di uracile (CPE, *cytoplasmic polyadenylation element*). Negli ovociti non stimolati dal progesterone, il CPE è legato ad una proteina chiamata CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*), che funge da repressore della traduzione, a causa della sua interazione con una proteina mascherante e il fattore eIF4E (*mRNA cap-binding factor*); in questo modo CPEB previene il legame tra eIF4E e la proteina ponte eIF4G, evitando la formazione del complesso d'inizio della traduzione. In seguito alla fosforilazione attivante di CPEB (sulla Ser174) da parte della chinasi Aurora-A (Aur-A; in *Xenopus* è detta anche Eg2), il fattore CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) viene riconosciuto dalla sequenza AAUAAA del mRNA di Mos (Mendez *et al.*, 2000). CPSF, a sua volta, riconosce la polimerasi poli(A) citoplasmatica e inizia la poliadenilazione. La coda poli(A) si lega poi alla proteina PABP (*poly(A) binding protein*) e il complesso PABP-eIF4G sposta

la proteina mascherante da eIF4E. Ciò permette l'assemblaggio del fattore eIF4E (costituito dalla subunità ribosomale 40S e altre proteine) e eIF4G, conducendo alla traduzione dell'mRNA codificante per Mos e all'attivazione delle altre chinasi a valle, fino a p90<sup>Rsk</sup> (Crane *et al.*, 2003). Un tale meccanismo non è attivo solo negli ovociti di *Xenopus*, ma anche nei mammiferi, come il topo (Hodgman *et al.*, 2001).

E' stato dimostrato che p90<sup>Rsk</sup> è in grado di fosforilare e inibire in maniera diretta Myt1, facilitando l'attivazione del MPF mediata da Cdc25 e l'entrata in meiosi I (Palmer *et al.*, 1998). Altri dati, inoltre, suggeriscono che anche Mos potrebbe fosforilare direttamente Myt1 (Peter *et al.*, 2002).



**Figura 1.8** - Il progesterone attiva due vie di segnale parallele che conducono all'attivazione del MPF (Crane *et al.*, 2003).

Le due *pathway* sopra descritte possono essere bloccate dall'alta attività di PKA (*protein kinase A*). Nel primo caso, PKA inibisce Cdc25C mediante una fosforilazione inibitoria (Duckworth *et al.*, 2002); nel secondo caso, PKA blocca la sintesi e/o l'accumulo di Mos, la sua attivazione e la sua capacità di indurre la GVBD (Stanford *et al.*, 2003). Inoltre, PKA può anche avere un ruolo non catalitico nel blocco della transizione G2/Meiosi (Schmitt e Nebreda, 2002a).

### **1.3.g - Ruolo di Cdk2 nel ciclo cellulare meiotico**

L'enzima Cdk2, inizialmente conosciuto come Eg1 in *Xenopus*, è una proteina avente un alto grado di identità di sequenza con p34<sup>cdc2</sup> (Paris *et al.*, 1991) e la sua attività è stata studiata in uova di *Xenopus*, in cui è presente sia come complesso ad alto peso molecolare con l'istone H1, sia come monomero cataliticamente inattivo (Gabrielli *et al.*, 1992b). L'attività Cdk2 oscilla durante il ciclo cellulare embrionale con una periodicità simile a quella di Cdc2, ma con cambiamenti di attività più modesti, infatti, nella fase M, Cdk2 aumenta di 2-3 volte rispetto a Cdc2 che aumenta di più di 10 volte (Gabrielli *et al.*, 1992b). La regolazione di Cdk2 nel ciclo cellulare embrionale di *Xenopus* è dovuta principalmente alla sua fosforilazione e defosforilazione su residui di serina e tirosina, ed è stato dimostrato che il peptide presente in Cdc2, contenente Thr<sup>14</sup> e Tyr<sup>15</sup>, sebbene sia conservato in Cdk2, non è il maggiore responsabile della sua regolazione (Gabrielli *et al.*, 1992a). Circa il ruolo di Cdk2 nella regolazione del ciclo cellulare meiotico, diversi studi sono

stati eseguiti in ovociti di *Xenopus*, ottenendo risultati contrastanti. In un primo lavoro, l'inattivazione di Cdk2, ottenuta mediante l'iniezione del suo RNA antisenso in ovociti maturi, ha portato al fallimento dell'arresto alla metafase II (Gabrielli *et al.*, 1993). Inoltre, è stato dimostrato che l'aggiunta del complesso attivo Cdk2/ciclina E in estratti di ovociti di *Xenopus* preveniva la degradazione della ciclina B, mantenendo alta l'attività MPF (Tunquist *et al.*, 2002). Questi lavori indicano l'importanza dell'attività Cdk2 nella meiosi II in ovociti di *Xenopus*. Al contrario, Furuno e collaboratori hanno dimostrato che l'iniezione in ovociti di *Xenopus* di p21<sup>Cip</sup>, inibitore di Cdk2, non impedisce l'entrata in meiosi II, suggerendo che, in questa specie, Cdk2 non è indispensabile per la progressione meiotica (Furuno *et al.*, 1997). Per quanto riguarda i mammiferi, è stata riportata la presenza di mRNA codificante per Cdk2 in ovociti di topo (Moore *et al.*, 1996) e, in un recente lavoro, è stato dimostrato che la maturazione degli ovociti di mammiferi richiede attività Cdk2 e che un'inibizione di tale attività comporta il fallimento nell'induzione della meiosi II (Sugiura *et al.*, 2005).

### **1.3.h - Fecondazione e attivazione dell'uovo**

Nel momento in cui avviene la fecondazione, la cellula uovo si "attiva", cioè riprende il processo meiotico ed inizia lo sviluppo embrionale (Runft *et al.*, 2002). Una conseguenza di questo fenomeno, a livello universale, è un aumento di circa 10 volte del calcio libero (Ca<sup>2+</sup>) citoplasmatico (Stricker, 1999). Tale aumento è necessario e sufficiente per la ripresa delle varie fasi

del ciclo cellulare nelle ascidie (Russo *et al.*, 1996), nei vertebrati (Yamamoto *et al.*, 1999) e negli echinodermi (Carroll *et al.*, 1999, 2000). In quasi tutte le specie finora studiate, l'aumento del calcio avviene mediante una o più onde che attraversano l'uovo. Nel riccio di mare, nella rana e nei pesci la fusione dello spermatozoo con l'uovo conduce ad una singola onda di calcio che attraversa l'uovo da un polo all'altro (Stricker, 1999). Al contrario, nei mammiferi, nei vermi marini e nelle ascidie si verificano una serie di aumenti periodici (oscillazioni di  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Swann e Ozil, 1994).

Nelle uova di ascidie e in quelle dei vertebrati, l'aumento del calcio provoca l'entrata in anafase e il conseguente completamento della meiosi, mentre nelle uova del riccio di mare, in cui al momento della fecondazione la meiosi è già stata completata, l'aumento del calcio permette l'entrata in fase S. Nel primo caso, il meccanismo che porta all'anafase non è ancora completamente chiaro, ma sembra coinvolgere una proteina chinasi calmodulina-dipendente (CaMKII) (Johnson *et al.*, 1998), che conduce alla proteolisi della securina e della ciclina B, le quali a loro volta provocano la proteolisi della coesina, una proteina che tiene uniti i cromosomi (Stemmann *et al.*, 2001). Nel secondo caso, la via che connette l'aumento del calcio con la sintesi del DNA negli echinodermi sembra coinvolgere l'inattivazione di MAPK (Carroll *et al.*, 1999, 2000), sebbene il meccanismo non sia ancora del tutto chiaro. Un'ulteriore conseguenza dell'aumento del calcio alla fecondazione è l'esocitosi dei granuli corticali, che rappresenta un blocco meccanico che impedisce la polispermia (Kline, 1988; Kline e Kline, 1992).

L'aumento del calcio alla fecondazione è causato principalmente dal rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico mediato dall'inositolo 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ); ciò è stato osservato negli echinodermi (Iwasaki *et al.*, 2001), nelle ascidie (Albrieux *et al.*, 1997; Runft e Jaffe, 2000), negli anfibi (Runft *et al.*, 1999) e nei mammiferi (Miyazaki *et al.*, 1993; Kline e Kline, 1994). E' possibile, inoltre, che altre piccole molecole agiscano in concerto con  $\text{IP}_3$  nel rilascio del calcio, tra queste l'ADP-ribosio ciclico (cADPR), l'acido nicotinico adenina dinucleotide fosfato (NAADP), l'ossido nitrico (NO) e il GMP ciclico (cGMP) (Bootman *et al.*, 2001; Leckie *et al.*, 2003).

Il preciso meccanismo secondo il quale lo spermatozoo inizia la cascata di trasduzione del segnale con conseguente rilascio del calcio alla fecondazione non è completamente chiaro. Esistono, infatti, due principali teorie a riguardo. La prima sostiene che il rilascio del calcio avviene in seguito ad un'interazione superficiale tra un ligando presente sullo spermatozoo e un recettore sulla membrana plasmatica dell'uovo. La seconda suggerisce che l'attivazione dell'uovo è provocata da un fattore spermatico solubile che viene introdotto nell'uovo durante la fusione uovo-spermatozoo (Dale, 1987; Parrington, 2001). Sulla base di numerosi studi effettuati negli ultimi anni, sia negli invertebrati che nei vertebrati, quest'ultima ipotesi sta diventando sempre più convincente. Il fattore spermatico sembra appartenere alla famiglia delle fosfolipasi C (PLC) (Rice *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Parrington *et al.*, 2002). Recentemente è stata identificata in alcuni mammiferi una nuova isoforma di PLC sperma-specifica chiamata  $\text{PLC}\zeta$  (Saunders *et al.*, 2002; Cox

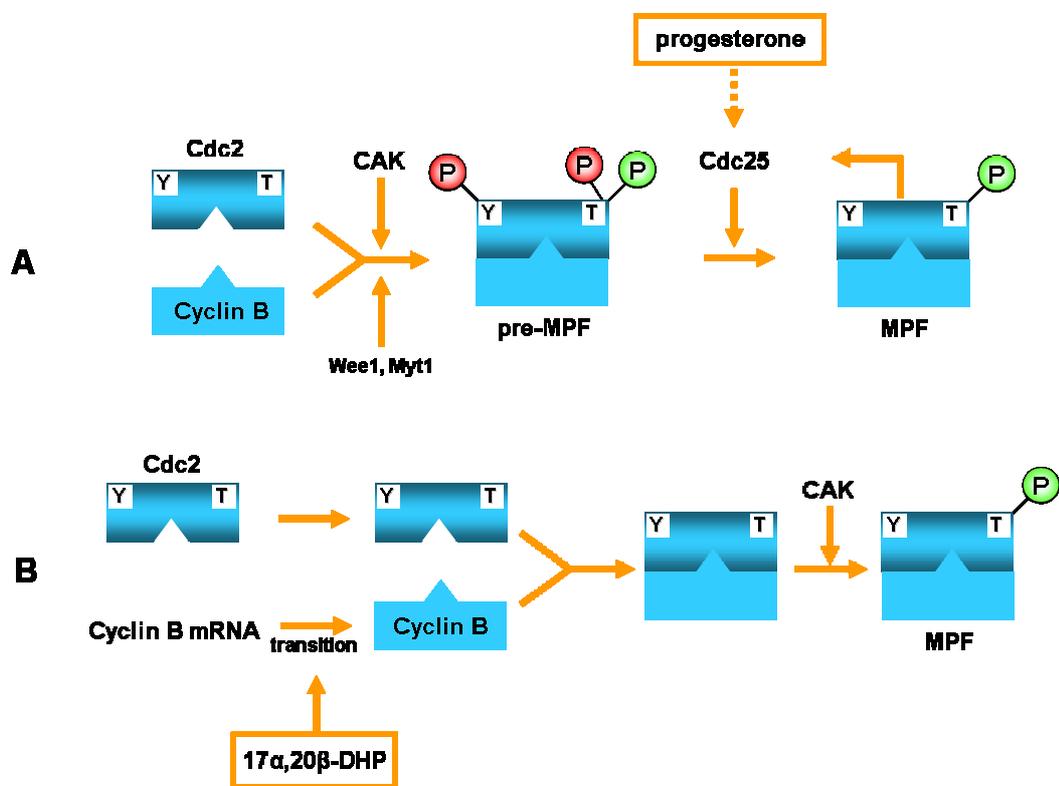
*et al.*, 2002). Un simile fattore spermatico è stato, inoltre, osservato anche in alcuni invertebrati, come vermi marini, ascidie ed echinodermi (Jones *et al.*, 2000), nei vertebrati non mammiferi, come *Xenopus* e pollo (Dong *et al.*, 2000) e addirittura in una pianta (Li *et al.*, 2001). Tali scoperte sono di fondamentale importanza, perché l'attività di tale fattore potrebbe non essere specifica per il regno animale. Ulteriori studi saranno necessari per stabilire se lo *sperm factor* giochi un ruolo universale durante la fecondazione (Coward e Parrington, 2003; Dale, 1987).

### **1.3i - Regolazione meiotica nei pesci**

Nei pesci, come in alcuni anfibi diversi da *Xenopus*, gli ovociti immaturi contengono solo molecole di Cdc2 monomeriche e la ciclina B non è presente (Tanaka e Yamashita, 1995). Di conseguenza, in tali organismi non esiste un pre-MPF. Dopo la stimolazione ormonale, la ciclina B viene sintetizzata a partire dall'mRNA materno e si lega alla Cdc2 preesistente, formando un MPF inattivo, la cui attivazione è dovuta alla fosforilazione della T161 da parte del complesso CAK, costituito da una subunità catalitica (Cdk7 o MO15), ed una regolatrice, la ciclina H (Solomon *et al.*, 1993). Tale complesso rimane attivo durante la crescita e la maturazione dell'ovocita (Kondo *et al.*, 1997) (Fig. 1.9B). Nei pesci, dunque, mancando la fosforilazione su T14 e Y15, l'attivazione dell'MPF non dovrebbe dipendere dall'attività di Cdc25C.

In un recente studio eseguito nel pesce teleosteo *Anabas testudineus*, è stato dimostrato che anche nei pesci esiste un pre-MPF e, di conseguenza,

un'attività fosfatase Cdc25 (Basu *et al.*, 2004). Questa recente scoperta ha rimesso in discussione la regolazione dell'MPF nei pesci e nei bassi vertebrati rispetto allo *Xenopus*, uno dei modelli sperimentali più studiati ed accreditati. Ulteriori studi si rendono, quindi, necessari per confermare questa interessante scoperta che, in un certo senso, riavvicina da un punto di vista evolutivo la regolazione meiotica di queste due categorie di bassi vertebrati: pesci e anfibi.



**Figura 1.9** - Meccanismo di formazione e attivazione dell'MPF durante la maturazione meiotica di *Xenopus laevis* (A) e *Carassius auratus* (B). (Adattato da: Yamashita, 1998).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Da quanto sopra detto, traspare la necessità di disporre di nuovi modelli sperimentali in grado di chiarire i più importanti meccanismi regolativi della meiosi nei pesci. Un attento lavoro di ricerca bibliografica evidenzia chiaramente questa carenza nella Letteratura scientifica; infatti, fatta eccezione per i pionieristici lavori di Yamashita e coll. succitati in *Carassius auratus* (Yamashita *et al.*, 1995) e quest'ultimo recente lavoro di Basu *et al.* (2004) in *Anabas testudineus*, non esistono, a nostra conoscenza, accreditati modelli sperimentali per lo studio della regolazione del completamento meiotico nei pesci. Un discorso a parte merita *zebrafish* (*Danio rerio*), un organismo largamente utilizzato come modello genetico; infatti, *zebrafish* diversamente da semplici invertebrati quali *Drosophila* o nematodi, ha conservato la complessità biologica e genomica dei vertebrati più evoluti. Ha, inoltre, il vantaggio di possedere un genoma facilmente accessibile mediante approcci di genetica diretta ed inversa (Chen e Ekker, 2004). Tuttavia, nonostante queste caratteristiche, solo pochissimi lavori (circa 30) sono stati pubblicati negli ultimi 20 anni sulla regolazione meiotica in ovociti e uova di *zebrafish* (ad esempio: Kondo *et al.*, 2001). La maggiore difficoltà, comune anche ad altri modelli quali *Carassius auratus*, potrebbe essere legata alla difficoltà di avere sufficiente materiale per l'analisi biochimica considerando che, in entrambi i casi, si tratta di animali di piccola taglia. Altre ragioni potrebbero risiedere nella difficoltà di fecondare *in vitro* le uova e/o una complessa morfologia e

fisiologia dell'apparato riproduttore e dell'anatomia degli esemplari produttori dei gameti.

Alla luce di quanto detto, uno degli scopi primari ed iniziali del presente progetto di dottorato è stato quello di proporre le uova del teleosteo *Sparus aurata* come nuovo modello sperimentale per lo studio della regolazione meiotica e dei primi stadi di sviluppo nei Pesci. *Sparus aurata*, infatti, presenta i seguenti vantaggi:

1. gameti (spermatozoi ed uova) prodotti in abbondanza e sufficienti per l'analisi biochimica;
2. sincronia delle uova deposte ed efficiente fecondazione *in vitro*;
3. conoscenza dettagliata dell'anatomia e fisiologia della riproduzione di *Sparus aurata*;
4. relativa facilità nel reperire gli organismi produttori in quanto la specie è presente in molti allevamenti di acquacoltura;
5. possibilità, a lungo termine, di individuare vantaggi applicativi della ricerca in corso in relazione all'interesse commerciale che riveste questo organismo.

Una possibile limitazione potrebbe essere rappresentata dal limitato periodo in cui gli animali sono sessualmente maturi (vedi paragrafo 3.1). Negli impianti di acquicoltura, però, i pesci sono esposti a termo-fotoperiodo artificiale, per cui la disponibilità di uova aumenta da tre a otto mesi. Dal punto di vista scientifico, invece, è necessario sottolineare che per *Sparus aurata*, come per ogni altro nuovo modello sperimentale, non sono disponibili

reagenti specifici (ad esempio anticorpi, sonde di acidi nucleici) rispetto a potenziali altri organismi di riferimento quali *Fugu rubripes* (pesce palla giapponese) o *Danio rerio* i cui genomi sono stati pubblicati o sono in corso di sequenziamento (<http://genome.jgi-psf.org/Takru4;www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/zebrafish>).

