



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo Biologia Evoluzionistica

XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

*Ruolo di neuropeptidi nella spermatogenesi
di vertebrati non mammiferi*

Relatore:

Ch.mo Prof. Piero Andreuccetti

Coordinatore del corso:

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Dottoranda:

Dott.ssa Marisa Agnese

Anno accademico 2009/2010

INDICE

<i>Abstract</i>	pag. 1
<i>Introduzione</i>	pag. 4
<u>Capitolo 1: Il PACAP e il VIP: struttura e funzioni</u>	pag. 7
1.1 Generalità	pag. 7
1.1.1 La superfamiglia del PACAP e del VIP	pag. 7
1.1.2 Il PACAP	pag. 7
1.1.3 Il VIP	pag. 8
1.2 Dal gene alla proteina	pag. 9
1.2.1 Il PACAP	pag. 10
1.2.2 Il VIP	pag. 12
1.3 Distribuzione e funzioni del PACAP e del VIP	pag. 14
1.4 Il PACAP e il VIP nei vertebrati	pag. 15
<u>Capitolo 2: I recettori del PACAP e del VIP</u>	pag. 22
2.1 Classificazione e vie di segnalazione dei recettori del PACAP e del VIP	pag. 22
2.2 Il recettore PAC₁	pag. 24
2.3 I recettori VPAC	pag. 26
2.4 Distribuzione dei recettori del PACAP e del VIP	pag. 28
2.5 I recettori del PACAP e del VIP in vertebrati non mammiferi	pag. 30
2.6 Evoluzione dei recettori del PACAP e del VIP	pag. 32
<u>Capitolo 3: Il PACAP, il VIP e i loro recettori nel testicolo dei vertebrati</u>	pag. 33
3.1 Localizzazione del PACAP, del VIP e dei loro recettori nel testicolo dei mammiferi	pag. 34
3.1.1 Il PACAP	pag. 34
3.1.2 Il VIP	pag. 36
3.1.3 I recettori	pag. 37
3.2 Funzioni del PACAP e del VIP nel testicolo	pag. 38
3.3 Il PACAP e il VIP nel testicolo di vertebrati non mammiferi	pag. 41
<u>Scopo della tesi</u>	pag. 43
<u>Capitolo 4: I modelli sperimentali: il testicolo di <i>Torpedo marmorata</i> e di <i>Podarcis sicula</i></u>	pag. 45

4.1 <i>Torpedo marmorata</i>	pag. 45
4.2 <i>Podarcis sicula</i>	pag. 48
<u>Capitolo 5: Materiali e metodi</u>	pag. 51
I e II fase: il PACAP, il VIP e i loro recettori	pag. 52
- Indagini di biologia molecolare	pag. 52
- Indagini biochimiche	pag. 62
- Indagini immunohistochimiche	pag. 64
III fase: colture d'organo sul testicolo di <i>Podarcis sicula</i>	pag. 65
<u>Capitolo 6: Risultati I: PACAP e VIP</u>	pag. 67
6.1 Il PACAP	pag. 67
6.1.1 <i>Torpedo marmorata</i>	pag. 67
6.1.2 <i>Podarcis sicula</i>	pag. 72
6.2 Il VIP	pag. 74
6.2.1 <i>Torpedo marmorata</i>	pag. 74
6.2.2 <i>Podarcis sicula</i>	pag. 75
<u>Capitolo 7: Risultati II: I recettori del PACAP e del VIP</u>	pag. 81
Western blotting	pag. 81
7.1 Il recettore PAC ₁	pag. 81
7.1.1 <i>Torpedo marmorata</i>	pag. 81
7.1.2 <i>Podarcis sicula</i>	pag. 85
7.2 I recettori VPAC	pag. 89
7.2.1 <i>Torpedo marmorata</i>	pag. 89
7.2.2 <i>Podarcis sicula</i>	pag. 90
<u>Capitolo 8: Risultati III: Colture d'organo</u>	pag. 92
8.1 Effetti del PACAP ₂₇	pag. 92
8.2 Effetti del PACAP ₃₈	pag. 92
8.3 Effetti del VIP	pag. 93
8.4 Confronto degli effetti indotti dai tre peptidi	pag. 93
<u>Discussione</u>	pag. 96
Tavole	pag. 106
Bibliografia	pag. 149

ABSTRACT

Spermatogenesis is a fascinating process involving the differentiation of round diploid spermatogonia to elongated haploid spermatozoa. This process is primarily under the control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with the production of gonadotropins, namely FSH and LH, and then under the control of various factors produced in germ and somatic gonadal cells that act in a paracrine or autocrine manner (Matsumoto et al., 1986). Recent studies demonstrated the presence of various neuropeptides (such as GHRH, PACAP, VIP, secretin, oxytocin and somatostatin) and their receptors in the testis, suggesting their involvement in spermatogenesis and steroidogenesis (Li and Arimura, 2003). However the role of these neuropeptides in the testicular physiology is largely unknown, although the use of new techniques is allowing the understanding of their regulatory functions in the testis. Among these neuropeptides, I focused my attention on two neuropeptides of the secretin peptide superfamily, that includes nine different hormones that are related by structure, distribution, function and receptors (Sherwood et al., 2000).

Among the peptides of this superfamily, I studied the PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), since the total amount of PACAP within the testis exceeds that of any other peptide present in the testis, and the VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), since this neuropeptide is 68% identical to PACAP and since PACAP and VIP act by binding some common receptors. PACAP is the newest peptide to be identified in the superfamily; it has been isolated from ovine hypothalamic extracts on the basis of its ability to stimulate cAMP formation in anterior pituitary cells; it exists in two different forms of 27 and 38 amino acids, named PACAP27 and PACAP38, respectively. VIP, a 28 amino acid peptide, is one of the earliest discovered neuropeptides of the superfamily, originally isolated from porcine ileum; the peptide has derived its name from the vasodilatory action seen upon systemic administration. The sequence of both PACAP and VIP has been remarkably well conserved during the evolution (Vaudry et al., 2000). PACAP and VIP bind the same receptors; indeed, both bind VPAC₁ e VPAC₂ receptors with the same affinity; however, PACAP binds also a PACAP-specific receptor, the PAC₁R, which has been described as “one of the most extensively spliced GPCRs known”, with variants resulting from the alternative splicing of the hip/hop cassettes in the third intracellular loop (Dickson and Finlayson, 2009).

PACAP and VIP are pleiotropic peptides, that influence gametogenesis, and particularly spermatogenesis. However the exact role of these peptides in this process has not been fully understood yet; furthermore, despite the large number of data in mammalian testis (Li and Arimura, 2003), few information are available for non mammalian vertebrates (Gobbetti and Zerani, 2002; Huang et al., 2009; Agnese et al., 2010). Therefore, the aim of this PhD thesis is the characterization of PACAP, VIP and their receptors in the testis of two non mammalian vertebrates: the cartilaginous fish *Torpedo marmorata* and the wall lizard *Podarcis sicula*, that are characterized by a different testicular organization, cystic in *Torpedo* (Stanley, 1966; Prisco et al., 2002) and tubular in *Podarcis* (Galgano and D'Amore, 1953; Lofts, 1987).

The investigation was carried out following three research lines: in the first I studied the PACAP, analyzing the sequence encoding *Torpedo* PACAP and the distribution of its mRNA and protein (both PACAP27 and PACAP38) in *Torpedo* and in *Podarcis*, and the VIP, analyzing the sequence encoding *Podarcis* VIP (verifying if the same gene that encodes VIP encodes also PHI) and its mRNA and protein localization in both the experimental models; the second research line pointed to the localization of PACAP and VIP receptors and to the sequencing of *Torpedo* and *Podarcis* PAC₁R; finally, the third line consisted in the *in vitro* organ culture of the *Podarcis sicula* testis to verify the effects of PACAP and VIP on testicular steroidogenesis. The results of the experiments carried out during these three years demonstrated that *Torpedo* PACAP, *Podarcis* VIP and *Torpedo* and *Podarcis* PAC₁R have highly conserved sequences, as assessed by comparison of the sequences with those of known vertebrates; furthermore, it was demonstrated that the VIP gene encodes also PHI and that in *Torpedo* and *Podarcis* testis only some variants of the PAC₁R are present: particularly, the null and hop2 variants are expressed in *Torpedo*, while the null and hop1 variants are expressed in *Podarcis*. The obtained results showed the testicular cells that synthesize these neuropeptides and the PAC₁R and demonstrated that PACAP, VIP and their receptors are widely distributed in *Torpedo* and *Podarcis* testis; their localization strongly suggests that the peptides are involved in the hormonal control of spermatogenesis and steroidogenesis, acting via a paracrine and/or autocrine mechanism. PACAP and VIP involvement in the *Podarcis* steroidogenesis was directly demonstrated by the testis culture.

Thus, PACAP and VIP can be included among the neuropeptides locally produced in the testis, that take part in the regulation of spermatogenesis and steroidogenesis of *Torpedo marmorata* and *Podarcis sicula*. Comparing the data reported in the present thesis (see also

Agnese et al., 2010) and the information available in mammals, it is evident that these neuropeptides have a more significant role in the spermatogenesis of non mammalian vertebrates rather than in mammals, since PACAP, VIP and their receptors are represented in the testis during the different phases of spermatogenesis; differently, in mammals the distribution is limited to spermatids for PACAP, while VIP is not represented in the seminiferous epithelium. Only further studies on these neuropeptides in other non mammalian vertebrates could allow the complete understanding of the processes that led to the differences in the localization of these neuropeptides throughout the vertebrate evolution.

INTRODUZIONE

Il testicolo è un organo complesso che svolge due funzioni fondamentali, la spermatogenesi e la steroidogenesi. Tali processi si realizzano sotto il controllo delle gonadotropine ipofisarie, FSH e LH, il cui rilascio è stimolato dal GnRH, e di numerosi fattori paracrini e autocrini (Matsumoto et al., 1986). Recenti studi hanno dimostrato la presenza di molti neuropeptidi e dei loro recettori nel testicolo, suggerendo che questi possano agire come regolatori locali della spermatogenesi e della steroidogenesi. Tra i neuropeptidi identificati nel testicolo rientrano il GHRH, il PACAP, il VIP, la secretina, l'ossitocina e la somatostatina. Il ruolo di questi neuropeptidi nella fisiologia del testicolo è in gran parte sconosciuto, anche se l'avvento di nuove tecniche ha permesso di iniziare a comprenderne le funzioni come fattori regolatori di spermatogenesi e steroidogenesi (Li e Arimura, 2003). Tra i neuropeptidi coinvolti nella regolazione delle funzioni testicolari, la mia attenzione si è rivolta principalmente a due neuropeptidi della superfamiglia della secretina, che include nove ormoni accomunati dalla struttura, dalla distribuzione, dalla funzione e dai recettori: ho studiato in primo luogo il PACAP, dal momento che la sua concentrazione nel testicolo supera quella di qualsiasi altro peptide testicolare noto, e in secondo luogo il VIP, dal momento che questo peptide ha il 68% di identità con il PACAP e dal momento che questi due neuropeptidi svolgono le proprie funzioni interagendo con alcuni recettori comuni (Sherwood et al., 2000).

Il PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) è il membro della superfamiglia descritto più di recente in base alla sua capacità di stimolare la formazione di cAMP nelle cellule dell'ipofisi anteriore di ratto; è un peptide che esiste in due diverse forme di 27 e 38 aminoacidi, il PACAP27 e il PACAP38, rispettivamente. Il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) è un peptide di 28 aminoacidi; è uno dei membri della superfamiglia isolato più precocemente dall'ileo di maiale e deve il suo nome all'azione vasodilatatoria che induce dopo somministrazione sistemica. La sequenza di entrambi i peptidi si è conservata nel corso dell'evoluzione (Vaudry et al., 2000). Il PACAP e il VIP interagiscono con alcuni recettori comuni; infatti entrambi si legano con la stessa affinità ai recettori VPAC₁ e VPAC₂; in aggiunta, il PACAP si lega anche al recettore PAC₁, che è il recettore a sette segmenti transmembrana di cui si conosce il maggior numero di isoforme, la maggior parte delle quali

deriva dallo splicing alternativo di alcune cassette (hip/hop) nel terzo loop intracellulare (Dickson e Finlayson, 2009).

Il PACAP e il VIP sono peptidi pleiotropici, che intervengono nella gametogenesi, e in particolare nella spermatogenesi. Tuttavia il loro ruolo nell'ambito di questo processo non è stato ancora del tutto chiarito e, se da una parte non mancano studi condotti nel testicolo dei mammiferi (Li e Arimura, 2003), dall'altra i dati circa il coinvolgimento del PACAP e del VIP nella spermatogenesi dei vertebrati non mammiferi sono a tutt'oggi molto scarsi (Gobbetti e Zerani, 2002; Huang et al., 2009; Agnese et al., 2010). È per questa ragione che lo scopo di questa tesi di dottorato è quello di caratterizzare il PACAP, il VIP e i loro recettori nel testicolo di due vertebrati non mammiferi: il pesce cartilagineo *Torpedo marmorata* e il rettile squamato *Podarcis sicula*, confrontando, attraverso questi modelli sperimentali, un'organizzazione testicolare di tipo cistica (*Torpedo marmorata*) (Stanley, 1966; Prisco et al., 2002) con una di tipo tubulare (*Podarcis sicula*) (Galvano e D'Amore, 1953; Lofts, 1987).

Lo studio è stato condotto lungo tre linee di ricerca: la prima è stata tesa essenzialmente allo studio del PACAP, del quale sono state caratterizzate la sequenza codificante in *Torpedo* e la distribuzione del messaggero e della proteina nelle sue due forme 27 e 38 in *Torpedo* e in *Podarcis*, e del VIP, del quale sono state caratterizzate la sequenza in *Podarcis* (verificando anche se lo stesso gene che codifica il VIP codifica anche il PHI) e la localizzazione del messaggero e della proteina in entrambi i modelli sperimentali; la seconda ha riguardato la localizzazione dei recettori del PACAP e del VIP, con una particolare attenzione al recettore PAC₁, sul quale è stata condotta anche un'analisi di tipo biomolecolare per caratterizzare parte della sequenza codificante questo recettore sia in *Torpedo* sia in *Podarcis*; la terza linea di ricerca è stata prettamente funzionale e ha previsto l'allestimento di colture d'organo per comprendere l'effetto di PACAP e VIP sulla steroidogenesi nel testicolo di *Podarcis sicula*. I dati ottenuti nel corso di questi tre anni hanno innanzitutto dimostrato che le sequenze del PACAP di *Torpedo*, del VIP di *Podarcis* e del recettore PAC₁ di *Torpedo* e di *Podarcis* hanno un'elevata identità con quelle degli altri vertebrati; in particolare, per quanto riguarda il VIP, è stato dimostrato che lo stesso gene che codifica il VIP codifica anche il PHI; per quanto riguarda invece il PAC₁R, le analisi biomolecolari hanno evidenziato che nel testicolo di *Torpedo marmorata* sono presenti le isoforme null e hop2, nel testicolo di *Podarcis sicula* la null e la hop1. Sono stati quindi individuati i siti di sintesi endotesticolare del PACAP, del VIP e del recettore PAC₁. È emerso inoltre che questi

neuropeptidi e i loro recettori sono ampiamente distribuiti nel testicolo di entrambi i modelli sperimentali e la loro localizzazione suggerisce fortemente che PACAP e VIP intervengono nella regolazione della spermatogenesi e della steroidogenesi sia di *Torpedo* sia di *Podarcis* agendo come fattori paracrini e autocrini; il coinvolgimento di questi peptidi nella steroidogenesi di *Podarcis sicula* è stato poi dimostrato più direttamente dalle colture d'organo. I risultati ottenuti hanno dunque dimostrato che il PACAP e il VIP possono essere annoverati tra quei neuropeptidi prodotti localmente a livello testicolare, che partecipano alla fine regolazione della spermatogenesi e della steroidogenesi anche in *Torpedo marmorata* e in *Podarcis sicula*. Dall'insieme dei dati da me ottenuti (vedi anche Agnese et al., 2010) e da quelli ottenuti nei mammiferi emerge chiaramente che nei vertebrati non mammiferi il ruolo di tali neuropeptidi nel controllo della spermatogenesi sembra molto più significativo dal momento che il PACAP, il VIP e i rispettivi recettori sono ampiamente rappresentati nei diversi momenti della spermatogenesi, mentre nei mammiferi la loro distribuzione è particolarmente circoscritta, nel caso del PACAP, o del tutto assente, almeno come molecola, nel caso del VIP. A questo proposito sarebbe particolarmente interessante estendere le osservazioni ad altri rettili e agli uccelli per avere una visione più completa della distribuzione di tali peptidi nei diversi taxa di vertebrati e quindi pervenire ad una comprensione dei processi che nel corso della storia evolutiva dei vertebrati hanno accompagnato i cambiamenti nella localizzazione di tali neuropeptidi.

CAPITOLO 1

IL PACAP E IL VIP: STRUTTURA E FUNZIONI

1.1 GENERALITÀ

1.1.1 La superfamiglia del PACAP e del VIP

Il PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) e il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) sono due peptidi strutturalmente correlati, che appartengono alla superfamiglia di ormoni della secretina, così chiamata in quanto la secretina è stato il primo membro della superfamiglia ad essere descritto. Questa superfamiglia include nove diversi peptidi bioattivi: il glucagone, il GLP-1 (Glucagon-Like-Peptide-1), il GLP-2, il GIP (Glucose-Dependent-Insulinotropic Polypeptide), il GHRH (GH-Releasing Hormone), il PHM (Peptide Histidine-Methionine), il PACAP, la secretina e il VIP. Sei geni codificano i nove peptidi bioattivi della superfamiglia; l'organizzazione strutturale di questi geni è molto simile e tale somiglianza si riflette poi nei precursori dei vari peptidi: ogni gene codifica infatti un peptide segnale, da 1 a 3 peptidi bioattivi e un peptide C-terminale (Sherwood et al., 2000). Oltre ad avere una considerevole identità nelle sequenze, la maggioranza dei peptidi di questa superfamiglia presenta anche una somiglianza nella struttura secondaria, con strutture random coil all'N-terminale e regioni ad α -elica al C-terminale (Clowes et al., 1986; Gronenborn et al., 1987; Theriault et al., 1991; Wray et al., 1998). I membri di questa superfamiglia hanno numerose funzioni che sono svolte attraverso l'interazione con recettori a sette segmenti transmembrana (Dickson e Finlayson, 2009).

1.1.2 Il PACAP

Il PACAP è un peptide che esiste in due diverse forme, una di 38 (PACAP38) e una di 27 (PACAP27) aminoacidi. Nella sua forma con 38 aminoacidi è stato descritto per la prima volta da Miyata e collaboratori nel 1989, mentre tentavano di isolare un ormone ipotalamico ovino capace di stimolare l'adenilato ciclasi nelle

cellule dell'ipofisi anteriore di ratto; è stato così identificato un peptide di 38 aminoacidi, definito, di conseguenza, PACAP38 (Miyata et al., 1989). Meno di un anno dopo, lo stesso gruppo di ricerca ha isolato un altro peptide capace di stimolare l'adenilato ciclasi come prodotto secondario della purificazione del PACAP38 (Miyata et al., 1990); successive analisi hanno poi dimostrato che questo nuovo peptide è una forma tronca del PACAP38, corrispondente ai primi 27 aminoacidi del PACAP38 (Miyata et al., 1990), e denominato quindi PACAP27; entrambi i peptidi sono amidati all'estremità C-terminale (Miyata et al., 1989, 1990).

Nonostante l'iniziale scoperta come ormone ipotalamico, successive indagini hanno evidenziato che il PACAP è ampiamente distribuito nel sistema nervoso centrale e periferico, nonché in numerosi organi periferici dove svolge specifiche funzioni (vedi par. 1.3), per cui può essere considerato un peptide pleiotropico (Fahrenkrug, 2010).

Inoltre, a seguito della sua scoperta, il PACAP è stato poi caratterizzato in varie specie di vertebrati (vedi par. 1.4): questo peptide è presente sia nei mammiferi sia nei vertebrati non mammiferi e più recentemente è stato descritto anche nei tunicati (Vaudry et al., 2000); in modo sorprendente la sua sequenza è rimasta quasi invariata per un periodo di circa 700 milioni di anni (vedi par. 1.4) (Arimura, 1998), suggerendo quindi che le sue funzioni possano essere essenziali per la sopravvivenza.

1.1.3 Il VIP

Il VIP è un peptide di 28 aminoacidi, che presenta il 68% di identità con il PACAP27; diversamente dal PACAP, che è il più recente membro della superfamiglia della secretina ad essere stato descritto (Miyata et al., 1989), il VIP è uno dei peptidi isolato più precocemente da Said e Mutt (1970a) dall'ileo di maiale. Questo peptide deve il suo nome all'azione vasodilatatoria che induce dopo somministrazione sistemica (Said e Mutt, 1970b). Successivamente è stato messo in evidenza che il VIP esercita la sua azione stimolando l'attività dell'adenilato ciclasi e dunque la formazione di cAMP (Desbueguois et al., 1973). Da successive analisi della sequenza aminoacidica, è stato evidenziato che il VIP è un peptide altamente basico di 28 aminoacidi con un'asparagina amidata al C-terminale (Mutt e Said, 1974).

Inizialmente il VIP è stato classificato solo come ormone intestinale; tuttavia, studi successivi hanno evidenziato che presenta una distribuzione molto più ampia (vedi par. 1.3), con una localizzazione predominante nel sistema nervoso centrale e periferico (Larsson et al., 1976 a, b). Gli studi condotti negli ultimi anni hanno validato questa ipotesi, evidenziando però il coinvolgimento di questo peptide anche in molte altre funzioni (Bryant et al., 1976; Duckles e Said, 1982; Fahrenkrug e Hannibal, 2004; Van Geldre e Lefebvre, 2004). Attualmente il VIP è considerato un neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale e periferico, coinvolto nel controllo della motilità, del flusso sanguigno e della secrezione del tratto intestinale, del tratto respiratorio e di quello urogenitale (Fahrenkrug, 1993).

Il VIP è stato caratterizzato in varie specie di vertebrati (vedi par. 1.4) e la sua sequenza risulta altamente conservata, in modo simile al PACAP, anche se la conservazione è più bassa di quella riscontrata per il PACAP (vedi par. 1.4).

1.2 DAL GENE ALLA PROTEINA

Prima di analizzare le singole caratteristiche del PACAP e del VIP, ricordo che i geni che codificano questi peptidi presentano una struttura simile, caratterizzata dal fatto che ciascun gene codifica un precursore più grande (preproPACAP e preproVIP, rispettivamente), contenente un peptide segnale, un peptide N-terminale (detto peptide criptico e presente, nell'ambito della superfamiglia, solo nel gene del PACAP e del VIP), due peptidi (infatti entrambi i geni codificano, oltre al PACAP e al VIP, un secondo peptide, il PRP e PHI/PHM, rispettivamente, codificato dall'esone che precede quello che codifica il PACAP o il VIP) e un peptide C-terminale. La proteolisi di questo precursore porterà poi alla formazione del PACAP, nelle sue due forme mature 38 e 27, e del VIP (Fig. I) (Vaudry et al., 2009; Dickson e Finlayson, 2009).

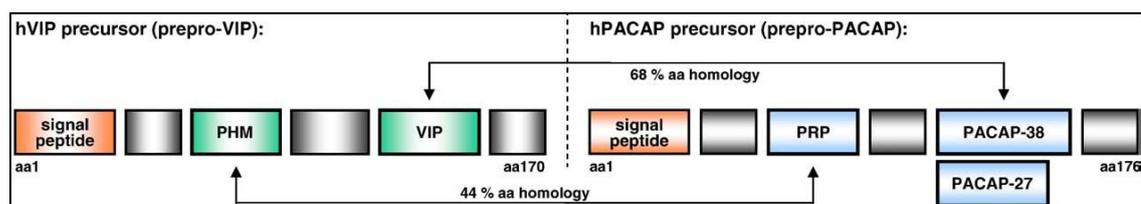


Figura I: il precursore del VIP e del PACAP (Dickson e Finlayson, 2009).

1.2.1 Il PACAP

Il gene del PACAP umano è stato clonato nel 1992 e mappato nella regione p11 del cromosoma 18 (Hosoya et al., 1992), mentre nel ratto è localizzato sul cromosoma 9q37 (Cai et al., 1995). Questo gene è costituito da cinque esoni e quattro introni; il promotore contiene due elementi di risposta al cAMP (CRE), un elemento di risposta al 12-O-tetradecanoilforbolo 13-acetato e un paio di sequenze omologhe alla sequenza consenso per i siti di legame del GHF-1, che sono importanti per l'espressione tessuto-specifica del GH (Dolle et al., 1990; Castrillo et al., 1991). Ricerche sull'attività del promotore hanno dimostrato che il gene del PACAP è espresso costitutivamente e che la sua trascrizione può essere indotta dal cAMP, dal 12-tetradecanoilforbolo 13-acetato e dal PACAP stesso (Suzuki et al., 1994; Hashimoto et al., 2000). È stato inoltre messo in evidenza che nell'uomo l'esone 1 comprende la 5'-UTR, l'esone 2 comprende la regione che codifica il peptide segnale, l'esone 3 quella che codifica il peptide criptico, l'esone 4 codifica il PRP (PACAP-Related-Peptide), un peptide di 29 aminoacidi che non è biologicamente attivo, probabilmente a causa della sostituzione dell'aminoacido Asp in His o Tyr nella posizione N-terminale; infine l'esone 5 comprende la regione che codifica il PACAP38 e la 3'-UTR. La mancanza di un esone che codifica il PACAP27 indica che questo non deriva da un meccanismo di splicing alternativo, ma, come di seguito riportato, dalla proteolisi alternativa post-traduzionale del precursore (Hosoya et al., 1992).

La traduzione dell'mRNA determina la formazione di un precursore del PACAP, noto come preproPACAP, che è lungo 176 aminoacidi ed include il peptide segnale, una proregione (107 aa), contenente il PRP, e il PACAP stesso. Dalla

proteolisi del precursore si formano il PRP e il PACAP nelle sue due forme di 27 e 38 aminoacidi: la sequenza del PACAP38 è seguita dalla sequenza Gly-Lys-Arg che serve per il processamento proteolitico e l'amidazione. La forma matura del PACAP38 contiene inoltre dei residui aminoacidici basici, Gly²⁸-Lys²⁹-Arg³⁰, che costituiscono un probabile sito di proteolisi post-traduzionale e successiva amidazione, che porta quindi alla formazione del PACAP27, di 27 aminoacidi, che è una forma tronca del PACAP38 (Fig. I) (Ohkubo et al., 1992). Il processamento post-traduzionale del precursore è operato da una famiglia di pro-ormone convertasi (PCs), caratterizzate per la prima volta in alcuni tessuti di mammiferi. Tra queste PCs, la PC₁ e la PC₂ sono espresse in cellule ad attività endocrina e neuronale, mentre la PC₄ è presente esclusivamente nel testicolo e nell'ovario, dove invece non sono espresse né la PC₁ né la PC₂ (Li et al., 1998, 2000).

Infine, la struttura conformazionale del PACAP38 e del PACAP27 è stata determinata usando la spettroscopia CD e NMR. Il PACAP27 è costituito da vari domini: i primi otto aminoacidi all'N-terminale hanno una struttura random coil (dominio 1-8) e sono seguiti da una regione (aa 9-24), che consiste di quattro domini distinti (Inooka et al., 1992): il primo dominio presenta una conformazione β , mentre gli altri tre domini presentano una struttura ad α -elica. La conformazione del PACAP38 rispecchia quella del PACAP27 nella regione N-terminale, mentre la porzione C-terminale è costituita da una corta coda ad α -elica attaccata tramite una cerniera flessibile alla regione 1-27 (Wray et al., 1993) (Fig. II).

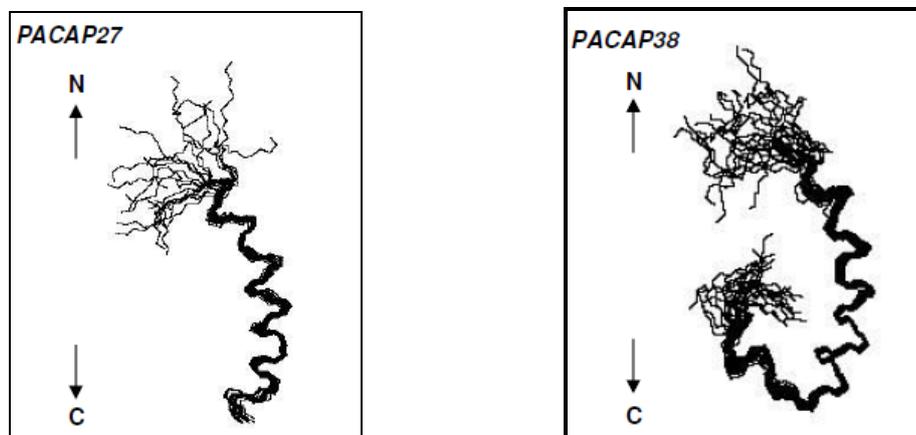


Figura II: struttura del PACAP27 e del PACAP38 (Sze et al., 2007).

La tripletta N-terminale His-Ser-Asp, il dominio centrale ad α -elica e la coda C-terminale formano tre siti di ancoraggio necessari per il riconoscimento del recettore. Due di questi tre domini strutturali possono contribuire al legame ad alta affinità con il recettore. La tripletta N-terminale, oltre a legare il recettore, è essenziale anche per l'attivazione del recettore e la trasduzione del segnale: la sua rimozione porta infatti alla formazione dell'antagonista competitivo, il PACAP6-38 (Robberecht et al., 1992).

1.2.2 Il VIP

Il gene del VIP umano è stato clonato nel 1985 e mappato sul cromosoma 6 nella regione q25 (Tsukada et al., 1985; Gozes et al., 1987); sei anni dopo sono stati clonati anche i geni del VIP di ratto e di topo e localizzati sul cromosoma 1p11 e 10A1, rispettivamente (Lamperti et al., 1991). Il gene del VIP è costituito da sette esoni e sei introni; il suo promotore presenta 3 TATAAA box (Yamagami et al., 1988; Sena et al., 1994), dei siti consenso AP2 (Sena et al., 1994), un elemento di risposta al cAMP (CRE) entro le 100 bp dal sito di inizio (Yamagami et al., 1988; Sena et al., 1994; Hahn e Eiden, 1996), un'area responsiva alle citochine circa 1 Kb a monte del sito di inizio (Tolentino et al., 1995) e un'area contenente sequenze di DNA ripetuto (Linder et al., 1987). È stato inoltre messo in evidenza che nell'uomo ciascuno dei sette esoni codifica un diverso dominio funzionale del precursore del VIP e in particolare l'esone 1 comprende la 5'-UTR; l'esone 2 comprende la rimanente parte della 5'-UTR e la regione codificante il peptide segnale e una parte del peptide criptico (regione N-terminale); l'esone 3 codifica la maggior parte del peptide criptico; l'esone 4 il PHM (Peptide Histidine-Methionine amide) e una parte della regione che separa il PHM e il VIP; l'esone 5 codifica la restante parte della regione che separa PHM e VIP, la sequenza del VIP e una piccola parte della regione C-terminale; l'esone 6 comprende la maggior parte della regione C-terminale e una parte della 3'-UTR; infine, l'esone 7 comprende il resto della 3'-UTR (Yamagami et al., 1988). Bisogna comunque precisare che nei vertebrati non mammiferi l'esone 4 codifica il PHI (Peptide Histidine-Isoleucine amide), che differisce dal PHM solo nell'aminoacido C-

terminale, dove presenta un'isoleucina al posto della metionina. Questo è un peptide biologicamente attivo; ha 27 aminoacidi ed è molto simile al VIP nella sequenza e nelle funzioni, anche se è meno potente del VIP (Tatemoto e Mutt, 1981).

La traduzione dell'mRNA determina quindi la formazione di un precursore del VIP, noto come preproVIP, che è lungo 170 aminoacidi ed include, oltre al VIP, il peptide segnale e il PHI/PHM (Fig. I). Nel precursore, sia il PHI/PHM sia il VIP sono fiancheggiati C-terminalmente dagli aminoacidi Gly-Lys-Arg, che guidano il processamento del precursore, dal momento che costituiscono dei putativi siti di proteolisi e successiva amidazione; N-terminalmente il PHI/PHM è fiancheggiato da una Arg, anch'essa potenziale sito di clivaggio, mentre il VIP è fiancheggiato da una tipica sequenza dibasica Lys-Arg di proteolisi (Fahrenkrug, 2010). Tuttavia, il processamento del precursore può anche seguire una via alternativa in cui il sito dibasico di proteolisi dopo il PHI non viene tagliato, portando alla formazione di una forma di PHI estesa al C-terminale, definita PHV, che è potente quanto il VIP nel determinare il rilassamento dei muscoli lisci (Palle et al., 1992; Yiangou et al., 1987).

Infine, la struttura conformazionale del VIP riflette quella riportata per gli altri membri della superfamiglia; in particolare, numerosi studi conformazionali hanno evidenziato che il VIP possiede due segmenti di strutture secondarie: una struttura random coil all'N-terminale, contenente circa dieci residui aminoacidici (da 1 a 9), e una lunga struttura ad α -elica nella regione C-terminale (dalla posizione 10 al C-terminale) (Bodanszky et al., 1974; Robinson et al., 1982; Bodanszky e Bodanszky, 1986; Onoue et al., 2008) (Fig. III).



Figura III: struttura del VIP (Onoue et al., 2008).

Dal momento che PACAP e VIP interagiscono con due recettori comuni (vedi cap. 2), mentre il PACAP interagisce con un recettore a cui il VIP non si lega, sono stati condotti numerosi studi per chiarire gli elementi strutturali responsabili della selettività del recettore (Onoue et al., 2008). Tali studi hanno dimostrato che la regione N-terminale dei peptidi gioca un ruolo cruciale per il legame con il recettore PACAP-specifico; in particolare i residui 4 e 5 sono fondamentali per la selettività del recettore (Onoue et al., 1999; Onoue et al., 2001); d'altra parte, la formazione della struttura ad α -elica C-terminale è critica per il legame con i recettori VPAC (Onoue et al., 2004; Gourlet et al., 1996).

1.3 DISTRIBUZIONE E FUNZIONI DEL PACAP E DEL VIP

Dal momento in cui sono stati scoperti, sono stati condotti molti studi per localizzare il PACAP e il VIP. In generale, questi peptidi presentano una distribuzione molto ampia nel sistema nervoso, centrale e periferico, così come in numerosi altri organi. In sintesi, il PACAP e il VIP hanno un diverso pattern di distribuzione nel sistema nervoso centrale, mentre colocalizzano in numerosi organi (Fahrenkrug e Hannibal, 2004). I più alti livelli di PACAP, e, tra le due forme, di PACAP38 (Arimura et al., 1991), sono stati trovati nell'ipotalamo, in particolare nel nucleo para- e peri-ventricolare, e nel nucleo soprachiasmatico (Arimura et al., 1991; Masuo et al., 1993); inoltre il PACAP è presente nel nucleo arcuato, nell'amigdala, nel talamo, nel cortex cerebrale, nel midollo allungato e nell'ipofisi posteriore (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993; Masuo et al., 1993; Fukuhara et al., 1997). Il VIP è ampiamente distribuito nell'encefalo, con una considerevole espressione nel cortex cerebrale, nell'ippocampo, nell'amigdala, nel nucleo soprachiasmatico e nell'ipotalamo (Koves et al., 1991; Mikkelsen e Fahrenkrug, 1994; Acsady et al., 1996; Fahrenkrug e Hannibal, 2004). Infine sia il PACAP sia il VIP sono presenti nelle fibre nervose che innervano i vasi sanguigni cerebrali (Miao e Lee, 1990; Uddman et al., 1993).

La coespressione del PACAP e del VIP è stata ben documentata in molti sistemi; infatti entrambi sono presenti nel sistema gastro-intestinale, cardiovascolare, respiratorio, riproduttivo, così come nelle ghiandole endocrine ed esocrine (Ghatei et

al., 1993; Werkstrom et al., 1998; Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000; Dickson e Finlayson, 2009) e nelle cellule e nei tessuti del sistema immunitario (Gaytan et al., 1994; Leceta et al., 1994; Delgado et al., 1996; Abad et al., 2002). Come riportato nell'encefalo, tra le due forme di PACAP, il PACAP38 risulta sempre la forma presente in quantità maggiore. In particolare, un'alta concentrazione di PACAP è stata riscontrata nelle cellule germinali del testicolo, dove la quantità totale di PACAP supera quella presente nell'intero encefalo (Arimura et al., 1991).

Data l'ampia e simile distribuzione del PACAP e del VIP, è facile immaginare che questi siano peptidi pleiotropici con funzioni che spesso si sovrappongono (Cardoso et al., 2007a). Nei mammiferi, il PACAP è prevalentemente associato al sistema nervoso e svolge un ruolo ipofisiotropico nella secrezione degli ormoni ipofisari (Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000), mentre il VIP è prevalentemente associato al sistema gastrointestinale, agisce come potente vasoregolatore ed è coinvolto nella motilità intestinale (Sherwood et al., 2000). Nonostante questa distinzione, né il PACAP può essere considerato solo un fattore ipotalamico di rilascio di ormoni dell'ipofisi anteriore, né d'altra parte il VIP può essere considerato esclusivamente un ormone intestinale. Infatti è sempre più evidente che questi peptidi possano agire come ormoni, neurotrasmettitori e fattori trofici in vari tessuti, e sono comunemente riconosciuti come principali regolatori della crescita e del differenziamento cellulare, con funzioni trofiche e citoprotettive, e come regolatori dello sviluppo embrionale, della neurogenesi e di molti tipi di cancro (Couvineau et al., 1986; Dejda et al., 2005; Moody et al., 2003a, b; Muller et al., 1995; Waschek, 1995).

Non mi soffermerò sulle funzioni svolte da questi peptidi nei singoli organi; si rimanda al capitolo 3 per i dettagli sulla distribuzione e le funzioni di questi peptidi nel testicolo, in considerazione allo scopo della presente tesi.

1.4 IL PACAP E IL VIP NEI VERTEBRATI

A seguito della loro scoperta, i geni del PACAP e del VIP sono stati caratterizzati soprattutto nei cordati. I tetrapodi possiedono un singolo gene del

PACAP e del VIP, mentre nei teleostei, con l'eccezione di *Carassius auratus*, sono stati riportati due geni del PACAP (*PACAPa* e *PACAPb*); fino a poco tempo fa si riteneva che fosse presente un singolo gene del VIP nei teleostei, fatta eccezione per *Carassius auratus*, in cui sono stati isolati due geni del VIP (*goldfish 2A* e *11A*), che probabilmente hanno avuto origine da un evento di duplicazione genica specifica di questa specie (Tse et al., 2002; Cardoso et al., 2007a). In realtà, recentemente è stato identificato un nuovo gene del VIP anche in altri teleostei e i geni duplicati sono stati quindi designati con il nome di *VIPa* e *b* (Lee et al., 2007).

I geni duplicati del PACAP dei teleostei hanno un'organizzazione sovrapponibile a quella dei geni dei tetrapodi, con il PRP codificato dall'esone che precede quello che codifica il PACAP (Cardoso et al., 2007a). Bisogna tuttavia precisare che precedentemente si credeva che, in animali meno evoluti dei mammiferi (tunicati, pesci, anfibi, rettili e uccelli), l'esone 4 codificasse un peptide GHRH-like, che nei mammiferi è sostituito dal PRP. Tuttavia, recenti dati indicano che nei vertebrati non mammiferi, come nei mammiferi, il GHRH è codificato da un gene diverso da quello del PACAP (Lee et al., 2007; Wang et al., 2007).

I geni duplicati del VIP dei teleostei sono di un esone più corti rispetto al gene del VIP dei tetrapodi; in particolare, nel gene *VIPa* dei teleostei manca l'esone 5 rispetto all'omologo umano del VIP, mentre nel gene *VIPb* dei teleostei manca l'esone 2 (Cardoso et al., 2007a).

Inoltre trascritti alternativi del PACAP sono stati descritti in tutti i vertebrati. In generale, sono stati identificati due trascritti: uno più lungo, che codifica sia il PRP sia il PACAP, e una variante più corta derivante da un evento di splicing alternativo che esclude l'esone del PRP e codifica quindi esclusivamente il PACAP (McRory et al., 1995, 1997; Parker et al., 1993, 1997; Alexandre et al., 2000a). Inoltre, in *Danio rerio* è stato descritto un nuovo trascritto che manca dell'esone 3 che codifica il peptide criptico (Krueckl et al., 2003).

Al contrario, sono stati descritti pochi trascritti alternativi del VIP. In *Carassius auratus* sono stati riportati due trascritti alternativi, uno contenente sia il PHI sia il VIP, l'altro contenente solo il PHI (Tse et al., 2002); in *Gallus gallus* è stato descritto anche un

ulteriore trascritto più corto che manca della regione codificante il PHI (Talbot et al., 1995).

Le sequenze sia del PACAP sia del VIP si sono altamente conservate nel corso dell'evoluzione, come emerge dal confronto delle sequenze di vari vertebrati.

Per quanto riguarda il PACAP, a seguito della sua scoperta, questo peptide è stato identificato in varie specie di vertebrati, sia mammiferi, quali uomo (Hosoya et al., 1992; Ohkubo et al., 1992), pecora (Miyata et al., 1989, 1990; Kimura et al., 1990), ratto (Ogi et al., 1990), topo (Okazaki et al., 1995; Yamamoto et al., 1998), sia in vari vertebrati non mammiferi, tra cui uccelli (*Gallus gallus* (McRory et al., 1997)), rettili (*Podarcis sicula* (Pohl e Wank, 1998, Valiante et al., 2007)), anfibi (*Rana ridibunda* (Chartrel et al., 1991; Yon et al., 2001)), teleostei (*Salmo salar* (Parker et al., 1993, 1997), *Clarias macrocephalus* (McRory et al., 1995), *Uranoscopus japonicus* (Matsuda et al., 1997), *Carassius auratus* (Leung, 1999) e *Danio rerio* (Fradinger et al., 1996)) ed elasmobranchi (*Dasyatis akajiei* (Matsuda et al., 1998a, b)); più recentemente è stato anche descritto nei tunicati (McRory e Sherwood, 1997). Tra le specie in cui è stato identificato, è stata evidenziata un'elevata conservazione nella sequenza: in particolare, nei mammiferi il PACAP presenta una perfetta identità nella sequenza aminoacidica (Sherwood et al., 2000), mentre nelle altre specie in cui è stato identificato presenta la sostituzione di uno o di soli pochi aminoacidi: il PACAP del pollo e della rana presentano, rispetto ai mammiferi, la sostituzione di un solo aminoacido (Chartrel et al., 1991); nei pesci, invece, il PACAP, in confronto con quello dei mammiferi, presenta tre o quattro sostituzioni aminoacidiche, che si trovano, con una sola eccezione, nella regione C-terminale (Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000; Valiante et al., 2007) (Fig. IV). Questi dati evidenziano quindi che la sequenza del PACAP è altamente conservata ed è rimasta quasi invariata per un periodo di circa 700 milioni di anni (Arimura, 1998); un simile livello di identità non è stato riscontrato per nessun altro ormone di grandezza comparabile al PACAP, il che suggerisce che le sue funzioni possano essere essenziali per la sopravvivenza.

	*	20	*	40	
Homo	:	: 45
Bos	:P..	: 45
Canis	:	: 45
Oryctolagus	:-----	: 40
Mus	:	: 45
Rattus	:	: 45
Sus	:	: 45
Ovis	:P..	: 45
Anas	:	.I.....	V..-	: 44
Gallus	:	.I.....	V..	: 45
Meleagris	:	.I.....	V..	: 45
Podarcis	:R..V..	: 45
Xenopus	:I..V..	: 45
Rana	:I..V..	: 45
Danio	:I.....	R..R..F..	: 45
Oncorhynchus	:R..YR.....LG..	: 45
Ictalurus	:R..R..FR.....F..	: 45
Pleuronectes	:Q.....	R..R..R.....	: 38
Hippoglossus	:Q.....	R..R..R.....	: 38
Uranoscopus	:Q.....	R..R..R.....	: 38
Acipenser	:R..R.....	: 38
Ctenopharyngodon	:I.....	R..R..I.....F..	: 45
Mola	:Q.....		: 23
Trachurus	:R..IR.....	: 38
Anguilla	:Q.....	R..R..R.....L..-	: 43
Gadus	:H.....	R..R..R.....L..	: 45
Dasyatis	:E.....	R..R..R.....S.....	: 38
Tunicate-1	:N.....		: 27
Tunicate-2	:N.....		: 22

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNGRRIAYL

Figura IV: confronto della sequenza del PACAP in vertebrati e tunicati (Valiante et al., 2007).

Per quanto riguarda il VIP, a seguito della sua scoperta, questo peptide è stato identificato in vari vertebrati, sia mammiferi, quali uomo (Itoh et al., 1983; Tsukada et al., 1985; Yamagami et al., 1988), maiale (Mutt e Said, 1974), cavia (Du et al., 1985; Eng et al., 1986), ratto (Dimaline et al., 1984), topo (Lamperti et al., 1991) e opossum (Eng et al., 1992), sia in vari vertebrati non mammiferi, quali uccelli (*Gallus gallus* (Nilsson, 1975; McFarlin et al., 1995; Talbot et al., 1995)), rettili (*Alligator mississippiensis* (Wang e Conlon, 1993)), anfibi (*Rana ridibunda* (Chartrel et al., 1995)), teleostei (*Sparus aurata* (Power e Ingleton, 1998), *Danio rerio* (XM001335417; CK362621), *Gadus morhua* (Thwaites et al., 1989), *Oncorhynchus mykiss* (Wang e Conlon, 1995), *Carassius auratus* (Tse et al., 2002)) ed elasmobranchi (*Squalus acanthias* (Dimaline et al., 1987)). Anche la sequenza aminoacidica del VIP, come quella del PACAP, è risultata altamente conservata tra i vertebrati e le differenze osservate sono prevalentemente dovute a sostituzioni nella regione centrale e C-terminale; in particolare, tra i mammiferi la sequenza del VIP è generalmente conservata, eccetto che nel caso delle sequenze della cavia e dell'opossum, che presentano almeno quattro aminoacidi diversi rispetto al

VIP degli altri mammiferi; il VIP maturo umano differisce in almeno 4 aminoacidi se confrontato con quello degli uccelli, dei rettili, degli anfibi e dei teleostei (Sherwood et al., 2000; Cardoso et al., 2007a) (Fig. V).

VIP*	
human/monkey/pig/cattle/	
sheep/goat/dog/rabbit/	
rat/mouse	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN
guinea pig	HSDALFTD TY TRLRKQMA KK YLN SVLN
opposum	HSDAVFTD SY TRL LK QMA MR KYLD SILN
chick/turk/allig/frog	HSDAVFTDNY SR FRKQMAVKKYLNS VLT
cod	HSDAVFTDNY SR FRKQMA AK KYLNS VLA
trout/bowfin	HSDA I FTDNY SR FRKQMAVKKYLNS VLT
dogfish	HSDAVFTDNY SR IRKQMAVKKY IN SL LA

Figura V: confronto tra la sequenza del VIP in vari vertebrati (Sherwood et al., 2000).

Per quanto riguarda le funzioni svolte dal PACAP e dal VIP nei vertebrati non mammiferi, negli uccelli, nei rettili e negli anfibi questi peptidi esercitano funzioni simili a quelle che sono state descritte nei mammiferi (Chartrel et al., 1995; Hu et al., 2000a; Olsson, 2002; Sherwood et al., 2000; Valiante et al., 2007). Probabilmente lo stesso si può dire per i teleostei, anche se il significato funzionale della presenza di geni duplicati rimane da chiarire (Cardoso et al., 2007a).

Considerate le parentele filetiche, le indagini sulla probabile evoluzione del PACAP e del VIP, dopo essere state condotte sui vertebrati, sono state effettuate nei tunicati.

Nel *Cheilosoma productum* sono stati identificati due geni che codificano il PACAP, il *pacap1* e il *pacap2*; questi geni hanno un'elevata identità di sequenza e codificano entrambi un peptide PRP-like e il PACAP27, mentre non è stato identificato il PACAP38. Il *pacap1* codifica un peptide PRP-like, che mostra il 59% di identità con il GHRH umano e il 61% con il glucagone, e il PACAP27, che mostra il 96% di identità (26 aa su 27) con il PACAP27 umano. Il *pacap2* codifica due peptidi: il primo ha il 59% di identità con il GHRH, il secondo ha l'85% di identità con il PACAP27 umano e l'89% di identità con il PACAP codificato dal gene *pacap1* (McRory e Sherwood, 1997).

È stato recentemente proposto un modello per spiegare gli eventi evolutivi che hanno portato alla formazione dei geni del GHRH, del PRP-PACAP e del PHI-VIP (Lee et

al., 2007); saranno considerati insieme questi geni dal momento che, tra i vari membri della superfamiglia della secretina, hanno seguito la stessa linea evolutiva. Secondo questo modello, i protocordati possedevano una sola copia di un gene *PACAP-like*, che codificava un solo peptide e, a seguito di una duplicazione esonica, si sarebbe venuto a formare il gene ancestrale del PRP-PACAP. L'identità mostrata tra esoni dello stesso gene in *Chelyosoma productum* supporta tale ipotesi; difatti le sequenze aminoacidiche codificate dagli esoni 3 e 4 del gene *pacap1* hanno una identità del 44%; in modo simile, nel gene *pacap2*, i nucleotidi degli esoni 3 e 4 hanno un'identità del 57%, mentre le sequenze aminoacidiche da questi codificate hanno un'identità del 48% (McRory e Sherwood, 1997). A seguito di questa duplicazione esonica, due eventi di duplicazione genomica (1R e 2R) (Hughes, 1999), avrebbero portato alla formazione di quattro geni paraloghi, tre dei quali sarebbero rimasti sotto il nome di PRP-PACAP, PHI-VIP e GHRH; secondo questa ipotesi, questi eventi di duplicazione si sarebbero verificati l'uno precocemente nei deuterostomi e l'altro prima dell'origine degli gnatostomi (Hughes, 1999). La presenza di due geni del PACAP nei tunicati è probabilmente da attribuire ad un evento di duplicazione genica piuttosto recente avvenuto dopo la divergenza iniziale, come suggerito anche dai livelli molto elevati di somiglianza tra i due geni in termini di struttura genica e di sequenza aminoacidica. D'altra parte, se questi due geni esistevano prima degli eventi 1R e 2R, gli eventi di duplicazione genomica avrebbero portato alla formazione di 8 e non di 4 geni paraloghi nei vertebrati.

Dunque, in base a questo modello, a seguito del primo evento di duplicazione (1R), il gene ancestrale *PRP-PACAP* si sarebbe duplicato e ciascuna copia sarebbe andata incontro a mutazioni: una delle due avrebbe dato origine al *PRP-PACAP*, mentre nell'altra copia, una volta assicurata la funzione primaria conservando il PACAP, il PRP sarebbe mutato in GHRH e una delezione esonica avrebbe portato alla perdita del PACAP. A seguito poi del secondo evento di duplicazione genomica (2R), la copia duplicata del gene *PRP-PACAP* sarebbe mutata ed avrebbe quindi acquisito nuove funzioni per diventare *PHI-VIP*: il PHI e il VIP infatti sono simili al PRP e al PACAP, rispettivamente (Lee et al., 2007).

Infine un terzo evento di duplicazione genomica (3R) si sarebbe verificato nei teleostei, dopo la divergenza che ha portato ai tetrapodi, e avrebbe quindi portato alla formazione dei geni duplicati del PRP-PACAP e del PHI-VIP (Van de Peer et al., 2003; Meyer e Van de Peer, 2005).

CAPITOLO 2

I RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP

I recettori del PACAP e del VIP (PAC₁ e VPAC) sono membri della famiglia dei recettori della secretina accoppiati a proteine G (GPCR) o famiglia 2 dei GPCR, che include recettori per importanti ormoni e neuropeptidi, come la secretina, la calcitonina, il VIP e il PACAP, con circa 55 membri riconosciuti dallo IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology). I recettori PAC₁ e VPAC, come gli altri membri della famiglia 2 dei GPCR, mostrano un'identica organizzazione strutturale, caratterizzata dalla presenza di 7 segmenti transmembrana (TM), un lungo segmento N-terminale a cui si lega il ligando e una regione C-terminale che interagisce con la proteina G (Laburthe et al., 2002). I domini transmembrana sono collegati tra loro da tre loop intracellulari e tre loop extracellulari, che svolgono importanti funzioni nell'attivazione dei recettori. La regione N-terminale dei recettori è extracellulare ed è caratterizzata dalla presenza di sei cisteine conservate e siti di N-glicosilazione, che sono cruciali per la conformazione del recettore e l'interazione con il ligando (Hashimoto et al., 1997; Holtmann et al., 1995; Laburthe et al., 2002), per la quale però il solo dominio N-terminale non è sufficiente, ma sono necessari anche dei punti di contatto sui loop extracellulari (Lins et al., 2001; Unson, 2002). A seguito del legame con il ligando, i recettori mediano la segnalazione intracellulare attraverso le proteine G, che si legano al terzo loop intracellulare e al dominio C-terminale, facendo così partire la trasduzione del segnale che vede coinvolti il cAMP, l'IP₃ o il calcio (Couvineau et al., 2003, Dickson et al., 2006a, b; Laburthe et al., 2002; Vaudry et al., 2009).

2.1 CLASSIFICAZIONE E VIE DI SEGNALAZIONE DEI RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP

Nei tetrapodi, sono stati identificati tre recettori del PACAP e del VIP, denominati PAC₁, VPAC₁ e VPAC₂; in base alla diversa affinità di legame per il

PACAP e per il VIP, sono stati distinti in recettori di tipo I e di tipo II: al primo gruppo, caratterizzato inizialmente nell'ipofisi anteriore e nell'ipotalamo (Lam et al., 1990), appartiene il recettore PAC₁; al secondo gruppo, che è ampiamente diffuso in vari organi periferici, i recettori VPAC₁ e VPAC₂ (Gottschall et al., 1990; Suda et al., 1992). I recettori di tipo I (PAC₁-R) legano quasi esclusivamente il PACAP, dal momento che hanno un'affinità di legame molto alta per il PACAP38 e 27 e molto più bassa per il VIP (circa 1000 volte inferiore) (Cauvin et al., 1991; Gottschall et al., 1990, 1991; Lam et al., 1990; Suda et al., 1992); i recettori di tipo II (VPAC₁-R e VPAC₂-R) legano PACAP e VIP con la stessa affinità (Gottschall et al., 1990; Lam et al., 1990), ma sono stati suddivisi in due classi in base alla loro affinità per l'elodermina (Christophe et al., 1986) e la secretina (Hubel, 1972): il VPAC₁-R presenta bassa affinità per la secretina e l'elodermina, mentre il VPAC₂-R possiede un'alta affinità per l'elodermina, ma non lega la secretina (Arimura, 1993).

Una volta attivi, i recettori PAC/VPAC possono innescare vie di trasduzione del segnale diverse (Fig. VI). Innanzitutto, l'attivazione dei recettori può portare ad un aumento di cAMP dipendente dall'attivazione della proteina G α_s (Dickson e Finlayson, 2009). Tuttavia, i recettori PAC/VPAC possono stimolare anche la produzione di altri secondi messaggeri; ad esempio, possono stimolare la produzione di calcio intracellulare ([Ca²⁺]; Dickson et al., 2006a, b) attraverso la via delle proteine G α_q (attivata tanto dal recettore PAC₁ quanto dai recettori VPAC; MacKenzie et al., 1996; Van Rampelbergh et al., 1996; Langer e Robberecht, 2005) o G α_i (attivata esclusivamente dai recettori VPAC; MacKenzie et al., 1996; Langer e Robberecht, 2005). L'attivazione dei recettori PAC/VPAC può modulare l'attività della fosfolipasi D (PLD; Morisset et al., 1995; McCulloch et al., 2000): nel caso dei recettori VPAC e dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ (vedi par. 2.2), l'attività della PLD dipende dall'attivazione della piccola proteina G ARF (ADP-Ribosilation Factor; McCulloch et al., 2000); invece, nel caso delle altre isoforme del recettore PAC₁, l'attivazione della PLD non dipende da ARF, ma è dipendente dalla fosfolipasi C (PLC; McCulloch et al., 2000). Inoltre questi recettori attivano tirosina kinasi (Morisset et al., 1995), canali del calcio (Chatterjee et al., 1996; Tompkins et al., 2006), GTPasi RhoA

(Henle et al., 2006), MAPK (Moroo et al., 1998), monossido di carbonio (Watkins et al., 2004) e Src (Macdonald et al., 2005).

