



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOLOGICHE  
BIOLOGIA AVANZATA INDIRIZZO EVOLUZIONISTICO

XXIV CICLO

**RUOLO DELLA SELENIOPROTEINA GLUTATIONE  
PEROSSIDASI IDROSSIDO FOSFOLIPIDE (PHGP<sub>x</sub>) NELLA  
SPERMATOGENESI DI VERTEBRATI NON MAMMIFERI**

**COORDINATORE:** CH.MO PROF. LUCIANO GAUDIO

**TUTORE:** CH.MO PROF. GAETANO CIARCIA

**COTUTORE:** CH.MA PROF.SSA VINCENZA LAFORGIA

**DOTTORANDO:** DR. ROSARIO BATTIMO

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

*Crederci sempre arrendersi mai (S.V.)*

# INDICE

SINTESI DEL LAVORO DI TESI .....	1
INQUADRAMENTO SCIENTIFICO-TECNICO DEL PROGETTO .....	6
CAPITOLO I: SISTEMI ANTIOSSIDANTI & STRESS OSSIDATIVO NEI PROCESSI RIPRODUTTIVI .....	9
1.1 STRESS OSSIDATIVO & DANNO CELLULARE .....	9
1.2 SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS).....	13
1.3 SISTEMI DI DIFESA ANTIOSSIDANTE .....	17
1.3.1 Antiossidanti enzimatici o primari.....	18
1.3.2 Antiossidanti secondari o non enzimatici.....	21
1.4 STRESS OSSIDATIVO NEL TESTICOLO .....	25
1.5 DISTRUTTORI DELLO STATUS ANTIOSSIDANTE NEL TESTICOLO.....	28
CAPITOLO II: LE SELENIOPROTEINE .....	31
2.1 RUOLO BIOLOGICO DEL SELENIO .....	31
2.2 METABOLISMO & RUOLO FISILOGICO DEL SELENIO .....	34
2.3 INCORPORAZIONE DEL SELENIO NELLE SELENIOPROTEINE .....	36
2.4 LE SELENIOPROTEINE: CLASSIFICAZIONE& STRUTTURA .....	39
2.5 LE SELENIOPROTEINE: FUNZIONE .....	43
2.6 LA SUPERFAMIGLIA DELLE GLUTATIONE PEROSSIDASI: STRUTTURA ED EVOLUZIONE .....	46
CAPITOLO III: LA SELENIOPROTEINA GLUTATIONE PEROSSIDASI IDROSSIDO FOSFOLIPIDE PHGPx/GPx4	52
3.1 SELENIO: ELEMENTO CHIAVE NELLA SPERMATOGENESI .....	52
3.2 PHGPx: STRUTTURA & FUNZIONE .....	54
3.3 PHGPx: RUOLO NEL TESTICOLO.....	57
3.4 PHGPx: RUOLO NELLA SPERMATOGENESI .....	60
CAPITOLO IV: CONTROLLO ENDOCRINO DEGLI ESTROGENI NELLA SPERMATOGENESI .....	64
4.1 IL CONTROLLO ENDOCRINO DELLA SPERMATOGENESI NEI VERTEBRATI NON MAMMIFERI ....	64
4.2 ESTROGENI E RECETTORI DEGLI ESTROGENI.....	66
4.3 PRODUZIONE DI ESTROGENI NEL TESTICOLO, RECETTORE DEGLI ESTROGENI E AROMATASI ..	72
4.4 ESTROGENI & PHGPx.....	75
SCOPO DELLA TESI .....	77
CAPITOLO V: MODELLO SPERIMENTALE .....	78
5.1 CICLO RIPRODUTTIVO & SPERMATOGENETICO NEL MASCHIO DEL <i>LACERTIDAE Podarcis sicula</i>	