Le uova mature di *Sparus aurata* sono state quindi utilizzate nel presente progetto come principale fonte di materiale per lo studio della fecondazione e del completamento meiotico nei pesci con due principali obiettivi:

1. identificare e caratterizzare in questo nuovo modello sperimentale alcuni tra i più conservati marcatori biochimici e funzionali della meiosi nella scala evolutiva (ad esempio, chinasi della famiglia Cdk e MAP/ERK, cicline, fosfatasi) utilizzando un approccio biochimico (studio dell'attività e dell'espressione);

2. identificare, mediante un approccio proteomico, nuove molecole che rivestono un ruolo funzionale nel processo di completamento meiotico nei pesci con la possibilità di verificarne, a lungo termine, la conservatività evolutiva in modelli di invertebrati (ascidie) e mammiferi (topo).

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 - MODELLO SPERIMENTALE: L'ORATA

Il pesce teleosteo *Sparus aurata*, comunemente chiamato orata, appartiene all'ordine dei Perciformes ed alla famiglia degli Sparidae che comprende circa 120 specie (Fig. 3.1). L'orata ha il corpo arrotondato con peduncolo caudale sottile, dorso grigio-azzurro con fianchi argentati percorsi da linee longitudinali grigiastre e presenta una fascia nera e una dorata tra gli occhi.



**Figura 3.1** - *Sparus aurata*.

L'opercolo branchiale ha il margine rossastro, sfumature azzurrognole sulla dorsale e grigio-verdastre sulla caudale. E' una specie marina costiera con caratteristiche eurialine, a diffusione subtropicale; vive isolata o in piccoli branchi lungo le coste dell'Atlantico, dal Senegal all'Inghilterra, presso tutte le coste del Mediterraneo e del Mar Nero ad una profondità tra 10 e 30 metri

(Fig. 3.2). E' carnivora e si nutre di molluschi, piccoli crostacei ed altri organismi bentonici.

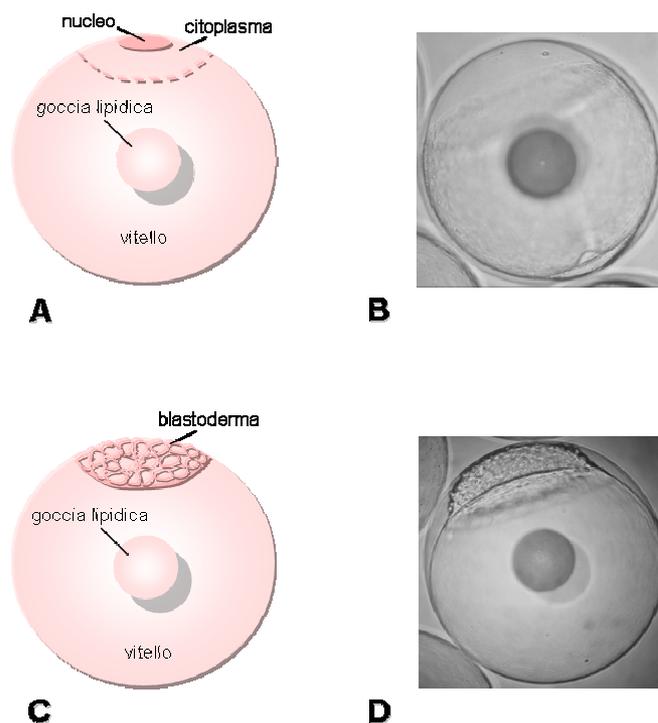
L'orata è una specie ermafrodita proterandra, la cui inversione sessuale, da maschio a femmina, si compie solitamente entro il secondo anno d'età. Alle nostre latitudini si riproduce in autunno, nel periodo tra ottobre e dicembre. L'ovario matura gradatamente e la deposizione delle uova è asincrona lungo un arco temporale di tre mesi. L'uovo è pelagico con un diametro di circa 1 mm (AAVV, 2001).



**Figura 3.2** - Distribuzione geografica di *Sparus aurata*.

Nell'orata come in altri teleostei le uova sono telolecitiche, ossia il tuorlo è molto abbondante, occupa la maggior parte dell'uovo ed è separato dal citoplasma, contenente il nucleo, che è raccolto al polo animale e forma una piccola chiazza adagiata sul tuorlo, detta macula germinativa. Nelle uova telolecitiche la segmentazione è meroblastica poiché è limitata al plasma

formativo raccolto al polo animale. Il primo piano di divisione durante la segmentazione è meridiano, limitato alla zona centrale del blastodisco e lo suddivide in due semicerchi, ciascuno dei quali contenente un nucleo, poggianti sul sottile strato citoplasmatico sovrastante il tuorlo. Il secondo piano è anch'esso meridiano e ortogonale al primo. Le divisioni continuano con piani di separazione verticali che separano i blastomeri fra loro ma non dallo strato citoplasmatico profondo (Fig. 3.3). Tali cellule, non completamente delimitate, prendono il nome di merociti.



**Figura 3.3** - **A:** schema di uovo telolecitico non fecondato; **B:** fotografia di uovo non fecondato di *Sparus aurata*; **C:** schema di una discoblastula; **D:** fotografia di una discoblastula di *Sparus aurata*.

### 3.2 - MATERIALI

I reagenti utilizzati sono stati acquistati alle ditte fornitrici di seguito riportate: anticorpi anti-Cdc2 e anti-Cdk2 (Santa Cruz Biotechnology), anticorpi anti-fosfo MAPK e anti-ERK1 (New England Biolabs), inibitori di Cdk: olomoucina e roscovitina (Biomol Research Laboratories). Gli altri reagenti, se non specificamente indicato, sono stati acquistati alla Sigma.

### 3.3 - CAMPIONAMENTO

Il prelievo delle cellule germinali di *Sparus aurata*, la fecondazione *in vitro* ed il campionamento di cellule embrionate durante l'interfase del primo ciclo cellulare sono stati effettuati nel marzo 2003 e nell'aprile 2004 presso l'Azienda Ittica "Valle Ca' Zuliani" di Monfalcone (Go).

I riproduttori utilizzati per il campionamento erano stabulati in vasche di cemento aventi una capacità di 15 m<sup>3</sup>. Le condizioni di stabulazione sono riportate in tabella 3.1.

**Tabella 3.1** - Condizioni di stabulazione. L/O: rapporto ore luce/ombra.

Ricambio H <sub>2</sub> O	2.5 l/sec
Salinità	35 g/l
O <sub>2</sub> disciolto	7.2 ± 1 mg/l
pH	7.7
Temperatura H <sub>2</sub> O	17.5 °C
Fotoperiodo	L/O 16/8

Le vasche contenevano femmine di 3-4 anni di età e 2-3 kg di peso e maschi di 2-3 anni di età e 0.8-1.2 kg di peso.

I prelievi di uova e liquido spermatico sono stati effettuati secondo il metodo riportato da Saroglia (Tecniche di acquacoltura, 1992) con opportune modifiche. Il contenuto d'acqua della vasca è stato ridotto fino ad un'altezza di circa 20 cm ed i pesci anestetizzati mediante l'aggiunta di 2-fenossietanolo in quantità pari a circa 250 ppm. Da due maschi e sei femmine stabulati nella stessa vasca sono stati raccolti il liquido spermatico e le uova, mediante una lieve pressione sull'addome.

#### **3.4 - PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Ogni campione è stato scongelato ed omogeneizzato con l'utilizzo di un omogeneizzatore a lame rotanti Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik), previa aggiunta, in rapporto 1:1, di tampone di lisi (LB150) costituito da 50 mM TRIS pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 mM ditiotreitolo (DTT), 10% glicerolo, 100 µg/ml PMSF (*phenylmethylnsulphonylfluoride*), ed una miscela di inibitori di proteasi ("Complete" Boehringer, Ingelheim, Germania). L'omogenato relativo a ciascun campione è stato poi centrifugato a freddo a 13000 rpm per 40 min in microfuge ed il sopranatante è stato aliquotato e conservato a -80 °C per le successive analisi.

Le concentrazioni proteiche sono state determinate utilizzando il metodo di Bradford (1976).

### 3.5 - PURIFICAZIONE DI CDK SU P13-SUC1

Estratti proteici di uova non fecondate e a 45 min dalla fecondazione sono stati precipitati con *sepharose-p13Suc1* (*Suppressor of Cdc2 -1*). p13Suc1 svolge la sua attività regolatoria legandosi alle Cdk, in maniera specifica a Cdc2 (Khazanovich *et al.*, 1996) durante le transizioni G1-S e G2-M. Pertanto, la capacità di tale molecola di legare le Cdk, ne ha suggerito il possibile utilizzo come agente precipitante quando covalentemente legata a resine quali il sepharosio (Amersham Biosciences, Cologno Monzese, Milano) (Brizuela *et al.*, 1987; Neant *et al.*, 1994). Il reagente utilizzato nella presente tesi è stato preparato in laboratorio a partire dalla proteina da lievito espressa in *Escherichia coli* (Russo *et al.*, 1992).

La precipitazione è stata eseguita a partire da aliquote di estratti proteici contenenti 350 µg di proteine totali a cui è stato aggiunto l'LB150 (contenente inibitori di proteasi e PMSF) fino ad un volume totale di 700 µl. A questa soluzione sono stati aggiunti 60 µl di *sepharose-p13Suc1* diluita in PBS (*phosphate buffered saline*) in rapporto 1:1; tali campioni sono stati incubati per 16-18 h a 4 °C e soggetti ad agitazione rotante. Al termine dell'incubazione è stata effettuata una centrifugazione a 2000 rpm a 4 °C per 1 min. Il precipitato così ottenuto e contenente le Cdk legate a *sepharose-p13Suc1* è stato recuperato, lavato due volte con 300 µl di LB150 (senza inibitori) ed utilizzato per immunoblotting e/o saggi radiochimici.

### 3.6 - IMMUNOPRECIPITAZIONE

Estratti proteici di uova non fecondate sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione mediante l'utilizzo di anticorpi policlonali anti-Cdc2 (SC-954 e SC-747), anti-Cdk2 (SC-163), anti-ERK1 (SC-093) e anti-fosfo MAPK (NEB 9101 e NEB 9105). Prima di iniziare l'immunoprecipitazione, i campioni sono stati sottoposti ad una fase di prelavaggio, per eliminare eventuali molecole che potevano legarsi all'immunocomplesso in maniera non specifica. A tal fine, ad aliquote di estratti proteici contenenti 500-700 µg di proteine totali è stato aggiunto LB150 (contenente inibitori di proteasi e PMSF) fino ad un volume totale di 700 µl. A questa soluzione sono stati aggiunti 50 µl di *Protein A-sepharose* diluita in PBS in rapporto 1:1 (prelavaggio). Dopo un'incubazione di 30 min a 4 °C in agitazione rotante, è stata effettuata una centrifugazione a 2000 rpm a 4 °C per 1 min ed è stato recuperato il supernatante purificato, a cui sono stati aggiunti 10 µl di anticorpo (corrispondenti a circa 10 µg di immunoglobuline). Dopo un'incubazione di 4-5 h a 4 °C in agitazione rotante, sono stati aggiunti 50 µl di *Protein A-sepharose* e si è proceduto con un'ulteriore incubazione di 16-18 h nelle stesse condizioni. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 2000 rpm a 4 °C per 1 min e sono stati recuperati sia il precipitato che la fase superiore. Il precipitato, contenente le chinasi legate all'anticorpo, è stato lavato due volte con 300 µl di LB150 ed utilizzato per immunoblotting e/o saggi radiochimici. Il supernatante, in alcuni casi, è stato

analizzato su immunoblotting per verificare l'avvenuta immunoprecipitazione dell'antigene.

### 3.7 - SAGGI RADIOCHIMICI

Per il saggio radiochimico relativo all'attività della chinasi Cdk1 si è utilizzata la procedura messa a punto Casnellie (1991) con opportune modifiche (Russo *et al.*, 1996). Tali saggi sono stati effettuati su estratti proteici di uova fecondate e non, prima e dopo purificazione con il reagente *sepharose-p13Suc1* e prima e dopo trattamento delle uova ed embrioni di *Sparus aurata* con inibitori delle Cdk.

Nel caso di saggi enzimatici su estratti totali, ad ogni campione contenente circa 30 µg di proteine totali, è stata aggiunta una miscela di reazione costituita da 2-5 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (*easytides*-Perkin Elmer) per un totale di 10-20000 cpm/pmol (ATP marcato è stato preparato a partire da singole aliquote congelate di una soluzione concentrata quantizzata spettrofotometricamente), il substrato di reazione per Cdk1 costituito da un peptide sintetico in concentrazione di 0.1 mg/ml (New England Biolabs, Beverly, MA) con sequenza S\*/T\*-P-X-R/K in cui la T seguita da una prolina in posizione +1 e un amminoacido basico in posizione +3 rappresenta il residuo fosforilabile più frequente trovato tra i substrati *in vivo* e *in vitro* delle Cdk, il tampone per Cdk1 (5X) (concentrazione finale nel saggio: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) in un volume finale di 50 µl. Nella reazione controllo al campione è stato sostituito un ugual

volume di tampone LB150. La miscela è stata incubata a 30 °C per 60 min, e la reazione bloccata per l'aggiunta di acido tricloroacetico (10% concentrazione finale) e albumina bovina sierica (BSA, 5 mg/ml) al fine di facilitare la precipitazione delle proteine dell'estratto e lasciare in soluzione il substrato peptidico. Dopo l'incubazione in ghiaccio per 10 min e successiva centrifugazione in microfuge per 10 min a 14000 rpm, 2 x 20 µl di ogni campione sono stati pipettati su filtri assorbenti P81 (Whatman), costituiti da carta di fosfocellulosa che lega i residui basici contenuti nel substrato peptidico mediante interazioni ioniche. I filtri sono stati lavati quattro volte con 500 ml di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75 mM) per eliminare le cariche negative dei gruppi fosfato e lasciati asciugare all'aria. Infine, la radioattività incorporata nei filtri P81 è stata misurata mediante lettura allo scintillatore (Beckman) con o senza (conte Cerenkov) liquido di scintillazione. I risultati sono stati espressi in termini di attività specifica di Cdk (pmol di ATP incorporate sul peptide/min/mg proteine totali), oppure in maniera relativa come percento di incremento (cpm/mg proteine) rispetto all'attività basale. Nel caso del saggio con inibitori *in vitro*, alla miscela di reazione sono stati aggiunti gli inibitori a concentrazioni crescenti da 0,1 a 1000 µM, tutti solubilizzati in DMSO.

Nel caso di saggio enzimatico dopo precipitazione con *sepharose-p13Suc1*, i pellet sono stati lavati una volta con 500 µl di tampone LB150 e tre volte con 500 µl di tampone per Cdk1 (1X). Il saggio enzimatico successivo è stato eseguito in presenza del substrato peptidico come sopra descritto, oppure utilizzando come accettore di gruppi fosforici da parte di Cdc2, 3 µg di istone

H1 (3 mg/ml; Boehringer, Ingelheim, Germania); le restanti condizioni di reazioni sono rimaste immutate. Al termine dell'incubazione, a 10 µl di miscela di reazione, contenente l'istone H1 potenzialmente fosforilato, è stato aggiunto un pari volume di Laemmli *sample buffer*. La miscela è stata bollita per 5 min e sottoposta a SDS-PAGE (12%). Il gel dopo l'elettroforesi è stato essiccato ed esposto a lastra autoradiografica (Amersham Biosciences) con schermo intensificatore. Il pellet residuo è stato lavato 2 volte con LB150, ed il complesso MPF è stato fluito dalla resina mediante aggiunta di 30 µl di 2X Laemmli *sample buffer* per la successiva SDS-PAGE ed immunoblotting.

Quando la reazione di fosforilazione è stata eseguita dopo immunoprecipitazione, nella miscela di reazione è stato utilizzato l'istone H1 come substrato per Cdc2. I precipitati sono stati trattati come descritto per i campioni purificati con *sepharose-p13Suc1*, ma i substrati fosforilati sono stati direttamente sottoposti ad SDS-PAGE e i gel esposti a lastre autoradiografiche.

### **3.8 - WESTERN BLOTTING**

Gli estratti proteici a diversi tempi dalla fecondazione sono stati analizzati mediante Western blotting con l'utilizzo del sistema XCell II Blot Module (Invitrogen) (Russo *et al.*, 2004). Prima di procedere al trasferimento, le miscele proteiche sono state separate in alcuni casi mediante SDS-PAGE, in altri casi mediante elettroforesi bidimensionale. Per l'SDS-PAGE sono stati utilizzati gel *pre-cast* di dimensioni 8 x 8 cm al 12% di acrilammide

(Invitrogen). Il *running buffer* utilizzato era costituito da una soluzione di 1X MOPS (*3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid*) con l'aggiunta di un antiossidante (0.25% concentrazione finale) fornito dalla casa. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 200 V per 50 min con l'utilizzo del power supply PowerPak3000 (BioRad). Per ogni campione sono stati analizzati 60 µg di proteine totali. Per l'elettroforesi bidimensionale si veda il paragrafo 3.9.

Al termine della separazione elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Invitrogen). Il trasferimento è stato eseguito a 30 V per 60 min, utilizzando un tampone di trasferimento contenente Invitrogen *transfer buffer* 1X, 20% metanolo e 0,1% di agente antiossidante (Invitrogen). A trasferimento avvenuto, la membrana è stata lavata per 1 min in una soluzione di 1X T-TBS (1X TBS (*TRIS buffered saline*) + 0.1% Tween 20). Per la preparazione del 1X TBS è stato diluito il 10X TBS pH 8, contenente NaCl 137 mM, KCl 2.69 mM, Tris 25 mM. La membrana è stata poi incubata per 60 min in una *blocking solution* costituita da 3% BSA in 1X PBS. Dopo l'incubazione la membrana è stata nuovamente lavata in 1X T-TBS e incubata nella soluzione di anticorpo primario per 16 ore a 4 °C in agitazione. Gli anticorpi primari monoclonali e policlonali, acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California), sono stati diluiti 1:1000 in *blocking solution*. Al termine dell'incubazione, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi in 1X T-TBS ed incubata con la soluzione di anticorpo secondario (Amersham Biosciences) diluita 1:8000 in T-TBS 1X. Dopo un ulteriore lavaggio la membrana di nitrocellulosa è stata incubata per 10 min al

buio con una soluzione chemiluminescente (ECL-plus, Amersham Biosciences) secondo il protocollo consigliato dal fornitore ed esposta al buio a lastre autoradiografiche (Amersham Biosciences). Per la determinazione del peso molecolare, le bande proteiche ottenute sono state confrontate con quelle di una miscela di proteine standard See Blue Plus2 (Invitrogen).