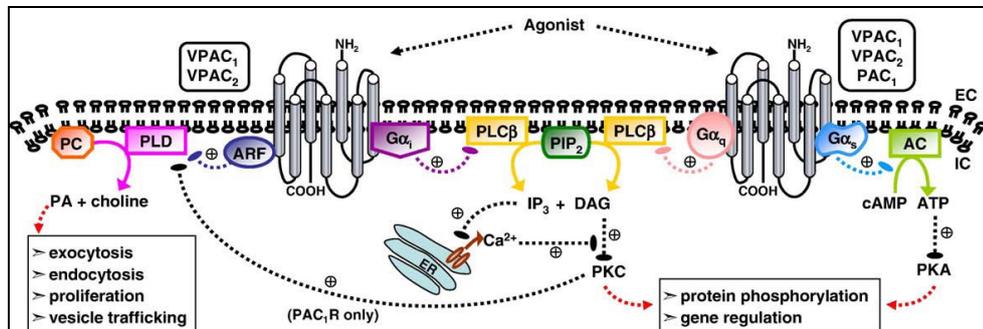


Figura VI: vie di trasduzione del segnale che possono essere stimulate dall'attivazione dei recettori PAC/VPAC (Dickson e Finlayson, 2009).

2.2 IL RECETTORE PAC₁

La sequenza del cDNA del recettore PAC₁ è stata determinata per la prima volta in una linea cellulare di carcinoma degli acini pancreatici (Pisegna e Wank, 1993); questo cDNA codifica una proteina di 495 aminoacidi (circa 60 kDa) a sette segmenti transmembrana, e mostra un alto grado di somiglianza con i cDNA dei recettori del glucagone, della secretina e della calcitonina. Successivamente il gene del recettore PAC₁ è stato clonato in vari mammiferi, quali uomo (Ogi et al., 1993; Pisegna e Wank, 1996), ratto (Hashimoto et al., 1993; Spengler et al., 1993), topo (Hashimoto et al., 1996a), e vertebrati non mammiferi (vedi par. 2.4).

Il gene del PAC₁-R nell'uomo è localizzato sul cromosoma 7 (Brabet et al., 1996); è costituito da 18 esoni, dieci dei quali sono costitutivamente espressi (esoni 2, 3, 7-13 e 18), mentre l'espressione dei restanti 7 (esoni 4-6 e 14-17) è regolata (Lutz et al., 2006). Nel topo, il gene del PAC₁-R è lungo più di 50 kb ed è costituito da 18 esoni (Aino et al., 1995); nel ratto il gene è lungo 40 kb, è costituito da 15 esoni e si trova sul cromosoma 4 (Chatterjee et al., 1997). L'organizzazione in introni/esoni del gene del PAC₁-R è molto simile a quella degli altri membri della famiglia di recettori della secretina. Lo splicing alternativo del trascritto di questo gene rappresenta un meccanismo di regolazione coinvolto nell'espressione tessuto-specifica del gene e/o nella stabilità dell'mRNA. Lo splicing alternativo determina la formazione di

numeroso isoforme di questo recettore (Fig. VII), tanto che il PAC₁R è stato definito uno dei recettori GPCR con più varianti di splicing, che differiscono nei domini intracellulari, transmembrana e N-terminali (Dautzenberg et al., 1999).

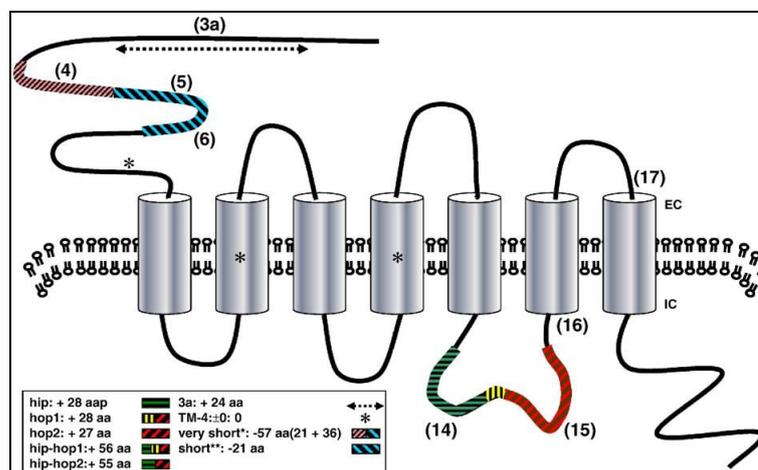


Figura VII: isoforme del recettore PAC₁ (Dickson e Finlayson, 2009).

La maggior parte delle isoforme note deriva dallo splicing alternativo degli inserti hip/hop nella terza ansa intracellularare (Spengler et al., 1993). Le varianti sono caratterizzate dall'assenza o dalla presenza di due cassette di 28 (forma hip o hop₁) o di 27 (forma hop₂) aminoacidi (Journot et al., 1994). È possibile quindi distinguere: l'isoforma null, che è quella breve, caratterizzata dall'assenza delle due cassette (PAC₁-R-null), l'isoforma hip, l'isoforma hop₁, l'isoforma hop₂, le isoforme hip-hop₁/hip-hop₂ (Fig. VII).

Queste varianti sono accoppiate a diverse vie di trasduzione del segnale: nei mammiferi, tutte queste isoforme sono in grado di attivare la via dell'adenilato ciclasi, tuttavia solo le varianti null e hop attivano anche la via di segnalazione della fosfolipasi C, mentre le isoforme hip-hop hanno una capacità ridotta di attivare la fosfolipasi C; infine la variante hip non è in grado di attivare questa via di segnalazione (Spengler et al., 1993; Journot et al., 1994; Pisegna e Wank, 1993, 1996). Successivamente è stata poi identificata anche una isoforma caratterizzata da una delezione di 21 aminoacidi nel dominio extracellulare N-terminale (Pantaloni et al., 1996; Dautzenberg et al., 1999), che è stata definita "variante corta" (PAC₁-R-s) (Fig.

VII) e che deriva dallo splicing alternativo; questa isoforma, a differenza delle isoforme che contengono questi 21 aminoacidi, mostra un lieve aumento nell'affinità per il PACAP27, il che sta ad indicare che la presenza di questi 21 aminoacidi contribuisce ad influenzare la selettività del recettore per il PACAP38 o 27. L'isoforma corta attiva la PLC e l'AC (Pantaloni et al., 1996).

Nel 1999 è stata poi identificata un'altra variante caratterizzata dalla delezione di 57 aminoacidi nel dominio extracellulare N-terminale (Dautzenberg et al., 1999); la sequenza deleta comprende i 21 aminoacidi della variante corta descritta da Pantaloni e colleghi (1996) in aggiunta ad altri 36 residui, per cui è stata definita come isoforma "molto corta". Il PACAP27 e il PACAP38 si legano con minore affinità a questa isoforma rispetto alla null o alla corta, anche se comunque la variante molto corta è un recettore selettivo del PACAP (Dautzenberg et al., 1999; Dickson e Finlayson, 2009).

Nel cervelletto del ratto è stata poi clonata un'altra variante del recettore del PACAP, chiamata PAC₁-R TM4 (Fig. VII), che differisce dalla variante corta per la presenza di sequenze diverse nei domini transmembrana II e IV (Chatterjee et al., 1996). In modo sorprendente, l'attivazione del PAC₁-R TM4 non ha effetto sull'attività dell'AC o della PLC, ma causa un ingresso di calcio attraverso i canali del calcio di tipo L voltaggio-dipendenti (Chatterjee et al., 1996).

Infine, nel 2001 Daniel e colleghi hanno descritto nel testicolo di ratto una isoforma che ha 24 aminoacidi addizionali nel dominio di legame al ligando N-terminale, per la presenza di una cassetta tra gli esoni 3 e 4; tale isoforma è stata definita pertanto PAC₁R (3a) (Daniel et al., 2001).

Quindi in generale i PAC₁-R, fatta eccezione per il PAC₁-R-TM4, sono in grado di attivare sia l'AC sia la PLC, anche se le diverse isoforme hanno una diversa capacità di attivare l'una o l'altra via di trasduzione del segnale.

2.3 I RECETTORI VPAC

Il gene del recettore VPAC₁ è stato clonato per la prima volta nel ratto, dove codifica una proteina di 459 aminoacidi (Ishihara et al., 1992), che presenta il 50% di

identità nella sequenza aminoacidica con il recettore PAC₁ (Pisegna e Wank, 1993). Il gene del VPAC₁-R è stato successivamente clonato nell'uomo, dove codifica una proteina di 457 aminoacidi e possiede l'84% di identità con il VPAC₁-R di ratto (Sreedharan et al., 1993); il gene è lungo 22 kb, è formato da 13 esoni ed è localizzato sul cromosoma 3 (Sreedharan et al., 1995). Il gene del VPAC₁-R è stato successivamente clonato anche nel topo (Johnson et al., 1996) e in vari vertebrati non mammiferi (vedi par. 2.4). Il PACAP e il VIP si legano al recettore VPAC₁ con un'affinità simile e, a seguito di tale legame, determinano l'attivazione delle vie dell'AC e della PLC; infatti, oltre a stimolare l'AC, il VIP induce il rilascio del Ca²⁺ dalle riserve intracellulari nelle cellule che esprimono il VPAC₁-R (in questo processo, la terza ansa intracellulare del recettore è necessaria per attivare la via inositolo fosfato/calcio (Langer et al., 2002)) (Fig. VI).

Il recettore VPAC₂ è stato descritto per la prima volta nell'ipofisi di ratto (Lutz et al., 1993) e successivamente ritrovato anche nel topo a livello delle cellule β che secernono insulina (Inagaki et al., 1994) e nell'uomo a livello della placenta (Adamou et al., 1995); i recettori di ratto e di uomo presentano una identità nella sequenza aminoacidica dell'87%. Questo recettore è codificato da 13 esoni e il gene umano è lungo 117 kb. Il gene del VPAC₂-R è localizzato sul cromosoma 7 nell'uomo (Mackay et al., 1996) e sul cromosoma 4 nel ratto (Cai et al., 1995). Il VPAC₂-R ha un'affinità simile per il PACAP e il VIP (Lutz et al., 1993). Il legame di questi ligandi con questo recettore determina l'attivazione delle vie dell'AC e della PLC (Fig. VI) (Dickson e Finlayson, 2009).

Diversamente dal recettore PAC₁, per il quale sono state identificate da subito numerose isoforme derivanti dallo splicing alternativo, varianti dei recettori VPAC sono state identificate solo recentemente, tanto che fino a poco tempo fa si riteneva non esistessero. In particolare, sebbene il VPAC₁R e il VPAC₂R siano dei recettori a sette segmenti transmembrana, per entrambi recentemente è stata caratterizzata un'isoforma a cinque segmenti transmembrana derivante dallo splicing alternativo (Bokaei et al., 2006). Queste isoforme, definite appunto VPAC₁-5TM e VPAC₂-5TM, sono caratterizzate dalla delezione di 88 e 74 aminoacidi, rispettivamente, nel terzo

dominio intracellulare, nel terzo dominio extracellulare e nel sesto e nel settimo dominio transmembrana (Bokaei et al., 2006), risultando appunto in una forma a cinque segmenti transmembrana. Analizzando le proprietà funzionali della forma tronca del VPAC₁R, è emerso che in presenza di tale isoforma si registra un ridotto accoppiamento con la via di segnalazione del cAMP (Bokaei et al., 2006). Dal momento che questo è stato il primo studio a riportare l'esistenza di varianti del recettore VPAC₁, e più in generale dei recettori VPAC, saranno necessari ulteriori studi per accertare la distribuzione e il significato fisiologico di queste isoforme (Dickson e Finlayson, 2009).

È stato infine descritto un recettore specifico per il VIP nelle cellule muscolari lisce di cavia, che differisce dal recettore VPAC₂R per soli 2 aminoacidi nel dominio di legame N-terminale (Teng et al., 2001; Zhou et al., 2006); la sostituzione di questi due aminoacidi determina un'affinità di legame elevata per il VIP e molto bassa per le due forme di PACAP (Zhou et al., 2006).

2.4 DISTRIBUZIONE DEI RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP

La distribuzione dei recettori PAC₁ e VPAC è stata ampiamente studiata e risulta simile a quella dei loro ligandi; infatti, in modo simile al PACAP e al VIP, sono ampiamente distribuiti nel sistema nervoso, gastrointestinale, riproduttivo e immunitario (Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000).

Per quanto riguarda il recettore PAC₁, è stata registrata un'espressione notevole nell'encefalo (Hashimoto et al., 1993; Ogi et al., 1993) e bassa nei polmoni e nel fegato (Hosoya et al., 1992). Sono stati poi condotti molti studi sulla distribuzione di tale recettore, spesso senza soffermarsi eccessivamente sulle singole varianti. Tali studi hanno evidenziato che, nell'ambito del sistema nervoso, il PAC₁R è presente nel bulbo olfattivo, nell'ippocampo, nell'area postrema, nella corteccia cerebrale, cerebellare, cingolata ed entorinale, così come nell'ipotalamo, nell'amigdala e nel talamo (Hashimoto et al., 1996b; Vaudry et al., 2000; Joo et al., 2004; Kalamatianos et al., 2004). Il PAC₁R è inoltre presente nell'ipofisi, nella parte midollare della ghiandola adrenale, nell'utero, nel tessuto linfoide dell'intestino, nel testicolo e nell'epididimo

(Shivers et al., 1991; Reubi et al., 2000; Vaudry et al., 2000). Dagli studi condotti invece sulla singole isoforme del recettore PAC₁ è emerso che queste varianti hanno una diversa distribuzione tissutale e che, tra le varie isoforme, la null e la hop sono le isoforme maggiormente presenti nell'encefalo e l'isoforma hop in particolare è la forma predominante nel testicolo, nel bulbo olfattivo e nella ghiandola adrenale (Splengler et al., 1993; Zhou et al., 2000). Le altre isoforme hanno una distribuzione generalmente più limitata (Spengler et al., 1993): l'isoforma hip è presente, anche se a livelli più bassi della null o della hop, nel bulbo olfattivo e nell'ippocampo. L'mRNA dell'isoforma PAC₁TM4 è stato localizzato nella corteccia cerebrale, nel cervelletto, nei polmoni e nel pancreas (Chatterjee et al., 1996), dove è coinvolta nella regolazione del rilascio dell'insulina da parte delle isole del pancreas mediato dal PACAP (Yada et al., 1994); l'isoforma corta è presente solo nell'ipotalamo, nel talamo, nell'ipofisi e nella ghiandola adrenale (Pantaloni et al., 1996). Infine, l'isoforma PAC₁(3a) è stata inizialmente localizzata nel testicolo (Daniel et al., 2001), ma uno studio più recente ha evidenziato la sua presenza anche negli astrociti corticali di ratti appena nati (Pilzer e Gozes, 2006).

Per quanto riguarda i recettori VPAC, entrambi sono stati localizzati nel sistema nervoso centrale, anche se in generale il recettore PAC₁ è maggiormente presente a questo livello (Basille et al., 2006). I recettori VPAC₁ e VPAC₂ hanno però nel sistema nervoso centrale una distribuzione completamente diversa (Ishihara et al., 1992; Usdin et al., 1994). Infatti il VPAC₁R è presente per lo più nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, mentre il VPAC₂R è presente nel talamo, nell'amigdala e nel nucleo soprachiasmatico (Usdin et al., 1994; Sheward et al., 1995). Inoltre questi recettori sono distribuiti in modo apparentemente complementare; infatti, sono coespressi in molte aree del sistema nervoso centrale, ma quando ciò accade in realtà si trovano in diversi strati di cellule: ad esempio, entrambi sono presenti nel bulbo olfattivo, ma il VPAC₁ è presente nello strato esterno e il VPAC₂ in quello interno (Usdin et al., 1994). Per quanto riguarda la loro distribuzione negli organi periferici, il VPAC₁R è altamente rappresentato nei polmoni, nell'intestino, nel pancreas e nella parte midollare della ghiandola adrenale, mentre il VPAC₂R è localizzato

principalmente nell'ipofisi, nell'ovario, nel testicolo, nella milza e nella parte corticale della ghiandola adrenale (Vaudry et al., 2009).

2.5 I RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP IN VERTEBRATI NON MAMMIFERI

I recettori del PACAP e del VIP sono stati identificati anche in vari vertebrati non mammiferi (Vaudry et al., 2009).

Per quanto riguarda il recettore PAC₁, il suo cDNA è stato clonato negli uccelli (*Gallus gallus* (Peeters et al., 1999)), negli anfibi (*Xenopus laevis* (Hu et al., 2000b), *Rana ridibunda* (Alexandre et al., 1999)) e in vari teleostei (*Carassius auratus* (Wong et al., 1998), *Takifugu rubripes* (isoforme A e B; Cardoso et al., 2004), *Sparus aurata* (isoforme A e B e variante hop1 dell'isoforma A; Cardoso et al., 2007b), *Danio rerio* (Wu et al., 2008)). Conformemente con l'idea che il PAC₁R è un recettore specifico per il PACAP, è stato dimostrato che anche nei vertebrati non mammiferi questo lega esclusivamente il PACAP nelle sue due forme 38 e 27 (Vaudry et al., 2009). Anche nei vertebrati non mammiferi sono state descritte isoforme di questo recettore: in *Gallus gallus* è stata riportata l'isoforma hop1 (Peeters et al., 1999), negli anfibi sono state riportate tre isoforme, PAC₁-R25 (omologa dell'isoforma hop1), PAC₁-R41 (che ha una cassetta che non corrisponde a nessuna delle isoforme descritte nei mammiferi) e PAC₁-Rmc (che ha un dominio intracellulare C-terminale del tutto diverso da quello dei mammiferi) (Alexandre et al., 1999, 2001, 2002; Hu et al., 2000b). Tra i teleostei le isoforme hop1 e hop2, omologhe a quelle dei mammiferi, sono state descritte in *Carassius auratus* (Kwok et al., 2006), *Danio rerio* (Fradinger et al., 2005) e *Sparus aurata* (Cardoso et al., 2007b).

Per quanto riguarda i recettori VPAC, il gene del VPAC₁R è stato clonato nell'anfibio *Rana ridibunda* (Alexandre et al., 1999), in vari teleostei (*Carassius auratus* (Chow et al., 1997), *Takifugu rubripes* (isoforme A e B; Cardoso et al., 2004) e *Danio rerio* (Wu et al., 2008)) e nell'elasmobranco *Squalus acanthias* (Bewley et al., 2006). Diversamente dai mammiferi, in cui questo recettore ha la stessa affinità per il PACAP e per il VIP, in *Carassius auratus* (Chow et al., 1997) e in *Squalus acanthias*

(Bewley et al., 2006) il VPAC₁R ha una maggiore affinità per il VIP; tuttavia, nella rana, come nei mammiferi, questo recettore lega allo stesso modo PACAP e VIP (Alexandre et al., 2000b), il che suggerisce che la capacità del recettore di interagire con il PACAP potrebbe essere emersa solo dopo che si è originata la linea evolutiva che ha portato ai tetrapodi.

Il gene del VPAC₂R è stato clonato nella rana *Rana tigrina rugulosa* (Hoo et al., 2001) e in vari teleostei (*Carassius auratus* (Tse et al., 2002), *Danio rerio* (Wu et al., 2008) e *Takifugu rubripes* (Cardoso et al., 2004)). Nei teleostei, questo recettore, pur essendo strutturalmente simile al VPAC₂R dei mammiferi, presenta un'elevata affinità per il PHI (Tse et al., 2002), mentre nella rana è simile ai mammiferi (Hoo et al., 2001). Questo suggerisce che il recettore VPAC₂R/PHI-R nei bassi vertebrati probabilmente era un recettore per il PHI e solo successivamente è diventato un recettore PACAP/VIP, per poi restare solo tale dopo la divergenza della linea dei tetrapodi (Vaudry et al., 2009). Ulteriori studi in bassi vertebrati potranno aiutare a chiarire questo punto.

Diversamente dai mammiferi, nei vertebrati non mammiferi non sono state identificate isoforme dei recettori VPAC.

In generale l'attivazione dei recettori del PACAP e del VIP anche nei vertebrati non mammiferi determina la stimolazione dell'adenilato ciclasi e, solo nel caso del recettore PAC₁, della fosfolipasi C (Fradinger et al., 2005; Kwok et al., 2006).

Per quanto riguarda la localizzazione dei recettori del PACAP e del VIP, gli studi disponibili nei vertebrati non mammiferi suggeriscono una distribuzione simile a quella riportata nei mammiferi (Alexandre et al., 1999, 2001, 2002; Hoo et al., 2001; Peeters et al., 1999, 2000). Per quanto riguarda le varie isoforme, in *Gallus gallus* l'isoforma PAC₁hop1 è presente solo nell'encefalo e nelle gonadi (Peeters et al., 1999, 2000); nella rana le isoforme PAC₁-R25, PAC₁-R41 e PAC₁-Rmc sono abbondantemente rappresentate nel sistema nervoso e la PAC₁-R25 è presente anche nel testicolo, nella milza e nel cuore (Alexandre et al., 2002). Nei teleostei, gli studi circa la localizzazione dei recettori sono piuttosto limitati, ma quelli pubblicati

suggeriscono una localizzazione sovrapponibile a quella riportata nei tetrapodi (Cardoso et al., 2004).

2.6 EVOLUZIONE DEI RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP

È ampiamente dimostrato che i recettori per un neuropeptide esistono in una varietà di sottotipi che sono codificati da geni diversi. Poiché la sequenza nucleotidica nelle regioni che codificano le proteine dei tre cDNA dei recettori del PACAP e del VIP è altamente conservata (50% di identità tra recettori a due a due), sembra che questi tre geni abbiano avuto origine da un gene ancestrale comune che successivamente si è duplicato e nel corso dell'evoluzione si sono poi separati i vari geni (Ishihara et al., 1992; Lutz et al., 1993; Pisegna e Wank, 1993; Inagaki et al., 1994). Il fatto che i geni del PAC₁-R e del VPAC₂-R sono entrambi localizzati sullo stesso cromosoma (cromosoma 7 nell'uomo e 4 nel ratto), mentre il gene del VPAC₁-R si trova su un cromosoma diverso (cromosoma 3 nell'uomo e 8 nel ratto) fornisce una prova circa la storia evolutiva dei tre geni (Cai et al., 1995; Sreedharan et al., 1995). In accordo con questa osservazione, una prima duplicazione avrebbe portato al gene del VPAC₁-R e a un antenato comune dei geni del PAC₁-R e del VPAC₂-R. In un successivo stadio evolutivo, una seconda duplicazione del gene ancestrale avrebbe prodotto due geni separati che codificano il PAC₁-R e il VPAC₂-R.

CAPITOLO 3
IL PACAP, IL VIP E I LORO RECETTORI NEL TESTICOLO
DEI VERTEBRATI

Il testicolo è un organo complesso che ha due funzioni fondamentali, la spermatogenesi e la steroidogenesi, processi che sono regolati dalle gonadotropine ipofisarie, FSH e LH, il cui rilascio è a sua volta stimolato dal GnRH (Matsumoto et al., 1986). La spermatogenesi è un processo morfogenetico complesso controllato da fattori endocrini e fattori che agiscono per via paracrina e autocrina. Recenti studi hanno dimostrato la presenza di molti neuropeptidi nonché dei loro recettori all'interno del testicolo, suggerendo che questi possano agire come regolatori locali dello sviluppo delle cellule germinali (Li e Arimura, 2003). Tra i neuropeptidi identificati a livello testicolare rientrano il GHRH (Campbell e Scanes, 1992), il PACAP (Arimura et al., 1991), il VIP (Hannibal et al., 1982), la secretina (Ohta et al., 1992), l'ossitocina (Nicholson et al., 1984), la somatostatina (Pekary et al., 1984), la sostanza P (Schulze et al., 1987) e il neuropeptide Y (Kanzaki et al., 1996). Il ruolo di questi neuropeptidi nella fisiologia del testicolo è in gran parte sconosciuto, anche se l'avvento di nuove tecniche ha permesso di iniziare a comprendere le complesse funzioni di questi peptidi regolatori nel testicolo (Jamen et al., 2000; Gray et al., 2001; Hashimoto et al., 2001). Tra tutti quelli descritti a livello testicolare, il PACAP e il VIP rivestono un ruolo particolare, dal momento che si inseriscono nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, stimolando, insieme al GnRH, la sintesi e la secrezione delle gonadotropine ipofisarie LH (Culler e Paschall, 1991; Counis et al., 2007; Baranowska et al., 1999) e FSH (Culler e Paschall, 1991; Counis et al., 2007).

Di seguito saranno riportate la localizzazione e le funzioni del PACAP, del VIP e dei loro recettori nel testicolo dei mammiferi e dei vertebrati non mammiferi.

3.1 LOCALIZZAZIONE DEL PACAP, DEL VIP E DEI LORO RECETTORI NEL TESTICOLO DEI MAMMIFERI

Il PACAP, il VIP e i loro recettori sono stati localizzati all'interno del testicolo dei mammiferi, mentre le notizie nei vertebrati non mammiferi sono piuttosto scarse (vedi par. 3.3). Nei mammiferi, in particolare, tanto l'mRNA quanto le proteine di questi neuropeptidi e dei loro recettori sono presenti in modo stadio-specifico durante la spermatogenesi (Shioda et al., 1994; Li e Arimura, 2003).

3.1.1 Il PACAP

Indubbiamente, tra i vari peptidi localizzati nel testicolo, il PACAP sembra avere un'importanza particolare, dal momento che la sua concentrazione nel testicolo supera quella di qualsiasi altro peptide testicolare noto (Arimura et al., 1991). Inoltre il testicolo è l'organo in cui il PACAP è maggiormente rappresentato; infatti, la quantità totale di PACAP presente nei testicoli è superiore a quella trovata nell'intero encefalo (Arimura et al., 1991); come nell'encefalo, il PACAP38 è la forma maggiormente rappresentata (Arimura et al., 1991). Tutte queste informazioni suggeriscono che questo neuropeptide è particolarmente importante nel regolare le funzioni testicolari.

Il PACAP è presente nei testicoli di ratti sia immaturi (Koh et al., 2003; El-Gehani et al., 1998a, 2000) sia maturi (Kononen et al., 1994; Shioda et al., 1994; Daniel e Habener, 2000). Per quanto riguarda i testicoli di ratti immaturi, l'mRNA del PACAP è stato descritto per la prima volta nei testicoli di 28 giorni, immediatamente dopo la comparsa degli spermatidi rotondi; i livelli dell'mRNA aumentano progressivamente, raggiungendo il picco al giorno 42, e poi lentamente decrescono. La proteina invece è presente a bassi livelli nel testicolo dei feti e dei neonati, raggiunge poi livelli quasi non rintracciabili al giorno 21, inizia ad aumentare al giorno 28 e raggiunge i livelli più alti al giorno 56. Negli stadi iniziali dello sviluppo, e in particolare nel testicolo di ratti di 14 giorni, l'mRNA e la proteina del PACAP sono assenti nei tubuli, mentre sono localizzati nelle cellule peritubulari e interstiziali, per cui probabilmente questo peptide contribuisce alla crescita e al differenziamento di questo tipo di cellule e può agire come fattore trofico durante lo sviluppo testicolare (Koh et al., 2003); negli stadi successivi, la positività si sposta dalle cellule peritubulari

e interstiziali alle cellule germinali, in particolare agli spermatidi (Koh et al., 2003). Questi risultati suggeriscono che l'espressione del PACAP è regolata e cambi nei livelli di mRNA sono poi seguiti da cambi nei livelli di proteina. I bassi livelli di proteina trovati nei feti e neonati possono avere origine extratesticolare, come la placenta (Li e Arimura, 2003).

Nel testicolo di ratti adulti, esperimenti di ibridazione *in situ* (ISH) hanno dimostrato che l'mRNA per il PACAP è localizzato nelle cellule germinali all'inizio dello sviluppo, e in particolare negli spermatogoni e negli spermatociti I (Shioda et al., 1994), indicando che la trascrizione del gene del PACAP avviene durante gli stadi iniziali del differenziamento delle cellule germinali (McArdle, 1994; Shioda et al., 1998). L'mRNA del PACAP è stato inoltre localizzato anche negli spermatidi rotondi e allungati e in particolare negli stadi III-VII del ciclo spermatogenico; analisi di Northern blot hanno mostrato che la più alta quantità di mRNA del PACAP è presente dallo stadio V al VII, mentre livelli molto bassi sono presenti negli stadi da I a II e da IX a XIV (Kononen et al., 1994). L'espressione stadio-specifica del PACAP è stata confermata anche nel testicolo di topo (Cummings et al., 2002). Diversamente, non è stato trovato nessun segnale per l'mRNA del PACAP nelle cellule di Leydig e di Sertoli (Shioda et al., 1994). Analisi immunistochemiche hanno evidenziato che la proteina è presente solo nelle cellule germinali e in particolare negli spermatidi situati vicino al lume dei tubuli seminiferi; in particolare, il PACAP è presente negli spermatidi nelle fasi del cappuccio e in quella acrosomica, mentre è assente negli stadi iniziali della spermatogenesi, negli spermatozoi e nelle cellule di Sertoli e di Leydig (Shioda et al., 1994; Yanaihara et al., 1998). A livello ultrastrutturale, in particolare, è stato rilevato che il PACAP è presente nei granuli acrosomiali e nel cappuccio acrosomiale (Shioda et al., 1994). Questi dati dimostrano quindi che la presenza dell'mRNA del PACAP e della proteina nelle cellule germinali del testicolo è stadio-specifica e i livelli maggiori sono stati rintracciati negli spermatidi (Li e Arimura, 2003).

Il PACAP è stato localizzato anche nei vari tratti dell'epididimo: è più abbondante nelle regioni del *caput* e del *corpus* rispetto a quella della *cauda* (Leung et al.,

1998); la presenza di questo peptide nell'epididimo suggerisce un suo coinvolgimento nella regolazione delle secrezioni epididimali, influenzando così la maturazione degli spermatozoi lungo l'epididimo (Zhou et al., 1997).

È stato inoltre dimostrato che nel testicolo l'espressione del gene del PACAP è controllata da un promotore tessuto-specifico (Daniel e Habener, 2000) che porta alla formazione di un mRNA di 1.2 kb, mentre l'mRNA trovato in altri tessuti è di 2.7 kb (Hannibal e Fahrenkrug, 1995; Kononen et al., 1994). Il trascritto testicolare del PACAP ha una 3'-UTR tronca e una regione al 5' diversa da quella osservata nel trascritto presente nell'encefalo; questo mRNA è il risultato dello splicing alternativo e della modifica post-trascrizionale (poliadenilazione) dell'mRNA del preproPACAP (Harakall et al., 1998). Il promotore testicolo-specifico è stato recentemente caratterizzato anche nell'uomo (Tominaga et al., 2010).

Infine, altri esperimenti hanno dimostrato che l'espressione testicolare del PACAP è sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi; infatti, la concentrazione di PACAP è significativamente ridotta nei testicoli di ratto a seguito di ipofisectomia, ma la successiva somministrazione di FSH determina un incremento del PACAP, suggerendo quindi che l'FSH è un importante regolatore dell'espressione testicolare del PACAP (Shuto et al., 1995).

3.1.2 Il VIP

Diversamente dal PACAP, studi sui trascritti del VIP non hanno evidenziato espressione dell'mRNA del VIP nel testicolo di feti o di neonati usando analisi di RT-PCR e di Northern blot (El-Gehani et al., 1998b, c). Il VIP è ampiamente distribuito nelle fibre nervose che innervano l'epididimo e l'area interstiziale; in particolare, molte fibre nervose contenenti il VIP sono state osservate nella regione della *cauda* dell'epididimo, nel dotto deferente, nelle ghiandole accessorie e nel pene di ratti di 20 giorni (Zhu et al., 1995; Alm et al., 1977, 1980; Properzi et al., 1992). Il numero di fibre positive al VIP aumenta nei ratti di 35 giorni, mentre in ratti più vecchi non sono state osservate ulteriori differenze (Properzi et al., 1992). I tubuli seminiferi e la regione del *caput* dell'epididimo non mostrano alcuna immunoreattività (Vaalasti et al.,

1986), mentre l'epididimo è densamente innervato da fibre immunoreattive al VIP (Tainio, 1994). Questi dati suggeriscono che fibre nervose contenenti VIP appaiono nel sistema genitale dopo la nascita e raggiungono il pieno sviluppo prima del completamento della pubertà. Dall'altro lato, l'immunoreattività per il VIP nel testicolo di ratti adulti è molto bassa e difficilmente misurabile con il metodo RIA (El-Gehani et al., 1998b, c).

3.1.3 I recettori

La presenza dei recettori del PACAP e del VIP nel testicolo è stata più volte indagata. In generale, è stato evidenziato che nel testicolo di ratti adulti i trascritti del PAC₁R e del VPAC₂R sono espressi a livelli significativi, mentre solo gli spermatozoi umani esprimono un alto livello di mRNA del VPAC₁R (Li e Arimura, 2003).

Per quanto riguarda il recettore PAC₁, il suo mRNA è stato evidenziato negli spermatogoni, negli spermatociti I e negli spermatidi, nonché nelle cellule di Leydig e di Sertoli (Shioda et al., 1998). Il PAC₁R è presente nelle cellule germinali (Shivers et al., 1991), nelle cellule di Sertoli (Heindel et al., 1992) e nelle cellule di Leydig (Romanelli et al., 1997). Tra le cellule germinali, studi di autoradiografia condotti con ¹²⁵I-PACAP27 hanno evidenziato che il PAC₁R è presente negli spermatogoni, negli spermatociti, negli spermatidi e nelle code degli spermatozoi (Shivers et al., 1991); successivi studi condotti con un anticorpo specifico per il PAC₁R hanno invece dimostrato che l'immunoreattività è localizzata soprattutto negli spermatidi rotondi, con una marcatura particolarmente intensa nell'acrosoma, in modo simile a quanto riportato per il PACAP (Arimura e Shioda, 1995). In particolare, Li e colleghi (2004) hanno dimostrato che parte di questa positività è presente in modo specifico nel citoplasma e non sulla membrana plasmatica e hanno suggerito che il PACAP presente nel citoplasma degli spermatidi può legarsi direttamente al PAC₁R presente anch'esso nel citoplasma e stimolare la via delle MAPK, agendo con un meccanismo intracrina (Re, 2003; Li et al., 2004). Il recettore PAC₁ è stato descritto anche nelle cellule di Leydig, in cui il PACAP attiva l'adenilato ciclasi, la fosfolipasi C (Romanelli et al., 1997) e una via di trasduzione accoppiata a un canale del sodio attraverso una

proteina G sensibile alla tossina della pertosse (Rossato et al., 1997). Come anticipato (paragrafo 2.2), nel testicolo è stata descritta anche un'isoforma particolare del recettore PAC₁R, definita PAC₁R(3a), caratterizzata dalla presenza di 24 aminoacidi addizionali nel dominio di legame del ligando; questa isoforma è abbondantemente rappresentata negli spermatidi rotondi e nelle cellule di Sertoli (Daniel et al., 2001), ha un'affinità per il PACAP38 sei volte maggiore rispetto al PACAP27 ed è accoppiata alle vie del cAMP e dell'inositolo fosfato (Daniel et al., 2001). Infine, nei vasi deferenti è stata localizzata l'isoforma PAC₁R-TM4, una variante che innesca un ingresso di calcio a seguito dell'attivazione dei canali del calcio di tipo L (Chatterjee et al., 1996).

Più limitati sono gli studi relativi ai recettori VPAC. Nei testicoli di feti e di neonati di ratti, usando RT-PCR, non è stato evidenziato il trascritto del VPAC₁R, mentre quello del VPAC₂R è presente dal giorno 15 (El-Gehani et al., 1998b, c); quindi PACAP e VIP possono regolare l'inizio della steroidogenesi, che avviene proprio a questo stadio, prima dell'inizio della secrezione di LH, interagendo con il recettore VPAC₂. Nel testicolo di ratti adulti, l'ibridazione *in situ* con una sonda per VPAC₂R ha evidenziato una marcatura all'interno dei tubuli seminiferi, in particolare negli spermatociti (Csaba et al., 1997) e nelle cellule di Leydig (Hueso et al., 1989; Krempels et al., 1995). Il recettore VPAC₁, che sembrerebbe essere assente nel testicolo, colocalizza con l'isoforma PAC₁(3a) nei vasi deferenti (Moretti et al., 2002).

3.2 FUNZIONI DEL PACAP E DEL VIP NEL TESTICOLO

La presenza del PACAP e dei recettori del PACAP e del VIP nel testicolo fornisce una forte indicazione del fatto che questi neuropeptidi agiscono come regolatori locali dell'attività gonadica. Questi peptidi, infatti, sono coinvolti nella regolazione della spermatogenesi e della steroidogenesi testicolare, influenzando l'attività delle cellule germinali (West et al., 1995), delle cellule di Sertoli (Heindel et al., 1992) e delle cellule di Leydig (Romanelli et al., 1997; Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a).

Per quanto riguarda le cellule germinali, studi *in vitro* hanno evidenziato che il PACAP e il VIP attivano la sintesi proteica negli spermatociti e la inibiscono negli spermatidi e questi effetti sono mimati da un analogo del cAMP, indicando che una delle vie di trasduzione adoperata dal PACAP e dal VIP per influenzare la sintesi proteica vede coinvolto il cAMP (West et al., 1995). L'effetto contrastante registrato negli spermatociti e negli spermatidi può essere spiegato con il fatto che le cellule germinali esprimono in modo stadio-specifico diversi membri della famiglia multigenica CREM/CREB (Delmas e Sassone-Corsi, 1994, West et al., 1994), che include proteine capaci di attivare o inibire la trascrizione genica. Di conseguenza, l'attivazione di diverse proteine può portare ad avere effetti opposti sulla sintesi proteica negli spermatociti (attivazione) e negli spermatidi (inibizione) (West et al., 1995).

Nelle cellule di Sertoli in coltura il PACAP induce un aumento nella concentrazione di cAMP, con conseguente sintesi di 17β -estradiolo e aumento della secrezione di inibina, in modo dose-dipendente (Heindel et al., 1992). Diversamente è stato evidenziato che il VIP non ha alcun effetto a livello delle cellule di Sertoli (Heindel et al., 1992).

Il PACAP e il VIP agiscono anche sulle cellule di Leydig. Il PACAP induce una secrezione dose-dipendente di testosterone dalle cellule di Leydig (Romanelli et al., 1997; Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 1998a); questo effetto sembra essere mediato da un'isoforma del recettore PAC₁R accoppiata a un canale del sodio attraverso una proteina G sensibile alla tossina della pertosse (Rossato et al., 1997). In modo simile, Kasson e colleghi (1986) e Romanelli e colleghi (1997) hanno evidenziato che anche il VIP è un induttore della produzione di testosterone. Tali dati sono supportati anche dal fatto che topi knockout per il PACAP o per il VIP mostrano una ridotta steroidogenesi, con livelli di testosterone più bassi rispetto ai topi selvatici (Lacombe et al., 2006, 2007); questo fenomeno è tra l'altro associato ad una riduzione dell'espressione dell'mRNA di due componenti della via biosintetica

del testosterone, i.e. StAR e 3 β -HSD (Lacombe et al., 2006, 2007), il che suggerisce che il PACAP e il VIP agiscono sugli elementi della via biosintetica del testosterone. Anche le cellule di Leydig fetali rispondono a basse concentrazioni di PACAP, che può quindi avere un importante ruolo regolatorio prima dell'inizio della secrezione di LH ipofisaria (El-Gehani et al., 2000; Csaba et al., 1997). Il PACAP determina infatti un aumento della produzione di cAMP e di testosterone nelle cellule di Leydig isolate da embrioni di ratto (El-Gehani et al., 2000); gli stessi effetti sono determinati anche dal VIP (El-Gehani et al., 1998b, c), tuttavia il PACAP è almeno cinque volte più potente del VIP nello stimolare la steroidogenesi durante la fase fetale (El-Gehani et al., 1998a). Il PACAP e il VIP sono quindi probabili candidati per la regolazione endocrina/paracrina delle cellule di Leydig fetali, prima ancora dell'intervento dell'LH (El-Gehani, 1998a, b, c, 2000).

Inoltre nell'epitelio dell'epididimo il PACAP stimola la secrezione di cloruro, che è importante per l'attivazione e la conservazione degli spermatozoi (Zhou et al., 1997), per cui il PACAP può agire come regolatore paracrino della maturazione spermatica, stimolando gli spermatozoi presenti nell'epididimo, che, pur avendo perso la capacità di produrre il PACAP (Shioda et al., 1994), contengono ancora i suoi recettori (Shivers et al., 1991). Diversamente, è stato dimostrato che la somministrazione apicale di VIP non influenza la secrezione epididimale di cloruro (Wong, 1990).

Infine, è stato dimostrato che nel tessuto cavernoso umano il PACAP induce il rilascio di noradrenalina in modo dose-dipendente e che il VIP e il PACAP inducono la vasodilatazione e stimolano il flusso sanguigno testicolare (Lissbrant e Bergh, 1997; Lissbrant et al., 1999), suggerendo che questi peptidi sono coinvolti nell'induzione e nel mantenimento dell'erezione (Hedlund et al., 1994, 1995). Un coniugato stearico del VIP determina un aumento dell'attività copulatoria e dell'erezione in ratti castrati trattati con testosterone (Gozes e Fridkin, 1992), suggerendo che derivati del PACAP e del VIP possono essere sviluppati per il trattamento dell'impotenza.

3.3 IL PACAP E IL VIP NEL TESTICOLO DI VERTEBRATI NON MAMMIFERI

Se da una parte per i mammiferi sono disponibili molte informazioni circa la distribuzione del PACAP, del VIP e dei loro recettori, nonché circa le loro funzioni nel testicolo, dall'altra parte i dati disponibili riguardo questi peptidi e i loro recettori nei vertebrati non mammiferi sono a tutt'oggi scarsi e spesso in uno stadio iniziale.

La presenza di questi peptidi e dei loro recettori è stata evidenziata tramite PCR nel testicolo di alcuni pesci (Wong et al., 2000), quali *Carassius auratus* (Kwok et al., 2006), *Danio rerio* (Fradinger e Sherwood, 2000), *Protopterus dolloi* (Lee et al., 2009), *Clarias macrocephalus* (McRory et al., 1995), *Ictalurus punctatus* (Small e Nonneman, 2001) e, tramite immunostochimica e PCR, in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Huang et al., 2009); in particolare in tilapia è stato evidenziato che il PACAP e il PAC₁R sono presenti nelle cellule interstiziali, ma non negli spermatozoi del testicolo (Huang et al., 2009), e che il PACAP38 ovino ha un effetto induttivo sull'espressione del PACAP e, anche se inferiore, su quella del PAC₁R (Huang et al., 2009).

Nella rana *Rana ridibunda*, tramite PCR e Northern blot, Alexandre e colleghi (2000a, 2002) hanno evidenziato che il PACAP non è presente nel testicolo, diversamente dai mammiferi, in cui questo è presente in elevate quantità (Arimura et al., 1991), mentre sono stati evidenziati bassi livelli del suo recettore PAC₁ (Alexandre et al., 2002). L'assenza del PACAP nel testicolo di rana può essere dovuta al fatto che il gene viene espresso solo in rane sessualmente attive e non negli animali tenuti in cattività; in alternativa, nella rana il PACAP non è coinvolto nella regolazione dell'attività testicolare (Alexandre et al., 2000a).

Nel tritone *Triturus carnifex*, infine, Gobbetti e Zerani (2002) hanno dimostrato che il PACAP38 induce la sintesi di PGE₂, cAMP, 17β-estradiolo e di aromatasi, mentre riduce i livelli di testosterone; la somministrazione di un COX inibitore determina l'effetto inverso. Questo suggerisce che il PACAP38 agisce sulla PLC, inducendo l'aumento di PGE₂, che a sua volta, agendo sull'adenilato ciclasi, determina un aumento dell'attività dell'aromatasi con conseguente aumento del 17β-estradiolo e riduzione del testosterone (Gobbetti e Zerani, 2002). Un recente studio

da me pubblicato ha evidenziato che in *Triturus carnifex* il PACAP (mRNA e proteina) e il suo recettore PAC₁ sono presenti nelle cellule germinali delle cisti contenenti spermatogoni e spermatociti I e nelle cellule di Sertoli e di Leydig localizzate dentro e tra queste cisti, mentre negli spermatozoi è presente solo il PACAP, confermando quindi il coinvolgimento di questo peptide nella regolazione dell'attività testicolare (Agnese et al., 2010).

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni, lo studio della spermatogenesi ha evidenziato che tale processo è regolato non solo dalle gonadotropine ipofisarie LH e FSH, ma anche da altri fattori tanto di origine ipofisaria quanto di sintesi locale. Lo studio dei vari fattori che regolano la spermatogenesi sta dimostrando che il PACAP e il VIP svolgono un ruolo di primo piano in tale processo. Non pochi studi sono stati condotti nel testicolo dei mammiferi (vedi cap. 3) per definire la distribuzione di questi neuropeptidi e dei loro recettori e per cercare di delineare in quali funzioni possano essere coinvolti. D'altra parte piuttosto limitati sono invece gli studi condotti nel testicolo dei vertebrati non mammiferi (vedi cap. 3) ed è per questo che lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di fornire nuove informazioni circa il coinvolgimento di PACAP e VIP nella spermatogenesi di vertebrati non mammiferi. A tal fine sono stati scelti tra i vertebrati non mammiferi due modelli sperimentali: il pesce cartilagineo *Torpedo marmorata* e il rettile squamato *Podarcis sicula*. La scelta di questi due organismi non è stata casuale, ma è stata dettata dalla preferenza per modelli sperimentali che presentassero un'organizzazione testicolare diversa: cistica in *Torpedo marmorata*, tubulare in *Podarcis sicula* (vedi cap. 4).

Il mio lavoro di tesi si è articolato essenzialmente in tre fasi.

1. PACAP e VIP: Nella prima fase ho caratterizzato e analizzato la sequenza del PACAP di *Torpedo marmorata*, dal momento che per *Podarcis sicula* questa è già nota e pubblicata in banca dati (gi|89593597; Valiante et al., 2007). Analisi di PCR hanno permesso di ottenere anche la parziale sequenza del VIP di *Podarcis sicula* e di verificare se lo stesso gene che codifica il VIP codifica anche il PHI. Tali sequenze sono state utilizzate in analisi di ibridazione *in situ* sia per valutare l'esistenza di una sintesi endotesticolare del PACAP e del VIP sia per identificare i tipi cellulari responsabili di questa sintesi. Ho poi condotto analisi di biochimica e di immunistochemica con anticorpi eterologhi per il PACAP, nelle sue due forme di 27 e 38 aminoacidi, e per il VIP per verificare la

presenza e la localizzazione dei peptidi nel testicolo di *Torpedo marmorata* e *Podarcis sicula*. Parte dei risultati ottenuti in *Podarcis sicula* sono stati oggetto di pubblicazione sulla rivista “General and Comparative Endocrinology” (Agnese et al., 2010).

2. RECETTORI: Nella seconda fase la mia attenzione si è rivolta allo studio dei recettori del PACAP e del VIP, ed in particolare del recettore PAC₁. Per tale recettore sono stati infatti condotti esperimenti di PCR per caratterizzarne una parte della sequenza codificante; i primer utilizzati sono stati disegnati in modo da analizzare la presenza di isoforme del recettore derivanti dallo splicing alternativo delle cassette hip/hop. Ho poi costruito delle sonde usate in analisi di ibridazione *in situ* per localizzare l'mRNA del PAC₁R. Infine ho effettuato degli esperimenti di Western blotting e di immunistochemica, oltre che per il PAC₁R, anche per il VPAC₁R e per il VPAC₂R, per verificare la presenza e la distribuzione di questi recettori nei due tipi di testicolo.
3. FUNZIONI: Lo scopo della terza fase è stato quello di analizzare una delle funzioni in cui PACAP e VIP possono essere coinvolti, verificando gli effetti che inducono sulla steroidogenesi di *Podarcis sicula*. A tal fine ho allestito delle colture d'organo con il PACAP (27 e 38) e il VIP a tempi e a dosi diversi e ho poi valutato gli effetti determinati sui livelli di testosterone e 17 β -estradiolo. Questa terza fase è stata limitata solo al testicolo di *Podarcis sicula*, data l'impossibilità di disporre di esemplari di *Torpedo marmorata* in questo terzo anno di dottorato.

CAPITOLO 4

I MODELLI SPERIMENTALI:

Torpedo marmorata e *Podarcis sicula*

4.1 *Torpedo marmorata*

I pesci cartilaginei fanno parte di uno dei gruppi più antichi tra i vertebrati e per molto tempo non sono stati utilizzati come modello di studio sia perché sono difficili da reperire sia per le notevoli dimensioni sia, non ultimo, perché, rispetto ai teleostei, sono animali di scarso valore economico. Pur tuttavia, come Wourms (1977) ha puntualizzato, questi pesci sono molto interessanti per la biologia riproduttiva poiché per la prima volta nei vertebrati compaiono e si affermano processi quali la fecondazione interna, la viviparità e la placentazione, caratteri che li rendono più simili agli amnioti che non ai vicini teleostei (Wourms, 1977; Dodd e Sumpter, 1984).



Figura VIII: *Torpedo marmorata*

Il maschio di *Torpedo marmorata* (Fig. VIII) è un esemplare a riproduzione continua (Prisco et al., 2002) che vive nel Mar Mediterraneo e nell'Oceano Atlantico (Capape, 1979). Esso presenta un apparato riproduttivo costituito da testicolo, epididimo e dotti genitali; associato al testicolo si trova un organo emopoietico, chiamato organo epigonale (Mellinger, 1965; Hamlett e Koob, 1999). Come in gran parte dei vertebrati anamni, il testicolo di *Torpedo marmorata* è di tipo cistico (Stanley, 1966; Prisco et al., 2002) (Fig. IX).

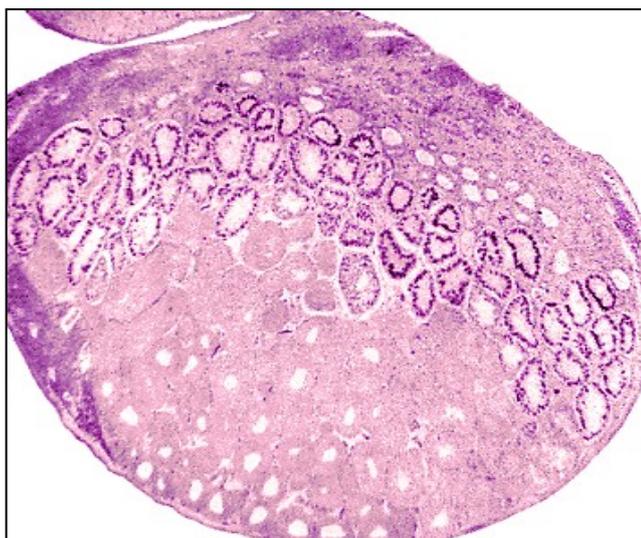


Figura IX: il testicolo cistico di *Torpedo marmorata*

Ogni cisti è formata da unità funzionali, gli spermatoblasti, costituiti da un'unica cellula di Sertoli collegata, al termine della spermatogenesi, a 64 spermatozoi (Stanley, 1966; Prisco et al., 2002; Prisco et al., 2003). È stato calcolato che ogni cisti presenta 250 spermatoblasti disposti intorno ad una cavità centrale. In ogni cisti le cellule germinali si trovano tutte nel medesimo stadio differenziativo in quanto il processo meiotico interessa tutte le cellule contemporaneamente (Stanley, 1966). La formazione delle cisti inizia nella regione ventrale del testicolo, con l'associazione di una singola cellula di Sertoli con una singola cellula germinale (Callard et al., 1989; Pudney, 1995). Dopo la fase di unione tra i due tipi cellulari, intervengono diversi eventi mitotici a carico sia delle cellule di Sertoli sia delle cellule germinali che portano alla formazione di un determinato numero di cellule di Sertoli, ognuna delle quali si lega ad uno spermatogonio, grazie alla presenza di glicoproteine di superficie (Liguoro et al., 2004), tra cui le caderine (Prisco et al., 2007). A seguito delle divisioni mitotiche, inizia il processo meiotico: i 16 spermatogoni si trasformano in spermatociti, che, dividendosi per meiosi, daranno 64 spermatidi rotondi che iniziano così il processo di spermiogenesi (Stanley, 1966). Le cisti, man mano che nel loro interno procede il differenziamento delle cellule germinali, migrano progressivamente dalla regione ventrale verso la regione dorsale dove avviene il rilascio degli spermatozoi, per cui il testicolo di *Torpedo* può essere suddiviso a grandi linee in tre regioni: una di genesi,

dove si ha la formazione di cisti in cui è evidenziabile la formazione di spermatogoni; una intermedia, dove si riscontrano cisti già completamente organizzate contenenti cellule germinali in stadi sempre più avanzati della spermatogenesi; una di rilascio, sul versante dorsale, dove sono presenti le cisti contenenti gli spermatozoi completamente differenziati pronti ad essere rilasciati e le cisti svuotate (Stanley, 1966; Prisco et al., 2002).

Ogni cisti, dopo aver compiuto la spermiatura, va incontro ad un processo di degenerazione per apoptosi, che colpisce le cellule di Sertoli (Prisco et al., 2003). Processi apoptotici regolati dal sistema Fas/FasL intervengono anche durante la spermatogenesi per rimuovere quegli spermatoblasti in cui non si è stabilito un corretto rapporto tra cellule di Sertoli e cellule germinali (Prisco et al., 2003). Infine indagini citologiche (Prisco et al., 2003) ed immunocitochimiche (Prisco et al., 2008) hanno permesso di rilevare che le cellule di Leydig e di Sertoli, oltre agli spermatogoni, sono implicate nella produzione di ormoni steroidei e quindi, verosimilmente, nel controllo della spermatogenesi di *Torpedo marmorata*.

È infine interessante notare che sono stati condotti alcuni studi che hanno evidenziato la presenza del PACAP in differenti organi di *Torpedo marmorata* (Valiante et al., 2006); in particolare, il PACAP è stato riscontrato nel lobo neurointermedio dell'ipofisi e nell'ipotalamo, per cui è possibile che possa intervenire nella regolazione endocrina dell'attività riproduttiva dell'animale; il PACAP è presente nel sacco vascoloso, un caratteristico organo presente nei pesci, che è probabilmente implicato nella regolazione di funzioni endocrine, oltre che nell'omeostasi del fluido cerebrospinale e nell'osmoregolazione; infine, è risultato positivo al PACAP anche il cervelletto, per cui questo peptide può agire nella modulazione dell'output motorio e/o nell'input tattile (Valiante et al., 2006). Oltre che nell'encefalo, il PACAP e i suoi recettori sono stati identificati anche nell'ovario (Agnese et al., submitted) e la loro espressione varia a seconda dello stadio di sviluppo dei follicoli: infatti nei follicoli primari è presente solo il recettore VPAC₂; nei follicoli previtellogeni e vitellogeni sia il PACAP sia i recettori sono ampiamente rappresentati nelle varie componenti del follicolo (cellule della teca, cellule della granulosa e cortex ovocitario); infine, PACAP

e recettori VPAC sono presenti nei follicoli atresici. La presenza del sistema PACAP-recettori durante tutto il processo differenziativo suggerisce che questo peptide sia coinvolto nella regolazione della steroidogenesi e della crescita ovocitaria.

Diversamente, non sono stati condotti studi sul VIP in *Torpedo marmorata*.

4.2 *Podarcis sicula*

Il secondo modello sperimentale su cui ho condotto le mie indagini è *Podarcis sicula*, il rettile più diffuso in Italia, che appartiene alla famiglia dei Lacertidae (Fig. X).



