

Università degli Studi di Napoli “Federico II”



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione Zoologia

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo Biologia Evoluzionistica

(XXI Ciclo)

**Caratterizzazione biochimica e funzionale di
proteine chinasi che regolano il completamento
meiotico nell'ascidia *Ciona intestinalis***

TUTORE
PROF. GAETANO CIARCIA

CANDIDATA
DOTT.SSA STEFANIA BILOTTO

COORDINATRICE
PROF.SSA LAURA FUCCI

Al piccolo Antonio

*Perché...tutto ciò che vale merita di
essere atteso.*

*Perché un giorno chiederai a noi la
fiducia e l'amore che tu ora ci stai
offrendo attraverso i tuoi inestimabili
sorrisi.*

*Perché starti vicino ci fa sentire
speciali.*

Perché...semplicemente sei mio nipote.

RINGRAZIAMENTI

La presente tesi è stata svolta presso l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione CNR di Avellino la Stazione Zoologica "A. Dohrn" di Napoli e il laboratorio di Endocrinologia Comparata del dipartimento delle Scienze Biologiche sezione Zoologia dell'Università "Federico II" di Napoli.

Si ringrazia il Prof. **Gaetano Ciarcia**, tutore della tesi per avere dato fiducia a questo lavoro dal primo giorno e per la cortese disponibilità dimostrata più volte.

Un ringraziamento particolare al Dott. **Gian Luigi Russo**, (ISA-CNR, Avellino) che ha seguito il mio percorso scientifico fin dai "primi passi", grazie per aver creduto in me. Le tue qualità umane e scientifiche hanno reso piacevole lavorare al tuo fianco in questi anni.

Ringrazio ugualmente la Dott.ssa **Elisabetta Tosti** per l'ospitalità alla SZN e soprattutto per la disponibilità, l'ascolto e la positività trasmessami.

Un doveroso ringraziamento è rivolto al Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica di Napoli in particolare al Dott. **E. Biffali** e al Dott. **M. Borra** e al Servizio di Ibridazione *in situ*, in particolare alla Dott.ssa **R. Marino** e alla Dott.ssa **A. Graziano**, per i suggerimenti e il supporto tecnico in alcuni esperimenti ed inoltre un "grazie" anche al Dott. **L. Cipriani** (ISA-CNR) per il pronto intervento telematico.

Desidero inoltre ringraziare tutti gli studenti dell' "EC lab" di Napoli e tra i permanenti la Prof.ssa **Giulia Guerriero** per i consigli...sempre utili... ringrazio inoltre i permanenti del BJ lab di Avellino: grazie **Idolo Tedesco** per il tuo ottimismo, l'ascolto e l'affetto...sarà indimenticabile il tuo caffè, unico al mondo!!! **Pino Iacomino** per il buonumore, le discussioni e i consigli, **Maria Russo** per le discussioni scientifiche. Impossibile dimenticare coloro che mi hanno affiancato all'inizio del mio percorso scientifico: **Rosaria, Pia, Cristina, Tina, Cira, Nico** grazie per la condivisione di "gioie e dolori" vissuti durante la nostra vita di laboratorio...naturalmente, è altresì impossibile dimenticare chi mi ha accompagnato verso la fine di questo percorso: **Manuela, Carmela** e **Paola**: grazie a tutte per l'ottimismo costante, la comprensione e l'incoraggiamento.

Ringrazio il mio "napoletano preferito": **Francesco Silvestre**...un collega che diventa un amico; grazie per essermi stato così vicino pur essendo così lontani quando contemporaneamente abbiamo condiviso l'esperienza di stranieri in terra straniera, grazie ad **Annunziata Cuomo**, Titti mi mancheranno le nostre chiacchierate!!!

Luciano, amico da sempre; semplicemente grazie di esistere nella mia vita e di credere in me più di me...grazie per essere stato presente quando cedeva il passo, di avermi infuso ottimismo e di avere ascoltato e ascoltare i miei "discorsi dell'una" (ci vuole coraggio per non addormentarsi!), grazie per le discussioni incessanti sempre arricchenti...e per avermi offerto parte dei tuoi preziosi versi. **Prezzy, Giusy, Paola**: amiche care, grazie per l'incoraggiamento costante, grazie per l'affetto, la fiducia, l'ascolto e i continui "vai Ste"; spero che possiate leggere in queste righe tutta la mia gratitudine e il mio affetto (in più vi concedo di guardare solo le immagini!Paolè grazie pure per la password!!!); ancora, grazie a **Carmela, Elena, Mario, Antonio, Maria, Marianna, Pellegrino, Enrichetta, Davide**,

Antonella, Mauro e la “setta del tango” per i momenti piacevoli di distrazione utilissimi e graditissimi.

Un sincero ringraziamento vola oltralpe in direzione Roscoff, indirizzato al **Prof. Patrick Cormier**, che mi ha accolto calorosamente nella sua equipe durante il mio stage in Francia mostrandomi fiducia fin dai primi giorni...un sentito ringraziamento è inoltre rivolto a tutta l’equipe CCD de la Station Biologique de Roscoff: **Odile Mullner-Lorrillon, Robert Bellé, Bertrand Cosson, Julia Morales, Sandrine Boulben, Isabelle Gauffeny, Magali Le Breton, Hussam Saad.**

Nathalie Oulhen 1000 mots ne sont pas suffisantes pour te remercier. Ta présence au labo pendant mon séjour à Roscoff a été indispensable; sans ton aide constant je ne sais pas quoi j’aurais fait, en plus j’ai eu la chance de me rapprocher à toi comme une amie, mais je dirais une sœur plutôt et pourtant je te remercie pour le temps où on a parlé de eIF2 et des toutes les soucis qu’il m’a procuré et de ton 4EBP et j’attende le jour où on se reverra (quelque part dans le monde, comme tu dis) pour en rigoler ensemble...dans ma mémoire il y a beaucoup des souvenirs qui sont gravés: la brioche de la tristesse, les mails quotidiennes, les baignades, et oui tes courses que finalement, j’ai appris par cœur...avec le p abricot!

Assa Abassi merci pour ton soutien et ton amitié et ta bonne humeur, tu a été et tu es comme une sœur pour moi; **Virginie, Vlad, Rania Maria, Thomas, Guillaume, Anne, Matthieu, Océane, Pitou:** merci à vous tous pour avoir rendu si agréable et si inoubliable mon séjour en Bretagne. **Mahdi:** neuf mois comme un jour...tu as raison, mais ça a été un de plus beaux jours de ma vie, puisque j’ai eu la chance d’avoir ton amitié et le partage de nos silences qui ont été plus bavardes de millions de mots sous le ciel étoilé de Roscoff...**Xavier,** merci à toi pour tout ça que tu as fait pour moi: les ballades, les courses, le français, la télé, le fer à repasser, les blagues, la vaisselle, les films, Ste Anne, les vieilles charrues, tes souris et tes regards gentils...qui finalement j’ai compris: ils ont dit que il ne fallait pas s’empoisonner...

Ritornando in Italia...desidero ringraziare ancora la mia famiglia: in modo speciale i miei genitori, l’approdo sicuro tra mille tempeste...mio padre **Antonio** anche per il consueto «servizio navetta» durante i miei spostamenti quotidiani e mia madre **Fiorina** per l’immane sostentamento nutritivo. Mio fratello **Carmine** per le critiche, talvolta costruttive e per il soccorso informatico; la neomamma **Katja** per l’estrema gentilezza dimostrata da sempre nei miei confronti.

Un sentito “grazie” è indirizzato inoltre anche agli **Innominati** e agli **Innominabili** che in maniera non sempre evidente hanno contribuito alla formazione personale e scientifica durante questi 3 anni di tesi...anche se tra essi, qualcuno dovrà accontentarsi del semplice ringraziamento in una tesi di dottorato in luogo di una menzione speciale in un discorso da premio nobel...

Infine grazie anche a voi, potenziali lettori che vi apprestate a leggere questa tesi perchè se lo farete vuol dire che per qualche ragione avete incrociato il mio cammino arricchendolo.

GRAZIE a tutti

INDICE

RINGRAZIAMENTI.....	1
INDICE	3
ABBREVIAZIONI.....	5
RIASSUNTO	7
1 INTRODUZIONE	9
1.1 - GENERALITÀ SUL CICLO CELLULARE.....	9
1.1a - Mitosi nelle cellule eucariotiche	11
1.1b - Meiosi	17
1.2 - REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE	22
1.2 a - Punti di controllo del ciclo cellulare	26
1.3 - MPF (<i>MATURATION PROMOTING FACTOR</i>).....	29
1.3a - Regolazione dell'MPF	30
1.4 - CSF(<i>cytostatic factor</i>).....	35
1.5 - REGOLAZIONE DELLA MEIOSI.....	40
1.6 - MATURAZIONE DEGLI OVOCITI NEGLI INVERTEBRATI	45
1.7 - ATTIVAZIONE OVOCITARIA E RUOLO DEGLI IONI CALCIO (Ca ²⁺).....	46
1.8 - RUOLO DI CK2 NEL COMPLETAMENTO MEIOTICO	52
2 - SCOPO DELLA TESI.....	59
3 - MATERIALI E METODI	62
3.1 - MODELLO SPERIMENTALE: l'ascidia <i>Ciona intestinalis</i>	62
3.1a - Prelievo delle cellule germinali e fecondazione <i>in vitro</i>	66
3.2 – CAMPIONAMENTO DEGLI EMBRIONI E SAGGI DI ATTIVITÀ CHINASICA.....	67
3.2a – saggio radiochimico	68
3.3 - CLONAGGIO DEI cDNA CiCK2 α E CiCK2 β IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE.....	69
3.4 - IMMUNOBLOTTING	71

3.5 - PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PER IL SAGGIO CSF E MICROINIEZIONE.....	73
3.6- <i>REAL TIME</i> -PCR	74
3.7 - IBRIDAZIONE <i>IN SITU</i>	75
4 - RISULTATI E DISCUSSIONE.....	77
4.1 - LA <i>PATHWAY</i> DEL CSF È CONSERVATA NEL GENOMA DI <i>CIONA INTESTINALIS</i> ...	77
4.2 – CARATTERIZZAZIONE DEL CSF IN <i>CIONA INTESTINALIS</i>	86
4.3 - WORK IN PROGRESS.....	94
4.3.1 CK2 nel completamento meiotico in ovociti di <i>C. intestinalis</i>	94
4.3.2 Espressione di <i>CiCK2A</i> e <i>CiCK2B</i> in fasi specifiche dello sviluppo.....	99
5 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	103
BIBLIOGRAFIA.....	106

ABBREVIAZIONI

APC	<i><u>A</u>naphase-<u>P</u>romoting <u>C</u>omplex</i>
ATM	<i><u>A</u>taxia <u>T</u>elangiectasia <u>M</u>utated</i>
ATR	<i><u>A</u>TM and <u>R</u>ad3 <u>R</u>elated</i>
BSA	<i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumine</i>
Bub1	<i>Budding inhibited benzimidazole</i>
cADPR	<i>cyclic <u>A</u>DP-<u>R</u>ibose</i>
CAK	<i><u>C</u>yclin-dependent kinase <u>A</u>ctivating <u>K</u>inase</i>
CaMKII	<i><u>C</u>almodulin-dependent Protein <u>K</u>inase <u>I</u>I</i>
CDK	<i><u>C</u>yclin-dependent <u>k</u>inase (chinasi ciclina dipendente)</i>
CDKI	<i><u>C</u>dk <u>i</u>nhibitors</i>
Ci-Mos	<i>Mos da <u>C. intestinalis</u></i>
CK2	<i><u>C</u>asein <u>k</u>inase 2</i>
CKS	<i><u>C</u>dc28 <u>K</u>inase <u>S</u>pecific</i>
CPE	<i><u>C</u>ytoplasmic <u>P</u>olyadenylation <u>E</u>lement</i>
CSF	<i><u>C</u>ytostatic <u>F</u>actor</i>
DMSO	<i><u>D</u>imethyl <u>s</u>ulfoxide</i>
EDTA	<i><u>E</u>thylenediaminetetraacetic <u>a</u>cid</i>
GV	<i><u>G</u>erminal <u>V</u>esicle (vescicola germinale)</i>
GVBD	<i><u>G</u>erminal <u>V</u>esicle <u>B</u>reakdown (rottura della vescicola germinale)</i>
ICS	<i><u>I</u>ntracellular <u>C</u>ontrol <u>S</u>olution</i>
IP₃	<i><u>I</u>nositolo 1,4,5-triphosphate</i>
Kip	<i><u>K</u>inase <u>i</u>nhibitor <u>p</u>rotein</i>
M-I	<i><u>M</u>etafase-I</i>
M-II	<i><u>M</u>etafase-II</i>
Mad	<i><u>M</u>itotic <u>a</u>rrest <u>d</u>eficient</i>
MAPK	<i><u>M</u>itogenic <u>A</u>ctivated <u>P</u>rotein <u>K</u>inase</i>
MEK1	<i>MAPK activating kinase</i>
MOPS	<i>acido 3-(N-Morfolino)-propansulfonico</i>
MPF	<i><u>M</u>aturation-<u>P</u>romoting <u>F</u>actor</i>
NAADP	<i><u>N</u>icotinic <u>a</u>cid-<u>a</u>denine <u>d</u>inucleotide <u>p</u>hosphate</i>
p90^{Rsk}	<i>90 kDa ribosomal subunit s6 kinase</i>
P-I	<i><u>P</u>rofase I</i>
PABP	<i><u>P</u>oly(<u>A</u>) <u>B</u>inding <u>P</u>rotein</i>
PBS	<i><u>P</u>hosphate <u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i>
PKA	<i><u>P</u>rotein <u>k</u>inase <u>A</u></i>
PLC	<i><u>P</u>hospholipase <u>C</u></i>
PLCγ	<i><u>P</u>hospholipase C di tipo gamma</i>
PLCζ	<i><u>P</u>hospholipase C di tipo zeta</i>
PMSF	<i><u>P</u>henylmethylsulphonylfluoride</i>
q PCR	<i><u>P</u>CR <u>q</u>uantitativa</i>
Suc1	<i><u>S</u>uppressor of <u>C</u>dc2 -1</i>
TCA	<i><u>A</u>cido tricloraacetico</i>
xPlk1	<i><u>X</u>enopus <u>P</u>olo-like <u>k</u>inase</i>

xPlkk1 *Xenopus* Polo-like kinase kinase

RIASSUNTO

Nella maggior parte dei vertebrati, gli ovociti maturi sono bloccati nella metafase della II divisione meiotica, mentre in molti invertebrati il blocco si verifica in metafase I; in altri, invece, allo stadio di pronucleo (G1). La fecondazione induce il completamento meiotico. Il mantenimento del blocco metafasico ed il passaggio (maturazione) dalla profase agli stadi successivi è, dal punto di vista molecolare, sotto il controllo di due complessi interagenti: MPF (fattore che promuove la maturazione) e CSF (fattore citostatico). Il CSF comprende la chinasi Mos, codificata dal gene *c-mos*, un proto-oncogene cellulare. Il complesso MPF, invece, è costituito da una subunità catalitica: la chinasi Cdc2, ed una subunità regolatrice: la ciclina B. MPF e CSF interagiscono per mantenere attivo il blocco meiotico. L'MPF è stato caratterizzato sia in vertebrati che invertebrati e il suo ruolo nella maturazione e attivazione degli ovociti può considerarsi universale. Per il CSF, invece, molto è stato fatto sin dagli anni '70 in modelli meiotici di vertebrati (*Xenopus*, *Rana*, *Mus*), mentre, negli invertebrati, il ruolo e la composizione del CSF sono rimasti elusivi e in parte discordanti.

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata l'ascidia *Ciona intestinalis* come organismo modello per lo studio del completamento meiotico. L'uso del genoma di tale organismo, di recente pubblicazione, è risultato uno strumento fondamentale per ricostruire dal punto di vista filogenetico la *pathway* del CSF in *Ciona intestinalis* a partire da quella funzionale nei vertebrati (*Xenopus*). In ascidia, sembra che la via del CSF coinvolga la cascata di

fosforilazioni Mos→MEK→MAPK→p90^{Rsk}→Bub1→Cdc20 con conseguente blocco dell'attività del complesso APC/C. E' stato interessante osservare che l'omologo della chinasi Mos in *Ciona intestinalis* presenta un'ampia regione N-terminale priva di omologia significativa con altre proteine note. Ciò ha suggerito un ruolo per Mos da ascidie non unicamente limitato alla regolazione del CSF. Questa parte di lavoro *in silico* consentirà, nell'immediato futuro, di semplificare l'attività sperimentale diretta a valutare l'espressione e regolazione dei componenti del CSF nelle ascidie.

Nella seconda parte del presente lavoro, è stata sperimentalmente dimostrata l'esistenza del CSF in ascidie mediante microiniezioni di citoplasma ottenuto da ovociti di *Ciona intestinalis* (bloccati in M-I) in embrioni allo stadio di due cellule. Tale attività CSF, similmente a quanto avviene in *Xenopus*, non dipende da un'attiva e continua sintesi proteica come descritto per altre specie di invertebrati. Tuttavia, il lavoro di tesi ha messo in evidenza importanti differenze tra ascidie e vertebrati. Ad esempio, in *Ciona intestinalis*, l'attività di MAPK, un componente del CSF, non sembra rivestire lo stesso ruolo essenziale nella rimozione del blocco metafasico come da tempo descritto nei vertebrati.

I risultati ottenuti e in parte pubblicati nell'articolo allegato alla presente tesi, suggeriscono che la regolazione meiotica in *Ciona intestinalis* si attua attraverso dei meccanismi molecolari in parte condivisi con quelli dei vertebrati in accordo con la posizione di tale organismo nella scala evolutiva.

Il lavoro di tesi ha anche riguardato il ruolo della chinasi CK2 nel completamento meiotica e nello sviluppo embrionale della *Ciona intestinalis*. Dati di letteratura suggeriscono che le due subunità dell'enzima (α , catalitica e β , regolatoria) possano avere un ruolo differenziale nella regolazione della progressione meiotica e prime fasi dello sviluppo (α) e nella regolazione del CSF (β). Alcuni dei dati preliminari ottenuti riguardanti CK2 in *Ciona intestinalis* sono stati riportati nella presente tesi.

1. INTRODUZIONE

1.1 Generalità sul ciclo cellulare

“*Omnis cellula e cellula*”: ogni cellula deriva da un'altra cellula, asserì il patologo Rudolf Virchow in risposta alla teoria della generazione spontanea nella seconda metà dell'ottocento. Da allora la sfida è stata quella di comprendere i meccanismi che governano il ciclo cellulare e attraverso i quali la cellula trasmette il proprio patrimonio genetico. Il **ciclo cellulare** infatti, rappresenta la serie di eventi che avvengono in una cellula tra una divisione cellulare e quella successiva con la produzione di due cellule figlie a partire da una cellula madre. La durata del ciclo cellulare varia col variare della specie, del tipo di cellula e delle condizioni di crescita ed è un processo geneticamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule eucariotiche. Gli eventi molecolari che controllano il ciclo cellulare sono ordinati, finemente regolati e direzionali: ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente ed è la causa di quello successivo.

Esistono due tipologie di divisione cellulare: la mitosi che coinvolge le cellule somatiche e la meiosi che riguarda le cellule germinali. Il ciclo cellulare mitotico (Fig. 1.1) è tradizionalmente diviso in due periodi: la divisione cellulare (fase M) e l'interfase. Quest'ultima rappresenta il periodo di crescita della cellula e di preparazione alla mitosi e comprende tre tappe: la

fase pre-replicative G1 (*gap1*) in cui la cellula svolge le funzioni per le quali è stata predisposta dal differenziamento; la fase S in cui avviene la duplicazione del DNA e la fase G2, post-replicative di controllo del risultato degli eventi precedenti. Durante la fase mitotica propriamente detta (costituita da prometafase, metafase, anafase, telofase) si completa la divisione cellulare con la formazione di due cellule figlie identiche (Nigg, 2001; O' Farrell, 2001; Doreè e Hunt, 2002; Murray, 2004).

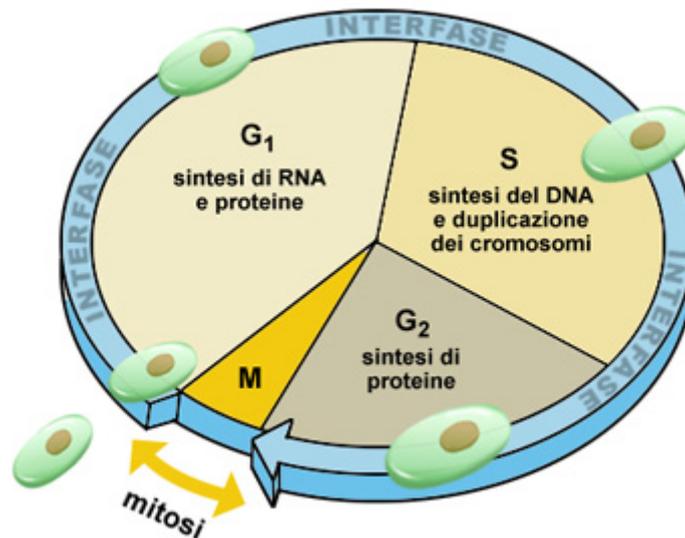


Fig. 1.1 Il ciclo cellulare e le sue fasi (www.torinoscienza.it)

Diversamente, la meiosi consiste di due divisioni: la prima divisione meiotica in cui, dopo la replicazione del DNA, si verifica la segregazione dei cromosomi omologhi, uno di origine paterna e uno di origine materna; la seconda divisione meiotica, dal punto di vista morfologico identica ad una

mitosi, in cui i cromatidi fratelli si dividono in cellule figlie. Il risultato è la produzione di quattro cellule aploidi che escono dal ciclo

1.1a Mitosi nelle cellule eucariotiche (Alberts *et al.*, 2004)

In una cellula somatica, la divisione cellulare viene tradizionalmente suddivisa in sei stadi, citologicamente distinguibili, di cui i primi cinque costituiscono la mitosi mentre il sesto è la citodieresi. Sebbene l'organizzazione spazio-temporale della mitosi e della citocinesi differiscano tra cellule animali, vegetali e funghi, la segregazione cromosomica richiede invariabilmente l'assemblaggio del fuso mitotico, mentre la citocinesi dipende dalla formazione del fuso, dall'actomiosina del citoscheletro e del cortex cellulare. La regolazione e la progressione della fase M, si fonda essenzialmente su due meccanismi : la fosforilazione di proteine e la proteolisi. La descrizione della divisione cellulare è basata sulle osservazioni provenienti da due fonti: microscopia ottica di cellule viventi e la microscopia ottica ed elettronica di cellule fissate e colorate. Nello schema presentato nella Fig 1.2 sono riportate le varie fasi della divisione qui di seguito riassunte:

Profase. La cromatina nucleare comincia ad organizzarsi e condensarsi a formare i cromosomi osservabili al microscopio ottico. Il nucleolo inizia a disgregarsi e gradualmente scompare. Ogni cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli uniti in un punto

specifico da una regione detta centromero. Durante la profase, dei cambiamenti avvengono anche nel citoplasma: 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 che sono organizzati a formare il centrosoma, la cui comparsa a livello biochimico, sembra essere controllata dall'azione delle chinasi *Polo-like* che fosforilano proteine dette *Asp* (*abnormal spindle*) la cui funzione è quella di vincolare i filamenti di γ tubulina dei microtubuli al centrosoma. La separazione dei centrosomi sembra essere invece regolata dalla chinasi *Nek2*, la quale è in grado di fosforilare una proteina del centrosoma, *C-Nap1* causando la dissoluzione di una struttura che lega l'uno all'altro i centrosomi duplicati (Fry *et al.*, 1998). Inoltre, sembra che la famiglia delle *KRPs* (*kinesin related motor proteins*) e la dineina citoplasmatica siano necessarie per la separazione dei centrosomi. Un ruolo nella separazione dei centrosomi è stato anche proposto per le chinasi della famiglia *Aurora-A*. 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 partecipa all'organizzazione a raggiera dei microtubuli (aster). All'inizio i due aster si trovano uno di fianco all'altro e vicini all'involucro nucleare. A partire dalla tarda profase i fasci di microtubuli polari che interagiscono tra i due aster (visibili al microscopio ottico come fibre polari) si allungano in modo specifico facendo allontanare l'uno dall'altro i due centri lungo la superficie esterna del nucleo. In questo modo si forma un fuso mitotico bipolare. L'assemblaggio del fuso e i successivi movimenti dei cromosomi, dipendono dalle proprietà dinamiche dei polimeri di microtubuli e dall'azione della dineina e della chinesina che rappresentano i "motori" dello spostamento microtubulare. La dinamicità dei microtubuli infatti, è regolata da un equilibrio dinamico di stabilità/instabilità della struttura microtubulare mediato da proteine. L'attività della maggior parte di tali proteine è regolata da fosforilazione; un esempio è rappresentato dalla statmina, la cui attività destabilizzante è inibita da una sequenza di fosforilazioni che coinvolge anche il complesso Cdc2/ciclina (*cyc*) B (di cui si discuterà nei prossimi paragrafi) e una chinasi ancora non caratterizzata (Larsson *et al.*, 1997; Nigg, 2001)

- Prometafase. La prometafase inizia con la disgregazione dell'involucro nucleare. Durante l'interfase, la membrana nucleare è stabilizzata da una struttura citoscheletrica nota come lamina nucleare che è depolimerizzata in seguito a fosforilazione; ciò causa la disgregazione dell'involucro nucleare che origina cisterne membranose

morfologicamente diverse da quelle del reticolo endoplasmatico. Durante la mitosi rimangono visibili intorno al fuso. Il fuso, inizialmente sviluppatosi all'esterno del nucleo, penetra 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 l'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. Ogni cromosoma quindi, è bi orientato sulla piastra metafasica grazie al duplice attacco del cinetocore al fuso. Tale meccanismo è sotto il controllo delle chinasi della famiglia Aurora B che facilitano l'orientamento dei cinetocori ai microtubuli mediante fosforilazione dei componenti del cinetocore stesso (Lampson *et al.*, 2004). Durante la transizione metafase-anafase, la

separazione dei cromatidi fratelli necessita della rimozione dei residui di coesina dai cromosomi (Nasmyth e Haering, 2005). La separazione dei cromosomi è irreversibile e il principale regolatore di questo processo è una proteasi detta separasi (Ulmann *et al.*, 2000) (spiegazione in seguito).

- Anafase. La metafase può durare a lungo. L'anafase inizia bruscamente, come se innescata da uno speciale segnale, quando i due cinetocori di ogni cromosoma si separano, per cui ogni cromatidio può essere lentamente trascinato verso un polo del fuso. 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. Studi effettuati nei lieviti hanno evidenziato che la separazione dei cromatidi fratelli dipende dalla degradazione, ubiquitina-dipendente, di una molecola inibitrice detta securina (Nasmyth *et al.*, 2000; Yanagida *et al.*, 2000), il cui compito è quello di inibire l'azione della separasi la quale favorisce il distacco dei cromatidi fratelli agendo sul complesso proteico della coesina (Ulmann *et al.*, 2000). Tale complesso è costituito da quattro molecole: Smc1, Smc3, Scc1 e Scc3 (Nasmyth e Haering, 2005). Smc1 e Smc3 dimerizzano formando un eterodimero a forma di V che viene chiuso da Scc1 e Scc3 per formare una struttura ad anello che è generalmente legata ai cromosomi alla fine della fase M.

- 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.

- Citodieresi (citocinesi). Il citoplasma si divide con un processo che di solito inizia alla fine dell'anafase o alla telofase. 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 formando una struttura ad anello. Questo stretto ponte o corpo intermedio, può rimanere per un certo tempo prima di chiudersi e infine rompersi alle due estremità dando origine a due cellule figlie complete e distinte. La scomparsa dell'anello contrattile si verifica grazie all'intervento della chinasi Plk1 (Burkad *et al.*, 2007) che fosforila la GTPasi Rho-A, una proteina che controlla l'assemblaggio dell'anello contrattile agendo sulla miosina II e sull'actina (Petronkcz *et al.*, 2008).