### **3.9 - ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE**

Gli estratti totali di uova non fecondate e a diversi tempi dalla fecondazione sono stati sottoposti ad elettroforesi bidimensionale mediante l'utilizzo del sistema ZOOM IPGRunner System (Invitrogen). Questo tipo di elettroforesi permette una doppia separazione delle proteine, le quali vengono prima separate in base al proprio punto isoelettrico mediante l'isoelettrofocalizzazione (IEF) e poi in base al proprio peso molecolare mediante SDS-PAGE.

Per la prima dimensione sono state utilizzate strisce di gel (*strip*) di 7.0 cm, con un range di pH 3-10 non lineare. Gli estratti proteici, previamente diluiti con un tampone di reidratazione costituito da 8M urea, 2% CHAPS, 0.5% anfoliti pH 3-10, 0.002% blu di bromofenolo, 20mM DTT, sono stati lasciati per circa 16 h a temperatura ambiente a contatto con le *strip* e successivamente sottoposti ad IEF. Per ogni campione sono stati analizzati 50 µg di proteine. In seguito all'IEF, ogni *strip* è stata incubata per 15 min con una soluzione riducente (contenente 1X *Sample Reducing Agent*, Invitrogen), per altri 15 min con una soluzione alchilante (contenente 125 mM

iodoacetammide) ed infine è stata caricata sul gel di seconda dimensione. La SDS-PAGE è stata effettuata mediante l'utilizzo di gel *pre-cast* di dimensioni 8 x 8 cm in gradiente di concentrazione dell'acrilammide (4-12%). Le condizioni di corsa, sia per la prima, che per la seconda dimensione, sono riportate in tabella (Tab. 3.2).

Al termine della SDS-PAGE, per alcuni gel è stato eseguito il trasferimento su membrana di nitrocellulosa (come descritto nel paragrafo 3.8), per altri è stata effettuata la rivelazione degli *spot* proteici mediante l'utilizzo di un kit per *silver staining* (SilverQuest, Invitrogen) compatibile con la spettrometria di massa.

**Tabella 3.2** - Condizioni di corsa dell'elettroforesi bidimensionale.

I Dimensione (IEF)	
200 V	20 min
450 V	15 min
750 V	15 min
2000 V	60 min
II Dimensione (SDS-PAGE)	
200 V	45 min

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

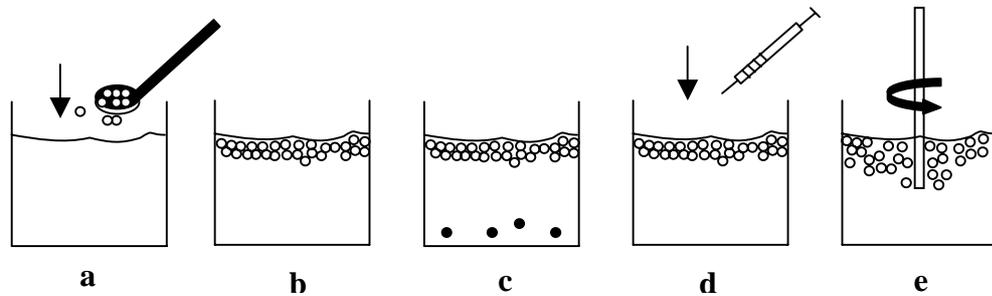
### 4.1 - ATTIVITÀ CDC2-LIKE IN SPARUS AURATA DURANTE IL COMPLETAMENTO MEIOTICO

I prelievi di uova e liquido spermatico sono stati effettuati secondo il metodo riportato da Saroglia (1992) con opportune modifiche. Il contenuto d'acqua nella vasca è stato ridotto fino ad un'altezza di circa 20 cm ed i pesci anestetizzati mediante l'aggiunta di 2-fenossietanolo in quantità pari a circa 250 ppm. Da due maschi e sei femmine stabulati nella stessa vasca sono stati raccolti il liquido spermatico e le uova, mediante una lieve pressione sull'addome.

La fecondazione *in vitro* è stata eseguita in un becker da 150 ml contenente 100 ml di acqua di mare (salinità pari a 35 g/l) in cui sono stati delicatamente adagiati, utilizzando un cucchiaino di legno, 20 ml di liquido celomatico contenente le uova non fecondate (~2000 uova/ml) (Fig. 4.1a).

Le uova vitali hanno una densità minore di quella dell'acqua, pertanto galleggiavano e si stratificavano in superficie (Fig. 4.1b), mentre quelle non vitali o aberranti, facilmente riconoscibili perché più opache per la condensazione dell'albumina, dopo circa 15 min si depositavano sul fondo (Fig. 4.1c). Le uova vitali sono state trasferite in un altro becker, per allontanarle da quelle non vitali, e ad esse è stato aggiunto 1 ml di liquido spermatico ( $\sim 140 \times 10^{10}$  spermatozoi/ml) (Fig. 4.1d), agitando delicatamente

con una bacchettina di vetro sterile per qualche secondo per agevolare la fecondazione (Fig. 4.1e).



**Figura 4.1** - Schema della fecondazione in vitro. **a:** immissione delle uova in acqua di mare; **b:** stratificazione delle uova in superficie; **c:** eliminazione delle uova non vitali; **d:** aggiunta dello sperma; **e:** agitazione dell'acqua per agevolare la fecondazione.

A partire dall'aggiunta dello sperma, venivano prelevate piccole aliquote di uova fecondate e poste su un vetrino portaoggetto per l'osservazione al microscopio al fine di determinare il tempo della prima segmentazione che si verificava dopo circa un'ora dalla fecondazione. Successivamente a questo controllo, necessario sia per determinare la "qualità" dei gameti prelevati che il *timing* dell'esperimento, aliquote da circa 1 ml di uova embrionate sono state prelevate a tempi differenti (Tab. 4.1) ed immediatamente congelate in azoto liquido.

**Tabella 4.1** - Protocollo preliminare di campionamento.

Campioni	Tempo dalla fecondazione (min)
1	Uova non fecondate
2	3
3	15
4	30
5	45
6	60

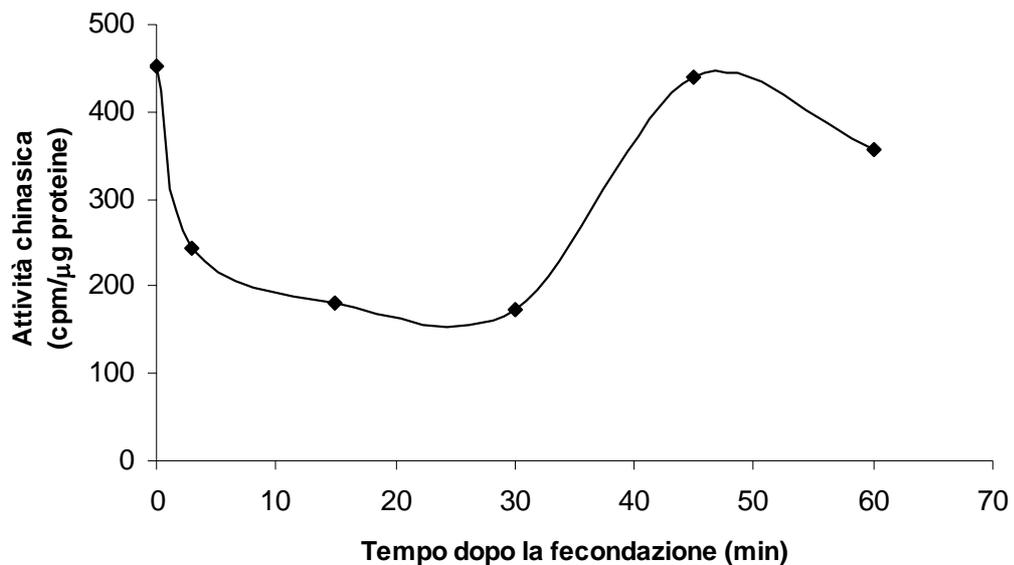
La prima analisi effettuata sui campioni di uova vergini e a tempi diversi dalla fecondazione ha riguardato la determinazione dell'attività chinasi associata al complesso MPF. Tale saggio è stato eseguito per diversi motivi: 1. l'attività Cdc2 è universalmente conservata dal lievito all'uomo, sia nei gameti che nelle cellule somatiche, pertanto può rappresentare un ottimo marcatore della divisione cellulare; 2. variazioni di attività Cdc2 sono state osservate in ovociti ed uova di diversi organismi, sia invertebrati (Russo *et al.*, 1996; Doree *et al.*, 1983; Peaucellier *et al.*, 1984), che vertebrati (Watanabe *et al.*, 1991); 3. il substrato peptidico utilizzato nel saggio di attività chinasi, progettato per l'enzima da mammiferi, è stato efficientemente fosforilato dalla chinasi da altre fonti, incluso invertebrati (Russo *et al.*, 1996). Inoltre, in ovociti ed uova, una corretta oscillazione di attività Cdc2, con picchi in metafase e forti diminuzioni tra una metafase e l'altra, può considerarsi un indice della sincronia del materiale utilizzato al momento della fecondazione (>90%). Pertanto, l'obiettivo di questa prima parte di lavoro ha riguardato la

determinazione dell'attività *Cdc2-like* in uova fecondate di *Sparus aurata*, utilizzando un saggio messo a punto per l'enzima umano. E' da osservare che in *Sparus aurata* non era mai stata eseguita prima d'ora un'analisi molecolare di marcatori meiotici.

Il saggio ha evidenziato la presenza di due picchi di attività *Cdc2-like* (Fig. 4.2). Il primo è presente, come atteso, in estratti di uova non fecondate; infatti, una caratteristica del processo di ovogenesi della maggior parte dei vertebrati, compresi i pesci teleostei come l'orata, è rappresentata dall'arresto degli ovociti alla metafase della seconda divisione meiotica. Il secondo picco di attività è presente dopo 45 min dalla fecondazione, subito prima della divisione dell'embrione osservata al microscopio (dati non mostrati), ad indicare la metafase della I divisione mitotica, caratterizzata da un'elevata attività MPF. In tutti gli altri campioni l'attività chinasi è risultata bassa, confermando la specificità di Cdc2 per la fase M del ciclo cellulare. E' da osservare la ripidità con cui diminuisce l'attività *Cdc2-like* immediatamente dopo la fecondazione (circa 50%), confermando quanto avviene in altri sistemi, laddove tale evento è collegato all'aumento di calcio causato dallo spermatozoo attivante, l'immediata degradazione della ciclina B e l'entrata nell'anafase della II divisione meiotica.

L'esperimento mostrato in figura 4.2 non solo ha evidenziato, per la prima volta, la presenza di attività *Cdc2-like* in *Sparus aurata*, ma l'andamento ed i tempi di tale attività suggeriscono una perfetta sincronia delle uova utilizzate, a dimostrazione della validità del modello sperimentale

che risponde perfettamente ad alcuni dei parametri, tra quelli elencati nel Capitolo 2, necessari per lo studio del completamento meiotico.



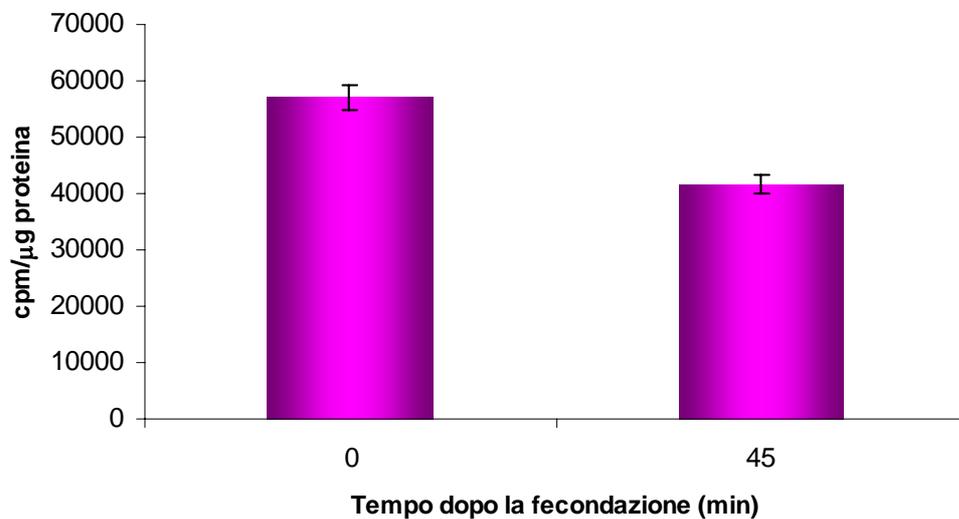
**Figura 4.2** - Saggio di attività Cdc2-like sulle uova non fecondate ed embrionate. I punti sperimentali dell'esperimento in figura rappresentano la media di almeno 5 esperimenti eseguiti con una SD inferiore al 5%.

Per verificare se l'attività chinasi ottenuta nel precedente saggio enzimatico fosse realmente da attribuire a Cdc2, i campioni ad alta attività (0 e 45 min) sono stati parzialmente purificati mediante precipitazione con *sepharose-p13Suc1* (si veda il Capitolo 3). Il gene *suc1* fu identificato per la prima volta nel lievito a scissione (*Schizosaccharomyces pombe*), come soppressore di alcune mutazioni sensibili alla temperatura di *cdc2* (Hayles *et al.*, 1986; Khazanovich *et al.*, 1996). Successivamente, si dimostrò che questa

proteina era ubiquitariamente espressa negli eucarioti, interagiva fisicamente con Cdc2, Cdk2 e Cdk3 (Draetta *et al.*, 1987; Hirai *et al.*, 1992), ed era essenziale per l'attivazione dell'MPF alla transizione G2/M e per la sua inattivazione all'anafase (Fang e Newport, 1991). p13Suc1 appartiene, quindi, alle CKS (*Cdc28 kinase specific*) del lievito a scissione, *Schizosaccharomyces pombe*, una classe di proteine che controllano il ciclo cellulare e che include anche le CKS1 del lievito a gemmazione, *Saccharomyces cerevisiae*, e gli omologhi umani CksHs1 e CksHs2 (Parge *et al.*, 1993; Patra e Dunphy, 1996). Pertanto, sfruttando la capacità di interagire con le Cdk, p13Suc1 è stata utilizzata per sintetizzare una resina d'affinità in cui la proteina è legata covalentemente al *sepharose*. Ciò ha permesso la precipitazione del complesso p13Suc1/Cdk (Brizuela *et al.*, 1987; Neant *et al.*, 1994).

Gli estratti di uova vergini (tempo 0 min) e fecondate (tempo 45 min), dopo precipitazione con *sepharose*-p13Suc1, sono stati sottoposti a saggio radiochimico di attività Cdc2-like (Fig. 4.3). Come ipotizzato, in entrambi i casi, è stata misurata un'elevata attività enzimatica, confermando e rafforzando i dati in figura 4.2. Infatti, non solo l'esperimento dimostra che si è misurata un'attività Cdc2-like in quanto associata ad un reagente (*sepharose*-p13Suc1) che lega specificamente Cdc2, ma, indirettamente, conferma la validità del saggio enzimatico e del peptide substrato utilizzato. Il dato presentato in figura 4.2 indica che l'attività enzimatica misurata nell'estratto cellulare è attribuibile all'omologo in *Sparus aurata* di Cdc2 e non a potenziali altre attività chinasiche contaminanti. Pertanto, negli esperimenti successivi si

è ritenuto sufficiente misurare l'attività *Cdc2-like* utilizzando gli estratti grezzi, senza ricorrere alla purificazione dell'enzima. Infine, l'osservazione che Cdc2 da *Sparus aurata* è precipitata da *sepharose-p13Suc1* suggerisce una similitudine strutturale tra la proteina da bassi vertebrati rispetto a quella da mammiferi, almeno nella regione che interagisce con Suc1.



**Figura 4.3** - Saggio di attività *Cdc2-like* su estratti di uova vergini e dopo 45 min dalla fecondazione dopo precipitazione del complesso MPF con *sepharose-p13Suc1*. I punti sperimentali in figura rappresentano la media di 3 distinte misurazioni con indicazione della SD.

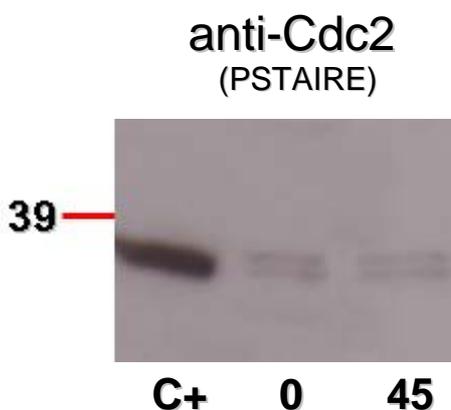
#### **4.2 - IMMUNOREATTIVITÀ DELLE CHINASI CDK-LIKE IN SPARUS AURATA**

Nei vertebrati superiori, la famiglia delle Cdk include diversi membri con funzioni differenti in relazione alle varie fasi del ciclo cellulare e con diversa tessuto-specificità (Sanchez e Dynlacht, 2005). Non si hanno

informazioni sulla ridondanza delle Cdk nei bassi vertebrati e nei pesci in particolare. Sulla base dell'esistenza di una chiara attività chinasi nelle uova di *Sparus aurata* (*Sp*), si è eseguita una caratterizzazione immunologica di *SpCdc2* e/o di altri membri della famiglia durante il completamento meiotico. Pertanto, estratti di uova non fecondate e dopo 45 min dalla fecondazione (i due tempi corrispondenti al massimo di attività *SpCdc2*) sono stati separati mediante SDS-PAGE e successivamente analizzati mediante immunoblotting, utilizzando diversi anticorpi primari anti-Cdc2 umana ed un anticorpo anti-Cdk2 umana. A nostra conoscenza, non sono disponibili in commercio anticorpi anti-Cdk da *Sparus*, o da altri teleostei. Inoltre, nei pesci, il gene codificante per Cdc2 è stato clonato solo in *Danio rerio* (Strausberg *et al.*, 2002) e *Anabas testudineus* (*perch*) (Basu *et al.*, 2004).