5.2	CONTROLLO ENDOCRINO NEL CICLO RIPRODUTTIVO DEL MASCHIO DEL <i>LACERTIDAE Podarcis sicula</i>	81
CAPITOLO VI: ESPERIMENTI <i>IN VIVO</i> .....		84
6.1	RACCOLTA DI ANIMALI & TESSUTI .....	84
6.2	TRATTAMENTI SPERIMENTALI.....	85
CAPITOLO VII: INDAGINI BIOCHIMICHE.....		87
7.1	ESTRAZIONE DI PROTEINE .....	87
7.2	PREPARAZIONE DEL GEL DI ACRILAMIDE .....	87
7.3	TRASFERIMENTO SUL FILTRO .....	87
7.4	INCUBAZIONE CON GLI ANTICORPI .....	88
7.5	IMMUNORIVELAZIONE (ECL).....	88
7.6	ANALISI DENSITOMETRICA.....	88
CAPITOLO VIII: INDAGINI BIOMOLECOLARI.....		89
8.1	ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE.....	89
8.2	TRASCRIZIONE INVERSA DELL'RNA (RT-PCR).....	89
8.3	AMPLIFICAZIONE MEDIANTE <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> (PCR) .....	90
8.4	PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE.....	91
8.5	ANALISI DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE SEPARAZIONE SU GEL DI AGAROSIO .	91
8.6	RT-PCR SEMIQUANTITATIVA (SQ-RT-PCR).....	92
8.7	SEQUENZIAMENTO.....	92
CAPITOLO IX: ANALISI BIOINFORMATICA.....		94
CAPITOLO X: RISULTATI E DISCUSSIONE.....		96
10.1	VALUTAZIONE BIOCHIMICA DELLA PHGPX.....	96
10.2	ESPRESSIONE DEL PATTERN PROTEICO DI PHGPX DOPO TRATTAMENTI SPERIMENTALI.....	99
	<i>Trattamento condotto durante la stasi riproduttiva</i> .....	99
	<i>Trattamento condotto durante la massima attività gonadica</i> .....	100
10.3	ESTRAZIONE ED ANALISI DELL'RNA TOTALE.....	102
10.4	PCR RETROTRASCRIZIONALE (RT-PCR) & AMPLIFICAZIONE SU cDNA DEL GENE PHGPX.....	104
10.5	VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI PHGPX NELLE FASI PIÙ SIGNIFICATIVE DI SVILUPPO DEL TESTICOLO .....	106
10.6	SEQUENZIAMENTO NUCLEOTIDICO E AMINOACIDICO DI UN FRAMMENTO PARZIALE DI cDNA CODIFICANTE IL GENE PHGPX .....	108
10.7	ALLINEAMENTO COMPARATIVO DELLA SEQUENZA NUCLEOTIDICA E AMINOACIDICA DEDOTTA DI PHGPX CON LE SEQUENZE DEL GENE PRESENTE NEI BASSI VERTEBRATI.....	110
10.8	ANALISI FILOGENETICA.....	120
CONCLUSIONI .....		123

BIBLIOGRAFIA .....	125
SITOGRAFIA .....	138

## SINTESI DEL LAVORO DI TESI

La Glutathione Perossidasi Idrossido Fosfolipide (PHGPx/GPx4) è una selenioproteina che appartiene alla superfamiglia delle glutathione perossidasi. Condivide con le altre glutathione perossidasi il meccanismo catalitico, che comprende l'ossidazione, in presenza di un idroperossido, del selenolato del sito attivo a derivato dell'acido selenenico, la riduzione di questo da parte del glutathione (GSH) con formazione di un selenodisolfuro e quindi la rigenerazione dell'enzima nativo da parte di una seconda molecola di cosubstrato riducente (Shi *et al.*, 2010). Tra le glutathione perossidasi, PHGPx è la meno specifica; non solo riduce un ampio spettro di idroperossidi, ma accetta anche diversi tipi di tioli come riducenti (compresi i di-tioli). La selenoperossidasi PHGPx viene descritta come enzima chiave implicato nella regolazione cellulare, nell'apoptosi, nella costruzione di strutture sopramolecolari e nel differenziamento; particolarmente rilevante appare la capacità della PHGPx di ossidare tioli proteici nelle fasi finali della spermatogenesi (Ursini *et al.*, 1999). Similmente al GPx citosolico è presente in molti tessuti, ma contrariamente al GPx i suoi livelli e il suo pattern di espressione nel testicolo sono più alti che in ogni altro tessuto, incluso il fegato (Maiorino *et al.*, 2003; Diaconu *et al.*, 2006). Il gene umano della PHGPx è localizzato sul cromosoma 19 e risulta composto da sette esoni distribuiti su 3-4 kb di DNA (Imai e Nakagawa, 2002). Il gene è trascritto in mRNA di diversa lunghezza che danno origine a tre isoforme che indirizzano la proteina in diversi compartimenti e che differiscono per la loro estensione N-terminale: un mRNA citosolico (cPHGPx), nucleare (nPHGPx) e mitocondriale (mPHGPx) (Puglisi *et al.*, 2005). In condizioni di potenziali redox elevati (ad es. basse concentrazioni intracellulari di GSH) e una fonte di perossidi, PHGPx catalizza l'ossidazione di specifici tioli proteici. Questa reazione è associata ad almeno due eventi rilevanti per la funzione riproduttiva: la compattazione della cromatina (Puglisi *et al.*, 2005) e la formazione della capsula mitocondriale (Nayernia, 2002). L'isoforma nucleare in particolare, è coinvolta nel processo di condensazione della cromatina, che si verifica negli *steps* finali di spermatogenesi e che richiede la sostituzione della maggioranza degli istoni con proteine di transizione e protammine ritenute essenziali per la stabilizzazione del DNA e la condensazione dei spermatociti. La formazione della capsula mitocondriale richiede le "proteine ricche di cisteine associate ai mitocondri degli spermatozoi" (SMCP); infatti uno dei principali aspetti della funzione della PHGPx è la catalisi operata su cisteine adiacenti in specifiche proteine che possono funzionare come "interruttori redox" e che possono "accendere" o "spegnere" specifiche funzioni biologiche o la formazione di aggregati sopramolecolari: ciò suggerisce il ruolo del selenio nella protezione dai residui chimici libero-radicali altamente reattivi, che sono collegati alla sterilità