Figura X: *Podarcis sicula*

Il maschio di *Podarcis sicula*, a differenza di quello di *Torpedo marmorata*, è un esemplare a riproduzione stagionale, il cui testicolo è formato da tubuli seminiferi abbondantemente anastomizzati e ramificati, che convergono in uno spazio che si immette in un canale flessuoso che collega il testicolo alla testa dell'epididimo (Galgano e D'Amore, 1953) (Fig. XI).

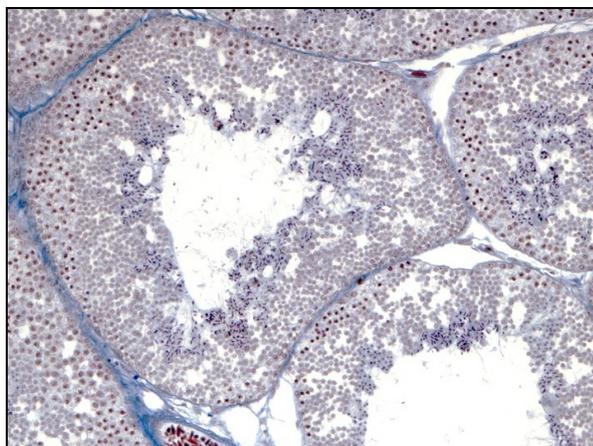


Figura XI: il testicolo tubulare di *Podarcis sicula*.

All'interno dei tubuli seminiferi sono presenti cellule di Sertoli e cellule germinali; le cellule di Leydig si trovano nel tessuto connettivo interstiziale all'esterno dei tubuli.

Le cellule germinali si differenziano attraverso le varie fasi della spermatogenesi all'interno dei tubuli seminiferi, in cui è possibile distinguere spermatogoni nella porzione basale e spermatozoi nella parte apicale; in particolare, nell'epitelio seminifero della lucertola sono presenti due tipi di spermatogoni, indicati come spermatogoni A e B: gli spermatogoni A si trovano nell'epitelio tutto l'anno e vanno incontro a mitosi per dare origine agli spermatogoni B, che si dividono ed entrano in meiosi I. All'interno dei tubuli seminiferi si distinguono poi spermatociti I e II, spermatidi rotondi e allungati e infine spermatozoi. Le uniche altre cellule presenti all'interno dell'epitelio seminifero sono le cellule di Sertoli, caratterizzate da un nucleo triangolare e presenti all'interno dei tubuli in ogni periodo dell'anno (Lofts, 1972).

Il ciclo spermatogenico di *Podarcis sicula* si può dividere in sei periodi. Un primo periodo di stasi estiva, che va da fine luglio a inizio-metà agosto, è caratterizzato da testicoli di dimensioni ridotte e dalla presenza solo di spermatogoni e cellule di Sertoli all'interno dei tubuli seminiferi. Segue poi un periodo di ripresa lieve che va da inizio-metà agosto a fine ottobre; la ripresa della spermatogenesi è dapprima stentata, con degenerazioni tra gli spermatogoni, le cellule germinali in meiosi e gli spermatidi; poi, verso la fine di agosto, si ha una regolare ripresa che prosegue fino ad ottobre, con la produzione di una modesta quantità di spermatozoi, mentre le dimensioni del testicolo vanno lentamente aumentando. Segue ancora un secondo periodo di stasi invernale, che va da inizio novembre a fine febbraio-inizio marzo; durante questo periodo, a causa della precedente ripresa della spermatogenesi, sono presenti nel testicolo tutti gli stadi, dagli spermatogoni a un modesto numero di spermatozoi, ma le cellule germinali restano bloccate o quasi nello stadio che avevano precedentemente raggiunto alla fine di ottobre e inoltre molti spermatidi degenerano. Il quarto periodo del ciclo consiste in una fase di ripresa definitiva, che va da fine febbraio-inizio marzo fino a fine marzo o a fine aprile; la spermatogenesi si riattiva e diventa via via più intensa, si formano nuovi spermatozoi e aumenta sempre più il numero di quelli liberi nel lume dei tubuli, mentre degenerano gli spermatidi vecchi. Si

entra quindi in un periodo di massima attività, che va da marzo-aprile a fine giugno-inizio luglio; in questa fase la spermatogenesi è attivissima e vengono prodotti molti spermatozoi. Segue infine un periodo di decrescente attività, che va da fine giugno-inizio luglio a fine luglio; in questa fase l'attività spermatogenica diminuisce in modo drastico; tutti o quasi tutti gli spermatogoni B, gli spermatociti e gli spermatidi e addirittura qualche raro spermatogonio A degenerano e il testicolo va diminuendo rapidamente di volume (Galgano e D'Amore, 1953; Angelini e Botte, 1992).

I livelli di testosterone e di 17β -estradiolo variano durante il ciclo riproduttivo: i livelli di androgeni nel plasma sono molto alti a marzo-aprile, mentre gli estrogeni prevalgono nel periodo refrattario. Durante le due ondate spermatogeniche, nel testicolo di *Podarcis sicula*, inoltre, sono presenti significative quantità di androgeni (Andò et al., 1990; Angelini e Botte, 1992).

Per quanto riguarda la regolazione ormonale della spermatogenesi, è stato messo in evidenza che le gonadotropine stimolano la spermatogenesi nei rettili, e in particolare stimolano la divisione degli spermatogoni (Licht e Pearson, 1969; Licht, 1973).

Anche in *Podarcis sicula* sono stati condotti studi sul PACAP e sui suoi recettori (Valiante et al., 2007, 2008, 2009), che hanno dimostrato la presenza di questo neuropeptide in molti tessuti, quali l'encefalo, il fegato, lo stomaco, l'intestino e i polmoni; inoltre è nota la sequenza del PACAP di *Podarcis sicula* (gi|89593597; Valiante et al., 2007), che, confrontata con le sequenze di altri vertebrati, mostra un'elevata identità sia nucleotidica (Valiante et al., 2007) sia nella sequenza aminoacidica dedotta (Valiante et al., 2009). È disponibile inoltre una parziale sequenza codificante il recettore PAC₁ di 180 bp (EU285280). Infine è stato condotto uno studio sulla presenza e sulle funzioni del PACAP e del VIP nella ghiandola adrenale di *Podarcis sicula*, che ha evidenziato che questi peptidi agiscono come regolatori autocrini e paracrini sulle cellule corticali e cromaffini, stimolando il rilascio di catecolammine, corticosterone e aldosterone dalle cellule adrenali in coltura in modo dose- e tempo-dipendente (Laforgia et al., 1999; Valiante et al., 2008).

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

Per maggiore chiarezza e semplicità di lettura, saranno riportati in un'unica sezione iniziale gli esperimenti riguardanti la prima e la seconda fase, suddividendoli tra le indagini di biologia molecolare, di biochimica e di immunoistochimica, e in una sezione a parte le indagini riguardanti la terza fase del progetto sulle colture d'organo.

Animali

Maschi adulti sessualmente maturi di *Torpedo marmorata* Risso 1880 (Elasmobranchii, Torpediniformes) sono stati catturati nel golfo di Napoli e gentilmente forniti dalla Stazione Zoologica "Anthon Dohrn". Gli esemplari sono stati tenuti in vasche in condizioni naturali di fotoperiodo e temperatura. Per ciascun animale sono stati riportati i seguenti parametri: peso, lunghezza totale, ampiezza del disco e distanza bocca-cloaca. La maturità sessuale è stata accertata con analisi istologiche volte a verificare l'attività spermatogenica. Gli esemplari sono stati anestetizzati con etil-3-amminobenzoato metansulfonato (MS-222, Sigma-Aldrich) (42 mg/dm³), prima di essere sacrificati.

Maschi adulti di *Podarcis sicula* nel pieno periodo riproduttivo (maggio-giugno) sono stati catturati nei dintorni di Napoli, mantenuti in terrari in condizioni naturali di temperatura e di fotoperiodo e alimentati *ad libitum* con larve di *Tenebrio monitor*. Di ciascun animale è stata misurata la distanza bocca-cloaca; la maturità sessuale è stata accertata con analisi istologiche volte a verificare l'attività spermatogenica. Gli esemplari sono stati sacrificati per decapitazione previa anestesia in ghiaccio.

I testicoli di *Torpedo* e *Podarcis* sono stati in parte conservati a -80°C per le successive indagini di biochimica e di biologia molecolare e in parte fissati in Bouin per 24 ore, disidratati attraverso una serie crescente di alcoli e inclusi in paraffina. Sezioni di 7 µm di spessore sono state colorate con emallume di Mayer ed eosina per un'analisi istologica al microscopio ottico. Altre sezioni sono state poste su vetrini

polilisinati e superfrost per i successivi esperimenti di immunisto chimica e di ibridazione *in situ*, rispettivamente.

I e II FASE: IL PACAP, IL VIP E I LORO RECETTORI **INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

Estrazione di RNA

RNA totale è stato estratto mediante TRI REAGENT (Sigma) da testicoli ed encefali di maschi di *Torpedo marmorata* e *Podarcis sicula*. In particolare ciascun campione è stato omogeneizzato in TRI REAGENT in un omogeneizzatore sterile, centrifugato a 12.000 g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo da microcentrifuga. Per assicurare una completa dissociazione dei complessi nucleoproteici il campione è stato lasciato per 5 min a temperatura ambiente. Sono stati poi aggiunti 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRI REAGENT utilizzato. Il campione è stato agitato vigorosamente per 15 secondi e lasciato poi per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela risultante è stata centrifugata a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione ha separato la miscela in tre fasi: una fase organica rossa (contenente proteine), un'interfase (contenente DNA) e una fase acquosa superiore incolore (contenente RNA). La fase acquosa è stata recuperata e trasferita in un nuovo tubo da microcentrifuga e sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo per ogni ml di TRI REAGENT. Il campione è stato lasciato per 10 minuti a temperatura ambiente. Poi è stata eseguita una centrifugazione a 12.000 g per 10 minuti a 4°C. L'RNA ha formato un precipitato sul fondo della provetta. Il surnatante è stato rimosso e l'RNA è stato lavato con 1 ml di etanolo 75° per ogni ml di TRI REAGENT usato. Il campione è stato agitato con vortex e poi centrifugato a 7.500 g per 5 minuti a 4°C. Il surnatante è stato eliminato e il precipitato di RNA è stato lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti. L'RNA è stato risospeso in 20 µl di acqua DEPC. La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio; la concentrazione e la purezza dell'RNA sono state stimate con lettura

allo spettrofotometro a 260 e 280 nm. Il campione risultante è stato conservato a -80°C.

Retrotrascrizione

Gli RNA ottenuti sono stati retrotrascritti mediante SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per ciascuna reazione, 1 µg di RNA totale è stato incubato con 1 µl di primer oligo-dT (500 µg/ml), 1 µl di dNTP (10 mM) e acqua fino a 12 µl per 5 minuti a 65°C. Dopo una breve centrifugazione, sono stati aggiunti 4 µl di 5X First-Strand Buffer, 2 µl di DTT 0.1 M e 1 µl di acqua RNasi-free; la miscela è stata incubata a 42°C per 2 minuti. È stato aggiunto 1 µl di SuperScript II RT e incubato a 42°C per 50 minuti. La reazione è stata inattivata mediante incubazione a 70°C per 15 minuti.

PCR

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come template in reazioni di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) volte ad identificare le parziali sequenze codificanti il PACAP di *Torpedo marmorata*, il VIP di *Podarcis sicula* e il recettore PAC₁ di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula*. Tali reazioni sono state condotte nel termociclatore 2720 dell'Applied Biosystem (Applied Biosystem).

PCR per il PACAP:

- *Torpedo marmorata*

Il cDNA di testicolo è stato amplificato mediante PCR utilizzando dei primer (PCPfor, 5'- CATTCGGA(CT)GGGATCTTCACGGA(CT)AG -3'; PCPprev, 5'- AATABGCNAGGCGACGTCCTT -3') disegnati sulla sequenza del PACAP di vari teleostei, utilizzando il software Genamics Expression 1.1 (Genamics, Hamilton, NZ), per amplificare esclusivamente la sequenza codificante il PACAP (Fig. 2). La reazione di PCR è stata eseguita usando 2 µl di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 0.4 mM di ciascun dNTP, 2.5 mM di MgCl₂ e 0.4 µM di ciascun primer.

Il ciclo termico di PCR utilizzato è il seguente:

94°C	94°C	48°C	72°C	72°C	4°C
3'	1'	45"	45"	7'	∞
35 cicli					

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio.

- *Podarcis sicula*

cDNA di testicolo e di encefalo sono stati amplificati mediante PCR utilizzando gli stessi primer utilizzati da Valiante e collaboratori (2007) per verificare se anche nel testicolo è espresso l'mRNA di questo neuropeptide: la coppia di primer utilizzata (F3, 5'-CATTCGGA(CT)GGGATCTTCACGGA(CT)AG-3'; Rd, 5'-CATGTTAIAGAAACACAIGAGCG-3') è stata disegnata confrontando le sequenze codificanti il PACAP di vari vertebrati con Genamics Expression 1.1 (Genamics, Hamilton, NZ) per amplificare l'intera regione codificante il PACAP (Fig. 2). La reazione di PCR è stata eseguita usando 2 µl di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 0.4 mM di ciascun dNTP, 2.5 mM di MgCl₂ e 0.4 µM di ciascun primer. Il ciclo termico di PCR utilizzato è il seguente:

94°C	94°C	48°C	72°C	72°C	4°C
3'	1'	1'	1'	7'	∞
35 cicli					

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio.

PCR per il VIP:

- *Podarcis sicula*

Il cDNA di testicolo è stato amplificato mediante PCR utilizzando una coppia di primer (VIPfor3Ac, 5'- TAGGAAACAGAATGCCCTTTGA -3'; Vip rev1Ac, 5'- AACTCTGTCTTAACTGGGAA -3') disegnati sulla sequenza del PHI/VIP di *Anolis carolinensis* utilizzando il software Genamics Expression 1.1 (Genamics, Hamilton, NZ) in modo da amplificare la regione codificante sia il PHI sia il VIP (Fig. 22). La reazione di PCR è stata eseguita usando 2 µl di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 0.4 mM di ciascun dNTP, 2 mM di MgCl₂ e 0.4 µM di ciascun primer. Il ciclo termico di PCR utilizzato è il seguente:

94°C	94°C	45°C	72°C	72°C	4°C
3'	45''	45''	1'	7'	∞
35 cicli					

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% e visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio.

PCR per il recettore PAC₁

- *Torpedo marmorata* e *Podarcis sicula*

Le condizioni sperimentali della PCR per ottenere la parziale sequenza codificante il recettore PAC₁ di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* sono state le stesse e sono riportate di seguito: il cDNA di testicolo è stato amplificato mediante PCR utilizzando due coppie di primer (PR1for, 5'-TCCAACACTACTTCTGGCTGTTC -3'; PR4rev, 5'-AGTGTAGAGCGAGCCAATCTC-3') disegnati sulla sequenza del recettore PAC₁ di vari vertebrati utilizzando il software Genamics Expression 1.1 (Genamics, Hamilton, NZ). I primer sono stati disegnati a monte e a valle rispetto al sito di inserzione delle cassette hip/hop per verificare quale delle isoforme derivante dallo splicing alternativo di queste cassette è espressa all'interno del testicolo di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* (Fig. 34). La reazione di PCR è stata eseguita usando 2 µl di cDNA, 1 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 0.4 mM di ciascun dNTP, 2.0 mM di MgCl₂ e 0.5 µM di ciascun primer. Il ciclo termico di PCR utilizzato è il seguente:

94°C	94°C	47°C	72°C	72°C	4°C
3'	45''	1'	1'	7'	∞
35 cicli					

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio.

Purificazione e sequenziamento dei prodotti di PCR

I prodotti di amplificazione ottenuti da ciascun campione sono stati eluiti da gel mediante QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) come da data sheet. Il DNA così ottenuto è stato quantificato mediante corsa elettroforetica utilizzando come riferimento una scala quantitativa, la 100 bp ladder (Fermentas). I campioni ottenuti

sono stati sequenziati con BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e processati con ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Analisi bioinformatica delle sequenze nucleotidiche

Le sequenze nucleotidiche risultanti sono state analizzate con BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) per verificare che i prodotti dell'amplificazione effettivamente corrispondessero a quelli attesi. La traduzione è stata effettuata usando il software Genamics Expression, mentre i pesi molecolari putativi sono stati dedotti utilizzando il server ExPASy (<http://www.expasy.org/>). L'allineamento delle sequenze è stato effettuato usando il programma Clustal W2. L'analisi filogenetica sulle sequenze nucleotidiche è stata condotta usando il software MEGA 4.0 (Kumar et al., 2004). Le sequenze scelte per tali analisi appartengono a vari vertebrati e, nel caso del *PACAP*, anche ai tunicati. Per le sequenze ottenute sono stati calcolati il numero di siti conservati e variabili, il numero dei siti "parsimony-informative", che sono siti che contengono almeno due tipi di nucleotidi e almeno due di questi ricorrono con una frequenza minima di due e sono utili per la costruzione di alberi della massima parsimonia, e i siti "singleton", siti che contengono almeno due tipi di nucleotidi con almeno uno che ricorre più volte. Inoltre è stato calcolato il numero di siti 0-volte degenerati, che sono quelli in cui tutti i cambi sono non-sinonimi (un cambio nucleotidico è non-sinonimo se determina un cambio nell'aminoacido codificato dal codone originale), di siti 2-volte degenerati, che sono quelli in cui un cambio su tre è sinonimo (in questa categoria sono inclusi anche i siti in cui due cambi su tre sono sinonimi; un cambio nucleotidico è sinonimo se non determina un cambio nell'aminoacido codificato dal codone originale), e 4-volte degenerati, che sono quelli in cui tutti i cambi sono sinonimi.

Inoltre per quanto riguarda le sequenze del *PACAP* e del *VIP*, le distanze evolutive sono state calcolate con il metodo di Kumar, una modifica del metodo di Pamilo e Bianchi (Pamilo e Bianchi, 1993; Li, 1993), che risolve il problema del trattamento di alcuni codoni difficili quali l'arginina e l'isoleucina (Nei e Kumar, 2000). In particolare, sono state calcolate la distanza sinonima, che è il numero di sostituzioni sinonime per siti sinonimi (d_s), quella "non-sinonima", che è il numero di

sostituzioni non-sinonime per siti non-sinonimi (d_N), nonché il rapporto tra queste due distanze (d_N/d_S); sono stati calcolati inoltre il numero di sostituzioni per siti 4-volte degenerati (d_{4f}), che è utile per misurare il tasso di evoluzione neutrale, e il numero di sostituzioni per siti 0-volte degenerati (d_{0f}), che è utile per misurare il tasso di evoluzione nella sequenza aminoacidica. Per valutare che tipo di selezione agisca sul *PACAP* e sul *VIP*, è stato effettuato lo Z-test di selezione, che permette di confrontare l'abbondanza relativa di sostituzioni sinonime per siti sinonimi (d_S) e di sostituzioni non-sinonime per siti non-sinonimi (d_N); è stato effettuato inoltre il test F di Fisher, che è più adatto quando c'è un piccolo numero di differenze nelle sequenze; tale test confronta il numero di sostituzioni sinonime e non-sinonime tra le sequenze: se il valore di P è minore di 0.05, allora viene rigettata l'ipotesi zero di selezione neutrale; se il numero di sostituzioni sinonime per sito sinonimo eccede il numero di sostituzioni non-sinonime per sito non-sinonimo, allora MEGA setta $P=1$ per indicare la presenza di una selezione purificante.

La ricostruzione filogenetica è stata condotta con il metodo della Massima Parsimonia, in cui è considerato solo il numero minimo di cambi richiesto per produrre le variazioni osservate; questa analisi è stata condotta assumendo 1.000 repliche bootstrap come prova di affidabilità del test.

Analisi bioinformatica delle sequenze aminoacidiche

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche dedotte è stato effettuato usando il programma Clustal W2. L'analisi filogenetica sulle sequenze aminoacidiche è stata condotta usando il software MEGA 4.0 (Kumar et al., 2004). Come per le sequenze nucleotidiche, le sequenze scelte per tali analisi appartengono a vari vertebrati e, nel caso del *PACAP*, anche ai tunicati. Per le sequenze ottenute sono stati calcolati il numero di siti conservati e variabili, il numero dei siti "parsimony-informative", che sono siti che contengono almeno due tipi di aminoacidi e almeno due di questi ricorrono con una frequenza minima di due e sono utili per la costruzione di alberi della massima parsimonia, e dei siti "singleton", che sono siti che contengono almeno due tipi di aminoacidi con almeno uno che ricorre più volte.

Inoltre per quanto riguarda le sequenze del PACAP e del VIP, sono state calcolate le distanze evolutive con il metodo Dayoff Matrix sia tra la sequenza di *Torpedo marmorata* per il PACAP o di *Podarcis sicula* per il VIP e quelle delle singole specie considerate nel confronto sia tra la sequenza di *Torpedo marmorata* per il PACAP o di *Podarcis sicula* per il VIP e quella delle altre specie, raggruppate per classi. Il metodo Dayoff Matrix calcola la proporzione di siti aminoacidici in cui le sequenze confrontate differiscono; questo metodo tiene in considerazione la correzione di sostituzioni multiple nello stesso sito, assumendo un tasso uniforme di variazione tra i siti.

La ricostruzione filogenetica è stata condotta con il metodo della Massima Parsimonia, in cui è considerato solo il numero minimo di cambi richiesto per produrre le variazioni osservate; questa analisi è stata condotta assumendo 1.000 repliche bootstrap come prova di affidabilità.

Clonaggio delle sequenze del PACAP di Podarcis sicula e del PAC₁R di Torpedo marmorata

I prodotti di amplificazione ottenuti dalle PCR volte a identificare le sequenze del PACAP di *Podarcis sicula* e del recettore PAC₁ di *Torpedo marmorata* sono stati clonati nel vettore plasmidico pGEM-T Easy (Promega) mediante una reazione con la DNA Ligasi T4. 2 µl della reazione di ligasi sono stati incubati con cellule competenti JM109 a 42°C per 50 secondi.

Le cellule potenzialmente trasformate sono state trasferite su una piastra di agar contenente ampicillina, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattopiranoside) e IPTG (isopropil-β-D-tiogalattopiranoside) per distinguere le cellule che hanno incorporato il plasmide ricombinante da quelle che hanno incorporato il plasmide senza inserto. I due tipi cellulari sono fenotipicamente distinguibili in base al colore: le colonie bianche sono costituite da cellule che contengono il plasmide ricombinante mentre quelle blu da cellule con il plasmide senza inserto. Le colonie bianche sono state piccate e inoculate in brodo di coltura SB (*Super broth*) con ampicillina per una notte a 37°C e inoculate il giorno seguente in brodo di coltura LB (*Luria broth*) con

ampicillina per una notte a 37°C. I plasmidi ricombinanti sono stati recuperati mediante minipreparazione.

Minipreparazione mediante lisi alcalina con SDS

Il brodo di coltura, contenente un clone ricombinante, è stato trasferito in aliquote da 1.5 ml in tubi da microcentrifuga e centrifugato per 5 minuti a 12.000 g. Il surnatante è stato rimosso ed il precipitato è stato risospeso in 100 µl di soluzione I (glucosio 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0) fredda mescolando vigorosamente fino ad ottenere una soluzione omogenea. La miscela è stata lasciata in ghiaccio per 10 minuti. In seguito sono stati aggiunti 200 µl di soluzione II (0.2 N NaOH, 1% SDS) e si è proceduto a mescolare gentilmente per poi lasciare in ghiaccio per 10 minuti. Sono stati aggiunti 150 µl di sodio acetato 3M freddo, si è proceduto a mescolare gentilmente e a lasciare in ghiaccio per 10 minuti. È stata poi effettuata una centrifugazione a 12.000 g per 5 minuti a 4°C ed il surnatante ottenuto è stato trasferito in un nuovo tubo. È stato aggiunto un egual volume di fenolo:cloroformio (1:1), mescolato bene con vortex e poi centrifugato a 12.000 g per 5 minuti. Il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo e sono stati aggiunti due volumi di etanolo 100°. La miscela è stata lasciata a -80°C per un'ora e poi centrifugata a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. Il surnatante è stato rimosso, il precipitato è stato fatto asciugare all'aria per 10 minuti e poi risospeso in RNasi 0.1 mg/ml a 37°C per 30 minuti. Sono stati aggiunti due volumi di etanolo 100 e 1/10 del volume di sodio acetato 3 M e lasciato precipitare over night a 4°C. In seguito ad una centrifugazione a 12.000 g a 4°C per 20 minuti, il DNA ha formato un precipitato, è stato lavato con etanolo 70° e risospeso in 20 µl di acqua sterile. 1 µl di ciascun campione è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% e visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio. La concentrazione del DNA è stata stimata mediante lettura allo spettrofotometro.

Digestione enzimatica dei cloni ricombinanti

Per controllare che effettivamente i plasmidi recuperati contenessero gli inserti, sono stati digeriti con l'enzima di restrizione EcoRI. In base all'analisi della mappa dei siti di restrizione, effettuata mediante il programma NEBcutter V2.0, infatti, tale enzima

non opera tagli su nessuno dei due inserti, ma opera solo due tagli sul plasmide, uno a monte e uno a valle dell'inserto, consentendone l'escissione.

I plasmidi ricombinanti, contenenti le parziali sequenze codificanti il PACAP o il recettore PAC₁, sono stati inoltre digeriti con gli enzimi di restrizione Sal I e Nco I. In base alla mappa dei siti di restrizione, infatti, questi enzimi operano un singolo taglio, rispettivamente a monte e a valle di ciascun inserto.

Sintesi delle sonde a RNA

I plasmidi così linearizzati sono stati utilizzati come templati in una reazione di trascrizione *in vitro* con il kit DIG RNA Labeling (Roche) che utilizza le RNA polimerasi SP6 e T7 e UTP-digossigenina al fine di ottenere sonde marcate a RNA, senso e antisenso; la sonda antisenso è complementare all'RNA, la senso ha la stessa sequenza del messaggero. L'efficienza di marcatura è stata determinata mediante spot test.

Sintesi delle sonde a cDNA: PACAP di *Torpedo marmorata*, PAC₁R di *Podarcis sicula* e PHI/VIP di *Podarcis sicula*

I prodotti dell'eluizione sono stati sottoposti ad amplificazione per PCR utilizzando dNTP marcati con digossigenina (Roche). I prodotti della PCR sono stati corsi su gel di agarosio per stimarne la concentrazione, usando come riferimento la scala quantitativa 100 bp ladder (Fermentas).

Ibridazione in situ con sonde a RNA: PACAP di *Podarcis sicula* e PAC₁R di *Torpedo marmorata*

Per la localizzazione dell'mRNA del PACAP nel testicolo di *Podarcis sicula* (sonda omologa) e di *Torpedo marmorata* (sonda eterologa) o del recettore PAC₁ nel testicolo di *Torpedo marmorata* (sonda omologa) sono state utilizzate delle sonde a RNA, senso e antisenso, ottenute come sopra descritto.

Sezioni di 7 µm di spessore di testicoli di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* fissati in Bouin e inclusi in paraffina, sono state sparaffinate in histolemon e idratate con una serie a gradazione decrescente di alcol etilico. Le fette sono state pre-fissate in 4% di paraformaldeide in PBS (NaCl 250 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KH₂PO₄ 15 mM, pH 7.4), lavate in PBS e digerite con proteinasi K (10 µg/ml) in Tris-HCl 20

mM e EDTA 1 mM, pH 7.2; in seguito sono state post-fissate in 4% paraformaldeide in PBS, lavate in 2x SSC (NaCl 3M, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 300 mM) e tenute per almeno 30 minuti in un tampone Tris-Glicina (Tris 100 mM, Glicina 100 mM). A questo punto le sezioni sono state pre-ibridate con 40% formammide deionizzata, 5x SSC, 1x Denhardt's solution, 100 µg/ml DNA di sperma di salmone, 100 µg/ml di tRNA e ibridate over night in camera umida con la miscela di ibridazione, che differisce da quella della pre-ibridazione per la presenza della sonda a RNA (1 ng/µl) senso o antisense marcata con digossigenina. Le temperature di ibridazione utilizzate sono state le seguenti: 60°C per il *PACAP* e 52°C per il recettore *PAC₁*. Le sezioni sono state lavate prima in 5x SSC e poi nella soluzione di post-ibridazione (0.5x SSC; 20% formammide deionizzata) per 3 ore a 60°C. Per rimuovere la sonda a singolo filamento è stata effettuata una digestione con ribonucleasi A (10 µg/ml) diluita in NTE (NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.0, EDTA 5 mM) a 37°C per 30 minuti. Poi le fette sono state lavate in NTE senza enzima a 37°C per 15 minuti e nella soluzione di post-ibridazione a 60°C per 30 minuti. Nei passaggi successivi, necessari per la rivelazione della sonda, le fette sono state incubate in 2% Blocking Solution (Roche) in acido maleico 100 mM pH 7.5 per 30 minuti e poi con un anticorpo anti-digossigenina coniugato a fosfatasi alcalina (Roche), diluito 1:5000 v/v in 2% Blocking Solution (Roche) in acido maleico 100 mM, pH 7.5, 10% v/v di siero normale di pecora (Sigma-Aldrich). Tale passaggio è stato effettuato a 4°C over night. A questo punto sono state bloccate le fosfatasi endogene lavando le sezioni in 0.1% Tween-20 e 0.5 mg/ml levamisole (Sigma-Aldrich). Le fette sono state poi incubate con un substrato della fosfatasi alcalina, il BM Purple (Roche) in 0.1% tween-20 e 0.5 mg/ml levamisole. Dopo aver bloccato la reazione in 1 mM EDTA in PBS, le sezioni sono state contrastate con Nuclear Fast Red (Vector), montate in Acquovitrex (Carlo Erba) e osservate con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss). Le immagini sono state ottenute utilizzando una videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) e acquisite con il software AxioVision 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Ibridazione in situ a cDNA: PACAP di *Torpedo marmorata*, PHI/VIP di *Torpedo marmorata* e *Podarcis sicula* e PAC₁R di *Podarcis sicula*

Per la localizzazione dell'mRNA del PACAP in *Torpedo marmorata* (sonda omologa), del PHI/VIP in *Podarcis sicula* (sonda omologa) e in *Torpedo marmorata* (sonda eterologa) e del PAC₁R in *Podarcis sicula* (sonda omologa) sono state utilizzate le sonde a cDNA ottenute come sopra descritto.

Sezioni di 7 µm di spessore di testicoli di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* sono state sparaffinate in histolemon e idratate con una serie decrescente di alcol etilico. Le fette sono state pre-fissate in 4% di paraformaldeide in PBS (NaCl 250 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KH₂PO₄ 15mM, pH 7.4), lavate in PBS e digerite con proteinasi K (10 µg/ml) in Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM, pH 7.2; di seguito sono state post-fissate in 4% paraformaldeide in PBS, lavate in 2x SSC (NaCl 3M, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 300mM) e tenute per almeno 30 minuti in un tampone Tris-Glicina (Tris 100mM, glicina 100mM). A questo punto le sezioni sono state pre-ibridate con 40% formammide deionizzata, 5x SSC, 1x Denhardt's solution, 100 µg/ml DNA di sperma di salmone, 100 µg/ml di tRNA e ibridate over night in camera umida con la miscela di ibridazione, che differisce da quella della pre-ibridazione per la presenza della sonda a cDNA (1 ng/µl) marcata con digossigenina. Le temperature di ibridazione utilizzate sono di 60°C per il PACAP, 42°C per il PHI/VIP e di 45°C per il PAC₁R. Le fette sono state lavate in 2x SSC e formammide 50% per 30 minuti; è seguito poi un lavaggio in 1x SSC e formammide 50% per 30 minuti e in 0.5x SSC e formammide 50% per 15 minuti. Le fette sono state poi lavate in 2x SSC. A questo punto, i passaggi successivi, necessari per la rivelazione della sonda, sono stati eseguiti come descritto per l'ibridazione *in situ* con sonda a RNA.

INDAGINI BIOCHIMICHE

Anticorpi e diluizioni utilizzati

Gli anticorpi primari utilizzati negli esperimenti di biochimica e immunoistochimica sono: rabbit anti-PACAP27 dell'elasmobranco *Dasyatis akajeii* (donato dal prof.

Kouhei Matsuda, Università di Toyama) per gli esperimenti condotti in *Torpedo marmorata* (diluito 1:500), rabbit anti-human PACAP27 (Phoenix Pharmaceuticals) per gli esperimenti condotti in *Podarcis sicula* (diluito 1:500), rabbit anti-human PACAP38 (Phoenix Pharmaceuticals; diluito 1:500), rabbit anti-human VIP (Phoenix Pharmaceuticals; diluito 1:500), rabbit anti-human PAC₁-R (Santa Cruz Biotechnology; diluito 1:50), rabbit anti-human VPAC₁-R e rabbit anti-human VPAC₂-R (Santa Cruz Biotechnology; diluiti 1:200).

Estrazione di proteine

I testicoli sono stati omogeneizzati in un buffer di lisi (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tryton X-100 1%, glicerolo 10%), contenente un cocktail di inibitori delle proteasi (PMSF 1 mM, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 1 mg/mL, NaF 10 mM; Sigma) con un omogeneizzatore Dounce per 15' a 4°C. Il materiale è stato poi centrifugato a 7.000 g ed è stato recuperato il surnatante; la concentrazione proteica del surnatante è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica utilizzando il metodo Pierce.

SDS-PAGE e Western blotting per i recettori del PACAP e del VIP

Le proteine estratte sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) al 10% in condizioni denaturanti (Laemmli, 1970). I campioni sono stati diluiti nel tampone di corsa 5x e bolliti per 5 minuti; proteine a peso molecolare noto (miosina 205 kDa, β -galattosidasi 116kDa, fosforilasi B 97 kDa, albumina serica bovina 66 kDa, ovalbumina 45 kDa, anidrasi carbonica 29 kDa, da Sigma-Aldrich) sono state utilizzate come scala di riferimento. In seguito all'elettroforesi, un gel è stato colorato con Blu Coomassie (Biorad), l'altro è stato trasferito (Transfer Kit Biorad) su filtro di nitrocellulosa (Schleicher e Schuell) a 200 mA over night a 4°C; le proteine trasferite sono state visualizzate mediante colorazione con Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich). La nitrocellulosa è stata trattata con BSA 3% in TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50mM) per bloccare i siti aspecifici. In seguito è stata effettuata un'incubazione con gli anticorpi anti-PAC₁R, anti-VPAC₁R o anti-VPAC₂R, diluiti in TBS con BSA 3% e Triton X-100 0.5% e lasciati

over night a 4°C. È seguita l'incubazione per un'ora a temperatura ambiente con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con biotina; è stata poi effettuata un'incubazione con ABC (Avidina-Biotina Perossidasi Complex) per un'ora a temperatura ambiente. La reazione è stata rivelata con una soluzione contenente diaminobenzidina, che è stata attivata immediatamente prima dell'uso con H₂O₂ allo 0,03%. I controlli negativi sono stati ottenuti attraverso l'omissione dell'anticorpo primario.

Immunoprecipitazione per il PACAP27, il PACAP38 e il VIP

Per il PACAP27, il PACAP38 e il VIP, le proteine sono state sottoposte a esperimenti di immunoprecipitazione utilizzando la matrice per immunoprecipitazione ExactaCruz (Santa Cruz Biotechnology). La matrice ExactaCruz e gli anticorpi anti-PACAP27, anti-PACAP38 o anti-VIP in PB sono stati incubati over night a 4°C. Dopo una centrifugazione a 16.000 g, al pellet sono state aggiunte le proteine estratte dal testicolo di *Torpedo marmorata* o di *Podarcis sicula* e la miscela è stata incubata over night a 4°C. Dopo una ulteriore centrifugazione a 16.000 g, il pellet è stato risospeso in buffer di elettroforesi riducente, denaturato mediante bollitura e centrifugato; il campione è stato corso su gel SDS-PAGE 15% in condizioni denaturanti e riducenti insieme a markers di peso molecolare noto (ovalbumina 45 kDa, anidrasi carbonica 30 kDa, inibitore della tripsina 20.1 kDa, lisozima 14.3 kDa, aprotinina 6.5 kDa, insulina, catena β , 3.5 kDa, insulina, catena α , 2.5 kDa; GE Healthcare). Il gel è stato quindi colorato in Blue Coomassie.

INDAGINI IMMUNOISTOCHIMICHE

Gli esperimenti di immunistoichimica sono stati effettuati su sezioni di 7 μ m di testicoli di *Torpedo marmorata* e *Podarcis sicula* fissati in Bouin e inclusi in paraffina. Le sezioni sono state sparaffinate e idratate con una serie decrescente di alcoli. Lo smascheramento antigenico è stato condotto mediante incubazione in tampone sodio citrato 10 mM pH 6.0 in microonde; le perossidasi endogene sono state inattivate mediante incubazione con perossido di idrogeno allo 0.5% in metanolo per 40 minuti

a temperatura ambiente. Per bloccare i siti aspecifici, è stata effettuata un'incubazione di un'ora in Normal Goat Serum (Pierce). Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi primari diluiti in Normal Goat Serum over night a 4°C. È seguita l'incubazione per un'ora a temperatura ambiente con anticorpo secondario anti-rabbit biotinilato di capra; si è poi effettuata un'incubazione con ABC (Avidina-Biotina Perossidasi Complex) per un'ora a temperatura ambiente. La rivelazione è stata effettuata con una soluzione contenente diaminobenzidina come cromogeno, che viene attivata immediatamente prima dell'uso con H₂O₂ allo 0,03%. I controlli negativi sono stati ottenuti attraverso l'omissione degli anticorpi primari. Le sezioni sono state contrastate con l'emallume di Mayer e osservate con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss). Le immagini sono state ottenute utilizzando una videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) e acquisite con il software AxioVision 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

III FASE: COLTURE D'ORGANO SUL TESTICOLO DI *Podarcis sicula*

Allestimento delle colture

Tutte le soluzioni utilizzate sono state filtrate con filtri da 0.22 µm, autoclavate e sterilizzate agli UV over night. Testicoli di *Podarcis sicula* appena prelevati sono stati passati in soluzione fisiologica sterile e fredda per rettili (NaCl 0.75%), tagliati e trasferiti poi nel mezzo F10-HAM (Sigma), contenente L-glutamina 20 mM (Invitrogen), 7% FBS (Invitrogen), 100 U/ml penicillina (Invitrogen), 100 µg/ml streptomina (Invitrogen), 40 µg/ml gentamicina (Invitrogen) e 20 mM HEPES (Sigma). I testicoli sono stati quindi incubati a 25°C con il 5% di CO₂ per 2 ore. I mezzi sono stati prelevati al tempo zero e sostituiti con il mezzo contenente i peptidi. Tutti i peptidi sono stati sciolti nel mezzo completo alle concentrazioni stabilite. Per stabilire gli effetti del PACAP27, del PACAP38 e del VIP, sono state usate tre diverse concentrazioni (10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M e 10⁻⁸ M) e tre diversi tempi (30, 60 e 120 minuti) per ciascun peptide. Parallelamente un pezzo di testicolo è stato incubato solo con mezzo

completo privo di peptidi. I mezzi sono stati poi prelevati e conservati a -20°C per le successive analisi di dosaggio ormonale del testosterone e del 17 β -estradiolo.

Dosaggi ormonali

La determinazione dei livelli di testosterone nei mezzi è stata effettuata utilizzando un kit radioimmunologico (RIA) della RadioImmunotech; la sensibilità è di 40 pg/ml con una variabilità intra-saggio di 6.0% e inter-saggio di 7.8%. La determinazione dei livelli di 17 β -estradiolo nei mezzi è stata effettuata utilizzando un kit radioimmunologico (RIA) della DiaSorin; la sensibilità è di 10 pg/ml con una variabilità intra-saggio di 4.3% e inter-saggio 7.5%.

Analisi statistiche

I dati sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 5. Tutti i dati sono espressi come la media \pm S.E.M.. Per verificare se il PACAP27, il PACAP38 e il VIP hanno un effetto statisticamente significativo sui livelli di testosterone e 17 β -estradiolo, le differenze sono state confrontate effettuando il test statistico “t di Student”. I valori di $p < 0.05$ sono considerati statisticamente significativi.

CAPITOLO 6

RISULTATI I: PACAP e VIP

6.1 IL PACAP

6.1.1 *Torpedo marmorata*

Estrazione di RNA

L'RNA estratto da testicolo di maschi maturi di *Torpedo marmorata* è stato corso su gel di agarosio all'1% per verificarne la qualità (Fig. 1). La bontà dell'estratto è stata confermata dalla lettura allo spettrofotometro: la ratio 260/280 è maggiore di 1.7.

RT-PCR

La corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% della PCR effettuata con i primer specifici per il *PACAP* (Fig. 2) ha permesso di evidenziare un prodotto di circa 150 bp (Fig. 3A); i controlli non presentano alcuna banda (Fig. 3A). Il prodotto della PCR è stato quindi eluito e il prodotto dell'eluizione è stato corso su un gel di agarosio al 2% (Fig. 3B); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare la banda della lunghezza attesa, che è stata quindi sequenziata. In figura 4 sono riportate la sequenza nucleotidica e la sequenza aminoacidica dedotta del PACAP di *Torpedo marmorata*. La sequenza nucleotidica è lunga 132 bp con una sequenza aminoacidica dedotta di 44 residui. La proteina matura dedotta consta di 44 aminoacidi che corrispondono a un peso molecolare di 5.2 kDa (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>); in particolare, il PACAP27 ha un peso molecolare teorico di 3.1 kDa, mentre il PACAP38 di 4.5 kDa. La sequenza è stata pubblicata sul sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con numero di accesso HQ283396.

Analisi bioinformatica della sequenza nucleotidica

L'analisi della distanza evolutiva mostra un'alta conservazione della sequenza nucleotidica del *PACAP*, come evidenziato dall'allineamento della sequenza del *PACAP* di *Torpedo marmorata* con quella di altri vertebrati, scelti tra mammiferi, uccelli, rettili, anfibi e teleostei, e con la sequenza dei tunicati (Fig. 5). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTn ha evidenziato in particolare che la sequenza del *PACAP*

di *Torpedo marmorata* ha l'89% di identità con la sequenza del PACAP di *Canis familiaris* (gi|73961997) e di *Rana ridibunda* (gi|8347251), l'88% di identità con la sequenza di *Podarcis sicula* (gi|89593597), l'86% di identità con quella di *Homo sapiens* (gi|62739998), di *Bos taurus* (gi|114053158), di *Gallus gallus* (gi|61808325) e di *Xenopus tropicalis* (gi|156717769), l'85% con quella di *Rattus norvegicus* (gi|126090893), di *Mus musculus* (gi|74145166), di *Ovis aries* (gi|57526362), di *Anas platyrhynchos* (gi|90823302) e di *Protopterus dolloi* (gi|207832972), l'83% con quella di *Xenopus laevis* (gi|147902743), *Takifugu rubripes* (GI:163954958) e *Sparus aurata* (gi|110349434), l'81% con quella di *Oncorhynchus mykiss* (gi|185135157) e l'80% con quella di *Danio rerio* (GI:182891611). È evidenziabile poi un'elevata identità anche con le due sequenze del PACAP dei tunicati (83% con la sequenza 1 e 78% con la sequenza 2).

In tabella 1 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta comparando la sequenza del PACAP di *Torpedo marmorata* con quella dei vertebrati prima riportati e dei tunicati: parte dei nucleotidi è completamente conservata (57.6%); il 31.8% del totale sono siti "parsimony-informative", mentre il 10.6% sono "singleton"; inoltre il 57.6% del totale sono siti 0-volte degenerati (d_{0f}), mentre i siti 2-volte (d_{2f}) e 4-volte (d_{4f}) degenerati sono il 20.4% e l'8.3% del totale, rispettivamente. In tabella 2 sono riportate le distanze evolutive calcolate con il metodo di Kumar; in particolare, sono stati calcolati la distanza sinonima (d_S), quella non-sinonima (d_N) e il rapporto tra queste due distanze (d_N/d_S), che è molto minore di 1, suggerendo che la selezione positiva sia improbabile (il rapporto d_N/d_S dovrebbe essere maggiore di 1); è riportato inoltre il numero delle sostituzioni nei siti 4-volte (d_{4f}) e 0-volte degenerati (d_{0f}). Inoltre, per valutare il tipo di selezione che agisce sulla sequenza del PACAP, è stato effettuato lo Z-test di selezione e il test F di Fisher. Per lo Z-test di selezione è mostrata la probabilità P di rigettare l'ipotesi nulla (H_0 : selezione neutrale, $d_N=d_S$) a favore dell'ipotesi alternativa (H_A : selezione purificante, $d_N<d_S$); i risultati ottenuti da tale test sono statisticamente significativi. Per il test F di Fisher è mostrata la probabilità P di rigettare l'ipotesi nulla di stretta neutralità a favore dell'ipotesi alternativa di selezione positiva; i valori di $P<0.05$ sono considerati significativi; se il numero delle sostituzioni sinonime per sito sinonimo eccede quello delle sostituzioni

non-sinonime per sito non-sinonimo, MEGA setta $P=1$ per indicare la presenza di una selezione purificante; i valore di P ottenuti dal test F di Fisher sono sempre pari a 1, indicando quindi la presenza di una selezione purificante, che ha agito contro eventuali cambiamenti nella sequenza del PACAP nel corso dell'evoluzione. In figura 6 è rappresentato l'albero filogenetico dedotto costruito con il metodo della Massima Parsimonia; è interessante notare che dall'albero filogenetico emerge che la sequenza nucleotidica del PACAP di *Torpedo marmorata* è più vicina evolutivamente a quella degli anfibi che a quella dei teleostei.

Analisi bioinformatica della sequenza aminoacidica

La sequenza aminoacidica dedotta del PACAP di *Torpedo marmorata* (44 aa) è stata allineata con quella del PACAP di altri vertebrati (Fig. 7). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTx ha evidenziato in particolare che la sequenza del PACAP di *Torpedo marmorata* ha il 100% di identità con i 40 aminoacidi di *Oryctolagus cuniculus* (nella cui sequenza mancano però gli ultimi quattro aminoacidi, in cui è presente l'unico aminoacido in cui la sequenza del PACAP di *Torpedo* differisce da quella dei mammiferi), il 98% di identità con la sequenza di *Homo sapiens*, di *Mus musculus*, di *Rattus norvegicus* e di *Sus scrofa*, il 95% di identità con quella di *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Gallus gallus*, *Anas platyrhynchos*, *Podarcis sicula*, *Xenopus laevis*, *Rana ridibunda*, *Acipenser schrenckii* e *Protopterus dolloi*, il 94% con quella di *Sparus aurata*, il 92% con i 38 aminoacidi del PACAP di *Trachurus japonicus* e *Dasyatis akajei*, il 91% con quella di *Takifugu rubripes*, *Gadus morhua* e *Oncorhynchus mykiss*, l'89% con quella di *Ctenopharingodon idella* e *Uranoscopus japonicus*, l'86% con la sequenza di *Danio rerio*. È evidenziabile poi un'elevata identità anche con le due sequenze del PACAP dei tunicati (97% con la sequenza 1 e 88% con la sequenza 2).

Inoltre l'analisi della sequenza aminoacidica (44 aa) ha evidenziato che il 54.5% dei residui sono conservati, il 45.5% sono variabili (e la maggior parte di questi sono nella porzione C-terminale), il 20.4% sono residui "parsimony-informative" (la maggior parte di questi si trova al C-terminale) e il 25% sono singleton (Tab. 3). In tabella 4 sono riportati i valori delle distanze a coppie tra la sequenza del PACAP di *Torpedo marmorata* e quella di altri vertebrati o tunicati (A) e tra la sequenza del PACAP di

Torpedo marmorata e quella di questi stessi organismi, raggruppati per classi (B); tali parametri sono stati calcolati con il metodo Dayoff Matrix. L'albero filogenetico costruito con il metodo della Massima Parsimonia è riportato in figura 8; per quanto riguarda la sequenza aminoacidica, questa è vicina a quella dell'altro elasmobranco di cui si conosce la sequenza del PACAP, *Dasyatis akajei*, e a quella degli anfibi.

Produzione della sonda a cDNA

La reazione di PCR condotta sul prodotto di eluizione di circa 150 bp, utilizzando dNTP marcati con digossigenina, ha evidenziato una banda leggermente più alta di quella ottenuta conducendo parallelamente la PCR con dNTP non marcati (Fig. 9). Per la produzione della sonda a RNA eterologa per il PACAP di *Podarcis sicula* si veda il paragrafo 6.1.2.

Ibridazione in situ per la localizzazione del messaggero del PACAP nel testicolo di Torpedo marmorata

Indagini di ibridazione *in situ* condotte in primo luogo con sonda eterologa a RNA per il PACAP di *Podarcis sicula* e in secondo luogo, dopo aver ottenuto la sequenza del PACAP di *Torpedo marmorata*, con sonda omologa a cDNA dimostrano che il messaggero del PACAP è ampiamente espresso nelle sezioni di testicolo di *Torpedo marmorata* a livello sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche. L'utilizzo delle due sonde ha dato gli stessi risultati. Nelle cellule germinali, l'mRNA del PACAP, assente negli spermatogoni (Fig. 10B) e negli spermatociti I (Fig. 10C), è presente, invece, nei prespermatogoni (Fig. 10A), negli spermatociti II (Fig. 10D), negli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 10D) e negli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 10E). Un segnale positivo di ibridazione è presente anche nelle cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono prespermatogoni (10A), spermatociti I (Fig. 10C), spermatociti II (Fig. 10D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 10D) e spermatozoi (Fig. 10E), mentre le cellule di Sertoli non sono mai marcate, eccetto che quelle presenti nelle cisti a prespermatogoni (Fig. 10A) e nelle cisti svuotate (Fig. 10F). L'mRNA del PACAP non è stato rilevato nelle sezioni di testicolo di controllo incubate con la sonda senso o senza sonda (Fig. 10G).

Immunoprecipitazione per il PACAP27 e il PACAP38 nel testicolo di *Torpedo marmorata*

L'immunoprecipitazione con anticorpi anti-PACAP27 e anti-PACAP38 su estratti proteici testicolari ha evidenziato la presenza di due bande di circa 3.5 kDa (Figg. 11A e 12A), dimostrando quindi che entrambe le forme di questo peptide sono presenti nel testicolo di *Torpedo marmorata*.

Immunoistochimica per la localizzazione del PACAP27 nel testicolo di *Torpedo marmorata*

L'immunolocalizzazione del PACAP27 nel testicolo di *Torpedo marmorata* dimostra che questa proteina è rappresentata in questo distretto in modo sovrapponibile al messaggero. Infatti il PACAP27 è presente sia nelle cellule germinali sia in quelle somatiche: l'immunoreattività è stata infatti rilevata nei prespermatogoni (Fig. 11B), negli spermatociti II (Fig. 11D), negli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 11E) e negli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 11F), nonché nelle cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatociti I (Fig. 11D), spermatociti II (Fig. 11D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 11E), spermatozoi (Fig. 11F) e tra le cisti svuotate (Fig. 11G). Diversamente, il PACAP27 è assente negli spermatogoni (Fig. 11C) e negli spermatociti I (Fig. 11D), così come nelle cellule di Sertoli, eccetto che in quelle delle cisti a prespermatogoni (Fig. 11B) e delle cisti svuotate (Fig. 11G). Le sezioni di controllo, ottenute per omissione dell'anticorpo primario, sono risultate negative (Fig. 11H).

Immunoistochimica per la localizzazione del PACAP38 nel testicolo di *Torpedo marmorata*

L'immunolocalizzazione del PACAP38 nel testicolo di *Torpedo marmorata* dimostra che questa proteina è rappresentata in questo distretto in modo simile al PACAP27. Infatti il PACAP38 è presente sia nelle cellule germinali sia in quelle somatiche: allo stesso modo del PACAP27, è presente nei prespermatogoni (Fig. 12B), negli spermatociti II (Fig. 12E), negli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 12F) e negli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 12G), nonché nelle cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatociti I (Fig. 12D), spermatociti II (Fig. 12E),

spermatidi rotondi e allungati (Fig. 12F) e spermatozoi (Fig. 12G); manca negli spermatociti I (Fig. 12D), così come nelle cellule di Sertoli, eccetto che quelle delle cisti a prespermatogoni (Fig. 12B) e delle cisti svuotate (Fig. 12H). Diversamente dal PACAP27, è presente anche negli spermatogoni, nelle cellule di Sertoli presenti in queste cisti e nelle cellule di Leydig presenti tra queste cisti (Fig. 12C). Le sezioni di controllo, ottenute per omissione dell'anticorpo primario, sono risultate negative (Fig. 12H, inserto).

6.1.2 *Podarcis sicula*

Estrazione di RNA

L'RNA estratto da testicolo e da encefalo di maschi maturi di *Podarcis sicula* è stato corso su gel di agarosio all'1% per verificarne la qualità (Fig. 13). La lettura allo spettrofotometro ha confermato la bontà dell'estratto: la ratio 260/280 è infatti maggiore di 1.7.

RT-PCR

La PCR condotta usando gli stessi primer utilizzati nelle precedenti reazioni di PCR (Valiante et al., 2007), costruiti comparando le regioni codificanti del *PACAP* dei vertebrati (Fig. 2) ha evidenziato che il trascritto del gene del *PACAP* è espresso, oltre che nell'encefalo, nel fegato, nello stomaco, nell'intestino e nei polmoni (Valiante et al., 2007, 2009), anche nel testicolo di *Podarcis sicula*. La corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% della PCR condotta su cDNA di testicolo e di encefalo ha permesso di evidenziare in entrambi i casi un prodotto di circa 200 coppie di basi (Fig. 14A); i controlli non presentano alcuna banda (Fig. 14A). I prodotti delle PCR sono stati quindi eluiti e il prodotto dell'eluizione è stato corso su un gel di agarosio al 2% (Fig. 14B); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare un'unica banda della lunghezza attesa, che, sequenziata, effettivamente corrisponde al *PACAP* di *Podarcis sicula* precedentemente identificato (gi | 89593597) (Fig. 15).

Produzione della sonda a RNA e ibridazione in situ

- Clonaggio e minipreparazione dei cloni ricombinanti

Il plasmide ricombinante, contenuto nelle colonie bianche, è stato recuperato mediante minipreparazione, corso su gel d'agarosio e visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio: sono evidenziabili le tre bande corrispondenti alle tre isoforme del plasmide (Fig. 16A).

- Digestione enzimatica dei cloni ricombinanti e sintesi della sonda a RNA

In seguito alla digestione del plasmide ricombinante con EcoRI, si osservano due bande: una corrispondente all'inserto, l'altra corrispondente al plasmide pGEM-T easy linearizzato (Fig. 16B). La digestione dello stesso plasmide con gli enzimi Sall e NcoI ne ha consentito la linearizzazione, come dimostrato dalla corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (Fig. 16B). Lo spot test dimostra che la sonda a RNA sia antisense sia sense è concentrata 500 ng/μl (dato non mostrato).

Ibridazione in situ per la localizzazione del messaggero del PACAP nel testicolo di Podarcis sicula

Indagini di ibridazione *in situ* condotte con sonda omologa a RNA per il PACAP dimostrano che il messaggero di questo peptide è ampiamente espresso nelle sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* a livello sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche (Agnese et al., 2010). In particolare, l'mRNA per il PACAP è espresso in tutti gli stadi della spermatogenesi, anche se un segnale di ibridazione particolarmente intenso è presente negli ultimi stadi (spermatidi e spermatozoi) (Fig. 17). Un segnale di ibridazione è evidente anche nelle cellule di Leydig e di Sertoli (Fig. 17). Sezioni di controllo, ottenute per incubazione con la sonda sense, non sono marcate (Fig. 17, inserto).

Immunoprecipitazione per il PACAP27 e il PACAP38 nel testicolo di Podarcis sicula

L'immunoprecipitazione con anticorpi anti-PACAP27 e anti-PACAP38 su estratti proteici testicolari ha evidenziato la presenza di due bande di circa 3.5 kDa (Figg. 18A e 19A), dimostrando quindi che entrambe le forme di questo peptide sono presenti nel testicolo di *Podarcis sicula*.