La prima prova è stata effettuata utilizzando l'anticorpo policlonale anti-Cdc2 che riconosce la regione PSTAIRE, una sequenza amminoacidica molto conservata di tale enzima ed unica della famiglia delle Cdk (Fig. 4.4). In letteratura sono riportati moltissimi lavori in cui anticorpi con simile specificità sono stati utilizzati con successo, sia in vertebrati (Fellous *et al.*, 1994; Naito *et al.*, 1995) che in invertebrati (Russo *et al.*, 1996). Sorprendentemente, in estratti di uova di *Sparus aurata* tale anticorpo sembra non essere molto efficace, o meglio ha rilevato una banda con un peso molecolare leggermente inferiore a 39 kDa che potrebbe essere attribuita a *SpCdc2*, la cui intensità è relativamente bassa rispetto a quanto atteso sulla base dell'attività enzimatica. Un risultato simile è stato riportato in un recente

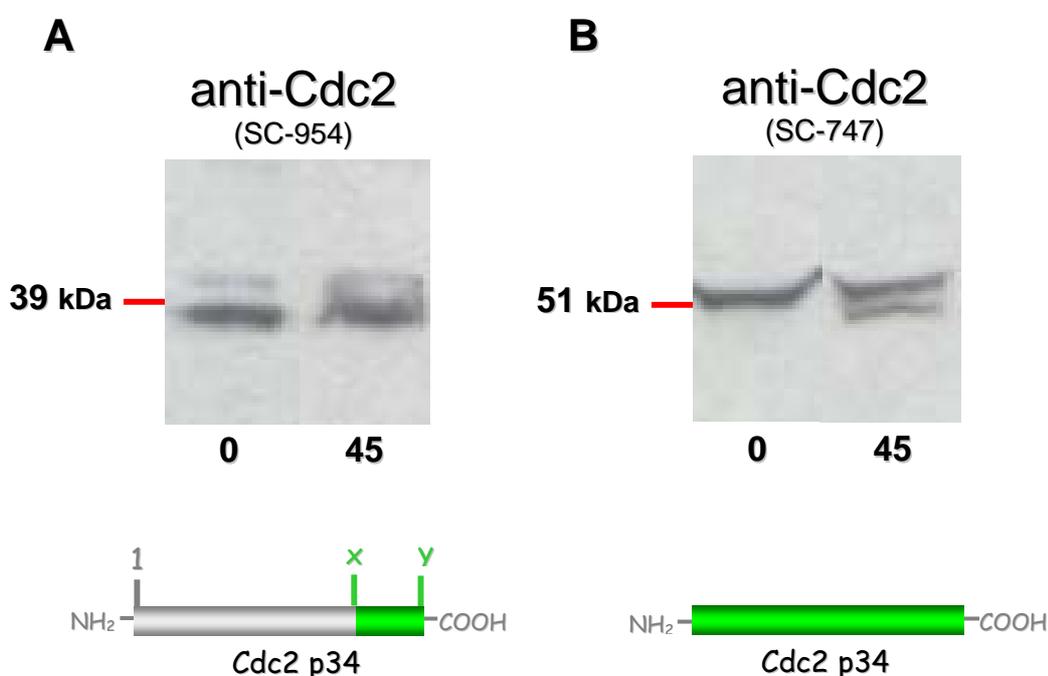
lavoro condotto su ovociti di un pesce teleosteo, *Anabas testudineus*, in cui l'utilizzo di un anticorpo anti-PSTAIRE ha dato risultati negativi (Basu *et al.*, 2004), suggerendo che, forse, il *fold*ing di questa regione di Cdc2 è diverso nei bassi vertebrati rispetto ai mammiferi. E' da notare la doppia banda riconosciuta dall'anticorpo. In generale, all'isoforma a più lenta migrazione (*upper band*) è stata associata la forma fosforilata di Cdc2, mentre la *lower band* corrisponderebbe alla proteina non fosforilata. In figura 4.4 le due bande presentano identica intensità, mentre in *Ciona intestinalis* (controllo positivo), l'*upper band* è molto più marcata rispetto alla *lower band*.



**Figura 4.4** - Reattività di uova vergini e fecondate di *Sparus aurata* all'anticorpo anti-PSTAIRE. L'immunoblot è stato eseguito su 60 µg di estratto totale preparato da uova vergini e dopo 45 min dalla fecondazione, utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la regione PSTAIRE di Cdc2 umana. C+: controllo positivo (30 µg di estratto preparato da ovociti maturi e non fecondati dell'ascidia *Ciona intestinalis*).

Data la scarsa reattività dell'anticorpo anti-PSTAIRE, si è passati all'utilizzo di due diversi anticorpi policlonali anti-Cdc2. Il primo (SC-954) è stato prodotto contro un antigene corrispondente ad una regione all'estremità C-terminale della proteina umana (peso molecolare di 34 kDa). Tale anticorpo ha riconosciuto, sia nel campione non fecondato che in quello a 45 min dalla fecondazione, una banda corrispondente ad un peso molecolare leggermente inferiore a 39 kDa (Fig. 4.5, pannello A), in buon accordo con quello di Cdc2 umana; pertanto, la banda rilevata potrebbe corrispondere all'omologo di tale proteina in *Sparus aurata*. Inoltre, in entrambi i campioni si è osservato la presenza di un'*upper band*, che potrebbe corrispondere, similmente a quanto riportato per l'anti-PSTAIRE, ad una (o più) forme fosforilate della proteina. Poiché le fosforilazioni in Cdc2 possono essere inibitorie (Thr-14, Tyr-15) o attivanti (Thr-161), è difficile attribuire una funzione all'*upper band* di Fig. 4.5A. Difficilmente potrebbe trattarsi della forma fosforilata ed attiva di *SpCdc2*, in quanto, in tal caso, considerando l'elevata attività chinasi, ci si aspetterebbe un'*upper band* molto più intensa rispetto alla *lower band*. Più verosimilmente, potremmo essere in presenza di un residuo di forme fosforilate in Thr-14/Tyr-15 derivanti dalle contaminazioni di ovociti immaturi (nel caso del campione a tempo 0 min) o dalla presenza di una piccola aliquota di campioni in anafase-telofase II (per il tempo 45 min); infatti, è possibile che nella fecondazione delle uova si verifichi una leggera asincronia (5-10%) dovuta alle condizioni sperimentali.

Il secondo anticorpo policlonale anti-Cdc2 (SC-747) è stato ottenuto contro un antigene corrispondente all'intera sequenza amminoacidica di Cdc2 umana e riconosce una banda con un peso molecolare di circa 50 kDa (Fig. 4.5, pannello B). Un tale peso molecolare è nettamente superiore rispetto a quello atteso (circa 35 kDa) e a quello riconosciuto dall'anticorpo SC-954 e dall'anti-PSTAIRE.



**Figura 4.5** - Reattività di uova vergini e fecondate di *Sparus aurata* ad anticorpi anti-Cdc2. Gli immunoblots sono stati eseguiti a partire da 60 µg di estratti di uova a 0 e 45 min dalla fecondazione, utilizzando di due diversi anticorpi policlonali: il primo prodotto contro un antigene corrispondente ad una regione C-terminale di Cdc2 umana (SC-954); il secondo realizzato contro un antigene corrispondente all'intera sequenza di Cdc2 umana (SC-747).

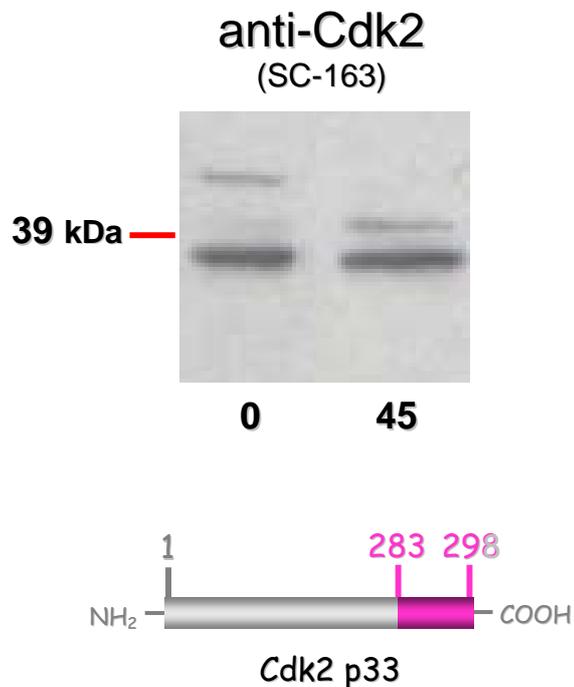
Questo risultato, che lascerebbe ipotizzare la presenza di un'isoforma di *SpCdc2* ad elevato peso molecolare, non trova riscontro nella famiglia delle Cdk da Vertebrati superiori, dove il MW si aggira intorno a 33-36 kDa.

Tuttavia, a parziale conferma che *Sparus aurata* potrebbe possedere una Cdk ad elevato peso molecolare, un esperimento di immunoblotting eseguito in parallelo nel nostro laboratorio su gameti maschili di *Rana esculenta*, ha evidenziato la presenza di una banda riconosciuta dall'anti-PSTAIRE a circa 46 kDa (dati non mostrati). Nei bassi vertebrati, pertanto, potrebbe esistere un'isoforma di Cdc2 con un peso molecolare maggiore di 34 kDa. Sulla base della immunoreattività con gli anticorpi, tale proteina dovrebbe condividere epitopi in comune con la parte amino-terminale di Cdc2 e differenziarsi nella regione carbossi-terminale. In tal modo si spiegherebbe, sebbene in termini parzialmente speculativi, la banda a 50 kDa ottenuta con l'anti-SC747 e non con l'anti-954. Inoltre, nel campione a 45 min dalla fecondazione in figura 4.5B, si osserva la presenza una doppia banda, che potrebbe essere indice di fosforilazione a carico di *SpCdc2*. Nel campione di uova non fecondate, invece, l'unica banda presente si trova alla stessa altezza della *upper band* del campione a 45 min. Questo dato indicherebbe, come è da attendersi, che tutte le molecole di Cdc2 presenti nelle uova non fecondate di *Sparus aurata* siano fosforilate ed attive. Al contrario, la leggera *lower band* a 45 min potrebbe rappresentare un residuo di Cdc2 non fosforilata derivante da campioni asincroni. Riassumendo, da un confronto degli immunoblot ottenuti mediante l'utilizzo dei due differenti anticorpi anti-Cdc2 (SC-954 e SC-747), si può

dedurre che le bande riconosciute dal primo anticorpo (SC-954) sono compatibili con Cdc2 per il loro peso molecolare, mentre quelle riconosciute dal secondo anticorpo (SC-747) sono in accordo con la presenza di isoforme di Cdc2 ad elevato peso molecolare presenti in bassi vertebrati.

Poiché, come già descritto nel paragrafo 1.3g, Cdk2 ha un alto grado di identità di sequenza con Cdc2 e la sua attività enzimatica oscilla durante il ciclo cellulare embrionale con una periodicità simile a quella di Cdc2 (Furuno *et al.*, 1997), nel presente lavoro si è ritenuto opportuno analizzare l'espressione di questo enzima parallelamente a quella di Cdc2. Pertanto, è stato eseguito un immunoblotting su estratti di uova non fecondate e a 45 min dalla fecondazione, utilizzando un anticorpo policlonale prodotto contro un antigene corrispondente agli ultimi 16 amminoacidi situati all'estremità C-terminale di Cdk2 umana, che ha un peso molecolare di 33 kDa. Tale anticorpo ha riconosciuto in entrambi i campioni una banda con un peso molecolare leggermente inferiore a 39 kDa (Fig. 4.6), che potrebbe corrispondere all'omologo di Cdk2 in *Sparus aurata*. Inoltre, nel campione a 45 min dalla fecondazione si osserva anche una banda a migrazione più lenta rispetto alla precedente e assente nel campione di uova non fecondate. Anche in questo caso, la "doppia banda" potrebbe indicare presenza di fosforilazione sebbene, in questo caso come per l'SC-954, è difficile predire quale sito sia fosforilato. Inoltre, a causa dell'omologia tra Cdc2 e Cdk2 e dell'uguale migrazione su SDS-PAGE di Cdc2-like (Fig. 4.5) e Cdk2-like (Fig. 4.6), non

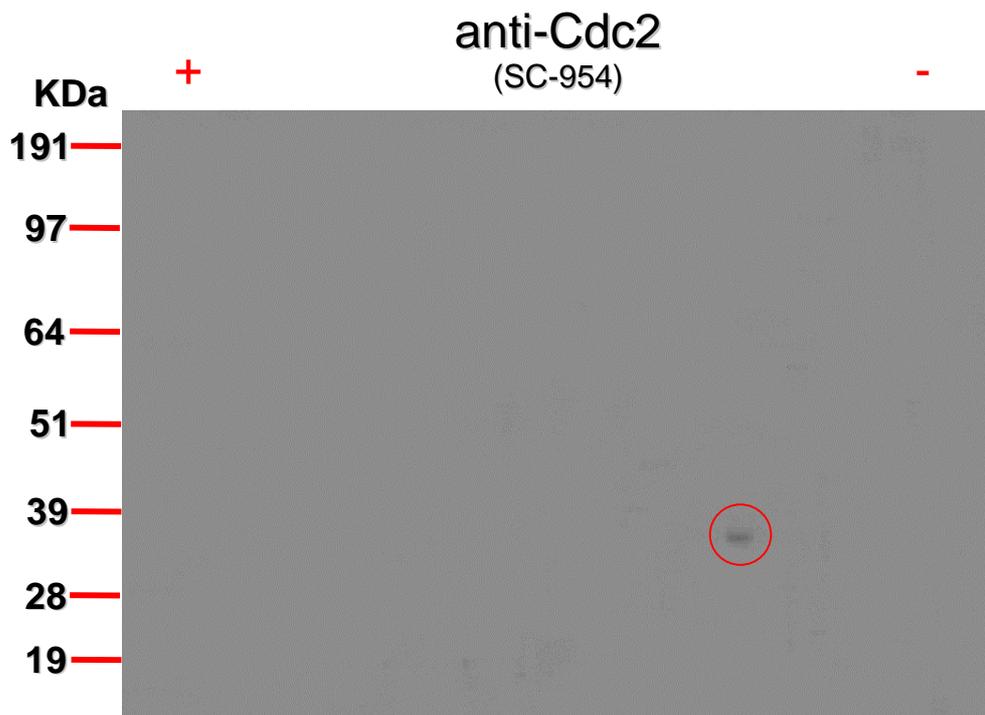
si può escludere che i due diversi anticorpi, SC-954 e SC-163, riconoscano la stessa proteina.



**Figura 4.6** - Reattività di uova vergini e fecondate di *Sparus aurata* all'anticorpo anti-Cdk2. L'immunoblot è stato eseguito su 60 µg di estratti di uova a 0 e 45 min dalla fecondazione eseguiti mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale prodotto contro un antigene corrispondenti agli ultimi 16 amminoacidi situati all'estremità C-terminale di Cdk2 umana (SC-163).

A conferma dei risultati sopra descritti e al fine di una migliore caratterizzazione di Cdc2 e/o Cdk2, gli estratti proteici delle uova non fecondate sono stati separati mediante elettroforesi bidimensionale e sottoposti a immunoblotting, eseguiti mediante l'utilizzo degli stessi anticorpi utilizzati

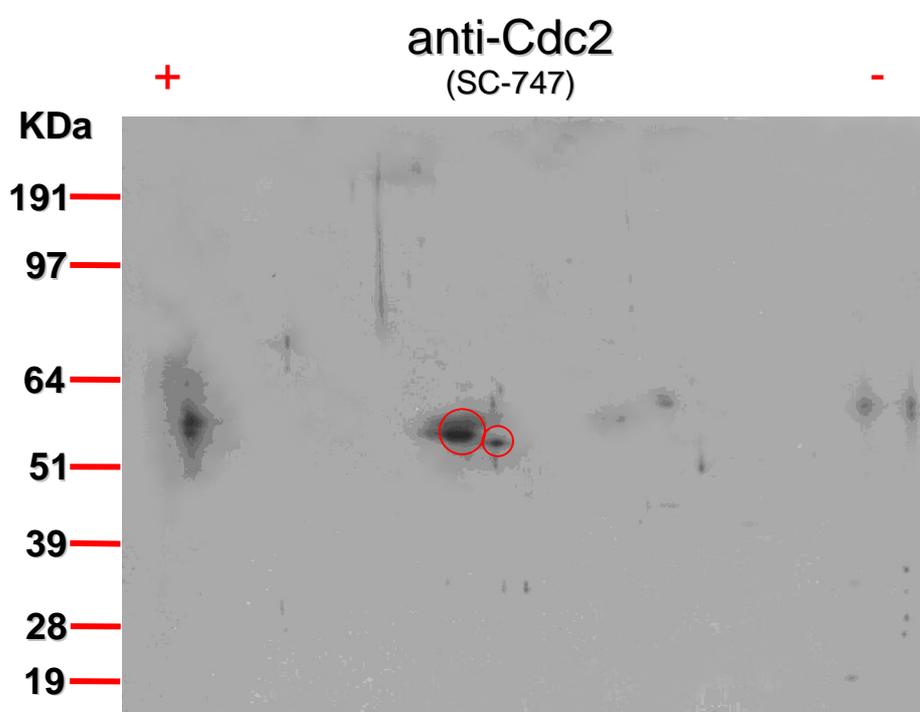
precedentemente. Ancora una volta, l'anticorpo policlonale anti-Cdc2 PSTAIRE si è dimostrato poco efficace (dati non riportati), a differenza degli altri tre anticorpi che hanno prodotto dati più attendibili. L'anticorpo anti-Cdc2 (SC-954), anche in seguito all'elettroforesi bidimensionale (2-D), riconosce un *spot* a circa 34 kDa (cerchiato in rosso in figura 4.7), a conferma della presenza in *Sparus aurata* di una forma di Cdc2 avente peso molecolare simile a quella osservata in altri vertebrati.