maschile (Maiorino e Ursini, 2002). Le cause che contribuiscono ad avere soggetti infertili, prevedono a monte la valutazione del quadro ormonale: quindi il bilancio tra le azioni degli androgeni e estrogeni può essere importante ai fini del mantenimento della spermatogenesi. Tramite l'induzione della spermatogenesi, è stato provato che gli ormoni steroidei non stimolano direttamente la trascrizione genica e che, in vivo, il testosterone media l'espressione della PHGPx (Maiorino *et al.*, 1998). Inoltre, l'espressione di PHGPx nei vertebrati mammiferi può essere controllata dagli estrogeni negli organi riproduttori maschili (testicoli, epididimo, prostata). Il  $17\beta$  estradiolo, un estrogeno intrinseco nei vertebrati, ha il suo recettore espresso nei testicoli durante l'intero processo di spermatogenesi (O'Donnell *et al.*, 2001). L'espressione del trascritto di PHGPx incrementa in seguito al trattamento con  $17\beta$  estradiolo, per cui il recettore  $\beta$  che funziona come un regolatore dominante del segnale degli estrogeni risulta correlato con PHGPx (Pettersson *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2003). Da ciò emerge che nei mammiferi gli estrogeni esogeni influenzano il pattern di espressione del gene di PHGPx tramite il recettore  $\beta$  (Sang *et al.*, 2003).

Partendo da questa base scientifica ho utilizzato come modello sperimentale il maschio di un vertebrato non mammifero con tipica riproduzione stagionale, il *Lacertidae Podarcis sicula* il cui noto meccanismo riproduttivo è influenzato da molteplici fattori molecolari che governano le numerose ed importanti relazioni che si instaurano lungo l'asse *ipotalamo-ipofisi-gonade* (Guerriero, 2009).

Dalla letteratura risulta ben evidente il ruolo svolto da diversi fattori endogeni ed esogeni sulla spermatogenesi del modello sperimentale oggetto della ricerca. In particolare è evidente che lo steroide testosterone eserciti un rilevante effetto regolatore sulla spermatogenesi e sullo sviluppo e funzione del sistema riproduttivo anche se la localizzazione di recettori degli estrogeni  $\beta$  nelle cellule del Sertoli e nelle cellule germinali suggerisce che gli estrogeni esercitino un'influenza diretta sulla funzione e maturazione delle cellule germinali (Chieffi e Varriale, 2004). Ciò solleva la possibilità che alcuni degli effetti del testosterone sulla spermatogenesi potrebbero verificarsi direttamente sulle cellule germinali dopo conversione del testosterone ad estradiolo, suggerendo una relazione funzionale tra steroidi e PHGPx. Pertanto *Podarcis sicula* in qualità di riproduttore stagionale si pone come modello sperimentale idoneo a definirne gli eventi che regolano la spermatogenesi a partire dalla identificazione e caratterizzazione della sequenza nucleotidica di PHGPx e dallo studio delle sue variazioni stagionali di espressione nel ciclo riproduttivo.