Immunoistochimica per la localizzazione del PACAP27 nel testicolo di *Podarcis sicula*

L'immunolocalizzazione del PACAP27 nel testicolo di *Podarcis sicula* dimostra che questa proteina è rappresentata in questo distretto in modo sovrapponibile al messaggero. Infatti il PACAP27 è presente sia nelle cellule germinali sia in quelle somatiche: un segnale positivo è stato infatti rilevato negli spermatogoni, negli spermatociti I e II e, in modo più evidente, negli spermatidi e negli spermatozoi (Fig. 18B); allo stesso modo, sono marcate anche le cellule di Leydig e di Sertoli (Fig. 18B). Controlli ottenuti omettendo l'anticorpo primario sono risultati negativi (Fig. 18C) (Agnese et al., 2010).

Immunoistochimica per la localizzazione del PACAP38 nel testicolo di *Podarcis sicula*

Indagini immunoistochimiche condotte con un anticorpo eterologo anti-PACAP38 su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* dimostrano che questa proteina è rappresentata in questo distretto in modo sovrapponibile al messaggero e al PACAP27; infatti il PACAP38 è presente negli spermatogoni, negli spermatociti I e II e, in modo più evidente, negli spermatidi e negli spermatozoi (Fig. 19B); sono marcate anche le cellule di Leydig e di Sertoli (Fig. 19B). I controlli, ottenuti per omissione dell'anticorpo primario, sono negativi (Fig. 19C).

6.2 IL VIP

6.2.1 *Torpedo marmorata*

Ibridazione in situ per la localizzazione del messaggero del PHI/VIP nel testicolo di

Torpedo marmorata

Indagini di ibridazione *in situ* condotte con una sonda eterologa a cDNA per il PHI/VIP di *Podarcis sicula* (vedi par. 6.2.2) dimostrano che il messaggero del PHI/VIP è espresso nelle sezioni di testicolo di *Torpedo marmorata* a livello sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche. Nelle cellule germinali, il messaggero del PHI/VIP è assente negli spermatogoni (Fig. 20B) e negli spermatociti I (Fig. 20C); diversamente, è presente nei prespermatogoni (Fig. 20A), negli spermatociti II (Fig. 20D), negli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 20E) e negli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 20F). Un segnale positivo di ibridazione è presente anche nelle cellule di

Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatociti I (Fig. 20C), spermatociti II (Fig. 20D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 20E) e spermatozoi (Fig. 20F), mentre le cellule di Sertoli non sono mai marcate, eccetto che quelle presenti nelle cisti a prespermatogoni (Fig. 20A) e nelle cisti svuotate (Fig. 20G). L'mRNA del PHI/VIP non è stato rilevato nelle sezioni di testicolo di controllo (Fig. 20G, inserto).

Immunoprecipitazione per il VIP nel testicolo di *Torpedo marmorata*

L'immunoprecipitazione su estratti proteici testicolari con anticorpo anti-VIP ha evidenziato la presenza di una banda di circa 3.5 kDa (Fig. 21A), dimostrando quindi che questo peptide è presente nel testicolo di *Torpedo marmorata*.

Immunoistochimica per la localizzazione del VIP nel testicolo di *Torpedo marmorata*

Indagini immunoistochimiche condotte con un anticorpo eterologo per il VIP dimostrano che tale peptide è ampiamente distribuito nel testicolo di *Torpedo marmorata*. In particolare, il VIP manca negli spermatociti I (Fig. 21D), mentre è presente nei prespermatogoni (Fig. 21B), negli spermatogoni (Fig. 21C), negli spermatociti II (Fig. 21E), negli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 21F) e negli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 21G). La proteina è presente anche nelle cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatogoni (Fig. 21C), spermatociti I (Fig. 21D), spermatociti II (Fig. 21E), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 21F) e spermatozoi (Fig. 21G, inserto) e nelle cellule di Sertoli delle cisti contenenti prespermatogoni (Fig. 21B), spermatogoni (Fig. 21C), spermatozoi appena prima del rilascio (Fig. 21G) e delle cisti svuotate (Fig. 21H). I controlli, ottenuti per omissione dell'anticorpo primario, sono negativi (Fig. 21H, inserto).

6.2.2 *Podarcis sicula*

RT-PCR

La PCR ha evidenziato che il trascritto del gene del PHI/VIP è espresso nel testicolo di *Podarcis sicula*. La corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% della PCR effettuata con dei primer specifici costruiti sulle regioni codificanti del PHI/VIP di *Anolis carolinensis* (Fig. 22) ha permesso di evidenziare un prodotto lungo poco meno di 400 coppie di basi (Fig. 23A); i controlli non presentano alcuna banda (Fig. 23A). Il

prodotto della PCR è stato quindi eluito e il prodotto dell'eluizione è stato corso su gel di agarosio all'1.8% (Fig. 23B); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare la banda della lunghezza attesa, che è stata quindi sequenziata. Dal sequenziamento emerge che il prodotto della PCR corrisponde a una parte della sequenza codificante il propeptide, alla sequenza codificante il PHI, il VIP e alla sequenza codificante la parte del propeptide tra il PHI e il VIP. In figura 24 sono riportate la sequenza nucleotidica e la sequenza aminoacidica dedotta del PHI/VIP di *Podarcis sicula*. La sequenza nucleotidica è lunga circa 350 bp con un open reading frame di 312 bp e una sequenza aminoacidica dedotta di 104 residui. La proteina matura dedotta consta di 104 aminoacidi, che includono parte del propeptide, l'intera sequenza del PHI (27 aminoacidi) e del VIP (28 aminoacidi), e corrispondono a un peso molecolare di 12 kDa (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>); in particolare, il PHI ha un peso molecolare teorico di circa 3 kDa, mentre il VIP di 3.3 kDa.

Analisi bioinformatica della sequenza nucleotidica

Dall'analisi della sequenza nucleotidica ottenuta emerge la presenza di un'elevata identità tra la sequenza nucleotidica del PHI/VIP di *Podarcis sicula* e quella di altri vertebrati, come evidenziato dall'allineamento della sequenza da me ottenuta con quella di vertebrati scelti tra mammiferi, uccelli, rettili, anfibi e teleostei (Fig. 25). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTn ha evidenziato in particolare che la sequenza del PHI/VIP di *Podarcis sicula* ha l'82% di identità con la sequenza di *Anolis carolinensis* (ENSACAT00000005611), il 78% di identità con quella di *Xenopus laevis* (gi|148232101), il 76% di identità con quella di *Gallus gallus* (gi|487632), il 75% con quella di *Canis familiaris* (gi|73946149) e il 74% di identità con quella di *Takifugu rubripes* (gi|163954954). Comparando l'intera sequenza ottenuta con quella dei vertebrati prima riportati, emerge che il 44% di nucleotidi sono completamente conservati. I nucleotidi completamente conservati salgono però al 51% e al 61% quando, tra le specie riportate, invece di considerare l'intero frammento, si considerano le singole sequenze del PHI e del VIP, rispettivamente. Per quanto riguarda il PHI, la sequenza di *Podarcis sicula* ha il 91% di identità con la sequenza di *Anolis carolinensis* (ENSACAT00000005611), il 78% con *Takifugu rubripes*

(gi|163954954), il 77% con *Xenopus laevis* (gi|148232101), il 73% con *Canis familiaris* (gi|73946149) e il 72% con *Gallus gallus* (gi|487632). L'identità aumenta ancora se si considera invece la sequenza del VIP, come mostrato dall'allineamento tra la sequenza nucleotidica del VIP di *Podarcis sicula* e quella di altri vertebrati riportata in figura 26; infatti, il VIP di *Podarcis sicula* ha il 94% di identità con quello di *Anolis carolinensis* (ENSACAT00000005611), il 90% con *Taenopygia guttata* (ENSTGUT00000011658), l'89% con *Gallus gallus* (gi|487632), l'86% con *Danio rerio* (gi|167621465), l'84% con *Xenopus laevis* (gi|148232101), l'83% con *Bos taurus* (gi|112181314), *Ovis aries* (gi|187607662) e *Takifugu rubripes* (gi|163954954), l'80% con *Homo sapiens* (gi|37588851), *Rattus norvegicus* (gi|209870056) e *Oryzias latipes* (ENSORLT00000004877), il 79% con *Sus scrofa* (gi|305377067) e il 77% con *Mus musculus* (gi|142365020) e *Canis familiaris* (gi|73946149).

In tabella 5 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta con MEGA 4.0, comparando la sola parte della sequenza che codifica il VIP di *Podarcis sicula* con quella dei vertebrati sopra riportati: il 59.5% dei residui sono conservati, il 36.9% dei siti sono "parsimony-informative", mentre il 3.6% sono singleton; inoltre il 63.1% del totale sono siti 0-volte degenerati (d_{0f}), mentre i siti 2-volte (d_{2f}) e 4-volte (d_{4f}) degenerati sono il 15.5% e l'8.3% del totale, rispettivamente. In tabella 6 sono riportate inoltre le distanze evolutive calcolate con il metodo di Kumar; in particolare, sono state calcolate la distanza sinonima (d_s), quella non-sinonima (d_N) e il rapporto tra queste due distanze (d_N/d_s), che è molto minore di 1, suggerendo che la selezione positiva sia improbabile (il rapporto d_N/d_s dovrebbe essere maggiore di 1); è riportato inoltre il numero delle sostituzioni nei siti 4-volte (d_{4f}) e 0-volte degenerati (d_{0f}). Inoltre, per valutare il tipo di selezione che agisce sulla sequenza del VIP, è stato effettuato lo Z-test di selezione e il test F di Fisher. Per lo Z-test di selezione è mostrata la probabilità P di rigettare l'ipotesi nulla (H_0 : selezione neutrale, $d_N=d_s$) a favore dell'ipotesi alternativa (H_A : selezione purificante, $d_N<d_s$); i risultati ottenuti da tale test sono statisticamente significativi. Per il test F di Fisher è mostrata la probabilità P di rigettare l'ipotesi nulla di stretta neutralità a favore dell'ipotesi alternativa di selezione positiva; i valori di $P<0.05$ sono considerati significativi; se il

numero delle sostituzioni sinonime per sito sinonimo eccede quello delle sostituzioni non-sinonime per sito non-sinonimo, MEGA setta $P=1$ per indicare la presenza di una selezione purificante; i valore di P ottenuti dal test F di Fisher sono sempre pari a 1, indicando quindi la presenza di una selezione purificante, che ha agito contro eventuali cambiamenti nella sequenza del VIP nel corso dell'evoluzione. In figura 27 è rappresentato l'albero filogenetico dedotto costruito con il metodo della Massima Parsimonia; è interessante notare che dall'albero filogenetico emerge che la sequenza nucleotidica del VIP di *Podarcis sicula* è più vicina evolutivamente a quella dell'altro rettile di cui si conosce la sequenza nucleotidica, *Anolis carolinensis*.

Analisi bioinformatica della sequenza aminoacidica

La sequenza aminoacidica dedotta del PHI/VIP di *Podarcis sicula* è stata allineata con quella del PHI/VIP di altri vertebrati (Fig. 28). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTx ha evidenziato in particolare che l'intera sequenza aminoacidica del PHI/VIP di *Podarcis sicula* ha l'82% di identità con la sequenza di *Anolis carolinensis*, il 76% con *Xenopus laevis*, il 69% con *Gallus gallus*, il 68% con *Canis familiaris*, e il 64% con *Takifugu rubripes*. Comparando l'intera sequenza ottenuta con quella dei vertebrati prima riportati utilizzando il software MEGA 4.0, emerge che il 49% degli aminoacidi sono completamente conservati. Gli aminoacidi completamente conservati salgono però al 54% e all'82% quando, invece di considerare l'intero frammento, si considerano le singole sequenze del PHI e del VIP, rispettivamente. Per quanto riguarda il PHI, la sequenza di *Podarcis sicula* ha il 92% di identità con la sequenza di *Anolis carolinensis*, *Xenopus laevis* e *Takifugu rubripes*, il 77% con *Canis familiaris* e il 58% con *Gallus gallus*. L'identità aumenta ancora se si considera invece la sequenza del VIP, come mostrato dall'allineamento tra la sequenza aminoacidica del VIP di *Podarcis sicula* e quella di altri vertebrati riportata in figura 29; infatti, il VIP di *Podarcis sicula* ha il 100% di identità con quello di *Gallus gallus*, di *Taenopygia guttata*, di *Anolis carolinensis*, di *Alligator mississippiensis*, di *Rana ridibunda* e di *Xenopus laevis*, mentre ha il 96% di identità con quello di *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Takifugu rubripes*, *Onchorhynchus mykiss* e *Sparus aurata* e l'86% con *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Canis familiaris*, *Sus scrofa* e *Scyliorhinus canicula*. Inoltre l'analisi sulla sequenza

aminoacidica del VIP (28 aa) condotta con MEGA 4.0 ha evidenziato che il 78.6% dei residui sono conservati, il 17.6% sono residui “parsimony-informative” e il 3.6% sono singleton (Tab. 7). In tabella 8 sono riportati i valori delle distanze a coppie tra la sequenza del VIP di *Podarcis sicula* e quella di altri vertebrati (A) e tra la sequenza del VIP di *Podarcis sicula* e quella di questi stessi organismi, raggruppati per classi (B); tali parametri sono stati calcolati con il metodo Dayoff Matrix. L'albero filogenetico costruito con il metodo della Massima Parsimonia è riportato in figura 30; per quanto riguarda la sequenza aminoacidica, questa è vicina a quella degli altri rettili, anfibi e uccelli, dal momento che le loro sequenze hanno il 100% di identità.

Produzione della sonda a cDNA

La reazione di PCR condotta sul prodotto di eluizione utilizzando dNTP marcati con digossigenina ha evidenziato una banda leggermente più alta di quella ottenuta conducendo parallelamente la PCR con dNTP non marcati (Fig. 31A).

Ibridazione in situ per la localizzazione del messaggero del PHI/VIP nel testicolo di Podarcis sicula

Indagini di ibridazione *in situ* condotte con sonda omologa a cDNA per il PHI/VIP dimostrano che il messaggero del PHI/VIP è espresso nelle sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* a livello sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche in modo stadio-dipendente. Nelle cellule germinali, è espresso soprattutto negli spermatociti II e negli spermatidi; sono debolmente marcati anche gli spermatogoni e gli spermatociti I, mentre non sono marcati gli spermatozoi (Fig. 31B). Un segnale di ibridazione è presente anche nelle cellule di Sertoli e nelle cellule di Leydig (Fig. 31B). L'mRNA del PHI/VIP non è stato rilevato nelle sezioni di testicolo di controllo (Fig. 31B, inserto).

Immunoprecipitazione per il VIP nel testicolo di Podarcis sicula

L'immunoprecipitazione su estratti proteici testicolari con anticorpo anti-VIP ha evidenziato la presenza di una banda al di sotto di 3.5 kDa (Fig. 32A), dimostrando quindi che questo peptide è presente nel testicolo di *Podarcis sicula*.

Immunoistochimica per la localizzazione del VIP nel testicolo di Podarcis sicula

Indagini immunoistochimiche condotte con un anticorpo eterologo per il VIP dimostrano che tale peptide è ampiamente distribuito nel testicolo di *Podarcis sicula*. In

particolare, il VIP, in modo simile al PACAP, è presente in tutti gli stadi della spermatogenesi, anche se risultano maggiormente marcati gli ultimi stadi (spermatociti II, spermatidi rotondi e allungati e spermatozoi) rispetto ai primi (spermatogoni e spermatociti I); sono marcate anche le cellule di Leydig e quelle di Sertoli (Fig. 32B). I controlli, ottenuti omettendo dell'anticorpo primario, sono negativi (Fig. 32B, inserto).

CAPITOLO 7

RISULTATI II: I RECETTORI DEL PACAP E DEL VIP

WESTERN BLOTTING PER PAC₁R, VPAC₁R E VPAC₂R

Le analisi di Western blotting su proteine estratte da testicolo hanno evidenziato che in *Torpedo marmorata* (Fig. 33A) e in *Podarcis sicula* (Fig. 33C) sono presenti i recettori del PACAP e del VIP: l'incubazione con l'anticorpo anti-PAC₁R ha evidenziato una banda di circa 66 kDa, l'incubazione con l'anticorpo anti-VPAC₁R una banda di circa 45 kDa e infine l'incubazione con l'anticorpo anti-VPAC₂R una banda di circa 55 kDa (Fig. 33B e D). Diversamente, i controlli negativi, ottenuti per omissione dell'anticorpo primario, non presentano nessuna banda (Fig. 33B e D).

7.1 IL RECETTORE PAC₁

7.1.1 *Torpedo marmorata*

RT-PCR

La PCR è stata condotta con dei primer specifici costruiti comparando le regioni codificanti del PAC₁R dei vertebrati circa 320 bp a monte e appena a valle rispetto al sito di inserzione delle cassette hip e/o hop (Fig. 34) e ha evidenziato che il trascritto del recettore PAC₁ è presente nel testicolo di *Torpedo marmorata*. La corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% ha permesso di evidenziare due bande di circa 350 e 450 coppie di basi (Fig. 35A). I controlli non presentano alcuna banda (Fig. 35A). Le due bande ottenute dalla PCR sono state quindi eluite; i prodotti dell'eluizione sono stati corsi su gel di agarosio all'1.8% (Fig. 35B); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare, per ciascun eluito, un'unica banda della lunghezza attesa, che è stata quindi sequenziata. Nelle figure 36 e 37 sono riportate le sequenze nucleotidiche e le sequenze aminoacidiche dedotte delle due sequenze ottenute. Una sequenza nucleotidica è lunga 303 bp con un open reading frame di 303 bp e una sequenza aminoacidica dedotta di 101 aminoacidi (Fig. 36); l'altra sequenza nucleotidica è lunga invece 336 bp con un open reading frame di 335 bp e

una sequenza aminoacidica dedotta di 111 aminoacidi (Fig. 37). L'analisi con Clustal W2 tra ciascuna sequenza e le varie cassette hip/hop ha permesso di evidenziare che la sequenza di 303 bp corrisponde all'isoforma null (Figg. 38-39), cioè priva dell'inserito, mentre la sequenza di 450 bp corrisponde all'isoforma hop2 (Figg. 40-41). La sequenza null è stata pubblicata sul sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con numero di accesso HQ318781.

Analisi bioinformatica della sequenza nucleotidica dell'isoforma null

La sequenza nucleotidica dell'isoforma null del *PAC₁R* di *Torpedo marmorata* ha un'elevata identità con le sequenze del *PAC₁R* di altri vertebrati, come evidenziato dall'allineamento della sequenza di *Torpedo marmorata* con quella di *Podarcis sicula* (vedi par. 7.1.2) e di altri vertebrati, scelti tra mammiferi, uccelli, anfibi e teleostei (Fig. 38). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTn ha evidenziato in particolare che la sequenza del *PAC₁R* di *Torpedo marmorata* ha il 74% di identità con quella di *Rattus norvegicus* (gi|404252), il 73% di identità con quella di *Gallus gallus* (gi|148372317), il 76% con quella di *Podarcis sicula*, il 70% con *Xenopus laevis* (gi|6561484) e il 73% con *Danio rerio* (gi|218931202). In tabella 9 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta comparando le sequenze degli organismi prima menzionati nell'analisi sia di *Torpedo marmorata* sia di *Podarcis sicula*: parte dei nucleotidi è completamente conservata (59.6%); il 20.8% del totale sono siti "parsimony-informative" e il 19.6% sono siti singleton; il 62.4% del totale sono siti 0-volte degenerati, mentre i siti 2-volte e 4-volte sono ciascuno il 12.2 % del totale.

In figura 50 sono riportate le parti del recettore codificate dalla sequenza ottenuta.

Analisi bioinformatica della sequenza aminoacidica dell'isoforma null

La sequenza aminoacidica parziale dedotta del *PAC₁R* di *Torpedo marmorata* è stata allineata con quella del *PAC₁R* di *Podarcis sicula* e di altri vertebrati (Fig. 39). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTx ha evidenziato in particolare che la sequenza aminoacidica del recettore *PAC₁* di *Torpedo marmorata* ha il 78% di identità con quella di *Rattus norvegicus*, di *Gallus gallus* e di *Podarcis sicula*, il 79% con *Xenopus laevis* e l'81% con *Danio rerio*. In tabella 10 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta con il software MEGA 4.0, comparando le sequenze di *Torpedo marmorata* e

di *Podarcis sicula* con quelle di *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* e *Danio rerio*: il 73.4% degli aminoacidi sono conservati tra i vari vertebrati analizzati, il 26.6% sono variabili, il 7.3% sono residui “parsimony-informative” e il 19.3% sono singleton.

In figura 51 sono riportate le parti del recettore comprese nella sequenza ottenuta.

Analisi bioinformatica della sequenza nucleotidica dell'isoforma hop2

L'analisi della sequenza nucleotidica dell'isoforma hop2 del PAC_1R di *Torpedo marmorata* ha evidenziato un'alta identità con il PAC_1R di altri vertebrati, come emerge dall'allineamento riportato in figura 40. L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTn ha evidenziato in particolare che la sequenza dell'isoforma hop2 del recettore PAC_1 di *Torpedo marmorata* ha il 74% di identità con quella di *Rattus norvegicus* (gi|404197), il 72% di identità con quella di *Gallus gallus* (Peeters et al., 1999) e il 76% con *Danio rerio* (gi|58047486). In tabella 11 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta con il software MEGA 4.0, comparando le sequenze degli organismi prima menzionati: parte dei nucleotidi è completamente conservata (63.4%); il 6.5% del totale sono siti “parsimony-informative” e il 29.8% sono singleton; il 59.8% del totale sono siti 0-volte degenerati, mentre i siti 2-volte e 4-volte degenerati sono ciascuno il 10.4 e l'8.3% del totale, rispettivamente.

In figura 50 sono evidenziate le parti del recettore che sono codificate dalle sequenze ottenute. Tra i vari vertebrati presi in considerazione, i residui conservati nel terzo loop intracellulare, in cui si inserisce la cassetta hop2, sono il 64%.

Analisi bioinformatica della sequenza aminoacidica dell'isoforma hop2

La sequenza aminoacidica parziale dedotta dell'isoforma hop2 del recettore PAC_1 di *Torpedo marmorata* è stata allineata con quella del PAC_1R di altri vertebrati (Fig. 41). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTx ha evidenziato in particolare che la sequenza di *Torpedo marmorata* ha il 78% di identità con quella di *Rattus norvegicus*, il 77% di identità con quella di *Gallus gallus* e il 76% con *Danio rerio*. In tabella 12 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta con il programma MEGA 4.0, comparando la sequenza di *Torpedo marmorata* con quella dei vertebrati appena riportati: il 71.2% degli aminoacidi sono conservati tra i vari vertebrati analizzati, il

28.8% sono variabili, il 3.6% sono residui “parsimony-informative” e il 25.2% sono singleton.

In figura 51 sono riportate le parti del recettore che sono comprese nelle sequenze ottenute ed è indicato il punto in cui c'è l'inserimento della cassetta hop2. I residui conservati nel terzo loop intracellulare, in cui si inserisce la cassetta hop2, sono il 62%.

Produzione della sonda a RNA e ibridazione in situ

- Clonaggio e minipreparazione dei cloni ricombinanti

La corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% del plasmide ricombinante, recuperato mediante minipreparazione, ha evidenziato le tre bande, corrispondenti alle tre isoforme del plasmide (Fig. 42A).

- Digestione enzimatica dei cloni ricombinanti e sintesi della sonda a RNA

Il plasmide ricombinante è stato prima digerito con EcoRI, per verificare la presenza dell'inserto, e poi con gli enzimi SalI e NcoI per linearizzarlo, come dimostrato dalla corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (Fig. 42B). Lo spot test dimostra che la sonda a RNA sia antisenso sia senso è concentrata 500 ng/μl (dato non mostrato).

Ibridazione in situ per la localizzazione del messaggero del PAC₁R nel testicolo di Torpedo marmorata

Indagini di ibridazione *in situ* condotte con sonda omologa a RNA per il PAC₁R dimostrano che il messaggero del recettore PAC₁ è ampiamente espresso nelle sezioni di testicolo di *Torpedo marmorata*. Nelle cellule germinali, l'mRNA del PAC₁R, assente negli spermatociti I (Fig. 43C), è presente, invece, nei prespermatogoni (Fig. 43A), negli spermatogoni (Fig. 43B), negli spermatociti II (Fig. 43D), negli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 43E) e negli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 43F). Un segnale positivo di ibridazione è presente anche nelle cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatogoni (Fig. 43B), spermatociti I (Fig. 43C), spermatociti II (Fig. 43D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 43E) e spermatozoi (Fig. 43F); sono marcate le cellule di Sertoli delle cisti a prespermatogoni (Fig. 43A), a spermatogoni (Fig. 43B) e delle cisti svuotate (Fig. 43G). L'mRNA del PAC₁R non è stato rilevato nelle sezioni di testicolo incubate con la sonda senso (Fig. 43G, inserto).

Immunoistochimica per la localizzazione del PAC₁R nel testicolo di *Torpedo marmorata*

Esperimenti di immunolocalizzazione condotti con un anticorpo eterologo per il PAC₁R dimostrano che tale proteina è presente nel testicolo di *Torpedo marmorata*. In particolare, sono marcati gli spermatociti II (Fig. 44D), gli spermatidi rotondi e allungati (Fig. 44E) e gli spermatozoi prima del rilascio (Fig. 44F), nonché le cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatociti I (Fig. 44C), spermatociti II (Fig. 44D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 44E) e spermatozoi (Fig. 44F) e tra le cisti svuotate (Fig. 44G); sono inoltre marcate le cellule di Sertoli delle cisti svuotate (Fig. 44G). Diversamente, non sono marcati i prespermatogoni (Fig. 44A), gli spermatogoni (Fig. 44B) e gli spermatociti I (Fig. 44C). Non è rilevabile nessun segnale nelle sezioni di controllo, in cui è stato omesso l'anticorpo primario (Fig. 44H).

7.1.2 *Podarcis sicula*

RT-PCR

La PCR condotta con i primer disegnati comparando le regioni codificanti del PAC₁R dei vertebrati circa 320 bp a monte e appena a valle rispetto al sito di inserzione delle cassette hip e/o hop (Fig. 34) ha evidenziato che il trascritto del gene del recettore PAC₁ è espresso nel testicolo di *Podarcis sicula* e ha permesso di ottenere due sequenze più lunghe di quella già depositata in banca dati (gi|161898731) e corrispondenti a due diverse isoforme del recettore. La corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% ha permesso di evidenziare, come per *Torpedo marmorata*, due bande di circa 350 e 450 coppie di basi (Fig. 45A), mentre i controlli non presentano alcuna banda (Fig. 45A). Le due bande ottenute dalla PCR sono state quindi eluite e i prodotti dell'eluizione sono stati corsi su un gel di agarosio all'1.8% (Fig. 45B); la corsa elettroforetica ha permesso di evidenziare un'unica banda della lunghezza attesa per ogni eluito e ciascun eluito è stato quindi sequenziato. Nelle figure 46 e 47 sono riportate le sequenze nucleotidiche e le sequenze aminoacidiche dedotte delle due isoforme del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula*. Una sequenza nucleotidica è lunga 327 bp con un

open reading frame di 327 bp e una sequenza aminoacidica dedotta di 109 aminoacidi (Fig. 46); l'altra è lunga 411 bp con un open reading frame di 411 bp e una sequenza aminoacidica dedotta di 137 aminoacidi (Fig. 47). L'analisi con Clustal W2 tra ciascuna sequenza (327 e 411 bp) e le varie cassette hip/hop ha permesso di evidenziare che la banda di 327 bp corrisponde all'isoforma null, cioè priva dell'inserito (Figg. 38-39), mentre la banda di 411 bp corrisponde all'isoforma hop1 (Figg. 48-49). Le sequenze sono state pubblicate sul sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con numero di accesso HQ318782 per la sequenza null e HQ318783 per la sequenza hop1.

Analisi bioinformatica della sequenza nucleotidica dell'isoforma null

La sequenza nucleotidica dell'isoforma null del PAC_1R di *Podarcis sicula* presenta un'elevata identità con quella di altri vertebrati, come evidenziato dall'allineamento della sequenza null di *Podarcis sicula* con quella di altri vertebrati, mammiferi, uccelli, rettili, anfibi e teleostei, mostrato precedentemente per *Torpedo marmorata* (Fig. 38). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTn ha evidenziato in particolare che la sequenza dell'isoforma null del recettore PAC_1 di *Podarcis sicula* ha l'81% di identità con quella di *Rattus norvegicus* (gi|404252), l'82% di identità con quella di *Gallus gallus* (gi|148372317), l'80% con *Xenopus laevis* (gi|6561484) e con *Danio rerio* (gi|218931202).

In figura 50 sono riportate le parti del recettore codificate dalla sequenza ottenuta.

Analisi bioinformatica della sequenza aminoacidica dell'isoforma null

La sequenza aminoacidica parziale dedotta del PAC_1R di *Podarcis sicula* è stata allineata con quella del PAC_1R di altri vertebrati (Fig. 39). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTx ha evidenziato in particolare che la sequenza dell'isoforma null del recettore PAC_1 di *Podarcis sicula* ha l'88% di identità con quella di *Rattus norvegicus*, il 92% di identità con quella di *Gallus gallus*, il 91% con *Xenopus laevis* e il 95% con *Danio rerio*.

In figura 51 sono riportate le parti del recettore comprese nella sequenza ottenuta.

Analisi bioinformatica della sequenza nucleotidica dell'isoforma hop1

La sequenza nucleotidica dell'isoforma hop1 di *Podarcis sicula* ha un'alta identità con il PAC₁R di altri vertebrati, come evidenziato dall'allineamento riportato in figura 48. L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTn ha evidenziato in particolare che la sequenza dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* ha l'80% di identità con quella di *Rattus norvegicus* (gi|404220), l'83% di identità con quella di *Gallus gallus* (Peeters et al., 1999), il 75% con *Rana ridibunda* (gi|16588558) e il 78% con *Danio rerio* (gi|58047490). In tabella 13 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta con il programma MEGA 4.0, comparando le sequenze degli organismi prima menzionati: parte dei nucleotidi è completamente conservata (62%); il 12.9% del totale sono siti "parsimony-informative" e il 25.1% sono singleton; il 64% del totale sono siti 0-volte degenerati, mentre i siti 2-volte e 4-volte degenerati sono ciascuno il 13.6 e l'11.9% del totale, rispettivamente.

In figura 50 sono evidenziate le parti del recettore che sono codificate dalle sequenze ottenute. I residui conservati nel terzo dominio intracellulare, dove c'è l'inserzione della cassetta hop1, è del 61% tra i vari vertebrati presi in considerazione.

Analisi bioinformatica della sequenza aminoacidica dell'isoforma hop1

La sequenza aminoacidica parziale dedotta dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* è stata allineata con quella del PAC₁R di altri vertebrati (Fig. 49). L'analisi bioinformatica condotta mediante BLASTx ha evidenziato in particolare che la sequenza dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* ha l'87% di identità con quella di *Rattus norvegicus*, il 90% di identità con quella di *Gallus gallus*, l'83% con *Rana ridibunda* e l'88% con *Danio rerio*. In tabella 14 sono riassunti inoltre i risultati dell'analisi condotta con MEGA 4.0, comparando la sequenza di *Podarcis* con quelle dei vertebrati appena riportati: il 74.4% degli aminoacidi sono conservati tra i vari vertebrati analizzati, il 25.6% sono variabili, il 5.1% sono residui "parsimony-informative" e il 20.4% sono singleton.

In figura 51 sono evidenziate le parti del recettore che sono comprese nelle sequenze ottenute. I residui conservati nel terzo dominio intracellulare, dove c'è l'inserzione della cassetta hop1, è del 63%.

Riassunto delle isoforme ottenute per *Torpedo marmorata* e per *Podarcis sicula*

In figura 50 sono evidenziate le parti del recettore che sono codificate dalle sequenze ottenute. Le sequenze del PAC₁R di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* includono parte del terzo segmento transmembrana (in cui il 48.1% dei nucleotidi sono conservati), il secondo loop intracellulare (in cui il 50% dei nucleotidi sono conservati), il quarto segmento transmembrana (in cui il 59.1% dei nucleotidi sono conservati), il terzo loop extracellulare (in cui il 60.3% dei nucleotidi sono conservati), il quinto segmento transmembrana (in cui il 61.7% dei nucleotidi sono conservati), il terzo loop intracellulare (in cui il 64.8% dei nucleotidi sono conservati), in cui ci può essere l'inserzione delle cassette hip/hop, e parte del sesto segmento transmembrana. In modo simile alla sequenza nucleotidica, anche per la sequenza aminoacidica in figura 51 sono evidenziate le varie parti del recettore. Le sequenze del PAC₁R di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* includono parte del terzo segmento transmembrana (in cui il 77.8% degli aminoacidi sono conservati), il secondo loop intracellulare (in cui il 75% degli aminoacidi sono conservati), il quarto segmento transmembrana (in cui il 68.2% degli aminoacidi sono conservati), il terzo loop extracellulare (in cui il 65.4% degli aminoacidi sono conservati), il quinto segmento transmembrana (in cui il 70% degli aminoacidi sono conservati), il terzo loop intracellulare (in cui il 83.3% degli aminoacidi sono conservati), in cui ci può essere l'inserzione delle cassette hip/hop, e parte del sesto segmento transmembrana. La più alta identità è stata registrata nel terzo dominio intracellulare.

Produzione della sonda a cDNA

La corsa elettroforetica su gel di agarosio della PCR condotta sull'eluito di 350 bp utilizzando dNTP marcati con digossigenina ha permesso di evidenziare una banda leggermente più alta di quella ottenuta conducendo parallelamente la PCR con dNTP non marcati (Fig. 52A).

Ibridazione in situ per la localizzazione del messaggero del PAC₁R nel testicolo di *Podarcis sicula*

Indagini di ibridazione *in situ* condotte con sonda omologa a cDNA per il PAC₁R dimostrano che il messaggero del recettore del PAC₁R è espresso nelle sezioni di

testicolo di *Podarcis sicula* a livello sia delle cellule germinali sia delle cellule somatiche in modo stadio-dipendente. Nelle cellule germinali, il messaggero del recettore PAC₁ è espresso soprattutto negli spermatociti II e negli spermatidi; sono debolmente marcati anche alcuni spermatogoni e spermatociti I, mentre non sono marcati gli spermatozoi (Fig. 52B). Un segnale di ibridazione è presente anche nelle cellule di Sertoli e nelle cellule di Leydig (Fig. 52B). L'mRNA del recettore del PAC₁R non è stato rilevato nelle sezioni di testicolo di controllo (Fig. 52B, inserto).

Immunoistochimica per la localizzazione del PAC₁R nel testicolo di Podarcis sicula

Esperimenti di immunoistochimica condotti con anticorpo anti-PAC₁R dimostrano che questa proteina è ampiamente rappresentata nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il recettore PAC₁ è presente sia nelle cellule germinali sia in quelle somatiche: nelle cellule germinali, è presente in tutti gli stadi della spermatogenesi, anche se la marcatura è più intensa negli ultimi stadi (spermatociti II, spermatidi rotondi e allungati e spermatozoi) rispetto ai primi (spermatogoni e spermatociti I). Inoltre, sono marcate anche le cellule di Leydig e quelle di Sertoli (Fig. 53A). Controlli negativi, ottenuti attraverso l'omissione dell'anticorpo primario, hanno sempre dato un segnale negativo (Fig. 53B) (Agnese et al., 2010).

7.2 I RECETTORI VPAC

7.2.1 Torpedo marmorata

Immunoistochimica per la localizzazione del recettore VPAC₁ nel testicolo di Torpedo marmorata

Esperimenti di immunolocalizzazione condotti con un anticorpo eterologo anti-VPAC₁R hanno evidenziato che, diversamente dagli altri elementi del sistema PACAP-VIP-recettori, questo recettore ha una distribuzione piuttosto limitata nel testicolo di *Torpedo marmorata*. Infatti, l'unica positività per questo recettore è stata evidenziata nelle cellule germinali delle cisti contenenti spermatogoni (Fig. 54B) e nelle cellule di Sertoli delle cisti svuotate (Fig. 54F). Diversamente, né le cellule germinali né le cellule di Leydig sono marcate nelle cisti contenenti prespermatogoni (Fig. 54A), spermatociti I (Fig. 54C), spermatociti II (Fig. 54C), spermatidi rotondi e

allungati (Fig. 54D) o spermatozoi (Fig. 54E). Allo stesso modo, controlli negativi, ottenuti omettendo l'anticorpo primario, non sono risultati marcati (Fig. 54F).

*Immunoistochimica per la localizzazione del recettore VPAC₂ nel testicolo di *Torpedo marmorata**

L'immunolocalizzazione del recettore VPAC₂ è stata condotta utilizzando un anticorpo eterologo, che ha evidenziato per il recettore VPAC₂ una distribuzione più ampia del recettore VPAC₁ e simile a quella del recettore PAC₁ piuttosto che a quella del recettore VPAC₁. Difatti, l'immunoreattività per questo recettore è stata evidenziata all'interno delle cellule germinali delle cisti contenenti prespermatogoni (Fig. 55A), spermatogoni (Fig. 55B), spermatociti II (Fig. 55D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 55E) e spermatozoi prima del rilascio (Fig. 55F). Una reazione positiva è presente anche nelle cellule di Sertoli delle cisti contenenti spermatogoni (Fig. 55B) e delle cisti svuotate (Fig. 55G) e nelle cellule di Leydig localizzate tra le cisti che contengono spermatociti I (Fig. 55C), spermatociti II (Fig. 55D), spermatidi rotondi e allungati (Fig. 55E) e spermatozoi (Fig. 55F). I controlli negativi, ottenuti per omissione dell'anticorpo primario, sono negativi (Fig. 55G, inserto).

7.2.2 *Podarcis sicula*

*Immunoistochimica per la localizzazione del recettore VPAC₁ nel testicolo di *Podarcis sicula**

Esperimenti di immunolocalizzazione utilizzando un anticorpo eterologo anti-VPAC₁R hanno evidenziato che, come nel testicolo di *Torpedo marmorata*, questo recettore ha una distribuzione molto limitata nel testicolo di *Podarcis sicula*. Infatti, l'unica positività per questo recettore è stata evidenziata nelle cellule di Leydig, mentre non è presente nelle cellule germinali e di Sertoli (Fig. 56A e B), nonché nei controlli negativi, ottenuti attraverso l'omissione dell'anticorpo primario (Fig. 56C).

*Immunoistochimica per la localizzazione del recettore VPAC₂ nel testicolo di *Podarcis sicula**

L'immunolocalizzazione del recettore VPAC₂ è stata condotta utilizzando un anticorpo eterologo, che ha evidenziato per il recettore VPAC₂ una distribuzione

simile a quella del recettore PAC₁ piuttosto che del recettore VPAC₁. Difatti immunoreattività per questo recettore è stata evidenziata all'interno delle cellule germinali dove, come per il recettore PAC₁, sono maggiormente marcati gli ultimi stadi (spermatociti II, spermatidi rotondi e allungati e spermatozoi) rispetto ai primi stadi (spermatogoni e spermatociti I); sono marcate anche le cellule di Leydig e quelle di Sertoli (Fig. 57A). Controlli negativi, ottenuti omettendo l'anticorpo primario, non sono marcati (Fig. 57B).

CAPITOLO 8

RISULTATI III: COLTURE D'ORGANO

8.1 Effetti del PACAP27

Il trattamento con il PACAP27 ha determinato un aumento nelle concentrazioni di testosterone e di 17β -estradiolo tempo-dipendente e dose-dipendente rispetto alle concentrazioni riportate al tempo zero e nei controlli, come evidente dai grafici riportati in figura 58 per il testosterone e in figura 59 per il 17β -estradiolo. Le differenze tra i vari tempi e le varie concentrazioni a cui è stato condotto il trattamento sono statisticamente significative, eccetto che in alcuni casi. Per quanto riguarda il testosterone, le differenze tra il trattamento a 30' e il tempo zero non sono significative per la concentrazione 10^{-8} M, così come tra la concentrazione 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M; nel trattamento di 60', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative; nel trattamento di 120', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative (Fig. 58). Per quanto riguarda il 17β -estradiolo, le differenze tra il trattamento a 30' e il tempo zero non sono significative alle varie concentrazioni utilizzate; nel trattamento di 120', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative (Fig. 59).

8.2 Effetti del PACAP38

Il trattamento con il PACAP38 ha determinato un aumento nelle concentrazioni di testosterone e di 17β -estradiolo tempo-dipendente e dose-dipendente rispetto alle concentrazioni riportate al tempo zero e nei controlli, come evidente dai grafici riportati in figura 60 per il testosterone e in figura 61 per il 17β -estradiolo. Le differenze tra i vari tempi e le varie concentrazioni a cui è stato condotto il trattamento sono statisticamente significative, eccetto che nei casi di seguito riportati. Per quanto riguarda il testosterone, nel trattamento di 30' e di 120', le differenze tra le concentrazioni 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative; nel

trattamento di 60', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-7} M non sono significative (Fig. 60). Per quanto riguarda il 17β -estradiolo, le differenze tra il trattamento a 30' e il tempo zero non sono significative alle varie concentrazioni utilizzate; nel trattamento di 60', le differenze tra gli effetti indotti tra il trattamento con PACAP38 concentrato 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative (Fig. 61).

8.3 Effetti del VIP

Allo stesso modo, il trattamento con il VIP ha determinato un aumento nelle concentrazioni di testosterone e di 17β -estradiolo tempo-dipendente e dose-dipendente rispetto alle concentrazioni riportate al tempo zero e nei controlli, come evidente dai grafici riportati in figura 62 per il testosterone e in figura 63 per il 17β -estradiolo. Le differenze tra i vari tempi e le varie concentrazioni a cui è stato condotto il trattamento sono statisticamente significative, eccetto che in alcuni casi di seguito riportati. Per quanto riguarda il testosterone, nel trattamento di 30', le differenze tra gli effetti indotti rispetto al tempo zero e tra le varie concentrazioni di VIP utilizzate non sono statisticamente significative, eccetto che per la dose 10^{-6} M; nel trattamento di 60', le differenze tra gli effetti indotti tra le concentrazioni di 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative (Fig. 62). Per quanto riguarda il 17β -estradiolo, nel trattamento di 30', le differenze tra gli effetti indotti tra il trattamento con VIP concentrato 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono statisticamente significative; nel trattamento di 60', le differenze tra le varie concentrazioni di VIP non sono significative (Fig. 63).

8.4 Confronto degli effetti indotti dai tre peptidi

Effetti indotti sul testosterone

Confrontando gli effetti indotti dai peptidi ai tempi diversi e alle diverse concentrazioni, emerge che gli effetti indotti dal PACAP38 sui livelli di testosterone sono maggiori di quelli indotti dal PACAP27 e dal VIP in modo statisticamente significativo (Figg. 64-65-66).

Dal confronto degli effetti indotti dal trattamento di 30' con i tre peptidi sui livelli di

testosterone emerge che il PACAP38 induce un aumento di testosterone maggiore di quello indotto dal PACAP27 e dal VIP in modo statisticamente significativo; il trattamento con il PACAP27 alle concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-8} M induce effetti che non sono significativamente diversi da quelli indotti dal VIP alle stesse concentrazioni (Fig. 64).

Dal confronto degli effetti indotti dal trattamento di 60' emerge che il PACAP38 e il VIP inducono un aumento di testosterone sempre statisticamente maggiore di quello indotto dal PACAP27; il PACAP38 inoltre ha un effetto statisticamente maggiore nell'indurre l'aumento di testosterone rispetto al VIP, anche se il trattamento con il PACAP38 alla concentrazione di 10^{-8} M induce effetti che non sono significativamente diversi da quelli indotti dal VIP alla stessa concentrazione (Fig. 65). Infine, dal confronto degli effetti indotti dal trattamento di 120' emerge che il PACAP38 e il VIP inducono un aumento di testosterone maggiore di quello indotto dal PACAP27. Le differenze osservate tra PACAP38 e VIP sono invece statisticamente significative solo alla concentrazione di 10^{-8} M (Fig. 66).

Effetti indotti sul 17β -estradiolo

Confrontando invece gli effetti indotti dai tre peptidi sui livelli di 17β -estradiolo, emerge che gli effetti indotti dal VIP sono maggiori di quelli indotti dal PACAP, nelle sue 2 forme 27 e 38, almeno a 30' e a 60'; nel trattamento a 120' tali differenze si riducono notevolmente (Figg. 67-68-69).

Dal confronto degli effetti indotti dal trattamento di 30' con i tre peptidi sui livelli di 17β -estradiolo emerge che il VIP induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP27 e 38 in modo statisticamente significativo, mentre le differenze tra gli effetti indotti dal PACAP27 e dal 38 non sono statisticamente significative (Fig. 67).

Dal confronto degli effetti indotti dal trattamento di 60' emerge che il VIP induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP27 e 38 in modo statisticamente significativo. Il PACAP27 induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP38 solo alla concentrazione di 10^{-6} M, mentre alle altre concentrazioni le differenze tra gli effetti indotti dal PACAP27 e dal 38 non

sono statisticamente significative (Fig. 68).

Dal confronto degli effetti indotti dal trattamento di 120' emerge che le differenze osservate tra gli effetti indotti dal VIP alle concentrazioni di 10^{-8} M e 10^{-7} M sono statisticamente maggiori di quelli indotti dal PACAP27 e 38 alle stesse concentrazioni, mentre le differenze tra i livelli di 17β -estradiolo indotti da PACAP27 e 38 non sono statisticamente significative. Alla concentrazione di 10^{-6} M il PACAP27 induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal VIP e dal PACAP38, mentre le differenze tra gli effetti indotti da VIP e PACAP38 non sono statisticamente significative (Fig. 69).

DISCUSSIONE

Il controllo della spermatogenesi e della steroidogenesi è un processo finemente regolato al quale partecipano fattori di varia origine, dalle gonadotropine ipofisarie, FSH e LH, il cui rilascio è stimolato dal GnRH (Matsumoto et al., 1986), a fattori endocrini, paracrini e autocrini. Recenti studi hanno dimostrato la presenza di molti neuropeptidi nonché dei loro recettori all'interno del testicolo, suggerendo che questi possano agire come regolatori locali del differenziamento delle cellule germinali e della steroidogenesi (Li e Arimura, 2003). Tra i neuropeptidi identificati a livello testicolare rientrano il GHRH, il PACAP, il VIP, la secretina, l'ossitocina, la somatostatina, la sostanza P e il neuropeptide Y (Li e Arimura, 2003). Il ruolo di questi neuropeptidi nella fisiologia del testicolo è in gran parte sconosciuto, anche se l'avvento di nuove tecniche ha permesso di iniziare a comprendere le complesse funzioni di questi peptidi nel testicolo (Li e Arimura, 2003). Lo studio dei vari fattori che regolano la spermatogenesi sta dimostrando che il PACAP e il VIP svolgono un ruolo di primo piano in tale processo. Non pochi studi sono stati condotti nel testicolo dei mammiferi per definire la distribuzione di questi neuropeptidi e dei loro recettori e per cercare di delineare in quali funzioni possano essere coinvolti. D'altra parte piuttosto limitati sono invece gli studi condotti nel testicolo dei vertebrati non mammiferi. I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi hanno permesso di delineare un quadro più completo circa la presenza del PACAP, del VIP e dei loro recettori nel testicolo di due vertebrati non mammiferi, il pesce cartilagineo *Torpedo marmorata* e il rettile squamato *Podarcis sicula*, con l'acquisizione di nuove e significative informazioni sui seguenti aspetti: 1. sulle sequenze di alcuni elementi di questo sistema di regolazione; 2. sulla distribuzione dei siti di sintesi endotesticolare del PACAP, del VIP e del PAC₁R e sulla presenza e sulla distribuzione di PACAP, VIP e recettori; 3. sugli effetti indotti sui livelli di testosterone e 17 β -estradiolo dal trattamento con PACAP27, PACAP38 e VIP nel testicolo di *Podarcis sicula*.

Il primo risultato di questa tesi di dottorato è stato quello di caratterizzare parte delle sequenze codificanti il PACAP di *Torpedo marmorata*, il PHI/VIP di *Podarcis sicula* e il PAC₁R sia di *Torpedo marmorata* sia di *Podarcis sicula* tramite RT-PCR. I risultati di queste analisi hanno permesso di caratterizzare per la prima volta la sequenza codificante il PACAP in un elasmobranco e hanno evidenziato che il PACAP di *Torpedo marmorata* ha una sequenza altamente conservata, come confermato dal confronto della sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta con quella di molti altri vertebrati e dei tunicati; il PACAP di *Torpedo marmorata* presenta inoltre un'elevata identità con quello precedentemente caratterizzato di *Podarcis sicula*, l'altro modello sperimentale da me utilizzato (88% di identità nucleotidica e 95% di identità aminoacidica). Tra i vari organismi considerati, l'identità è particolarmente evidente quando si confrontano le sequenze aminoacidiche, nelle quali la parte maggiormente conservata è quella all'N-terminale, che è responsabile dell'attività biologica del PACAP, piuttosto che quella al C-terminale, dove si osserva invece il maggior numero di variazioni (Vaudry et al., 2000; Cardoso et al., 2007a). Dalle analisi filogenetiche emerge dunque che la sequenza del PACAP si è conservata nel corso dell'evoluzione; infatti il rapporto d_N/d_S è sempre minore di 1, il che indica che è improbabile l'esistenza di una selezione positiva (per la quale tale rapporto dovrebbe essere maggiore di 1). Anche i dati derivanti dallo Z-test di selezione e dal test F di Fisher confermano l'esistenza di una selezione di tipo purificante, che ha agito contro eventuali cambiamenti nella sequenza del PACAP nel corso dell'evoluzione. Inoltre, è interessante notare che dall'albero filogenetico emerge che la sequenza nucleotidica del PACAP di *Torpedo marmorata* è più vicina evolutivamente a quella degli anfibi che a quella dei teleostei; per quanto riguarda la sequenza aminoacidica, questa è vicina a quella dell'altro elasmobranco di cui si conosce esclusivamente la sequenza aminoacidica (e non quella nucleotidica) del PACAP, *Dasyatis akajei*, e a quella degli anfibi.

Per quanto riguarda invece il VIP di *Podarcis sicula*, il risultato dell'RT-PCR ha permesso di ottenere una sequenza che include la parte codificante sia il PHI sia VIP; questo dimostra per la prima volta che anche in *Podarcis sicula* lo stesso gene che

codifica il VIP codifica anche il PHI, come accade negli altri vertebrati non mammiferi, mentre nei mammiferi lo stesso gene che codifica il VIP codifica il PHM (che differisce dal PHI per l'ultimo aminoacido) (Yamagami et al., 1988; Sherwood et al., 2000). Inoltre, l'analisi bioinformatica ha evidenziato che, nell'ambito di questa sequenza, la più alta identità è presente proprio nella parte codificante il VIP, la cui sequenza aminoacidica dedotta ha il 100% di identità con le sequenze aminoacidiche di *Anolis carolinensis*, di *Gallus gallus* e di *Xenopus laevis*, mentre l'identità scende se si considera il PHI e si abbassa ancor di più se si considera la parte del propeptide che viene poi tagliata nel successivo processamento post-traduzionale. Dalle analisi filogenetiche condotte sulla sola porzione codificante il VIP di *Podarcis sicula* emerge dunque che la sequenza del VIP si è conservata nel corso dell'evoluzione; infatti il rapporto d_N/d_S è sempre minore di 1, il che indica che è improbabile l'esistenza di una selezione positiva (per la quale tale rapporto dovrebbe essere maggiore di 1). Anche i dati derivanti dallo Z-test di selezione e dal test F di Fisher confermano l'esistenza di una selezione di tipo purificante, che ha agito contro eventuali cambiamenti nella sequenza del VIP nel corso dell'evoluzione. È interessante notare come, diversamente dalla sequenza del PACAP, nella sequenza aminoacidica del VIP le sostituzioni rispetto alla sequenza dei mammiferi si verificano sempre negli stessi siti e questi residui sono inoltre sostituiti sempre con gli stessi aminoacidi. In particolare, i residui variabili generalmente non si trovano nella regione N-terminale; a tal proposito, è interessante notare che sono proprio le differenze nei residui all'N-terminale tra il PACAP e il VIP a determinare la selettività per il recettore PACAP-specifico; in tal senso, la conservazione in questi residui può essere finalizzata a impedire che sostituzioni in questi siti determinino l'interazione del VIP con il recettore PACAP-specifico. Inoltre, è interessante notare che dall'albero filogenetico emerge che la sequenza nucleotidica del VIP di *Podarcis sicula* è vicina evolutivamente a quella dell'altro rettile *Anolis carolinensis*; per quanto riguarda la sequenza aminoacidica, questa è vicina a quella di uccelli, rettili e anfibi, che sono caratterizzati dalla stessa sequenza.

Le PCR per il recettore PAC₁ hanno permesso di caratterizzare le prime sequenze delle isoforme del recettore del PACAP in un elasmobranco e in un rettile. L'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute dalle analisi di RT-PCR per il PAC₁R di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula*, condotte con dei primer disegnati a monte e a valle rispetto al sito di inserzione delle cassette hip/hop, ha evidenziato che le sequenze da me ottenute includono parte del terzo segmento transmembrana, il secondo loop intracellulare, il quarto segmento transmembrana, il terzo loop extracellulare, il quinto segmento transmembrana, il terzo loop intracellulare, in cui ci può essere l'inserzione delle cassette hip/hop, e parte del sesto segmento transmembrana. Nel testicolo di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* sono presenti solo alcune delle sei diverse isoforme del recettore PAC₁ derivanti dallo splicing di tali cassette nella terza ansa intracellulare. In particolare, sia in *Torpedo marmorata* sia in *Podarcis sicula* è presente l'isoforma null; diversamente, in *Torpedo marmorata* è presente l'isoforma hop₂, mentre in *Podarcis sicula* è presente l'isoforma hop₁, che differiscono tra loro per la presenza di un solo aminoacido aggiuntivo nella sequenza hop₁. Il ritrovamento delle isoforme null e hop nel testicolo di questi vertebrati non mammiferi è conforme con quanto riportato nei mammiferi, in cui tali isoforme sono quelle maggiormente rappresentate, diversamente dall'isoforma hip (Spengler et al., 1993). Inoltre la presenza di queste due isoforme suggerisce che gli effetti indotti dal PACAP nel testicolo possano essere mediati, a seguito del legame con il recettore PAC₁, oltre che dall'adenilato ciclasi, anche dalla fosfolipasi C, dal momento che nei mammiferi le isoforme null e hop, a differenza delle isoforme hip e hip/hop, non attivano solo l'adenilato ciclasi, ma anche la fosfolipasi C (Dickson e Finlayson, 2009). Dall'allineamento delle sequenze ottenute con quelle di altri vertebrati presenti in banca dati emerge inoltre che anche le sequenze dei recettori del PACAP e del VIP sono altamente conservate nel corso dell'evoluzione.

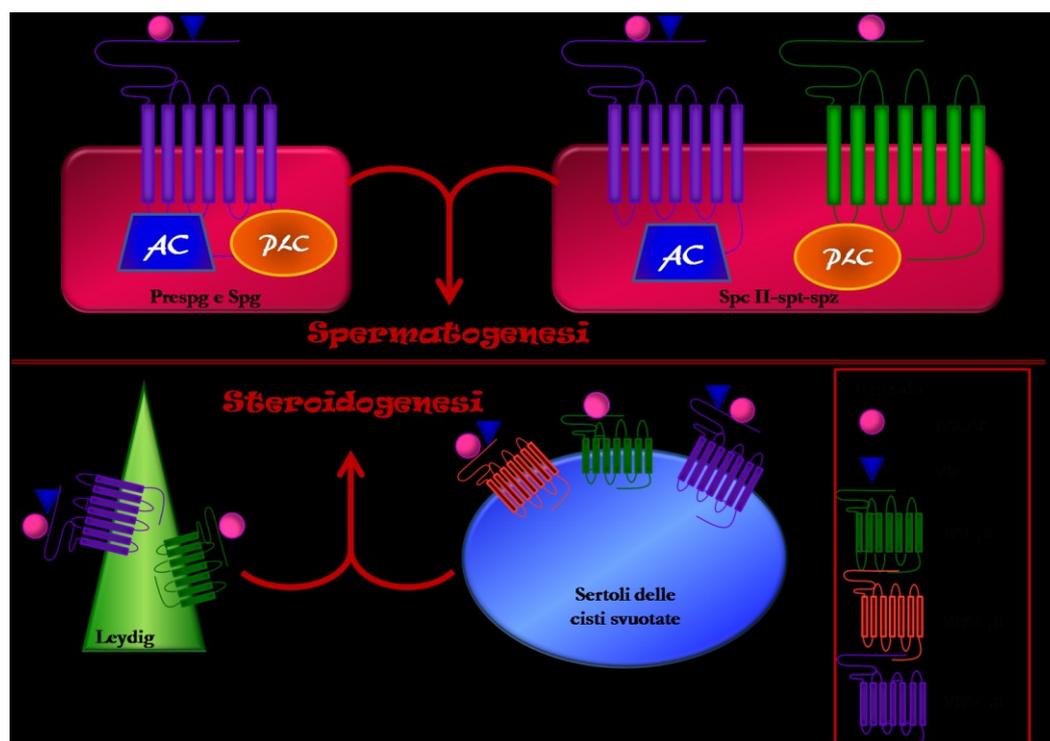
Dunque tutte le sequenze da me identificate sono caratterizzate dall'aver un'elevata conservazione nucleotidica e soprattutto aminoacidica, anche se indubbiamente la conservazione è particolarmente evidente per i due neuropeptidi considerati.