**Figura 4.7** - Immunoblot dell'estratto di uova di *Sparus aurata* non fecondate eseguito dopo elettroforesi bidimensionale, mediante l'utilizzo dell'anticorpo policlonale anti-Cdc2 (SC-954). La figura è rappresentativa di uno dei due immunoblot eseguiti. I campioni sono stati risolti mediante IEF a pH 3-10 (prima dimensione) seguita da SDS-PAGE al 12%.

In questo caso, l'anticorpo non ha evidenziato nessun'altra banda spostata verso l'anodo, come c'era da attendersi per le forme fosforilate, suggerendo che l'*upper band* in figura 4.5 potrebbe essere attribuita ad un segnale non specifico.

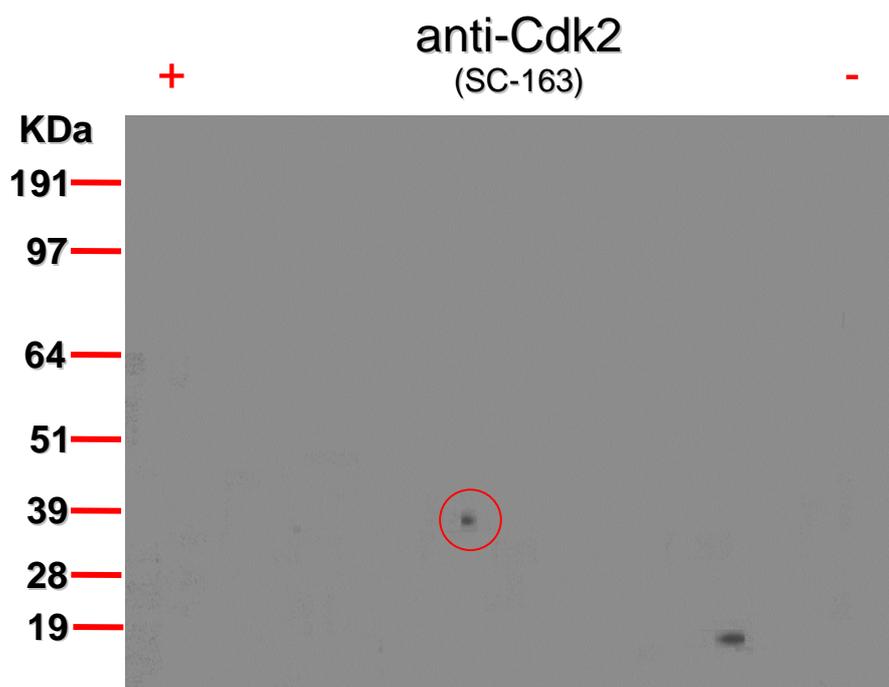
L'anticorpo SC-747 nel profilo 2-D ha riconosciuto due *spots* (cerchiati in rosso in figura 4.8) con all'incirca lo stesso peso molecolare della banda evidenziata dopo SDS-PAGE monodimensionale (Fig. 4.5).



**Figura 4.8** - Immunoblot dell'estratto di uova non fecondate di *Sparus aurata* dopo elettroforesi bidimensionale eseguita utilizzando dell'anticorpo policlonale anti-Cdc2 (SC-747). La figura è rappresentativa di uno dei tre immunoblot eseguiti. I campioni sono stati risolti mediante IEF a pH 3-10 (prima dimensione) seguita da SDS-PAGE al 12%.

La posizione dei due *spots*, leggermente sfasati sia per peso molecolare che per punto isoelettrico, lascerebbe pensare ad un'isoforma di Cdc2 fosforilata, sebbene nel profilo monodimensionale il campione a tempo 0 mostrava un unico segnale.

Infine, l'anticorpo anti-Cdk2 ha riconosciuto un singolo *spot* (cerchiato in rosso in figura 4.9) con un peso molecolare leggermente inferiore a 39 kDa, confermando il risultato dell'immunoblot ottenuto in seguito alla separazione mediante SDS-PAGE (Fig. 4.6).



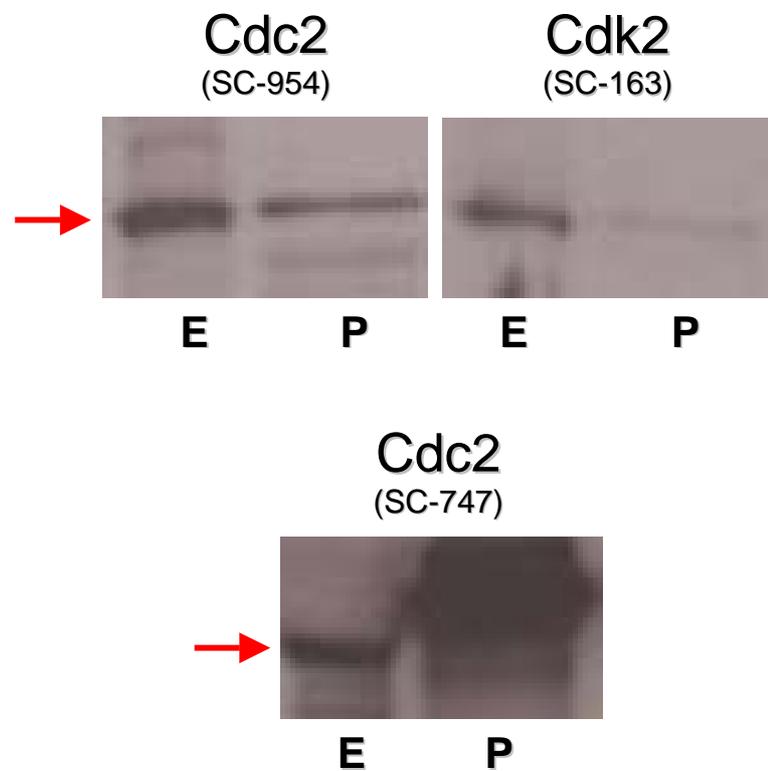
**Figura 4.9** - Immunoblot dell'estratto di uova non fecondate eseguito, in seguito a elettroforesi bidimensionale, mediante l'utilizzo dell'anticorpo policlonale anti-Cdk2 (SC-163). I campioni sono stati risolti mediante IEF a pH 3-10 (prima dimensione) seguita da SDS-PAGE al 12%. La figura è rappresentativa di uno dei tre immunoblot eseguiti.

Lo *spot* con peso molecolare inferiore a 19 kDa evidenziato da questo stesso anticorpo molto probabilmente rappresenta un segnale non specifico.

In conclusione, i risultati degli immunoblot ottenuti utilizzando i diversi anticorpi anti-Cdc2 e anti-Cdk2, dopo elettroforesi bidimensionale hanno confermato quelli ottenuti dopo SDS-PAGE monodimensionale. Confrontando questi dati con quelli ottenuti su linee cellulari umane in coltura (Russo *et al.*, 1992; Draetta *et al.*, 1988), si osserva uno scarso numero di potenziali forme fosforilate di Cdc2. Ciò sembrerebbe confermare l'assenza o la limitata presenza di fosforilazioni inibitorie su Cdc2 nei pesci come suggerito da (Yamashita, 1998). Tuttavia, non si può al momento escludere che lo scarso numero di segnali osservato possa semplicemente essere attribuito ad una limitata sensibilità degli anticorpi, che, si ricorda, sono diretti contro epitopi umani della proteina.

Presi nel complesso, gli immunoblot riportati sopra suggeriscono la possibile esistenza di più isoforme di *SpCdc2*. Si è, quindi, tentato di stabilire a quale di queste sia maggiormente associabile l'attività chinasi misurata sull'estratto proteico totale a 0 e 45 min dalla fecondazione. L'approccio sperimentale è stato il seguente: precipitare uno dei due campioni con *sepharose-p13Suc1* ed eseguire l'immunoblot con gli stessi anticorpi primari utilizzati nelle figure 4.5-4.9. Se, infatti, il reagente *sepharose-p13Suc1* avesse precipitato solo una delle isoforme riconosciute dagli anticorpi SC-954, SC-747 e SC-167, allora sarebbe stato facile attribuire l'attività chinasi mostrata in figura 4.3 a tale isoforma. Purtroppo, i risultati presentati in figura 4.10 non

hanno risolto questo quesito. Il segnale rilevato dall'anticorpo anti-PSTAIRE non migliora in seguito alla purificazione del campione su *sepharose-p13Suc1* (dati non mostrati). Circa gli altri due anticorpi anti-Cdc2, SC-954 e SC-747, entrambi riconoscono i rispettivi antigeni dopo precipitazione con *sepharose-p13Suc1* (Fig. 4.10).



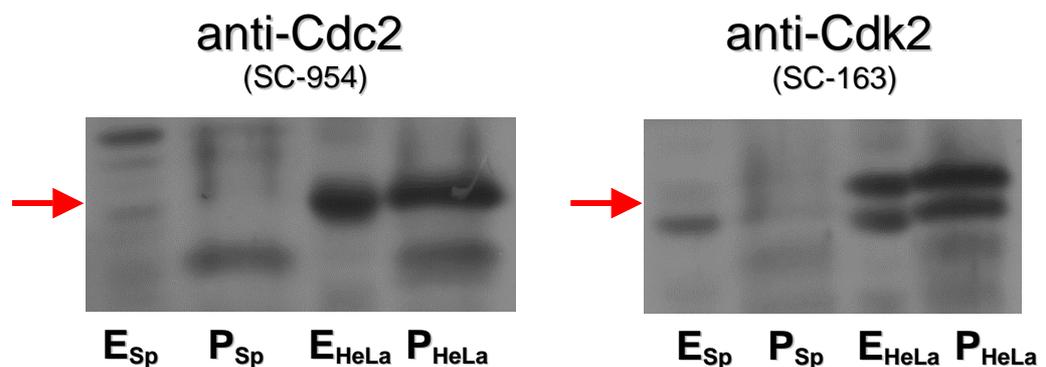
**Figura 4.10** - Immunoblot di estratti di uova non fecondate dopo precipitazione con *sepharose-p13Suc1*. Gli anticorpi utilizzati sono quelli indicati nella parte superiore dei pannelli. E: estratto totale (60  $\mu$ g); P: precipitato dopo *sepharose-p13Suc1* (da 350  $\mu$ g di proteine totali).

Nel caso dell'immunoblot con SC-747, il segnale è più "sporco" forse a causa di materiale non specifico che si lega alla *sepharose-p13Suc1* e cross-reagisce con l'anticorpo. Infine, l'anticorpo anti-Cdk2, sebbene con una minore intensità, ha anch'esso riconosciuto una banda nel precipitato corrispondente a quella presente nell'immunoblot eseguito sull'estratto grezzo (Fig. 4.6).

La capacità di *sepharose-p13Suc1* di precipitare tutte le potenziali isoforme di *SpCdc2* presenti nell'uovo vergine non consente di associare con precisione l'attività chinasi specificamente ad una di esse. E' inoltre da notare che l'affinità di *p13Suc1* per *SpCdc2* si è rilevata inferiore all'attesa, in quanto il segnale ottenuto su immunoblot è debole nonostante si siano precipitati 350 µg di proteine totali. Nelle stesse condizioni sperimentali, *p13Suc1* è in grado di legare la proteina umana 5-10 volte più efficientemente (Russo *et al.*, 1992). Anche questa differenza di comportamento può essere imputata a differenze strutturali tra la proteina da teleostei e quella da mammiferi.

In alternativa alla precipitazione *sepharose-p13Suc1*, si è pensato di immunoprecipitare *SpCdc2* dagli estratti grezzi utilizzando gli stessi anticorpi sia per l'immunoprecipitazione che per il successivo immunoblotting (IP-Wb); infatti, sia l'anticorpo anti-Cdc2 (SC-954) che l'anti-Cdk2 (SC-163), sono capaci di immunoprecipitare la proteina umana, così come certificato dalla ditta fornitrice (Santa Cruz Biotechnology). Pertanto, utilizzando estratti di cellule HeLa (derivate da un adenocarcinoma umano) come controllo positivo,

*SpCdc2* è stata immunoprecipitata e gli immunocomplessi sono stati prima utilizzati come fonte enzimatica per saggi d'attività utilizzando l'istone H1 come substrato, poi, al termine della reazione di fosforilazione *in vitro*, i pellet sono stati caricati su SDS-PAGE per il successivo immunoblotting. I risultati ottenuti hanno mostrato che gli anticorpi immunoprecipitano Cdc2/Cdk2 da cellule HeLa, ma non sono in grado di fare lo stesso per le omologhe proteine da *Sparus aurata* (Fig. 4.11).



**Figura 4.11** - Immunoblot eseguito dopo immunoprecipitazione mediante l'utilizzo degli anticorpi anti-Cdc2 (SC-954) e anti-Cdk2 (SC-163). E<sub>Sp</sub>: estratto totale di uova non fecondate di *Sparus aurata* (50 µg); P<sub>Sp</sub>: immunoprecipitato da uova non fecondate di *Sparus aurata*; E<sub>HeLa</sub>: estratto totale di cellule HeLa umane (50 µg); P<sub>HeLa</sub>: immunoprecipitato da cellule HeLa umane. Per le immunoprecipitazioni si è partiti da 500 µg di proteine totali.

A conferma di ciò, gli immunoprecipitati non mostravano alcuna attività chinasi capace di fosforilare l'istone H1 (dati non mostrati). Un tale fenomeno potrebbe avere due possibili spiegazioni. In primo luogo, proteine omologhe appartenenti ad organismi diversi, come vertebrati superiori e bassi vertebrati, potrebbero avere una differente struttura nativa che ne impedisce il riconoscimento da parte degli anticorpi e quindi l'immunoprecipitazione. In secondo luogo, l'impossibilità degli anticorpi di immunoprecipitare *SpCdc2* potrebbe dipendere da un eventuale legame della chinasi, nel complesso MPF, con altre molecole che maschererebbero il sito d'interazione con l'anticorpo. Questa seconda ipotesi è sostenuta da uno studio condotto sul pesce teleosteo *Anabas testudineus*, in cui è stato dimostrato che l'impossibilità di immunorilevare Cdc2 con l'anticorpo PSTAIRE e precipitarla con p13 era causata dal legame dell'MPF con un peptide di 20 kDa (Basu *et al.*, 2004).

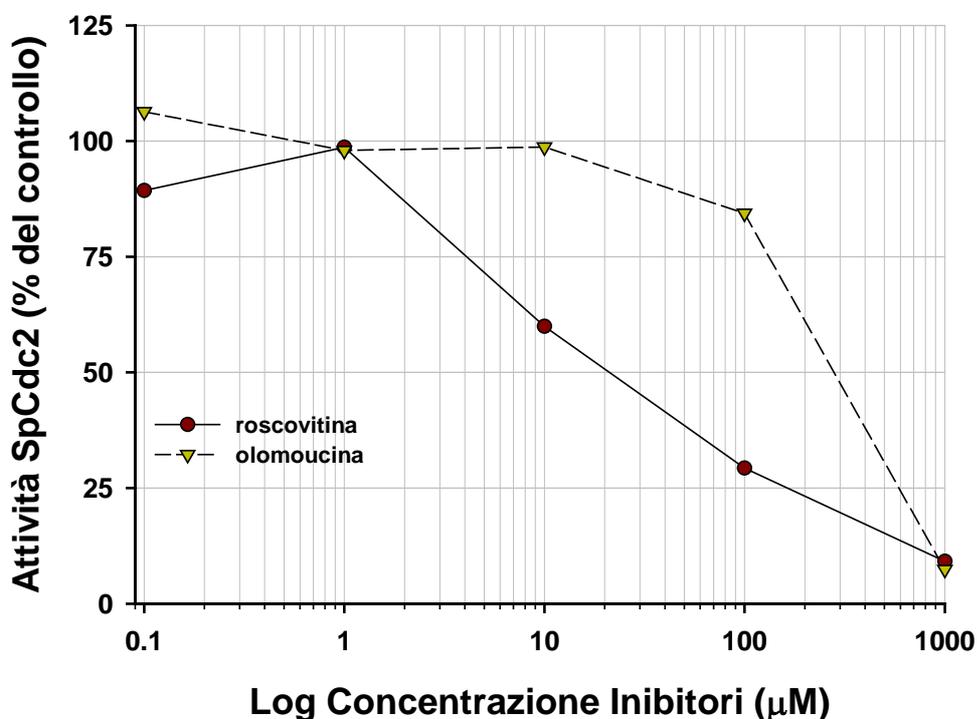
#### **4.3 - DETERMINAZIONE DELLE IC<sub>50</sub> DI INIBITORI DI CDK IN SPARUS AURATA**

Un approccio classico nella caratterizzazione dell'attività enzimatica è il ricorso ad inibitori specifici. Come riportato nel Capitolo 1, non solo sono noti diversi inibitori delle Cdk, ma è anche stata determinata la loro selettiva capacità inibitoria nei confronti dei diversi componenti di questa famiglia di proteine. E' evidente che chinasi diverse inibite da una stessa molecola con IC<sub>50</sub> simili mostreranno omologia di struttura e funzione, almeno nel dominio legante l'inibitore. Pertanto, l'attività *Cdc2-like* in *Sparus aurata* è stata determinata in presenza di alcuni inibitori specifici per le Cdk, quali

roscovitina e olomoucina. Le due principali domande alle quali questa serie di esperimenti intendeva dare una risposta erano le seguenti: 1. se l'attività Cdc2-*like* esiste in *Sparus aurata*, allora questa deve essere inibita dalle stesse molecole e con simili IC<sub>50</sub> rispetto a quanto misurato nelle Cdk da altri organismi; 2. una risposta simile ad inibitori diversi può fornire indicazioni su quali componenti della famiglia Cdk sono conservati nei teleostei rispetto ai mammiferi.