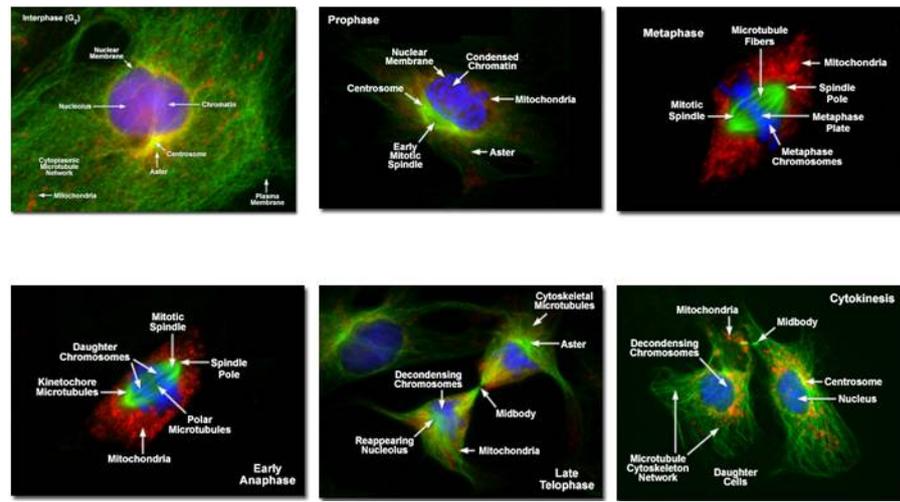


Fig. 1.2 Fasi del ciclo mitotico in cellule renali di *Potorous tridactylus*. Le immagini sono visualizzate mediante tecniche di microscopia ad epifluorescenza: il DNA cellulare (blu) è colorato con DAPI, i microtubuli (in verde) con Alexa fluor 488 coniugato ad un anticorpo secondario. In rosso sono indicati i mitocondri (<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/fluorescencemitosis>)

1.1b Meiosi

La meiosi è il processo di divisione cellulare caratteristico delle cellule germinali che porta alla formazione di gameti aploidi da cellule parentali diploidi. Durante la meiosi il numero di cromosomi si dimezza perchè una singola replicazione di DNA è seguita da due divisioni nucleari. Alla fecondazione la fusione dei nuclei aploidi dei gameti maschile (spermatozoo) e femminile (uovo), ripristina il corredo cromosomico diploide dando vita allo zigote, che è la prima cellula del nuovo individuo. L'individuo quindi affida i suoi geni ai gameti che a loro volta assicurano la propagazione della specie.

La meiosi, fenomeno unico per molteplici aspetti, ha consentito lo

sviluppo della riproduzione sessuale e quindi il rimescolamento dei geni. Durante la meiosi l'assortimento indipendente dei cromosomi parentali e il *crossing-over* meiotico contribuiscono a generare la diversità degli individui e l'evoluzione di nuove specie. Infine, la comparsa di genomi sempre più complessi e con caratteristiche imprevedibili ha consentito alle specie di adattarsi agli ambienti più avversi.

Virtualmente la meiosi ha inizio con la replicazione del DNA grazie alla quale ogni cromosoma si divide in due cromatidi che restano strettamente congiunti, questo evento dà inizio alla prima profase che nella linea germinale femminile, può bloccarsi anche per decenni, mentre in quella maschile il processo meiotico è continuo. Durante la profase I, si assiste inoltre all'appaiamento dei cromosomi omologhi, alla formazione del complesso sinaptonemale e alla ricombinazione omologa tra cromatidi non fratelli.

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. E' comunque necessario immaginarsi questi processi come dinamici ed in parte sovrapposti, senza che vi siano confini netti.

Profase I. Nelle cellule che vanno incontro alla meiosi, il complesso di coesina mitotico coesiste, almeno inizialmente, con isoforme specifiche. Nei mammiferi sono stati evidenziati dei geni paraloghi per SMC1, (che in un contesto meiotico viene definita SMC1 α) RAD21/SCC1 ed esistono delle isoforme di SCC3: SMC1 β (Revenkova *et al.*, 2001), REC8 (Parisi *et*

al., 1999) e STAG3 (Prieto *et al.*, 2001). La presenza di SMC mitotici e meiotici e l'assenza di subunità di coesina SMC in profase I suggerisce la presenza di più complessi di coesina a questo stadio (Revenkova e Jessberger, 2005). Diverse evidenze sperimentali infatti, indicano l'esistenza di almeno tre distinti complessi di coesina. SMC1 α e SMC1 β coesistono in profase I in spermatociti (Revenkova *et al.*, 2001, 2004, Eijpe *et al.*, 2003), suggerendo l'esistenza di due complessi di coesina ognuno su una specifica isoforma SMC1. Due proteine SMC: SMC1 β e SMC3 rimangono associate inoltre ai centromeri fino alla transizione metafase II/anafase II (Eijpe, 2003).

- *Leptotene*. A questo stadio i cromosomi diventano visibili ed hanno l'aspetto di lunghi e sottili filamenti. Nessuna duplicazione longitudinale è ancora visibile. Il processo di contrazione continua nel leptotene e durante l'intera profase. Un'altra caratteristica del leptotene è la comparsa lungo il cromosoma di piccole aree di ispessimento, denominate cromomeri, che danno al cromosoma l'aspetto di una collana di perle.

- *Zigotene*. E' questa la fase dell'appaiamento attivo, quando diviene evidente che il complemento cromosomico del meiocita è in effetti rappresentato da due insiemi completi. Ogni cromosoma ha infatti un partner con cui accoppiarsi e ciò accade effettivamente, da un'estremità all'altra di ogni coppia di cromosomi, con un meccanismo a cerniera, nel corso di un processo denominato sinapsi: ogni paio rappresenta una coppia di omologhi. Si deve anche notare che il fenomeno dell'appaiamento

rappresenta una differenza notevole con la mitosi, dove questo processo non ha luogo.

- *Pachitene*. Questo stadio è caratterizzato dalla presenza di filamenti molto spessi che corrispondono al completamento della sinapsi. Il numero delle unità presenti nel nucleo è pertanto uguale ad n . Spesso in questo stadio sono assai pronunciati i nucleoli. Gli ispessimenti lungo i cromosomi, i cromomeri, sono esattamente allineati negli omologhi appaiati, producendo un pattern caratteristico per ogni coppia.

- *Diploiene*. Diviene a questo stadio manifesta la sintesi di DNA che è avvenuta nella fase S premeiotica in quanto ogni coppia di omologhi appare longitudinalmente duplicata. Anche in questo caso le due unità derivate dalla divisione longitudinale prendono il nome di cromatidi. Dal momento che ogni membro di una coppia di omologhi dà luogo a due cromatidi fratelli, la struttura sinaptica viene ad essere costituita da quattro cromatidi omologhi. Durante il diplotene l'appaiamento tra gli omologhi diviene meno stretto; in effetti essi giungono al punto di respingersi e quando cominciano a separarsi diventano visibili delle strutture poste a croce tra i due cromatidi non fratelli e denominate chiasmi (singolare chiasma). Per ogni coppia di cromosomi sono evidenziabili uno o più chiasmi: essi sono la manifestazione visibile di eventi accaduti in precedenza, probabilmente durante lo zigotene o il pachitene quando vi è una parziale sintesi di DNA. Si tratta degli scambi (detti anche *crossing-over* o *crossover*), i quali rappresentano una delle principali differenze tra

meiosi e mitosi (nella quale avvengono solo raramente). Uno scambio è un evento esatto di rottura e risaldatura che avviene tra due cromatidi non fratelli; essi hanno anche un'altra funzione interessante: la creazione di variabilità genetica per mezzo della formazione di nuove combinazioni di geni.

- *Diacinesi*. Questo stadio non differisce in modo apprezzabile dal diplotene se si eccettua un'ulteriore contrazione dei cromosomi. A questo punto i lunghi filamenti cromosomici dell'interfase sono stati sostituiti da unità molto più compatte e manovrabili nella complessa dinamica della divisione meiotica.

- Metafase I. La membrana nucleare ed i nucleoli sono a questo punto scomparsi ed ogni coppia di omologhi si colloca sul piano equatoriale. I centromeri non si dividono in questo stadio della meiosi, al contrario di quanto accade nella mitosi. 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 .

- Telofase I. Questa telofase e la successiva "interfase", sono molto variabili: in molti organismi questi stadi non esistono affatto, la membrana nucleare non si riforma e la cellula procede direttamente verso la meiosi II; in altri la telofase I e l'intercinesi sono assai brevi, i cromosomi si allungano e si assottigliano, poi scompaiono e si riforma la

membrana nucleare. In ogni caso non vi è mai in questo stadio nuova sintesi di DNA e lo stato genetico dei cromosomi non cambia; i due nuclei che risultano dalla meiosi I sono effettivamente aploidi (in questo caso l'aploidia è più chiara se si contano i centromeri invece dei cromosomi o cromatidi).

- 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. I nuclei si riformano ora attorno ai cromosomi in corrispondenza dei due poli .

1.2 Regolatori del ciclo cellulare

Nelle cellule eucariotiche, l'inizio, la progressione, il controllo e la successione armoniosa delle diverse fasi del ciclo cellulare, sono regolate dall'attivazione transitoria e sequenziale di una famiglia di proteine chinasi, le CDKs (*cyclin dependent kinases*), che dipendono dal legame con componenti

di un'altra famiglia di fattori proteici, le cicline. Queste ultime sono proteine poco stabili, sintetizzate e degradate periodicamente, che si accumulano in fasi del ciclo specifiche e che non solo attivano le Cdk, ma ne determinano anche la specificità di substrato. In più, l'attività delle Cdk è regolata attraverso processi di fosforilazione e defosforilazione, proteolisi e interazione con piccole molecole inibitrici (Meijer, 2003; Murray, 2004). Nel lievito, il ciclo cellulare è regolato da una sola Cdk (Cdc2 nel lievito con divisione per scissione *Schizosaccharomyces pombe* e Cdc28 nel lievito a gemmazione *Saccharomyces cerevisiae*). Nell'uomo sono state scoperte almeno tredici Cdk, di cui sette sono quelle coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare: Cdk1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 (Knockaert *et al.*, 2002) e 25 cicline (Morgan 1997, Meijer, 2003). Schematicamente (Fig1.3), durante il ciclo cellulare, Cdk4 e 6 si associano alle cicline di tipo D, regolando lo svolgimento della fase G1. Il complesso Cdk2/*cycE* è attivo durante la transizione G1/S, seguita dal complesso Cdk2/*cycA*, che assicura il corretto svolgimento della fase S (Voronina *et al.*, 2003; Mitra e Enders 2004); Infine, il complesso Cdk1/*cycB* regola la transizione G2/M e l'ingresso in mitosi 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).

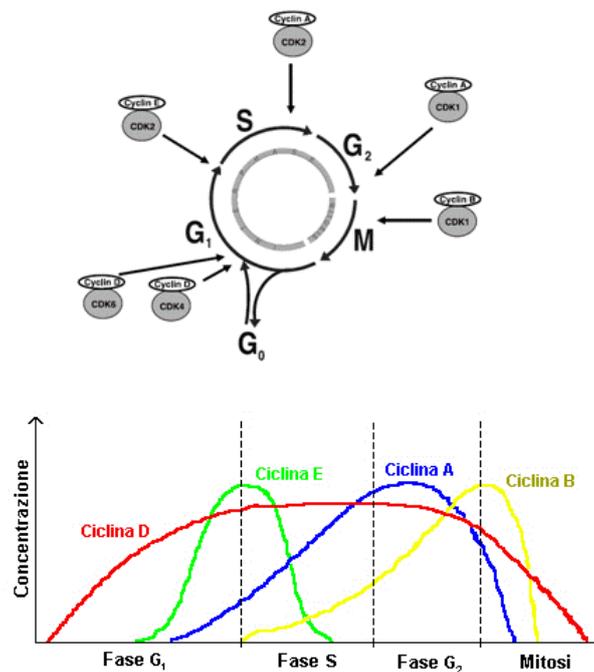


Fig. 1.3 Distribuzione dei complessi cicline/cdk durante le varie fasi del ciclo cellulare (Vermeulen *et al.*, 2003)(in alto) e schema della distribuzione delle cicline nelle varie fasi del ciclo cellulare (in basso).

Come sarà discusso in seguito, il complesso Cdk1/*cycB*, inizialmente identificato in ovociti di anfibio, è stato definito come MPF (*maturation-promoting factor*). Le cicline fanno parte di una ampia e variegata famiglia di proteine di 50-90 kDa che presentano una scarsa omologia di sequenza amminoacidica, tranne che in una corta regione definita “*cyclin box*” (una regione di circa 100 amminoacidi importante per l’interazione con le rispettive chinasi) che mostra un’elevata percentuale di conservazione in organismi di specie differenti compresi lievito, piante, uomo (Kitazono *et al.*, 2003). Le cicline sono anche regolate a livello di trascrizione, traduzione e degradazione; infatti, al completamento della mitosi, esse diminuiscono bruscamente in

seguito a processi di ubiquitinazione e successiva idrolisi. Infine, la localizzazione cellulare rappresenta un altro meccanismo di regolazione: le cicline mitotiche, per esempio, si trovano nel citoplasma durante l'interfase e traslocano nel nucleo durante la transizione G2/M.

Le cicline G1 ad esempio, contengono sequenze PEST (ricche di prolina, acido glutammico, serina e treonina) che sembrano conferire loro una certa instabilità e quindi, una emivita breve (Pines *et al.*, 1995; Rechsteiner e Rogers, 1996). Le cicline G2, 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). Una ulteriore regolazione si attua sul complesso ciclina-Cdk, grazie al legame con un gruppo di molecole note come inibitori delle Cdk (CKI). Nei metazoi sono state definite, in relazione alla loro origine evolutiva, struttura e specificità per le Cdk, due famiglie di CKI. Della famiglia dei geni INK4 fanno parte le proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, le quali interagiscono con le Cdk4 e Cdk6 inibendone l'attività chinasi e l'associazione con le cicline di tipo D (Sherr e Roberts, 1999; Besson *et al.*, 2008).

Al contrario, gli inibitori CKI appartenenti alla famiglia Cip/Kip legano sia le cicline che le Cdk e possono modulare l'attività delle cicline D, E, A e del complesso *cycB*/Cdk. Le proteine p21, p27, p57 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-cicline G1 e in maniera

meno efficace anche i complessi Cdk/*cycB*. Diversamente dagli inibitori INK4, i p21 mostrano una maggiore affinità per i complessi Cdk-ciclina che per le Cdk monomeriche (Lees, 1995).

1.2a Punti di controllo del ciclo cellulare (Stein *et al.*, 2002)

Ogni fase del ciclo cellulare è strettamente regolata e controllata a livello dei *checkpoints*, punti di controllo costantemente sollecitati al fine di bloccare la divisione alla minima anomalia. I *checkpoints* bloccano la divisione cellulare consentendo l'attivazione di meccanismi capaci di riparare gli errori e di consentire quindi la ripresa del ciclo. Se i danni sono irreversibili, la cellula può andare incontro ad un meccanismo di morte programmata noto come apoptosi (Kastan e Bartek, 2004). Esistono quindi, dei punti di controllo, a livello dei quali la cellula “decide” il proprio destino di vita o morte. Le tappe che maggiormente sono soggette a tali controlli riguardano la condensazione dei cromosomi, l'assemblaggio del fuso mitotico, l'allineamento dei cromosomi sulle fibre del fuso e il loro movimento lungo le stesse, nonché la citocinesi. I *checkpoints* sono quindi localizzati a livello delle transizioni G1/S e G2/M: in fase G2; all'ingresso in fase M (prima di procedere la cellula “si assicura” che tutto il DNA sia stato duplicato e che l'ambiente sia favorevole); in metafase, all'uscita dalla

fase M (a questo punto la cellula “verifica” se tutti i cromosomi siano attaccati al fuso).

1) All’uscita dalla fase G1, prima dell’ingresso in fase S, che avviene solo quando l’ambiente è favorevole. Questo punto di controllo è noto come START nei lieviti e *restriction point* nelle cellule somatiche in divisione. Se non si verificano le condizioni ottimali per entrare in fase S, la cellula resta bloccata in G1/S, oppure può decidere di uscire dal ciclo ed entrare nella fase di quiescenza detta G0. Più in dettaglio: in caso di danneggiamento del DNA, le chinasi ATM e ATR sono le principali proteine ad essere coinvolte nelle prime tappe dell’attivazione dei *checkpoints*. Esse infatti, se si verificano danni al DNA, fosforilano la proteina p53 che controlla la trascrizione di p21 e inibisce il complesso *cycE/Cdk2* responsabile della transizione G1/S (Eklom e Reed, 2000; Child e Man, 2006). Allo stesso modo, le chinasi ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) e ATR (*ATM and Rad3-related*) fosforilano delle serina treonina chinasi: Chk1 (principalmente attivata da ATM) e Chk2, (principalmente attivata da ATR) (Dorée, 2003; Pommier e Kohn, 2003) le quali a loro volta fosforilano delle molecole essenziali coinvolte nella transizione G2/M: le fosfatasi Cdc25B e Cdc25C (‘O Connor *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1997).

Il risultato di questa via biochimica di fosforilazione/defosforilazione è l’inattivazione dei complessi Cdk2/*cycA* e Cdc2/*cycB* con il conseguente arresto del ciclo cellulare. Lo *spindle checkpoint* rappresenta invece il punto

di controllo responsabile dell'arresto del ciclo cellulare prima che avvenga la separazione dei cromatidi. Tale *checkpoint* si attiva sia in assenza di una corretta forza di tensione tra il cinetocore e i microtubuli, sia se il cinetocore non è correttamente attaccato. In tali casi, si attiva la chinasi Mps1 che fosforila la proteina Mad1 (*mitotic arrest deficient*). Tale fosforilazione è dipendente da altre proteine del *checkpoint*: la chinasi Bub1 (*budding inhibited benzimidazole*), Bub3 e Mad2 (Amon, 1999). L'insieme di queste proteine è localizzato sul cinetocore dei cromatidi in modo tale che, quando è presente un difetto, tali proteine interagiscono con il complesso Cdc20/APC inibendone l'attività di ubiquitinazione (Nigg, 2001). In questa situazione, l'APC/C è incapace di ubiquitinare la securina e pertanto i cromatidi non sono separati. Se le anomalie del fuso sono eliminate, Mad2 si dissocia dal complesso e il complesso Cdc20/APC a sua volta può quindi ubiquitinare la securina con conseguente separazione dei cromatidi fratelli e la cellula può entrare così in anafase.

In accordo con l'argomento trattato nel presente lavoro di tesi e considerata la vastità della tematica concernente il ciclo cellulare e la sua regolazione, nei prossimi paragrafi si focalizzerà l'attenzione soprattutto sulla meiosi; verranno approfonditi pertanto, alcuni aspetti riguardanti la regolazione del ciclo meiotico prendendo in considerazione gli attori principali oggetto di questo studio.

1.3 MPF (*Maturation promoting factor*)

La convergenza di approcci sperimentali multidisciplinari realizzati in diversi modelli, quali lievito (approccio genetico), maturazione meiotica della stella di mare e dello *Xenopus*, lo sviluppo embrionale del riccio di mare (approccio embriologico) ha consentito l'identificazione delle molecole e dei meccanismi coinvolti nella transizione G2/M (Dorée e Hunt, 2002; Nurse, 2002). In tal senso, nel 1971 esperimenti di trasfezione di citoplasma effettuati da Masui e Markert durante la maturazione meiotica di anfibio hanno mostrato l'esistenza di un fattore capace di promuovere l'ingresso in meiosi, che essi pertanto definirono MPF (*maturation promoting factor*) (Masui e Markert, 1971). Alla fine degli anni '80, fu evidenziata un'attività MPF in cellule somatiche in divisione dai lieviti ai mammiferi e da qui l'MPF fu rinominato *M-phase-promoting factor* ad indicarne il coinvolgimento nell'indurre la fase M in tutte le cellule eucariotiche (Hashimoto, 1988). Studi indipendenti hanno consentito la caratterizzazione molecolare dell'MPF. Mediante screening genetico nei lieviti *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* si sono identificati i geni *cdc2* e *CDC28*, risultati essere regolatori sia della fase M che della fase S e codificanti per una proteina di 34 kDa (Hartwell *et al.*, 1970; Nurse *et al.*, 1976). Parallelamente, Hunt e coll. identificavano, in molluschi bivalvi e riccio di mare, le cicline quali proteine sintetizzate nelle prime fasi di divisione dell'embrione e i cui livelli d'espressione fluttuavano nel corso della divisione cellulare mostrando dei picchi ad ogni metafase

(Hunt, 1989). Grazie alla convergenza di questi studi, fu definita la natura molecolare dell'MPF che risultò composto da una subunità catalitica, la Ser/Thr chinasi Cdk1 (detta anche Cdc2, perché omologa alla proteina codificata dal gene *cdc2* che controlla il ciclo cellulare in *S. pombe*) e una subunità regolatrice, la ciclina B (*cycB*, Lohka *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1988, Hunt, 1989; Nurse, 1990).

L'MPF fu inizialmente purificato da ovociti di rana, dove si scoprì essere capace di indurre la rottura della membrana nucleare. Successivamente, fu dimostrata l'attività dell'MPF nella fosforilazione di proteine quali la condensina, necessaria per il *supercoil* del DNA durante la mitosi (Swedlow e Hirano, 2003), dell'istone H1 e di alcune proteine come la nucleoporina, un componente dei pori nucleari la cui fosforilazione potrebbe rappresentare uno dei primi *steps* della rottura della membrana nucleare (Burke e Ellenberg 2002; Lénart *et al.*, 2003).

Il legame della Cdk1/Cdc2 alla *cycB* è necessario, ma non sufficiente per l'attività chinastica. Nel corso del ciclo cellulare, infatti l'attività dell'MPF è regolata attraverso meccanismi di fosforilazione/defosforilazione della subunità catalitica.

1.3a Regolazione dell' MPF (Fig.1.4)

a) Le fosforilazioni attivatrici

Cdc2 può essere fosforilata su un residuo di treonina, la Thr 161 (la posizione si riferisce sequenza della proteina umana), che favorisce la stabilità e l'attivazione del complesso (Gu *et al.*, 1992). Il complesso proteico responsabile di tale evento è noto come CAK ed è a sua volta costituito da una subunità catalitica (Cdk7 o MO15) ed una regolatrice, la ciclina H (Solomon *et al.*, 1993). La defosforilazione della Thr 161 è essenziale per l'inattivazione di Cdc2 all'uscita della fase M (Gould *et al.*, 1991; Lorca *et al.*, 1992). Diverse proteine sono implicate direttamente o indirettamente, in questo processo: una fosfatasi di tipo 2A detta INH (Solomon *et al.*, 1990; Janssens e Goris, 2001), le fosfatasi 2C (De Smedt *et al.*, 2002), la proteina kap (Harper e Adams, 2001) e una fosfatasi di tipo 1 (Lorca *et al.*, 1992).

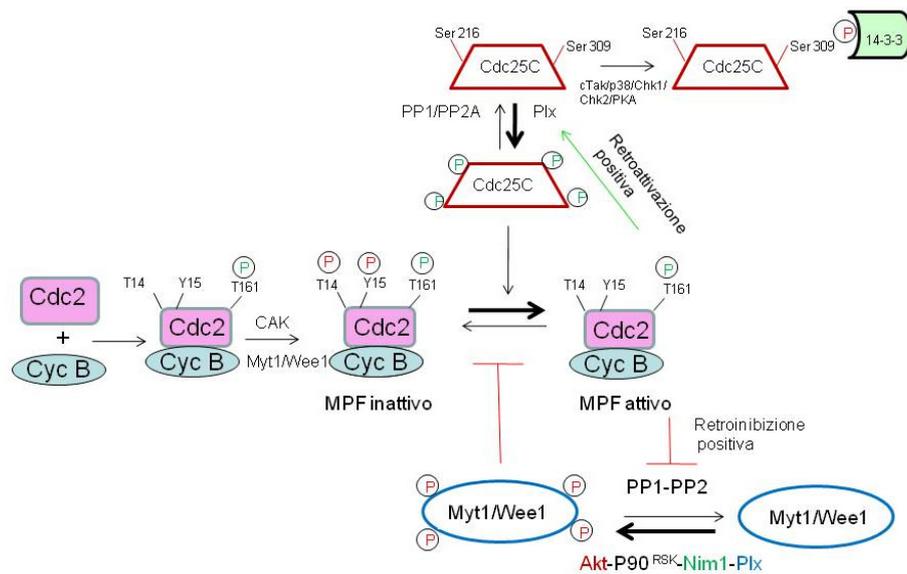


Fig. 1.4 Struttura molecolare e regolazione dell' MPF.

b) Le fosforilazioni inibitrici

Durante la fase S la *cycB* neosintetizzata si lega a Cdc2 formando il complesso *cycB/Cdc2*, noto come pre-MPF, dove l'attività MPF è inibita a causa delle fosforilazione dei residui di treonina e tirosina (Thr-14 et Tyr-15) presenti nel dominio di legame con l'ATP sulla molecola di Cdc2. La fosforilazione di questi residui è realizzata dalle chinasi Wee1 e Myt1 (*Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase*). La chinasi Wee 1 fosforila tirosina 15, mentre Myt1 (Han e Conti, 2006) è in grado di fosforilare entrambi i residui. Queste due chinasi sono attivate per defosforilazione e inattivate per fosforilazione (Fig. 1.5)(Russell e Nurse, 1987; Tang *et al.*, 1993).

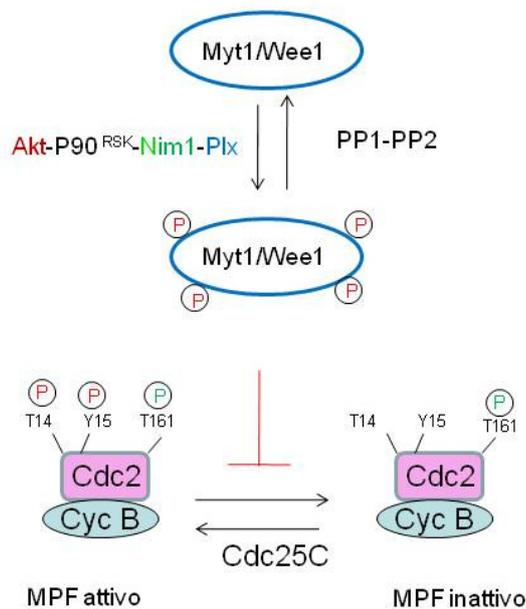


Fig. 1.5. Regolazione delle chinasi Myt1 e Wee1 durante la maturazione meiotica.

Sono state identificate diverse chinasi responsabili di queste fosforilazioni: Akt (Okumura *et al.*, 2002), p90^{Rsk} (Han e Conti, 2006; Philpott e Yew, 2008), nim1 (Coleman *et al.*, 1993; Han e Conti, 2006) e Plk, una chinasi della famiglia polo (Okano-Uchida *et al.*, 2003; Philpott e Yew, 2008). Queste chinasi inibiscono Myt 1 e Wee1 ristabilendo l'equilibrio dinamico che regola l'attività MPF tra le chinasi inibitrici (Myt1 e Wee1) e la fosfatasi attivatrice dell'MPF (Fig. 1.5), Cdc25 (spiegazione in seguito) (Fig. 1.6).

c) Le defosforilazioni attivatrici

Le fosfatasi della famiglia delle Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B e Cdc25C nell'uomo) sono capaci di rimuovere le fosforilazioni inibitrici dai residui di Tyr-15 e Thr-14 (Millar *et al.*, 1991; Rudolph, 2007). Cdc25A è classicamente descritta come un regolatore attivo nella transizione G1/S, mentre Cdc25B e C sono attive in G2/M. In *Xenopus* l'attività di Cdc25C è regolata per proteolisi e per fosforilazione di residui inibitori (Fig 1.6). Il residuo inibitorio è una serina conservata, la Ser 287 (Ser 216 sulla proteina umana) (Ogg *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1997; Kumagai *et al.*, 1998). La fosforilazione di questo residuo provoca il legame di proteine nel sito 14-3-3. Le proteine della famiglia 14-3-3 sono note per riconoscere specificamente dei residui di fosforilazione su proteine regolatrici del ciclo cellulare (Kumagai *et al.*, 1998; Hermeking, 2003). Più chinasi sono coinvolte nella regolazione del residuo inibitorio, le prime ad essere identificate sono state le chinasi Chk1 (Peng *et*

al., 1997; Sanchez *et al.*, 1997) e Chk2, responsabili dell'arresto del ciclo nel checkpoint in G2.