Per quanto riguarda la localizzazione degli mRNA e delle proteine degli elementi del sistema di regolazione PACAP/VIP/recettori, i risultati ottenuti suggeriscono fortemente che il PACAP e il VIP siano coinvolti nella regolazione della spermatogenesi e della steroidogenesi di questi due vertebrati non mammiferi. La distribuzione dei peptidi e dei loro recettori nel testicolo delle specie da me analizzate è generalmente più ampia rispetto a quella riportata nel testicolo dei mammiferi, dove è essenzialmente circoscritta alle cellule germinali allo stadio di spermatidi nel caso del PACAP (Heindel et al., 1992; Shioda et al., 1994; El-Gehani et al., 2000), e alle fibre nervose nel caso del VIP (Zhu et al., 1995; Alm et al., 1977, 1980; Properzi et al., 1992). La più ampia distribuzione del PACAP e soprattutto del VIP rispetto ai mammiferi lascia ipotizzare che questi peptidi controllino le funzioni testicolari di questi due vertebrati non mammiferi, agendo come regolatori paracrini/autocrini della spermatogenesi e della steroidogenesi; inoltre, dal confronto tra l'insieme dei dati da me ottenuti (vedi anche Agnese et al., 2010) e quelli ottenuti nei mammiferi emerge chiaramente che nei vertebrati non mammiferi il ruolo di tali neuropeptidi nel controllo della spermatogenesi sembra molto più significativo dal momento che il PACAP, il VIP e i rispettivi recettori sono ampiamente rappresentati nei diversi momenti della spermatogenesi, mentre nei mammiferi la loro distribuzione è particolarmente circoscritta, nel caso del PACAP, o del tutto assente, almeno come molecola, nel caso del VIP.

Nel dettaglio, per quanto riguarda *Torpedo marmorata*, il PACAP e il VIP sono ampiamente rappresentati a livello del testicolo; tra i recettori, sono particolarmente rappresentati il PAC₁R e il VPAC₂R, mentre il recettore VPAC₁ è quasi assente, in modo simile a quanto descritto nei mammiferi (Shivers et al., 1991). In particolare, negli stadi iniziali della spermatogenesi (prespermatogoni e spermatogoni) è stata registrata una positività al PACAP, al VIP, al VPAC₂R e all'mRNA del PAC₁R, suggerendo quindi che questi peptidi possano essere coinvolti nella regolazione dell'inizio della spermatogenesi; la positività al PACAP, al VIP e ai recettori PAC₁ e VPAC₂ è presente anche in cellule che sono ancora in meiosi (spermatociti II) e in cellule che hanno intrapreso il processo differenziativo (spermatidi), nonché negli

spermatozoi. Queste osservazioni lasciano ipotizzare che il PACAP e il VIP possano essere coinvolti nel controllo della spermatogenesi e della spermioistogenesi, dal momento che le cellule germinali, oltre ad essere positive per il PACAP e il VIP, lo sono anche per i loro recettori. Dunque questi peptidi potrebbero esercitare un'azione locale sulla spermatogenesi agendo in maniera autocrina e/o paracrina a seguito dell'interazione con i recettori PAC₁ e VPAC₂. In sintesi, la regolazione della spermatogenesi da parte degli elementi del sistema PACAP/VIP/recettori in *Torpedo marmorata* è attuata attraverso il legame del PACAP e del VIP con il solo recettore VPAC₂ nei primi stadi differenziativi (prespermatogoni e spermatogoni), mentre negli ultimi stadi meiotici (spermatociti II) e durante la spermioistogenesi il VIP e il PACAP possono agire attraverso il legame con il recettore VPAC₂ e in aggiunta il PACAP può legarsi anche al recettore PAC₁, presente in questi stadi (Schema 1).

È plausibile inoltre ipotizzare che il PACAP e il VIP siano coinvolti anche nella regolazione della steroidogenesi, e conseguentemente dell'andamento generale della spermatogenesi, come già evidenziato nei mammiferi (Romanelli et al., 1997; Rossato et al., 1997; El-Gehani et al., 2000); infatti sono marcate le cellule germinali e le cellule di Sertoli in cui è stata dimostrata una rilevante attività steroidogenica, e in aggiunta le cellule di Leydig sono caratterizzate dalla presenza del PACAP, del VIP e dei loro recettori, soprattutto quando l'attività steroidogenica è maggiore (Prisco et al., 2002, 2003, 2008). La regolazione della steroidogenesi è attuata principalmente attraverso il legame con i recettori PAC₁ e VPAC₂, ma, nelle cellule di Sertoli delle cisti svuotate, questa può verificarsi anche a seguito del legame con il recettore VPAC₁ (Schema 1).

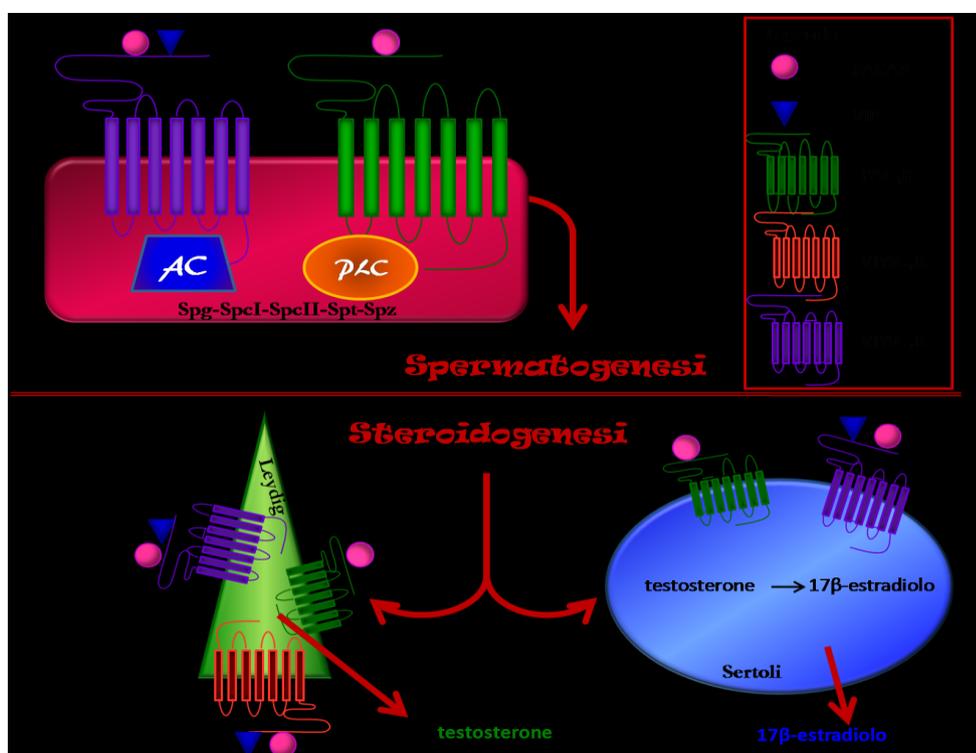


Schema 1: possibile meccanismo di azione del PACAP e del VIP nel testicolo di *Torpedo*.

Per quanto riguarda *Podarcis sicula*, la positività riscontrata a livello delle cellule germinali, sia per il messaggero sia per la proteina del PACAP e del VIP e per i recettori PAC₁ e VPAC₂, è risultata ancora più ampia rispetto a quella evidenziata per *Torpedo marmorata*, essendo in questo caso marcati tutti gli stadi della spermatogenesi, anche se è ben evidente che la marcatura è molto più intensa negli ultimi stadi (spermatidi e spermatozoi). Questo suggerisce quindi che anche in *Podarcis sicula* il PACAP e il VIP siano coinvolti nei meccanismi che controllano la spermatogenesi, essendo tra l'altro marcate anche le cellule di Sertoli, che accompagnano le cellule germinali nel differenziamento. Anche nel caso di *Podarcis sicula* è presente un'intensa marcatura anche a livello delle cellule di Leydig, suggerendo quindi ancora una volta un coinvolgimento dei peptidi nei processi steroidogenici. Allo stesso modo di *Torpedo marmorata* e dei mammiferi (Shivers et al., 1991), il recettore VPAC₁ risulta scarsamente rappresentato nel testicolo di *Podarcis sicula*, suggerendo quindi che le funzioni testicolari di questi peptidi non siano mediate dall'intervento di questo recettore. In sintesi, nel testicolo di *Podarcis sicula*, la regolazione della spermatogenesi da parte degli elementi del sistema PACAP/VIP/recettori è attuata attraverso il

legame del PACAP e del VIP ai recettori VPAC₂ e attraverso il legame del PACAP al recettore PAC₁. La regolazione della steroidogenesi vede invece anche la partecipazione del recettore VPAC₁, dal momento che tale recettore è presente esclusivamente nelle cellule di Leydig (Schema 2).

Il coinvolgimento di questi peptidi nella steroidogenesi di *Podarcis sicula* è stato ampiamente dimostrato dalle colture d'organo, che hanno evidenziato un aumento nei livelli di testosterone e 17 β -estradiolo tempo- e dose-dipendente a seguito del trattamento con tutti e tre i peptidi, PACAP27, PACAP38 e VIP (Schema 2). Tuttavia, emerge chiaramente anche che il PACAP38 induce un aumento nei livelli di testosterone maggiore di quello indotto dal PACAP27 e dal VIP e che il VIP induce invece un incremento nei livelli di 17 β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP27 e dal PACAP38. In questa ottica, il PACAP27 sembrerebbe avere un effetto marginale sugli effetti indotti sulla steroidogenesi; d'altra parte nei mammiferi, tra le due forme di PACAP, il PACAP27 è sempre la forma meno rappresentata (Vaudry et al., 2000).



Schema 2: possibile meccanismo di azione del PACAP e del VIP nel testicolo di *Podarcis*.

I dati ottenuti da questi esperimenti dimostrano dunque innanzitutto che le sequenze di questi peptidi sono conservate nei modelli sperimentali da me scelti e che gli elementi del sistema PACAP/VIP/recettori sono ampiamente rappresentati nel testicolo di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula*. Il confronto tra due organismi con un'organizzazione testicolare completamente diversa ha dato dei risultati raffrontabili, anche se la presenza dei neuropeptidi e dei recettori è risultata più circoscritta in *Torpedo* (testicolo cistico) rispetto a *Podarcis* (testicolo tubulare), ma comunque diversa da quella riscontrata nei mammiferi. Nonostante ciò le ipotesi che possono essere fatte circa le funzioni di questi due neuropeptidi sono risultate molto simili; infatti, in entrambi i casi i peptidi sono coinvolti probabilmente nel controllo della spermatogenesi e della steroidogenesi. Per quanto riguarda questo secondo aspetto, infatti, significativi sono i dati ottenuti dalle colture di testicolo di *Podarcis sicula*, che supportano l'iniziale ipotesi che PACAP e VIP agiscano sulla steroidogenesi, dal momento che le colture hanno dimostrato appunto l'esistenza di una stimolazione dose- e tempo- dipendente sia del testosterone sia del 17β -estradiolo. Non è stato purtroppo possibile allestire colture anche su testicoli di *Torpedo marmorata*, data l'impossibilità di disporre di animali durante il terzo anno di dottorato; tuttavia, la localizzazione del PACAP, del VIP e dei loro recettori nelle cellule somatiche e germinali in cui è stata dimostrata un'attività steroidogenica più rilevante (Prisco et al., 2002, 2003, 2008), permette di ipotizzare che anche in *Torpedo marmorata* il PACAP e il VIP sono coinvolti nella regolazione della produzione di testosterone e conseguentemente dell'andamento generale della spermatogenesi. La presenza tanto dei peptidi quanto dei recettori all'interno del testicolo di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula* permette di ipotizzare che questi neuropeptidi possano svolgere le proprie funzioni nel testicolo intervenendo con un meccanismo di tipo autocrino, dato che le stesse cellule che sono positive per PACAP e VIP lo sono anche per i recettori, o di tipo paracrino, per cui le cellule presenti nel testicolo potrebbero comunicare tra di loro usando questi peptidi come segnale.

In conclusione, il PACAP e il VIP sono due neuropeptidi che possono essere annoverati tra quei fattori prodotti localmente a livello testicolare, che partecipano alla fine regolazione di processi quali la spermatogenesi e la steroidogenesi. I dati a disposizione suggeriscono fortemente che questi peptidi contribuiscono a creare un network di comunicazione intratesticolare finemente intrecciato per garantire il corretto andamento di spermatogenesi e steroidogenesi.

TAVOLE

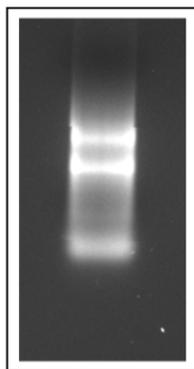


Figura 1: RNA di testicolo di *Torpedo marmorata*: corsa su gel di agarosio all'1% dell'RNA estratto da testicolo di *Torpedo marmorata*.

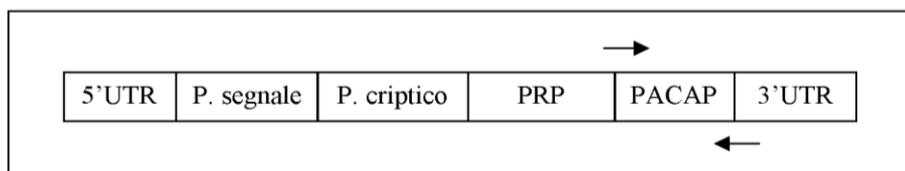


Figura 2: schema dei primer utilizzati per le PCR per il *PACAP* di *Torpedo marmorata* e di *Podarcis sicula*: l'utilizzo di questi primer permette di amplificare la regione codificante il PACAP.

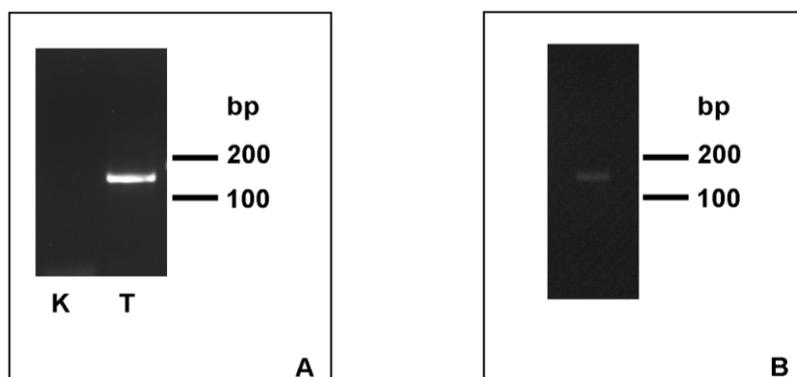


Figura 3: PCR (A) ed eluizione (B) per il *PACAP* in *Torpedo marmorata*. A: corsa su gel di agarosio al 2% della PCR per il *PACAP* condotta su cDNA di testicolo di *Torpedo marmorata* (T) e senza cDNA (K); i primer amplificano un frammento di circa 150 bp (T), mentre nel bianco non sono presenti bande (K). B: corsa su gel di agarosio 2% del prodotto dell'eluizione; è presente una banda della lunghezza attesa (150 bp).

```

cattccgatggcatccttcaactgacagctacagccgttacaggaaacagatggctgtcaag
H S D G I F T D S Y S R Y R K Q M A V K
aaatacctggcagctgtccttggggaaaaggtataaacaagggttaaaaataaggacgc
K Y L A A V L G K R Y K Q R V K N K G R
cgactcgcctat
R L A Y

```

Figura 4: sequenza del *PACAP* di *Torpedo marmorata* nucleotidica e aminoacidica dedotta (ExpASy: <http://www.expasy.ch/>).

#Homo	cac tcg gac ggg atc ttc acg gac agc tac agc cgc tac cgg aaa	caa atg gct gtc aag aaa tac ttg gcg gcc gtc
#Rattuscatattttg
#Musca .ttat
#Boscttttt
#Caniscttttt
#Oviscttttt
#Anascttttt
#Galluscttttt
#Podarcis	.tttttatttta
#Xenopus_laevisa .t .acta .atttta .a
#Xenopus_tropicalis	.t .a .t .ccttatttta .a
#Ranaa .t .ctttatttta .a
#Danio	.ttcttagcgta .a
#Oncorhynchusttata .gaatca .a
#Sparuscttttagggta .a
#Takifugu	.t .t .t .cctt .a .a .gcg .ccat
#Protopterust .cctt .aagggta .a
#Torpedo	.t .c .t .cttttagggtca .t ...
#Tunicate1tttttca .a .g
#Tunicate2ttttta .a aaca .c .g
#Homo	cta ggg aag agg tat aaa caa agg gtt aaa aac aaa gga cgc cga	ata gct tat
#Rattusaggttg .cttttg .c
#Musaggtta .ctttta .c
#Bosattttgttttg
#Canisattttatttta
#Ovisattttgttttg
#Anasattttgttttg
#Gallusattttagggta .g
#Podarcisattttatttta .g
#Xenopus_laevisacg .a .attagggta .a
#Xenopus_tropicalisattttg .a .agggta .a
#Ranaatata .a
#Danioatagggta .a
#Oncorhynchusatata .a
#Sparusatagggta .a
#Takifugua .gc .gg .attata .a
#Protopterusatagggta .a
#Torpedo	.t .gatgggtta .a
#Tunicate1tta .a .g
#Tunicate2tta .a aaca .c .g

Figura 5: allineamento della sequenza nucleotidica del *P4-CAP* di *Torpedo morata* (evidenziata in giallo) con quella di altri vertebrati e dei tunicati.

Siti Conservati	Siti Variabili	Siti Parsimony Informative	Siti Singletton	Siti 0-volte degenerati	Siti 2-volte degenerati	Siti 4-volte degenerati
76/132	63/132	49/132	14/132	76/132	26/132	10/132
57.6%	42.4%	31.8%	10.6%	57.6%	20.4%	8.3%

Tabella 1: Analisi della sequenza del *PACAP* di *Torpedo marmorata* a confronto con quella dei vertebrati e dei tunicati.

Tabella 2: distanze filogenetiche tra il *PACAP* di *Torpedo* e quello di vertebrati e tunicati. Z-test: è mostrata la *P* alla quale rigettare l' H_0 (selezione neutrale, $d_N=d_S$) a favore dell'HA (selezione purificante, $d_N<d_S$); i valori di $P<0.05$ sono considerati significativi. Test F-Fisher: è mostrata la *P* alla quale rigettare l' H_0 di stretta neutralità a favore dell'HA di selezione positiva; se le sostituzioni sinonime per sito sinonimo eccedono le sostituzioni non-sinonime per sito non-sinonimo, MEGA setta $P=1$ per indicare la presenza di una selezione purificante. n/c: non è possibile stimare la distanza.

Genere	d_N	d_S	d_N/d_S	d_{4f}	d_{0f}	Z-test	Fisher
<i>Homo</i>	0	0.8482	0	1.1893	0	0.0418	1.000
<i>Rattus</i>	0	1.0958	0	1.718	0	0.0227	1.000
<i>Mus</i>	0	1.0958	0	1.718	0	0.0219	1.000
<i>Bos</i>	0	0.64	0	0.9327	0	0.0332	1.000
<i>Canis</i>	0	0.4614	0	0.6454	0	0.0386	1.000
<i>Ovis</i>	0	0.5644	0	0.7438	0	0.0432	1.000
<i>Anas</i>	0.0387	0.6881	0.05624	0.9882	0.0473	0.0385	1.000
<i>Gallus</i>	0.0271	0.6881	0.03938	0.9882	0.0309	0.0374	1.000
<i>Podarcis</i>	0	0.7592	0	0.6969	0	0.0335	1.000
<i>Xenopus l</i>	0	0.8602	0	0.6881	0	0.0340	1.000
<i>Xenopus t</i>	0	0.5981	0	0.5423	0	0.0190	1.000
<i>Rana</i>	0	0.3962	0	0.2668	0	0.0127	1.000
<i>Danio</i>	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	1.000
<i>Oncorhynchus</i>	0.0281	1.1331	0.02479	1.2196	0.0224	0.0370	1.000
<i>Sparus</i>	0.0281	0.9538	0.02946	0.9678	0.0224	0.0386	1.000
<i>Takifugu</i>	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	1.000
<i>Protopterus</i>	0.0149	0.748	0.01992	0.48	0.0149	0.0207	1.000
<i>Tunicate1</i>	0.0178	0.5794	0.03072	0.7158	0.0063	0.0217	1.000
<i>Tunicate2</i>	0.0473	0.6086	0.07771	0.7151	0.0343	0.0058	1.000

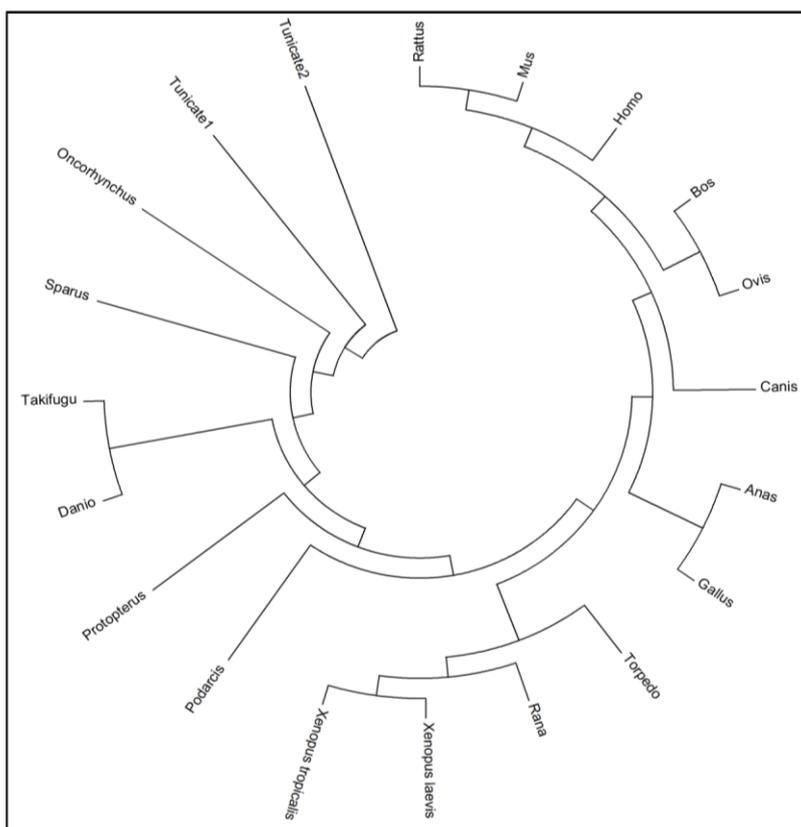


Figura 6: Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche del *PACAP*. L'albero è stato costruito utilizzando il software MEGA 4.0 con il metodo della Massima Parsimonia usando la parte della sequenza nucleotidica che codifica il *PACAP*.

#Mus	HSDGIFTDSY	SRYRQMAVK	KYLAAVLGKR	YKQRVKNKGR	RIAY
#Homo
#BosP.
#Rattus
#OvisP.
#Sus
#Oryctolagus	----
#Gallus	.I.....V..
#Anas	.I.....V..
#PodarcisR....	.V..
#XenopusI....	.V..
#RanaI....	.V..
#UranoscopusQR.	.R...R.--	----
#TakifuguR..IR....	.M..
#SparusR..IR....	.L..
#ProtopterusR.....	.LS.
#CtenopharyngodonI.R.	.R..I....	.F..
#Danio	...V.....T....	.R..YRS...	.L..
#TrachurusR..IR.--	----
#OncorhynchusR..YRS...	.L..
#AcipenserR...R.--	----
#GadusH.....R.	.R...R....	.L..
#DasyatisPK...S--	----
#TorpedoL..
#Tunicate1N.....	----
#Tunicate2N.....	..IN.L....	----

Figura 7: allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del PACAP di *Torpedo marmorata* (evidenziata in giallo) con le sequenze aminoacidiche del PACAP di altri vertebrati e dei tunicati.

Siti Conservati	Siti Variabili	Siti Parsimony Informative	Siti Singleton
24/44	20/44	9/44	11/44
54.5%	45.5%	20.4%	25%

Tabella 3: Analisi della sequenza aminoacidica dedotta del PACAP di *Torpedo marmorata* a confronto con quella dei vertebrati e dei tunicati.

Genere	Distanza
<i>Homo</i>	0.000001
<i>Rattus</i>	0.000001
<i>Mus</i>	0.000001
<i>Bos</i>	0.000001
<i>Sus</i>	0.000001
<i>Ovis</i>	0.000001
<i>Oryctolagus</i>	0.000001
<i>Anas</i>	0,032973
<i>Gallus</i>	0,032973
<i>Podarcis</i>	0.000001
<i>Xenopus</i>	0.000001
<i>Rana</i>	0.000001
<i>Uranoscopus</i>	0.092686
<i>Takifugu</i>	0.030405
<i>Sparus</i>	0.030405
<i>Protopterus</i>	0.030405
<i>Ctenopharyngodon</i>	0,099546
<i>Danio</i>	0,093713
<i>Trachurus</i>	0.030405
<i>Oncorhynchus</i>	0.030405
<i>Acipenser</i>	0,030405
<i>Gadus</i>	0,092250
<i>Dasyatis</i>	0.062395
<i>Tunicati1</i>	0.030110
<i>Tunicati2</i>	0.129172

A

	Distanza con <i>Torpedo</i>
Mammiferi	0.000001
Uccelli	0.032973
Rettili	0.000001
Anfibi	0.000001
Teleostei	0.056060
Elasmobranchi	0.062395
Tunicati	0.079641

B

Tabella 4: parametri che indicano le distanze tra la sequenza aminoacidica del PACAP di *Torpedo marmorata* e quella di altri vertebrati e dei tunicati (A) o degli stessi organismi raggruppati per classi (B), calcolati usando il metodo Dayoff Matrix.

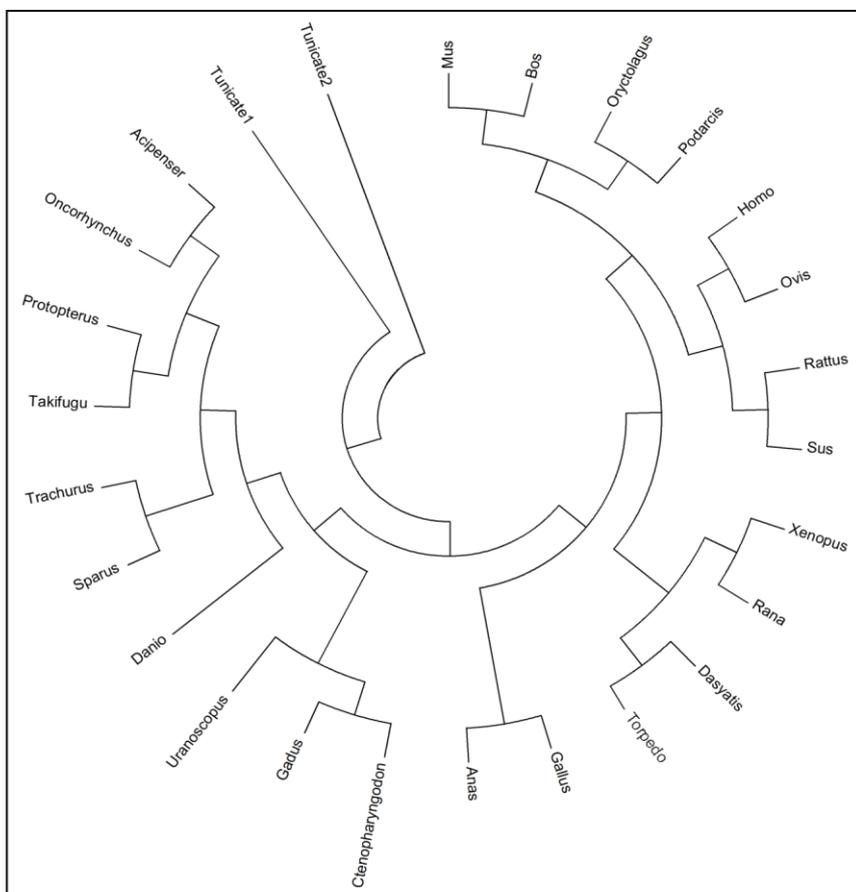


Figura 8: albero filogenetico sulle sequenze aminoacidiche del PACAP. L'albero è stato costruito utilizzando il software MEGA 4.0 con il metodo della Massima Parsimonia.

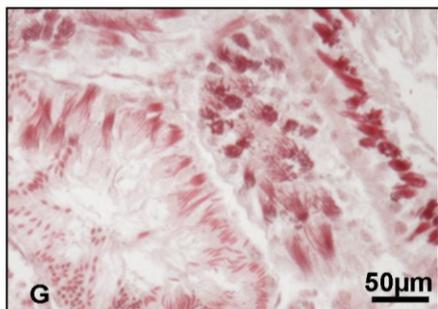
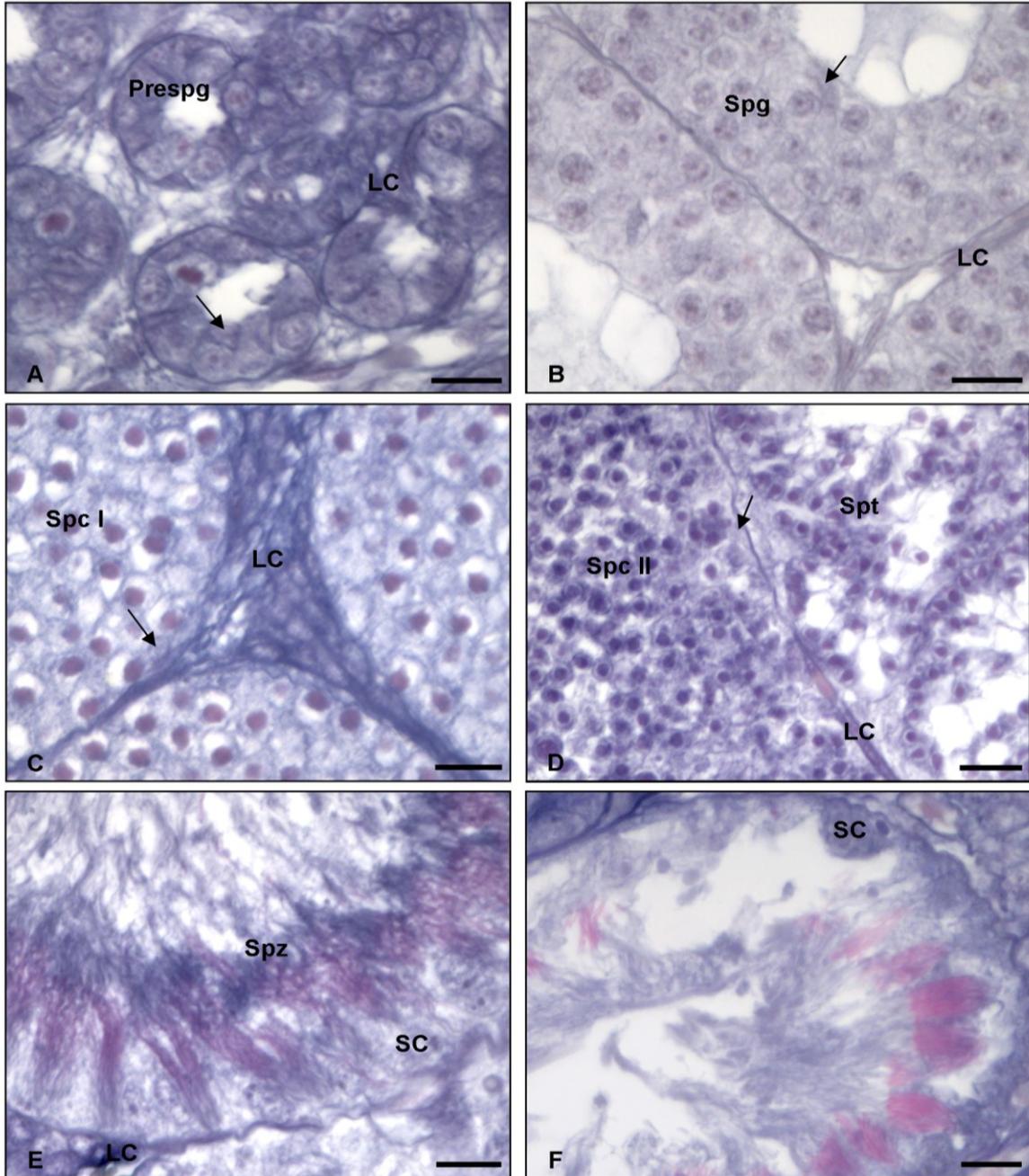
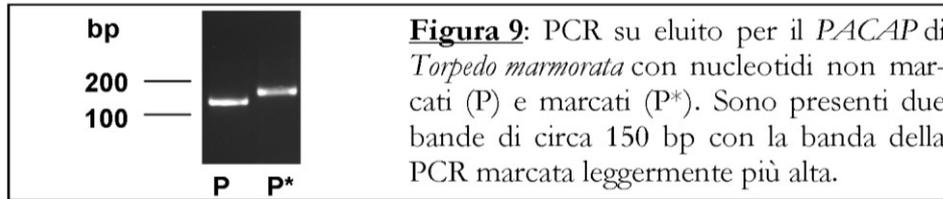


Figura 10: ibridazione *in situ* su sezioni di testicolo di *Torpedo marmorata* con sonda a cDNA per il *PACAP*: sono marcati i prespermatogoni (Prespg, A), gli spermatociti II (SpcII, D), gli spermatidi (Spt, D), gli spermatozoi (Spz, E), le cellule di Sertoli (SC o frecce) delle cisti a prespg e svuotate (A, F) e le cellule di Leydig (LC) presenti tra queste cisti (A, C-E); non sono marcati gli spermatogoni (Spg, B) e gli spermatociti I (SpcI, C), né i controlli (G). Dove non indicato, le barre corrispondono a 20 µm.

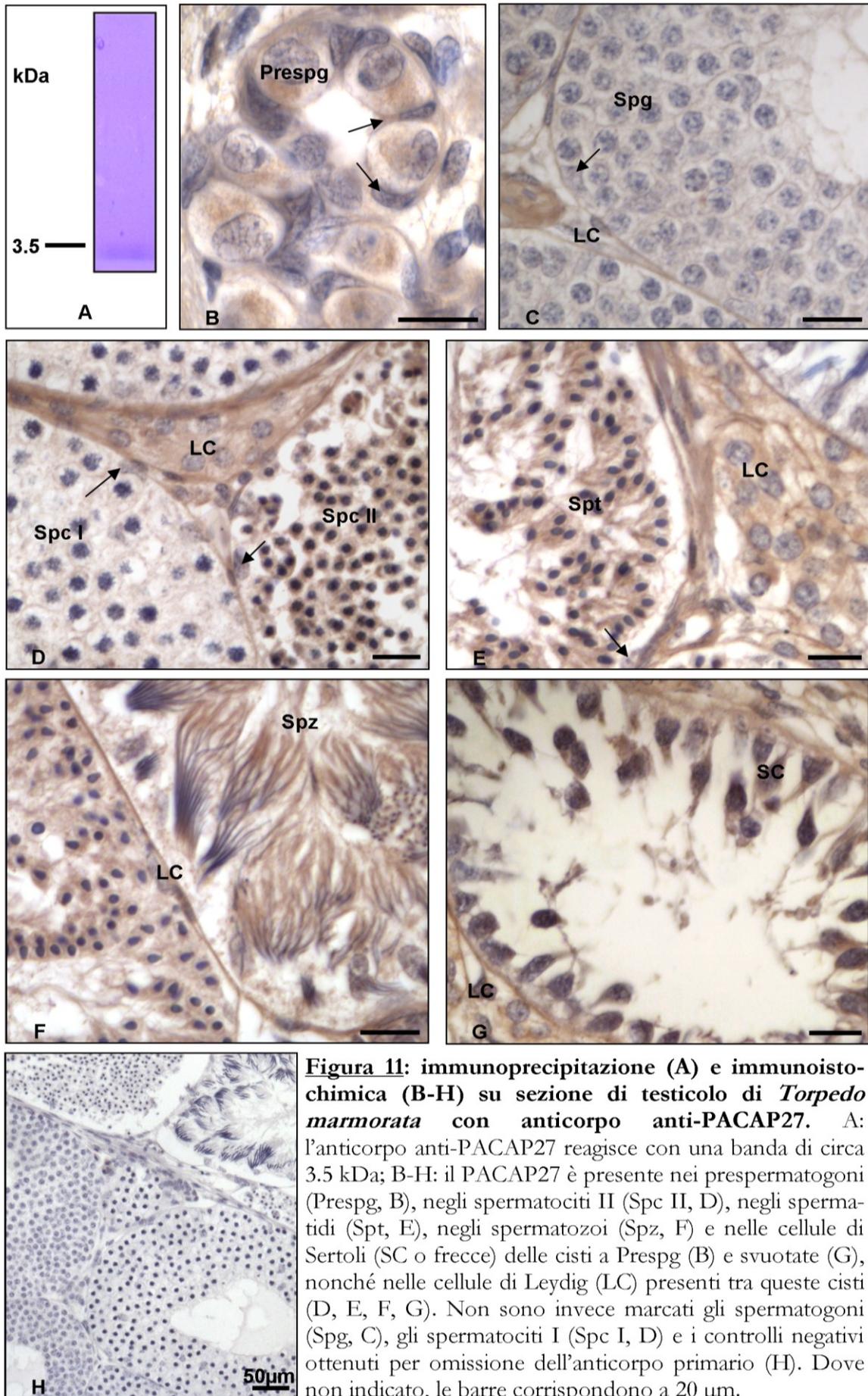


Figura 11: immunoprecipitazione (A) e immunoistochimica (B-H) su sezione di testicolo di *Torpedo marmorata* con anticorpo anti-PACAP27. A: l'anticorpo anti-PACAP27 reagisce con una banda di circa 3.5 kDa; B-H: il PACAP27 è presente nei prespermatogoni (Prespg, B), negli spermatociti II (Spc II, D), negli spermatidi (Spt, E), negli spermatozoi (Spz, F) e nelle cellule di Sertoli (SC o frecce) delle cisti a Prespg (B) e svuotate (G), nonché nelle cellule di Leydig (LC) presenti tra queste cisti (D, E, F, G). Non sono invece marcati gli spermatogoni (Spg, C), gli spermatociti I (Spc I, D) e i controlli negativi ottenuti per omissione dell'anticorpo primario (H). Dove non indicato, le barre corrispondono a 20 μm.

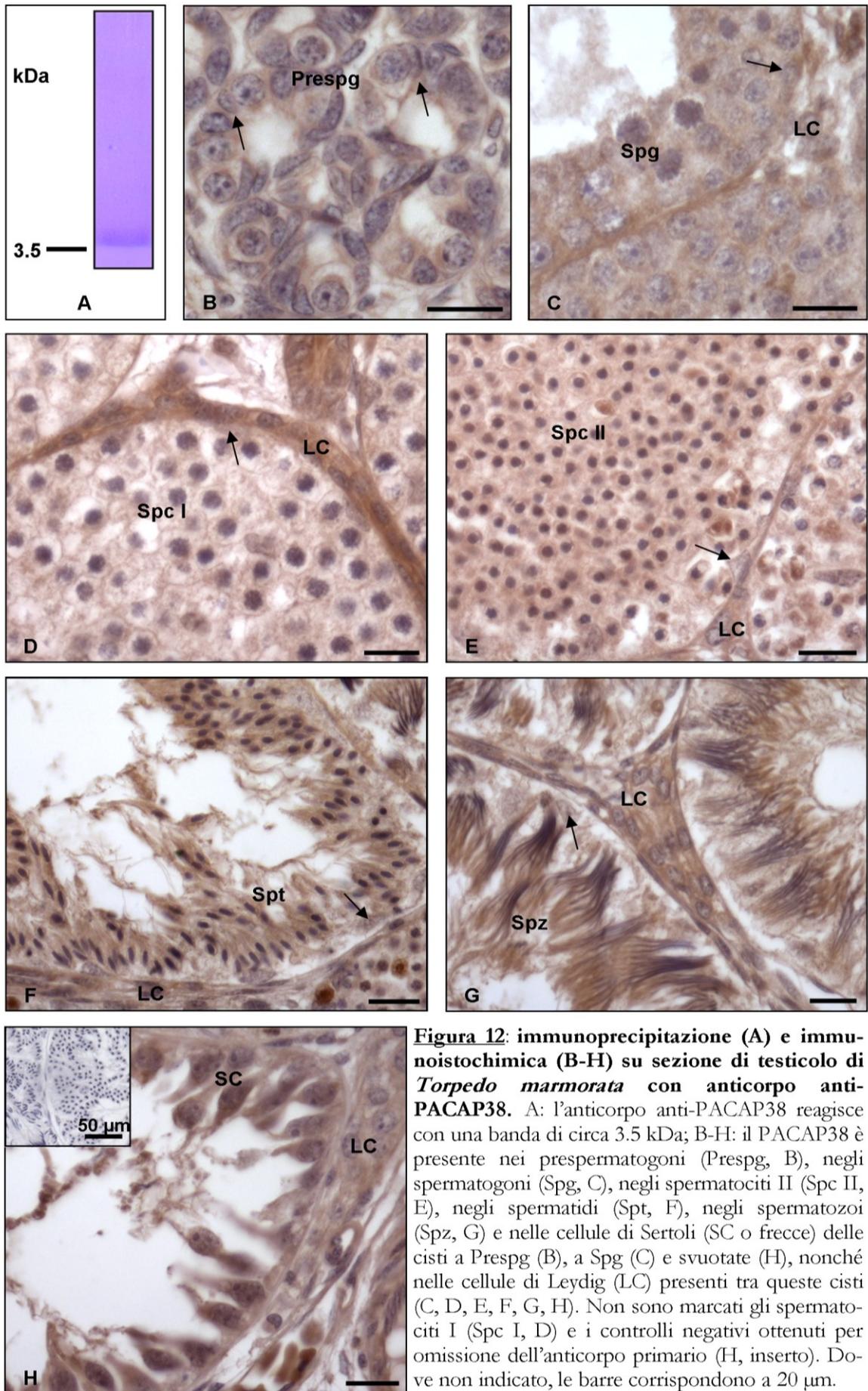


Figura 12: immunoprecipitazione (A) e immunohistochimica (B-H) su sezione di testicolo di *Torpedo marmorata* con anticorpo anti-PACAP38. A: l'anticorpo anti-PACAP38 reagisce con una banda di circa 3.5 kDa; B-H: il PACAP38 è presente nei prespermatogoni (Prespg, B), negli spermatogoni (Spg, C), negli spermatociti II (Spc II, E), negli spermatidi (Spt, F), negli spermatozoi (Spz, G) e nelle cellule di Sertoli (SC o frecce) delle cisti a Prespg (B), a Spg (C) e svuotate (H), nonché nelle cellule di Leydig (LC) presenti tra queste cisti (C, D, E, F, G, H). Non sono marcati gli spermatociti I (Spc I, D) e i controlli negativi ottenuti per omissione dell'anticorpo primario (H, inserto). Dove non indicato, le barre corrispondono a 20 µm.

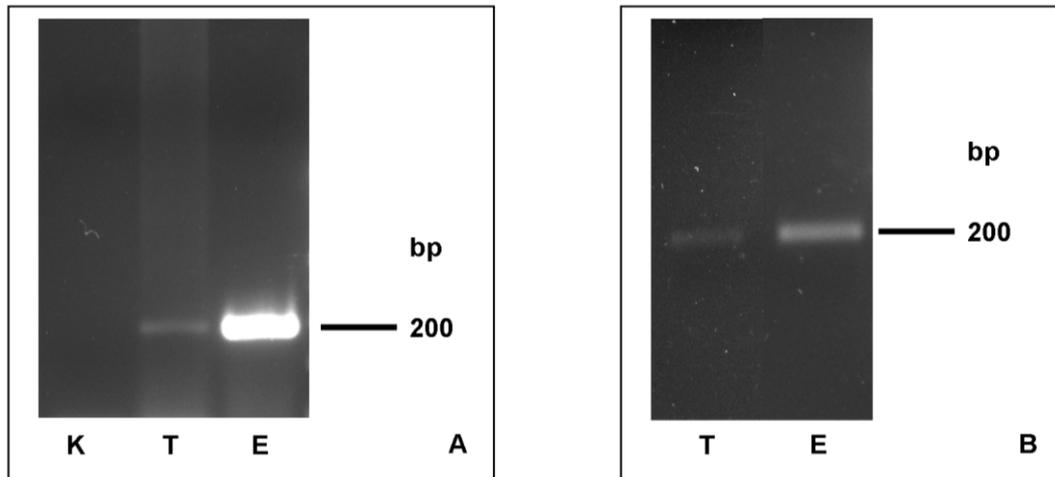
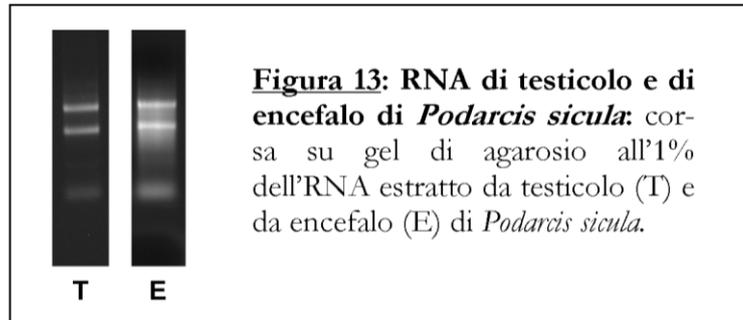


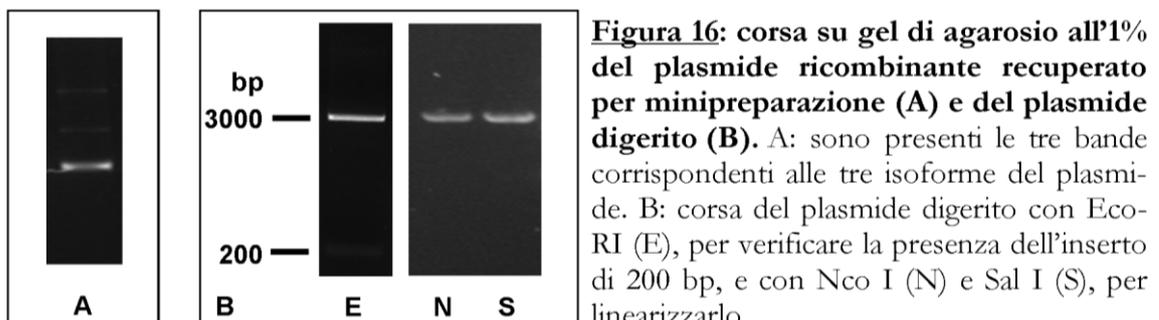
Figura 14: PCR (A) ed eluizione (B) per il PACAP di *Podarcis sicula*. A: corsa su gel di agarosio al 2% della PCR per il PACAP condotta su cDNA di testicolo (T) e di encefalo (E) di *Podarcis sicula* e senza cDNA (K); sia nel testicolo sia nell'encefalo è presente una banda di circa 200 bp, mentre nel controllo non è presente alcuna banda. B: corsa su gel di agarosio al 2% del prodotto dell'eluizione delle PCR condotte su cDNA di testicolo (T) e di encefalo (E); in entrambi i casi è presente la banda attesa di circa 200 bp.

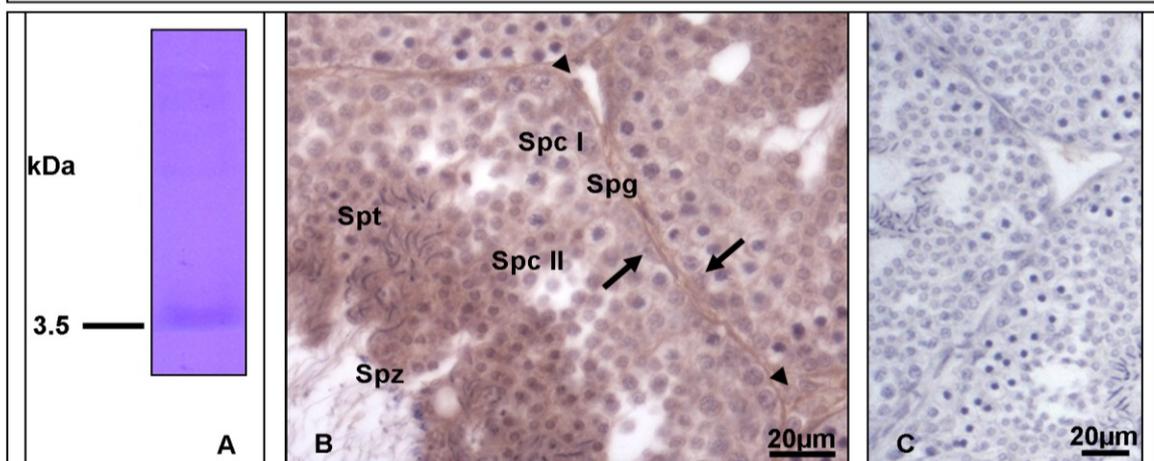
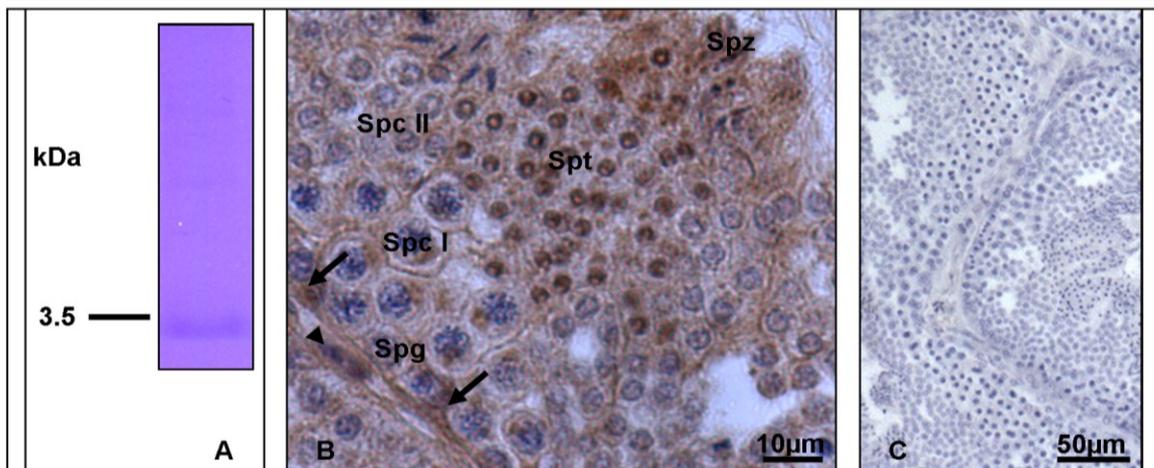
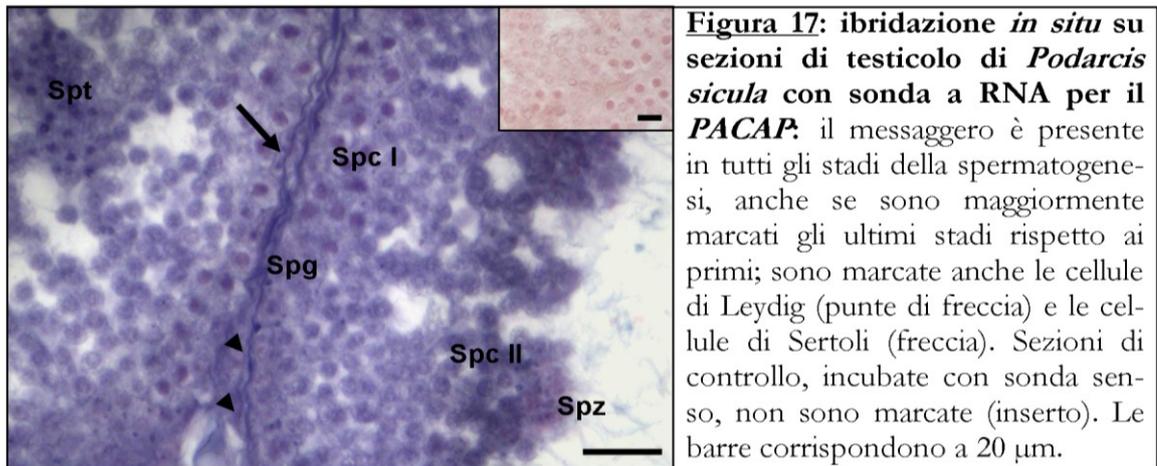
```

cattcggatgggatcttcacggatagctacagccgctaccgaaaacaatggctgtcaag
H S D G I F T D S Y S R Y R K Q M A V K
aaatacttggcagcagtcctggggaaaaggtataaacaagagttagaacaaggacgc
K Y L A A V L G K R Y K Q R V R N K G R
cgagtagcctattttag
R V A Y L -

```

Figura 15: sequenza del PACAP di *Podarcis sicula* nucleotidica e aminoacidica dedotta (ExpPASy: <http://www.expasy.ch/>): la sequenza ottenuta da cDNA di testicolo è uguale a quella ottenuta da cDNA di encefalo (gi | 89393397: Valiante et al., 2007).