Il progetto è stato pianificato in modo da ottimizzare l'integrazione di approcci biochimici con metodiche di biologia molecolare e di bioinformatica.

Usufruento della stagionalità riproduttiva del modello sperimentale, ho valutato biochimicamente la presenza e le variazioni stagionali della selenioproteina PHGPx mediante analisi di *Western blotting* in diversi tessuti (testicolo, encefalo, fegato e intestino) servendomi dell'anticorpo policlonale anti-PHGPx (Abnova, PAB 1206). L'analisi di *Western blotting* condotta, ha permesso di segnalare che l'anticorpo *cross* reagisce anche su tessuti di rettili evidenziando una banda del peso molecolare di circa 20kDa. L'analisi quantitativa densitometrica nei diversi tessuti conferma come per i mammiferi (Diaconu *et al.*, 2006), una predominante espressione di PHGPx nel testicolo, con un incremento del segnale in piena attività spermatogenetica; l'intestino mostra la più scarsa attività di PHGPx nelle fasi del ciclo esaminate.

Inoltre, il ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula* è facilmente manovrabile, agendo su fotoperiodo e temperatura è stato possibile favorire o meno la ripresa dell'attività spermatogenetica. Ho scelto quindi di studiare l'espressione del pattern proteico di PHGPx dopo trattamenti sperimentali eseguiti rispettivamente nella fase di stasi riproduttiva e nella fase di massima attività gonadica. Il trattamento con la gonadotropina corionica umana (HCG) condotto durante la stasi riproduttiva incrementa l'immunoreattività di PHGPx dopo 21 giorni di manipolazione, mentre il trattamento con l'antagonista del recettore degli estrogeni ICI 182-780 condotto durante la massima attività gonadica induce una riduzione del segnale di PHGPx dopo 21 giorni.

I risultati dei trattamenti sperimentali mettono in evidenza come, anche in *Podarcis sicula*, l'attività della selenioproteina PHGPx sia strettamente correlata all'attività spermatogenetica; inoltre esiste una dipendenza ormonale dell'espressione di PHGPx con gli estrogeni, che come è noto innescano il meccanismo di spermatogenesi e svolgono un ruolo fisiologico nella fertilità maschile (Carreau *et al.*, 2011).

Lo studio biochimico, come accennato, è stato integrato a quello di biologia molecolare e bioinformatico.

La regione parzialmente clonata di cDNA dal testicolo di *Podarcis sicula* è di 340 bp. Servendomi della metodica di PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR), ho ottenuto una sequenza parziale: gli allineamenti condotti hanno rivelato un range di indentità nucleotidica compreso tra il 71 e l'85% nell'ambito dei vertebrati non mammiferi e tra il 76 e il 79% nell'ambito dei vertebrati mammiferi. Anche la sequenza aminoacidica dedotta di PHGPx è stata confrontata alle altre sequenze disponibili in Banca dati, rivelando un range d'identità compreso tra il 68 e il 92% nell'ambito dei vertebrati non mammiferi e tra il 79 e l'83% tra i vertebrati mammiferi. E' interessante notare come la più bassa

identità nucleotidica sia a livello dei pesci mentre sia il gene che la proteina rivelano un alto grado di identità nucleotidica ed aminoacidica con i rettili.

La valutazione del livello di espressione di PHGPx è stata condotta su mRNA in varie fasi di sviluppo del testicolo con analisi semiquantitativa (SQ-RT-PCR): l'espressione testicolare di PHGPx, nel ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, aumenta nella massima attività gonadica e diminuisce drasticamente nella stasi estiva. I differenti livelli di espressione di mRNA fanno ipotizzare che la selenoproteina PHGPx possa giocare un ruolo antiossidante anche nella spermatogenesi di *Podarcis sicula* (Shi *et al.*, 2010). Il crollo di espressione di PHGPx nella stasi estiva, suggerisce che l'attività spermatogenetica possa essere inattiva per l'assenza dell'architettura del *midpiece* che contiene la maggior parte del selenio incorporato come residuo di selenocisteina nella PHGPx.