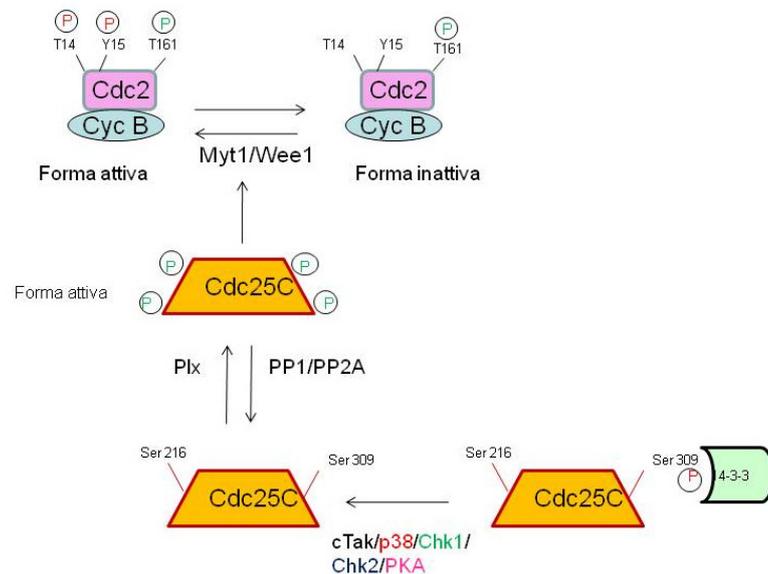


Fig. 1.6 Regolazione della fosfatasi Cdc25C durante la maturazione meiotica.

Successivamente si è visto che, in ovociti di *Xenopus*, il blocco in G2 è mantenuto dalla fosforilazione sulla Ser 287 di Cdc25 da parte della proteina chinasi A (Duckworth *et al.*, 2002). Le proteine di tipo 14-3-3 includono inoltre la proteina C-TAK, identificata in cellule umane (Peng *et al.*, 1998) e la chinasi calmodulina dipendente (CaMKII), attiva al rilascio di calcio in seguito alla fecondazione (Perdiguero e Nebreda, 2004). Durante la transizione G2/M, Cdc25 è attivata per defosforilazione della Ser 287 probabilmente dalla fosfatasi 2 (PP2A) (Pediguero e Nebreda, 2004). La fosforilazione del residuo Thr 138, forse dovuta a Cdk2, invece, potrebbe precedere il rilascio delle proteine 14-3-3 e successivamente favorire la

defosforilazione della Ser287, probabilmente mediata dalla fosfatasi 1 (PP1). In *Xenopus*, Xp38 fosforila poi la Ser 205 favorendo il legame con Plx1. Allo stadio di GVBD, Plx1 fosforila Cdc25 sulla Ser 198 attivandola. Cdc25, quindi, attiva il pre-MPF. È stato inoltre dimostrato che il complesso Cdc2/*cycB* fosforila Cdc25 su Thr 48 e Thr 67, (Perdiguero e Nebreda, 2004) innescando un meccanismo di auto amplificazione (Fig. 1.4) dell'attività MPF che promuove il passaggio attraverso la M-I e la M-II.

1.4 CSF (cytostatic factor)

Nello stesso lavoro in cui Masui e Markert descrissero l'attività MPF, fu anche riportato che l'iniezione di citoplasma prelevato da ovociti di *Xenopus* bloccati in metafase II in un blastomero di un embrione allo stadio di 2 cellule, bloccava la divisione del blastomero iniettato, pertanto essi ipotizzarono l'esistenza di un fattore citoplasmatico (presente in ovociti maturi), capace di inibire la divisione. Tale fattore fu definito *cytostatic factor* (CSF). Saggi funzionali di attività CSF sono stati descritti in Letteratura sin dagli anni '70 (Masui, 1971; Longo, 1983) e sono riproducibili in diversi modelli cellulari di vertebrati (*Xenopus*, *Rana*, *Mus*). Al contrario, la composizione in subunità del CSF è ancora oggetto di studio. Secondo alcuni autori, le tre principali caratteristiche per definire un'attività CSF sono: 1) CSF deve comparire durante la maturazione ovocitaria; 2) essere presente durante

l'arresto in M-II (almeno nei vertebrati; 3) essere degradato al momento della fecondazione (Masui, 2001; Tunquist e Maller, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Dal punto di vista molecolare, il CSF include la chinasi Mos, una proteina di 39 kDa codificata dal gene *c-mos*, un oncogene cellulare. Mos è una Ser/Thr chinasi originariamente identificata come omologo cellulare del prodotto del gene virale *v-mos*, responsabile del sarcoma murino di Moloney (Vande Woude *et al.*, 1990) ed espresso in maniera specifica nell'ovario e nel testicolo (Propst *et al.*, 1988). Fu nel 1989 che si scoprì che la proteina Mos era richiesta per il mantenimento dell'attività CSF, in quanto la degradazione dell'mRNA codificante per Mos coincideva con la perdita dell'attività (CSF Sagata *et al.*, 1989). Successivamente è stato visto che negli ovociti di tutti i vertebrati, Mos è responsabile del blocco in M-II, agendo come componente essenziale del CSF (Sagata *et al.*, 1989; Sagata, 1996; Sagata, 1997; Colledge *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1994; Tachibana *et al.*, 2000). Fu in seguito dimostrato, che Mos era responsabile dell'attivazione di p42MAPK durante la maturazione ovocitaria (Nebreda e Hunt, 1993; Posada *et al.*, 1993; Shibuya e Ruderman, 1993). Ciò suggerì che MAPK potesse essere un mediatore dell'attività di Mos come successivamente confermato in mammiferi, dove si osservò che MAPK non era attivata in topi *mos* *-/-* (Verlhac *et al.*, 1996). In questo periodo, venne anche identificata una chinasi capace di fosforilare entrambi i residui di tirosina (Tyr185) e treonina (Thr183) presenti sul *loop* regolativo di MAPK (Crews *et al.*, 1992; Nakielny *et al.*, 1992; Crews *et al.*, 1993). Questa proteina chiamata MEK1, fu poi identificata come un attivatore

a monte della MAPK (Kosako *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1992; Tobe *et al.*, 1992). Iniezioni di MEK1 in ovociti immaturi causavano infatti l'attivazione di MAPK e inibendo MEK1 si impediva la maturazione dell'ovocita indotta dal progesterone. Mos, quindi, attiverrebbe MEK1 fosforilandola sui residui di Ser 218 e Ser 222 (Posada *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995). Successivamente si vide che MAPK fosforilava la chinasi ribosomiale S6, p90^{Rsk} (Frodin e Gammeltoft, 1999). Nei mammiferi sono state identificate tre differenti isoforme di p90^{Rsk} dette Rsk1, Rsk2, Rsk3, mentre in *Xenopus*, sono presenti solo Rsk1 e Rsk2, entrambe attive durante la maturazione degli ovociti (Bhatt e Ferrell, 2000). La natura molecolare del CSF quindi, sembra essere definita dalla *pathway* Mos/MEK1/MAPK /p90^{Rsk}; durante la maturazione degli ovociti, in *Xenopus*, ogni componente di questa *pathway* è sintetizzato o attivato in seguito al rilascio del progesterone. Inoltre, una forma attiva di ogni componente è sufficiente ad indurre la maturazione ovocitaria (Tunquist e Maller, 2003). Alla fecondazione, in seguito all'aumento della concentrazione degli ioni calcio (Ca²⁺) Mos è degradata e il suo mRNA è deadenilato, mentre gli altri componenti della *pathway* CSF sono inattivati mediante defosforilazione; suggerendo che, in *Xenopus*, Mos è la sola MAPKKK (MAPK chinasi chinasi) attiva durante la maturazione ovocitaria (Tunquist e Maller, 2003). La *pathway* regolativa attivata da Mos e responsabile dunque del blocco mediato dal CSF in M-II, agisce inibendo l'attività di Cdc20/p55^{CDC}/Fizzy, un attivatore del complesso APC/C (Tunquist and Maller, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). La maggior parte degli studi riguardanti la

regolazione di Mos, sono stati concentrati sulla traduzione del suo RNA messaggero e sulla stabilità della proteina stessa. Negli ovociti immaturi di *Xenopus*, l'mRNA di Mos non è attivamente tradotto (Sagata *et al.*, 1988), pertanto la proteina è presente in piccole quantità. In risposta al progesterone (l'ormone che innesca il processo di maturazione), la chinasi Eg2/Aurora A fosforila CPEB un fattore che regola la traduzione inibendola (Mendez *et al.*, 2000; Pascreau *et al.*, 2005). Ciò consente un aumento nella sintesi di Mos (Sagata *et al.*, 1988). Alcuni autori ritengono che la stabilità della proteina Mos, sia dovuta alla fosforilazione del residuo Ser3 e tra le proteine ritenute responsabili di tale fosforilazione rientrano la chinasi Cdc2 (Castro *et al.*, 2001), p42 MAPK (Matten *et al.*, 1996) e Mos stessa (Sheng *et al.*, 2002). Chen e Cooper (Chen e Cooper, 1995) hanno evidenziato che la fosforilazione della Ser 3 oltre a favorire l'interazione di Mos con MEK 1 ne promuove anche l'attivazione. Ciò suggerisce che Mos è regolata non solo a livello di espressione ma anche in attività (Yue *et al.*, 2006), anche se la mutazione della Ser3/Ala3 non impedisce la maturazione ovocitaria o il mantenimento dell'attività CSF (Freeman *et al.*, 1992). Chen e collaboratori hanno inoltre mostrato che la subunità regolatrice della proteina CK2, CK2 β , può fungere da modulatore negativo dell'attività di Mos (Chen e Cooper, 1997; Chen *et al.*, 1997). Nel 2004, Lieberman e Ruderman hanno effettivamente dimostrato l'interazione tra Mos e CK2 β indicando il sito di ancoraggio di quest'ultima sulla sequenza di Mos (Lieberman e Ruderman, 2004). Se l'inibizione di Mos

da parte di CK2 β sia costitutiva o regolata e quali siano i meccanismi coinvolti in tale processo resta ancora da definire.

Negli ultimi anni, l'attività del CSF è stata correlata anche al controllo dell'assemblaggio del fuso in quanto p90^{Rsk} può fosforilare Bub1, una Ser/Thr protein chinasi capace di inibire APC/C attivando fattori coinvolti nei *checkpoints* quali Mad1, Mad2, BubR1 (Schwab *et al.*, 2001; Tunquist e Maller, 2003, Schmidt, 2006). Alcuni autori hanno avanzato l'ipotesi dell'esistenza di una seconda attività CSF che coinvolge il complesso Cdk2/*cycE* (Gabrielli *et al.*, 1993).

Più di recente, proteine appartenenti alla famiglia Emi/Erp1 sono state considerate come dei componenti importanti del CSF (Schmidt *et al.*, 2006). Inizialmente si è pensato che la proteina Emi1 (*Xenopus early mitotic inhibitor*) fosse un componente del CSF in quanto essa è necessaria e sufficiente ad indurre l'attività CSF (Reimann e Jackson, 2002). Successivamente, altri autori hanno evidenziato che Emi1 non è rilevabile in ovociti di *Xenopus* bloccati dall'attività CSF e la proteina esogena è instabile in estratti di ovociti bloccati; inoltre, il blocco causato da Emi1 è indipendente dalla *pathway* del CSF mediata da MAPK (Ohsumi *et al.*, 2004). Sebbene tali scoperte non possano escludere un contributo di Emi1 nell'attività CSF, secondo alcuni autori, la sua assenza nelle uova dovrebbe escluderne un coinvolgimento primario (Schmidt *et al.*, 2006). Recentemente, alcuni autori hanno suggerito un ruolo essenziale della proteina Erp1/Emi2, un inibitore dell'APC/C, nel mantenimento del CSF (Schmidt, *et al.* 2005; Ohe *et al.*,

2007). Sia in *Xenopus* sia in topo (Schmidt, *et al.*, 2005; Shoj *et al.*, 2006) Erp-1/Emi2, infatti, similmente a Mos, è distrutta alla fecondazione (Hansen *et al.*, 2006). Emi-2 è una *zinc finger protein* e presenta un dominio *F-box* nella regione C-terminale. Le proteine con dominio F-box, fanno parte del complesso SCF (Skp1/cullin/F-box) ubiquitina ligasi che, come l'APC/C, media la degradazione dei regolatori del ciclo cellulare (Schmidt *et al.*, 2006). Nei mammiferi l'analisi filogenetica delle proteine contenenti un dominio F-box ha rivelato una stretta relazione tra Emi1 ed Emi2 (Jin *et al.*, 2004). Esse infatti presentano il 39% di identità nell'estremità C-terminale nella regione contenente il dominio F-box che è seguito da una regione *zinc-binding*, mentre le due proteine sono poco affini nella parte N-terminale. Schmidt e colleghi hanno dimostrato che Emi2 è fondamentale per il mantenimento del CSF e che essa è rapidamente distrutta alla fecondazione (Schmidt *et al.*, 2005), dove si assiste alla degradazione dipendente dal calcio di Emi2. Tale evento è mediato dalla Plx1 (*Polo-like kinase*)(Rauh *et al.* 2005), che fosforilando Emi2, ne consente il riconoscimento da parte del proteasoma (Wu *et al.*, 2007).

1.5 Regolazione della meiosi

Lo sviluppo di un ovocita immaturo in un gamete fecondabile è un processo che viene definito maturazione meiotica (Haccard e Jessus, 2006). In tutti gli organismi, la maturazione degli ovociti prevede un blocco in P-I. In

alcune specie quali il mollusco *Spisula solidissima* o l'echiuroido *Urechis caupo*, la maturazione dell'ovocita è promossa dalla fecondazione stessa (Masui, 2001). Il primo segnale che contraddistingue la maturazione ovocitaria è il GVBD (*germinal vesicle breakdown*) ossia la rottura del nucleo, che nell'ovocita immaturo, è detto vescicola germinale (GV). Ciò implica il rilascio del nucleosoma nel citoplasma e la condensazione dei cromosomi. Se la maturazione è iniziata dalla fecondazione, così come accade in alcuni invertebrati, gli ovociti completano le due divisioni meiotiche senza interruzioni, al contrario, nel caso in cui la maturazione è indotta da altri stimoli quali ad es. le gonadotropine, possono verificarsi tre condizioni: 1) la maturazione può essere bloccata alla metafase della prima divisione meiotica (M-I), come accade negli insetti o nei tunicati; 2) si può avere un blocco in M-II, come in tutti i vertebrati; 3) in G1 come accade nei ricci di mare e nelle meduse (Masui, 2001) (Fig. 1.7).

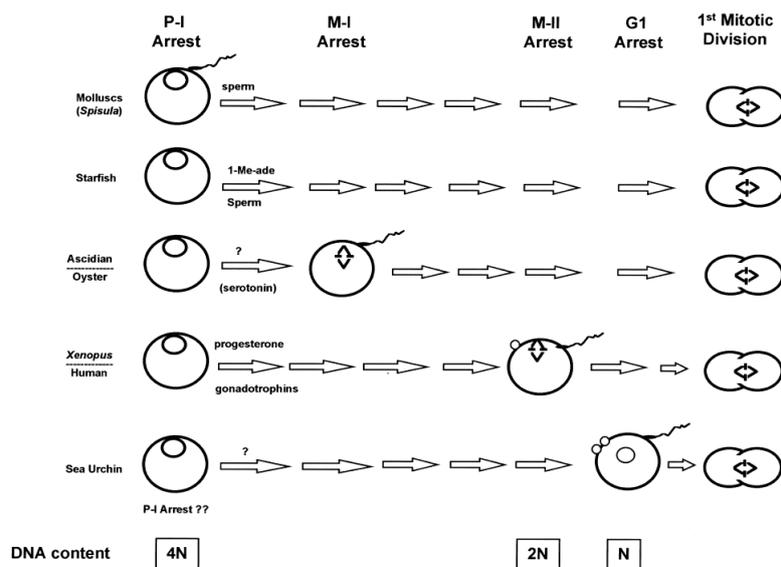


Fig. 1.7 Illustrazione schematica del blocco e della ripresa meiotica in ovociti di organismi differenti (Russo *et al.*, 1998).

In tutte le specie sinora studiate, la maturazione meiotica è regolata dall'MPF e dal CSF. Gli ovociti ed embrioni di *Xenopus* hanno rappresentato il modello di riferimento nello studio dei meccanismi regolativi del ciclo cellulare e della maturazione meiotica (Philpott e Yew, 2008). In *Xenopus*, il rilascio di progesterone induce gli ovociti bloccati in P-I a completare la prima divisione meiotica e la maturazione. In breve, durante il processo di maturazione, gli ovociti attraversano la meiosi I, subiscono la rottura della vescicola germinale (GVBD) emettendo il primo globulo polare, quindi entrano in M-II, senza passare in interfase, dove restano bloccati fino alla fecondazione (Philpott e Yew, 2008). L'attività dell'MPF oscilla durante la maturazione meiotica: è elevata in M-I, bassa alla transizione passaggio M-I/M-II, per ritornare nuovamente elevata in M-II. Qui, l'attività MPF è "sostenuta" dal CSF attivo (Fig 1.8) attraverso l'inibizione del complesso che promuove l'anafase (APC/C) (Doree e Hunt, 2002) (si veda di seguito).

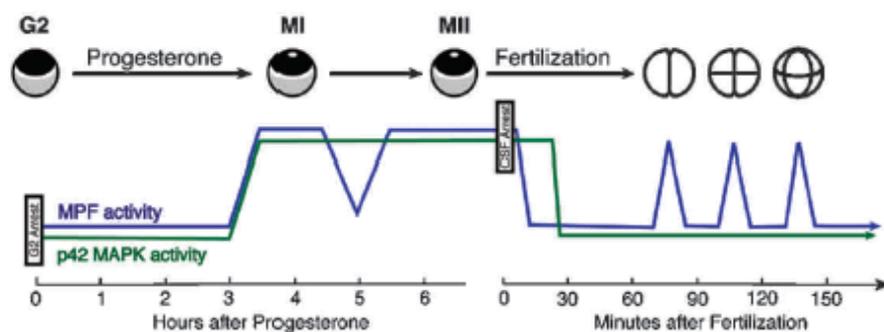


Fig. 1.8 *Interplay* tra MPF e CSF durante la maturazione meiotica in *Xenopus laevis* (Tunquist e Maller, 2003).

Negli ovociti immaturi bloccati in P-I, l'MPF è presente in una forma inattiva detta pre-MPF, con Cdc2 associata alla ciclina B, ma inattiva in quanto fosforilata in Tyr15 e Tre14 dalle chinasi Myt1 e Wee1. La fosfatasi Cdc25C rimuove queste fosforilazioni e attiva Cdc2, che a sua volta fosforila Cdc25, provocando una rapida amplificazione dell'attività MPF (Karaiskou, 2001; Haccard e Jessus, 2006). 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) (Fig. 1.6).

E' stato dimostrato che, per l'attivazione dell'MPF indotta dal progesterone, è richiesta l'inibizione dell'attività della PKA (*cyclin AMP dependent protein*) (Eyers *et al.*, 2005) e la sintesi di nuove proteine in grado di indurre una diminuzione dei livelli di AMP ciclico con conseguente diminuzione dell'attività di PKA. PKA, controlla la sintesi di due proteine funzionali in questa *pathway*: la *cycB* e Ringo/Speedy, un partner di Cdc2, che contribuisce all'attivazione dell'MPF. Un'altra *pathway* implica la sintesi della chinasi Mos che attivando indirettamente p90^{Rsk} (secondo un meccanismo precedentemente descritto), inibisce Myt1 e contemporaneamente favorisce l'attivazione di Cdc25 (Lenormand *et al.*, 1999; Haccard e Jessus, 2006). Riassumendo, in aggiunta alla *pathway* xPlkk1/Plx1/Cdc25C, il progesterone attiva una seconda *pathway*: la via di segnale Mos/MEK/MAPK/p90^{Rsk}. E' stato dimostrato che p90^{Rsk} è in grado di

fosforilare e inibire in maniera diretta Myt-1, facilitando l'attivazione dell'MPF mediata da Cdc25 e l'entrata in meiosi I (Palmer *et al.*, 1998). Altri dati, inoltre, suggeriscono che anche Mos potrebbe fosforilare direttamente Myt-1 (Peter *et al.*, 2002). L'uscita dalla M-I è associata alla degradazione della *cycB* mediata dal complesso APC/C. La *cycB* sarà neo-sintetizzata prima dell'ingresso in M-II e stabilizzata dal CSF (Taieb *et al.*, 2001). Alla fecondazione, il calcio provoca l'entrata in anafase favorendo la degradazione di Emi2 che, a cascata, causa l'attivazione di APC/C e la degradazione della *cycB*. Nei pesci (*Carassius auratus*) è stato inizialmente riportato che l'MPF non è presente sotto forma di pre-MPF, ma Cdc2 è in forma monomericamente con la *cycB* assente e sintetizzata solo in seguito alla stimolazione ormonale. Il complesso così formato quindi, è attivato solo mediante fosforilazione del residuo di Thr 161 in quanto mancano le fosforilazioni inibitorie sui residui di Thr14 e Tyr15 attraverso un meccanismo che non prevede l'intervento della fosfatasi Cdc25. Tali risultati sono stati messi in discussione da uno studio più recente, dove è stato riportato che nel pesce teleosteo *Anabas testudineus* esiste un pre-MPF e che la transizione G2/M indotta dal complesso *cycB*/Cdc2 è dipendente dall'attivazione di Cdc25 (Basu *et al.*, 2004).

1.6 Maturazione degli ovociti negli invertebrati

Negli invertebrati il passaggio dalla P-I a GVBD è indotto da stimoli differenti a seconda della specie. Negli echinodermi (in particolare nelle stelle di mare) ad esempio, la maturazione è indotta dalla 1-metiladenina, nei molluschi del genere *Ruditapes* e *Crassostrea*, dalla serotonina, mentre nei molluschi del genere *Spisula* è la fecondazione stessa a provocare il completamento meiotico. I meccanismi che regolano il completamento meiotico negli invertebrati non sono del tutto chiari. Per esempio in *Patella vulgata* (Colas *et al.*, 1993) e in *Mitilus edulis* (Néant *et al.*, 1994), il blocco in M-I è garantito dalla stabilità della *cycB* che dipenderebbe dalla continua sintesi di fattori proteici non ancora caratterizzati definiti *short lived proteins*; tale meccanismo è stato evidenziato in quanto, trattando gli ovociti con inibitori della sintesi proteica, si è osservato l'uscita dalla M-I (Colas *et al.*, 1993). Nelle stelle di mare, la via di traduzione del segnale che porta alla maturazione meiotica, non richiede la sintesi proteica e l'MPF presente sottoforma di pre-MPF, è subito attivato attraverso meccanismi di autoamplificazione (Taieb *et al.*, 1997). Nelle ascidie, invece la situazione è completamente diversa per due motivi: il mantenimento del blocco metafasico non sembra essere dipendente dalla sintesi di proteine, similmente a quanto riscontrato in ovociti di *Xenopus*, ma nettamente in contrasto con quanto osservato negli altri invertebrati marini in cui l'inibizione della sintesi proteica

provoca lo sblocco dall'arresto in M-I e la decondensazione dei cromosomi (Russo *et al.*, 1998).

Per quanto concerne il coinvolgimento del CSF nel processo di maturazione meiotica negli invertebrati, a tutt'oggi è stata identificata la chinasi Mos nella stella di mare, in cui sembra che Mos sia essenziale al mantenimento del blocco meiotico (Tachibana *et al.*, 2000), e un omologo di Mos è stato anche clonato in *Drosophila* (Ivanovska *et al.*, 2004) dove, tuttavia, la delezione del gene non impedisce il completamento meiotico, suggerendo l'esistenza di una *pathway* ridondante nella regolazione meiotica.

1.7 Attivazione ovocitaria e ruolo degli ioni calcio (Ca²⁺)

É ben documentato che il calcio (Ca²⁺) è coinvolto nei processi fisiologici ovocitari, dall'ovogenesi alla fecondazione (Homa 1993; Homa 1995; Stricker, 1999). Come già affermato nei precedenti paragrafi, il passaggio dal primo al secondo blocco meiotico è detto maturazione, mentre la rimozione del secondo blocco meiotico promossa dalla fecondazione è detta attivazione. L'attivazione comporta il completamento della seconda divisione meiotica caratterizzato dall'estrusione del secondo globulo polare prima dell'inizio delle divisioni embrionali. Alla fecondazione, infatti, l'ingresso dello spermatozoo nell'uovo provoca un aumento della concentrazione intracellulare degli ioni calcio, una caratteristica comune a tutte le specie

studiate finora (Whitaker, 1999). Una generale correlazione fra Ca^{2+} e GVBD è stata dimostrata da un cospicuo numero di studi. Negli ovociti di mammifero, la GVBD è bloccata da sostanze chelanti il Ca^{2+} almeno fino allo stadio di M-I (Homa, 1995).

Nel 1974 fu dimostrato per la prima volta che il Ca^{2+} ionoforo A23187 attivava le uova di echinodermi e criceto (Steinhart *et al.*, 1974). Nel 1977, fu misurata “l’esplosione” di Ca^{2+} successiva alla fecondazione in Medaka e riccio di mare utilizzando l’aequorina, una proteina luminescente che lega il Ca^{2+} (Steinhart *et al.*, 1974). Gilkey e collaboratori descrissero che l’ondata di calcio aveva origine dal sito di fusione tra lo spermatozoo e l’uovo e poi si propagava in tutta la cellula (Gilkey *et al.*, 1978). Nello scorso decennio, è stata scoperta una via biochimica che controlla il rilascio del Ca^{2+} nella contrazione muscolare, nella crescita cellulare, nella secrezione ormonale, nella percezione sensoriale e nel rilascio di neurotrasmettitori (Berridge, 1993). La sequenza di eventi di questa via biochimica riconosciuta anche negli ovociti, costituisce la cascata del fosfatidilinositolo. Secondo questo modello, un recettore proteico lega uno specifico ligando esternamente alla membrana, mentre internamente il legame recettore-ligando attiva una proteina che lega i nucleotidi guanosinici (proteina G). L’attivazione delle proteine G attiva delle fosfolipasi di tipo C che catalizzano l’idrolisi di del fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato in inositolo 1,45-trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). Per alcuni anni è stata ipotizzata l’esistenza di un fattore solubile, rilasciato dallo spermatozoo durante la fusione dei gameti, ritenuto responsabile

dell'attivazione ovocitaria. Nei mammiferi, tale ipotesi è stata confermata in seguito alla scoperta della fosfolipasi C zeta (PLC ζ) (Saunders *et al.*, 2002) che, attualmente è considerata come il fattore responsabile dell'attivazione ovocitaria nei mammiferi (*sperm factor*) anche se i meccanismi di azione di tale proteina non sono stati del tutto chiariti (Swann *et al.*, 2006). Nelle specie in cui la PLC ζ non è stata identificata, altri membri della famiglia delle PLC, in particolare le PLC γ (Runft and Jaffe, 2000; Runft *et al.*, 2002, 2004; Giusti *et al.*, 2003), sono stati proposti come mediatori del rilascio di Ca²⁺. La fecondazione, infatti, è associata ad un incremento delle PLC γ in uova di riccio di mare e rana (Rongish *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2000); allo stesso modo, nelle ascidie, e in altri invertebrati sembra che la PLC γ sia un attivatore della pathway dell'IP3 (Carroll *et al.*, 1997; Giusti *et al.*, 1999; Runft *et al.*, 2002).

In funzione della tipologia della propagazione del calcio intracellulare, possono essere distinte due categorie di uova: le uova di riccio di mare, anfibi, cnidari, nematodi e pesci che presentano una singola ondata di Ca²⁺ alla fecondazione e uova di alcune specie di molluschi, anellidi, ascidie e mammiferi che presentano ripetitivi aumenti della concentrazione di calcio intracellulare [Ca²⁺]_i. In quest'ultimo gruppo, la prima ondata di Ca²⁺ (detta onda di fecondazione) è generalmente seguita da onde ripetitive di più bassa durata e ampiezza (Dummollard *et al.*, 2002). Nelle uova di diverse specie tra cui il riccio di mare e i mammiferi (Epel, 1978), l'aumento della [Ca²⁺]_i, provoca l'esocitosi dei granuli corticali, un evento che comporta la formazione della membrana di fecondazione e contribuisce al blocco della polispermia.

Gli effetti immediati dell'attivazione ovocitaria e quindi dell'aumento di Ca^{2+} sono: rilascio dei granuli corticali, blocco della polispermia, reclutamento di mRNA materni, ripresa del ciclo meiotico (Schultz e Kropf, 1995). La ripresa del ciclo meiotico prevede l'attivazione di specifiche proteine chinasi che possono essere attivate dal Ca^{2+} sia in maniera diretta che indiretta. La prima chinasi ad essere attivata è la chinasi CaMKII la cui attivazione, promuove la degradazione della *cycB* attivando il proteasoma 26S in ovociti di ascidia (Kawachara e Yokosawa, 1994) e *Xenopus* (Aizawa *et al.*, 1996). Per poter essere degradata la *cycB* deve essere poli-ubiquitinata dall'APC/C e, prima dell'attivazione, è l'attività del CSF che previene questo processo mantenendo alta l'attività MPF, secondo meccanismi già descritti nei precedenti paragrafi. Due studi recenti effettuati su ovociti di *Xenopus*, hanno evidenziato che l'attivazione di una fosfatasi dipendente dal Ca^{2+} , la calcineurina (Mochida e Hunt, 2007; Nishyama *et al.*, 2007), contribuisce alla *pathway* Ca^{2+} -mediata responsabile della ripresa meiotica dopo la fecondazione. Dai primi risultati ottenuti da Mochida e Hunt sembra che Fizzy/Cdc20 sia la molecola *target* sulla quale agirebbe questa fosfatasi (Mochida e Hunt, 2007).