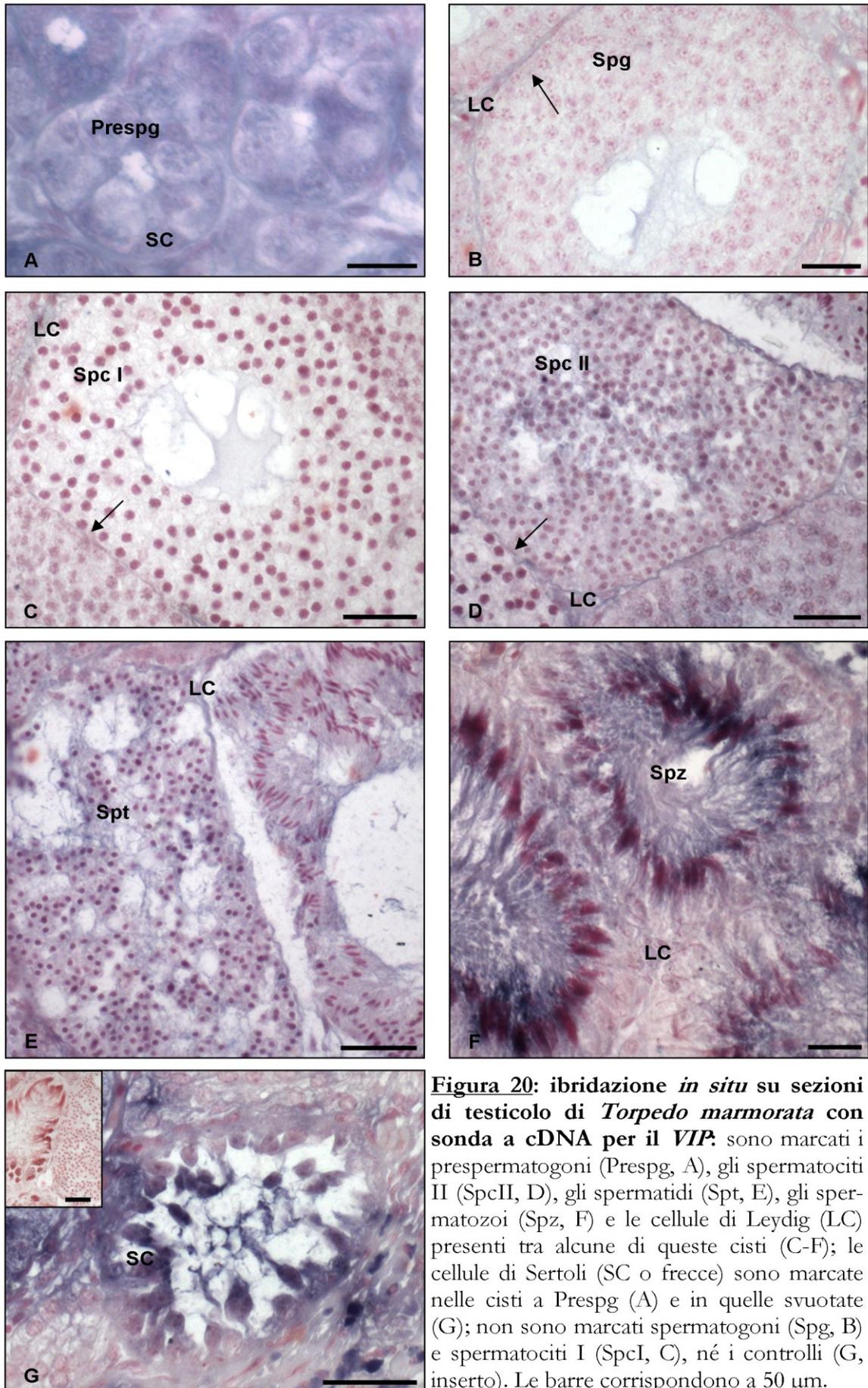


Figura 20: ibridazione *in situ* su sezioni di testicolo di *Torpedo marmorata* con sonda a cDNA per il VIP: sono marcati i prespermatogoni (Prespg, A), gli spermatociti II (SpcII, D), gli spermatidi (Spt, E), gli spermatozoi (Spz, F) e le cellule di Leydig (LC) presenti tra alcune di queste cisti (C-F); le cellule di Sertoli (SC o frecce) sono marcate nelle cisti a Prespg (A) e in quelle svuotate (G); non sono marcati spermatogoni (Spg, B) e spermatociti I (SpcI, C), né i controlli (G, inserto). Le barre corrispondono a 50 μ m.

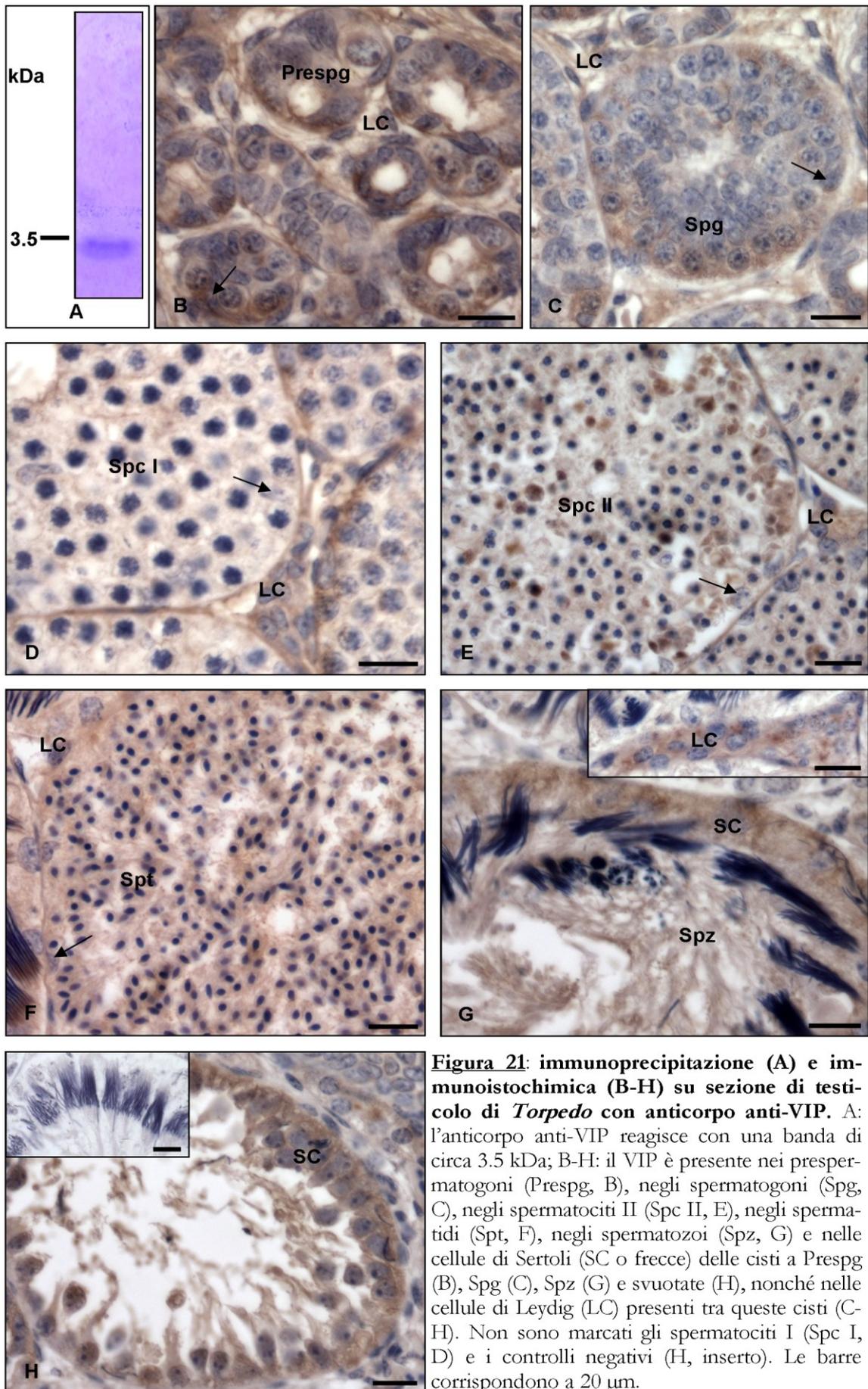


Figura 21: immunoprecipitazione (A) e immunoistochimica (B-H) su sezione di testicolo di *Torpedo* con anticorpo anti-VIP. A: l'anticorpo anti-VIP reagisce con una banda di circa 3.5 kDa; B-H: il VIP è presente nei prespermatogoni (Prespg, B), negli spermatogoni (Spg, C), negli spermatociti II (Spc II, E), negli spermatidi (Spt, F), negli spermatozoi (Spz, G) e nelle cellule di Sertoli (SC o frecce) delle cisti a Prespg (B), Spg (C), Spz (G) e svuotate (H), nonché nelle cellule di Leydig (LC) presenti tra queste cisti (C-H). Non sono marcati gli spermatociti I (Spc I, D) e i controlli negativi (H, inserto). Le barre corrispondono a 20 μm.

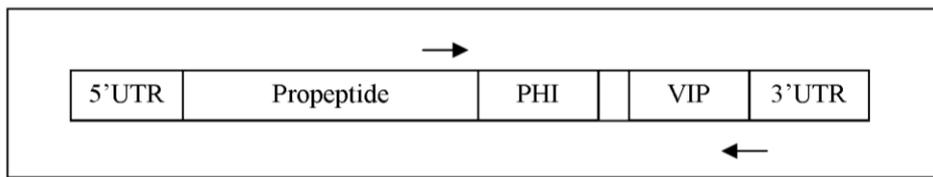


Figura 22: schema dei primer utilizzati per le PCR per il VIP di *Podarcis sicula*: l'utilizzo di questi primer, disegnati sulla sequenza di *Anolis carolinensis*, permette di amplificare parte della regione codificante il propeptide e la regione codificante il PHI e il VIP.

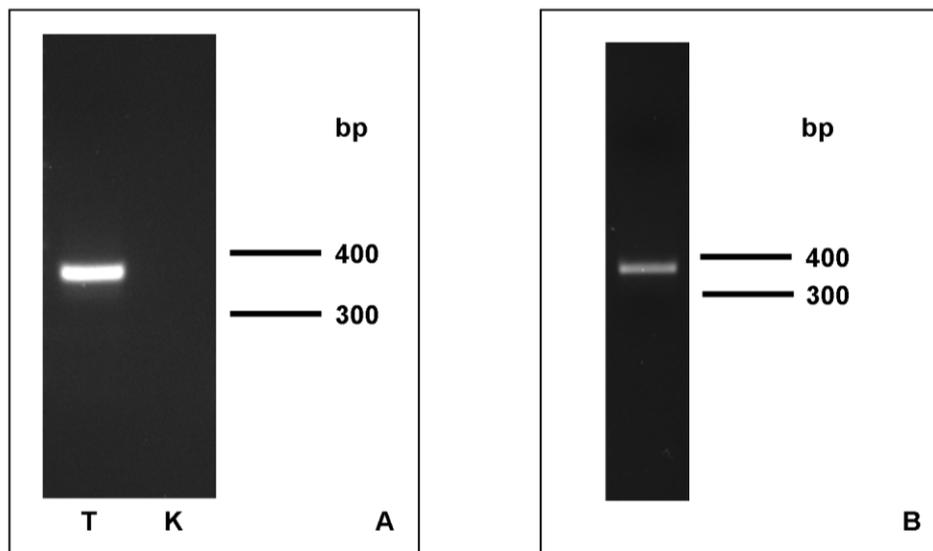


Figura 23: PCR (A) ed eluizione (B) per il VIP di *Podarcis sicula*. A: corsa su gel di agarosio all'1.8% della PCR per il VIP condotta su cDNA di testicolo di *Podarcis sicula* (T) e senza cDNA (K): è presente una banda di poco meno di 400 bp, mentre nel controllo non è presente alcuna banda. B: corsa su gel di agarosio all'1.8% del prodotto dell'eluizione: è presente la banda attesa di circa 400 bp.

```

aaatctgaggctgacatthttgcaaaactacactacctgagaatgacaagttctattatgat
K S E A D I L Q T T L P E N D K F Y Y D
gtgtacagagctatggataggaacacaagacatgccgatggactcttcacaagcggctac
V Y R A M D R N T R H A D G L F T S G Y
agcaaaacttctgggtcaaatttcggcaagaaaatatttggaaatcgcttataggaaaaaga
S K L L G Q I S A R K Y L E S L I G K R
gttggaaataaacactccccttgatgaacagacaccgccagtcaaacgccattcagatgct
V G N N T P L D E Q T P P V K R H S D A
gtctttactgacaactacagtcgcttttcgaaagcagatggctgtgaagaaatatttgaac
V F T D N Y S R F R K Q M A V K K Y L N
tctgtcttaactga
S V L T

```

Figura 24: Sequenza del PHI/VIP di *Podarcis sicula* nucleotidica e aminoacidica dedotta (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>).

#Homo	CAC	TCA	GAT	GCA	GTC	TTC	ACT	GAC	AAC	TAT	ACC	CGC	CTT	AGA
#RattusTA	..TC
#MusTCA	..TCC	...
#BosTC	..A	C..
#OvisTC	..A	C..
#CanisG	C..
#SusGC	C.C
#GallusTTC	..G	...	T..	C..
#TaenopygiaTTC	..G	...	T..	C..
#Podarcis	..TTTC	..GT	...	T..	C..
#AnolisTTT	..C	..GT	...	T..	C..
#XenopusTT	..GTC	..GT	..A	T..	..G
#Danio	..T	A.AAC	..GT	...	T..	C.C
#OryziasC	..C	A..AC	..G	...	T.C	C.C
#TakifuguC	..C	A..	..T	..AC	..G	...	T.C	C.T
#Homo	AAA	CAA	ATG	GCT	GTA	AAG	AAA	TAT	TTG	AAC	TCA	ATT	CTG	AAT
#Rattus	..GGCCA	...
#Mus	..GGC	C..C	..C
#BosGC	C..A	...
#OvisGCTA	...
#CanisC	C..
#SusCG	..CCA	...
#Gallus	..GGC	..A	G..	T.A	..C
#Taenopygia	..G	..GGC	..A	G..	T.A	..C
#Podarcis	..G	..GGT	G.C	T.A	..C
#Anolis	..G	..GGGT	G.C	T.A	..C
#Xenopus	..GCT	..T	G.C	T..	..C
#Danio	..G	..GG	..G	C..T	G..	..C	..CA	...
#OryziasGA	..CG	..C	C..	G.C	T.A	..CA
#TakifuguGCC	C..G	G.C	T.A	..CA

Figura 26: allineamento della sequenza nucleotidica del *VIP* di *Podarcis sicula* (evidenziata in verde) con quella di altri vertebrati.

Siti Conservati	Siti Variabili	Siti Parsimony Informative	Siti Singleton	Siti 0-volte degenerati	Siti 2-volte degenerati	Siti 4-volte degenerati
50/84	34/84	31/84	3/84	53/84	13/84	7/84
59.5%	40.5%	36.9%	3.6%	63.1%	15.5%	8.3%

Tabella 5: analisi della sequenza del *VIP* di *Podarcis sicula* a confronto con quella degli altri vertebrati.

Genere	d_N	d_S	d_N/d_S	d_{4f}	d_{0f}	Z-test	Fisher
<i>Homo</i>	0.06699	0.97786	0.068507	0.75646	0.07701	0.03813	1.000
<i>Rattus</i>	0.06699	1.05092	0.063744	0.83084	0.07701	0.03989	1.000
<i>Mus</i>	0.06719	1.37543	0.04885	1.06938	0.07701	0.01544	1.000
<i>Bos</i>	0.07453	0.72742	0.102458	0.17094	0.07701	0.03322	1.000
<i>Ovis</i>	0.07428	0.70171	0.105856	0.17863	0.07701	0.04131	1.000
<i>Canis</i>	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	1.000
<i>Sus</i>	0.06717	1.21316	0.055368	0.88068	0.07663	0.02998	1.000
<i>Gallus</i>	0	0.56032	0	0.31559	0	0.03214	1.000
<i>Taenopygia</i>	0	0.48073	0	0.31559	0	0.03369	1.000
<i>Anolis</i>	0	0.26347	0	0.08909	0	0.06598	1.000
<i>Xenopus</i>	0	1.07540	0	0.75719	0	0.03809	1.000
<i>Danio</i>	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	1.000
<i>Oryzias</i>	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	1.000
<i>Takifugu</i>	0.01835	1.34226	0.013671	0.90419	0.01835	0.02644	1.000

Tabella 6: distanze filogenetiche tra il *VIP* di *Podarcis* e quello di altri vertebrati. Z-test: è mostrata la P alla quale rigettare l' H_0 (selezione neutrale, $d_N=d_S$) a favore dell'HA (selezione purificante, $d_N<d_S$); i valori di $P<0.05$ sono considerati significativi. Test F-Fisher: è mostrata la P alla quale rigettare l' H_0 di stretta neutralità a favore dell'HA di selezione positiva; se le sostituzioni sinonime per sito sinonimo eccedono le sostituzioni non-sinonime per sito non-sinonimo, MEGA setta $P=1$ per indicare la presenza di una selezione purificante. n/c: non è possibile stimare la distanza.

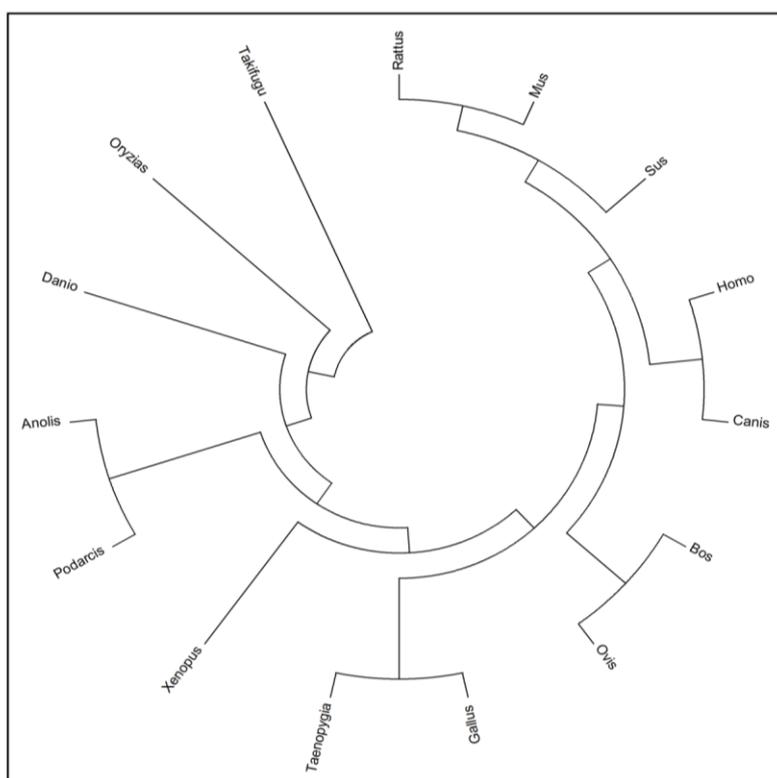
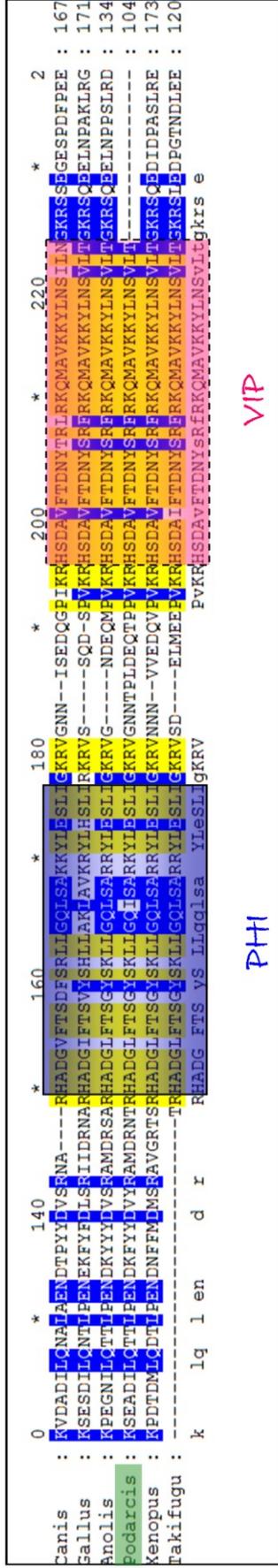


Figura 27: Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche del *VIP*. L'albero è stato costruito utilizzando il software MEGA 4.0 con il metodo della Massima Parsimonia usando la parte della sequenza nucleotidica che codifica il *VIP*.



PHI

VIP

Figura 28: Allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del PHI/VIP di *Podarcis sicula* con quella di altri vertebrati: la sequenza ottenuta corrisponde a parte del propeptide, al PHI, al VIP e alla parte di propeptide tra il PHI e il VIP. È evidente un'elevata identità nella sequenza tra i vari vertebrati riportati, soprattutto nel PHI e nel VIP. In giallo sono riportati i residui conservati tra tutte le specie, mentre in blu sono evidenziati i residui che differiscono solo in una specie.

#Homo	HSDAVFTDNY	TRLRQMAVK	KYILNSILN
#Rattus
#Mus
#Bos
#Ovis
#Canis
#Sus
#Gallus	S.F.....V.T
#Taenopygia	S.F.....V.T
#Podarcis	S.F.....V.T
#Anolis	S.F.....V.T
#Alligator	S.F.....V.T
#Rana	S.F.....V.T
#Xenopus	S.F.....V.T
#Danio	I.....V.T
#Oryzias	I.....V.T
#Takifugu	I.....V.T
#Oncorhynchus	I.....V.T
#Sparus	I.....V.T
#Scyliorhinus	S.I.....I.L.A

Figura 29: allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del VIP di *Podarcis sicula* (evidenziata in verde) con le sequenze aminoacidiche di altri vertebrati.

Siti Conservati	Siti Variabili	Siti Parsimony Informative	Siti Singleton
22/28	6/28	5/28	1/28
78.6%	21.4%	17.6%	3.6%

Tabella 7: Analisi della sequenza aminoacidica dedotta del VIP di *Podarcis sicula* a confronto con quella dei vertebrati.

Genere	Distanza
<i>Homo</i>	0.140801
<i>Rattus</i>	0.140801
<i>Mus</i>	0.140801
<i>Bos</i>	0.140801
<i>Ovis</i>	0.140801
<i>Canis</i>	0.140801
<i>Sus</i>	0.140801
<i>Gallus</i>	0.000001
<i>Taenopygia</i>	0.000001
<i>Anolis</i>	0.000001
<i>Alligator</i>	0.000001
<i>Rana</i>	0.000001
<i>Xenopus</i>	0.000001
<i>Danio</i>	0.033403
<i>Oryzias</i>	0.033403
<i>Takifugu</i>	0.033403
<i>Oncorhynchus</i>	0.033403
<i>Sparus</i>	0.033403
<i>Scyliorhinus</i>	0.139530

A

	Distanza con <i>Podarcis</i>
Mammiferi	0.140801
Uccelli	0.000001
Rettili	0.000001
Anfibi	0.000001
Teleostei	0.033403
Elasmobranchi	0.139530

B

Tabella 8: parametri che indicano le distanze tra la sequenza aminoacidica del VIP di *Podarcis sicula* e quella di altri vertebrati (A) o degli stessi organismi raggruppati per classi (B), calcolati usando il metodo Dayoff Matrix.

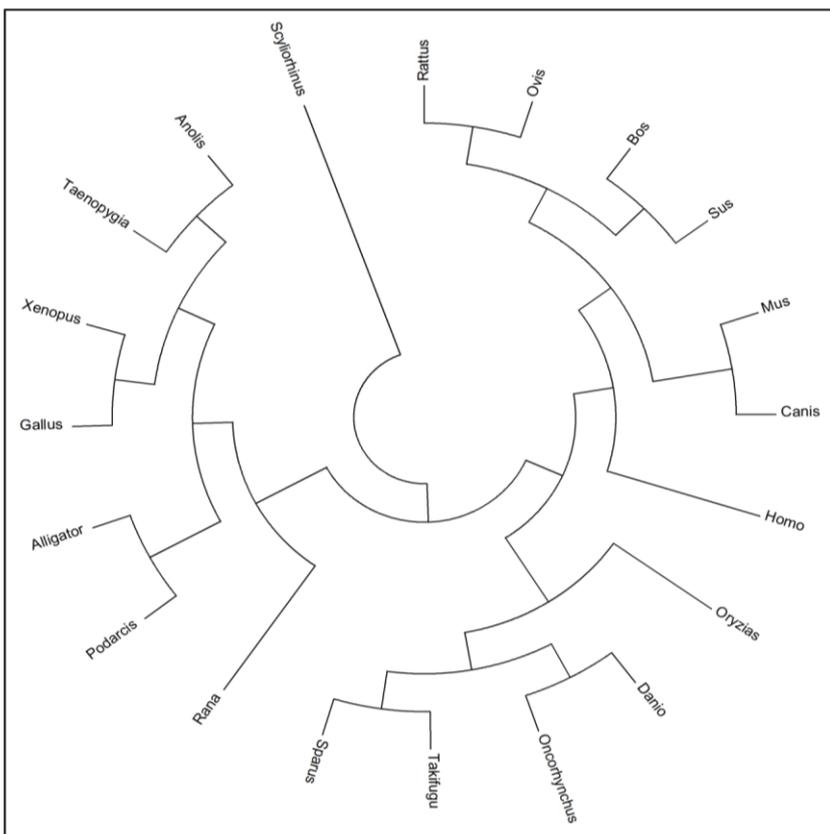


Figura 30: albero filogenetico sulle sequenze aminoacidiche del VIP. L'albero è stato costruito utilizzando il software MEGA 4.0 con il metodo della Massima Parsimonia.

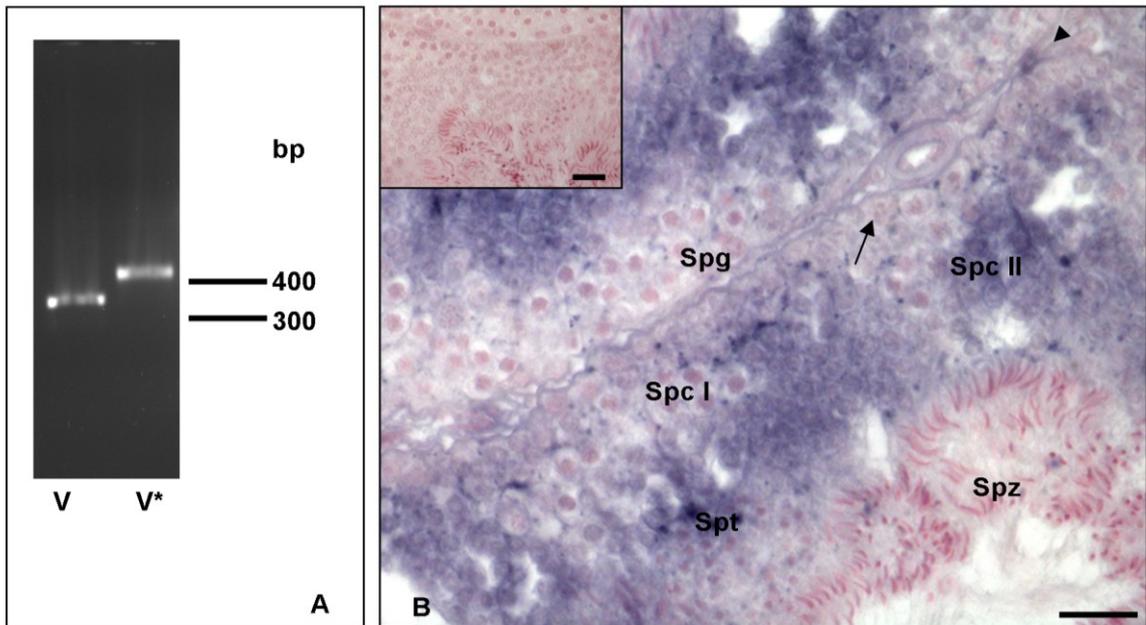


Figura 31: PCR su eluito per produrre la sonda a cDNA per il PHI/VIP (A) e ibridazione *in situ* su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* con sonda a cDNA (B). A: corsa su gel di agarosio all'1.8% della PCR condotta con nucleotidi marcati (V*) e non (V): sono presenti due bande di circa 400 bp, con la banda della PCR con dNTP marcati leggermente più alta. B: il messaggero del PHI/VIP è presente soprattutto negli spermatozoi (Spc II) e negli spermatidi (Spt); sono debolmente marcati anche gli spermatogoni (Spg), gli spermatozoi I (Spc I), le cellule di Leydig (punta di freccia) e di Sertoli (freccia). I controlli non sono marcati (B, inserto). Le barre corrispondono a 20 µm.

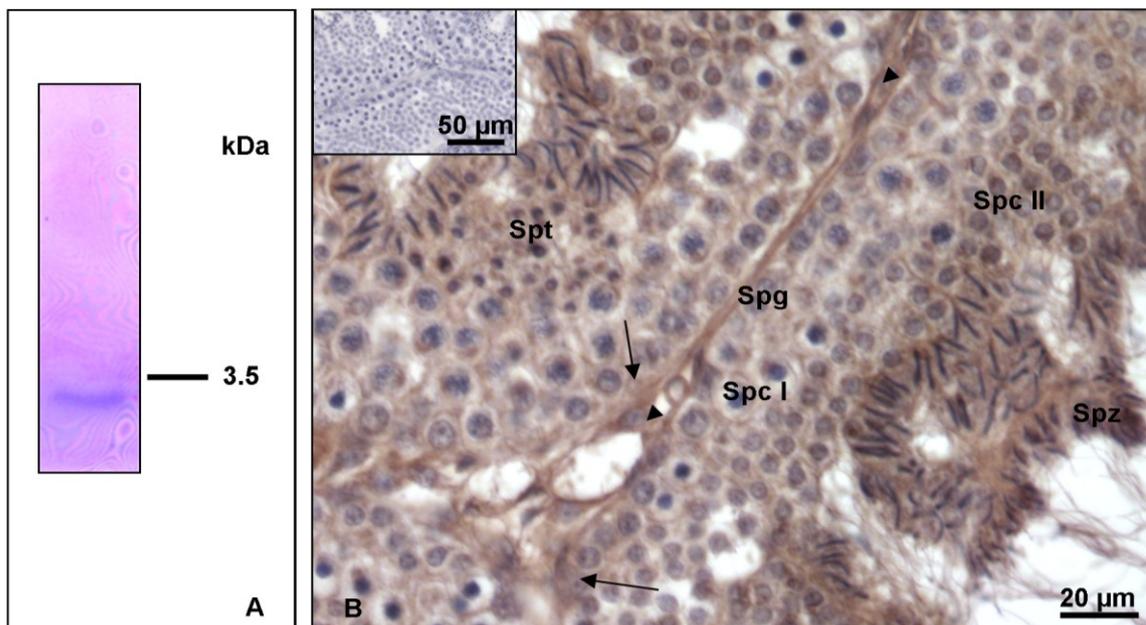


Figura 32: immunoprecipitazione (A) e immunoistochimica (B) su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* con anticorpo anti-VIP. A: l'anticorpo reagisce con una banda al di sotto di 3.5 kDa. B: il VIP è presente in tutti gli stadi della spermatogenesi; sono maggiormente marcati spermatozoi II (Spc II), spermatidi (Spt) e spermatozoi (Spz); sono marcate anche le cellule di Leydig (punta di freccia) e le cellule di Sertoli (freccia). I controlli ottenuti per omissione dell'anticorpo primario non sono marcati (B, inserto).

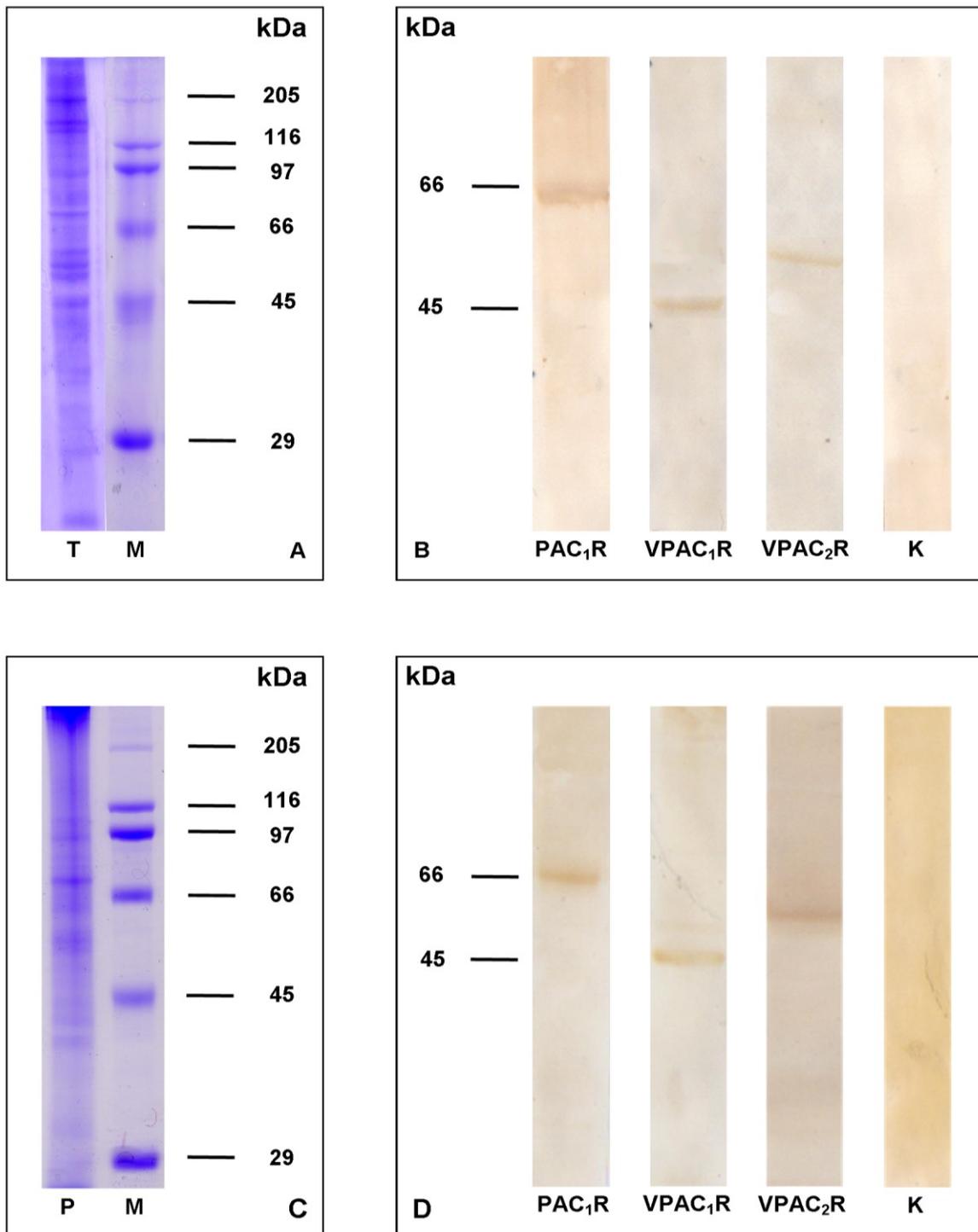


Figura 33: SDS-PAGE al 10% (A e C) e Western blotting (B e D) per i recettori del PACAP e del VIP in *Torpedo marmorata* (A e B) e *Podarcis sicula* (C e D). A e C: SDS-PAGE di proteine estratte da testicolo di *Torpedo* (A: lane T) e di *Podarcis* (C: lane P), con markers di peso molecolare (A e C: lane M). B e D: sia in *Torpedo* (B) sia in *Podarcis* (D), l'anticorpo anti-PAC₁R reagisce con una banda di circa 66 kDa, l'anti-VPAC₁R con una banda di circa 45 kDa e l'anti-VPAC₂R con una banda di circa 55 kDa. Nei controlli, ottenuti per omissione dell'anticorpo primario, non è presente nessuna banda (K).

1	cgcgatccgaacactgcgcttggctggtttagatgaaaagtctcgogctcctccgctgctccacagacctc	
73	atctctctagacgcacagatcoggatcacgggtgcaacgaacatacctccatctgcaggcggttcaaagaag	
145	aaaaggggaatatacagtagacacacatcgogtggatgtgogtggttataaggctgtgtttgaggaacaa	
217	tcgtcagcaga ATG TAT AGA CAA GCG GCG AGA GAG ACC TTC CTC ATC CTC TTC CTC	
	M Y R Q A A R E T F L I L F L	15
273	ATC ATC AGC CTG ATG TGG CCC ATA CAT TCA GAG ATC TCC AAC TGC GTC ATA AAA	
	I I S L M W P I H S E I S N C V I K	33
325	CGC GAG GAG GAG AGA TGC TTG GAG CGA ATC GCG CTC CAC GAC CCC AAA GAC GAC	
	R E E E R C L E R I A L H D P K D D	51
377	CAA AAA TTT GAG TGC CCG TGG GAG TGG GAT AAT CTG ACC TGC TGG CAG GCG GCG	
	Q K F E C P W E W D N L T C W Q A A	69
429	AGT GTT GGA GAC GTG GTG GAG GTG AAC TGT CCC GAG CTC TTC GAG TTC ATG AGT	
	S V Y G D V V E V N C P E L F E F M S	87
481	CCA GAA GAA GGG CTT GGA AAG ATC AGC AGA AAC TGT ACA GAG TTT GGT TGG TCT	
	P E E G L G K I S R N C T E F G W S	105
533	GAA CCG TAT CCA CAC TAT GTG GAT GCC TGT ATG ACT GAT GAA AAC ACA ACC AAG	
	E P Y P H Y V D A C M T D E N T T K	123
585	CCT GAC ATG TAT TAC GCG TCA GTG AAG GCT CTG TAT ACT GTG GGC TAC AGT ACG	
	P D M Y Y A S V K A L Y T V G Y S T	141
637	TCT CTG GTG TCT CTG ACC ACT GCT ATG GTC AIT TTG TGC CGC TTC AGG AAG CTT	
	S L V S L T T A M V I L C R F R K L	159
689	CAC TGC ACT AGG AAC TTC ATC CAC ATG AAC CTG TTT GTG TCC TTC ATC CTG AGG	
	H C T R N F I H M N L F V S F I L R	177
741	GCC ATT TCT GTC TTT ATT AAA GAT GGA GTT CTG TAT GCA GAG GAG GAC AGT GAC	
	A I S V F I K D G V L Y A E D S D	195
793	CAC TGC TTC GTT CAC ACT GTG GCG TGT AAA GCG GTG ATG GTG TTT TTC CAC TAC	
	H C F V H T V G C K A V M V F F H Y	213
845	TGC GTG ATG TCA AAC TAC TTC TGG CTC TTC AIC GAA GGT CTT TAT CTC TTT ACT	
	C V M S N Y F W L F I E G L Y L F T	231
897	CTT CTG GTC GAA ACC TTC TTT CCA GAG AGA GCG TAC TTT TAC TGG TAC ACC ATC	
	L L V E T F P E R R Y F Y W Y T I	249
949	ATC GGC TGG GGA ACG CCC ACC AIT TGT GTG ACC ATA TGG GCC GTT CTG CGC CTT	
	I G W G T P T I C V T I W A V L R L	267
1001	CAT TTT GAT GAT TCT GGC TGG GAC ATG AAT GAT AAC ACT GCC CTC TGG TGG	
	H F D D S G C W D M N D N T A L W W	285
1053	GTG ATC AAG GGC CCT GTG GTG GCA TCA ATC ATG ATT AAC TTT GTG CTG TTC ATT	
	V I K G P V V A S I M I N F V L F I	303
1105	GGG ATC ATC ATA ATC CTG GTG CAG AAG CTT CAG TCT CCA GAC ATC GGC GGA AAC	
	G I I I I I L V Q K L Q S P D I G G N	321
1157	GAG TCC AGC AIT TAT CTA CGT CTG GCG GCG TCC ACC CTT CTC CTC AIT CCT CTG	
	E S S I Y L R L A R S T L L L I P L	339
1209	TTT GGG ATC CAC TAC ACT GTG TTT GCC TTT TCC CCG GAG GAT TTC AGC AAG CCG	
	F G I H Y T V F A F S P E D F S K R	357
1261	GAG CGA CTG GTC TTT GAG CTC GGC CTG GGC TCC TTC CAG GGG TTT GTT GKT GCT	
	E R L V F E L G L G S F Q G F V V A	375
1313	GTG CTG TAC TGC TTT CTG AAT GGA GAG GCG CAG TCG GAG ATA AAG AGG AAA TGG	
	V L Y C F L N G E A Q S E I K R K W	393
1365	AGG AGT TGG ACG GTG AAC AGG TAC TTT GCT GTG GAC CTG AAG CAG CAG CGT CAC	
	R S W T V N R Y F A V D L K Q Q R H	411
1417	CCT TCG CTA GCG AGC AGT GGG GTG AAC GGG GGG ACG CAG CTG TCC ATC CTC AGC	
	P S L A S S G V N G G T Q L S I L S	429
1469	AAG AGC AGC TCT CAG ATA CCG ATG TCC AGC CCT CTG GCC GAG ACA GTC AAC CTC	
	K S S S Q I R M S S P L A E T V N L	447
1521	AAC CTG CCA ACC TGA gogcctgatcgcccaatccccctaaagcccccgcccttcaactcactctc	
	N L P T *	481
1587	ttcacctgcagtagggacgaccaatcacaattagactatgaaatattcatgaaatccctggatattacttca	
1660	cgagatcaaaattgagtttattttggtagctcacattgttattcttaggtgaacgattaatctgtgcaagt	
1733	taatctctgaattttaaaaaaaaaa	

Figura 34: primer utilizzati nelle PCR per il recettore PAC_1 in *Torpedo* e *Podarcis*. È riportata la sequenza del recettore PAC_1 di *Gallus gallus* (Peeters et al., 1999); i primer sono stati disegnati a monte e a valle rispetto al sito di inserzione delle cassette hip/hop (indicato dalle frecce).

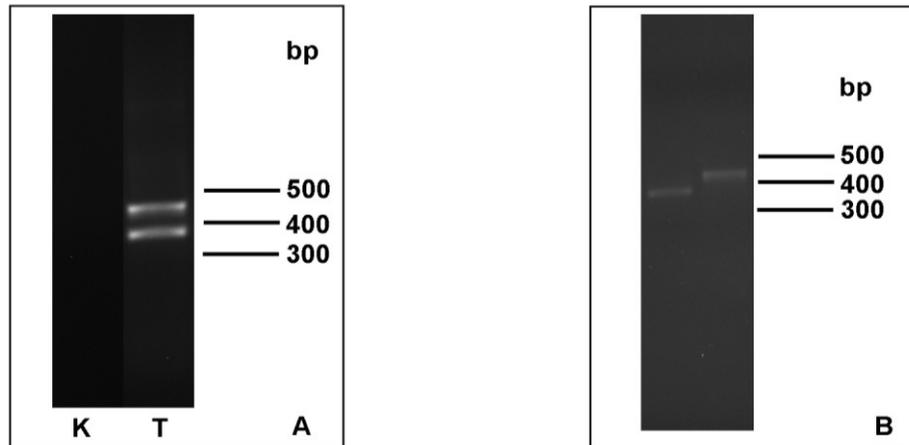


Figura 35: PCR (A) ed eluizione (B) per il recettore *PAC₁* in *Torpedo marmorata*.
 A: corsa su gel di agarosio al 2% della PCR per il *PAC₁R* condotta su cDNA di testicolo di *Torpedo marmorata* (T) e senza cDNA (K); i primer amplificano due frammenti di circa 350 e 450 bp; nel controllo non sono presenti bande. B: corsa su gel di agarosio all'1.8% dei prodotti dell'eluizione; sono presenti le bande della lunghezza attesa.

```

ctcttcaccctgctcatcgagacggttctatccggagcgccgatatttctactggtacatc
L F T L L I E T F Y P E R R Y F Y W Y I
ctgattggatgggggacaccacgatctgcactaccatctggacggtccttcgcctgcac
L I G W G T P T I C T T I W T V L R L H
tttgataactctggctgctgggaaaccaatgagcaccgagctttgtgggtgggtgatcaag
F D N S G C W E T N E H R A L W W V I K
ggaccagtcattgcctccatcatggtgaacttcacctcttcattggcatcatatattatc
G P V I A S I M V N F I L F I G I I F I
ctgggtgcagaagctgcagtcgcctgaaatgggaggcaacgagtcacagcatctccttgaga
L V Q K L Q S P E M G G N E S S I S L R
ttg
L

```

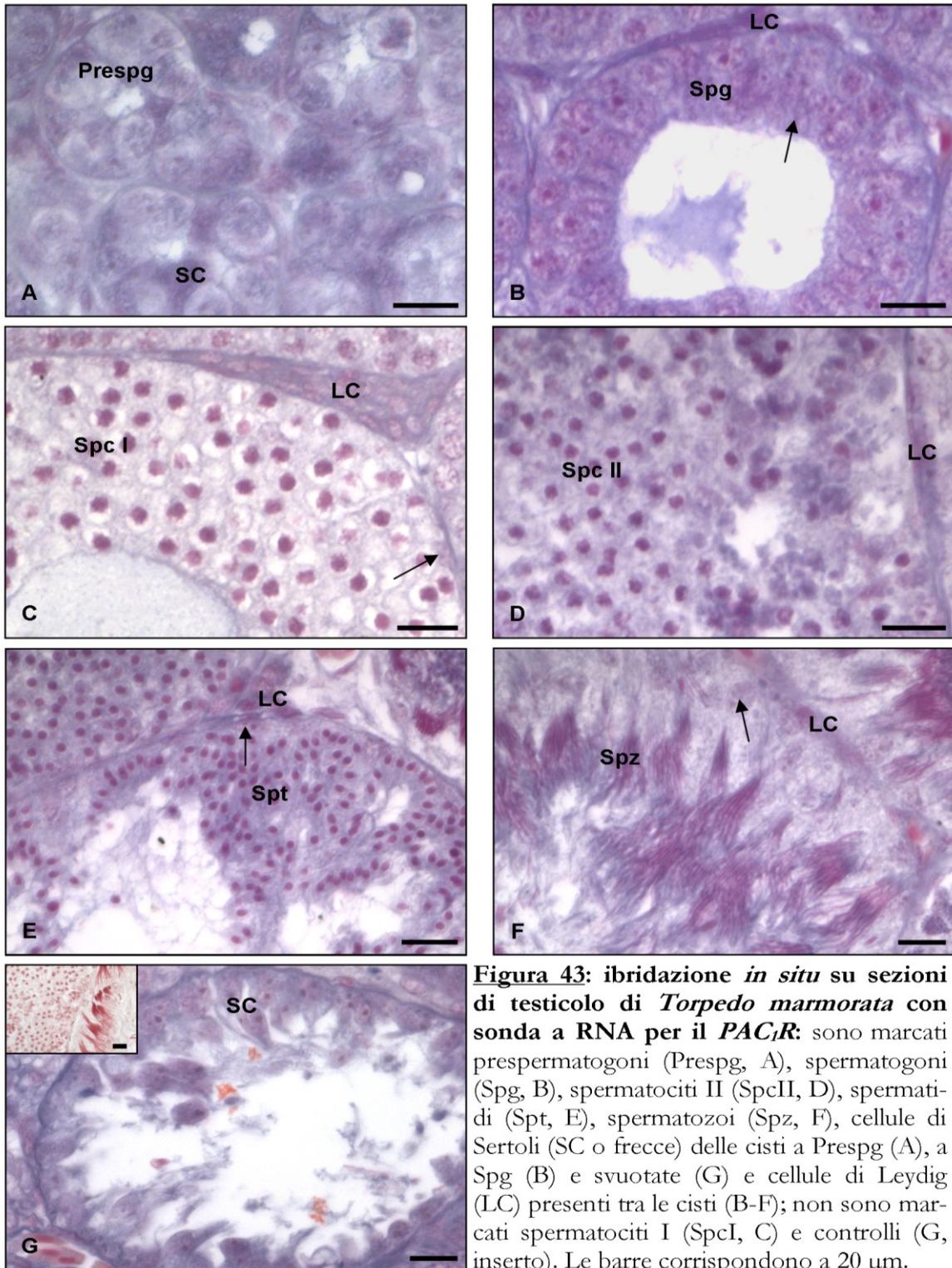
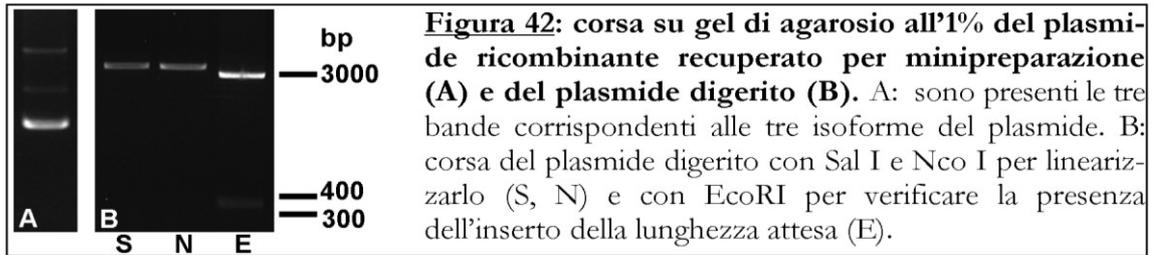
Figura 36: sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta dell'isoforma null del recettore *PAC₁* di *Torpedo marmorata* (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>).

```

ctcttcaccctgctcatcgagacggttctatccggagcgccgatatttctactggtacatc
L F T L L I E T F Y P E R R Y F Y W Y I
ctgattggatgggggacaccacgatctgcactaccatctggacggtccttcgcctgcac
L I G W G T P T I C T T I W T V L R L H
tttgataactctggctgctgggaaaccaatgagcaccgagctttgtgggtgggtgatcaag
F D N S G C W E T N E H R A L W W V I K
ggaccagtcattgcctccatcatggtgaacttcacctcttcattggcatcatatattatc
G P V I A S I M V N F I L F I G I I F I
ctgggtgcagaagctgcagtcgcctgaaatgggaggcaacgagtcacagcatctccttctgt
L V Q K L Q S P E M G G N E S S I S F C
gtacagaaatgctactgtaagcctcagacagagaa
V Q K C Y C K P Q T E

```

Figura 37: sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta dell'isoforma hop2 del recettore *PAC₁* di *Torpedo marmorata* (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>).



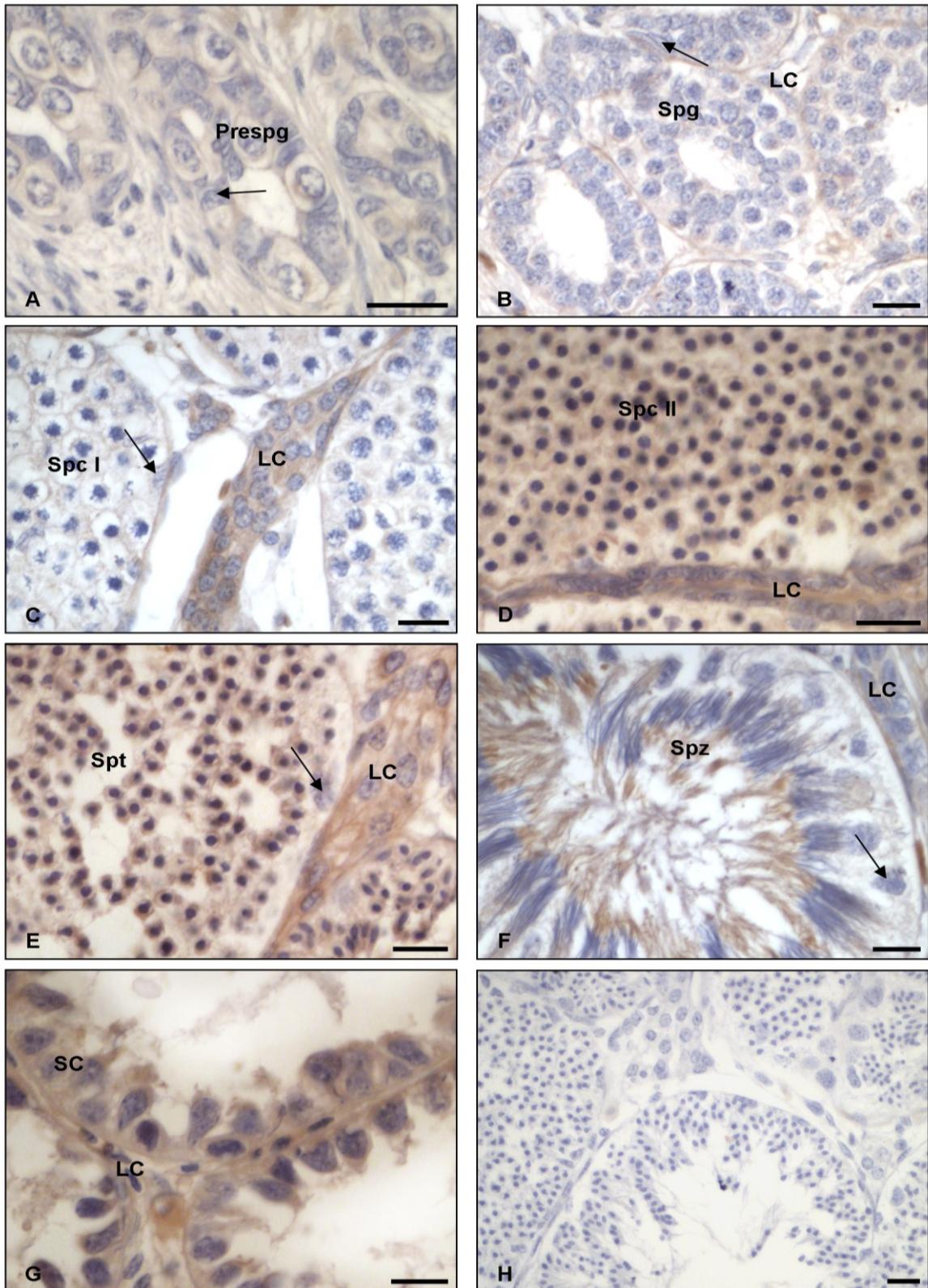


Figura 44: immunohistochimica su sezione di testicolo di *Torpedo marmorata* con anticorpo anti-PAC₁R. il PAC₁R è presente negli spermatociti II (Spc II, D), negli spermatidi (Spt, E), negli spermatozoi (Spz, F) e nelle cellule di Sertoli (SC o frecce) delle cisti svuotate (G), nonché nelle cellule di Leydig (LC) presenti tra le cisti (C-G). Non sono invece marcati i prespermatogoni (Prespg, A), gli spermatogoni (Spg, B), gli spermatociti I (Spc I, C) e i controlli negativi ottenuti per omissione dell'anticorpo primario (H). Le barre corrispondono a 20 μm.

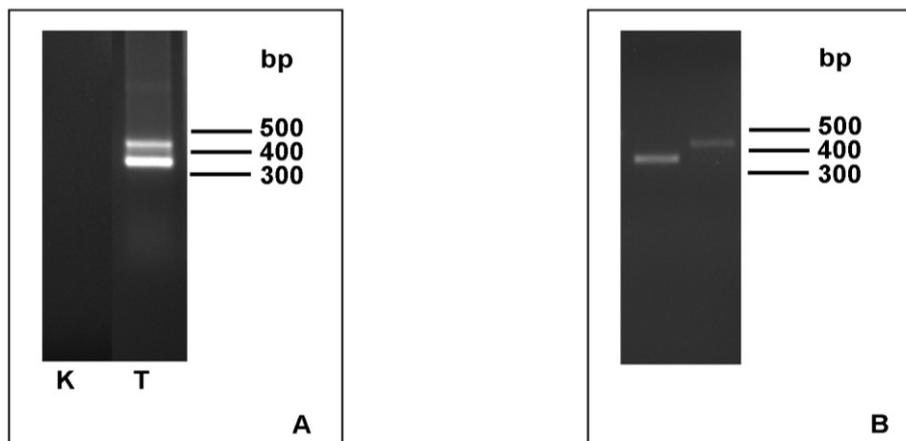


Figura 45: PCR (A) ed eluizione (B) per il recettore PAC_1 in *Podarcis sicula*. A: corsa su gel di agarosio al 2% della PCR per il PAC_1R condotta su cDNA di testicolo di *Podarcis sicula* (T) e senza cDNA (K); i primer amplificano due frammenti di circa 350 e 450 bp; nel controllo non ci sono bande. B: corsa su gel di agarosio all'1.8% dei prodotti dell'eluizione; sono presenti le bande della lunghezza attesa.

```

gggctgtacctctttgcactcttgggtggagcctttctttccggagaggagatacttctac
G L Y L F A L L V E P F F P E R R Y F Y
tggtacaccatcatcggtctggggaactcctaccatttgcgtcaccatctgggctgtcctt
W Y T I I G W G T P T I C V T I W A V L
agacttcactttgatgacgcttggctgctgggacatgaacgacaacacagccttgtgggtg
R L H F D D V G C W D M N D N T A L W W
gtgatcaaaggcctgtgattgcatcaataatgatcaacttcttgcttttcgtgggcatc
V I K G P V I A S I M I N F L L F V G I
atcatcatcctgggtccagaagctccagtcgcctgatatcgggggcaacgaatccagcatt
I I I L V Q K L Q S P D I G G N E S S I
tacttgagattggctcgcctctacacta
Y L R L A R S T L

```

Figura 46: sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta dell'isoforma null del recettore PAC_1 di *Podarcis sicula* (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>).

```

gggctgtacctctttgcactcttgggtggagcctttctttccggagaggagatacttctac
G L Y L F A L L V E P F F P E R R Y F Y
tggtacaccatcatcggtctggggaactcctaccatttgcgtcaccatctgggctgtcctt
W Y T I I G W G T P T I C V T I W A V L
agacttcactttgatgacgcttggctgctgggacatgaacgacaacacagccttgtgggtg
R L H F D D V G C W D M N D N T A L W W
gtgatcaaaggcctgtgattgcatcaataatgatcaacttcttgcttttcgtgggcatc
V I K G P V I A S I M I N F L L F V G I
atcatcatcctgggtccagaagctccagtcgcctgatatcgggggcaacgaatccagcatt
I I I L V Q K L Q S P D I G G N E S S I
tacttcagctgcgttcagaaatgctactgtaaataccagcaggggctaataacacccttgc
Y F S C V Q K C Y C K S S R A N Q H P C
aggatgtcagaactgtccaccattaccttgagattggctcgcctctacacta
R M S E L S T I T L R L A R S T L

```

Figura 47: sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta dell'isoforma hop1 del recettore PAC_1 di *Podarcis sicula* (ExPASy: <http://www.expasy.ch/>).