Sulla base di queste ipotesi sperimentali, sono stati eseguiti saggi radiochimici di attività *SpCdc2 in vitro* in presenza dei suddetti inibitori impiegati a concentrazioni diverse. In figura 4.12 sono riportate le curve dose-effetto per ogni inibitore: i valori di IC<sub>50</sub> ottenuti sono mostrati in tabella 4.2 e confrontati con quelli ottenuti per Cdk1 umana. Come ci si aspettava, l'inibitore più potente si è dimostrato essere la roscovitina con un valore di IC<sub>50</sub> pari a 2 µM. Stranamente l'olomoucina, per la quale in letteratura sono riportati valori di IC<sub>50</sub> di 7 µM (Schulze-Gahmen *et al.*, 1995), in *Sparus aurata* ha mostrato una minore efficacia (IC<sub>50</sub> = 30 µM). E' necessario puntualizzare che le misurazioni effettuate riguardano una IC<sub>50</sub> inibitoria "apparente", poiché eseguita non utilizzando un'attività enzimatica purificata all'omogeneità, né una chinasi clonata ed espressa e ricostituita *in vitro* (batteri, cellule d'insetto o di mammiferi), bensì la/le Cdk presenti negli estratti grezzi di uova di *Sparus aurata*. Ciò potrebbe in parte giustificare la minore efficacia mostrata dalla roscovitina e dall'olomoucina nei confronti della Cdk di *Sparus aurata* rispetto a quella umana. In conclusione, se da una

parte i dati mostrati in figura 4.12 e nella tabella 4.2 sono in accordo con l'esistenza di omologhi *Cdc2-like* in *Sparus aurata*, in quanto l'attività chinasi è inibita da alcuni degli inibitori più efficaci nel bloccare l'attività delle altre Cdk, dall'altro suggeriscono interessanti differenze strutturali e/o di specificità di substrato. Inoltre, inibitori di chinasi cellulari meno specifici, quali la quercetina, che mostra scarsa attività verso le Cdk umane (Casagrande e Darbon, 2001), è, al contrario, molto efficiente nell'inibire le *SpCdk* (dati non mostrati). Sebbene in maniera indiretta, questi dati suggeriscono interessanti proprietà catalitiche della proteina da *Sparus aurata*, che meritano un ulteriore approfondimento quando sarà disponibile la proteina parzialmente purificata e se ne conoscerà la sequenza.



**Figura 4.12** - Curve dose-effetto dell'attività Cdk-like in *Sparus aurata* in presenza degli inibitori indicati. I saggi enzimatici sono stati eseguiti utilizzando estratti totali

di uova non fecondate (50 µg). Media di due esperimenti eseguiti in triplicato con SD < 5%.

**Tabella 4.2** - IC<sub>50</sub> dei due inibitori per *SpCdc2* da estratti proteici di uova non fecondate rispetto a quelle da cellule umane.

Inibitori	IC <sub>50</sub> (µM)	
	<i>Sparus aurata</i>	<i>Homo sapiens</i>
Roscovitina	2	0.45 <sup>a</sup>
Olomoucina	30	7 <sup>b</sup>
<sup>a</sup> de Azevedo <i>et al.</i> , 1997; <sup>b</sup> Schulze-Gahmen <i>et al.</i> , 1995.		

L'effetto degli inibitori delle Cdk sull'attività chinasi di *SpCdc2* *in vitro*, ha suggerito di verificare *in vivo* la capacità di tale molecole di bloccare la progressione meiotica dopo la fecondazione. Infatti, molecole come la roscovitina, con una bassa IC<sub>50</sub> teorica, avrebbero dovuto bloccare il secondo picco di attività *SpCdc2*, corrispondente alla prima divisione dell'embrione causando un blocco dello sviluppo embrionale.

Per verificare quest'ipotesi, aliquote di uova non fecondate sono state incubate per 30 minuti in soluzioni di KCl 0.19 M contenenti concentrazioni diverse di roscovitina (in DMSO), uguali e superiori alla IC<sub>50</sub> determinata dai precedenti esperimenti *in vitro*. Al termine della pre-incubazione, la soluzione contenente l'inibitore è stata rimossa e è stata eseguita la fecondazione *in vitro*. I campioni sono stati congelati in ghiaccio secco a tempi diversi dalla fecondazione (0-3-15-30-45-60 min), successivamente lisati per misurare

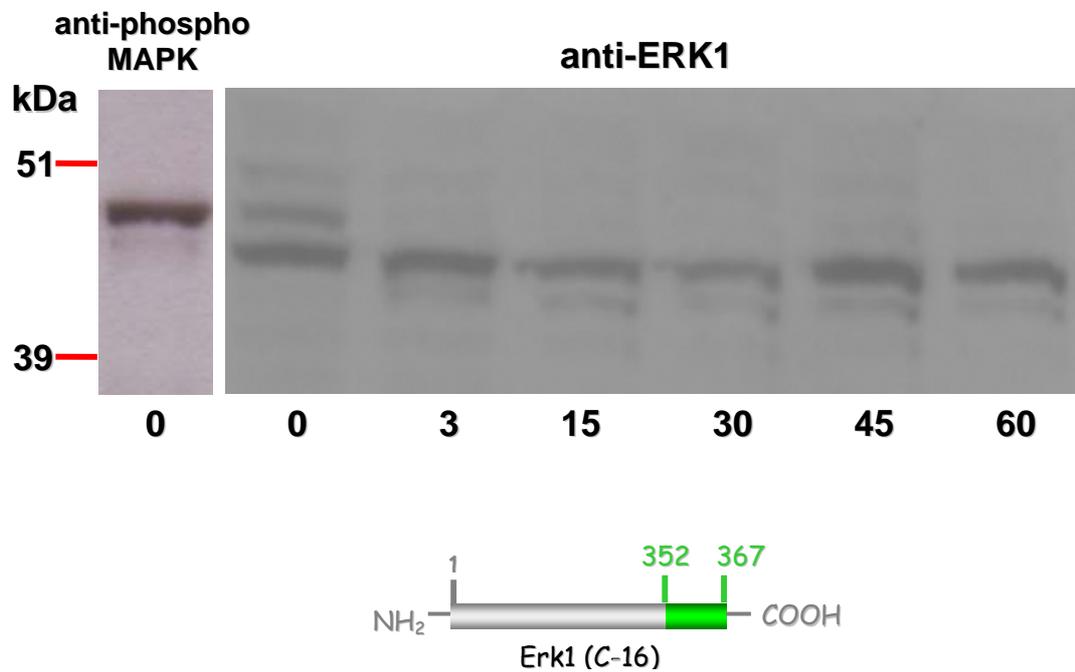
l'attività *SpCdc2*. L'esperimento non ha dato risultati indicativi a causa dell'interferenza del DMSO (dati non mostrati).

#### **4.4 - CARATTERIZZAZIONE DI MAPK IN *SPARUS AURATA***

Parallelamente allo studio delle chinasi *Cdc2-like* in *Sparus aurata*, è stata eseguita una caratterizzazione della proteina MAPK, uno dei componenti del CSF. Sia negli invertebrati che nei vertebrati, MAPK contribuisce a mantenere l'arresto in metafase e mostra un'elevata attività durante la maturazione ovocitaria, fino all'attivazione.

Nel presente lavoro, estratti di uova a tempi diversi dalla fecondazione sono stati sottoposti ad immunoblotting utilizzando come anticorpo primario un policlonale anti-ERK1, ottenuto contro un antigene corrispondente agli ultimi 16 amminoacidi della regione carbossi-terminale di MAPK umana (SC-093). Tale anticorpo ha riconosciuto in tutti i campioni una proteina corrispondente a circa 44 kDa (Fig. 4.13), un peso molecolare simile a quello dell'omologo umano. Solo nel campione di uova non fecondate si è osservata la presenza di un'ulteriore banda, che potrebbe indicare lo stato di fosforilazione della proteina. In tutti gli organismi sinora studiati, l'*upper band* di MAPK corrisponde alla forma fosforilata in Thr202/Tyr204 ed enzimaticamente attiva (Vaur *et al.*, 2004). Per essere sicuri che questo fosse verificato anche in *Sparus aurata*, il campione a tempo 0 è stato analizzato utilizzando un anticorpo monoclonale che riconosce soltanto la forma fosforilata ed attiva di MAPK (New England Biolabs, cat. N. 9101). Tale

anticorpo *cross-reagiva* con un'unica specie proteica allo stesso peso molecolare dell'*upper band* riconosciuta dall'anti-MAPK (Fig. 4.13). Di conseguenza, i risultati ottenuti consentono di affermare che in *Sparus aurata*, all'uscita dalla metafase II, l'attività MAPK decresce similmente a quanto avviene in altri vertebrati (Tatemoto *et al.*, 2001).



**Figura 4.13** - Reattività di estratti di uova di *Sparus aurata* (60 µg), vergini e a diversi minuti dalla fecondazione, all'anticorpo anti-MAPK. L'immunoblot è stato eseguito mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale prodotto contro un antigene corrispondente agli ultimi 16 amminoacidi situati all'estremità C-terminale di MAPK umana (SC-093). Per il campione a tempo 0 è stato utilizzato anche l'anticorpo monoclonale anti-fosfo-MAPK p44/42 (Thr202/Tyr204).

Negli invertebrati, come ad esempio nell'ascidia *Ciona intestinalis*, è stato dimostrato che l'attività MAPK è alta in ovociti non fecondati, aumenta fino al valore massimo dopo 5 min dalla fecondazione, diminuisce con l'estrusione del secondo globulo polare (telofase I) e non subisce ulteriori variazioni durante la seconda divisione meiotica (Russo *et al.*, 1996). Poiché le ascidie sono bloccate in M-I ed i vertebrati in M-II, è evidente che la diminuzione dell'attività MAPK alla fecondazione, osservata con modalità diverse in entrambi i casi, non è attribuibile allo stadio di metafase in quanto tale, ma piuttosto all'arresto CSF.

Per confermare i dati ottenuti mediante immunoblotting, si è pensato di eseguire uno studio dell'attività MAPK mediante saggio radiochimica *in vitro*, così come fatto per SpCdc2.

Purtroppo i numerosi tentativi effettuati hanno dato esito negativo. Probabilmente, il peptide substrato utilizzato per MAPK, progettato per l'omologo umano (Amersham Biosciences), non è riconosciuto e fosforilato dalla chinasi da *Sparus aurata*. Ciò rappresenta un dato apparentemente poco spiegabile in quanto lo stesso substrato è efficientemente fosforilato da MAPK da ascidia (Russo *et al.*, 1996) e da *Xenopus* (Carotenuto *et al.*, 2005). Se da un lato questo risultato negativo non ha permesso di convalidare il dato ottenuto mediante immunoblotting (Fig. 4.13), dall'altro ha contribuito ad escludere che l'attività osservata nel saggio radiochimico per SpCdc2 potesse essere attribuita a MAPK. Un tale dubbio era plausibile se si considera che la

sequenza *consensus* di fosforilazione di questi due enzimi è molto simile (Camps *et al.*, 2000).

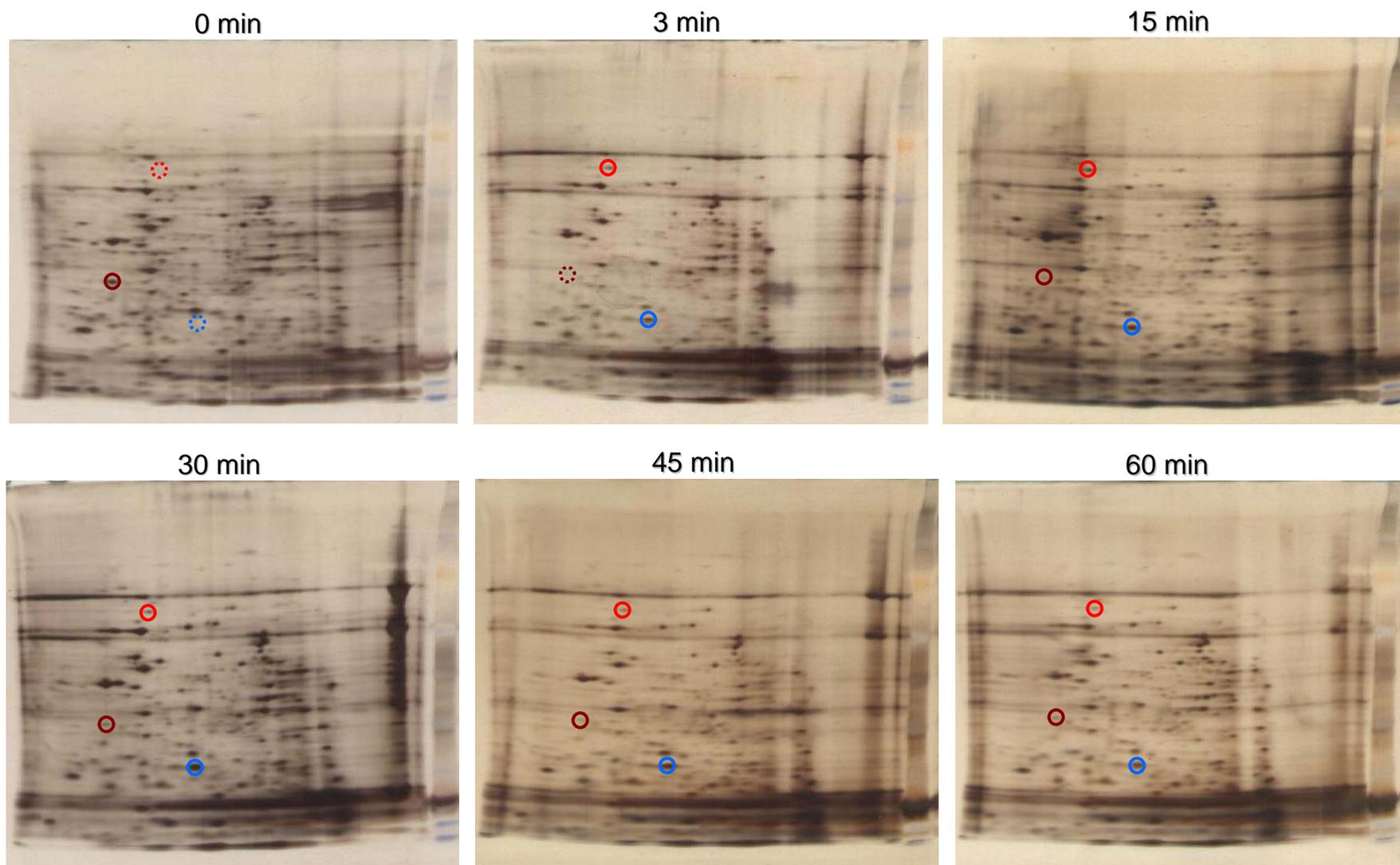
#### **4.5 - CARATTERIZZAZIONE DEL PROTEOMA IN UOVA DI *SPARUS AURATA* DURANTE IL COMPLETAMENTO MEIOTICO**

Un approccio relativamente innovativo per l'identificazione di fattori proteici nuovi coinvolti in un processo biologico è costituito dall'analisi proteomica. In letteratura sono riportati diversi lavori in cui un approccio di tipo proteomico è stato utilizzato per lo studio di ovociti di vertebrati, tra cui pesci (Rime *et al.*, 2004), anfibi (Liska *et al.*, 2004) e mammiferi (Coonrod *et al.*, 2004; Ellederova *et al.*, 2004).

Estratti proteici totali di uova di *Sparus aurata* non fecondate e a diversi tempi dalla fecondazione sono stati separati mediante elettroforesi bidimensionale, con l'ausilio di *minigel* in gradiente di acrilammide (4-12%). Dai profili elettroforetici riportati in figura 4.14 si evincono differenze significative nell'espressione di alcune proteine. Ad esempio, le bande cerchiare in rosso e in blu sono assenti nell'uovo non fecondato e presenti solo dopo la fecondazione, fino alla prima divisione mitotica, ad indicare, probabilmente, la trascrizione e traduzione di un fattore che potrebbe avere un ruolo nel prosieguo delle divisioni dell'embrione. Si può anche ipotizzare che l'espressione in M-II di questa proteina potrebbe causare la rimozione del blocco metafase, agendo da inibitore di tale meccanismo regolativo

nell'uovo non fecondato. Al contrario, la specie proteica indicata con il marrone, scompare subito dopo la fecondazione (3 min), per poi ricomparire ai tempi successivi a partire dalla telofase II - profase della I divisione mitotica. In questo caso, si potrebbe ipotizzare che tale fattore regoli positivamente il blocco metafasico in quanto la sua scomparsa (degradazione) coinciderebbe con gli eventi precoci dell'attivazione dell'uovo. La successiva ricomparsa, sebbene a livelli apparentemente ridotti, potrebbe riflettere attività diverse in queste fasi dell'embriogenesi.

L'utilizzo di minigel si è rivelato uno strumento utile, rapido ed economico per effettuare un'iniziale *screening* analitico del proteoma delle uova di *Sparus aurata*. La ripetizione degli esperimenti su gel di maggiori dimensioni, previa purificazione dei campioni, consentirà di consolidare i dati già ottenuti, migliorando la risoluzione e riducendo la possibilità di eventuali contaminazioni. Il successivo ricorso alla spettrometria di massa fornirà indicazioni utili ai fini di un'identificazione di fattori proteici nuovi o già conosciuti espressi in diversi stadi di sviluppo delle uova embrionate di *Sparus aurata*.



**Fig. 4.14** - Elettroforesi bidimensionale di estratti proteici di uova di *Sparus aurata* a tempi diversi dalla fecondazione (50  $\mu$ g).

## 5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il presente progetto di Dottorato ha avuto come obiettivo primario quello di individuare e caratterizzare un possibile, nuovo modello sperimentale per lo studio del completamento meiotico e dei primi stadi di sviluppo nei pesci. Tale fine, parzialmente ambizioso considerato i soli tre anni di lavoro, ha prodotto interessanti risultati preliminari e lascia presagire, per l'imminente futuro, nuove conoscenze nel settore dello studio comparato della meiosi e della fecondazione nei vertebrati.