Un legame interessante tra MPF e oscillazioni di Ca^{2+} è stato messo in evidenza nelle ascidie.

Nelle ascidie, il primo evento di fecondazione è una variazione transitoria del potenziale di riposo, che depolarizza in seguito all'apertura di canali ionici aspecifici, detti canali di fecondazione (Dale e De Felice, 1984; Tosti, 1994). Questi ultimi danno vita a una corrente elettrica in entrata

(corrente di fecondazione), seguita da una contrazione del corpo cellulare che è un processo peculiare delle ascidie dovuto alla mancanza dei granuli corticali. La contrazione è dovuta all'onda di calcio, che attraversa l'ovocita dal polo vegetativo a quello animale (Brownlee e Dale, 1990). Questo processo è temporaneo e l'ovocita ritorna alla forma sferica entro circa un minuto. In seguito all'interazione con lo spermatozoo, probabilmente un fattore solubile rilasciato dallo sperma, induce l'innalzamento della $[Ca^{2+}]_i$. Questo fattore stimolerebbe da un lato la produzione di IP_3 e dall'altro quella di ADPr. (Wilding *et al.*, 1997). L' IP_3 indurrebbe il rilascio di Ca^{2+} intracellulare, necessario per l'attivazione di MPF e il completamento della meiosi II, mentre l'ADPr, molto probabilmente attivato dall'ossido nitrico (Grumetto *et al.*, 1997) aprirebbe un canale aspecifico sulla membrana plasmatica generando la corrente di fecondazione e potrebbe essere coinvolto nell'inattivazione di MPF tra meiosi I e meiosi II.

L'ovocita fecondato esce definitivamente dalla meiosi e inizia la segmentazione, con ripetute e veloci divisioni mitotiche embrionali senza accrescimento cellulare (Russo *et al.*, 1998). La fecondazione riavvia il ciclo meiotico facendo estrudere il primo e il secondo globulo polare nell'arco di 20 minuti circa. Dopo circa 50 minuti, lo zigote si divide per mitosi. Nel 1996 fu evidenziato che in *Ciona intestinalis*, la prima onda di fecondazione è seguita da tre oscillazioni di Ca^{2+} successive: la prima 5 minuti dopo la fecondazione (fase 1), la seconda compare al completamento della fase 1, a 9-10 minuti circa dalla fecondazione e qui (fase 2) i livelli di Ca^{2+} rimangono stabili per circa 10

minuti. Dopo circa 15 minuti dalla fecondazione è presente una seconda serie di oscillazioni (fase 3) che termina con l'estrusione del secondo globulo polare (Russo *et al.*, 1998). Lo stesso gruppo ha riportato che in ovociti di ascidia, alla fecondazione la *pathway* che coinvolge il NAD è attiva, sebbene con meccanismi differenti dalle altre specie. Due sono gli eventi che si verificano con l'ingresso dello spermatozoo nell'ovocita: le oscillazioni del calcio e l'inattivazione dell'MPF. Tuttavia tali variazioni non sembrano controllare il ciclo cellulare in M-I. L'inattivazione di Cdc2 a questo stadio infatti, è Ca^{2+} indipendente (Russo *et al.*, 1996), ma le successive oscillazioni di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sembrano essere necessarie per l'estrusione del primo globulo polare e per l'ingresso in M-II (Russo *et al.*, 1998). Tuttavia nello stesso anno Mc Dougall e Levasseur riportarono che vi è una stretta correlazione tra l'attività di Cdc2 e le oscillazioni di Ca^{2+} generate dallo spermatozoo e che il mantenimento dell'attività di Cdc2 prolunga tali oscillazioni (McDougall e Levasseur, 1998), mentre la seconda fase di oscillazioni è assente se viene inibita l'attività di Cdc2, che pertanto sembra essere sia necessaria che sufficiente a generare la seconda fase di oscillazioni di Ca^{2+} (Levasseur e Mc Dougall, 2000). Più di recente gli stessi autori hanno proposto un ulteriore modello per spiegare l'interazione tra l'attività di Cdc2 e le oscillazioni di calcio nella seconda fase (Schema in Fig 1.10). Essi propongono un modello in cui Cdc2 promuove la produzione di IP_3 in presenza di un fattore spermatico. Dopo la fecondazione, il fattore spermatico viene liberato nell'uovo innescando la prima fase di oscillazioni di Ca^{2+} . Tale fattore è poi inattivato attraverso un meccanismo

sconosciuto che provoca una pausa nell'ondata di Ca^{2+} e il successivo aumento dell'attività di Cdc2, durante la transizione metafase-anafase in M-I riattiva il rilascio del Ca^{2+} mediato dall'azione del fattore spermatico, la cui attività sarebbe regolata per fosforilazione diretta da parte di Cdc2 generando le oscillazioni della seconda fase (Levasseur *et al.*, 2007). Il declino dell'attività di Cdc2 prima dell'uscita dalla meiosi implica l'inattivazione del fattore spermatico e di conseguenza delle oscillazioni di Ca^{2+} . (Levasseur *et al.*, 2007)

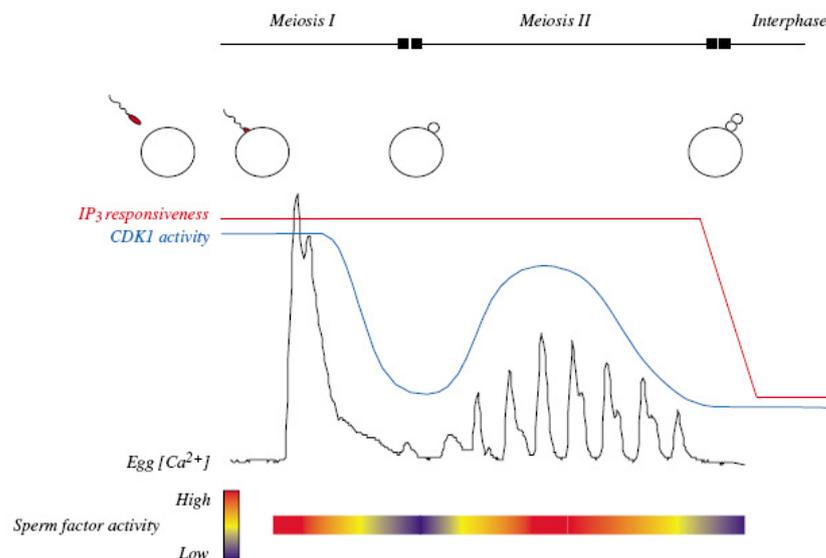


Fig. 1.9 Modello a “pacemaker” per l’attivazione mediata dal calcio in *C. intestinalis*. Il grafico in nero mostra un tipico *pattern* di oscillazioni di Ca^{2+} . L’attività Cdc2 descritta in McDougall e Levasseur, 1998 è riportata dal grafico in blu. La risposta al Ins(1,4,5)P₃ (Levasseur e McDougall, 2003) è indicata dalla linea rossa. L’attività dell’ipotetico fattore spermatico è riportata dalle barre colorate in basso, nella figura e correlate all’attività di Cdc2. (Da Levasseur *et al.*, 2007).

1.8 Ruolo di CK2 nel completamento meiotico

La proteina chinasi CK2 (in passato conosciuta come caseina chinasi 2) è una chinasi ubiquitaria, altamente pleiotropica e costitutivamente attiva che fosforila residui di serina/treonina e tirosina. Comparata ad altre proteine chinasi, CK2 possiede molteplici caratteristiche non convenzionali riguardo la sua organizzazione molecolare (Bouchou e Cochet, 2003). La complessità di questa proteina infatti, è già evidente a livello della sua struttura quaternaria. Purificata a partire da diversi organismi e tessuti, l'enzima si presenta sottoforma di un complesso proteico tetrameric (oloenzima) composto da due subunità catalitiche (α e/o α') e due subunità regolatorie (β) associate in modo diverso a formare un complesso $\alpha_2\beta_2$, $\alpha'\beta_2$ o $\alpha\alpha'\beta_2$. Nel genoma della maggior parte degli organismi sono presenti i due geni codificanti per le due isoforme della subunità catalitica (CK2 α e CK2 α'). L'oloenzima può dunque trovarsi a formare complessi di tipo $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta_2$, $\alpha'\beta_2$ (Litchfield, 2003) (Fig.1.10). Diversi studi hanno definito la sequenza minima di consenso di fosforilazione mediata da CK2 (Ser-X-X-acido) dove il residuo acido può essere Glu, Asp, P-Ser e P-Tyr (Pinna e Meggio, 1997). Esistono, numerose prove che attribuiscono a CK2 la capacità di fosforilare anche residui di tirosina (Tyr, Y); pertanto, CK2 può essere considerata una chinasi a duplice-specificità. CK2 rappresenta una chinasi che può utilizzare indifferentemente sia l'ATP sia il GTP come donatore di gruppi fosfato e contrariamente alla maggioranza delle proteine chinasi, la subunità catalitica di CK2 è costitutivamente attiva indipendentemente dall'associazione con la subunità β . In particolare, data la somiglianza tra le subunità α e α' non è possibile dai

semplici saggi di fosforilazione, condotti su CK2, determinare quali isoforme realmente contribuiscono all'attività analizzata (Bouchou e Cochet, 2003). CK2 α è fosforilato in siti all'interno del dominio C-terminale in un modo ciclo cellulare-dipendente, ciò implica che CK2 α e CK2 α' siano regolati in modo differenziale durante il ciclo cellulare. L'esame di CK2 isolata da cellule di mammiferi ha condotto all'identificazione di un certo numero di siti fisiologici di fosforilazione sia su CK2 α che su CK2 β . In cellule di mammiferi, la subunità β di CK2 è fosforilata nel sito di auto-fosforilazione ed in Ser209, un sito fosforilato in maniera dipendente dal ciclo cellulare (Russo *et al.*,1992).

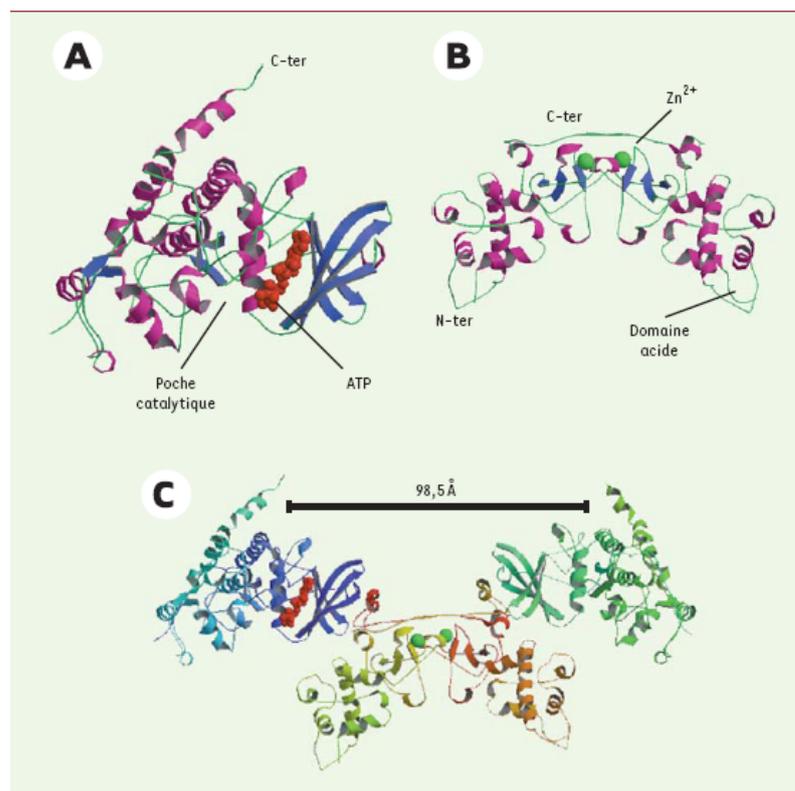


Fig. 1.10 Struttura della proteina CK2.(A) struttura della subunità catalitica.La struttura della subunità regolatrice (B) rivela l'esistenza di un dominio acido e un motivo zinc-finger responsabile della dimerizzazione della proteina. La struttura dell'oloenzima (C) mostra che le due subunità catalitiche non interagiscono tra loro. Una piccola regione di natura idrofobica , situata a livellodei foglietti β nel lobo superiore della subunità catalitica, interagisce con il dominio C- terminale delle due subunità regolatrici. (adattato da Bochou e Cochet, 2003)

L'esame della sequenza primaria di CK2 β non evidenzia particolari omologie con altre proteine conosciute. La sua struttura (Fig. 1.11B) rivela l'architettura di un dimero la cui interfaccia, si fonda su interazioni idrofobe all'interno di un motivo *zinc finger* (Chantalat *et al.*, 1998). La forte densità di amminoacidi conservati esposti sulla superficie di questo dimero suggerisce l'esistenza di domini di interazione per i numerosi partners di questa proteina. L'importanza di CK2 β deriva dal fatto che essa svolge delle funzioni indipendenti da CK2 α : per esempio può regolare l'attività di molteplici chinasi tra cui c-Mos o A-Raf (Chen e Cooper, 1997; Boldyreff *et al.*, 1997). CK2 β possiede un sito di autofosforilazione contenente Ser2, Ser3 e forse Ser 4 all'estremità N-terminale. CK2 β è inoltre fosforilata in Ser209 da Cdc2 in modo ciclo cellulare-dipendente. Oltre che i siti di fosforilazione, CK2 β contiene una sequenza in parte omologa al *destruction box* coinvolto nella degradazione mitosi-specifica della ciclina B.

Poco noto è il ruolo di CK2 nella regolazione meiotica. In ovociti di *Xenopus*, CK2 è, probabilmente, la chinasi più attiva la cui attività può essere incrementata dalle poliammine (spermina o spermidina) ed inibita dall'eparina (Leiva *et al.*, 1987; Osborne *et al.*, 1989). Inoltre, nell'ovario di *Xenopus*, l'mRNA per le subunità CK2 α e β è più abbondante di molti altri mRNAs ed aumenta durante l'ovogenesi, parallelamente all'aumento della attività enzimatica (Wilhelm *et al.*, 1995). In *Rana temporaria*, durante la maturazione ovocitaria, l'attività di CK2 aumenta 7 ore dopo somministrazione di progesterone e fino alla fase finale della maturazione suggerendo che CK2 ha

un ruolo importante nei meccanismi di traduzione durante la maturazione degli ovociti di rana (Kandror *et al.*, 1989). In contraddizione con questi dati, la microiniezione di CK2 altamente purificata in ovociti di *Xenopus* maturi, inibisce la progressione meiotica indotta dal progesterone (Mulner-Lorillon *et al.*, 1988). Durante la maturazione meiotica in *Xenopus*, Cdc2 fosforila diversi fattori incluso CK2, suggerendo che CK2 possa essere coinvolto nei processi di fosforilazione a cascata originati Cdc2 (Belle *et al.*, 1990). Gli stessi autori riportano che Cdc2 di *Xenopus* fosforila CK2 β *in vitro*, aumentando l'attività dell'oloenzima (Mulner-Lorillon *et al.*, 1990). Infine, diversi substrati di CK2 sono espressi in ovociti (Meggio e Pinna, 2003). Forti evidenze suggeriscono un ruolo per CK2 β indipendente dalla subunità catalitica nel processo di maturazione meiotica. In ovociti di *Xenopus* non fecondati, CK2 β lega e inibisce l'attività di Mos (Chen *et al.*, 1997; Chen e Cooper, 2006), la cui sequenza (52-115) di legame per CK2 β è stata evidenziata nel 2004 da Lieberman e Ruderman (Lieberman e Rudermann, 2004). La scoperta di un'attività biologica di CK2 β distinta dal suo ruolo di "subunità" regolatrice non è del tutto nuova, poiché CK2 β può avere una sua propria funzione di legame e sequestrare potenziali substrati per l'oloenzima (Litchfield, 2003), oppure è in grado di legare molecole non necessariamente fosforilate da CK2 α (Gotz *et al.*, 1996; Boldyreff e Issinger, 1997). Un coinvolgimento di CK2 nella maturazione meiotica è stato anche dimostrato in ovociti dell'ascidia *C. intestinalis*, dove è stata registrata una variazione dell'attività di CK2 α dopo la fecondazione indipendentemente da β che, sembra essere degradata alla

fecondazione; tuttavia il ruolo di tale attività e le molecole substrato di CK2 non sono ancora state identificate (Russo *et al.*, 2004)

Nel topo l'estrema omologia funzionale delle due isoforme CK2 α e CK2 α' spiega il perché gli animali in cui il gene CK2 α' è invalidato non sono vitali; ma CK2 α' rimane l'unica isoforma espressa durante gli ultimi stadi della spermatogenesi e l'invalidazione del gene da cui essa è codificata comporta l'insorgenza dell'infertilità maschile, dovuta ad un'alterazione della testa dello spermatidio che mima la globozoospermia umana (Xu *et al.*, 1999; (Bouchou e Cochet, 2003)

Recentemente, sono stati pubblicati importanti dati riguardanti il possibile ruolo di CK2 nello sviluppo embrionale (Dominguez *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2005). In *Xenopus*, la formazione dell'asse dorsale dipende dalla localizzazione asimmetrica della β -catenina, un trasduttore del *signaling* dipendente da Wnt (Dominguez *et al.*, 2005). Studi effettuati, per lo più in cellule somatiche, suggeriscono che CK2 regoli Wnt attraverso la fosforilazione di alcuni componenti della via inclusa la β -catenina (Song *et al.*, 2000). Seldin e coll. (Dominguez *et al.*, 2005) hanno riportato che CK2 è temporalmente e spazialmente espresso in fasi specifiche dello sviluppo di embrioni di *Xenopus* e partecipa alla formazione dell'asse dorsale. L'*over*-espressione dell'mRNA per entrambe le subunità di CK2 nei blastomeri ventrali è sufficiente a indurre la formazione di un asse ectopico completo, mimando il segnale di Wnt. Tale effetto di CK2 richiede una subunità catalitica enzimaticamente attiva, in quanto un mutante privo di attività

chinasica non è in grado di indurre la formazione ectopica dell'asse
(Dominguez *et al.*, 2005).

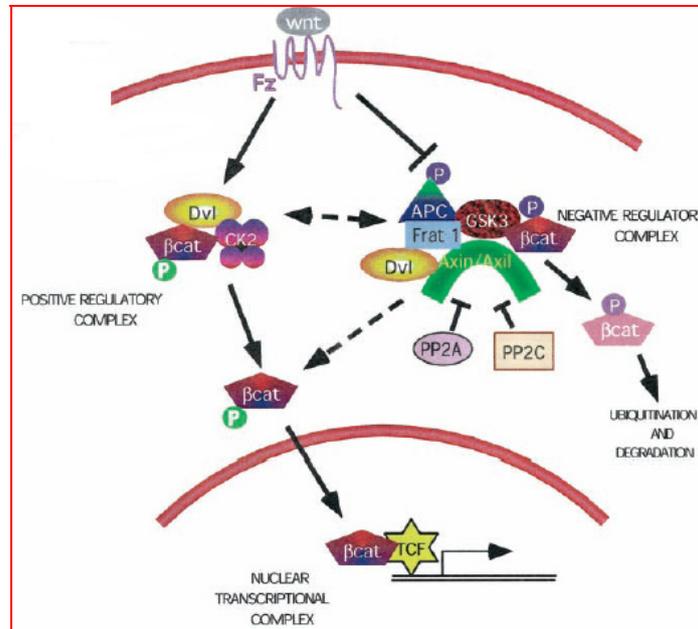


Fig. 1.11. Pathway canonica del Wnt signaling. Lo schema mostra l'interazione di CK2 con la β -catenina (spiegazione nel testo) (www.Wikipedia.com).

2. SCOPO DELLA TESI

Come precedentemente descritto, la maggior parte dei dati riguardanti la regolazione dell'MPF e del CSF durante il completamento della meiosi derivano principalmente dagli studi eseguiti in ovociti di *Xenopus*. Dal punto di vista fisiologico e molecolare, molti dei meccanismi regolativi della fecondazione e del completamento meiotico sono conservati nel mondo animale, così come è stato evidenziato da diversi studi condotti su invertebrati marini, principalmente molluschi (*Spisula*, *Ruditapes*, *Crassostrea*) ed echinodermi (stella di mare) (Longo *et al.*, 1983; Kyojuka *et al.*, 1997). Più di recente, è stato proposto un nuovo modello di studio rappresentato dall'ascidia *Ciona intestinalis* (Russo *et al.*, 1996; Satoh, 2003; Prodon *et al.*, 2006). Tutti questi organismi hanno in comune la formazione del II blocco in una fase precoce della divisione meiotica, tra la profase-I e la metafase-I, consentendo, quindi, lo studio più dettagliato delle diverse fasi che intercorrono tra meiosi-I e meiosi-II. Inoltre, l'ascidia presenta l'ulteriore vantaggio di poter studiare gli eventi biochimici e funzionali successivi alla fecondazione in relazione all'oscillazione dei livelli di Ca^{2+} (Russo *et al.*, 1998).

Scopo primario del presente progetto di ricerca è stato caratterizzare dal punto di vista funzionale e molecolare i complessi CSF ed MPF in ovociti dell'ascidia *Ciona intestinalis*. Per raggiungere questo

obiettivo è stato necessario studiare le chinasi principali responsabili dell'attività di CSF ed MPF nel processo di completamento meiotico. A tal riguardo, la Letteratura è ricca di informazioni da cui si evince una stretta relazione funzionale tra le chinasi Cdc2 (costituente dell'MPF), MAPK e CK2 (entrambe potenziali partners per l'attività CSF) nella regolazione del ciclo cellulare meiotico.

Come valore aggiunto del presente lavoro di tesi, è stato validato l'utilizzo dell'ascidia *Ciona intestinalis* quale modello sperimentale innovativo nello studio delle interazioni tra intercorrono tra le chinasi che regolano il completamento della meiosi e le fasi iniziali dello sviluppo successive alla fecondazione.

L'ascidia *Ciona intestinalis* (Subphylum *Urochordata*) è un modello sperimentale ampiamente impiegato in molti studi di biologia dello sviluppo (Satoh *et al.*, 1996; Satoh, 2003, Satou, 2003) in quanto si pone, dal punto di vista evolutivo, alla transizione tra invertebrati e bassi vertebrati. Alcuni dei vantaggi dell'utilizzo degli ovociti di *Ciona intestinalis* come modello di studio nel completamento meiotico sono di seguito riportati:

- Dopo la fecondazione, che avviene facilmente *in vitro* e non richiede una complessa attivazione e manipolazione dello sperma, si possono seguire entrambe le divisioni meiotiche e l'espulsione dei due globuli polari nell'arco di circa 30 minuti. Dopo 50 minuti circa si può

osservare la prima divisione mitotica dello zigote. La meiosi quindi si completa in tempi molto brevi rispetto ad altre specie conosciute;

- La fisiologia della fecondazione e dell'embriogenesi di *Ciona intestinalis* sono ampiamente conosciute. Sono inoltre attualmente disponibili numerosi dati e materiale di partenza (librerie genomiche e di cDNA, DNA, RNA) per il clonaggio di geni coinvolti nella regolazione meiotica;

- L' ovocita di *Ciona intestinalis* si presta ad essere facilmente microiniettato in quanto si può rimuovere la membrana accessoria esterna (corion) sia biochimicamente che manualmente con sottili aghi d'acciaio. Ciò consente un facile accesso alla membrana plasmatica;

- Gli ovociti di *Ciona intestinalis* presentano un elevato grado di sincronia (>90%); infatti, al momento dell'estrazione dall'ovario, si trovano in fase M-I e la ripresa della meiosi è facilmente indotta, in maniera naturale, dall'aggiunta degli spermatozoi senza necessità di ricorrere ad attivazioni artificiali (*pricking*, solventi, ecc.);

- La quantità di materiale ottenibile dagli esemplari di *C. intestinalis* (migliaia di ovociti) è sufficiente per poter intraprendere studi biochimici e molecolari;

- Dal 2002 è disponibile in rete una copia ancora parzialmente assemblata del genoma di *Ciona intestinalis* (Autori vari, 2003).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modello sperimentale: l'ascidia *Ciona intestinalis* (Fig 3.1)

Le ascidie sono invertebrati marini sessili, di forma cilindrica e ubiquitari.



Fig. 3.1 Colonie di *C. intestinalis*.

La classe degli ascidiacei é una delle tre classi appartenenti al subphylum degli Urocordati (Fig.3.2) e contiene circa 1600 specie. Le ascidie appartengono al gruppo degli Urocordati in quanto durante il loro sviluppo larvale presentano tre caratteristiche distintive, tipiche dei cordati: una notocorda, una corda nervosa dorsale cava e fessure faringee.

Phylum
 CHORDATA
Subphylum
 UROCHORDATA
 (UNICATA)
Classe
 ASCIDIACEE
Ordine
 ENTEROGONIA
Sottordine
 PHLEBOBRANCHIATA
Famiglia
 CIONINAE
Genere
 CIONA
Specie
 CIONA INTESTINALIS

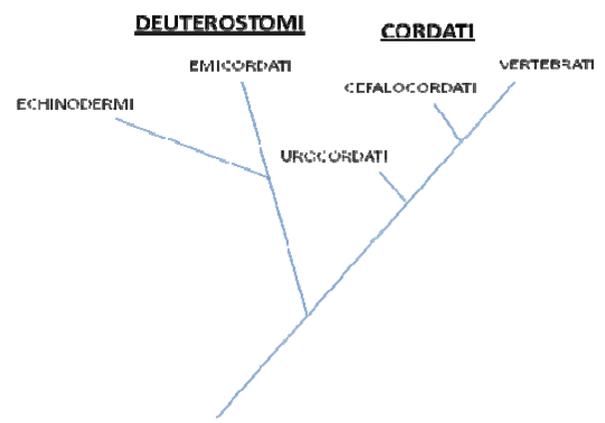


Fig. 3.2 Classificazione dell'ascidia *C. intestinalis* e albero filogenetico dei Cordati.

Le ascidie si trovano nelle acque costiere, attaccate con una estremità della loro struttura tubulare a vari substrati naturali e non. L'intero corpo di tale organismo è coperto da una tunica coriacea, da cui il nome *tunicati*. La tunica è composta principalmente da cellulosa, proteine e talvolta da spicole di calcio. I tunicati sono filtratori, cioè si nutrono del plancton che filtrano dall'acqua che attraversa la loro faringe. (Dale, 1989)

Attraverso il sifone inalante l'ascidia aspira l'acqua, che viene filtrata dal cestello branchiale. Il sifone esalante espelle l'acqua filtrata assieme alle feci e ai gameti. I movimenti dell'acqua sono assicurati dal battito sincrono di ciglia localizzate sul cestello branchiale. Le ascidie sono di solito ermafrodite con un unico testicolo e un unico ovario che giacciono in stretto contatto con l'ansa intestinale (Fig. 3.3).

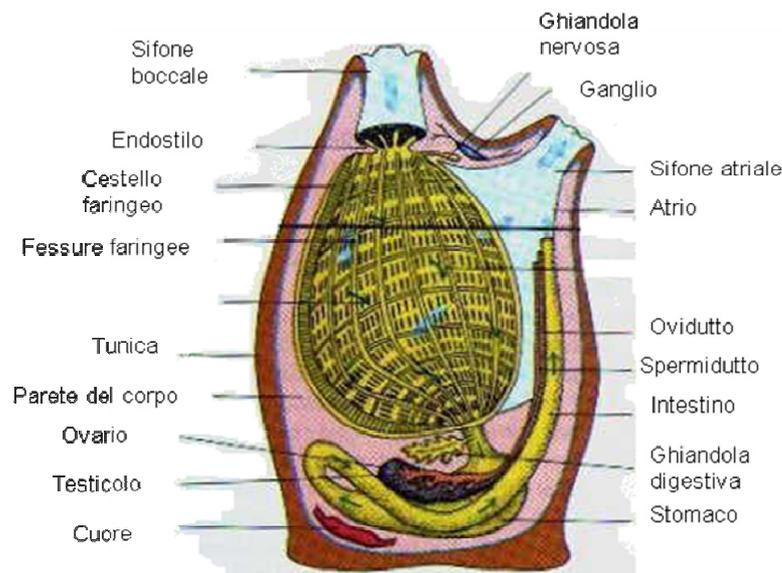


Fig. 3.3 Struttura dell'ascidia *Ciona intestinalis*.