Una proteina di 76 aa è stata dedotta dalla sequenza nucleotidica. L'approccio bioinformatico è stato, poi, utile a caratterizzare i vari domini della proteina, i motivi funzionali e a predire la struttura secondaria della proteina. I domini critici per la funzionalità di PHGPx sono pure ritrovati in *Podarcis sicula* segnalandone la sua appartenenza alle selenoproteine in particolare alla superfamiglia delle Tiorredossine (TRXs). La valenza come antiossidante, inoltre, è ritrovata per la conservazione degli aminoacidi della tetrade catalitica *triptofano* (W), *glutamina* (Q), *asparagina* (N) che catalizzano la riduzione di un ampio spettro di idroperossidi ed accettano diversi tipi di tioli come riducenti (compresi i di-tioli): rilevante è la capacità di PHGPx di ossidare tioli proteici nelle fasi finali della spermatogenesi (Maiorino *et al.*, 2005). Questa tesi è confermata anche dall'analisi delle relazioni filogenetiche tra la sequenza parziale di PHGPx di *Podarcis sicula* e di altre specie appartenenti a diverse classi di vertebrati laddove è evidente una relativa divergenza tra le sequenze di PHGPx nei vertebrati non mammiferi e mammiferi. I risultati sulle sequenze aminoacidiche omologhe disponibili presso banche dati hanno suggerito che le regioni conservate contengono informazioni filogenetiche sufficienti per dedurre relazioni evolutive all'interno di singoli gruppi.

Nei mammiferi, il ruolo della selenoperossidasi PHGPx è ben documentato in letteratura, ma l'utilizzo di bassi vertebrati, come modello sperimentale, facilita tale comprensione, data la rilevante semplicità della loro organizzazione anatomica, rispetto al modello mammifero. Per tale motivo, convinto del fatto che se un sistema biologico svolga una funzione importante e basilare nei mammiferi debba essere conservato in un basso vertebrato, mi sono avvalso del Lacertidae *Podarcis sicula* per lo studio del ruolo della PHGPx.

In conclusione, il lavoro di tesi sull'antiossidante PHGPx nel Lacertidae *Podarcis sicula* ne ha permesso l'identificazione della sequenza nucleotidica, la parziale caratterizzazione, lo studio delle

variazioni stagionali di espressione e la sua conservazione evolutiva. In particolare dalla letteratura è evidente l'esistenza di un' origine locale di estrogeni nel testicolo e di un suo ruolo nell'avviare la spermatogenesi e attraverso l'analisi dell'espressione stagionale ho dimostrato un coinvolgimento di PHGPx nella maturazione degli spermatozoi e una relazione funzionale tra steroidi e PHGPx.

## INQUADRAMENTO SCIENTIFICO-TECNICO DEL PROGETTO

L'evoluzione delle modalità e delle strategie riproduttive, fattore primario della continuità delle specie e dell'adattamento ad ambienti diversificati è oggetto di studio, in condizioni naturali e sperimentali, in diverse specie animali. Negli ultimi decenni, un gran numero di ricerche hanno ampliato la conoscenza dei cicli riproduttivi di diverse specie di vertebrati, tanto che oggi è possibile delineare dei modelli base che spieghino, in modo abbastanza soddisfacente, la varietà di processi riproduttivi osservata nei diversi ambienti in cui gli animali vivono. I processi riproduttivi si possono svolgere secondo tappe rigidamente fissate o presentare un grado più o meno ampio di flessibilità. L'andamento di tali processi risulta correlato alle variazioni di fattori endogeni (amminoacidi, neuropeptidi, gonadotropine, ormoni, recettori steroidei, antiossidanti) ed esogeni (fotoperiodo, temperatura e fattori ecologici ed etologici). Le complesse interazioni che si verificano tra fattori endogeni ed esogeni e la produzione dei gameti sono state sinora studiate ed approfondite in uno svariato numero di specie (Beckett e Arthur, 2005; Schulz *et al.*, 2009; Stradaoli *et al.*, 2009). Negli anfibi e rettili, come in altri vertebrati, lo sviluppo come l'attività gonadica ed i processi riproduttivi in generale sono sotto il controllo del sistema ipotalamo-ipofisario. Tale sistema è sostanzialmente simile tra le varie classi di vertebrati anche se la struttura e l'attività funzionale tuttavia, non mancano di presentare diversi aspetti specifici che ricerche più recenti stanno progressivamente mettendo in luce. Tra i fattori endogeni, il GnRH (ormone per il rilascio delle gonadotropine), un decapeptide secreto principalmente nell'ipotalamo, gioca un ruolo pilota nel controllo della riproduzione. Il GnRH, di cui sono state identificate e caratterizzate più forme molecolari comuni ai vertebrati, regola la sintesi e/o il rilascio di gonadotropine ipofisarie (FSH e LH), che a loro volta controllano l'attività gonadica di gametogenesi e steroidogenesi. Gli ormoni steroidei sessuali (estrogeni, androgeni e progesterone) in sincronia alle gonadotropine ipofisarie favoriscono la maturazione dei gameti e allo stesso tempo sono in grado di modulare il comportamento riproduttivo e l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisario grazie alla presenza di specifici recettori nucleari e agli antiossidanti coinvolti nelle fasi di formazione e attivazione dei gameti (Guerriero, 2009; Zhang *et al.*, 2010). All'interno delle cellule bersaglio, il complesso ormone-recettore esplica la propria funzione di regolazione della trascrizione di geni specifici; gli antiossidanti neutralizzano o limitano la produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che potrebbero bloccare le fasi meiotiche degli eventi riproduttivi (Parminder e Bansal, 2003). L'importanza dell'integrazione fra queste strutture è evidente soprattutto nelle specie a riproduzione stagionale, nelle quali gli stimoli ambientali si integrano a livello del sistema nervoso centrale con l'ambiente ormonale interno e con