La scelta dei pesci come modello di studio trova un razionale scientifico nell'apparente confusione e discordanza tra i pochi dati presenti in Letteratura. E' nostra opinione che, proprio la mancanza di un adeguato modello sperimentale, ha limitato lo studio della regolazione meiotica negli ovociti e uova di pesci. Il più autorevole studioso del settore, il Dr. Yamashita, nella prima metà degli anni '90 ha prodotto una serie di lavori in *Carassius auratus* (il comune pesciolino rosso) che lo hanno portato a proporre un modello regolativo della maturazione ed arresto meiotico nei pesci diverso da quanto si verifica negli anfibi e nei mammiferi. La sostanziale novità dei pesci è l'assenza del pre-MPF, in cui Cdk1/Cdc2 è legata alla ciclina B ma è inattiva a causa delle fosforilazioni inibitorie in Thr14 e Tyr15. Ciò implica, come corollario, l'assenza di un partner importante quale la fosfatasi Cdc25 che defosforila ed attiva Cdk1/Cdc2 e viene, a sua volta, da questa attivata secondo un meccanismo di *feedback* positivo. A complicare la storia è intervenuto un lavoro recente nel teleosteo *Anabas testudineus*, che ha posto in

discussione tale modello, indicando la presenza di un pre-MPF anche nei pesci e, quindi, di un'attività *Cdc25-like* (Basu *et al.*, 2004). Il lavoro di Basu *et al.* (2004), propone, dal punto di vista comparativo, un meccanismo maggiormente in accordo con il ruolo funzionale della fosforilazione inibitoria di Cdk1/Cdc2 e Cdc25C la cui funzione, ricordiamo, è conservata dai lieviti all'uomo. L'introduzione di modelli sperimentali nuovi, quale quello proposto in questo progetto, potrà contribuire a chiarire la regolazione meiotica nei pesci. Sebbene i dati in nostro possesso non consentono direttamente di commentare lo stato di fosforilazione di Cdc2 in *Sparus aurata*, né la presenza di un'attività *Cdc25C-like*, l'insieme dei risultati ottenuti sembrerebbero maggiormente in accordo con il modello Yamashita. Infatti, utilizzando una batteria di anticorpi diversi, non si è osservato un rilevante *shift* delle bande corrispondenti alle forme potenzialmente fosforilate di *SpCdc2* tale da giustificare la perdita di attività all'uscita dalla metafase. Le *upper bands* osservate, sono maggiormente in accordo con la fosforilazione attivante in Thr161/167, prevista anche dal modello di Yamashita. Tuttavia, solo l'utilizzo di anticorpi capaci di riconoscere le forme fosforilate e non-fosforilate di Cdc25C potranno escludere un ruolo primario di tale fosfatasi nell'attivazione meiotica di *Sparus aurata*. La ridondanza di proteine *Cdk-like* riportata nel presente lavoro, a nostra conoscenza, non era mai stata osservata nei pesci e potrebbe rappresentare un meccanismo alternativo all'attivazione per defosforilazione in Thr14 e Tyr15 di *SpCdc2*. In altri termini, sebbene al momento l'ipotesi è parzialmente speculativa e richiede una robusta conferma

sperimentale, le diverse isoforme di *SpCdc2* identificate potrebbero essere attivate in momenti diversi della maturazione meiotica e dell'attivazione dell'ovocita, mediante legami specifici con altri fattori attivanti a vita breve (esempio cicline), piuttosto che attraverso meccanismi di fosforilazione/defosforilazione. Si è cercato di investigare quest'aspetto mediante l'analisi dell'attività chinasi *SpCdc2* dopo precipitazione con *sepharose-p13Suc1* o immunoprecipitazione con anticorpi diversi. In entrambi i casi, i risultati non sono stati quelli attesi per motivi opposti: *p13Suc1* non si è mostrata sufficientemente specifica, in quanto ha legato tutte le isoforme di *SpCdc2*; al contrario, gli anticorpi utilizzati non si sono rivelati immunoprecipitanti sulle Cdk da *Sparus aurata* rispetto agli omologhi umani. L'approccio alternativo al problema riguarderà l'analisi dell'attività chinasi associata ai complessi proteici contenenti *SpCdc2* dopo purificazione su micro-scala degli stessi complessi mediante colonna cromatografia ad esclusione molecolare (Superose-12, Amersham Biosciences), applicata ad un apparecchio SMART (Amersham Biosciences). Ulteriori informazioni potranno derivare dal clonaggio del cDNA per *SpCdc2* e dall'analisi della struttura primaria per analizzare la conservatività sia dei residui fosforilabili che dei domini leganti le cicline. Tale fase di lavoro è già in corso: è stato isolato l'RNA totale da gonade di *Sparus aurata* al fine di sintetizzare il cDNA corrispondente e sono stati progettati e sintetizzati gli oligonucleotidi degenerati per l'amplificazione via PCR del cDNA. È stato ottenuto un frammento della grandezza attesa (circa 600 bp) sulla base dell'omologia di

sequenza con altri cDNA di Cdc2, il cui sub-clonaggio in un apposito vettore e sequenziamento sono in corso d'opera.

Un'altra interessante osservazione emersa dal presente lavoro, riguarda il comportamento di *SpCdc2* nei confronti di inibitori classici e validati delle Cdk da mammifero. La bassa  $IC_{50}$  per la quercetina, un inibitore non-specifico sia di tirosine-chinasi che di serine/treonine-chinasi suggerisce importanti differenze in termini di proprietà enzimatiche e strutturali della proteina da *Sparus aurata*. Sarà interessante ripetere i saggi d'inibizione enzimatica sulle proteine parzialmente purificate, eluite da colonna Superose-12 sopra citata, per escludere possibili interferenze dovute all'utilizzo di estratti totali. L'utilizzo degli inibitori servirà anche per meglio caratterizzare, dal punto di vista enzimatico, le diverse isoforme di *SpCdc2*. Infine, sarà interessante intraprendere uno studio biochimico-comparativo, tra le attività MPF isolate da invertebrati (ascidia *Ciona intestinalis*), bassi vertebrati (*Sparus aurata* e *Xenopus laevis*) e mammiferi (*Bos taurus* o *Mus musculus*) sulla base della specificità di substrato e risposta a inibitori specifici.

La seconda parte del presente lavoro di tesi ha riguardato lo studio del proteoma delle uova di *Sparus aurata* non fecondate e a tempi diversi dalla fecondazione. Dal punto di vista strategico, si è deciso di operare un primo *screening* sulle possibili differenze nell'espressione proteica dei campioni raccolti, utilizzando una strumentazione relativamente innovativa fornita dalla ditta Invitrogen. Tale apparecchiatura consente in maniera rapida, agevole e con costi limitati di esaminare un elevato numero di campioni per individuarne

differenze significative nell'espressione di fattori proteici. Come descritto nel capitolo precedente, tale obiettivo è stato conseguito individuando *spots* che compaiono o scompaiono in relazione al *timing* della fecondazione di uova di *Sparus aurata*. Certamente, i gel bidimensionali ottenuti, in quanto analitici, non sono adatti al prosieguo dell'analisi proteomica, che consiste nell'estrarre le proteine d'interesse dal gel, digerirle con tripsina ed analizzarle con metodiche di spettrometria di massa per l'identificazione finale. Questa seconda parte del lavoro, appena iniziata, richiede l'accesso ad un centro di proteomica avanzato quale quello attivo presso l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino. Purtroppo, non disponendo *Sparus aurata* di un genoma noto e sequenziato, l'identificazione degli *spots* d'interesse isolati dai gel bidimensionali avverrà analizzandone l'omologia con proteine conservate presenti in banca dati (ad esempio Swiss-Prot) e per omologia rispetto alle sequenze geniche annotate per i genomi di altri due teleostei: *Danio rerio* e *Fugu rubripes*.

In conclusione, il presente progetto ha portato alla definizione di un nuovo possibile modello sperimentale per lo studio della regolazione meiotica nei pesci. Quando i dati qui riportati saranno pubblicati, la comunità scientifica avrà a disposizione informazioni metodologiche e strumenti analitici (intesi come reagenti specifici) che sicuramente accelereranno questo tipo di studi. Infatti, è necessario ricordare che l'intero primo anno di lavoro ha riguardato la non facile messa a punto del modello sperimentale e dei protocolli, ora validati, che diverranno un importante patrimonio culturale per

coloro che si inseriranno in questo filone di ricerca. Prevediamo che, superata questa fase iniziale, il progetto procederà speditamente nel senso della conferma dei dati qui riportati e nel chiarire gli importanti aspetti evolutivi e comparativi della regolazione biochimica e funzionale della meiosi nei pesci.

## BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. (2001). Le specie allevate. In: Cataudella S. e Bronzi P. (Eds.). *Acquacoltura responsabile*. Unimar-Uniprom, Roma, p. 556.
- Abrieu A., Brassac T., Galas S., Fisher D., Labbe J.C., Doree M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G<sub>2</sub>/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* 111: 1751-1757.
- Alberts B. (2004). *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli (Ed.)
- Albrieux M., Sardet C., Villaz M. (1997). The two intracellular Ca<sup>2+</sup> release channels, ryanodine receptor and inositol 1,4,5- trisphosphate receptor, play different roles during fertilization in ascidians. *Dev. Biol.* 189: 174-185.
- Bain J., McLauchlan H., Elliott M., Cohen P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371: 199-204.
- Basu D., Navneet A.K., Dasgupta S., Bhattacharya S. (2004). Cdc2-cyclin B-induced G<sub>2</sub> to M transition in Perch oocyte is dependent on Cdc25. *Biol. Reprod.* 71: 894-900.
- Bayaa M., Booth R.A., Sheng Y., Liu X.J. (2000). The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12607-12612.
- Bhatt R.R., Ferrell Jr. J.E. (1999). The protein kinase p90Rsk as an essential mediator of cytosstatic factor activity. *Science* 286: 1362-1365.
- Bhatt R.R., Ferrell Jr. J.E. (2000). Cloning and characterization of *Xenopus* Rsk2, the predominant p90 Rsk isozyme in oocytes and eggs. *J. Biol. Chem.* 275: 32983-32990.
- Bootman M., Collins T.J., Peppiatt L.S., Prothero L.S., Mackenzie L., De Smet P., Travers M., Tovey S.C., Seo J.T., Berridge M.J., Ciccolini F., Lipp P. (2001). Calcium signalling-an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12: 3-10.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brizuela L., Draetta G., Beach D. (1987). p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J.* 6: 3507-3514.

- Byskov A.G., Andersen C.Y., Nordholm L., Thogersen H., Xia G., Wassmann O., Andersen J.V., Guddal E., Roed T. (1995). Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 374: 559-562.
- Camps M., Nichols A., Arkinstall S. (2000). Dual specificity phosphatase: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 14: 6-16.
- Carotenuto R., Vaccaro M.C., De Marco N., Wilding M., Biffo S., Marchisio P.C., Capriglione T., Russo G.L., Campanella C. (2005). In *Xenopus laevis* oogenesis p27<sup>BBP</sup>/eIF6 is phosphorylated and associated with the cytoskeleton following meiosis resumption. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1641-1652.
- Carroll D.J., Albay D.T., Hoang K.M., O'Neill F.J., Kumano H., Foltz K.R. (2000). The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev. Biol.* 217: 179-191.
- Carroll D.J., Albay D.T., Terasaki M., Jaffe L.A., Foltz K.R. (1999). Identification of PLC $\gamma$ -dependent and independent events during fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* 206: 232-257.
- Casagrande F., Darbon J.M. (2001). Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1205-1215.
- Casnellie J.E. (1991). Assay of protein kinases using peptides with basic residues for phosphocellulose binding. *Methods Enzymol.* 200: 115-120.
- Chen E., Ekker S.C. (2004). Zebrafish as a genomics research model. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5: 409-413.
- Colledge W.H., Carlton M.B.L., Udy G.B., Evans M.J. (1994). Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370: 65-68.
- Coonrod S.A., Calvert M.E., Reddi P.P., Kasper E.N., Digilio L.C., Herr J.C. (2004). Oocyte proteomics: localisation of mouse zona pellucida protein 3 to the plasma membrane of ovulated mouse eggs. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 69-78.
- Cox L.J., Larman M.G., Saunders C.M., Hashimoto K., Swann K., Lai F.A. (2002). Sperm phospholipase C $\zeta$  from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 124: 611-623.
- Coward K., Parrington J. (2003). New insights into the mechanism of egg activation in fish. *Aquat. Living Resour.* 16: 395-398.

- Crane R., Gadea B., Littlepage L., Wu H., Ruderman J.V. (2003). Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol. Cell* 96: 215-229.
- Crews C.M., Alessandrini A., Erikson R.L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480.
- Dai Y., Grant S. (2003). Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 362-370.
- Dale B. (1987). Mechanism of fertilization. *Nature* 325: 762-763.
- Darnell J.E., Lodish H. (2002). *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli (Ed.)
- Davies T.G., Pratt D.J., Endicott J.A., Johnson L.N., Noble M.E.M. (2002). Structured-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 93: 125-133.
- De azevedo W.F., Leclerc S., Meijer L., Havlicek L., Strnad M., Kim S.H. (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 243: 518-526.
- Della Ragione F., Russo G.L., Oliva A., Mercurio C., Mastropietro S., Della Pietra V., Zappia V. (1996). Biochemical characterization of p16INK4- and p18-containing complexes in human cell lines. *J. Biol. Chem.* 271: 15942-15949.
- Dong J.-B., Tang T.-S., Sun F.-Z. (2000). *Xenopus* and chicken sperm contain a cytosolic soluble protein factor, which can trigger calcium oscillations in mouse eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 947-951.
- Donzelli M., Draetta G.F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports* 4: 671-677.
- Doree M., Peaucellier G., Picard A. (1983). Activity of the maturation-promoting factor and the extent of protein phosphorylation oscillate simultaneously during meiotic maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.* 99: 489-501.
- Draetta G., Brizuela L., Potashkin J., Beach D. (1987). Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *su1+*. *Cell* 50: 319-325.
- Draetta G., Piwnicka-Worms H., Morrison D., Druker B., Roberts T., Beach D. (1988). Human *cdc2* protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature* 336: 738-744.
- Duckworth B.C., Weaver J.S., Ruderman J.V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of *cdc25* by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16794-16799.

- Dumont J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis*. I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-179.
- Dunphy W.G, Kumagai A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 67: 189-196.
- Dyson N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12: 2245-2262.
- Elleredova Z., Halada P., Man P., Kubelka M., Motlik J., Kovarova H. (2004). Protein patterns of pig oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 71: 1533-1539.
- Erikson E., Maller J.L. (1989). In vivo phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during *Xenopus* oocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 264: 13711-13717.
- Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D., Hunt T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396.
- Ezhevsky S.A., Nagahara H., Vocero-Akbani A.M., Gius D.R., Wei M.C., Dowdy S.F. (1997). Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10699-10704.
- Fang F., Newport J.W. (1991). Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* 66: 731-742.
- Featherstone C., Russell P. (1991). Fission yeast p107<sup>wee1</sup> mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 349: 808-811.
- Fellous A., Kubelka M., Thibier C., Taieb F., Haccard O., Jesus C. (1994). Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 651-659.
- Ferrell Jr. J.E., Wu M., Gerhart J.C., Martin G.S. (1991). Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell Biol.* 11: 1965-1971.
- Fesquet D., Labbe J.C., Derancourt J., Capony J.P., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Doree M., Cavadore J.C. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* 12: 3111-3121.

- Finidori-Lepicard J., Schorderet-Slatkine S., Hanoune J., Baulieu E.E. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 292: 255-257.
- Flemming W. (1965). Historical paper. Contribution to the knowledge of the cell and its vital processes. *J. Cell Biol.* 25: 1-69.
- Frodin M., Gammeltoft S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell Endocrinol.* 151: 65-77.
- Furuno N., Ogawa Y., Iwashita J., Nakajo N., Sagata N. (1997). Meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes is independent of cdk2 kinase. *EMBO J.* 16: 3860-3865.
- Gabrielli B.G., Lee M.S., Walker D.H., Piwnica-Worms H., Maller J.L. (1992a). Cdc25 regulates the phosphorylation and activity of the *Xenopus* cdk2 protein kinase complex. *J. Biol. Chem.* 267: 18040-18046.
- Gabrielli B.G., Roy L.M., Gautier J., Philippe M., Maller J.L. (1992b). A cdc2-related kinase oscillates in the cell cycle independently of cyclins G2/M and cdc2. *J. Biol. Chem.* 267: 1969-1975.
- Gabrielli B.G., Roy L.M., Maller J.L. (1993). Requirement for Cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* 259: 1766-1769.
- Gautier J., Minshull J., Lohka M., Glotzer M., Hunt T., Maller J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60: 487-494.
- Gautier J., Norbury C., Lohka M., Nurse P., Maller J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. *Cell* 54: 433-439.
- Gerhart J., Wu M., Kirschner M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell. Biol.* 98: 1247-1255.
- Gotoh Y., Moriyama K., Matsuda S., Okumura E., Kishimoto T., Kawasaki H., Suzuki K., Yahara I., Sakai H., Nishida E. (1991). *Xenopus* M phase MAP kinase: Isolation of its cDNA and activation by MPF. *EMBO J.* 10: 2661-2668.
- Gotoh Y., Nishida E. (1995). Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 486-492.
- Gross S.D., Lewellyn A.L., Maller J.L. (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G<sub>2</sub>/M transition in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 276: 46099-46103.
- Haccard O., Sarcevic B., Lewellyn A., Hartley R., Roy L., Izumi T., Erikson E.,

- Maller J.L. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 262: 1262-1265.
- Hayles J., Beach D., Durkacz B., Nurse P. (1986). The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol. Gen. Genet.* 202: 291-293.
- Hardcastle I.R., Golding B.T., Griffin R.J. (2002). Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 325-348.
- Hartley R.S., Lewellyn A.L., Maller J.L. (1994). MAP kinase is activated during mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 163: 521-524.
- Hartwell L.H. Cell division from a genetic perspective. (1978). *J. Cell. Biol.* 77: 627-637.
- Hinchcliffe E.H., Sluder G. (2001). "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* 15: 1167-1181.
- Hirai T., Yamashita M., Yoshikuni M., Tokumoto T., Kajiura H., Sakai N., Nagahama Y. (1992). Isolation and characterization of goldfish *cdk2*, a cognate variant of the cell cycle regulator *cdc2*. *Dev. Biol.* 152: 113-120.
- Hochstrasser M. (1995). Ubiquitin proteasomes and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 215-223.
- Hodgman R., Tay J., Mendez R., Richter J.D. (2001). CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAK1/Eg2 in maturing mouse oocytes *Development* 128: 2815-2822.
- Ihara J., Yoshida N., Tanaka T., Mita K., Yamashita M. (1998). Either cyclin B1 or B2 is necessary and sufficient for inducing germinal vesicle breakdown during frog (*Rana japonica*) oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 50:499-509.
- Iwasaki H., Chiba K., Uchiyama T., Yoshikawa F., Suzuki F., Ikeda M., Furuichi T., Mikoshiba K. (2001). 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.
- Jang Y.J., Ma S., Terada Y., Erikson R.L. (2002). Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J. Biol. Chem.* 277: 44115-44120.
- Jessus C., Ozon R. (2004). How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol. Cell* 96: 187-192.