La fecondazione avviene all'esterno. Dall'uovo fecondato nasce una larva natante, pelagica, simile a un girino, che dopo un periodo di vita libera si fissa al fondo e, attraverso una metamorfosi, si trasforma in una piccola ascidia (Fig 3.4). L'ovario è posizionato al di sopra dello stomaco ed è una struttura a forma di sacco con due strisce laterali, le aree germinali. Nell'ovario si possono rinvenire ovociti immaturi di varie dimensioni e a vari stadi di oogenesi (Satoh, 1994; Prodon *et al.*, 2006).

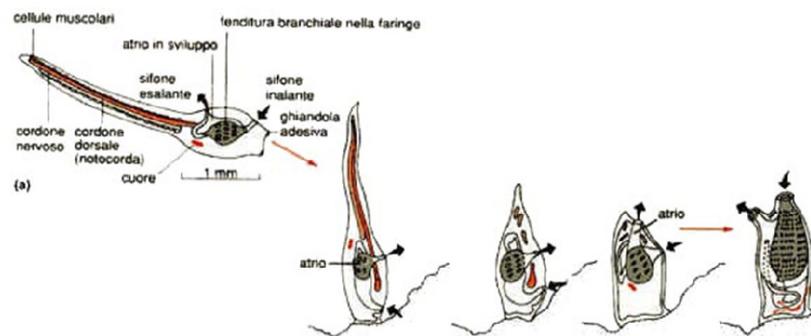


Fig. 3.4 Metamorfosi di un ascidiaceo (www.anisn.it).

Gli ovociti maturi sono trasportati nell'ovidutto, che corre parallelo all'intestino e sbocca nella cloaca di fronte all'ano. Il testicolo giace al di sotto dell'ovario ed è formato da un grappolo di piccole sacche che confluiscono nello spermidutto. Tale dotto si muove parallelamente all'ovidutto e si apre anch'esso nella cloaca. Gli ovociti esternamente presentano uno strato di cellule follicolari che circonda il corion. Tra il

corion e le cellule follicolari si trovano le così dette cellule testali (*testis cells*), la cui funzione è ancora ignota (Fig 3.5).

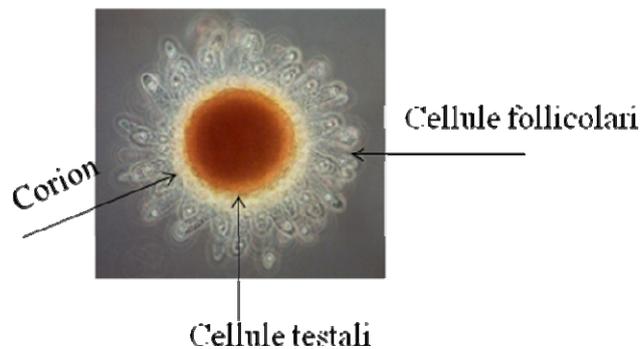


Fig. 3.5 Ovocita di *Ciona intestinalis*

3.1a. Prelievo delle cellule germinali e fecondazione *in vitro*

Gli esemplari dell'ascidia *Ciona intestinalis* da cui sono stati prelevati i gameti, sono stati forniti dalla Stazione Zoologica "A. Dohrn" di Napoli. Gli ovociti non fecondati (bloccati in M-I) e gli spermatozoi di *Ciona intestinalis* sono stati prelevati dall'ovidutto e dallo spermidutto mediante pipette Pasteur. Successivamente, il corion e le cellule follicolari sono stati rimossi mediante trattamento con una soluzione contenente 1% (peso/volume) di acido tioglicolico (Sigma) e 0,05 % (peso/volume) di pronase E ottenuta da *Streptomyces griseus* (Sigma) in acqua di mare filtrata, il pH è stato portato a 10,0 prima dell'utilizzo seguendo la procedura descritta (Sardet *et al.*, 1989; Prodon *et al.*, 2005). Gli ovociti

decorionati sono stati trasferiti in piastre contenenti acqua di mare e trattate con una soluzione allo 0,1% di gelatina-formaldeide per prevenirne la rottura per contatto con la superficie delle piastre. Gli ovociti così trattati, sono stati poi fecondati aggiungendo 2-3 gocce di spermatozoi diluiti 1:1000 in acqua di mare (Sardet *et al.*, 1989; Russo *et al.*, 1996).

3.2 Campionamento degli embrioni e saggi di attività chinasi

Saggi di attività enzimatica sono stati eseguiti per le tre chinasi CK2, MAPK e Cdc2 seguendo lo schema di seguito riportato per CK2 ed utilizzando substrati specifici per le diverse chinasi.

Aliquote di ovociti (circa 50-200 per campione) sono state prelevate a tempi differenti dalla fecondazione, posti in tubi da 1,5 ml, centrifugati per eliminare l'acqua di mare in eccesso e congelati a -80°C per il successivo saggio radiochimico. Per ogni tempo sperimentale, una piccola aliquota veniva posta su un vetrino porta-oggetto per verificare, mediante osservazione al microscopio stereoscopico, la fase dello sviluppo embrionale (contrazione, zigote, embrione a 2 cellule, 4 cellule, ecc.). Aliquote di ogni campione sono state scongelate e lisate aggiungendo 30 µL di buffer di lisi (LB150) costituito da 50 mM TRIS pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 mM ditiotreitolo, 10% glicerolo, 100 µg/ml

PMSF (*p*-nitrofenil-metil-sulfonil-fluoruro) ed un cocktail di inibitori di proteasi (Boehringer). Ciascun campione è stato poi centrifugato a 10000 rpm per 15 min; i supernatanti, contenenti i lisati cellulari, sono stati conservati a -80°C per le successive analisi.

3.2a Saggio radiochimico

Il saggio radiochimico relativo all'attività della chinasi CK2 è stato eseguito utilizzando circa 30 µg di proteine totali per ciascun campione. Ai lisati è stata aggiunta una miscela di reazione costituita da 2-5 µM [γ -³²P]ATP (1500-3000 cpm/pmol), un peptide substrato di reazione per CK2 alla concentrazione di 2 mg/ml (Boehringer), un tampone di reazione per CK2 (10 mM MOPS, pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 2 mM NaCl, 12 mM β -glicerolfosfato). Le reazioni sono state incubate a 30°C per 45 min, al termine dei quali è stata aggiunta una *stop solution* costituita da albumina sierica bovina (BSA, 10 mg/ml) e acido tricloroacetico (TCA, 10% v/v). Dopo incubazione per 30 min in ghiaccio e successiva centrifugazione a 14000 rpm per 15 min per eliminare le proteine precipitate, 2x25 µl per ogni campione sono stati pipettati su membrana P81 (Whatman) e lavati quattro volte con 500 µl di H₃PO₄ (75 mM). Infine, i pezzetti di membrana su cui resta adeso il peptide fosforilato e, quindi, radioattivo, sono stati posti in vials di plastica e posizionati in uno scintillatore β -

counter (Beckman) per misurare la radioattività incorporata (letture Cherenkov).

Per i saggi d'attività relativi alle chinasi Cdc2 e MAPK, si è proceduto in maniera analoga utilizzando i metodi descritti in Russo *et al.*, 1996.

3.3 Clonaggio dei cDNA CiCK2 α e CiCK2 β in un vettore di espressione

Come riportato in Russo *et al.* 2004, i due cDNA *full lenght* per *CiCK2A* e *CiCK2B* sono stati clonati nel sito EcoR-V del vettore plasmidico pMOSBlue (GE Healthcare; www.gehealthcare.com). Al fine di esprimere i due cDNA in *E. coli*, si è proceduto con il subclonaggio nel vettore pMAL-c2X (New England Biolabs; www.neb.com) seguendo le istruzioni allegate al kit. Il vettore pMALTM-2 (Fig. 3.6) permette l'espressione e purificazione di proteine mediante l'inserzione del clone d'interesse a valle dell'*open reading frame* del gene di *E. coli* malE che codifica per la proteina che lega il maltosio (MBP, *maltose binding protein*), con il risultato dell'espressione di una proteina di fusione. Il metodo, inoltre, permette la purificazione della proteina di fusione in una singola tappa utilizzando l'affinità del maltosio per l'MBP. Il vettore consente l'espressione del gene malE fuso al gene lacZ α gene. I siti di

restrizione inseriti tra *malE* e *lacZ* α consentono l'inserzione del gene d'interesse con conseguente interruzione del frammento codificante per la β -galattosidasi α ; ciò permette la selezione blu/bianco delle colonie su piastre contenenti Xgal.

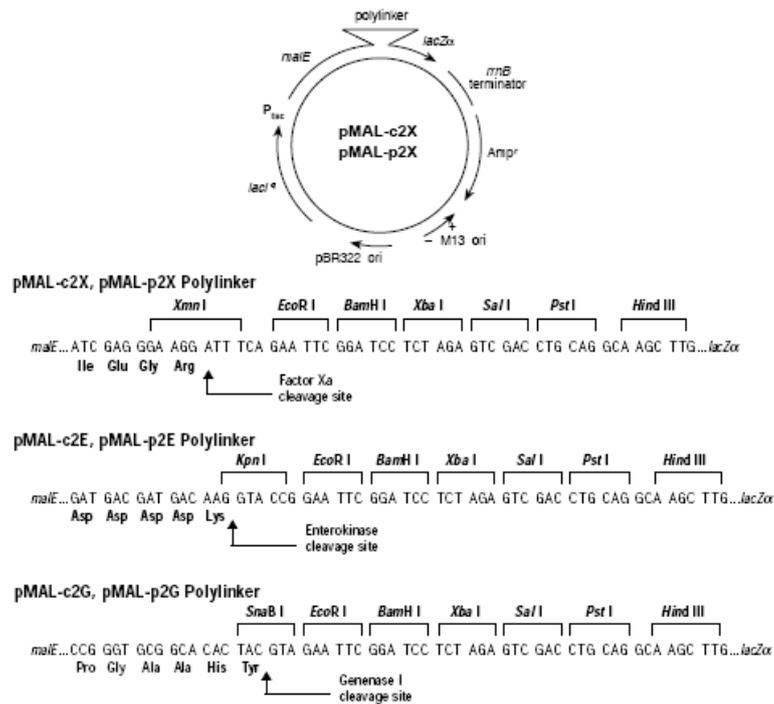


Fig. 3.5 Schema del vettore pMAL. Il vettore in figura è stato utilizzato per esprimere in *E. coli* le proteine CiCK2A e CiCK2B

In breve, per *CiCK2 β* il cDNA è stato estruso dal vettore pMOSBlue previa digestione con Hind-III e sublocato nel vettore pMAL-c2X precedentemente digerito con la coppia di enzimi di restrizione Xmn I e Hind III. Il vettore digerito ed il cDNA per *CiCK2 β* sono stati isolati ed eluiti dal gel di agarosio utilizzando un kit disponibile commercialmente

(Bio-Rad) e successivamente ligati utilizzando la T4 DNA ligasi e seguendo protocolli standard. I cloni positivi sono stati analizzati mediante PCR, amplificando il cDNA di CK2 β inserito pMAL con una coppia di *primers* localizzati sul vettore e forniti dal produttore. L'avvenuto clonaggio e la presenza del corretto *frame* di lettura è stato verificato mediante sequenziamento (le sequenze sono state eseguite dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica di Napoli). Per *CiCK2 α* si è seguita una procedura analoga. Per la purificazione, i batteri sono stati lisati mediante sonicazione in tampone A (20 mM tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitolo, 1 mM NaN₃) l'estratto grezzo è stato caricato su una colonna 2,5x10 cm di resina di amilosio precedentemente impaccata e lavata con 8 volumi di tampone A. Il campione è stato caricato a 1 ml/min ad una concentrazione di circa 2,5 mg/ml. Dopo lavaggio con 12 volumi di tampone A, si è passati ad eluire la proteina di fusione con tampone A addizionato con maltosio 10 mM. Sono state raccolte circa 10-20 frazioni di 3 ml il cui contenuto è stato analizzato mediante SDS-PAGE e colorazione con *Blue Coomassie* o colorazione all'argento. Le frazioni d'interesse sono state unite insieme e concentrate a circa 1 mg/ml utilizzando le unità filtranti Centricon e Centriprep dell'Amicon (www.amicon.it).

3.4 Immunoblotting

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. 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. Per ogni campione sono stati analizzati 50 µg di proteine totali. 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 TBS. Dopo l'incubazione la membrana è stata nuovamente lavata in 1X T-TBS e incubata nella soluzione di anticorpo

primario *over night* a 4 °C in agitazione. Gli anticorpi primari monoclonali e policlonali, anti-CiCK2- α e anti-CiCK2- β sono stati prodotti e acquistati dalla PRIMM (Primm, Milano). utilizzando come antigeni le proteine CiCK2- α -MBP e CiCK2- β -MPB espresse in *E. coli* e purificate per affinità. Gli anticorpi ottenuti 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 (GE Healthcare) 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, GE Healthcare) secondo il protocollo consigliato dal fornitore ed esposta al buio a lastre autoradiografiche (GE Healthcare). Per la determinazione del peso molecolare, le bande proteiche ottenute sono state confrontate con quelle di una miscela di proteine standard Precision Plus Protein (BioRad).

3.5 Preparazione degli estratti per il saggio CSF e microiniezione

Gli ovociti decorionati sono stati risospesi in una soluzione *intracellular-like solution* (ICS) contenente: 10 mM Hepes pH 7,5; 200 mM K₂SO₄; 20 mM NaCl; 200 mM sucrosio e i seguenti fattori stabilizzanti: 6 mM ATP; 10 mM NaF; 10 mM MgSO₄ and 1 mM β -mercaptoetanolo, in accordo con il protocollo originale proposto per preparare degli estratti CSF dagli ovociti di *Xenopus* (Sagata *et al.*, 1989).

Successivamente gli ovociti sono stati lisati mediante sonicazione e i lisati così ottenuti sono stati immediatamente micro iniettati in embrioni allo stadio di due cellule. Le restanti aliquote sono state conservate a -80°C.

Le microiniezioni sono state effettuate utilizzando il sistema Eppendorf transjector 5246 (Eppendorf, Hamburg, Germany) e la stima del volume iniettato corrisponde a circa 1-5 % (v/v) dell'ovocita. Le cellule e gli embrioni sono stati osservati all'invertoscopio (Nikon Eclipse TE300; Nikon, Melville, NY, USA) e le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale Nikon E995.

3.6 Real time PCR

La Real-time PCR (qPCR) è stata allestita utilizzando ABI PRISM 7000 sequence detector 20 system (Applied Biosystems) e SybrGreen (SYBR) come fluoroforo (Invitrogen). Il *software* "Primer3 output" (liberamente disponibile al sito http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) è stato utilizzato per progettare i *primers* utilizzati nelle reazioni di amplificazione. La coppia di primers per la subunità α (CK2 α RT-R, GAGGAAGTCAATCGCCTCTG, CK2 α RT-F; TTCGCATAGCCAAGGTTCTT) è stata progettata in modo da avere un amplificato di 175 bp. Gli stadi embrionali analizzati sono: ovociti vergini 2-, 4-, 16-cellule. Ogni reazione è stata allestita in triplicato ed effettuata

in *optical strip tubes* (Applied). La mix di reazione è costituita da 1 µl di cDNA (diluito 1:2 rispetto al materiale di partenza); 12.5 µl di Platinum SYBR Green qPCR super mix-UDG con Rox (Invitrogen) and 1 µl di primers (7,5 pmol). in 25 µl, di volume finale. Il protocollo di corsa prevede : denaturazione (95°C for 10 minuti), 40 cicli di amplificazione (15 secondi a 95°C; 1 minuto a 60°C). La specificità di ogni reazione di amplificazione è stata verificata mediante l'analisi della curva di *melting*. I dati ottenuti sono stati poi normalizzati in relazione all'mRNA della proteina ribosomale S-27; (controllo endogeno S27-F, AATCCACCCTTCACCTTGTG; S27-R, GGGAGATCTTGCCATTTTCA), la cui espressione rimane invariata durante gli stadi embrionali analizzati (Comes *et al.*, 2007) L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il metodo della curva standard. I livelli di espressione dei campioni sono stati espressi come differenza relativa (*n*-fold) rispetto al campione di ovociti.

3.7 Ibridazione *in situ*

Gli embrioni a vari stadi di sviluppo sono stati ibridati utilizzando probes per CK2 marcate con digossigenina. Gli ovociti e gli embrioni sono stati fissati in paraformaldeide al 4% e disidratati in soluzioni di etanolo 25%, 50% e 75% e conservati in etanolo 100% a -20°C. Dopo la

reidratazione, effettuata mediante incubazioni in etanolo al 75%, 50% e 25% in PBT (PBS più 0.1% Tween 20), i campioni sono stati trattati con 4 µg/ml proteinasi K in PBT, successivamente sono stati post fissati con 4% paraformaldeide in PBS per 30 minuti e lavati tre volte in PBT: quindi, si è proceduto all'incubazione nel buffer di preibridazione (50% formammide, 6x SSC, 5x Denhardt) per 1 h a 55°C. Successivamente il buffer di preibridazione è stato sostituito con il buffer di ibridazione contenente 0.4 ng/µl di probes senso/antisense marcate con digossigenina. La reazione di ibridazione è stata incubata per 16-20 h a 55°C. e successivamente gli embrioni sono stati lavati secondo la procedura descritta (Wada *et al.*, 1995) Dopo l'incubazione in 0,5% *blocking reagent* (Roche), i campioni sono stati incubati con un anticorpo anti-DIG 1:2000 e successivamente lavati con PBT. Gli RNAs ibridati sono stati rivelati utilizzando il detection kit (NBT, BCIP, Roche) seguendo le istruzioni riportate. Gli embrioni sono stati montati su vetrini e osservati utilizzando un microscopio ottico (ottica Nomarski, Axiophot, Zeiss).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 La pathway del CSF è conservata nel genoma di *Ciona intestinalis*

La possibilità di disporre del genoma della *Ciona intestinalis* ha stimolato la ricerca dei componenti della *pathway* del CSF (Mos-MAPK-p90^{Rsk} –APC/C, si veda Introduzione pag. 37) in tale organismo. Dalle sequenze ottenute dalla banca dati del genoma di *Ciona intestinalis* (<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html>) è stato identificato il clone estExt_fgenes3_pg.C_chr_02q0412 (*Ci-mos*, proteina ID: 286560) collocato sul cromosoma 02q:1706162-1708970, la cui sequenza proteica (Fig. 4.1 e B), analizzata mediante il software BLAST che cerca omologie tra sequenze note (Altschul *et al.*, 1997; Altschul, 2005), è risultata omologa a c-Mos sia di vertebrati che di invertebrati.

```
1  NSSPI3KFRSFRIFT3ASPXFAASRFVFDQ3V I3K3QSSPALTSACVARSVRTPPTKSKSPGACSTPMVKQAQNRCTGLVDEV
71  YPQRSFTPSKI3SRVKNNISPYKYLCLTSRKEHLGVSDGLSYKPKPNA?KRKDSFYSAKNRSPCPRRRC3VPSTSVAPTNTPKND
141  GKIFRLSGVSLSPSTVSWTAEEI?VQFVSDTTTSSQSPFRWNSCSDGCSHRLQAHVEQCFPGKLYFWEDDESELETAIQLRGGF
211  GRVFEIGNYRGOKVAIKKLENASKSROAILETNQGMYGLRLQHLNIVHTLVYVMDPTFSPENKNPSNTCYVVMHAGNRNLTQLLN
281  NSDEEISMGRKIRFASDILQGITTYLHERRLVHLDLKPNSVI?VSEDTC?KCD?FGSC?SISSPRLNQPNSQLNTRSGISLDNRD
351  ANTSQACD5AINGSTSYMSFSSTGSAHSSCLMGTFFYRAPELLRGFFPTTKAD IYSPGITAWQLWSRQOPYAGQHNHAAVPSVV
421  AFGSRPKTPDYNDYCDI.AEASSI.KQYFDVVTSC?NADADI.RPTA?QATAA.AKC
491
561
```

Fig. 4.1 A Presenza di Mos-like nel genoma di *C. intestinalis*. La sequenza deriva dal sito JGI dedicato alla *C. intestinalis* ed è stata ottenuta cercando in BLAST sequenze omologhe con le chinasi Mos da invertebrati e vertebrati. Le sequenze cerchiate indicano i domini funzionali conservati

È da notare che *Ci-Mos* possiede dei residui/domini caratteristici delle proteine chinasi; infatti, come si evince dalla Fig. 4.1B il dominio catalitico (circa 270 amminoacidi) conservato in tutte le proteine chinasi (residui 249-556) è presente anche in *c-Mos*. Inoltre, residui essenziali per l'attività chinasica quali, il *loop* di glicine (residui 251-256) e l'aspartato del sito catalitico (residuo 374; Fig 4.1A) sono anch'essi perfettamente conservati. L'allineamento di alcune sequenze di *Mos* omologhe riportate in Fig. 4.1B (effettuato con l'algoritmo MegAlign incluso nel *software* DNASTAR), ha indicato che *Ci-Mos* presenta il 48-50% di similarità e il 30-36% di identità con le proteine omologhe ottenute rispettivamente da invertebrati e vertebrati quali ad esempio l'anemone di mare *Nematostella vectensis* (XP_001630390) e il riccio di mare *Strongylocentrotus purpuratus* (XP_789415) i cui genomi sono stati pubblicati di recente (Putnam *et al.*, 2007; Sodergren,*et al.*, 2006); lo *Xenopus* e l'uomo (NP_001081563 e NP_005363 rispettivamente). Tutte le informazioni ottenute dagli allineamenti delle sequenze proteiche sono riportate in Tabella 1. *Ci-Mos* è caratterizzato da una regione N-terminale situata a monte del dominio chinasico che non presenta alcuna omologia con le sequenze di *Mos* da altre specie (Fig. 4.1B). Tale regione (residui 1-248) di *Ci-Mos* mostra una similarità del 47% e un'identità del 30% con la proteina BIR di *Aspergillus clavatus* (XP_001268852), coinvolta nel processo di segregazione cromosomica. Al momento il significato biologico di tale omologia e il ruolo fisiologico della regione N-terminale di *Ci-Mos* non è noto. Infine, i residui 231-297 di *Ci-Mos* mostrano un'identità del 32% e una

similarità del 56% con la sequenza omologa da *Xenopus* (residui 50-116) (Fig. 4.1B) coinvolti nel legame con la subunità regolatrice, β , di CK2 che interagisce con Mos inibendone l'attività (Lieberman e Ruderman, 2004; Chen e Cooper, 1997; Chen *et al.*, 1997).

Utilizzando la stessa strategia, si è proceduto ad individuare la presenza nel genoma di *Ciona* delle altre componenti proteiche note della *pathway* CSF attiva nei vertebrati (principalmente *Xenopus*). Dalle sequenze isolate emerge che i geni codificanti per le proteine MAPK (Fig. 4.2), MEK1 (Fig. 4.3), p90^{Rsk} (Fig. 4.4), Bub1 (Fig. 4.5), Cdc20 (Fig. 4.6) sono conservati in *Ciona intestinalis*. In Tabella 1 sono riassunti i dati ottenuti dal confronto tra le sequenze proteiche di *Ciona* e *Xenopus* per ogni componente della *pathway*. La percentuale di similarità tra i due organismi per MEK1, MAPK, e p90^{Rsk} è relativamente alta (73, 91 e 83%, rispettivamente). L'osservazione che anche Bub1 e Cdc20/p55^{CDC}/Fizzy sono conservati in *Ciona intestinalis* (51 e 66% di similarità rispetto a *Xenopus*) (Fig. 4.5 e 4.6 e Tabella 1) mentre non si trova traccia di omologhi di Emi1/Emi2 suggerisce che, negli Urochordata, la *pathway* Mos/MEK1/MAPK/p90^{Rsk}/Bub1/Cdc20/APC/C potrebbe essere preferita rispetto alla Mos/MEK1/MAPK/p90^{Rsk}/Emi-Erp/Cdc20/APC/C che controlla il blocco in M-II nei vertebrati (Schmidt *et al.*, 2006). In accordo con alcuni autori, tale evidenza suggerisce che mentre in *Xenopus*, e probabilmente in altri vertebrati, le due *pathways* potrebbero essere ridondanti e coesistere, negli invertebrati, la via di Bub1 potrebbe essere quella “preferita” per assicurare un CSF stabile.

```

1  M S D K R P - - - - - P E V V R G Q V F D V A P R Y T S L S Y I G E G A Y G M V C S A T D G Q N G Q K V A I K K I S P F E H Q T Y C Q R MAPK ciona.P
1  M A A A G A A S N P G G G P E M V R G Q A F D V G P R Y I N L A Y I G E G A Y G M V C S A H D N V N K V R V A I K K I S P F E H Q T Y C Q R MAPK xenopus

64 T L R E T R I L I S F N H E N I I S I K D I I R A P T L A E M K D V Y I V Q D L M E T D L Y K L L K T Q H L S N D H I C Y F L Y Q I L R G L MAPK ciona.P
71 T L R E I K I L L R F K H E N I I G I N D I I R A P T I E Q M K D V Y I V Q D L M E T D L Y K L L K T Q H L S N D H I C Y F L Y Q I L R G L MAPK xenopus

134 K Y I H S A N V I H R D L K P S N L L L N T T C D L K I C D F G L A R V A D P E H D H T G F L T E Y V A T R W Y R A P E I M L N S K G Y T K MAPK ciona.P
141 K Y I H S A N V L H R D L K P S N L L L N T T C D L K I C D F G L A R V A D P D H D H T G F L T E Y V A T R W Y R A P E I M L N S K G Y T K MAPK xenopus

204 S I D I W S V G C I L A E M I S N R P I F P G K H Y L D Q L N H I L G I L G S P S E E D L N C I I N E K A R A Y L M S L P N K P R L S W S R MAPK ciona.P
211 S I D I W S V G C I L A E M L S N R P I F P G K H Y L D Q L N H I L G I L G S P S Q E D L N C I I N L K A R N Y L L S L P H K N K V P W N R MAPK xenopus

274 L Y S K A D E K A L D L L D R M L T F N P T K R I N V D D A L A H P Y L E Q Y Y D P A D E P V T E K P F T F E E E F D D L P K E R L K E L I MAPK ciona.P
281 L F P N A D P K A L D L L D K M L T F N P H K R I E V E A A L A H P Y L E Q Y Y D P S D E P V A E A P F K F E M E L D D L P K E T L K E L I MAPK xenopus

344 F Q V S - - - P C R MAPK ciona.P
351 F E E T A R F Q P G Y MAPK xenopus

```

Decoration 'Decoration #1': Box residues that match the Consensus exactly.

Fig. 4.2 Confronto tra le sequenze proteiche di MAPK da *C. intestinalis* e *X. laevis*. L'allineamento è stato eseguito mediante l'impiego del programma MegAlign incluso nel software DNASTAR . Le sequenze cerchiato indicano i residui conservati . Le percentuali di identità e similarità sono riportati in Tabella 1. Gli asterischi (*) su Thr-181 e Tyr-183 indicano i siti di fosforilazione conservati necessari all'attività chinasi

```

1  M P - K K K P T P I Q L N P N P E G T A V N G T P T A E T N L E A L Q K K L E E L E L D E Q Q R K R L E A F L T Q K Q K V G E L - - - K D D MEK xenopus
1  M P P K R K L N P L N L - - - - - T L E G S S P I P N Q Q V S D L G K K M D E L N I D E T Q R K R L D Q F I K Q K Q K V G V M E N A Q N S MEK ciona.P

67  D F E K V S E L G A G N G G V V F K V S H K P T S L I M A R K K L I H L E I K P A I R N Q I I R E L Q V L H E C N S P Y I V G F Y G A F Y S D MEK xenopus
65  D F T K K G E L G A G N G G V V H L V V H N A T G F V M A R K K L I H L E V K Q A I L N Q I T R E L Q V L H D C R S P Y I V G Y Y G T F Y S D MEK ciona.P

137  G E I S I C M E H M D G G S L D Q V L K K A G K I P E K I L G K V S I A V I K G L T Y L R E K H K I M H R D V K P S N I L V N S R G E I K L MEK xenopus
135  G E I S I C M E S M D A G S L D L V L K K A R K I P E I Y L G K V S K A V I L G L K Y L R E E R S I I H R D V K P S N I L V N S R G E I K L MEK ciona.P

207  C D F G V S G Q L I D S M A N S F V G T R S Y M S P E R L Q G T H Y S V Q S D I W S M G L S L V E M A I G R Y P I P P P D A K E L E L I F G MEK xenopus
205  C D F G V S G Q L I D S M A N S F V G T R S Y M A P E R L Q G S K Y T I L S D I W S L G L S L I E M A I G R F P I P P P T A S Q I A A I F N MEK ciona.P

277  C S V E R D P A S S E L A P R F R P P G R P I S S Y G P D S R P P M A I F E L L D Y I V N E P P P K L P S G V F G A E F Q D F V N K C L V K MEK xenopus
275  T E V - - - S G G S G K A P N P H D V A R - - - - - - - - - - P M A I F E L L D Y I V N E P A P K L P Q G I F E K D F C D F V A S C L K K MEK ciona.P

347  N P A E R A D L K Q L M V H S F I K Q S E L E E V D F A G W L C S T M G L K Q P S T P T H A A G V MEK xenopus
331  E P K E R S D L G E L M K A P F I K N V S L T Q Y E F A K W V C S T M G L K A P S P D T V P D MEK ciona.P

```

Decoration 'Decoration #1': Box residues that match the Consensus exactly.