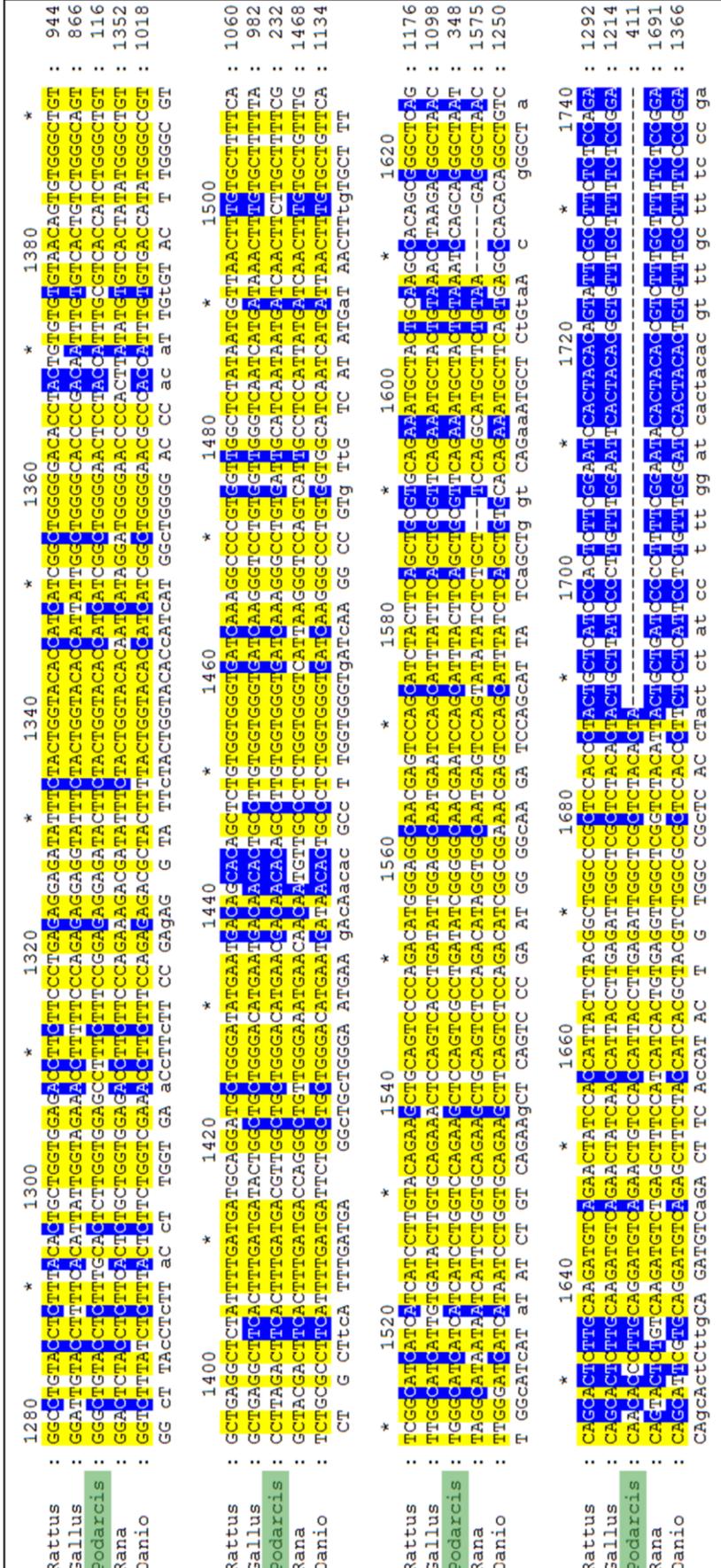


Figura 48: allineamento della sequenza nucleotidica dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* con quelle di altri vertebrati. In giallo sono riportati i residui conservati tra tutte le specie, mentre in blu sono evidenziati i residui che differiscono solo in una specie.

Tabella 13: analisi della sequenza dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* a confronto con quella di altri vertebrati.

Siti Conservati	Siti Variabili	Siti Parsimony Informative	Siti Singleton	Siti 0-volte degenerati	Siti 2-volte degenerati	Siti 4-volte degenerati
255/411	156/411	53/411	103/411	263/411	56/411	49/411
62%	38%	12.9%	25.1%	64%	13.6%	11.9%

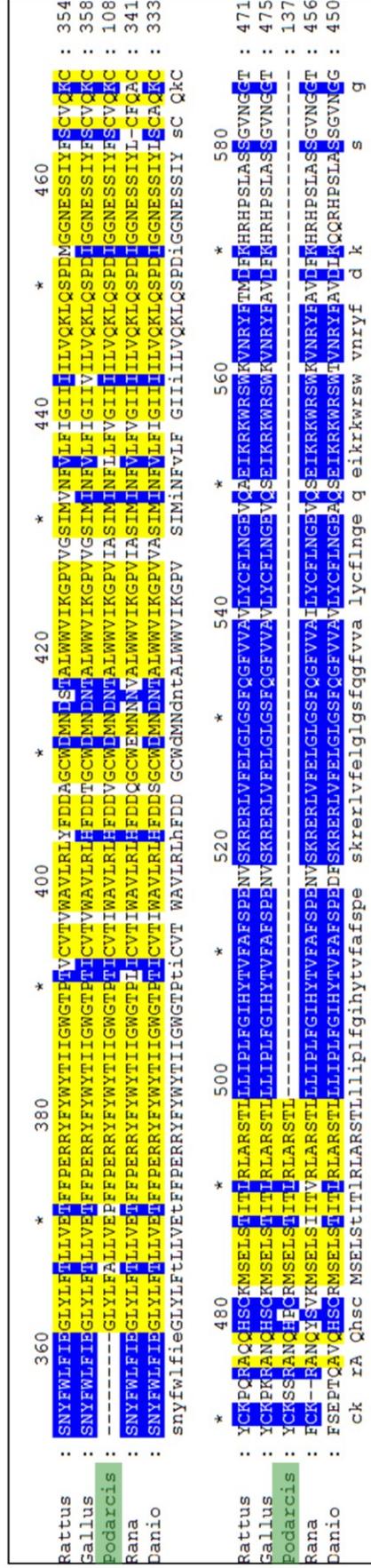


Figura 49: allineamento della sequenza aminoacidica dedotta dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* con quelle di altri vertebrati. In giallo sono riportati i residui conservati tra tutte le specie, mentre in blu sono evidenziati i residui che differiscono solo in una specie.

Tabella 14: analisi della sequenza aminoacidica dedotta dell'isoforma hop1 del recettore PAC₁ di *Podarcis sicula* a confronto con quella di altri vertebrati.

Siti Conservati	Siti Variabili	Siti Parsimony Informative	Siti Singleton
102/137	35/137	7/137	28/137
74.4%	25.6%	5.1%	20.4%

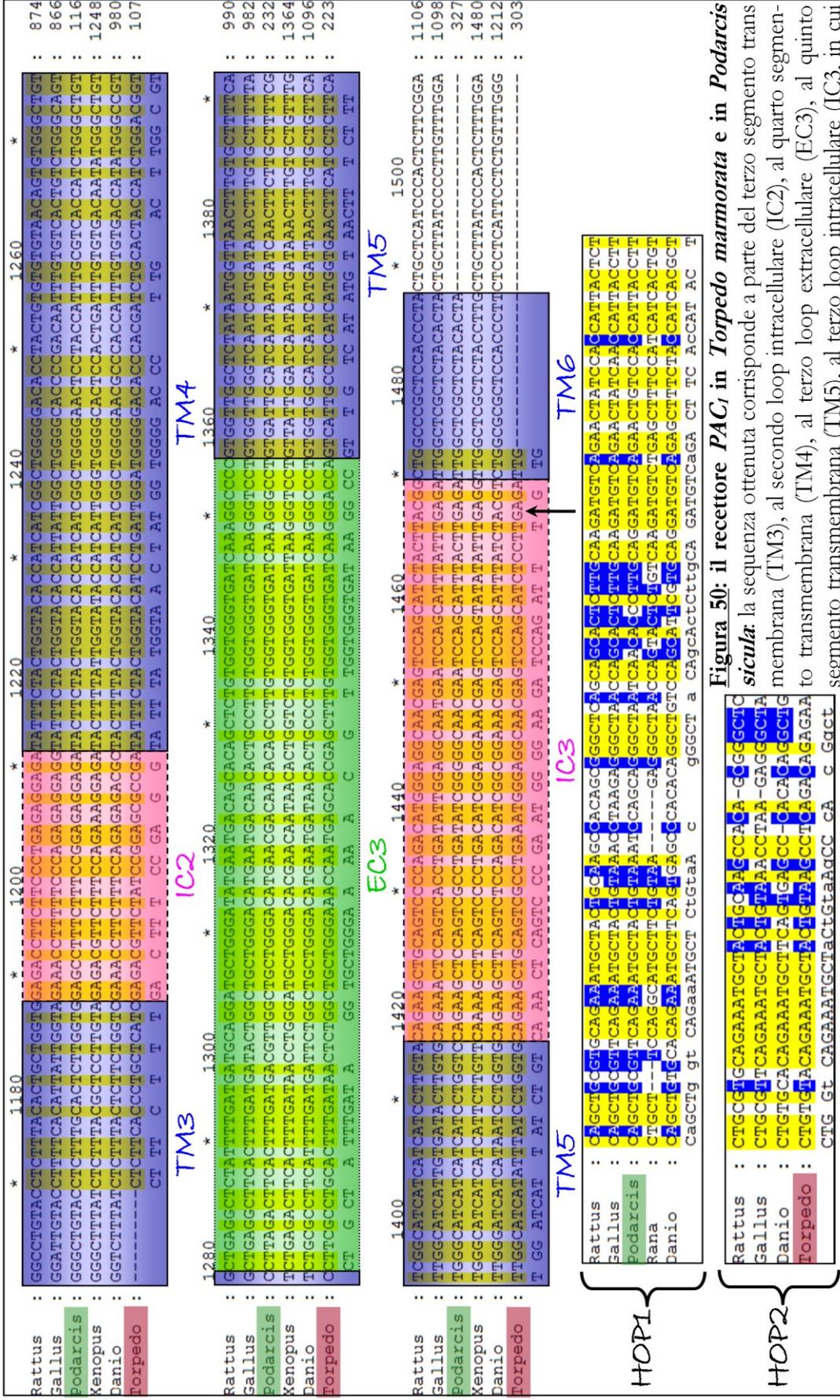


Figura 50: il recettore PAC₁ in *Torpedo mammarata* e in *Podarcis sicula* la sequenza ottenuta corrisponde a parte del terzo segmento transmembrana (TM3), al secondo loop intracellulare (IC2), al quarto segmento transmembrana (TM4), al terzo loop extracellulare (EC3), al quinto segmento transmembrana (TM5), al terzo loop intracellulare (IC3, in cui si inserisce la cassetta hop1 in *Podarcis*, hop2 in *Torpedo*, freccia) e a parte del sesto segmento transmembrana (TM6).

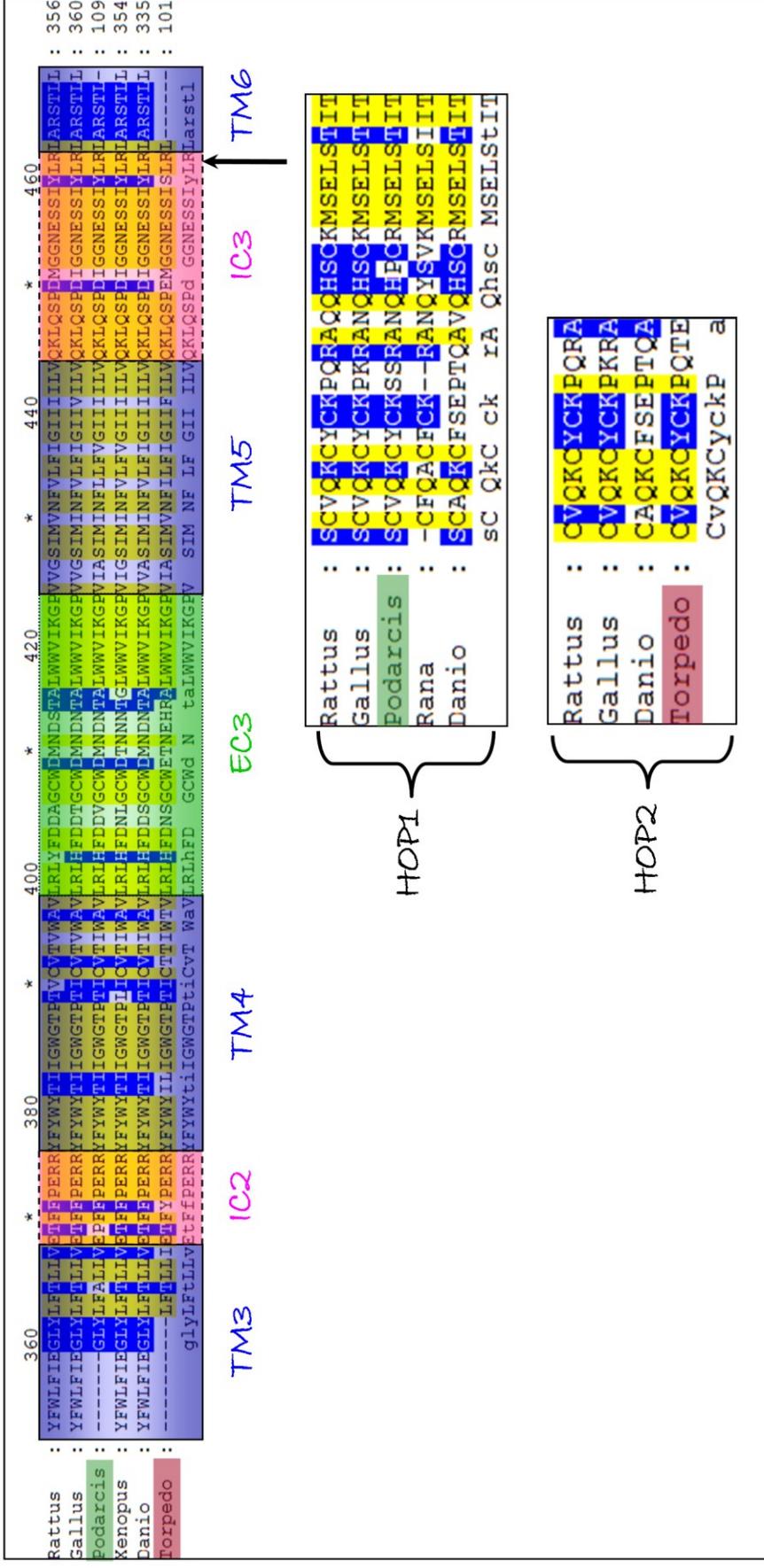


Figura 51: sequenza aminoacidica dedotta del recettore PAC₁ in *Torpedo marmorata* e in *Podarcis sicula* : la sequenza ottenuta corrisponde a parte del terzo segmento transmembrana (TM3), al secondo loop intracellulare (IC2), al quarto segmento transmembrana (TM4), al terzo loop extracellulare (EC3), al quinto segmento transmembrana (TM5), al terzo loop intracellulare (IC3, in cui si inserisce la cassetta hop1 in *Podarcis*, hop2 in *Torpedo*, freccia) e a parte del sesto segmento transmembrana (TM6).

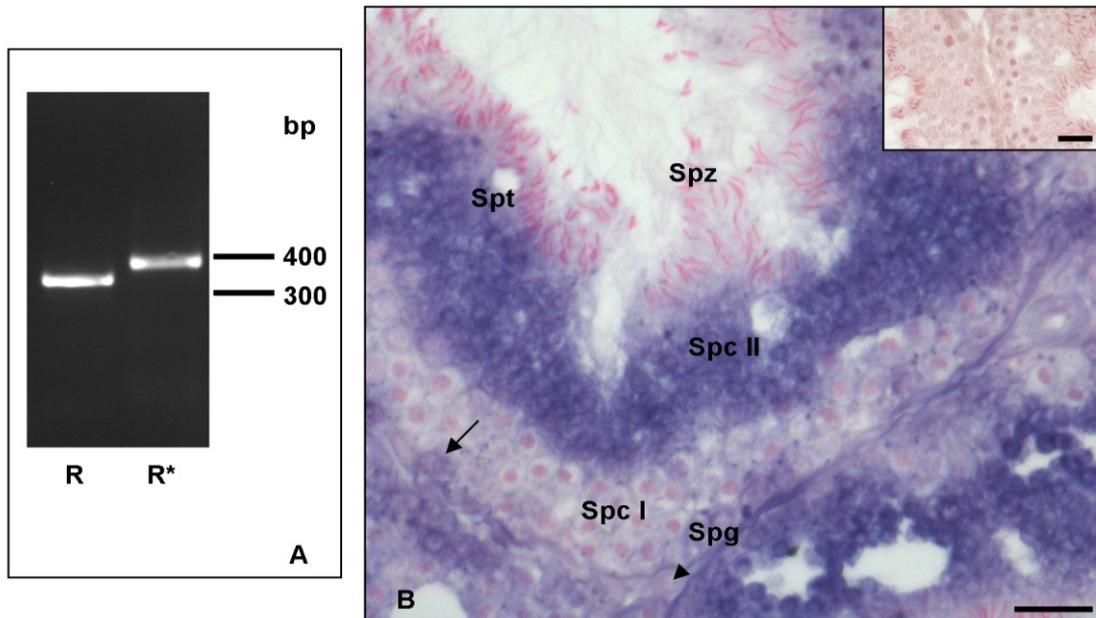


Figura 52: PCR su eluito per produrre la sonda a cDNA per il recettore PAC₁ (A) e ibridazione *in situ* su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* con sonda a cDNA (B). A: corsa su gel di agarosio all'1.8% della PCR condotta con nucleotidi marcati (R*) e non (R): sono presenti due bande di circa 350 bp, con la banda della PCR con dNTP marcati leggermente più alta. B: il messaggero del PAC₁R è presente soprattutto negli spermatociti II (Spc II) e negli spermatidi (Spt); sono debolmente marcati anche gli spermatogoni (Spg), gli spermatociti I (Spc I), le cellule di Leydig (punta di freccia) e di Sertoli (freccia). I controlli non sono marcati (B, inserto). Le barre corrispondono a 20 µm.

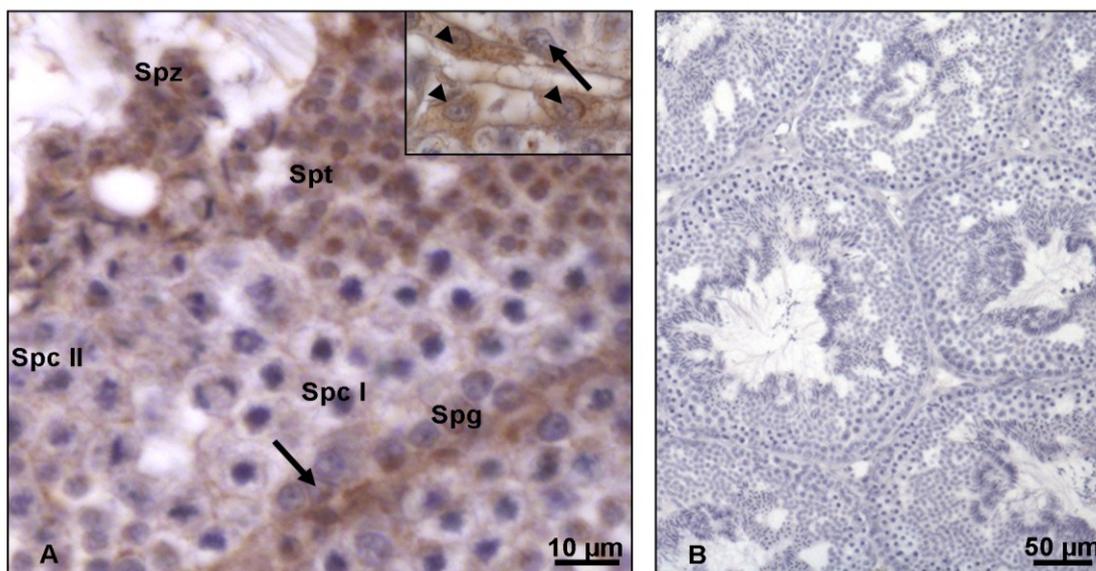
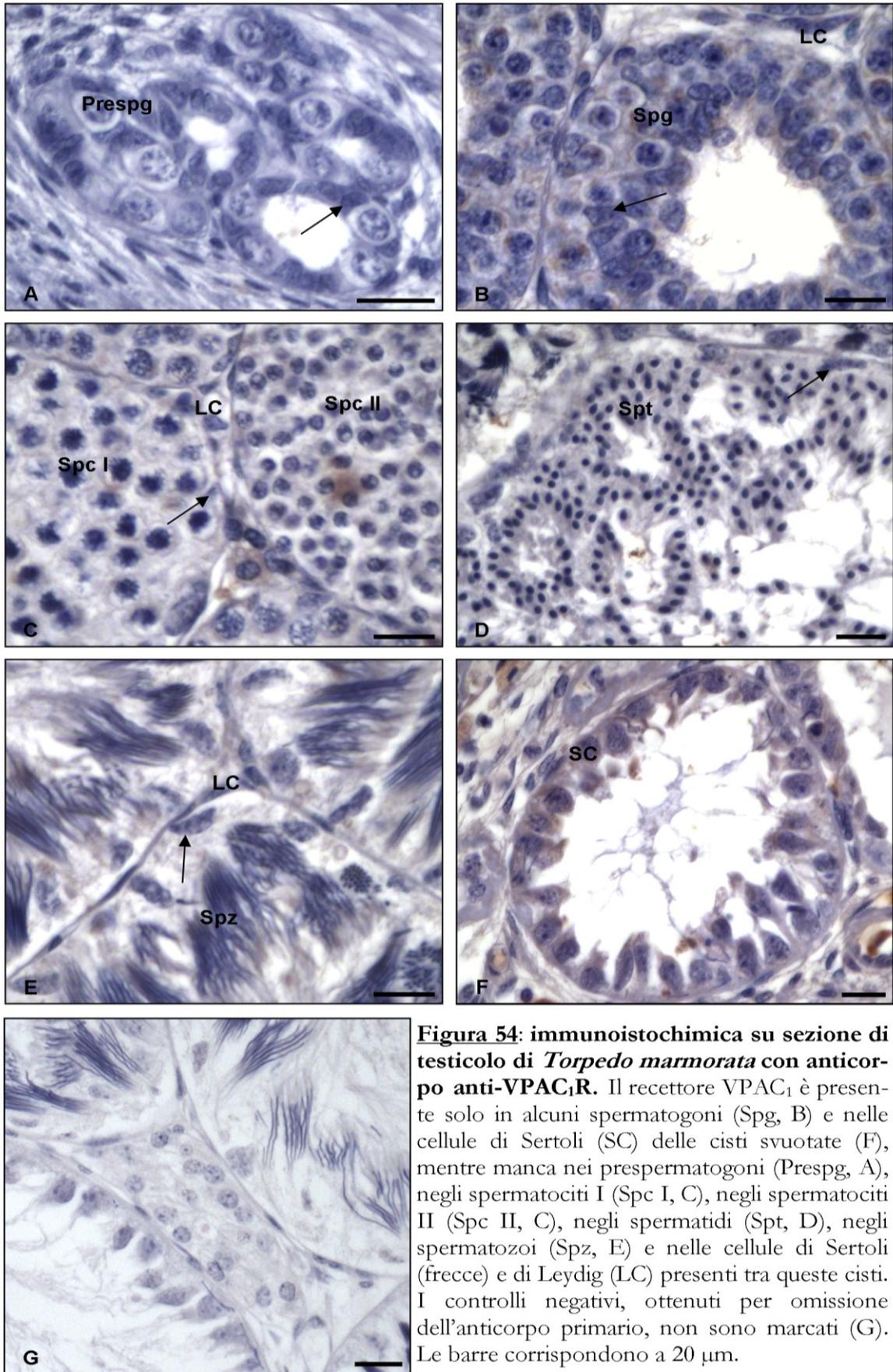


Figura 53: immunoistochimica su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* con anticorpo anti-PAC₁R. A: il recettore PAC₁ è presente in tutti gli stadi della spermatogenesi; sono maggiormente marcati spermatociti II (Spc II), spermatidi (Spt) e spermatozoi (Spz); sono marcate anche le cellule di Leydig (punta di freccia) e le cellule di Sertoli (freccia); nell'inserto è presente un ingrandimento delle cellule di Leydig (punta di freccia). B: i controlli ottenuti per omissione dell'anticorpo primario non sono marcati.



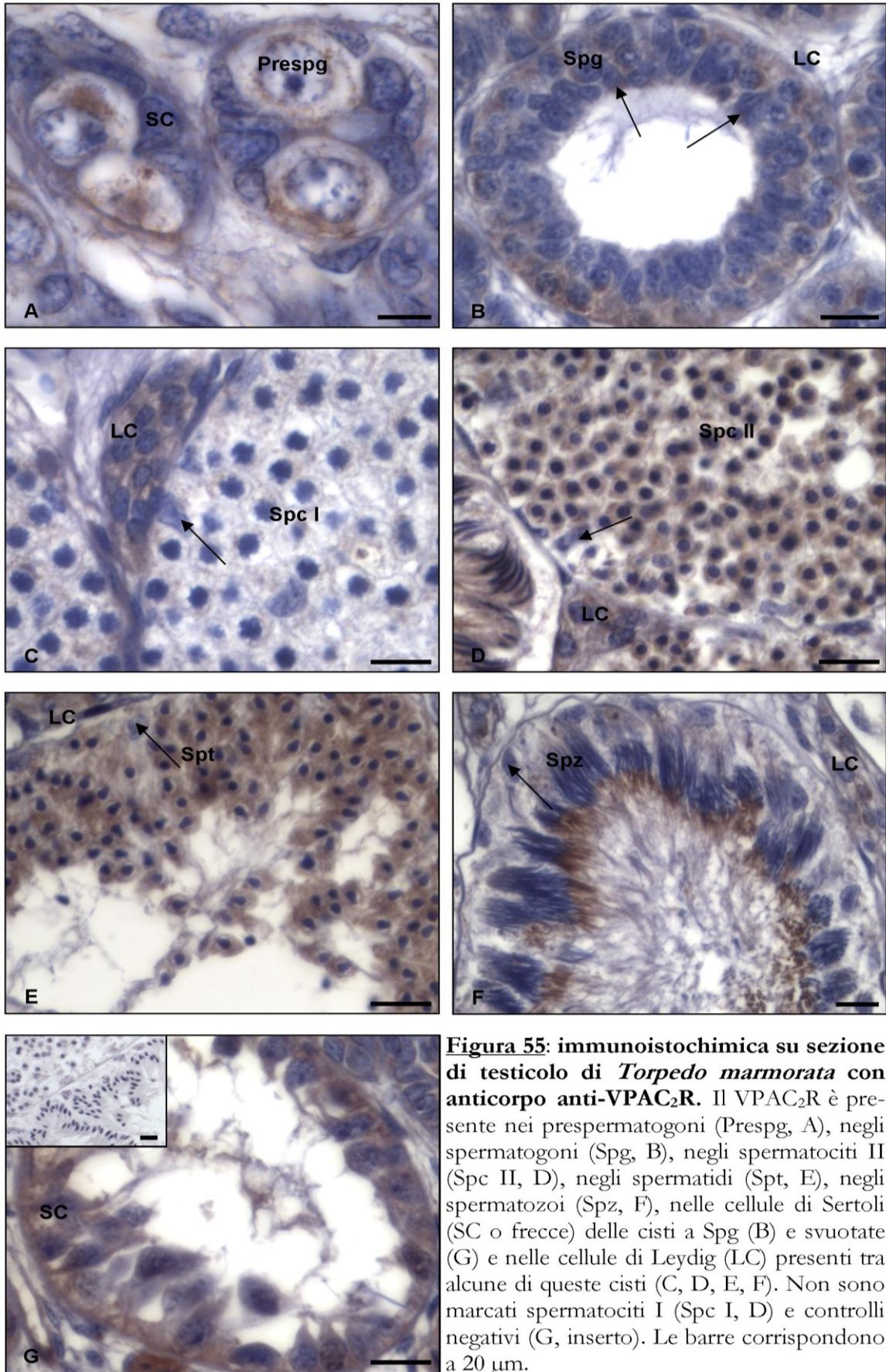


Figura 55: immunistochemica su sezione di testicolo di *Torpedo marmorata* con anticorpo anti-VPAC₂R. Il VPAC₂R è presente nei prespermatogoni (Prespg, A), negli spermatogoni (Spg, B), negli spermatociti II (Spc II, D), negli spermatidi (Spt, E), negli spermatozoi (Spz, F), nelle cellule di Sertoli (SC o frecce) delle cisti a Spg (B) e svuotate (G) e nelle cellule di Leydig (LC) presenti tra alcune di queste cisti (C, D, E, F). Non sono marcati spermatociti I (Spc I, D) e controlli negativi (G, inserto). Le barre corrispondono a 20 μm.

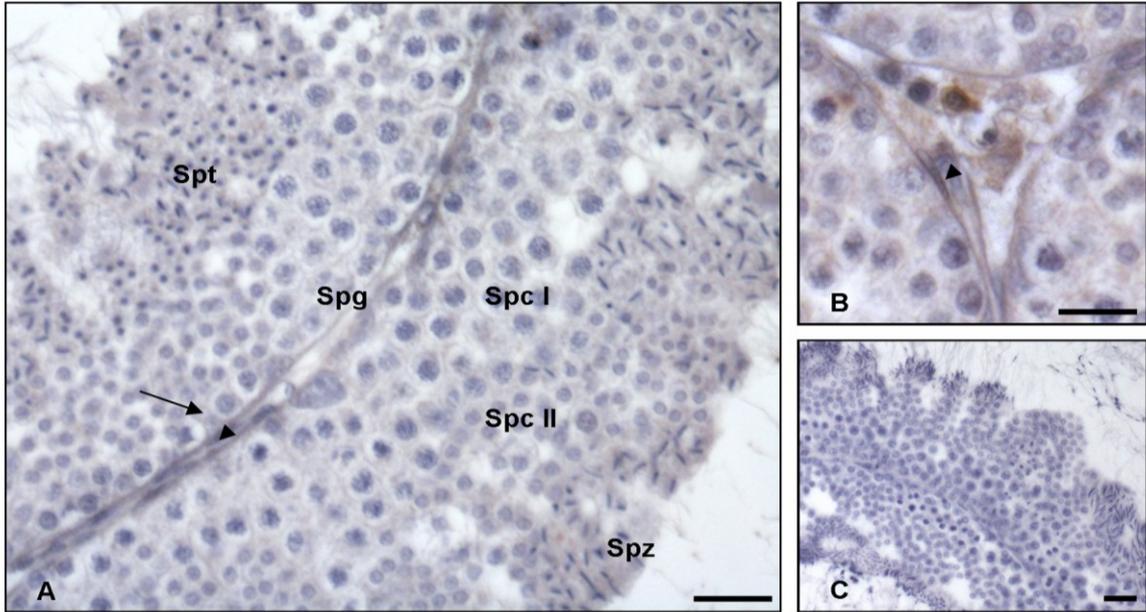


Figura 56: immunohistochimica su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* con anticorpo anti-VPAC₁R. Il recettore VPAC₁ è presente solo in alcune cellule di Leydig (punta di freccia, B), mentre manca nelle cellule germinali e nelle cellule di Sertoli (freccia, A). I controlli ottenuti per omissione dell'anticorpo primario non sono marcati (C). Le barre corrispondono a 20 μ m.

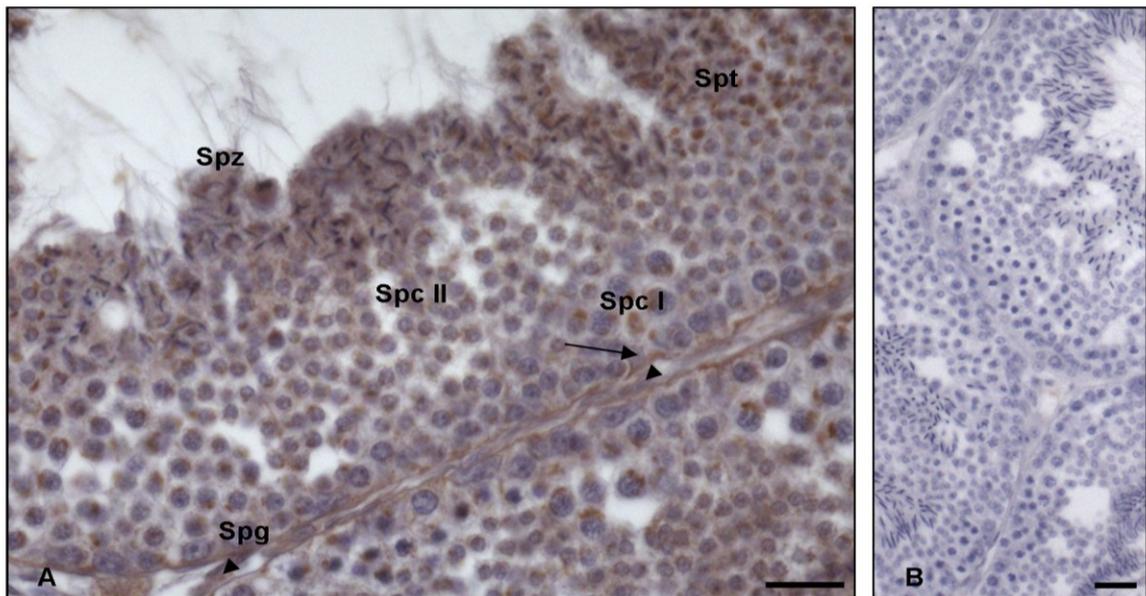


Figura 57: immunohistochimica su sezioni di testicolo di *Podarcis sicula* con anticorpo anti-VPAC₂R. A: Il recettore VPAC₂ è presente in tutti gli stadi della spermatogenesi; sono maggiormente marcati spermatociti II (Spc II), spermatidi (Spt) e spermatozoi (Spz); sono marcate anche le cellule di Leydig (punte di freccia) e le cellule di Sertoli (freccia). B: i controlli ottenuti per omissione dell'anticorpo primario non sono marcati. Le barre corrispondono a 20 μ m.

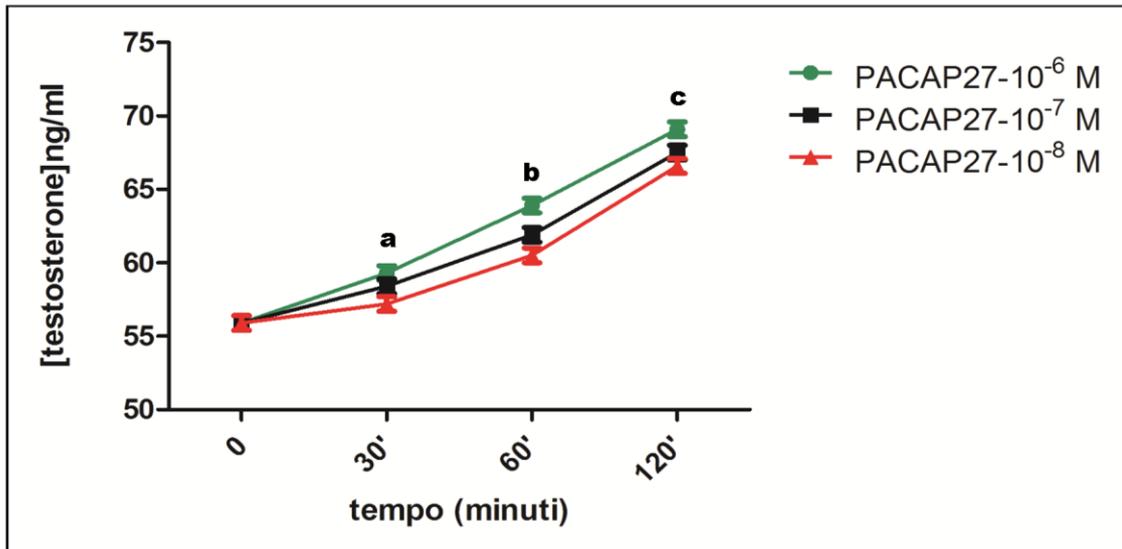


Figura 58: effetti indotti dal PACAP27 sui livelli di testosterone nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il PACAP27 induce un aumento di testosterone dose- e tempo-dipendente in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), eccetto che per alcuni confronti in a, in b e in c. a: le differenze tra il trattamento a 30' e il tempo zero non sono significative per la concentrazione 10^{-8} M, così come tra la concentrazione 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M; b: nel trattamento di 60', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative; c: nel trattamento di 120', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-7} M e tra 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative.

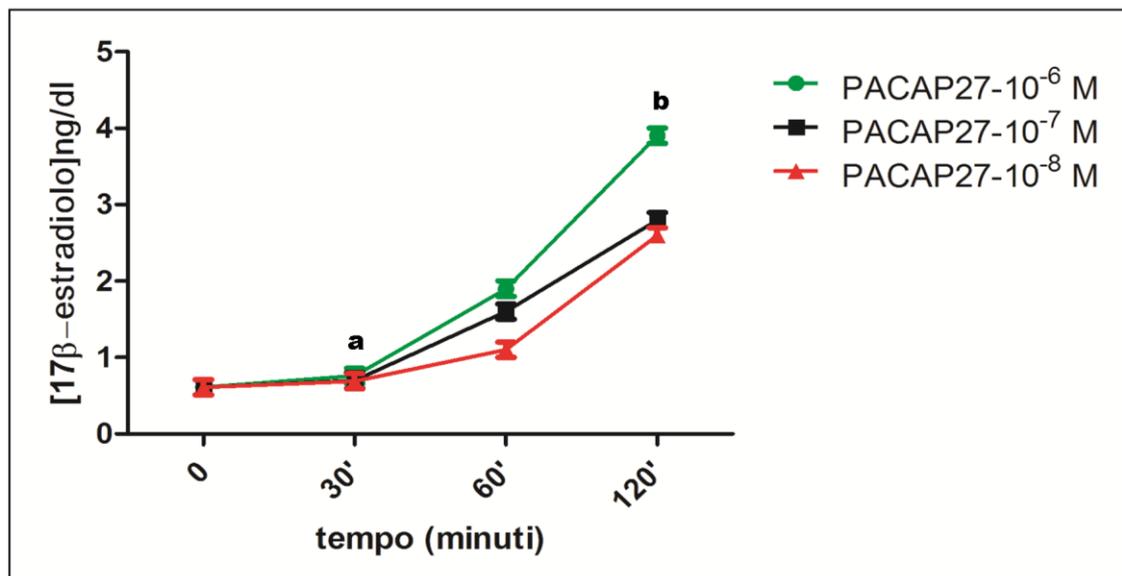


Figura 59: effetti indotti dal PACAP27 sui livelli di 17β -estradiolo nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il PACAP27 induce un aumento di 17β -estradiolo dose- e tempo-dipendente in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), eccetto che in a e in b. a: le differenze tra il trattamento a 30' e il tempo zero non sono significative alle varie concentrazioni utilizzate; b: nel trattamento di 120', le differenze tra le concentrazioni di 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative.

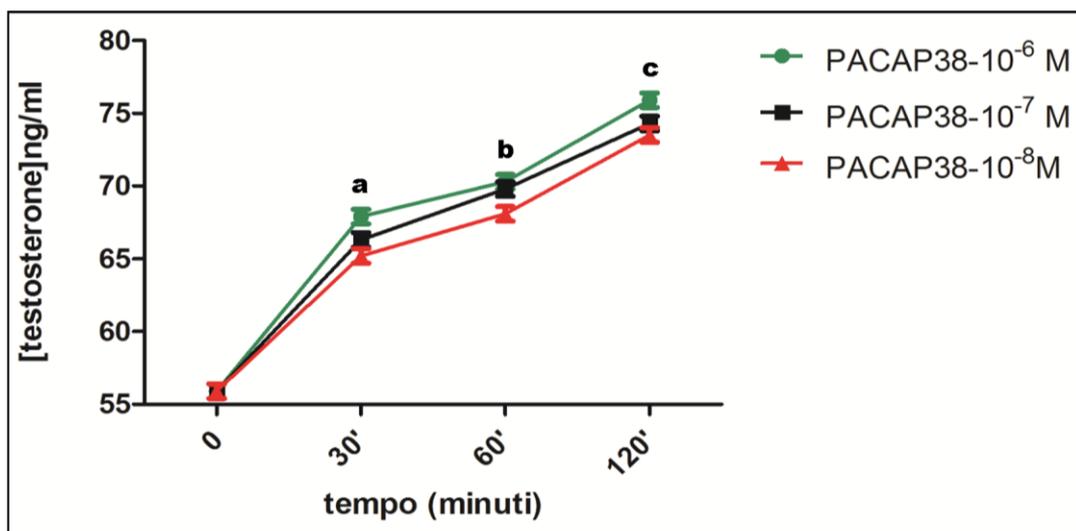


Figura 60: effetti indotti dal PACAP38 sui livelli di testosterone nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il PACAP38 induce un aumento di testosterone dose- e tempo-dipendente in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), eccetto che per alcuni confronti in a, in b e in c. a e c: nel trattamento di 30' e di 120', le differenze tra le concentrazioni 10⁻⁷ M e 10⁻⁸ M non sono significative; b: nel trattamento di 60', le differenze tra le concentrazioni di 10⁻⁶ M e 10⁻⁷ M non sono significative.

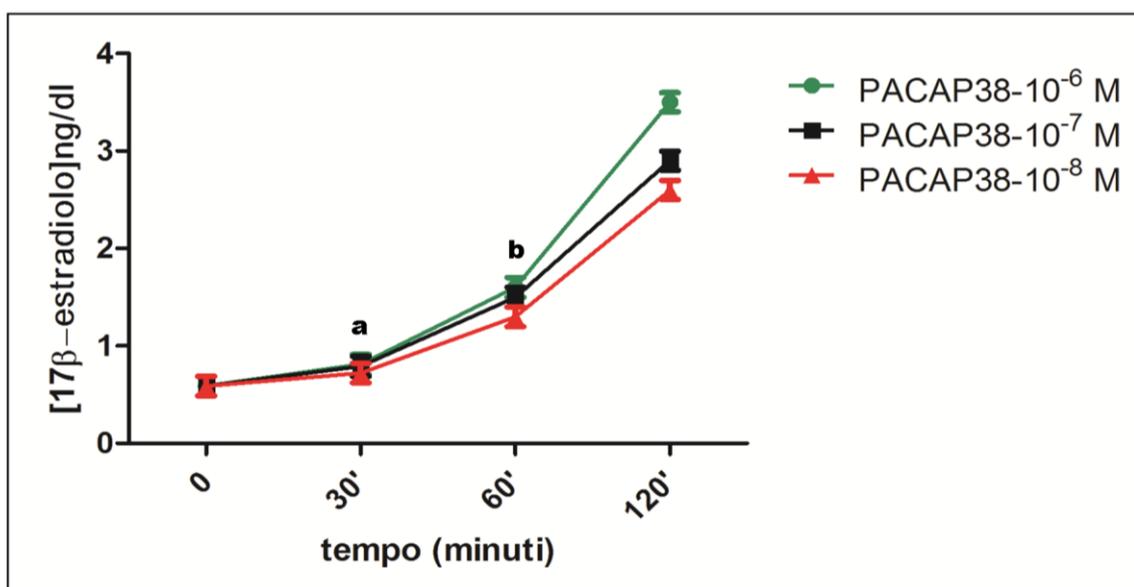


Figura 61: effetti indotti dal PACAP38 sui livelli di 17β-estradiolo nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il PACAP38 induce un aumento di 17β-estradiolo dose- e tempo-dipendente in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), eccetto che in a e in b. a: le differenze tra il trattamento a 30' e il tempo zero non sono significative alle varie concentrazioni utilizzate; b: nel trattamento di 60', le differenze tra gli effetti indotti tra il trattamento con PACAP38 concentrato 10⁻⁶ M e 10⁻⁷ M e tra 10⁻⁷ M e 10⁻⁸ M non sono significative.

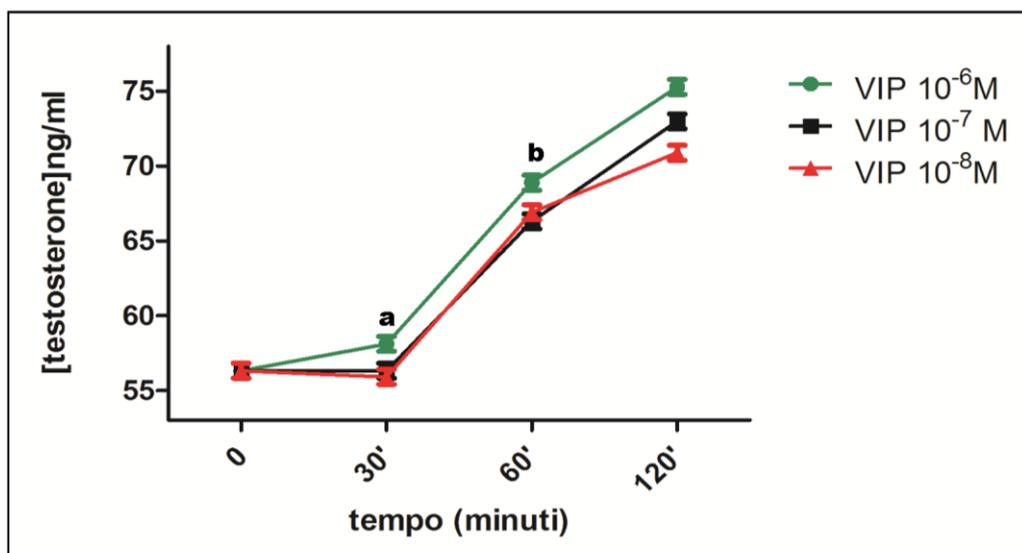


Figura 62: effetti indotti dal VIP sui livelli di testosterone nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il VIP induce un aumento di testosterone dose- e tempo-dipendente in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), eccetto che per alcuni confronti in a e in b. a: nel trattamento di 30', le differenze tra gli effetti indotti rispetto al tempo zero e tra le varie concentrazioni di VIP utilizzate non sono statisticamente significative, eccetto che per la dose 10^{-6} M; b: nel trattamento di 60', le differenze tra gli effetti indotti tra le concentrazioni di 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono significative.

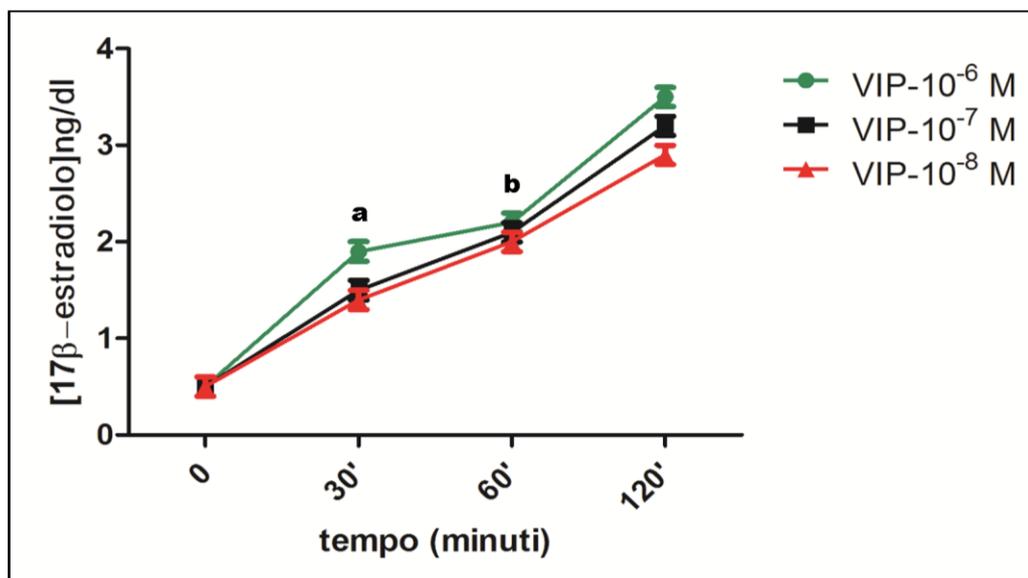


Figura 63: effetti indotti dal VIP sui livelli di 17β -estradiolo nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il VIP induce un aumento di 17β -estradiolo dose- e tempo-dipendente in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), eccetto che in a e in b. a: nel trattamento di 30', le differenze tra gli effetti indotti tra il trattamento con VIP concentrato 10^{-7} M e 10^{-8} M non sono statisticamente significative; b: nel trattamento di 60', le differenze indotte dalle varie concentrazioni di VIP utilizzate non sono significative.

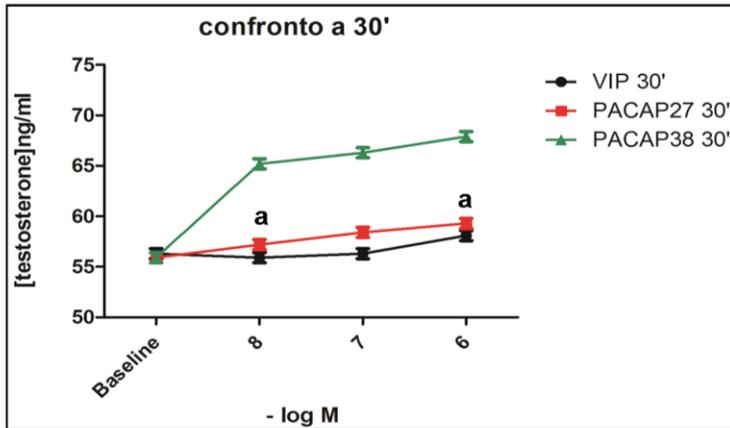


Figura 64: confronto degli effetti indotti dal trattamento di 30' con i tre peptidi sui livelli di testosterone nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il PACAP38 induce un aumento di testosterone maggiore di quello indotto dal PACAP27 e dal VIP in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$). a: il trattamento con il PACAP27 alle concentrazioni di 10^{-6} e 10^{-8} M induce effetti che non sono significativamente diversi da quelli indotti dal VIP alle stesse concentrazioni.

Figura 65: confronto degli effetti indotti dal trattamento di 60' con i tre peptidi sui livelli di testosterone nel testicolo di *Podarcis sicula*. PACAP38 e VIP inducono un aumento di testosterone statisticamente maggiore di quello indotto dal PACAP27; il PACAP38 inoltre ha un effetto statisticamente maggiore rispetto al VIP ($p < 0.05$), eccetto che in a. a: il trattamento con PACAP38 alla concentrazione di 10^{-8} M induce effetti che non sono significativamente diversi da quelli indotti dal VIP alla stessa concentrazione.

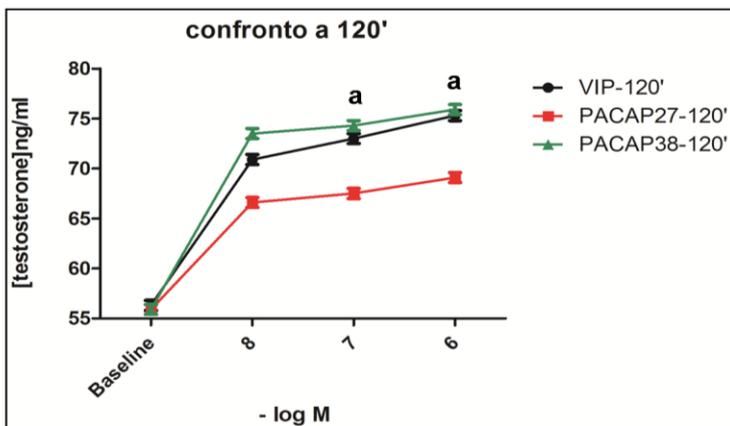
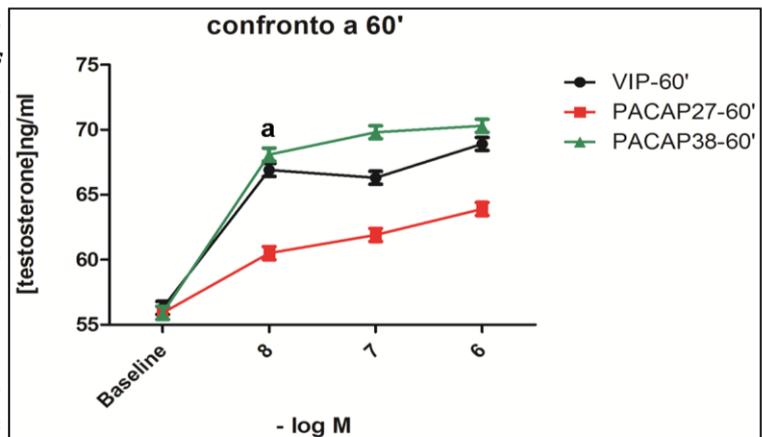


Figura 66: confronto degli effetti indotti dal trattamento di 120' con i tre peptidi sui livelli di testosterone nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il PACAP38 e il VIP inducono un aumento di testosterone maggiore di quello indotto dal PACAP27 ($p < 0.05$). Le differenze osservate tra PACAP38 e VIP sono invece statisticamente significative solo alla concentrazione di 10^{-8} M, mentre non lo sono in a.

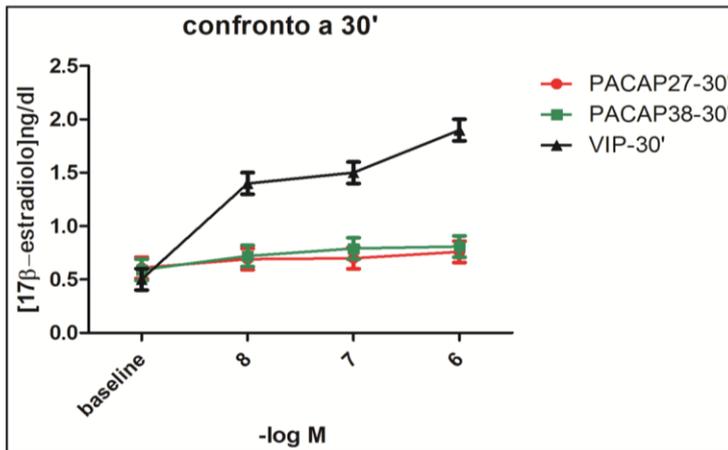


Figura 67: confronto degli effetti indotti dal trattamento di 30' con i tre peptidi sui livelli di 17β -estradiolo nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il VIP induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP27 e 38 in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$). Le differenze tra gli effetti indotti dal PACAP27 e dal 38 non sono statisticamente significative.

Figura 68: confronto degli effetti indotti dal trattamento di 60' con i tre peptidi sui livelli di 17β -estradiolo nel testicolo di *Podarcis sicula*. Il VIP induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP27 e 38 in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$). Il PACAP27 induce un aumento di 17β -estradiolo maggiore di quello indotto dal PACAP38 solo alla concentrazione di 10^{-6} M, mentre alle altre concentrazioni le differenze tra gli effetti indotti dal PACAP27 e dal 38 non sono statisticamente significative (a e b).