- Jessus C., Rime H., Haccard O., Van Lint J., Goris J., Merlevede W., Ozon R. (1991). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte: Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development* 111: 813-820.
- Johnson J., Bierle B.M., Gallicano G.I., Capco D.G. (1998). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin: Regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. *Dev. Biol.* 201: 161-177.
- Jones K.T., Matsumo M., Parrington J., Katan M., Swann K. (2000). Different Ca<sup>2+</sup> releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenates and mouse eggs. *Biochem. J.* 346: 743-749.
- Kanatani H. (1969). Induction of spawning and oocyte maturation by L-methyladanine in starfish. *Exp. Cell Res.* 57: 333-337.
- Karaiskou A., Duprè A., Haccard O., Jessus C. (2001). From progesterone to active Cdc2 in *Xenopus* oocytes : a puzzling signalling pathway. *Biol. Cell* 93: 35-46.
- Katagiri C.H., Ohsumi K. (1994). Remodeling of sperm chromatin induced in egg extracts of amphibians. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 209-216.
- Kelm O., Wind M., Lehmann W.D., Nigg E.A. (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J. Biol. Chem.* 277: 25247-25256.
- Khazanovich N., Bateman K., Chernaia M., Michalak M., James M. (1996). Crystal structure of the yeast cell-cycle control protein, p13suc1, in a strand-exchanged dimer. *Structure* 4: 299-309.
- Kline D. (1988). Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: Injection of a calcium buffer blocks ion channels opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev. Biol.* 126: 346-361.
- Kline D., Kline J.T. (1992). Repetitive calcium transient and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149: 80-89.
- Kline J.T., Kline D. (1994). Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Evidence for inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biol. Reprod.* 50: 193-203.
- Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *TRENDS Pharmacol. Sci.* 23: 417-425.

- Kobayashi H., Minshull J., Ford C., Golsteyn R., Poon P., Hunt T. (1991). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 114: 755-765.
- Kondo T., Kotani T., Yamashita M. (2001). Dispersion of cyclin B mRNA aggregation is coupled with translational activation of the mRNA during zebrafish oocyte maturation. *Dev. Biol.* 229: 421-31
- Kondo T., Yanagawa T., Yoshida N., Yamashita M. (1997). Introduction of cyclin B induces activation of the maturation-promoting factor and breakdown of germinal vesicle in growing Zebrafish oocytes unresponsive to the maturation-inducing hormone. *Dev. Biol.* 190: 142-152.
- Kosako H., Gotoh Y., Matsuda S., Ishikawa M., Nishida E. (1992). *Xenopus* MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.* 11: 2903-2908.
- Kosako H., Gotoh Y., Nishida E. (1994a). Regulation and function of the MAP kinase cascade in *Xenopus* oocytes *J. Cell Sci. Suppl.* 18: 115-119.
- Kosako H., Gotoh Y., Nishida E. (1994b). Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J. Biol. Chem.* 269: 28354-28358.
- Kraft C., Vodermaier H.C., Maurer-Stroh S., Eisenhaber F., Peters J.M. (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol. Cell* 18: 543-553.
- Leckie C., Empsom R., Becchetti A., Thomas J., Galione A., Whitaker M. (2003). The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchins. *J. Biol. Chem.* 278: 12247-12254.
- Lee M., Nurse P. Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells. (1988). *Trends Genet.* 4: 287-290.
- Lees E. (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 773-780.
- Lew D.J., Kornbluth S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 795-804.
- Li S.-T., Huang X.-Y., Sun F.-Z. (2001). Flowering plant sperm contains a cytosolic soluble protein factor, which can trigger calcium oscillations in mouse eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287: 56-59.
- Liska A.J., Popov A.V., Sunyaev S., Coughlin P., Habermann B., Shevchenko A., Bork P., Karsenti E., Shevchenko A. (2004). Homology-based functional

- proteomics by mass spectrometry: application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome. *Proteomics* 4: 2707-2721.
- Ljungman M., Paulsen M.T. (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and trigger nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol. Pharmacol.* 60: 785-789.
- Lohka M.J., Hayes M.K., Maller J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3009-3013.
- Lutz L.B., Cole L.M., Gupta M.K., Kwist K.W., Auchus R.J., Hammes S.R. (2001). Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13728-13733.
- Maller J.L., Krebs E.G. (1977). Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252: 1712-1718.
- Marko D., Schatzle S., Friedel A., Genzlinger A., Zankl H., Meijer L., Eisenbrand G. (2001). Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumor cells. *Br. J. Cancer* 84: 283-289.
- Masui Y. (2000). The elusive cytostatic factor in the animal egg. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 228-232.
- Masui Y., Markert C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 17: 129-145.
- Mendez R., Hake L.E., Andresson T., Littlepage L.E., Ruderman J.V., Richter J.D. (2000). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 404: 302-307.
- Meraldi P., Lukas J., Fry A.M., Bartek J., Nigg E.A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1: 88-93.
- Miller M.A., Nguyen V.Q., Lee M.H., Kosinski M., Schedl T., Caprioli R.M., Greenstein D. (2001). A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* 291: 2144-2147.

- Miyazaki S., Shirakawa H., Nakada K., Honda Y. (1993). Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channel in  $\text{Ca}^{2+}$  waves and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.* 158: 62-78.
- Moore G.D., Ayabe T., Kopf G.S., Schultz R.M. (1996). Temporal patterns of gene expression of G1-S cyclins and cdks during the first and second mitotic cell cycles in mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 264-275.
- 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: 86-90.
- Mulner O., Belle R., Ozon R. (1983). cAMP-dependent protein kinase regulates in ovo cAMP level of the *Xenopus* oocytes: evidence for an intracellular feedback mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 31: 151-160.
- Naito K., Hawkins C., Yamashita M., Nagahama Y., Aoki F., Kohmoto K., Toyoda Y., Moor R.M. (1995). Association of p34cdc2 and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Dev. Biol.* 168: 627-634.
- Neant I., Dufresne L., Morasse J., Gicquaud C., Guerrier P., Dube F. (1994). The release from metaphase arrest in blue mussel oocytes. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 513-523.
- Nomoto S., Haruki N., Takahashi T., Masuda A., Koshikawa T., Takahashi T., Fujii Y., Osada H., Takahashi T. (1999). *Oncogene* 18: 7180-7183.
- Nurse P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-508.
- Okamoto K., Nakajo N., Sagata N. (2002). The existence of two distinct Wee1 isoforms in *Xenopus*: implications for the developmental regulation of the cell cycle. *EMBO J.* 21: 2472-2484.
- Palmer A., Gavin A.C., Nebreda A.R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 17: 5037-5047.
- Parge H.E., Arvai A.S., Murtari D.J., Reed S.I., Tainer J.A. (1993). Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control. *Science* 262: 387-395.
- Paris S., LeGuellec R., Couturier A., LeGuellec A., Omilli, F., Camonis, J., MacNeill S., Philippe M. (1991). Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA

- coding for a protein highly homologous to cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 1039-1043.
- Parrington J. (2001). Does a soluble sperm factor trigger calcium release in the egg at fertilization? *J. Androl.* 22: 1-11.
- Parrington J., Jones M.L., Tunwell R., Devader C., Katan M., Swann K. (2002). Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: Potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs. *Reproduction* 123: 31-39.
- Patra D., Dunphy W.G. (1996). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* 10: 1503-1515.
- Peaucellier G., Doree M., Picard A. (1984). Rise and fall of protein phosphorylation during meiotic maturation in oocytes of *Sabellaria alveolata* (polychaete annelid). (1984). *Dev. Biol.* 106: 267-274.
- Peter M., Labbe J.C., Doree M., Mandart E. (2002). A new role for Mos in *Xenopus* oocyte maturation: Targeting Myt1 independently of MAPK. *Development* 129: 2129-2139.
- Peters J.M. (2002). The Anaphase-Promoting Complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9: 931-943.
- Petrino T.R., Lin Y.W., Netherton J.C., Powell D.H., Wallace R.A. (1993). Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* V.: purification, characterization, and metabolism of 17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one by intact follicles and its role in oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92: 1-15.
- Pomerening J.R., Sontag E.D., Ferrell J.E. (2003). Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat. Cell Biol.* Advance Online Publication.
- Poon R.Y.C., Yamashita K., Adamczewski J.P., Hunt T., Shuttleworth J. (1993). The cdc2-related protein p40(mo15) is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33(cdk2) and p34(cdc2). *EMBO J.* 12: 3123-3132.
- Posada J., Cooper J.A. (1992). Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* 255: 212-215.
- Rechsteiner M., Rogers S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21: 267-271.
- Reynhout J.K., Taddei C., Smith L.D., LaMarca M.J. (1975). Response of large oocytes of *Xenopus laevis* to progesterone in vitro in relation to oocyte size and time after previous HCG-induced ovulation. *Dev. Biol.* 44: 375-379.

- Rice A., Parrington J., Jones K.T., Swann K. (2000). Mammalian sperm contain a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive phospholipase C activity that can generate InsP3 from PIP2 associated with intracellular organelles. *Dev. Biol.* 228: 125-135.
- Richter J.D. (2000). Influence of polyadenylation-induced translation on metazoan development and neuronal synaptic function. In: Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M. (Eds.). *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 785-806.
- Rime H., Guitton N., Pineau C., Bonnet E., Bobe J., Jalabert B. (2004). Post-ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 26-35.
- Roshak A.K., Capper E.A., Imburgia C., Fornwald J., Scott G., Marshall L.A. (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal.* 12: 405-411.
- Runft L.L., Jaffe L.A. (2000). Sperm extract injection into ascidian eggs signals  $\text{Ca}^{2+}$  release by the same pathway as fertilization. *Development* 127: 3227-3236.
- Runft L.L., Jaffe L.A., Mehlmann L.M. (2002). Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev. Biol.* 245: 237-254.
- Runft L.L., Watras J., Jaffe L.A. (1999). Calcium release at fertilization of *Xenopus* eggs requires type I  $\text{IP}_3$  receptors, but not SH2 domain-mediated activation of  $\text{PLC}\gamma$  or  $\text{G}_q$  mediated activation of  $\text{PLC}\beta$ . *Dev. Biol.* 214: 399-411.
- 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.
- Russo G.L., Tosto M., Mupo A., Castellano I., Cuomo A., Tosti E. (2004). Biochemical and functional characterization of protein kinase CK2 in ascidian *Ciona intestinalis* oocytes at fertilization. Cloning and sequence analysis of cDNA for alpha and beta subunits. *J. Biol. Chem.* 279: 33012-33023.
- Russo G.L., Vandenberg M.T., Yu I.J., Bae Y.S., Franza B.R. Jr., Marshak D.R. (1992). Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 267: 20317-20325.
- Sadler S.E., Maller J.L. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 256: 6368-6373.

- Sadler S.E., Maller J.L. (1983). The development of competence for meiotic maturation during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 98: 165-172.
- Sagata N., Oskarsson M., Copeland T., Brumbaugh J., Vande Woude G.F. (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335: 519-525.
- Sakamoto I., Takahara K., Yamashita M., Iwao Y. (1998). Changes in cyclin B during oocyte maturation and early embryonic cell cycle in the newt, *Cynops pyrrhogaster*: requirement of germinal vesicle for MPF activation. *Dev. Biol.* 195: 60-69.
- Sanchez I., Dynlacht B.D. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 311-321.
- Saroglia M. (1992). Le tecnologie di allevamento. In: *Tecniche di acquacoltura* (M. Saroglia e E. Ingle, eds) pp. 134-137. Edagricole, Bologna.
- 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 Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-3544.
- Schmitt A., Nebreda A.R. (2002a). Inhibition of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4361-4366.
- Schmitt A., Nebreda A.R. (2002b). Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J. Cell Sci.* 115: 2457-2459.
- Schuetz A.W. (1971). Induction of oocyte maturation in starfish by 1-methyladenosine. Role of the ovarian wall. *Exp. Cell Res.* 66: 5-10.
- Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H.D., Morgan D.O., Meijer L., Kim S.H. (1995). Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins* 22:378-391.
- Smiley S. (1990). A review of echinoderm oogenesis. *J. Electron Microsc. Tech.* 16: 93-114.
- Sohaskey M.L., Ferrell J.L. (1999). Distinct, constitutively active MAPK phosphatases function in *Xenopus* oocytes: implications for p42 MAPK regulation *in vivo*. *Mol. Biol. Cell* 10: 3729-3743.

- Solomon M.J., Harper J.W., Shuttleworth J. (1993). Cak, the p34(cdc2) activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40(mo15). *EMBO J.* 12: 3133-3142.
- Speaker M.G., Butcher F.R. (1977). Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature* 267: 848-850.
- Stanford J.S., Lieberman S.L., Wong V.L., Ruderman J.V. (2003). Regulation of the G2/M transition in oocytes of *Xenopus tropicalis*. *Dev. Biol.* 260: 438-448.
- Stemmann O., Zou H., Gerber S.A., Gygi S.P., Kirschner M.W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107: 715-726.
- Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., et al. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16899-16903.
- Stricker S.A. (1999). Comparative biology of calcium signalling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* 211: 157-176.
- Sugiura K., Naito K., Tojo H. (2005). Cdk2 activity is essential for the first to second meiosis transition in porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 51: 143-149.
- Swann, K., Ozil, J.P. (1994). Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian oocyte activation. *Int. Rev. Cytol.* 152: 183-222.
- Tanaka T., Yamashita M. (1995). Pre-MPF is absent in immature oocytes of fishes and amphibians except *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 37: 387-393.
- Tatemoto H., Muto N. (2001). Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocyte. *Zygote* 9: 15-23.
- Thomas P., Zhu Y., Pace M. (2002). Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67: 511-517.
- Tian J., Kim S., Heilig E., Ruderman J.V. (2000). Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14358-14362.
- Tso J., Thibier C., Mulner O., Ozon R. (1982). Microinjected progesterone reinitiates meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5552-5556.
- Tunquist B.J., Maller J.L. (2003). Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17: 683-710.

- Tunquist B.J., Schwab M.S., Chen L.G., Maller J.L. (2002). The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr. Biol.* 12: 1027-1033.
- Vaur S., Poulhe R., Maton G., Andeol Y., Jesus C. (2004). Activation of Cdc2 kinase during meiotic maturation of axolotl oocyte. *Dev. Biol.* 267: 265-278.
- Verlhac M.H., Kubiak J.Z., Weber M., Gèraud G., Colledge W.H., Evans M.J., Maro B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122: 815-822.
- Verlhac M.H., Lefebvre C., Kubiak J.Z., Umbhauer M., Rassinier P., Colledge W., Maro B. (2000). Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *EMBO J.* 19: 6065-6074.
- Vitali L., Yakisich J.S., Vita M.F., Fernandez A., Settembrini L., Siden A., Cruz M., Carminatti H., Casas O., Idoyaga Vargas V. (2002). Roscovitina inhibits ongoing DNA synthesis in human cervical cancer. *Cancer Lett.* 180: 7-12.
- Watanabe N., Broome M., Hunter T. (1995). Regulation of the human Wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* 14: 1878-1981.
- Watanabe N., Hunt T., Ikawa Y., Sagata T. (1991). Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 352: 247-248.
- Wickens M., Goodwin E.B., Kimble J., Strickland S., Hentze M.W. (2000). Translational control of developmental decisions. In: Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M. (Eds.). *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 295-370.
- Yamamoto S., Yamashita M., Iwao I. (1999). Rise of intracellular Ca<sup>2+</sup> level causes the decrease of cyclin B1 and mos in the newt eggs at fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 341-349.
- Yamano H., Gannon J., Mahbubani H., Hunt T. (2004). Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* 13: 137-147.
- Yamashita M. (1998). Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes. *Sem. Cell Dev. Biol.* 9: 569-579.

- Yamashita M., Kajiura H., Tanaka T., Onoe S., Nagahama Y. (1995). Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation. *Dev. Biol.* 168: 62-75.
- Yamashita M., Mita K., Yoshida N., Kondo T. (2000). Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species-specific aspects. *Prog. Cell Cycle Res.* 4: 115-129.
- Zhu Y., Bond J., Thomas P. (2003a). Identification, classification and partial characterization of genes in human and other vertebrates homologous to a novel fish membrane progestin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 2237-2242.
- Zhu Y., Rice C.D., Pang Y., Pace M., Thomas P. (2003b). Cloning, expression and characterization of a novel membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 2231-2236.

## RINGRAZIAMENTI

Per questo progetto di Dottorato di Ricerca desidero ringraziare:

- Il **Prof. Gaetano Ciarcia**, per avermi dato l'opportunità di svolgere questo Dottorato e di vivere un'esperienza ricca di insegnamenti.
- Il **Dott. Gian Luigi Russo**, che si è sempre dimostrato un grandissimo Maestro di scienza e di vita.
- La **Dott.ssa Giulia Guerriero**, per la disponibilità, i preziosi consigli e l'affetto dimostratomi fin dal primo giorno.
- Tutti gli **studenti e collaboratori** del laboratorio di Endocrinologia Comparata dell'Università di Napoli, in modo particolare il Dott. Salvatore Porcaro, per l'affettuosa collaborazione.
- Tutti gli **studenti e collaboratori** del BJ-Lab dell'ISA-CNR di Avellino per la grandissima disponibilità e il sostegno professionale.
- Il **Dott. Piero Benedetti**, responsabile dell'Azienda Ittica "Ca' Zuliani" di Monfalcone (GO) e il **Prof. Lorenzo Colombo** per la gentile collaborazione.
- Il **Sig. Giuseppe Gargiulo**, per l'amichevole e prezioso supporto tecnico.
- La **mia famiglia**, per avermi sostenuta e sopportata anche nei momenti più difficili.

Grazie