Fig. 4.3 Confronto tra le sequenze proteiche di MEK1 da *C. intestinalis* e *X. laevis*. L'allineamento è stato eseguito mediante l'impiego del programma MegAlign incluso nel software DNASTAR. Le sequenze cerchiato indicano i residui conservati. Le percentuali di identità e similarità sono riportati in Tabella 1.

```

1  M P L A Q L A D P W Q K V P V Q K V E S E N G Q Q F A D E S M C E E D N E N N D E G N I N E I A I T H H V K E G H E K A D P S Q F E L L K V rsk xenopus
1  M P L A P F G N A - - - P F V N S A N T Q P L T E E Q E D E M A V D T V E I K D E - Q M H E I E I K E N T I K G C Q K A D P S Q F E L L K V rsk ciona.P

71  L G Q G S F G K V F L V R K I S G T D A G Q L Y A M K V L K K A T L K V R D R V R T K M E R D I L V E V N H P F I V K L H Y A F Q T E G K L rsk xenopus
67  L G Q G S F G K V F L V R K I V G N D R H Q L Y A M K V L K K A K L K V R D R V R T K M E R N I L V D V N H P F I V K V Y Y A F Q T D G N L rsk ciona.P

141  Y L I L D F L R G G D L F T R L S K E V M F T E E D V K Y Y L A E L A L A L D H L H S L G I I Y R D L K P E N I L L D E E G H I K L T D F G rsk xenopus
137  Y M V L A Y L R G G D L F T R L S K E L M F T E D D V K I Y L A E L A L A L D H L H S L G I I Y R D L K P E N I L L D V D G H I A L T D F G rsk ciona.P

211  L S K E S I D H E K K A Y S F C G T V E Y M A P E V V N R R G H T Q S A D W W S F G V L M F E M L T G T L P F Q G K D R K E T M T M I L K A rsk xenopus
207  L S K E S T D G S E K A Y S F C G T V E Y M A P E V V N R R G H D H S A D W W S F G V L M Y E M L T G Q L P F Q G R D R K D T M T Q I L K A rsk ciona.P

281  K L G M P Q F L T P E A Q S L L R M L F K R N P T N R L G A G P D G V E E I K R H P F F V T I D W N K L F R R E I Q P P F K P A T G G P E D rsk xenopus
277  K L G M P Q F L S P E A Q S L L R M L F K R N P A N R L G S G S D G V E E I K R H P F F S G I D W N R L L R K D I D P P F K P S A S R A E D rsk ciona.P

351  T F Y F D P E F T A K T P K D S P G I P A S A N A H Q L F R G F S F V A I S S E D E N - - Q A M Q T V G V H A I V P - - - - - - - - rsk xenopus
347  A T Y F D S E F T S R T P R D S P G V P A S A A A Q Q L F R G F S F V A P I I E E D A V G T A Q E E V K K N P A I P Q R D L S G T A L L T N rsk ciona.P

407  - L H R N S I Q F T D G Y E L K E D I G V G S Y S I C K R C I H K G T N M E Y A V K I I D K S K R D P T E E I E I L L R Y G Q H P N I I T L rsk xenopus
417  R L N N S P K K F Y D E Y D V R E E I G I G S Y S V C K R C I H K G T K K E Y A V K I I F K N K R D C E E E V Q I L L R Y G Q H P N I I T L rsk ciona.P

476  K D V Y D D G K Y V Y L V T E L M K G G E L L D K I L R Q K F F S E R E A S A V L H T I T K T A E Y L H S Q W V V H R D L K P S N I L Y V D rsk xenopus
487  K D V F D D G Q H V F L V T E L M K G G E L L D K I L R Q K F F T E K E A S A V L K T V A K V V V Y L H K N G V V H R D L K P S N I L Y A D rsk ciona.P

546  E S G N P E S I R I C D F G F A K Q L R A E N G L L M T P C Y T A N F V A P E V L K R Q G Y D A A C D I W S L G V L L Y T M L T G Y T P F A rsk xenopus
557  E T G N P E S L R V C D F G F A K Q L R H D N G L L M T P C Y T A N F V A P E V L K K K G Y D E A C D I W S L G V L L Y T M L A G Y T P F A rsk ciona.P

616  N G P E D T P E E I L A R I G S G K F S L S G G Y W N S V S D I A K D L V S K M L H V D P H Q R L T A A Q V L K H P W I V H C D Q L P Q F Q rsk xenopus
627  N G P D D T P T D I L K R I E T G K F N M S G G N W K S V S E T A K D L V R R M L H V D P N R R L S A P Q V L M H S F I A R P D Q L P E F H rsk ciona.P

686  L N R Q D A P H L V K G A M A A T Y S A L - N L N P M S P V L A P V G R S T L A Q R R G V K K I T S T A L rsk xenopus
697  L N Q S K D Y K F V K G A M S A M F S A A R S H K P L N - - L N P V G T S L L A Q R R G A K K V T S T A L rsk ciona.P

```

Decoration 'Decoration #1': Box residues that match the Consensus exactly.

Fig. 4.4 Confronto tra le sequenze proteiche di p90^{Rsk} da *C. intestinalis* e *X. laevis*. L'allineamento è stato eseguito mediante l'impiego del programma MegAlign incluso nel software DNASTAR. Le sequenze cerchiato indicano i residui conservati. Le percentuali di identità e similarità sono riportati in Tabella 1.

```

1  M A - Q F A F E T D I N S I L K L D T P I T N A P L A R W Q R K A K E - G N C - - - - - S L N T S A N T S - T M S P M K T S N R S H S cdc20 xenopus
1  M S S Q F D F E N E V N S L V R M D K P L Q A G P I A R W Q R K A N D L S G C G N L S L H N K S L N V S H H L S L N I S P S K N R S M S Q S cdc20 ciona.P

60  S S K T P S - - - - - K T P G K - - - S G Q K M Q G T P S R A G G D R F I P N R S A M Q M D V A S F L L S K E N E P T D T S P T K cdc20 xenopus
71  V N K T P G S T R T P T S G K N K T P G K L K P S S K N S S L N R T P G H G D R F I P N R Q A T N F E L G H Y R I V S E N G D Q E N S G S L cdc20 ciona.P

117 K E Q Q K A W A M N L N - - - - G F D M E E A K I L R L G G R P Q N A P E G Y Q N N L K V L Y S Q K N T P G S S K K T G R Y I P S M P D R cdc20 xenopus
141 A Q E D Y K R R M S E N L Q R A S G I G G G E - R I L A F K A R P A - A A E G Y H N N T K V L Y S S C K K S M A D R K K T R H I P T T A S R cdc20 ciona.P

182 V L D A P D I R N D Y Y L N L I D W S S Q N A L A V A L N D S V Y L W N Y A T G D I I L L L Q M E N S E E Y I S S V S W I K E G H F L A V G cdc20 xenopus
209 L D A P D L G N D F Y L N L L D W S S T N Q L A V V L G P S V Y L W D A S C G D I T M L M T M E G E N E Y V S S V K W M P D G E H I A I G cdc20 ciona.P

252 T S N S E V Q L W D V Q Q Q K R L R N M I S H S S R V G A L S W N N H I L S S G S R T G H I H H H D V R V A Q H H V S T L T G H T Q E V C G cdc20 xenopus
279 N S D A E V Q L W D V A A S K R M R N M K S H A A R V C S L S W N E Y I L S S G S L D G F I H H H D V R V P D H H V A T L T G H S Q E V C G cdc20 ciona.P

322 L K W S P D G R Y L A S G A N D N L V N V W P C V Q G D S G E F S P V Q T F T Q H Q G A V K A V A W C P W Q S N V L A T G G G T S D R H I R cdc20 xenopus
349 L E W S K D G H H L A S G S N D N I V N V Y S H M D T K - - - - P M Y S F T D H Q S A V K A I A W C P W Q S N V L A S G G G S A D R H I R cdc20 ciona.P

392 I W N V C S G T C L N S V D T H S Q V C S I L W S A N Y K E L I S G H G F A Q N Q L V L W K Y P T M T R V S E L K G H T A R V L N L A M S P cdc20 xenopus
414 F W N T H N G S C I K S V D T K S Q V C A L K W S T H Y K E I V S S H G Y V H N Q L T I W S Y P S M H W V Q D L M G H T S R V L Y L A M S P cdc20 ciona.P

462 D G C T V A S A A A D E T L R L W K C F E V D P V T K K E - K E K S R S S K S I I H Q - - S I R cdc20 xenopus
484 D G Q T V C S G A A D E S L R L W D C F A V D P S S K K K T K T P S T A T S S K I N T L F S I R cdc20 ciona.P

```

Decoration 'Decoration #1': Box residues that match the Consensus exactly.

Fig. 4.6 Confronto tra le sequenze proteiche di Cdc20/p55^{CDC}/Fizzy da *C. intestinalis* e *X. laevis*. L'allineamento è stato eseguito mediante l'impiego del programma MegAlign incluso nel software DNASTAR. Le sequenze cerchiato indicano i residui conservati. Le percentuali di identità e similarità sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1

La tabella riporta i dati dell' allineamento delle sequenze amminoacidiche effettuati sulle sequenze dei componenti della *pathway* del CSF di *C. intestinalis* con le sequenze ottenute da altri organismi di cui si dispone del genoma.

Proteina	Organismo	N° accesso	Lunghezza sequenza	Sequenza allineata	Identità %	Similarità %	Gaps %
Mos	<i>C. intestinalis</i>	286560	564	--	--	--	--
	<i>N. vectensis</i>	XP_001630390	312	324	36	50	55
	<i>S. purpuratus</i>	XP_789415	418	326	34	50	63
	<i>H. sapiens</i>	NP_005363	346	346	30	48	19
	<i>X. laevis</i>	NP_001081563	359	331	31	48	14
MEK	<i>C. intestinalis</i>	390005	377	341	65	73	4
	<i>X. laevis</i>	Q05116	395				
MAPK	<i>C. intestinalis</i>	284908	350	338	84	91	0
	<i>X. laevis</i>	NP_001083548	361				
p90^{Rsk}	<i>C. intestinalis</i>	216959	747	705	72	83	2
	<i>X. laevis</i>	NP_001084222	737				
Bub 1	<i>C. intestinalis</i>	230539	657	189	26	51	8
	<i>X. laevis</i>	AAK12628	1136				
Cdc20/p55^{CDC}	<i>C. intestinalis</i>	2834581	531	513	51	66	7
	<i>X. laevis</i>	AAH42288	506				
Fizzy							

4.2 Caratterizzazione del CSF in *Ciona intestinalis*

Come affermato nei precedenti paragrafi, la presenza del CSF in ovociti di invertebrati non è stata mai chiaramente dimostrata. Dati pregressi del nostro gruppo di ricerca, successivamente confermati e ampliati da altri autori, hanno portato alla caratterizzazione dell'MPF in *Ciona intestinalis* e allo studio dell'oscillazione dell'attività di Cdc2 nel completamento meiotico dopo la fecondazione ed in relazione agli *spike* di calcio (Russo *et al.*, 1996; McDougall e Levasseur, 1998; Levasseur e McDougall, 2000; Levasseur *et al.*, 2007). La presenza di un MPF attivo in ovociti arrestati in metafase può essere considerata come una prova indiretta dell'esistenza di un'attività CSF in ovociti di *C. intestinalis*. A ciò si aggiungono altri dati riguardanti la diminuzione dell'attività MAPK dopo la fecondazione (Russo *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 2004) che suggerisce come l'inattivazione di MAPK possa rappresentare un'evidenza biochimica della perdita di funzione del CSF in *Ciona*. Infatti, MAPK si presenta alta in ovociti bloccati in M-I, dove le attività CSF e MPF sono elevate (Fig 4.7). Subito dopo la fecondazione, l'enzima è inattivato probabilmente mediante defosforilazione dei siti Thr¹⁸¹ e Tyr¹⁸³ (corrispondenti a Thr¹⁸⁸ e Tyr¹⁹⁰ in *Xenopus* e Thr²⁰² e Tyr²⁰⁴ nell'uomo (Figg. 4.7B e 4.2) (Russo *et al.*, 2004), mentre l'espressione della proteina non cambia (Fig 4.7 C).

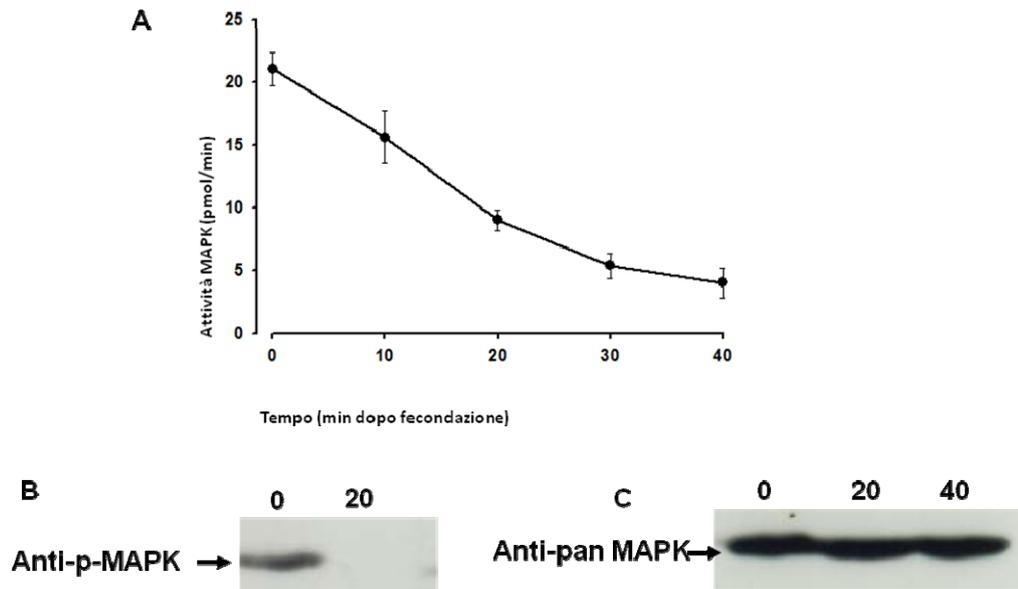


Fig. 4.7 Attività MAPK in ovociti di *C. intestinalis*. Gli ovociti decorionati sono stati fecondati e raccolti ai tempi indicati e lisati. **A.** l'attività MAPK è stata determinata impiegando 50 µg di lisati. Le bande di errore rappresentano tre esperimenti separati. **B.** e **C.** Aliquote da 50 µg di lisati cellulari sono stati separati mediante SDS-PAGE e incubati con un anticorpo diretto contro la forma fosforilata di MAPK.

Per dimostrare l'esistenza di un'attività CSF in *Ciona intestinalis*, sono stati verificati i criteri stabiliti da Masui e collaboratori per uova di *Xenopus laevis*: 1) il CSF appare durante la maturazione ovocitaria, 2) è presente durante il blocco in M-II, 3) non dipende dalla sintesi proteica 4) è degradato alla fecondazione (Masui, 2001). Pertanto, sono stati preparati degli estratti di ovociti di *Ciona* non fecondati (bloccati in metafase I) per la microiniezione in embrioni a due cellule al fine di verificarne la capacità di bloccare la divisione seguendo lo schema riportato in Figura 4.8.

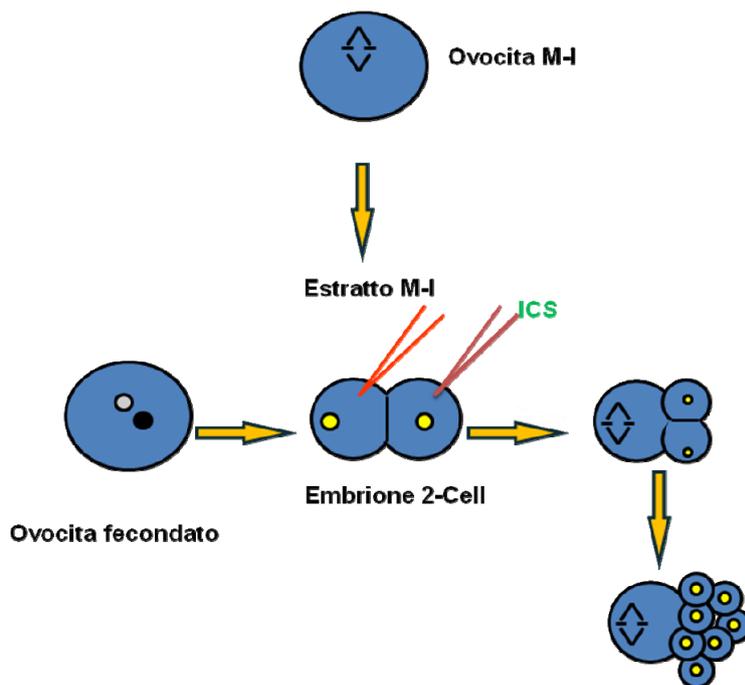


Fig. 4.8 Schema del saggio di attività CSF effettuato mediante microiniezione.

La misura dell'attività CSF è stata determinata calcolando la percentuale di arresto delle divisioni embrionali nel blastomero microiniettato con l'estratto M-I rispetto al blastomero gemello in cui è stata iniettata una soluzione (ICS) di controllo (Fig. 4.9 e Tabella 2).

La natura del CSF appare diversa in vertebrati rispetto agli invertebrati. Nel primo caso, infatti, il mantenimento del CSF è indipendente dalla sintesi proteica, mentre in molti invertebrati, la stabilità di CSF risulta strettamente legata dalla continua sintesi e degradazione di *short lived proteins* (Taieb *et al.*, 1997).

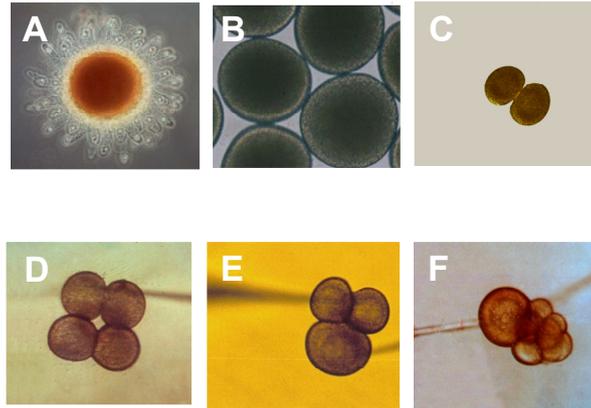


Fig. 4.9 Attività CSF-like in *C. intestinalis*. CSF è stato saggiato iniettando estratti di ovociti vergini bloccati in M-I in un blastomero di un embrione a due cellule. Nel blastomero fratello è stata iniettata una soluzione controllo (ICS). **A.** Ovociti vergini prima del decorionamento. **B.** Ovociti decorionati. **C.** Embrione a 2 cellule. **D.** Confronto tra il blastomero iniettato con ICS e blastomero non iniettato: la divisione avviene regolarmente in entrambi. **E.** Confronto tra il blastomero iniettato con estratto CSF (inferiore) e il blastomero iniettato con ICS (superiore) dopo la prima divisione e in **F.** dopo alcune divisioni successive.

Tabella 2

Iniezioni	N. Di divisioni	Blocco (%)
Estratto M-I	53	83.01%
Controllo	36	5.55%

Estratti di ovociti vergini bloccati in M-I sono stati iniettati in un blastomero di un embrione allo stadio di due cellule, mentre il blastomero gemello è stato iniettato con una soluzione controllo (ICS)

In *Ciona intestinalis*, il CSF appare indipendente dalla sintesi proteica; infatti, ovociti trattati con emetina (un inibitore della sintesi proteica che lega la subunità 40S del ribosoma e ne blocca la traslocazione) ad una concentrazione di 150 μ M, rimangono bloccati in M-I come gli ovociti controllo non trattati (Fig. 4.10).

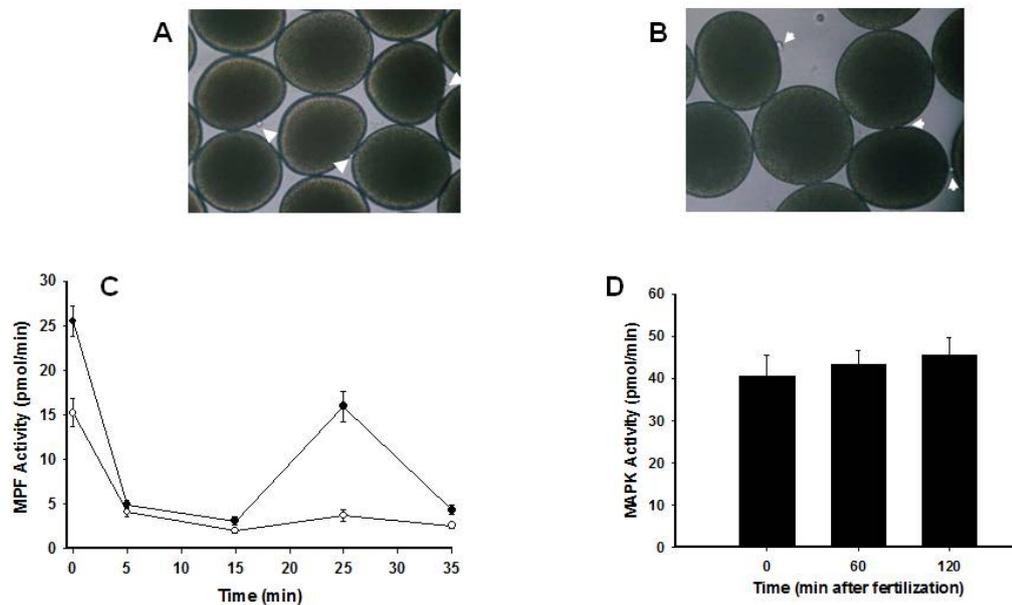


Fig. 4.10 Effetti dell' inibizioni della sintesi proteica nel completamento meiotico in *C. intestinalis*. Gli ovociti sono stati pre incubati in presenza di emetina (150 mM) e fecondati **A.** fotografia di ovociti trattati con emetina a 15 min dalla fecondazione, le frecce indicano il primo globulo polare. **B.** fotografia di ovociti non trattati dopo 40 min dalla fecondazione, qui le frecce indicano il primo e il secondo globulo polare. **C.** Gli ovociti trattati (-o-) e non trattati (-•-) con emetina sono stati raccolti ai tempi indicati dopo la fecondazione e lisati. Il saggio di attività Cdc2/Cdk1 è stato eseguito come riportato impiegando 50 mg di lisati cellulari. Le barre di errore sono rappresentative di tre esperimenti. **D.** Gli ovociti trattati con emetina sono stati raccolti e lisati dopo la fecondazione ai tempi indicati. Il saggio MAPK è stato effettuato come riportato in "Materiali e Metodi".

In caso di presenza di *short lived proteins* ci si sarebbe attesi un'attivazione degli ovociti in assenza di fecondazione. Come riportato in Fig. 4.10A, 15 min dopo la fecondazione gli ovociti trattati con emetina emettono il primo globulo polare, indicando l'avvenuto completamento della prima divisione meiotica così come negli ovociti controllo. Successivamente, l'emetina impediva la continuazione della progressione meiotica bloccando la divisione prima della metafase II. Al contrario, nei controlli si osserva l'estrusione del secondo globulo polare e il completamento della meiosi (Fig.4.10 B). Da questi dati si può dedurre che: **1.** il mantenimento di CSF in *Ciona intestinalis* non dipende dalla sintesi proteica; **2.** la mancata estrusione del II globulo polare è, probabilmente, una conseguenza dell'inibizione della sintesi di ciclina B. Quest'ultima ipotesi è confermata dall'inibizione dell'attività chinasi (Cdc2) associata all'MPF in M-II negli ovociti trattati con emetina (Fig.4.10 C).

Al fine di caratterizzare biochimicamente il complesso CSF in *Ciona intestinalis*, si è misurata l'attività MAPK nel completamento meiotico ed in relazione all'inibizione della sintesi proteica. MAPK rimane alta in ovociti non fecondati, a dimostrazione di un CSF attivo, e decresce dopo la fecondazione, in accordo con l'abolizione del CSF (Fig.4.10 C). Diversamente da quanto atteso, il trattamento con emetina, mantiene elevata l'attività MAPK, nonostante l'uscita dal blocco M-I e l'estrusione del primo globulo polare. Ciò suggerisce che MAPK, in *Ciona intestinalis*, riveste un ruolo regolativo indipendente dal CSF. Sulla base di questi risultati, si può dedurre

che l'inattivazione di MAPK alla fecondazione potrebbe dipendere dalla sintesi di fattori sensibili all'inibizione della sintesi proteica. Una ovvia conseguenza di quanto affermato è che MAPK non appare essenziale per l'uscita dalla M-I poiché tali eventi si verificano sia in presenza di attività chinasi alta (Fig 4.10 D) che bassa (Fig 4.7 A).

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi suggeriscono che la cascata di reazioni che conduce al blocco mediato dal CSF in *Ciona intestinalis* è comune a quella riscontrata nei vertebrati. La rapida diminuzione dell'attività di Cdc2/Cdk1 e MAPK in seguito alla fecondazione può essere interpretata come l'attesa inattivazione dell'MPF e del CSF osservata durante il blocco meiotico degli ovociti. In *Ciona intestinalis* dunque, a differenza degli altri invertebrati e similmente ai bassi vertebrati (*Xenopus* e pesci), la continua sintesi proteica sembra non essere richiesta per mantenere attivi l'MPF e il CSF. Tuttavia la sintesi proteica è essenziale per consentire l'ingresso in M-II, probabilmente per la richiesta di ciclina B: in presenza di emetina, infatti, gli ovociti entrano in anafase-I, estrudono il primo globulo polare mantenendo alta l'attività di MAPK (Fig 4.10). Questi dati potrebbero sembrare in contraddizione con la funzione di MAPK come marcatore dell'attività del CSF, in quanto indicherebbero che il completamento meiotico avviene in presenza di un CSF attivo. Questo possibile paradosso può essere spiegato immaginando che MAPK sia implicata sia nel completamento meiotico, come componente del CSF, sia nella transizione metafase-I/anafase-I, dove il proprio ruolo è ancora da chiarire. Questa ipotesi trova un sostegno scientifico

nell'osservazione che in *Xenopus* è già stata riportata la presenza di *pathways* ridondanti indipendenti da Mos nell'arresto mediato dal CSF e nell'inibizione del complesso APC/C, come, ad esempio, la pathway Cdk2/*cycE* (Tunquist e Maller, 2003). In più, nella *Drosophila*, la presenza di Mos non influenza il completamento meiotico (Ivanovska *et al.*, 2004) e la presenza esclusiva in *Ci-Mos* di un dominio N-terminale, non presente negli omologhi da vertebrati e invertebrati, suggerisce ulteriori funzioni per questa chinasi non ancora identificate.

4.3 Work in progress

4.3.1 CK2 nel completamento meiotico in ovociti di *Ciona intestinalis*

Nel corso dei tre anni di Dottorato, si è anche esplorato il ruolo della proteina chinasi CK2 nel completamento meiotico e nei primi stadi dello sviluppo embrionale in *Ciona intestinalis*. L'interesse per CK2 trae origine dalla precedente attività del nostro gruppo di ricerca che, per la prima volta, ha ipotizzato un ruolo funzionale per CK2 nella regolazione meiotica di *C. intestinalis*. Riassumendo i dati già pubblicati (Russo *et al.*, 2004)(Fig.4.11), l'attività di CK2 oscilla dopo la fecondazione intersecandosi con quella di MAPK e Cdc2. Inoltre, si è confermata l'esistenza di funzioni della subunità regolatrice β indipendente da quella catalitica α (Russo *et al.*, 2004).