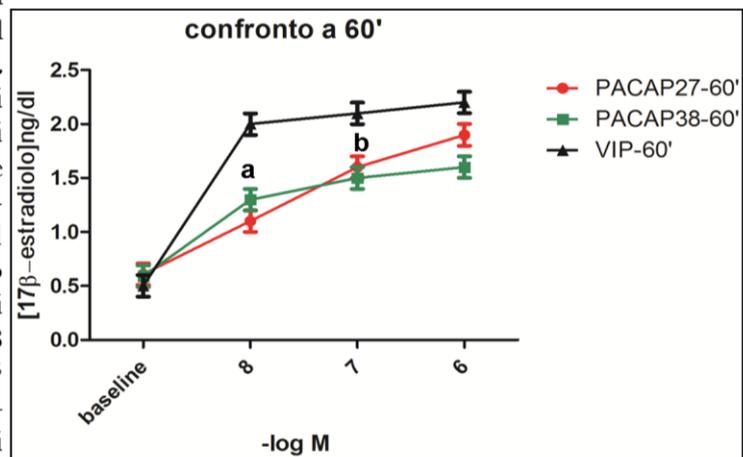
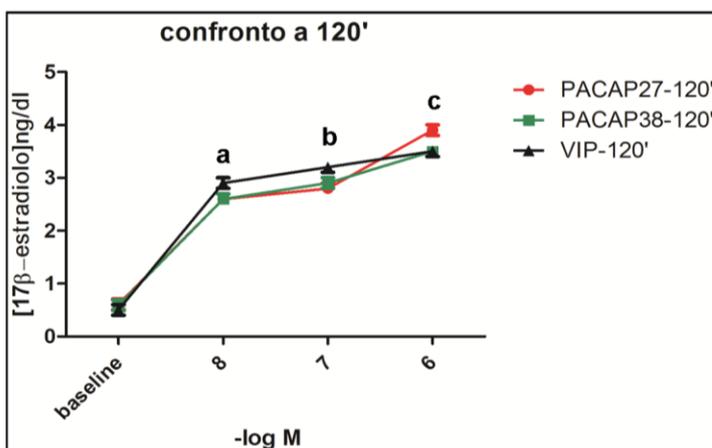


Figura 69: confronto degli effetti indotti dal trattamento di 120' con i tre peptidi sui livelli di 17β -estradiolo nel testicolo di *Podarcis sicula*. Le differenze osservate tra gli effetti indotti dai vari peptidi sono significative eccetto che in a, in b e in c. a e b: il trattamento con il PACAP27 alle concentrazioni di 10^{-8} e 10^{-7} M induce effetti che non sono significativamente diversi da quelli indotti dal PACAP38 alle stesse concentrazioni; c: nel trattamento alla concentrazione di 10^{-6} M le differenze tra gli effetti indotti dal VIP e dal PACAP38 non sono statisticamente significative.



BIBLIOGRAFIA

- Abad C., Martinez C., Leceta J., Juarranz M.G., Delgado M. and Gomariz R.P.** 2002. Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide expression in the immune system. *Neuroimmuno-modulation* 10: 177–186.
- Acsady L., Arabadzisz D. and Freund T.F.** 1996. Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73: 299–315.
- Adamou J.E., Aiyar N., Van Horn S. and Elshourbagy N.A.** 1995. Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 385–392.
- Agnese M., Valiante S., Angelini F., Laforgia V., Andreuccetti P. and Prisco M.** 2010. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptor PAC₁ in the testis of *Triturus carnifex* and *Podarcis sicula*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 168: 256-261.
- Agnese M., Valiante S., Laforgia V., Andreuccetti P. and Prisco M.** PACAP and its receptors in the ovary of the cartilaginous fish *Torpedo marmorata*. Submitted to *J. Exp. Zool.*
- Aino H., Hashimoto H., Ogawa N., Nishino A., Yamamoto K., Nogi H., Nagata S. and Baba A.** 1995. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Gene* 164: 301-304.
- Alexandre D., Anouar Y., Jégou S. and Vaudry H.** 1999. A cloned frog vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor exhibits pharmacological and tissue distribution characteristics of both VPAC1 and VPAC2 receptors in mammals. *Endocrinology* 140: 1285-1293.
- Alexandre D., Vaudry H., Jégou S. and Anouar Y.** 2000a. Structure and distribution of the mRNAs encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in the frog, *Rana ridibunda*. *J. Comp. Neurol.* 421: 234-246.
- Alexandre D., Anouar Y., Jégou S., Fournier A. and Vaudry H.** 2000b. Molecular cloning, mRNA distribution and pharmacological characterization of a VIP/PACAP receptor in the frog *Rana ridibunda*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921: 300–303.
- Alexandre D., Anouar Y., Turquier V., Jégou S., Vandesande F., Fournier A. and Vaudry H.** 2001. Identification and tissue distribution of novel splice variants of type I PACAP receptor in frog *Rana ridibunda*. *Perspective in comparative endocrinology*. Monduzzi editore, p. 1225-1231.
- Alexandre D., Vaudry H., Grumolato L., Turquier V., Fournier A., Jégou S. and Anouar Y.** 2002. Novel splice variants of type I pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in frog exhibit altered adenylate cyclase stimulation and differential relative abundance. *Endocrinology* 143: 2680–92.
- Alm P., Alumets J., Håkanson R. and Sundler F.** 1977. Peptidergic (vasoactive intestinal peptide) nerves in the genito-urinary tract. *Neuroscience* 2: 751-4.
- Alm P., Alumets J., Håkanson R., Owman O., Sjöberg N.O., Sundler F. and Walles B.** 1980. Origin and distribution of VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-nerves in the genito-urinary tract. *Cell Tissue Res.* 205: 337-47.
- Andò S., Panno M.L., Ciarcia G., Imbrogno E., Buffone M., Beraldi E., Sisci D., Angelini F. and Botte V.** 1990. Plasma sex hormone concentrations during the reproductive cycle in the male lizard, *Podarcis s. sicula*. *J. Reprod. Fertil.* 90: 353-60.
- Angelini F. and Botte V.** 1992. Spermatogenesis in reptiles: dynamic and regulatory aspects. In: Dallai R. Eds. *Sex origin and evolution*. Mucchi Selected Symposia and Monographs UZI, Modena, Italy: 211-230.
- Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Miyata A., Mizuno K., Coy D.H. and Kitada C.** 1991. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789.
- Arimura A.** 1993. Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: comparison with vasoactive intestinal peptide receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 3: 288-294.
- Arimura A. and Shioda S.** 1995. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.* 16: 53-88.

- Arimura A.** 1998. Perspectives on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine and nervous system. *Jpn. J. Physiol.* 48: 301-331.
- Baranowska B., Chmielowska M., Radzikowska M., Borowiec M., Roguski K. and Wasilewska-Dziubinska E.** 1999. Effects of neuropeptide Y (NPY), galanin and vasoactive intestinal peptide (VIP) on pituitary hormone release and on ovarian steroidogenesis. *Neuro Endocrinol. Lett.* 20: 385-389.
- Basille M., Falluel-Morel A., Vaudry D., Aubert N., Fournier A., Fréger P., Gallo-Payet N., Vaudry H. and Gonzalez B.** 2006. Ontogeny of PACAP receptors in the human cerebellum: perspectives of therapeutic applications. *Regul. Pept.* 137: 27-33.
- Bewley M.S., Pena J.T., Plesch F.N., Decker S.E., Weber G.J. and Forrest J.N.** 2006. Shark rectal gland vasoactive intestinal peptide receptor: cloning, functional expression, and regulation of CFTR chloride channels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291: R1157-R1164.
- Bodanszky M., Bodanszky A., Klausner Y.S. and Said S.I.** 1974. A preferred conformation in the vasoactive intestinal peptide (VIP). Molecular architecture of gastrointestinal hormones. *Bioorg. Chem.* 3: 133-140.
- Bodanszky M. and Bodanszky A.** 1986. Conformation of peptides of the secretin-VIP-glucagon family in solution. *Peptides* 7: 43-48.
- Bokaei P.B., Ma X.Z., Byczynski B., Keller J., Sakac D., Fahim S. and Branch D.R.** 2006. Identification and characterization of five-transmembrane isoforms of human vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors. *Genomics* 88: 791-800.
- Brabet P., Diriong S., Journot L., Bockaert J. and Taviaux S.** 1996. Localization of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PACAP₁-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 38: 100-102.
- Bryant M.G., Polak M.M., Modlin I., Bloom S.R., Albuquerque R.H. and Pearse A.G.** 1976. Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *Lancet* 1: 991-993.
- Cai Y., Xin X., Yamada T., Muramatsu Y., Szpirer C. and Matsumoto K.** 1995. Assignments of the genes for rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (Adcyap1) and its receptor subtypes (Adcyap1r1, Adcyap1r2 and Adcyap1r3). *Cytogenet. Cell. Genet.* 71: 193-196.
- Callard P. et al.** 1989. Endocrine regulation of reproduction in elasmobranchs: archetype for terrestrial vertebrates. *Exp. Zool. Suppl.* 2: 12-22.
- Campbell R.M. and Scanes C.G.** 1992. Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul.* 2: 175-191.
- Capape C.** 1979. La torpille marbrée, *Torpedo marmorata* Risso, 1810 (Pisces, Rajiformes) des cotes tunisiennes: nouvelles données sur l'écologie et la biologie de la reproduction de l'espèce, avec une comparaison entre les populations méditerranéennes et atlantiques. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 1: 79-97.
- Cardoso J.C., Power D.M., Elgar G. and Clark M.S.** 2004. Duplicated receptors for VIP and PACAP (VPAC1R and PAC1R) in a teleost fish, *Fugu rubripes*. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 411-428.
- Cardoso J.C., Vieira F.A., Gomes A.S. and Power D.M.** 2007a. PACAP, VIP and their receptors in the metazoa: insights about the origin and evolution of the ligand-receptor pair. *Peptides* 28: 1902-1919.
- Cardoso J.C., de Vet E.C., Louro B., Elgar G., Clark M.S. and Power D.M.** 2007b. Persistence of duplicated PAC1 receptors in the teleost, *Sparus auratus*. *BMC Evol. Biol.* 7: 221.
- Castrillo J.L., Theill L.E. and Karin M.** 1991. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253: 197-199.
- Cauvin A., Robberecht P., De Neef P., Gourlet P., Vandermeers A., Vamdermeers-Piret M.C. and Christophe J.** 1991. Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord. *Regulat. Pept.* 35: 161-173.

- Chartrel N., Tonon M.C., Vaudry H. and Conlon J.M.** 1991. Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology* 129: 3367-3371.
- Chartrel N., Wang Y., Fournier A., Vaudry H. and Conlon J.M.** 1995. Frog vasoactive intestinal polypeptide and galanin: primary structures and effects on pituitary adenylate cyclase. *Endocrinology* 136: 3079-3086.
- Chatterjee T.K., Sharma R.V. and Fisher R.A.** 1996. Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 271: 32226-32232.
- Chatterjee T.K., Liu X., Davisson R.L. and Fisher R.A.** 1997. Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. Alternative splicing within the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 272: 12122-12131.
- Chow B.K.C., Yuen T.T.H. and Chan K.W.** 1997. Molecular evolution of vertebrate VIP receptors and functional characterization of a VIP receptor from goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105: 176-185.
- Christophe J., Svoboda M., Lambert M., Waelbroeck M., Winand J., Dehaye J.P., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A. and Robberecht P.** 1986. Effector mechanisms of peptides of the VIP family. *Peptides* 7: 101-107.
- Clore G.M., Martin S.R. and Gronenborn A.M.** 1986. Solution structure of human growth hormone releasing factor. Combined use of circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 191: 553-561.
- Conconi M.T., Spinazzi R. and Nussdorfer G.G.** 2006. Endogenous ligands of PACAP/VIP receptors in the autocrine-paracrine regulation of the adrenal gland. *Int. Rev. Cytol.* 249: 1-51.
- Counis R., Laverrière J.N, Garrel-Lazayres G., Cohen-Tannoudji J., Larivière S., Bleux C. and Magre S.** 2007. What is the role of PACAP in gonadotropine function? *Peptides* 28: 1797-804.
- Couvineau A., Gammeltoft S. and Laburthe M.** 1986. Molecular characteristics and peptide specificity of vasoactive intestinal peptide receptors from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 47: 1469-75.
- Couvineau A., Lacapere J.J., Tan Y.V., Rouyer-Fessard C., Nicole P. and Laburthe M.** 2003. Identification of cytoplasmic domains of hVPAC1 receptor required for activation of adenylyl cyclase. Crucial role of two charged amino acids strictly conserved in class II G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 278: 24759-66.
- Csaba Z.S., Csernus V. and Gerendai I.** 1997. Local effect of PACAP and VIP on testicular function in immature and adult rats. *Peptides* 18: 1561-1567.
- Culler M.D. and Paschall C.S.** 1991. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potentiates the gonadotropin-releasing activity of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 129: 2260-2.
- Cummings K.J., Gray S.L., Simmons C.J., Kozak C.A. and Sherwood N.M.** 2002. Mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): gene, expression and novel splicing. *Mol. Cell. Endocrinol.* 192: 133-45.
- Daniel P.B. and Habener J.F.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression regulated by a testis-specific promoter in germ cells during spermatogenesis. *Endocrinology* 141: 1218-27.
- Daniel P.B., Kieffer T.J., Leech C.A. and Habener J.F.** 2001. Novel alternatively spliced exon in the extracellular ligand-binding domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) selectively increases ligand affinity and alters signal transduction coupling during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 276: 12938-12944.
- Dautzenberg F.M., Mevenkamp G., Willie S. and Hauger R.L.** 1999. N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: Isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J. Neuroendocrinol.* 11: 941-949.

- Dejda A., Sokolowska P. and Nowak J.Z.** 2005. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol. Rep.* 57: 307–20.
- Delgado M., Garrido E., De la Fuente M. and Gomariz R.P.** 1996. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) stimulates rat peritoneal macrophage functions. *Peptides* 17: 1097–1105.
- Delmas V. and Sassone-Corsi P.** 1994. The key role of CREM in the cAMP signaling pathway in the testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100: 121–4.
- Desbuquois B., Laudat M.H. and Laudat P.** 1973. Vasoactive intestinal polypeptide and glucagon: Stimulation of adenylate cyclase activity via distinct receptors in liver and fat cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 1187–1194.
- Dickson L., Aramori I., McCulloch J., Sharkey J. and Finlayson K.** 2006a. A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology* 51: 1086–1098.
- Dickson L., Aramori I., Sharkey J. and Finlayson K.** 2006b. VIP and PACAP receptor pharmacology: A comparison of intracellular signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070: 239–242.
- Dickson L. and Finlayson K.** 2009. VPAC and PAC receptors: from ligands to function. *Pharmacol. Ther.* 121: 294–316.
- Dimaline R., Reeve J.R., Shively J.E. and Hawke D.** 1984. Isolation and characterization of rat vasoactive intestinal peptide. *Peptides* 5: 183–187.
- Dimaline R., Young J., Thwaites D.T., Lee C.M., Shuttleworth T.J. and Thorndyke M.C.** 1987. A novel vasoactive intestinal peptide (VIP) from elasmobranch intestine has full affinity for mammalian pancreatic VIP receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 930: 97–100.
- Dodd J.M. and Sumpter J.P.** 1984. Fishes. In: Lamming G.E., editor *Marshall's. Physiology of reproduction*. 4th edition. Vol. 1. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne, New York: 1–126.
- Dolle P., Castrillo J.L., Theill L.E., Deerinick T., Ellismann M. and Karin M.** 1990. Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of the growth hormone gene activity. *Cell.* 60: 809–820.
- Du B.H., Eng J., Hulmes J.D., Chang M., Pan Y.C.E. and Yalow R.S.** 1985. Guinea pig has a unique mammalian VIP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 1093–1098.
- Duckles S.P. and Said S.I.** 1982. Vasoactive intestinal peptide as a neurotransmitter in the cerebral circulation. *Eur. J. Pharmacol.* 78: 371–374.
- El-Gehani F., Zhang F.P., Pakarinen P., Rannikko A. and Huhtaniemi I.** 1998a. Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol. Reprod.* 58: 116–123.
- El-Gehani F., Tena-Sempere M. and Huhtaniemi I.** 1998b. Vasoactive intestinal peptide is an important endocrine regulatory factor of fetal rat testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 139: 1474–1480.
- El-Gehani F., Tena-Sempere M. and Huhtaniemi I.** 1998c. Vasoactive intestinal peptide stimulates testosterone production by cultured fetal rat testicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140: 175–178.
- El-Gehani F., Tena-Sempere M. and Huhtaniemi I.** 2000. Evidence that Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 63: 1482–1489.
- Eng J., Du B.H., Raufman J.P. and Yalow R.S.** 1986. Purification and amino acid sequences of dog, goat and guinea pig VIPs. *Peptides* 7: 17–20.
- Eng J., Yu J., Rattan S. and Yalow R.S.** 1992. Isolation and amino acid sequences of opossum vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin octapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1809–1811.
- Fahrenkrug J.** 1993. Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol. Toxicol.* 72: 354–363.
- Fahrenkrug J.** 2010. VIP and PACAP. *Results Probl. Cell. Differ.* 50: 221–34.
- Fahrenkrug J. and Hannibal J.** 2004. Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides* 25: 393–401.

- Fradinger E.A. and Sherwood N.M.** 2000. Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 165: 211-219.
- Fradinger E.A., Cummings K.J. and Sherwood N.M.** 1996. GRF-PACAP gene in the zebrafish. *In* Program and Abstract, the 2nd IUBS Symposium on Advances in the Molecular Endocrinology of Fish. Toronto, Canada. P5.
- Fradinger E.A., Tello J.A., Rivier J.E. and Sherwood N.M.** 2005. Characterization of four receptor cDNAs: PAC₁, VPAC₁, a novel PAC₁ and a parzial GHRH in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 231: 49–63.
- Fukuhara C., Suzuki N., Matsumoto Y., Nakayama Y., Aoki K., Tsujimoto G., Inouye S.I. and Masuo Y.** 1997. Day–night variation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 229: 49–52.
- Galgano M. e D'Amore C.** 1953. Il ciclo sessuale annuo nel maschio di *Lacerta s.sicula Raf.* in *Atti della Società Italiana di Anatomia*, XV Convegno Sociale Milano 1953 *Monit. Zool. Ital. (suppl.)* 62: 320-325.
- Gaytan F., Martinez-Fuentes A.J., Gracia-Navarro F., Vaudry H. and Aguilar E.** 1994. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell. Tissue Res.* 276: 223-227.
- Ghatei M.A., Takahashi K., Suzuki Y., Gardiner J., Jones P.M. and Bloom S.R.** 1993. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J. Endocrinol.* 136: 159–166.
- Gobbetti A. and Zerani M.** 2002. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide induces testicular testosterone synthesis through PGE2 mediation in crested newt, *Triturus cristatus*. *J. Exp. Zool.* 293: 73-80.
- Gottschall P.E., Tatsuno I., Miyata A. and Arimura A.** 1990. Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 127: 272–277.
- Gottschall P.E., Tatsuno I. and Arimura A.** 1991. Hypothalamic binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: characterization and molecular identification. *FASEB J.* 5: 194–199.
- Gourlet P., Vilardaga J.P., De Neef P., Waelbroeck M., Vandermeers A. and Robberecht P.** 1996. The C-terminus ends of secretin and VIP interact with the N-terminal domains of their receptors. *Peptides* 17: 825–829.
- Gozes I., Avidor R., Yahav Y., Katznelson D., Croce C.M. and Huebner K.** 1987. The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p2–6qter. *Hum. Genet.* 75: 41–44.
- Gozes I. and Fridkin M.** 1992. A fatty neuropeptide. Potential drug for non invasive impotence treatment in a rat model. *J. Clin. Invest.* 90: 810–814.
- Gray S.L., Cummings K.J., Jirik F.R. and Sherwood N.M.** 2001. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol. Endocrinol.* 15: 1739-47.
- Gronenborn A.M., Bovermann G. and Clore G. M.** 1987. A 1H-NMR study of the solution conformation of secretin. Resonance assignment and secondary structure. *FEBS Lett.* 215: 88–94.
- Hahm S.H. and Eiden L.E.** 1996. Tissue-specific expression of the vasoactive intestinal peptide gene requires both an upstream tissue specifier element and the 59 proximal cyclic AMP-responsive element. *J. Neurochem.* 67: 1872–1881.
- Hamlett W.C. and Koob T.J.** 1999. Male reproductive system. In: *Sharks, skates and rays. The Biology of elasmobranch fishes.* Edited by Hamlett W.C. Baltimore: The Johns University Press. 444-466.
- Hannibal J., Sundler F. and Udderman.** 1982. In: *Vasoactive Intestinal Peptide.* Said S.I. (ed.). Raven, New York.
- Hannibal J. and Fahrenkrug J.** 1995. Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene by rat spermatogenic cells *Regulat. Pept.* 55: 111-115.

- Harakall S.A., Brandenburg C.A., Gilmartin G.A., May V. and Braas K.M.** 1998. Induction of multiple pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) transcripts through alternative cleavage and polyadenylation of proPACAP precursor mRNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865: 367–374.
- Hashimoto H., Ishihara T., Shigemoto R., Mori K. and Nagata S.** 1993. Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron*. 11: 333-342.
- Hashimoto H., Yamamoto K., Hagihara N., Ogawa N., Nishino A., Aino H., Nogi H., Imanishi K., Matsuda T. and Baba A.** 1996a. cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1281: 129-133.
- Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S. and Baba A.** 1996b. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 371: 567–577.
- Hashimoto H., Ogawa N., Hagihara N., Yamamoto K., Imanishi K., Nogi H., Nishino A., Fujita T., Matsuda T., Nagata S. and Baba A.** 1997. Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and activation. *Mol. Pharmacol.* 52: 128–35.
- Hashimoto H., Hagihara N., Koga K., Yamamoto K., Shintani N., Tomimoto S., Mori W., Koyama Y., Matsuda T. and Baba A.** 2000. Synergistic induction of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression by nerve growth factor and PACAP in PC12 cells. *J. Neurochem.* 74: 501-507.
- Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., Mori W., Hirose M., Matsuda T., Sakaue M., Miyazaki J., Niwa H., Tashiro F., Yamamoto K., Koga K., Tomimoto S., Kunugi A., Suetake S. and Baba A.** 2001. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13355-60.
- Hedlund P., Alm P., Hedlund H., Larsson B. and Andersson K.E.** 1994. Localization and effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human penile erectile tissue. *Acta Physiol. Scand.* 150: 103–104.
- Hedlund P., Alm P., Ekström P., Fahrenkrug J., Hannibal J., Hedlund H., Larsson B. and Andersson K.E.** 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2258–2266.
- Heindel J.J., Powell C.J., Paschall C.S., Arimura A. and Culler M.D.** 1992. A novel hypothalamic peptide, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. *Biol. Reprod.* 47: 800-806.
- Henle F., Fischer C., Meyer D.K. and Leemhuis J.** 2006. Vasoactive intestinal peptide and PACAP38 control N-methyl-D-aspartic acid-induced dendrite motility by modifying the activities of Rho GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases. *J. Biol. Chem.* 281: 24955–24969.
- Holtmann M.H., Hadac E.M. and Miller L.J.** 1995. Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. Studies of chimeric receptors. *J. Biol. Chem.* 270: 14394–8.
- Hoo R.L.C., Alexandre D., Chan S.M., Anouar Y., Pang R.T.K., Vaudry H. and Chow B.K.C.** 2001. Structural and functional identification of a VPAC₂ receptor from the frog *Rana tigrina rugulosa*. *J. Mol. Endocrinol.* 27:229-38.
- Hosoya M., Kimura C., Ogi K., Ohkubo S., Miyamoto Y., Kugoh H., Shimizu M., Onda H., Oshimura M., Arimura A. and Fujino M.** 1992. Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1129: 199-206.
- Hu Z., Lelievre V., Tam J., Cheng J.W., Fuenzalida G., Zhou X. and Waschek J.A.** 2000a. Molecular cloning of growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the frog, *Xenopus laevis*: brain distribution and regulation after castration. *Endocrinology* 141: 3366-3376.
- Hu Z., Lelievre V., Chao A., Zhou X. and Waschek J.A.** 2000b. Characterization and messenger ribonucleic acid distribution of a cloned pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor in the frog *Xenopus laevis* brain. *Endocrinology* 141: 657-665.

- Huang W.T., Li C.J., Wu P.J., Chang Y.S., Lee T.L. and Weng C.F.** 2009. Expression and in vitro regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP38) and its type I receptor (PAC1R) in the gonads of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Reproduction* 137: 449–467.
- Hubel K.A.** 1972. Secretin: a long progress note. *Gastroenterology* 62: 318–341.
- Hueso C., Carmena M.J. and Prieto J.C.** 1989. Identification of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat testis Leydig cells and study of developmental changes. *Biochem. Int.* 19: 951–958.
- Hughes A.L.** 1999. Phylogenies of developmentally important proteins do not support the hypothesis of two rounds of genome duplication early in vertebrate history. *J. Mol. Evol.* 48: 565–76.
- Inagaki N., Yoshida H., Mizuta M., Mizuno N., Fujii Y., Gono T., Miyazaki J.I. and Seino S.** 1994. Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2679–2683.
- Inooka H., Endo S., Kitada C., Mizuta E. and Fujino M.** 1992. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by ¹H NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40: 456–464.
- Ishihara T., Shigemoto R., Mori K., Takahashi K. and Nagata S.** 1992. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron*. 8: 811–819.
- Itoh N., Obata K., Yanaihara N. and Okamoto H.** 1983. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* 304: 547–549.
- Jamen F., Persson K., Bertrand G., Rodriguez-Henche N., Puech R., Bockaert J., Ahrén B. and Brabet P.** 2000. PAC1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance. *J. Clin. Invest.* 105: 1307–15.
- Johnson M.C., McCormack R.J., Delgado M., Martinez C. and Ganea D.** 1996. Murine T lymphocytes express vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIP-R1) mRNA. *J. Neuroimmunol.* 68: 109–119.
- Joo K.M., Chung Y.H., Kim M.K., Nam R.H., Lee B.L., Lee K.H. and Cha C.I.** 2004. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476: 388–413.
- Journot L., Pantaloni C., Dumuis A., Sebben M. and Bockaert J.** 1994. The PACAP receptor: Generation by alternative splicing of functional diversity among G protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin. Cell. Biol.* 5: 263–272.
- Kalamatianos T., Kallo I., Piggins H.D. and Coen C.W.** 2004. Expression of VIP and/or PACAP receptor mRNA in peptide synthesizing cells within the suprachiasmatic nucleus of the rat and in its efferent target sites. *J. Comp. Neurol.* 475: 19–35.
- Kanzaki M., Fujisawa M., Okuda Y., Okada H., Arakawa S. and Kamidono S.** 1996. Expression and regulation of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in cultured immature rat Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 137: 1249–57.
- Kasson B.G., Lim P. and Hsueh A.J.W.** 1986. Vasoactive intestinal peptide stimulates androgen biosynthesis by cultured neonatal testicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 48: 21–29.
- Kimura C., Ohkubo S., Ogi K., Hosoya M., Itoh Y., Onda H., Miyata A., Jiang L., Dahl R.R., Stibbs H.H., Arimura A. and Fujino M.** 1990. A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 81–89.
- Koh P.O., Noh H.S., Kim Y.S., Cheon E.W., Kim H.J., Kang S.S., Cho G.J. and Choi W.S.** 2003. Cellular localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat testis. *Mol. Cells.* 15: 271–6.
- Kononen J., Paavola M., Penttilä T.L., Parvinen M. and Pelto-Huikko M.** 1994. Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mRNA in the rat seminiferous tubules. *Endocrinology*. 135: 2291–4.
- Koves K., Arimura A., Gorcs T.G. and Somogyvari-Vigh A.** 1991. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 54: 159–169.

- Krepmpels K., Usdin T.B., Harta G. and Mezey E.** 1995. PACAP acts through VIP type 2 receptors in the rat testis. *Neuropeptides* 29: 315–320.
- Krueckl S.L., Fradinger E.A. and Sherwood N.M.** 2003. Developmental changes in the expression of growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 455: 396-405.
- Kumar S., Tamura K. and Nei M.** 2004. MEGA4: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150–163.
- Kwok Y.Y., Chu J.Y., Vaudry H., Yon L., Anouar Y. and Chow B.K.** 2006. Cloning and characterization of a PAC1 receptor hop-1 splice variant in goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 188–96.
- Laburthe M., Couvineau A. and Marie J.C.** 2002. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Recept. Channels* 8: 137–53.
- Lacombe A., Lelievre V., Roselli C.E., Salameh W., Lue Y.H., Lawson G., Muller J.M., Waschek J.A. and Vilain E.** 2006. Delayed testicular aging in pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3793– 3798.
- Lacombe A., Lelievre V., Roselli C.E., Muller J.M., Waschek J.A. and Vilain E.** 2007. Lack of vasoactive intestinal peptide reduces testosterone levels and reproductive aging in mouse testis. *J. Endocrinol.* 194: 153–160
- Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Laforgia V., De Falco M., Capaldo A. and Varano L.** 1999. Immunohistochemical localization of VIP in the adrenal gland of the lizard *Podarcis sicula*. *Brain Research* 848: A22.
- Lam H.C., Takahashi K., Ghatei M.A., Kanze S.M., Polak J.M. and Bloom S.R.** 1990. Binding sites of a novel neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung. *Eur. J. Biochem.* 193: 725-729.
- Lamperti E.D., Rosen K.M. and Villa-Komaroff L.** 1991. Characterization of the gene and messages for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat and mouse. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 9: 217–231.
- Langer I., Vertongen P., Perret J., Waelbroeck M. and Robberecht P.** 2002. A small sequence in the third intracellular loop of the VPAC₁ receptor is responsible for its efficient coupling to the calcium effector. *Molec. Endocrinol.* 16: 1089-1096.
- Langer I. and Robberecht P.** 2005. Mutations in the carboxy-terminus of the third intracellular loop of the human recombinant VPAC₁ receptor impair VIP-stimulated [Ca²⁺]_i increase but not adenylate cyclase stimulation. *Cell Signal.* 17: 17–24.
- Larsson L.I., Edvinsson L., Fahrenkrug J., Hakanson R., Owman C., Schaffalitzky d.M. and Sundler F.** 1976a. Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerves. *Brain Res.* 113: 400–404.
- Larsson L.I., Fahrenkrug J., Schaffalitzky d.M., Sundler F., Hakanson R. and Rehfeld J.R.** 1976b. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3197–3200.
- Leceta J., Martinez M.C., Delgado M., Garrido E. and Gomariz R.P.** 1994. Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in the rat. *Peptides* 15: 791–797.
- Lee L.T., Siu F.K., Tam J.K., Lau I.T., Wong A.O., Lin M.C., Vaudry H. and Chow B.K.** 2007. Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2133–8.
- Lee L.T.O., Tam J.K.V., Chan D.W. and Chow B.K.C.** 2009. Molecular Cloning and mRNA Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PACAP-related peptide in the lungfish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1163: 209–214.
- Leung P.S., Wong T.P., Wong P.Y. and Chan H.C.** 1998. Localization and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat epididymis. *Cell Biol. Int.* 22: 193–198.

- Leung M.Y.** 1999. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel growth hormone-releasing factor in the goldfish. M.Phil. thesis, University of Hong Kong, Hong Kong.
- Li M., Nakayama K., Somogivari-Vigh A. and Arimura A.** 1998. Testis-specific prohormone convertase PC4 processes the precursor of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Peptides* 17: 359-368.
- Li M., Mbikay M. and Arimura A.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor is processed solely by prohormone convertase 4 in the gonads. *Endocrinology* 141: 3723-3730.
- Li M. and Arimura A.** 2003. Neuropeptides of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide/growth hormone-releasing hormone/secretin family in testis. *Endocrin.* 20: 201-14.
- Li M., Funahashi H., Mbikay M., Shioda S. and Arimura A.** 2004. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrine.* 23: 59-75.
- Li W.H.** 1993. Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J. Mol. Evol.* 36: 96-99.
- Licht P.** 1973. Thermal and photic influences of reptilian reproduction. International Endocrinology Congress, Washington DC. Excerpta Medica International Congress Series, 273: 185-190.
- Licht P. and Pearson A.K.** 1969. Effects of adenohipophysectomy on testicular function in the lizard *Anolis carolinensis*. *Biol. Reprod.* 1: 107-119.
- Liguoro A., Prisco M., Mennella C., Ricchiari L., Angelini F. and Andreuccetti P.** 2004. Distribution of terminal sugar residues in the testis of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 524-30.
- Linder S., Barkhem T., Norberg A., Persson H., Schalling M., Hökfelt T. and Magnusson G.** 1987. Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 605-609.
- Lins L., Couvineau A., Rouyer-Fessard C., Nicole P., Maoret J.J., Benhamed M., Brasseur R., Thomas A. and Laburthe M.** 2001. The human VPAC1 receptor: Three-dimensional model and mutagenesis of the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276: 10153-10160.
- Lissbrant E. and Bergh A.** 1997. Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the testicular vasculature of the rat. *Int. J. Androl.* 20: 356-60.
- Lissbrant E., Collin O. and Bergh A.** 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): effects on blood flow in the testis and caput epididymidis of the rat. *J. Androl.* 20: 366-374.
- Lofts B.** 1972. The Sertoli cells. *Cen Comp. Endocrinol. Suppl.* 3: 636-648.
- Lofts B.** 1987. Testicular function. In: Norris, D.O., Commercial, R.E.J. (Eds.), *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. Plenum Press, NY: 283-325.
- Lutz E.M., Sherward W.J., West K.M., Morrow J.A., Fink G. and Harmar A.J.** 1993. The VIP₂ receptor: Molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* 334: 3-8.
- Lutz E.M., Ronaldson E., Shaw P., Johnson M.S., Holland P.J. and Mitchell R.** 2006. Characterization of novel splice variants of the PAC₁ receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Mol. Cell. Neurosci.* 31: 193-209.
- Macdonald D.S., Weerapura M., Beazely M.A., Martin L., Czerwinski W., Roder J.C., Orser B.A. and MacDonald J.F.** 2005. Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G α_q , protein kinase C, and activation of Src. *J. Neurosci.* 25: 11374-11384.
- Mackay M., Fantès J., Scherer S., Boyle S., West K., Tsui L.C., Belloni E., Lutz E., Van Heyningen V. and Harmar A.J.** 1996. Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: A possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. *Genomics* 37: 345-353.

- MacKenzie C.J., Lutz E.M., McCulloch D.A., Mitchell R. and Harmar A.J.** 1996. Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS7 cells involves a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 805: 579–584.
- Masuo Y., Suzuki N., Matsumoto H., Tokito F., Matsumoto Y., Tsuda M. and Fujino M.** 1993. Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res* 602: 57–63.
- Matsuda K., Takei Y., Katoh J.I., Shioda S., Arimura A. and Uchiyama M.** 1997. Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides* 18: 723-727.
- Matsuda K., Yoshida T., Nagano Y., Kashimoto K., Yatohgo T., Shimomura H., Shioda S., Arimura A. and Uchiyama M.** 1998a. Purification and primary structure of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) from the brain of an elasmobranch, stingray, *Dasyatis akajei*. *Peptides* 19: 1489-1495.
- Matsuda K., Itoh Y., Yoshida T., Shioda S., Arimura A. and Uchiyama M.** 1998b. The localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in the hypothalamo-pituitary region of an elasmobranch, stingray, *Dasyatis akajei*. *Peptides* 19: 1263-1267.
- Matsumoto A.M., Karpas A.E. and Bremner W.J.** 1986. Chronic human chorionic gonadotropin administration in normal men: evidence that follicle-stimulating hormone is necessary for the maintenance of quantitatively normal spermatogenesis in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 1184-1192.
- McArdle C.A.** 1994 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a key player in reproduction? *Endocrinology*. 135: 815-7.
- McCulloch D.A., Lutz E.M., Johnson M.S., MacKenzie C.J. and Mitchell R.** 2000. Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921: 175–185.
- McFarlin D.R., Lehn D.A., Moran S.M., MacDonald M.J. and Epstein M.L.** 1995. Sequence of a cDNA encoding chicken vasoactive intestinal peptide (VIP). *Gene* 154: 211–213.
- McRory J.E. and Sherwood N.M.** 1997. Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology* 138: 2380-2390.
- McRory J.E., Parker D.B., Ngamvongchon S. and Sherwood N.M.** 1995. Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108: 169-177.
- McRory J.E., Parker R.L. and Sherwood N.M.** 1997. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *DNA Cell. Biol.* 16: 95-102.
- Mellinger J.** 1965. Stades de la spermatogenesi chez *Scyliorhinus caniculus*. *Zellforsch* 67: 653-673.
- Meyer A. and Van de Peer Y.** 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* 27: 937–945.
- Miao F.J. and Lee T.J.** 1990. Cholinergic and VIPergic innervation in cerebral arteries: A sequential double-labeling immunohistochemical study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 32–37.
- Mikkelsen J.D. and Fahrenkrug J.** 1994. Concentrations and distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP), peptide histidine isoleucine (PHI) and peptide histidine valine (PHV) in the cerebral cortex and the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Brain Res.* 656: 95–107.
- Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D. and Coy D.H.** 1989. Isolation of a novel 38 residues-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
- Miyata A., Jiang L., Dahl R.D., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N. and Arimura A.** 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 643-648.
- Moody T.W., Chan D., Fahrenkrug J. and Jensen R.T.** 2003a. Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des* 9: 495–509.

- Moody T.W., Hill J.M. and Jensen R.T.** 2003b. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides* 24: 163–77.
- Moretti C., Mencacci C., Frajese G.V., Cerilli M. and Frajese G.** 2002. Growth hormone-realising hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 428-35.
- Morisset J., Douziech N., Rydzewska G., Buscail L. and Rivard N.** 1995. Cell signaling pathway involved in PACAP-induced AR4-2J cell proliferation. *Cell. Signal.* 7: 195–205.
- Moroo I., Tatsuno I., Uchida D., Tanaka T., Saito J., Saito Y. and Hirai A.** 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 795: 191-196.
- Muller J.M., Lelievre V., Becq-Giraudon L. and Meunier A.C.** 1995. VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. *Mol. Neurobiol.* 10: 115–34.
- Mutt V. and Said S.I.** 1974. Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur. J. Biochem.* 42: 581–589.
- Nei M. and Kumar S.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford Univ. Press, New York.
- Nicholson H.D., Swann R.W., Burford G.D., Wathes D.C., Porter D.G. and Pickering B.T.** 1984. Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. *Regul. Pept.* 2: 141-6.
- Nilsson A.** 1975. Structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from the chicken intestine. *FEBS Lett.* 60: 322–326.
- Ogi K., Kimura C., Onda H., Arimura A. and Fujino M.** 1990. Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1271-1279.
- Ogi K., Miyamoto Y., Masuda Y., Habata Y., Hosoya M., Ohtaki T., Masuo Y., Onda H. and Fujino M.** 1993. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1511-1521.
- Ohkubo S., Kimura C., Ogi K., Okazaki K., Hosoya M., Onda H., Miyata A., Arimura A. and Fujino M.** 1992. Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA Cell. Biol.* 11: 21-30.
- Ohta M., Funakoshi S., Kawasaki T. and Itoh N.** 1992. Tissue-specific expression of the rat secretin precursor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 390-5.
- Okazaki K., Itoh Y., Ogi K., Ohkubo S. and Onda H.** 1995. Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides* 16: 1295-1299.
- Olsson C.** 2002. Distribution and effects of PACAP, VIP, nitric oxide and GABA in the gut of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.* 205: 1123–34.
- Onoue S., Nagano Y., Tatsuno I., Uchida D. and Kashimoto K.** 1999. Receptor-binding specificity depending on N-terminal structure of VIP/PACAP. *Biomed. Res.* 20: 219–231.
- Onoue S., Waki Y., Nagano Y., Satoh S. and Kashimoto K.** 2001. The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures. *Peptides* 22: 867–872.
- Onoue S., Matsumoto A., Nagano Y., Ohshima K., Ohmori Y., Yamada S., Kimura R., Yajima T. and Kashimoto K.** 2004. Alpha-helical structure in the C-terminus of vasoactive intestinal peptide: functional and structural consequences. *Eur. J. Pharmacol.* 485: 307–316.
- Onoue S., Misaka S. and Yamada S.** 2008. Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377: 579–590.

- Palle C., Ottesen B. and Fahrenkrug J.** 1992. Peptide histidine valine (PHV) is present and biologically active in the human female genital tract. *Regul. Pept.* 38: 101-9.
- Pamilo P. and Bianchi N.O.** 1993. Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes. *Mol. Biol. Evol.* 10: 271-281.
- Pantaloni C., Brabet P., Bilanges B., Dumuis A., Houssami S., Spengler D., Bockaert J. and Journot L.** 1996. Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptors selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* 271: 22146-22151.
- Parker D.B., Coe I.R., Dixon G.H. and Sherwood N.M.** 1993. Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *Eur. J. Biochem.* 215: 439-448.
- Parker D.B., Power M.E., Swanson P., River J. and Sherwood N.M.** 1997. Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology* 138: 414-423.
- Peeters K., Gerets H.H., Princen K. and Vandesande F.** 1999. Molecular cloning and expression of a chicken pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71: 244-255.
- Peeters K., Gerets H.H., Arckens L. and Vandesande F.** 2000. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor mRNA in the chicken brain. *J. Comp. Neurol.* 423: 66-82.
- Pekary A.E., Yamada T., Sharp B., Bhasin S., Swerdloff R.S. and Hershman J.M.** 1984. Somatostatin-14 and -28 in the male rat reproductive system. *Life Sci.* 34: 939-45.
- Pilzer I. and Gozes I.** 2006. A splice variant to PACAP receptor that is involved in spermatogenesis is expressed in astrocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070: 484-490.
- Pisegna J.R. and Wank S.A.** 1993. Molecular cloning and functional expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6345-6349.
- Pisegna J.R. and Wank S.A.** 1996. Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 17267-17274.
- Pohl M. and Wank S.A.** 1998. Molecular cloning of helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. *J. Biol. Chem.* 273: 9778-9784.
- Power D.M. and Ingleton P.M.** 1998. Distribution of vasoactive intestinal peptide in the brain and hypothalamo-hypophysial system of the sea bream (*Sparus aurata*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 839: 356-7.
- Prisco M., Liguoro A., D'Onghia B., Ricchiari L., Andreuccetti P. and Angelini F.** 2002. Fine structure of Leydig and Sertoli cells in the testis of immature and mature Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.* 63: 192-201.
- Prisco M., Liguoro A., Comitato R., Cardone A., D'Onghia B., Ricchiari L., Angelini F. and Andreuccetti P.** 2003. Apoptosis during spermatogenesis in the Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 341-348.
- Prisco M., Liguoro A., Ricchiari L., Angelini F. and Andreuccetti P.** 2007. Cadherin in developing and maturing cysts of *Torpedo marmorata* testis. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 242-248.
- Prisco M., Liguoro A., Ricchiari L., Del Giudice G., Angelini F. and Andreuccetti P.** 2008. Immunolocalization of 3beta-HSD and 17beta-HSD in the testis of the Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 157-163.
- Properzi G., Cordeschi G. and Francavilla S.** 1992. Postnatal development and distribution of peptide-containing nerves in the genital system of the male rat. An immunohistochemical study. *Histochemistry.* 97: 61-8.
- Pudney J.** 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32:459-97.

- Re R.N.** 2003. Implications of intracrine hormone action for physiology and medicine. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H751–H757.
- Reubi J.C., Laderach U., Waser B., Gebbers J.O., Robberecht P. and Laissue J.A.** 2000. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res.* 60: 3105–3112.
- Robberecht P., Gourlet P., De Neef P., Woussen-Colle M.C., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A. and Christophe J.** 1992. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6–38) as a potent antagonist. *Eur. J. Biochem.* 207: 239–246.
- Robinson R.M., Blakeney E.W. Jr. and Mattice W.L.** 1982. Lipid-induced conformational changes in glucagon, secretin, and vasoactive intestinal peptide. *Biopolymers* 21: 1271–1228
- Romanelli F., Fillo S., Isidori A. and Conte D.** 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro. *Neuropeptides* 31: 311–317.
- Rossato M., Nogara A., Gottardello F., Bordon P. and Foresta C.** 1997. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide stimulates rat Leydig cell steroidogenesis through a novel transduction pathway. *Endocrinology* 138: 3228–3235.
- Said S.I. and Mutt V.** 1970a. Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science* 169: 1217–1218.
- Said S.I. and Mutt V.** 1970b. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225: 863–864.
- Schulze W., Davidoff M.S. and Holstein A.F.** 1987. Are Leydig cells of neural origin? Substance P-like immunoreactivity in human testicular tissue. *Acta Endocrinol.* 115: 373–7.
- Sena M., Bravo D.T., Agoston D. and Waschek J.A.** 1994. High conservation of upstream regulatory sequences on the human and mouse vasoactive intestinal peptide (VIP) genes. *DNA Seq.* 5: 25–29.
- Sherwood N.M., Krueckl S.L. and McRory J.E.** 2000. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/Glucagon superfamily. *Endocrine Review* 21: 619–670.
- Sheward W.J., Lutz E.M. and Harmar A.J.** 1995. The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by *in situ* hybridization. *Neuroscience* 67: 409–418.
- Shioda S., Legradi G., Leung W.C., Nakajo S., Nakaya K. and Arimura A.** 1994. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Endocrinology* 135: 818–825.
- Shioda S., Nakajo S., Nakai Y. and Arimura A.** 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a key player in male reproduction? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 839: 524–5.
- Shivers B.D., Gorcs T.J., Gottschall P.E. and Arimura A.** 1991. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distribution. *Endocrinology* 128: 3055–3065.
- Shuto Y., Somogyvári-Vigh A., Shioda S., Onda H. and Arimura A.** 1995. Effect of hypophysectomy on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression in the rat testis. *Peptides* 16: 1039–1044.
- Small B.C. and Nonneman D.** 2001. Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen. Compar. Endocrinol.* 122: 354–363.
- Spengler D., Waeber C., Pantaloni C., Holsboer F., Bocaert J., Seeburg F.H. and Journot L.** 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365: 170–175.
- Sreedharan S.P., Patel D.R., Huang J.X. and Goetzl E.J.** 1993. Cloning and functional expression of human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 546–553.

- Sreedharan S.P., Huang J.X., Cheung M.C. and Goetzl E.J.** 1995. Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2939-2943.
- Stanley H.P.** 1966. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus canicula* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Z. Zallforsch.* 75: 453-468.
- Suda K., Smith D.M., Ghatei M.A. and Bloom S.R.** 1992. Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain. *Neurosci. Lett.* 137: 19-23.
- Suzuki N., Harada M., Hosoya M. and Fujino M.** 1994. Enhanced production of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by 1,N⁶-dibutyryl adenosine 3'5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. *Eur. J. Biochem.* 223: 147-153.
- Sze K.H., Zhou H., Yang Y., He M., Jiang Y. and Wong A.O.L.** 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* 148: 5042-59.
- Tainio H.** 1994. Peptidergic innervation of the human testis and epididymis. *Acta Histochem.* 96: 415-20.
- Talbot R.T., Dunn I.C., Wilson P.W., Sang H.M. and Sharp P.J.** 1995. Evidence for alternative splicing of the chicken vasoactive intestinal polypeptide gene transcript. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 81-91.
- Tatemoto K. and Mutt V.** 1981. Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6603-6607.
- Teng B.Q., Grider J.R. and Murthy K.S.** 2001. Identification of a VIP-specific receptor in guinea pig tenia coli. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281: G718-G725.
- Theriault Y., Boulanger Y. and St-Pierre S.** 1991. Structural determination of the vasoactive intestinal peptide by two-dimensional H-NMR spectroscopy. *Biopolymers* 31: 459-464.
- Thwaites D.T., Young J., Thorndyke M.C. and Dimaline R.** 1989. The isolation and chemical characterization of a novel vasoactive intestinal peptide-related peptide from a teleost fish, the cod, *Gadus morhua*. *Biochim. Biophys. Acta* 999: 217-220.
- Tolentino P.J., Dikkes P., Tsuruda L., Ebert K., Fink J.S., Villa-Komaroff L. and Lamperti E.D.** 1995. Quantitative analysis of the expression of a VIP transgene. *Mol. Brain. Res.* 33: 47-60.
- Tominaga A., Sugawara H., Futagawa T., Inoue K., Sasaki K., Minamino N., Hatakeyama M., Handa H. and Miyata A.** 2010. Characterization of the testis-specific promoter region in the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Genes Cells.* 15: 595-606.
- Tompkins J.D., Hardwick J.C., Locknar S.A., Merriam L.A. and Parsons R.L.** 2006. Ca²⁺ influx, but not Ca²⁺ release from internal stores, is required for the PACAP-induced increase in excitability in guinea pig intracardiac neurons. *J. Neurophysiol.* 95: 2134-2142.
- Tse D.L., Pang R.T., Wong A.O., Chan S.M., Vaudry H. and Chow B.K.** 2002. Identification of a potential receptor for both peptide histidine isoleucine and peptide histidine valine. *Endocrinology* 143: 1327-36.
- Tsukada T., Horovitch S.J., Montminy M.R., Mandel G. and Goodman R.H.** 1985. Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene. *DNA* 4: 293-300.
- Uddman R., Goadsby P.J., Jansen I. and Edvinsson L.** 1993. PACAP, a VIP-like peptide: Immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries and cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13: 291-297.
- Unson C.G.** 2002. Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers* 66: 218-235.
- Usdin T.B., Bonner T.I. and Mezey E.** 1994. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135: 2662-2680.

- Vaalasti A., Tainio H., Pelto-Huikko M. and Hervonen A.** 1986. Light and electron microscope demonstration of VIP- and enkephalin-immunoreactive nerves in the human male genitourinary tract. *Anat Rec.* 215: 21-7.
- Valiante S., Prisco M., Ricchiari L., Laforgia V., Varano L. and Andreuccetti P.** 2006. Distribution of PACAP in the brain of the cartilaginous fish *Torpedo marmorata*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070: 591-6.
- Valiante S., Prisco M., Capaldo A., Zambrano I., De Falco M., Andreuccetti P., Laforgia V. and Varano L.** 2007. Molecular characterization and gene expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the lizard brain. *Brain Res.* 1127: 66-75.
- Valiante S., Prisco M., Sciarrillo R., De Falco M., Capaldo A., Gay F., Andreuccetti P., Laforgia V. and Varano L.** 2008. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors: distribution and involvement in the secretion of *Podarvis sicula* adrenal gland. *J. Endocrinol.* 196: 291-303.
- Valiante S., Prisco M., De Falco M., Sellitti A., Zambrano I., Sciarrillo R., Capaldo A., Gay F., Andreuccetti P. and Laforgia V.** 2009. Distribution and molecular evolution of the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the lizard *Podarvis sicula* (Squamata, Lacertidae). *J. Mol. Neurosci.* 39: 144-156.
- Van de Peer Y., Taylor J.S. and Meyer A.** 2003. Are all fishes ancient polyploids? *J. Struct. Funct. Genomics* 3: 65-73.
- Van Geldre L.A. and Lefebvre R. A.** 2004. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr. Pharm. Des.* 10: 2483-2497.
- Van Rampelbergh J., Goulot P., De Neef P., Robberecht P. and Waelbroeck M.** 1996. Properties of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide I and II receptors, vasoactive intestinal peptide-1, and chimeric amino-terminal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal peptide-1 receptors: Evidence for multiple receptor states. *Mol. Pharmacol.* 50: 1596-1604.
- Vaudry D., Gonzales B.J., Basille M., Yon L., Fournier A. and Vaudry H.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
- Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Fournier A., Chow B.K., Hashimoto H., Galas L. and Vaudry H.** 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61: 283-357.
- Wang Y. and Conlon J.M.** 1993. Neuroendocrine peptides (NPY, GRP, VIP, somatostatin) from the brain and stomach of the alligator. *Peptides* 14: 573-579
- Wang Y. and Conlon J.M.** 1995. Purification and structural characterization of vasoactive intestinal polypeptide from the trout and bowfin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98: 94-101
- Wang Y., Li J., Ying Wang C., Ho Yan Kwok A. and Leung F.C.** 2007. Identification of the endogenous ligands for chicken growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor: evidence for a separate gene encoding GHRH in submammalian vertebrates. *Endocrinology* 148: 2405-16.
- Waschek J.A.** 1995. Vasoactive intestinal peptide: an important trophic factor and developmental regulator? *Dev. Neurosci.* 17: 1-7.
- Watkins C.C., Boehning D., Kaplin A.I., Rao M., Ferris C.D. and Snyder S.H.** 2004. Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2631-2635.
- Werkstrom V., Alm P., Persson K. and Andersson K.E.** 1998. Inhibitory innervation of the guinea-pig urethra; roles of CO, NO and VIP. *J. Auton. Nerv. Syst.* 74: 33-42.
- West A.P., Sharpe R.M. and Saunders P.T.** 1994. Differential regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein and cAMP response element modulator messenger ribonucleic acid transcripts by follicle-stimulating hormone and androgen in the adult rat testis. *Biol. Reprod.* 50: 869-81.

- West A.P., McKinnell C., Sharpe R.M. and Saunders P.T.K.** 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide can regulate testicular germ cell protein synthesis in vitro. *J. Endocrinol.* 144: 215–223.
- Wong A.O.L., Leung M.Y., Shea W.L.C., Tse L.Y., Chan J.P. and Chow B.K.C.** 1998. Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: Immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology* 139: 3465–3476.
- Wong A.O.L., Li W.S., Lee E.K.Y., Leung M.Y., Tse L.Y., Chow B.K.C., Lin H.R. and Chang J.P.** 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 329–343.
- Wong P.Y.D.** 1990. Electrolyte and fluid transport in the epididymis. In: *Epithelial Secretion of Water and Electrolytes: 333–347.* Eds JA Young & PYD Wong. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Wourms J.P.** 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *Amer. Zool.* 17: 379–410.
- Wray V., Kokoschke C., Nokihara K. and Naruse S.** 1993. Solution structure of pituitary adenylate cyclase-activating peptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32: 5832–5841.
- Wray V., Nokihara K. and Naruse S.** 1998. Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 865: 37–44.
- Wu S., Roch G.J., Cervini L.A., Rivier J.E. and Sherwood N.M.** 2008. Newly-identified receptors for peptide histidine-isoleucine and GHRH-like peptide in zebrafish help to elucidate the mammalian secretin superfamily. *J. Mol. Endocrinol.* 41: 343–366.
- Yada T., Sakurada M., Ihida K., Nakata M., Murata F., Arimura A. and Kikuchi M.** 1994. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an extraordinarily potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet beta cells. *J. Biol. Chem.* 269: 1290–1293.
- Yamagami T., Ohsawa K., Nishizawa M., Inoue C., Gotoh E., Yanaihara N., Yamamoto H. and Okamoto H.** 1988. Complete nucleotide sequence of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 gene and its inducible promoter. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527: 87–102.
- Yamamoto K., Hashimoto H., Hagihara N., Nishino A., Fujita T., Matsuda T. and Baba A.** 1998. Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* 211: 63–69.
- Yanaihara H., Vigh S., Kozicz T., Somogyvári-Vigh A. and Arimura A.** 1998. Immunohistochemical demonstration of the intracellular localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat testis using the stamp preparation. *Regul. Pept.* 78: 83–8.
- Yiangou Y., Di Marzo V., Spokes R.A., Panico M., Morris H.R. and Bloom S.R.** 1987. Isolation, characterization and pharmacological actions of peptide histidine valine 42, a novel prepro-vasoactive intestinal peptide-derived peptide. *J. Biol. Chem.* 262: 14010–14013.
- Yon L., Alexandre D., Montèro M., Chartrel N., Jeandel L., Vallarino M., Conlon J.M., Kikuyama S., Fournier A., Gracia-Navarro F., Roubos E., Chow B., Arimura A., Anouar Y. and Vaudry H.** 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in amphibians. *Microsc. Res. Tech.* 54: 137–157.
- Zhou C.J., Kikuyama S., Shibamura M., Hirabayashi T., Nakajo S., Arimura A. and Shioda S.** 2000. Cellular distribution of the splice variants of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in the rat brain by *in situ* RTPCR. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 75: 150–158.
- Zhou H., Huang J. and Murthy K.S.** 2006. Molecular cloning and functional expression of a VIP-specific receptor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G728–G734.
- Zhou W.L., Leung P.S., Wong T.P., Dun N.J., Wong P.Y. and Chan H.C.** 1997. Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J. Endocrinol.* 154: 389–395.
- Zhu B.C., Chiochio S.R., Suburo A.M. and Tramezzani J.H.** 1995. Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and the inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat. *J. Androl.* 16: 248–58.