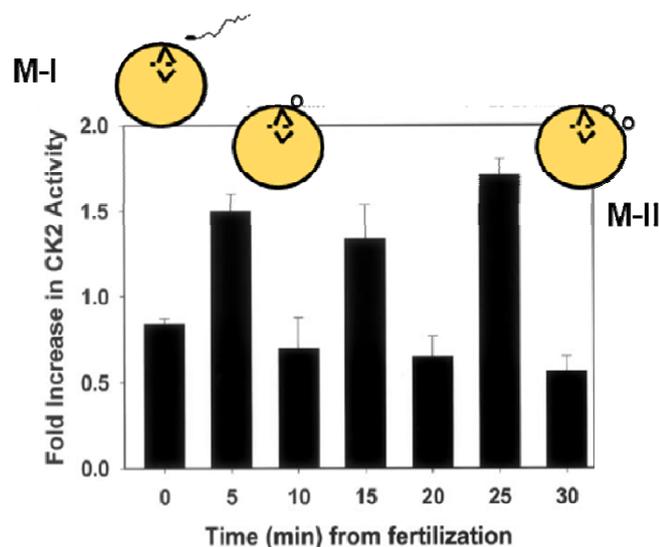


Fig. 4.11 Attività CK2 in ovociti di *C. intestinalis* a tempi diversi (min) dopo la fecondazione (adattato da Russo *et al.*, 2004)

Una strategia per approfondire l'analisi del ruolo di CK2 in ovociti di *Ciona intestinalis*, è stata quella di generare anticorpi specifici diretti contro le due subunità dell'enzima. Disponendo della sequenza di CK2 α depositate in GeneBank con il numero di accesso AY092081(*CiCK2A*) e AF360544 (*CiCK2B*)(Russo *et al.*, 2004) si è inizialmente proceduti col selezionare potenziali peptici antigenici. In tal maniera si sono identificati le sequenze corrispondenti alle regioni Asp59-Thr73 e Pro371-Asn385 della proteina da *Ciona intestinalis*, legati alla KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) ed iniettati in conigli allo scopo di ottenere anticorpi policlonali anti-peptide (PRIMM, Milano). Purtroppo, gli *immunoblotting* eseguiti finora per verificare la capacità degli anticorpi ottenuti di riconoscere *CiCK2- α* in estratti grezzi non ha dato esito positivo a causa dell'elevato *background* dovuto a bande non specifiche riconosciute dagli antisieri anti-peptide.

Come strategia alternativa, si è deciso di produrre anticorpi policlonali diretti contro l'intera proteina CK2- α e CK2- β . A tal proposito i due cloni *CiCK2A* e *CiCK2B* sono stati trasferiti dal vettore di clonaggio pMOSBlue (GE Healthcare) al vettore di espressione pMAL-c2X (NEB) capace di esprimere una proteina di fusione costituita dall'MBP (*maltose binding protein*) e dal polipeptide d'interesse. Inoltre, sfruttando la capacità dell'MBP di legare il maltosio, è stato relativamente facile ottenere proteine di fusione pure dopo cromatografia di affinità. *CiCK2- α -MBP* e *CiCK2- β -MPB* sono state espresse in *E. coli* e purificate per affinità, come indicato nelle Figure 4.12, 4.13 e 4.14. Questo materiale è stato utilizzato per la sintesi di anticorpi

policlonali anti-*CiCK2- α* e anti-*CiCK2- β* come descritto in “Materiali e Metodi” (PRIMM, Milano). Attualmente, si sta procedendo alla caratterizzazione di tali anticorpi al fine di migliorarne la specificità.

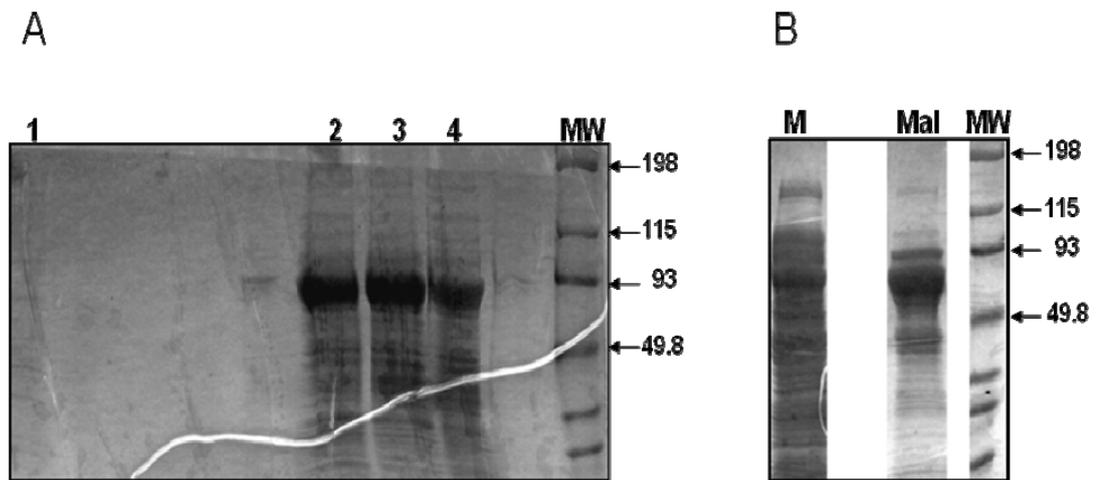


Fig. 4.12. Espressione di *pMAL-CiCK2A* in *E. coli*. (A) Quantità equivalenti di batteri provenienti da 1 ml di coltura ai tempi (ore) indicati dall'induzione con IPTG sono stati lisati in *cracking buffer* ed analizzati per SDS-PAGE. (B) Due ore dopo l'induzione con IPTG (M), i batteri sono stati lisati e l'estratto proteico risultante è stato caricato su resina di amilosio. Il canale indicato con Mal rappresenta la frazione eluita con maltosio 100 mM. La colorazione è stata eseguita con Blue di Coomassie. MW indica i marcatori di peso molecolare (Bio-Rad).

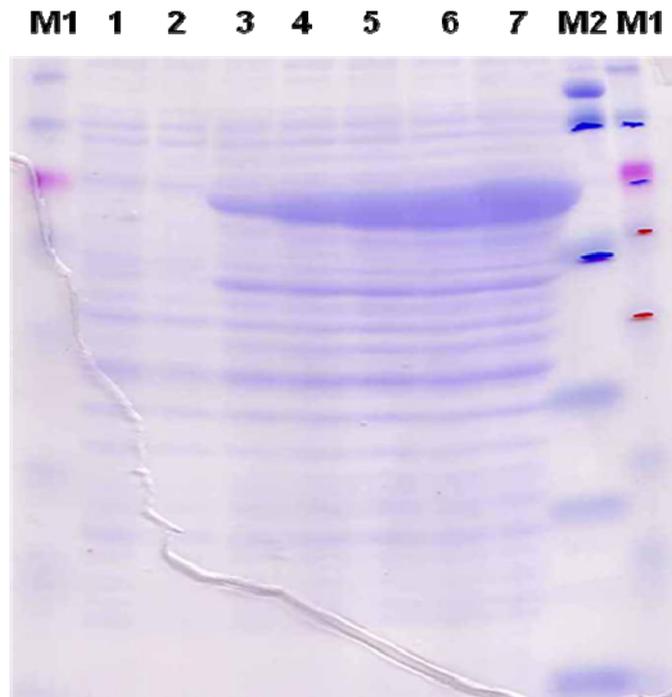


Fig. 4.13 Espressione di pMAL-CiCK2B in *E. coli*. Quantità equivalenti di batteri provenienti da 1 ml di coltura ai tempi (h) indicati dall'induzione con IPTG sono stati lisati in *cracking buffer* ed analizzati per SDS-PAGE. La colorazione è stata eseguita con Blue di Coomassie. M1 (Invitrogen) e M2 (Bio-Rad) indicano i marcatori di peso molecolare.

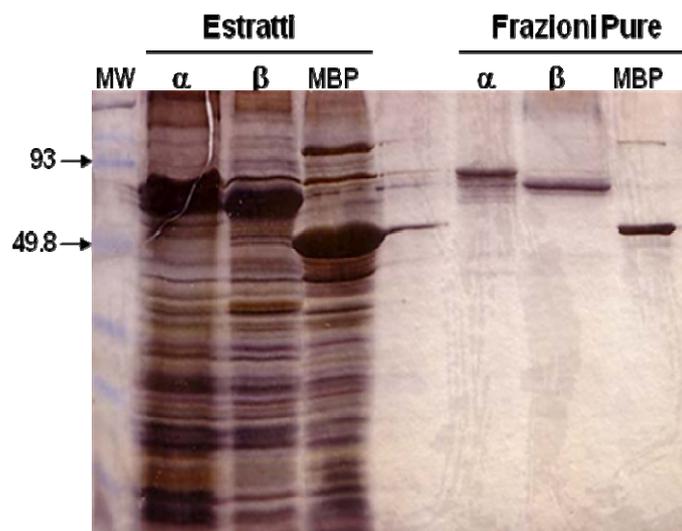


Fig. 4.14 Riepilogo della purificazione delle subunità α e β di CiCK2. I canali a, b e MBP riportano, rispettivamente, gli estratti grezzi preparati da batteri in cui è stato espressa le due subunità α e β di CiCK2 e la proteina MBP (vettore pMAL

“vuoto”). Il gruppo di canali indicati come “Frazioni pure”, rappresenta il risultato della purificazione delle tre proteine clonate ed espresse in *E. coli* dopo resina di affinità e SMART. MW indica i marcatori di peso molecolare (Bio-Rad).

L'espressione delle due subunità ricombinanti di *CiCK2* era anche finalizzata all'obiettivo di microiniettarle in ovociti e/o embrioni di *C. intestinalis* per studiarne la funzione. Per *CiCK2- α* ciò richiedeva la disponibilità di una chinasi ricombinante enzimaticamente attiva. Sebbene la gran parte delle due proteine di fusione espresse in *E. coli* si concentrasse nei corpi inclusi e fosse, quindi, insolubile, da una ridotta frazione citoplasmatica è stato possibile recuperare una *CiCK2- α -MBP* attiva (Fig. 4.15). Le fasi successive di tale procedura richiederanno l'idrolisi dell'MBP dalla proteina di fusione e la purificazione della proteina ricombinante attiva.

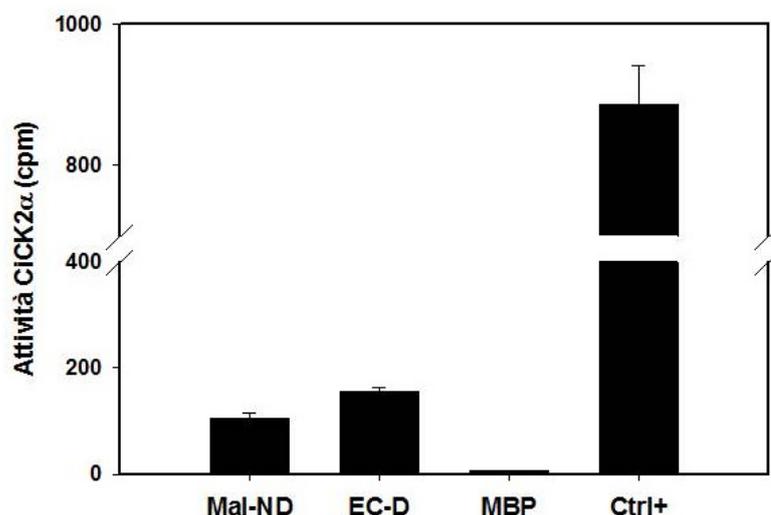


Fig. 4.15. Attività chinasi di *CiCK2 α* espressa in *E. coli*. Dopo l'espressione in batteri l'attività chinasi di *CiCK2 α* è stata misurata su diversi campioni. Mal-ND: *CiCK2 α* (5 mg) purificata in condizioni non-denaturanti (ND) e recuperata dopo resina di affinità ed eluizione con maltosio 100 mM; EC-D: estratto grezzo di *CiCK2 α* (25 mg), preparato in condizioni denaturanti (D); MBP: controllo negativo

rappresentato dall'espressione della MBP (vettore vuoto) in E. Coli e successiva purificazione su resina di affinità; Ctrl⁺: attività chinasi di CK2 bovina (oloenzima; Russo *et al.*, 1992).

4.3.2 Espressione di *CiCK2A* e *CiCK2B* in fasi specifiche dello sviluppo

Come ricordato nei paragrafi precedenti, recentemente sono stati pubblicati importanti dati riguardanti il possibile ruolo di CK2 nello sviluppo degli assi embrionali (Dominguez *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2005). Seldin e coll. (Dominguez *et al.*, 2005) hanno riportato che CK2 è temporalmente e spazialmente espresso in fasi specifiche dello sviluppo di embrioni di *Xenopus* e partecipa alla formazione dell'asse dorsale. L'*over*-espressione dell'mRNA per entrambe le subunità di CK2 nei blastomeri ventrali è sufficiente a indurre la formazione di un asse ectopico completo, mimando il segnale di Wnt. Tale effetto di CK2 richiede una subunità catalitica enzimaticamente attiva, in quanto un mutante privo di attività chinasi non è in grado di indurre la formazione ectopica dell'asse (Dominguez *et al.*, 2005).

Sulla base di questi dati di Letteratura, si è iniziato, lo studio dell'espressione di *CiCK2-α* e *CiCK2-β* nello sviluppo di *Ciona intestinalis* mediante *in situ hybridization* e qPCR. Gli esperimenti, attualmente in corso, hanno fornito solo dati preliminari che richiedono ulteriore conferme. In breve, come si evince dalle immagini riportate nelle Figg. 4.17 e 4.18 per

CiCK2- α e *CiCK2- β* , rispettivamente, i trascritti sono espressi e distribuiti in maniera diffusa nel citoplasma degli ovociti vergini e fecondanti e nella gastrula. Allo stadio di *tailbud* il segnale di entrambi i trascritti co-localizza nel mesenchima laterale e nella regione dorsale, in prossimità dell'origine dell'asse dorsale a parziale conferma di quanto avviene in *Xenopus* (Dominguez *et al.*, 2005).

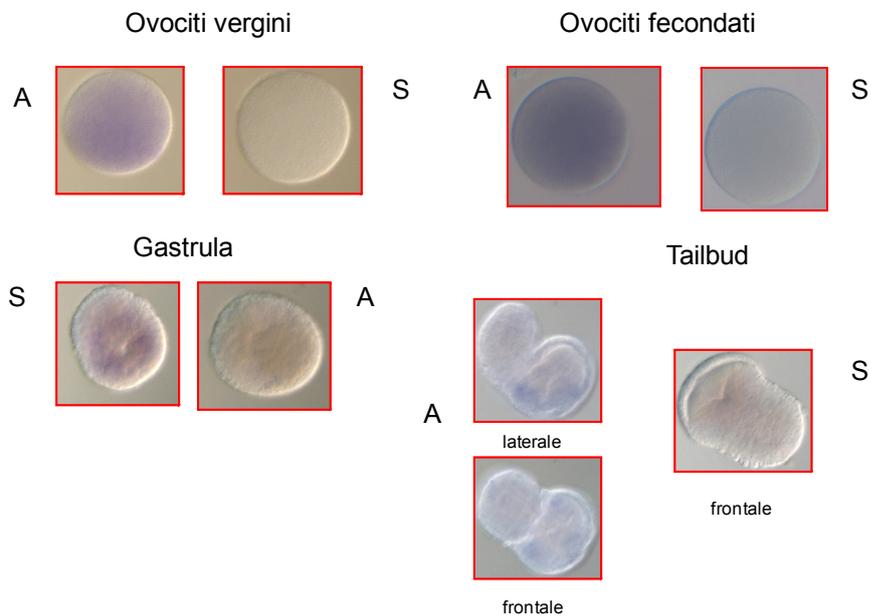


Fig. 4.17 Espressione di *CiCK2 α* in embrioni di *C. intestinalis* mediante ibridazione *in situ*. A e S indicano rispettivamente le sonde antisenso e senso.

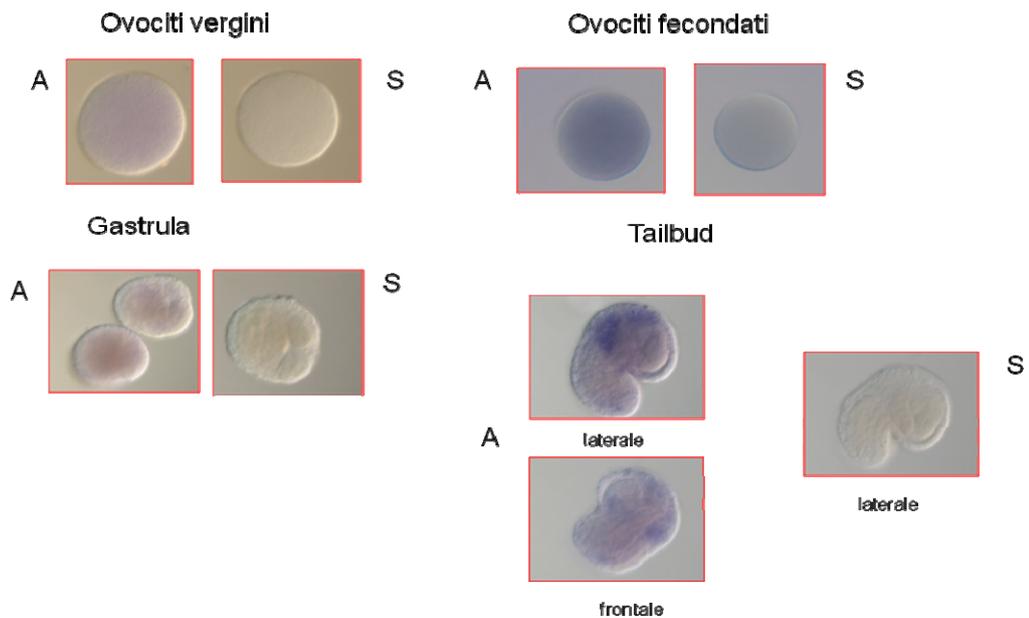


Fig. 4.18 Espressione di CiCK2 β in embrioni di *C. intestinalis* mediante ibridazione *in situ*. A e S indicano rispettivamente le sonde antisenso e senso.

Per mettere a punto l'analisi mediante qPCR si sono scelti campioni di *Ciona intestinalis* nelle prime fasi di sviluppo (0-16 blastomeri) su cui è stata quantificata l'espressione di *CiCK2A*. Dalla Fig. 4.19., si evince che i trascritti sono quantitativamente espressi in tutti gli stadi esaminati e non variano significativamente rispetto al riferimento (ovociti non fecondati). Futuri studi verranno estesi a fasi dello sviluppo successivo e alla subunità *CiCK2B*.

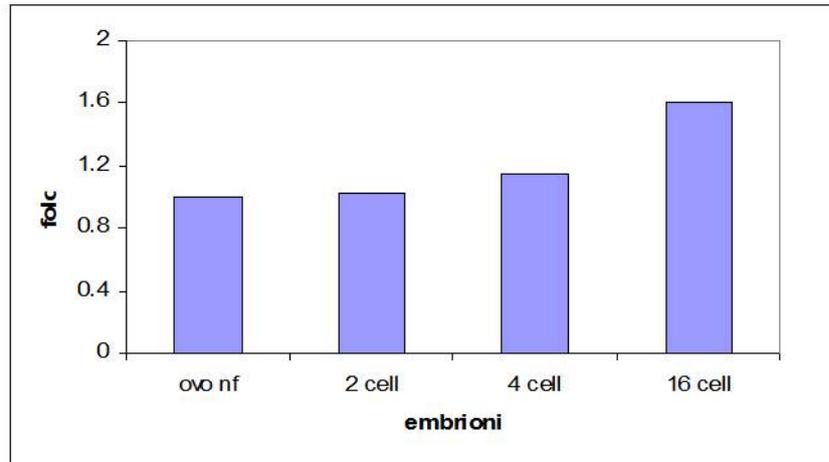


Fig. 4.19. Espressione di CiCK2 α in embrioni di *C. intestinalis* mediante *real time* PCR

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il risultato più rilevante ottenute nel corso del presente progetto di Dottorato è stato la caratterizzazione del fattore citostatico nell'ascidia *Ciona intestinalis*, un organismo appartenente al sub phylum degli Urocordati. Le ascidie costituiscono, dal punto di vista evolutivo, un punto di transizione tra invertebrati e bassi vertebrati e quindi rappresentano un modello idoneo per l'analisi comparativa dei meccanismi che regolano la divisione meiotica.

In questo studio, è stata individuata per la prima volta, a nostra conoscenza, un'attività CSF negli ovociti di invertebrati (*Ciona intestinalis*) bloccati in metafase omologa a quella descritta nei vertebrati (*Xenopus*, *Rana*, *Mus*). È stata inoltre studiata la regolazione del CSF dimostrando che sia l'inattivazione del CSF che dell'MPF (misurata saggiando l'attività della chinasi Cdc2) all'uscita dalla metafase-I sono indipendenti dalla sintesi proteica, indicando l'assenza di *short lived factors* responsabili del mantenimento della metafase diversamente da quanto accade in molte altre specie di invertebrati. Grazie al recente sequenziamento del genoma della *Ciona intestinalis* è stato possibile presentare un'analisi filogenetica dei componenti chiave della *pathway* del CSF, consentendo di evidenziare che la *pathway* $Mos \rightarrow MEK \rightarrow MAPK \rightarrow p90^{Rsk} \rightarrow Bub1 \rightarrow Cdc20$ è perfettamente conservata nelle ascidie. In particolare, *Ci-Mos* presenta un'alta percentuale di conservazione con la proteina da vertebrati (*Xenopus*). Tuttavia essa mostra

delle differenze strutturali e funzionali rispetto alla proteina da vertebrati: l'estremità N-terminale suggerendo delle funzioni specifiche non ancora conosciute e probabilmente scomparse nel corso dell'evoluzione dei cordati. In più, un gene essenziale nella regolazione del CSF nei vertebrati (*Xenopus*), Erp1/Emi2, sembra essere assente nel genoma di *Ciona intestinalis*. Ciò suggerisce che il mantenimento in invertebrati del blocco metafasico dipendente dal CSF passa per l'attività della chinasi Bub1 (schema in Fig. 5.1). In *Xenopus*, tale *pathway* risulta essere presente ma meno determinante per il mantenimento del CSF rispetto alla *pathway* regolata da Erp1/Emi2. Una facile conclusione suggerita da questi dati indica l'esistenza di due *pathways* che controllano il CSF in vertebrati, una predominante, Erp1/Emi2, l'altra ridondante probabilmente ereditata dagli invertebrati. Studi futuri chiariranno questa ipotesi.

Spesso alla fine della stesura di una tesi o di un *paper* scientifico, si può restare con l'impressione che i dati ottenuti, seppure inediti e importanti nel settore disciplinare, non siano conclusivi, ma aprino nuovi scenari e suggeriscano nuove ricerche. E' questo, probabilmente, ciò che si avverte alla fine di questo lavoro di tesi. La ricostruzione con gli strumenti della bioinformatica di una *pathway* per l'attivazione del CSF in *Ciona intestinalis* è sì un dato nuovo ed inesplorato negli invertebrati, ma apre immediatamente la questione della "verifica" sperimentale, spazio-temporale, dell'espressione quantitativa dei componenti del CSF nella maturazione ovocitaria in *Ciona intestinalis*. Tale lavoro sarà affrontato traendo vantaggio dalle sequenze

geniche qui identificate mediante la progettazione di idonei primers per qPCR. Inoltre, i colleghi alla Stazione Zoologica Anton Dohr di Napoli (Dott.ri E. Tosti, F. Silvestre, A. Cuomo) hanno messo a punto un metodo che consente di isolare ed analizzare gli ovociti di *Ciona intestinalis* prima del blocco metafase, nelle fasi precoci della maturazione. Tali campioni risulteranno particolarmente utili per seguire le varie tappe dell'attivazione del CSF. In tal modo, la *Ciona intestinalis* potrà meglio porsi come modello di riferimento per lo studio del completamento meiotico negli invertebrati, parallelamente a quanto avviene per *Xenopus* nei vertebrati.

La Fig. 4.9 rappresenta, a nostra conoscenza, un dato storico in quanto mai prima d'ora era stato possibile replicare in maniera così chiara in ovociti di invertebrati il saggio di Masui e Markert (1971) sull'esistenza del CSF. Tuttavia, anche questo esperimento pone questioni nuove e spunti per studi futuri. C'è "complementarietà" tra il CSF di invertebrati e quello di vertebrati? E' cioè possibile bloccare la divisione di un embrione a due cellule di *Xenopus* con l'estratto CSF di *Ciona intestinalis* e viceversa? La somiglianza funzionale si riflette anche a livello molecolare? L'assenza di Erp1-Emi2 nel genoma di *Ciona intestinalis* suggerirebbe di no. D'altro canto, le differenze tra il CSF di invertebrati rispetto a quello di vertebrati iniziano ad emergere già da questo lavoro. A parte la già citata assenza del gene codificante per Erp1-Emi2, un'importanza differenza esiste nella struttura primaria di *Ci-Mos* rispetto a *Xe-Mos* e un ruolo diverso per MAPK è stato ipotizzato nei due sistemi. E proprio MAPK si pone come obiettivo chiave per studi futuri. Va

chiarito, infatti, non solo il suo esatto ruolo nel CSF e alla transizione metafase-anafase alla fecondazione, ma anche l'interazione con altre chinasi quali CK2 già supposta in un precedente lavoro (Russo *et al.*, 2004). Il riferimento a CK2 consente un breve commento ai dati qui presentati come *in progress* (pag. 94). CK2 potrebbe avere un ruolo ancora inesplorato sia nella regolazione meiotica degli invertebrati che nel loro sviluppo embrionale. Lo studio del CSF ha assorbito buona parte delle energie sperimentali profuse nel presente progetto di Dottorato. Si è cercato di implementare anche lo studio di CK2 provvedendo alla sintesi di reagenti specifici (anticorpi) e mettendo a punto i protocolli per studiare l'espressione delle due subunità dell'enzima sia mediante *in situ hybridization* che qPCR. Chiarire, nel prossimo futuro, il ruolo di CK2 in ovociti ed embrioni di ascidie, potrebbe fungere da riferimento per studiarne il ruolo nella regolazione meiotica dei vertebrati.

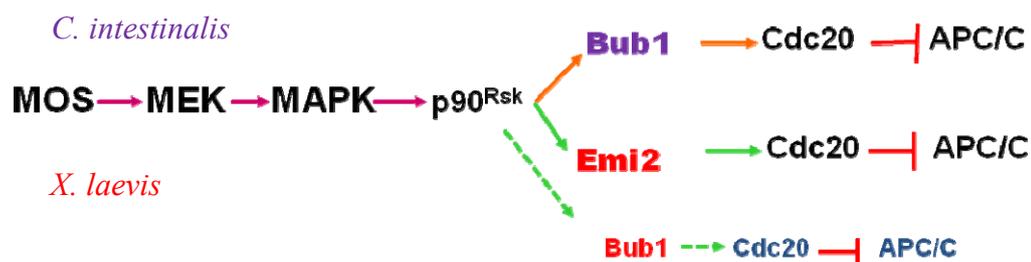


Fig. 5.1 Confronto tra la pathway CSF in *C. intestinalis* e *X. laevis*. Le due specie sembrano condividere la cascata di fosforilazioni che da Mos porta all'attivazione di p90^{Rsk}. Successivamente in *C. intestinalis* la via del CSF è mediata da Bub1(→) mentre in *Xenopus* è mediata da Emi2(→). Tuttavia la presenza di Bub1 nei vertebrati suggerisce la presenza di una via alternativa per il blocco meiotico mediato dal CSF (→).

Parte dei risultati ottenuti nel presente studio sono stati oggetto di una recente pubblicazione:

Russo G.L., Bilotto S., Ciarcia G., Tosti, E. *Phylogenetic conservation of cytostatic factor related genes in the ascidian *Ciona intestinalis**, **Gene** (2008), doi:10.1016/j.gene.2008.09.035

BIBLIOGRAFIA

- A. A. V.V, Ciona Genome Project (2003) *Dev. Gen. Evol.* **213**, 1–318
- Alberts B, Johson, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walters. (2004) *Biologia molecolare della cellula*, IV edizione (Zanichelli, S.p.A., Bologna, Italy)
- Abassi, Y. A., Carroll, D. J., Giusti, A. F., Belton, R. J., Jr., and Foltz, K. R. (2000). Evidence that Src-type tyrosine kinase activity is necessary for initiation of calcium release at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol* *218*, 206-219.
- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C., and Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* *111 (Pt 12)*, 1751-1757.
- Abrieu, A., Doree, M., and Picard, A. (1997). Mitogen-activated protein kinase activation down-regulates a mechanism that inactivates cyclin B-cdc2 kinase in G2-arrested oocytes. *Mol Biol Cell* *8*, 249-261.
- Abrieu, A., Fisher, D., Simon, M. N., Doree, M., and Picard, A. (1997). MAPK inactivation is required for the G2 to M-phase transition of the first mitotic cell cycle. *Embo J* *16*, 6407-6413.
- Aizawa, H., Kawahara, H., Tanaka, K., and Yokosawa, H. (1996). Activation of the proteasome during *Xenopus* egg activation implies a link between proteasome activation and intracellular calcium release. *Biochem Biophys Res Commun* *218*, 224-228.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* *25*, 3389-3402.
- Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schaffer, A. A., and Yu, Y. K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *Febs J* *272*, 5101-5109.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 69-75.
- Ayabe, T., Kopf, G. S., and Schultz, R. M. (1995). Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on unseminated and inseminated eggs. *Development* *121*, 2233-2244.
- Basu, D., Navneet, A. K., Dasgupta, S., and Bhattacharya, S. (2004). Cdc2-cyclin B-induced G2 to M transition in perch oocyte is dependent on Cdc25. *Biol Reprod* *71*, 894-900.
- Belle, R., Cormier, P., Poulhe, R., Morales, J., Huchon, D., and Mulner-Lorillon, O. (1990). Protein phosphorylation during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes: cdc2 protein kinase targets. *Int J Dev Biol* *34*, 111-115.
- Berridge, M. J. (1993). Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* *365*, 388-389.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* *361*, 315-325.
- Besson, A., Dowdy, S. F., and Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* *14*, 159-169.
- Bhatt, R. R., and Ferrell, J. E., Jr. (2000). Cloning and characterization of *Xenopus* Rsk2, the predominant p90 Rsk isozyme in oocytes and eggs. *J Biol Chem* *275*, 32983-32990.
- Boldyreff, B., and Issinger, O. G. (1997). A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett* *403*, 197-199.
- Brind, S., Swann, K., and Carroll, J. (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are downregulated in mouse oocytes in response to sperm or adenophostin A but not to increases in intracellular Ca(2+) or egg activation. *Dev Biol* *223*, 251-265.
- Brownlee, C., and Dale, B. (1990). Temporal and spatial correlation of fertilization current,

- calcium waves and cytoplasmic contraction in eggs of *Ciona intestinalis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* *239*, 321-328.
- Buchou, T., and Cochet, C. (2003). [Protein kinase CK2: an enzyme that likes to be different]. *Med Sci (Paris)* *19*, 709-716.
- Burkard, M. E., Randall, C. L., Laroche, S., Zhang, C., Shokat, K. M., Fisher, R. P., and Jallepalli, P. V. (2007). Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4383-4388.
- Burke, B., and Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 487-497.
- Carroll, D. J., Ramarao, C. S., Mehlmann, L. M., Roche, S., Terasaki, M., and Jaffe, L. A. (1997). Calcium release at fertilization in starfish eggs is mediated by phospholipase Cgamma. *J Cell Biol* *138*, 1303-1311.
- Castro, A., Peter, M., Lorca, T., and Mandart, E. (2001). c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. *Biol Cell* *93*, 15-25.
- Castro, A., Peter, M., Magnaghi-Jaulin, L., Vigneron, S., Galas, S., Lorca, T., and Labbe, J. C. (2001). Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* *12*, 2660-2671.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C., and Dideberg, O. (1999). Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *Embo J* *18*, 2930-2940.
- Chen, M., and Cooper, J. A. (1995). Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* *15*, 4727-4734.
- Chen, M., and Cooper, J. A. (1997). The beta subunit of CKII negatively regulates *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9136-9140.
- Chen, M., Li, D., Krebs, E. G., and Cooper, J. A. (1997). The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol* *17*, 1904-1912.
- Child, E. S., and Mann, D. J. (2006). The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* *5*, 1313-1319.
- Colas, P., Launay, C., van Loon, A. E., and Guerrier, P. (1993). Protein synthesis controls cyclin stability in metaphase I-arrested oocytes of *Patella vulgata*. *Exp Cell Res* *208*, 518-521.
- Coleman, T. R., Tang, Z., and Dunphy, W. G. (1993). Negative regulation of the wee1 protein kinase by direct action of the nim1/cdr1 mitotic inducer. *Cell* *72*, 919-929.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B., and Evans, M. J. (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* *370*, 65-68.
- Comes, S., Locascio, A., Silvestre, F., d'Ischia, M., Russo, G. L., Tosti, E., Branno, M., and Palumbo, A. (2007). Regulatory roles of nitric oxide during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* *306*, 772-784.
- Crews, C. M., and Erikson, R. L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 8205-8209.
- Crews, C. M., and Erikson, R. L. (1993). Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* *74*, 215-217.
- Dai, Y., and Grant, S. (2003). Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* *3*, 362-370.
- Dale, B., and De Felice, L. (1984). Sperm-activated channels in ascidian oocytes. *Dev Biol* *101*, 235-239.

- Dale, B., (1989). Non Mammalian animals models for biomedical research. Editor A. Woodhead. Crc press, bocaraton, chapter 7, pagg. 87-103.
- De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jessus, C., and Ozon, R. (2002). Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 277, 28592-28600.
- DeMarais, A. A., and Moon, R. T. (1992). The armadillo homologs beta-catenin and plakoglobin are differentially expressed during early development of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 153, 337-346.
- Dominguez, I., Mizuno, J., Wu, H., Imbrie, G. A., Symes, K., and Seldin, D. C. (2005). A role for CK2alpha/beta in *Xenopus* early embryonic development. *Mol Cell Biochem* 274, 125-131.
- Dominguez, I., Mizuno, J., Wu, H., Song, D. H., Symes, K., and Seldin, D. C. (2004). Protein kinase CK2 is required for dorsal axis formation in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 274, 110-124.
- Doree, M. (2003). [Triggering cell mitosis in higher eukaryotes]. *Med Sci (Paris)* 19, 299-307.
- Doree, M., and Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 115, 2461-2464.
- Duckworth, B. C., Weaver, J. S., and Ruderman, J. V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16794-16799.
- Dumollard, R., Carroll, J., Dupont, G., and Sardet, C. (2002). Calcium wave pacemakers in eggs. *J Cell Sci* 115, 3557-3564.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E., and Heyting, C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* 160, 657-670.
- Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12, 676-684.
- Epel, D. (1978). Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. *Curr Top Dev Biol* 12, 185-246.
- Eyers, P. A., Liu, J., Hayashi, N. R., Lewellyn, A. L., Gautier, J., and Maller, J. L. (2005). Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280, 24339-24346.
- Freeman, R. S., Meyer, A. N., Li, J., and Donoghue, D. J. (1992). Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mosxe protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor. *J Cell Biol* 116, 725-735.
- Frodin, M., and Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151, 65-77.
- Fry, A. M., Meraldi, P., and Nigg, E. A. (1998). A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J* 17, 470-481.
- Fujisue, M., Kobayakawa, Y., Yamana, K., (1993). Occurrence of dorsal axis inducing activity around the vegetal pole of an uncleaved *Xenopus* egg and displacement to the equatorial region by cortical rotation. . *Development*, 163– 170.
- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147, 295-306.
- Gabrielli, B. G., Roy, L. M., and Maller, J. L. (1993). Requirement for Cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* 259, 1766-1769.
- Galione, A., and White, A. (1994). Ca²⁺ release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol* 4, 431-436.

- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and 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.
- Gilkey, J. C., Jaffe, L. F., Ridgway, E. B., and Reynolds, G. T. (1978). A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol* *76*, 448-466.
- Giusti, A. F., Carroll, D. J., Abassi, Y. A., and Foltz, K. R. (1999). Evidence that a starfish egg Src family tyrosine kinase associates with PLC-gamma1 SH2 domains at fertilization. *Dev Biol* *208*, 189-199.
- Giusti, A. F., O'Neill, F. J., Yamasu, K., Foltz, K. R., and Jaffe, L. A. (2003). Function of a sea urchin egg Src family kinase in initiating Ca²⁺ release at fertilization. *Dev Biol* *256*, 367-378.
- Gotz, C., Wagner, P., Issinger, O. G., and Montenarh, M. (1996). p21WAF1/CIP1 interacts with protein kinase CK2. *Oncogene* *13*, 391-398.
- Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S., and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *Embo J* *10*, 3297-3309.
- Grumetto, L., Wilding, M., De Simone, M. L., Tosti, E., Galione, A., and Dale, B. (1997). Nitric oxide gates fertilization channels in ascidian oocytes through nicotinamide nucleotide metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* *239*, 723-728.
- Gu, W. C., and Du, G. G. (1992). [Regulator factors controlling the cell cycle]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* *23*, 342-345.
- Haccard, O., and Jessus, C. (2006). Oocyte maturation, Mos and cyclins--a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell Cycle* *5*, 1152-1159.
- Han, S. J., and Conti, M. (2006). New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle* *5*, 227-231.
- Hansen, D. V., Tung, J. J., and Jackson, P. K. (2006). CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 608-613.
- Harper, J. W., and Adams, P. D. (2001). Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* *101*, 2511-2526.
- Hartwell, L. H. (1970). Biochemical genetics of yeast. *Annu Rev Genet* *4*, 373-396.
- Hashimoto, N., and Kishimoto, T. (1988). Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* *126*, 242-252.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawa, Y., and et al. (1994). Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* *370*, 68-71.
- Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* *3*, 931-943.
- Homa, S. T. (1995). Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* *40*, 122-134.
- Homa, S. T., Carroll, J., and Swann, K. (1993). The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum Reprod* *8*, 1274-1281.
- Huang, W., Kessler, D. S., and Erikson, R. L. (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell* *6*, 237-245.
- Hunt, T. (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* *1*, 268-274.
- Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., and Sagata, N. (2007). A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature* *446*, 1100-1104.
- Ivanovska, I., Lee, E., Kwan, K. M., Fenger, D. D., and Orr-Weaver, T. L. (2004). The

- Drosophila* MOS ortholog is not essential for meiosis. *Curr Biol* *14*, 75-80.
- Jang, Y. J., Ma, S., Terada, Y., and 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.
- Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* *353*, 417-439.
- Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M., and Harper, J. W. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* *18*, 2573-2580.
- Kandror, K. V., Benumov, A. O., and Stepanov, A. S. (1989). Casein kinase II from *Rana temporaria* oocytes. Intracellular localization and activity during progesterone-induced maturation. *Eur J Biochem* *180*, 441-448.
- Karaiskou, A., Dupre, A., Haccard, O., and Jessus, C. (2001). From progesterone to active Cdc2 in *Xenopus* oocytes: a puzzling signalling pathway. *Biol Cell* *93*, 35-46.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.
- Kawahara, H., and Yokosawa, H. (1994). Intracellular calcium mobilization regulates the activity of 26 S proteasome during the metaphase-anaphase transition in the ascidian meiotic cell cycle. *Dev Biol* *166*, 623-633.
- Kelm, O., Wind, M., Lehmann, W. D., and Nigg, E. A. (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J Biol Chem* *277*, 25247-25256.
- Kitazono, A. A., Garza, D. A., and Kron, S. J. (2003). Mutations in the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28 reveal a role in the spindle assembly checkpoint. *Mol Genet Genomics* *269*, 672-684.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* *23*, 417-425.
- Kosako, H., Gotoh, Y., Matsuda, S., Ishikawa, M., and Nishida, E. (1992). *Xenopus* MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *Embo J* *11*, 2903-2908.
- Kraft, C., Vodermaier, H. C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and 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.
- Kropf, D. L., Henry, C. A., and Gibbon, B. C. (1995). Measurement and manipulation of cytosolic pH in polarizing zygotes. *Eur J Cell Biol* *68*, 297-305.
- Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K. H., Wang, S. X., and Dunphy, W. G. (1998). The *Xenopus* Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *J Cell Biol* *142*, 1559-1569.
- Kumagai, A., Yakowec, P. S., and Dunphy, W. G. (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* *9*, 345-354.
- Kyozuka, K., Deguchi, R., Mohri, T., and Miyazaki, S. (1998). Injection of sperm extract mimics spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ responses and progression of meiosis at fertilization of ascidian oocytes. *Development* *125*, 4099-4105.
- Kyozuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N., and Yamashita, M. (1997). Change in intracellular Ca²⁺ is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Dev Biol* *182*, 33-41.
- Lampson, M. A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T. M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* *6*, 232-237.
- Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G., and Gullberg, M. (1997). Control of

- microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol* *17*, 5530-5539.
- Lees, E. (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 773-780.
- Leiva, L., Carrasco, D., Taylor, A., Veliz, M., Gonzalez, C., Allende, C. C., and Allende, J. E. (1987). Casein kinase II is a major protein phosphorylating activity in the nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Int* *14*, 707-717.
- Lenart, P., and Ellenberg, J. (2003). Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 88-95.
- Lenart, P., Rabut, G., Daigle, N., Hand, A. R., Terasaki, M., and Ellenberg, J. (2003). Nuclear envelope breakdown in starfish oocytes proceeds by partial NPC disassembly followed by a rapidly spreading fenestration of nuclear membranes. *J Cell Biol* *160*, 1055-1068.
- Lenormand, J. L., Dellinger, R. W., Knudsen, K. E., Subramani, S., and Donoghue, D. J. (1999). Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *Embo J* *18*, 1869-1877.
- Levasseur, M., Carroll, M., Jones, K. T., and McDougall, A. (2007). A novel mechanism controls the Ca²⁺ oscillations triggered by activation of ascidian eggs and has an absolute requirement for Cdk1 activity. *J Cell Sci* *120*, 1763-1771.
- Levasseur, M., and McDougall, A. (2000). Sperm-induced calcium oscillations at fertilisation in ascidians are controlled by cyclin B1-dependent kinase activity. *Development* *127*, 631-641.
- Lieberman, S. L., and Ruderman, J. V. (2004). CK2 beta, which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Dev Biol* *268*, 271-279.
- Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* *369*, 1-15.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., and Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 3009-3013.
- Lorca, T., Labbe, J. C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J. P., Cavadore, J. C., Le Bouffant, F., and Doree, M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J* *11*, 2381-2390.
- Marikawa, Y., Li, Y., and Elinson, R. P. (1997). Dorsal determinants in the *Xenopus* egg are firmly associated with the vegetal cortex and behave like activators of the Wnt pathway. *Dev Biol* *191*, 69-79.
- Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* *69*, 1-17.
- Masui, Y., and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* *177*, 129-145.
- Matsuda, S., Kosako, H., Takenaka, K., Moriyama, K., Sakai, H., Akiyama, T., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1992). *Xenopus* MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *Embo J* *11*, 973-982.
- Matten, W. T., Copeland, T. D., Ahn, N. G., and Vande Woude, G. F. (1996). Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* *179*, 485-492.
- McDougall, A., and Levasseur, M. (1998). Sperm-triggered calcium oscillations during meiosis in ascidian oocytes first pause, restart, then stop: correlations with cell cycle kinase activity. *Development* *125*, 4451-4459.
- McPherson, S. M., McPherson, P. S., Mathews, L., Campbell, K. P., and Longo, F. J. (1992). Cortical localization of a calcium release channel in sea urchin eggs. *J Cell Biol* *116*, 1111-

1121.

- Meggio, F., and Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* 17, 349-368.
- Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* 5, 311-326.
- Mendez, R., Hake, L. E., Andresson, T., Littlepage, L. E., Ruderman, J. V., and Richter, J. D. (2000). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 404, 302-307.
- Millar, J. B., McGowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R., and Russell, P. (1991). p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *Embo J* 10, 4301-4309.
- Mitra, J., and Enders, G. H. (2004). Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* 23, 3361-3367.
- Mochida, S., and Hunt, T. (2007). Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature* 449, 336-340.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbe, J. C., Doree, M., Poulhe, R., Osborne, H., and Belle, R. (1990). M-phase-specific cdc2 protein kinase phosphorylates the beta subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. *Eur J Biochem* 193, 529-534.
- Mulner-Lorillon, O., Marot, J., Cayla, X., Poulhe, R., and Belle, R. (1988). Purification and characterization of a casein-kinase-II-type enzyme from *Xenopus laevis* ovary. Biological effects on the meiotic cell division of full-grown oocyte. *Eur J Biochem* 171, 107-117.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Nakielny, S., Campbell, D. G., and Cohen, P. (1992). MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle. A novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 308, 183-189.
- Nasmyth, K., and Haering, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74, 595-648.
- Nasmyth, K., Peters, J. M., and Uhlmann, F. (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 288, 1379-1385.
- Neant, I., Dufresne, L., Morasse, J., Gicquaud, C., Guerrier, P., and Dube, F. (1994). The release from metaphase arrest in blue mussel oocytes. *Int J Dev Biol* 38, 513-523.
- Nebreda, A. R., Hill, C., Gomez, N., Cohen, P., and Hunt, T. (1993). The protein kinase mos activates MAP kinase kinase in vitro and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells in vivo. *FEBS Lett* 333, 183-187.
- Nigg, E. A. (2001). Cell cycle regulation by protein kinases and phosphatases. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 19-46.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., and Ohsumi, K. (2007). Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature* 449, 341-345.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.
- Nurse, P. (2002). Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem* 3, 596-603.
- Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146, 167-178.

- O'Connor, P. M., Ferris, D. K., Hoffmann, I., Jackman, J., Draetta, G., and Kohn, K. W. (1994). Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9480-9484.
- O'Farrell, P. H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* *11*, 512-519.
- Ogg, S., Gabrielli, B., and Piwnica-Worms, H. (1994). Purification of a serine kinase that associates with and phosphorylates human Cdc25C on serine 216. *J Biol Chem* *269*, 30461-30469.
- Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y., and Sagata, N. (2007). Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* *303*, 157-164.
- Ohsumi, K., Koyanagi, A., Yamamoto, T. M., Gotoh, T., and Kishimoto, T. (2004). Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytostatic factor arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12531-12536.
- Okano-Uchida, T., Okumura, E., Iwashita, M., Yoshida, H., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2003). Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. *Embo J* *22*, 5633-5642.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* *4*, 111-116.
- Osborne, H. B., Mulner-Lorillon, O., Marot, J., and Belle, R. (1989). Polyamine levels during *Xenopus laevis* oogenesis: a role in oocyte competence to meiotic resumption. *Biochem Biophys Res Commun* *158*, 520-526.
- Palmer, A., Gavin, A. C., and 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.
- Parisi, S., McKay, M. J., Molnar, M., Thompson, M. A., van der Spek, P. J., van Drunen-Schoenmaker, E., Kanaar, R., Lehmann, E., Hoeijmakers, J. H., and Kohli, J. (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* *19*, 3515-3528.
- Parrington, J., Davis, L. C., Galione, A., and Wessel, G. (2007). Flipping the switch: how a sperm activates the egg at fertilization. *Dev Dyn* *236*, 2027-2038.
- Pascreau, G., Delcros, J. G., Cremet, J. Y., Prigent, C., and Arlot-Bonnemains, Y. (2005). Phosphorylation of maskin by Aurora-A participates in the control of sequential protein synthesis during *Xenopus laevis* oocyte maturation. *J Biol Chem* *280*, 13415-13423.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Ogg, S., Thoma, R. S., Byrnes, M. J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M. T., and Piwnica-Worms, H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* *9*, 197-208.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* *277*, 1501-1505.
- Perdiguero, E., and Nebreda, A. R. (2004). Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell Cycle* *3*, 733-737.
- Perdiguero, E., and Nebreda, A. R. (2004). Use of *Xenopus* oocytes and early embryos to study MAPK signaling. *Methods Mol Biol* *250*, 299-314.
- Peter, M., Labbe, J. C., Doree, M., and 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.

- Petronczki, M., Lenart, P., and Peters, J. M. (2008). Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* *14*, 646-659.
- Philpott, A., and Yew, P. R. (2008). The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Mol Biotechnol* *39*, 9-19.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* *308* (Pt 3), 697-711.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res* *66*, 181-212.
- Pinna, L. A., and Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* *3*, 77-97.
- Pommier, Y., and Kohn, K. W. (2003). [Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]. *Med Sci (Paris)* *19*, 173-186.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F., and Cooper, J. A. (1993). Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol* *13*, 2546-2553.
- Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martinez, A. C., Rufas, J. S., and Barbero, J. L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* *3*, 761-766.
- Prodon, F., Chenevert, J., and Sardet, C. (2006). Establishment of animal-vegetal polarity during maturation in ascidian oocytes. *Dev Biol* *290*, 297-311.
- Prodon, F., Dru, P., Roegiers, F., and Sardet, C. (2005). Polarity of the ascidian egg cortex and relocalization of cER and mRNAs in the early embryo. *J Cell Sci* *118*, 2393-2404.
- Propst, F., Rosenberg, M. P., and Vande Woude, G. F. (1988). Proto-oncogene expression in germ cell development. *Trends Genet* *4*, 183-187.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., *et al.* (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* *317*, 86-94.
- Rauh, N. R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A., and Mayer, T. U. (2005). Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* *437*, 1048-1052.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* *21*, 267-271.
- Reimann, J. D., and Jackson, P. K. (2002). Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* *416*, 850-854.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B., and Jessberger, R. (2001). Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* *21*, 6984-6998.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H., and Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* *6*, 555-562.
- Revenkova, E., and Jessberger, R. (2005). Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction* *130*, 783-790.
- Rongish, B. J., Wu, W., and Kinsey, W. H. (1999). Fertilization-induced activation of phospholipase C in the sea urchin egg. *Dev Biol* *215*, 147-154.
- Roshak, A. K., Capper, E. A., Imburgia, C., Fornwald, J., Scott, G., and 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.
- Roussou, I., and Draetta, G. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit. *Mol Cell*

- Biol 14, 576-586.
- Rudolph, J. (2007). Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism. *Biochemistry* 46, 3595-3604.
- Runft, L. L., Carroll, D. J., Gillett, J., Giusti, A. F., O'Neill, F. J., and Foltz, K. R. (2004). Identification of a starfish egg PLC-gamma that regulates Ca²⁺ release at fertilization. *Dev Biol* 269, 220-236.
- Runft, L. L., and Jaffe, L. A. (2000). Sperm extract injection into ascidian eggs signals Ca²⁺ release by the same pathway as fertilization. *Development* 127, 3227-3236.
- Runft, L. L., Jaffe, L. A., and Mehlmann, L. M. (2002). Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol* 245, 237-254.
- Runft, L. L., Watras, J., and Jaffe, L. A. (1999). Calcium release at fertilization of *Xenopus* eggs requires type I IP(3) receptors, but not SH2 domain-mediated activation of PLCgamma or G(q)-mediated activation of PLCbeta. *Dev Biol* 214, 399-411.
- Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 49, 559-567.
- Russo, G. L., Kyozuka, K., Antonazzo, L., Tosti, E., and 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., and 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., Wilding, M., Marino, M., and Dale, B. (1998). Ins and outs of meiosis in ascidians. *Semin Cell Dev Biol* 9, 559-567.
- Sagata, N. (1996). [The roles of the Mos-MAPK pathway in oocyte meiosis and cellular transformation]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 41, 1847-1855.
- Sagata, N. (1997). What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* 19, 13-21.
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., and Vande Woude, G. F. (1988). Function of *c-mos* proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335, 519-525.
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., and Ikawa, Y. (1989). The *c-mos* proto-oncogene product is a cytosstatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342, 512-518.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
- Sardet, C., Speksnijder, J., Inoue, S., and Jaffe, L. (1989). Fertilization and ooplasmic movements in the ascidian egg. *Development* 105, 237-249.
- Sato, K., Tokmakov, A. A., and Fukami, Y. (2000). Fertilization signalling and protein-tyrosine kinases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126, 129-148.
- Satoh, N. (2003). The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics. *Nat Rev Genet* 4, 285-295.
- Satoh, N., Araki, I., and Satou, Y. (1996). An intrinsic genetic program for autonomous differentiation of muscle cells in the ascidian embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9315-9321.
- Satoh N, M. K., Katsuyama Y, Wada S, Saiga H (1996). The ascidian embryo: an experimental system for studying genetic circuitry for embryonic cell specification and morphogenesis. *Dev Growth Differ* 38,

325]340.

- Satou, Y., Kawashima, T., Kohara, Y., and Satoh, N. (2003). Large scale EST analyses in *Ciona intestinalis*: its application as Northern blot analyses. *Dev Genes Evol* 213, 314-318.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., and Lai, F. A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-3544.
- Schmidt, A., Duncan, P. I., Rauh, N. R., Sauer, G., Fry, A. M., Nigg, E. A., and Mayer, T. U. (2005). *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev* 19, 502-513.
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., and Mayer, T. U. (2006). Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J Cell Sci* 119, 1213-1218.
- Schwab, M. S., Roberts, B. T., Gross, S. D., Tunquist, B. J., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* 11, 141-150.
- Sheng, J., Kumagai, A., Dunphy, W. G., and Varshavsky, A. (2002). Dissection of c-MOS degran. *Embo J* 21, 6061-6071.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Shibuya, E. K., and Ruderman, J. V. (1993). Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Mol Biol Cell* 4, 781-790.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., Angerer, L. M., Arnone, M. I., Burgess, D. R., Burke, R. D., *et al.* (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941-952.
- Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M., and Kirschner, M. W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 63, 1013-1024.
- Solomon, M. J., Harper, J. W., and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* 12, 3133-3142.
- Song, D. H., Sussman, D. J., and Seldin, D. C. (2000). Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 275, 23790-23797.
- Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Owen TA. (2002) *Cell Cycle Encyclopedia of life sciences*
- Steinhardt, R. A., Epel, D., Carroll, E. J., Jr., and Yanagimachi, R. (1974). Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs? *Nature* 252, 41-43.
- Stricker, S. A. (1999). Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 211, 157-176.
- Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., and Lai, F. A. (2006). PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17, 264-273.
- Swedlow, J. R., and Hirano, T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol Cell* 11, 557-569.
- Tachibana, K., Tanaka, D., Isobe, T., and Kishimoto, T. (2000). c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14301-14306.
- Taieb, F., Thibier, C., and Jesus, C. (1997). On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol Reprod Dev* 48, 397-411.
- Taieb, F. E., Gross, S. D., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. (2001). Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression

- from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* *11*, 508-513.
- Tang, Z., Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1993). Two distinct mechanisms for negative regulation of the Wee1 protein kinase. *Embo J* *12*, 3427-3436.
- Taylor, C. W., Genazzani, A. A., and Morris, S. A. (1999). Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* *26*, 237-251.
- Taylor, S. C., and Peers, C. (1999). Store-operated Ca²⁺ influx and voltage-gated Ca²⁺ channels coupled to exocytosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Neurochem* *73*, 874-880.
- Tobe, K., Kadowaki, T., Hara, K., Gotoh, Y., Kosako, H., Matsuda, S., Tamemoto, H., Ueki, K., Akanuma, Y., Nishida, E., and et al. (1992). Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J Biol Chem* *267*, 21089-21097.
- Tosti, E., and Dale, B. (1994). Regulation of the fertilization current in ascidian oocytes by intracellular second messengers. *Mol Reprod Dev* *37*, 473-476.
- Tunquist, B. J., and Maller, J. L. (2003). Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* *17*, 683-710.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M. A., Koonin, E. V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375-386.
- Vande Woude, G. F., Buccione, R., Daar, I., Eppig, J. J., Oskarsson, M., Paules, R., Sagata, N., and Yew, N. (1990). *mos* proto-oncogene function. *Ciba Found Symp* *150*, 147-160; discussion 160-142.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., and 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.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* *36*, 131-149.
- Voronina, E., Marzluff, W. F., and Wessel, G. M. (2003). Cyclin B synthesis is required for sea urchin oocyte maturation. *Dev Biol* *256*, 258-275.
- Wada, S., Katsuyama, Y., Yasugi, S., and Saiga, H. (1995). Spatially and temporally regulated expression of the LIM class homeobox gene *Hrlim* suggests multiple distinct functions in development of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Mech Dev* *51*, 115-126.
- Whitaker, M. (1999). Ways of looking at calcium. *Microsc Res Tech* *46*, 342-347.
- Wilding, M., and Dale, B. (1997). Sperm factor: what is it and what does it do? *Mol Hum Reprod* *3*, 269-273.
- Wu, J. Q., Hansen, D. V., Guo, Y., Wang, M. Z., Tang, W., Freel, C. D., Tung, J. J., Jackson, P. K., and Kornbluth, S. (2007). Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 16564-16569.
- Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D., and Seldin, D. C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet* *23*, 118-121.
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., and 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.
- Yanagida, M. (2000). Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* *5*, 1-8.
- Yue, J., and Ferrell, J. E., Jr. (2006). Mechanistic studies of the mitotic activation of *Mos*. *Mol Cell Biol* *26*, 5300-5309.