gli antiossidanti endogeni per innescare il comportamento riproduttivo (Guerriero e Ciarcia, 2001). Negli ultimi decenni molti sono stati gli studi tesi ad individuare i fattori promuoventi le diverse fasi riproduttive di organismi a ciclo stagionale (Chieffi e Varriale, 2004; Guerriero e Ciarcia 2006). In alcune specie quali il rettile *Podarcis sicula* e l'anfibio anuro *Rana esculenta* ricerche sono state svolte sulle variazioni degli steroidi sessuali plasmatici e tissutali, sul sistema neuronale GnRH e sul recettore ipotalamico degli estrogeni e del progesterone. Tuttavia rimangono ancora poco noti i meccanismi che regolano, negli organi bersaglio, le interazioni tra steroidi, i loro recettori e gli antiossidanti ed in particolare del ruolo che gioca la Glutazione Perossidasi Idrossido Fosfolipide nel controllo endocrino della spermatogenesi di vertebrati non mammiferi.

# *INTRODUZIONE*

## CAPITOLO I: SISTEMI ANTIOSSIDANTI & STRESS OSSIDATIVO NEI PROCESSI RIPRODUTTIVI

### 1.1 STRESS OSSIDATIVO & DANNO CELLULARE

Il termine stress ossidativo identifica una condizione patologica causata dalla rottura del fisiologico equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti (Celino *et al.*, 2011). E' necessario precisare che le specie ossidanti sono prodotti della normale attività metabolica che, a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico. I metaboliti ossidanti di maggiore interesse biologico sono centrati su pochi elementi: ossigeno, azoto, carbonio, cloro, zolfo (Celino *et al.*, 2011). L'espressione stress ossidativo è stata introdotta per la prima volta nel 1989 da Sies che lo definì come uno squilibrio tra la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e i sistemi di difesa antiossidanti. In condizioni fisiologiche la cellula mantiene al suo interno uno stato riducente grazie ad un bagaglio di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS. Se la generazione di ROS eccede le capacità antiossidante della cellula stessa, o si verifica una diminuzione dei meccanismi di detossificazione, si viene ad instaurare una nuova condizione che prende appunto il nome di stress ossidativo (Turner e Lysiak, 2008). La definizione di stress tende a coinvolgere una cascata endocrina come parte della risposta non specifica che agisce sia a livello neuronale sia a livello ormonale sull'asse ipotalamo-ipofisario (Kobayashi *et al.*, 2009). Si assiste a un cambiamento degli ormoni circolanti come risposta secondaria al fattore di stress, unitamente a cambiamenti nello stato osmotico, di sviluppo, di capacità immunitaria, di apprendimento e di biosintesi dell'energia che portano a modificare la capacità riproduttiva. Tuttavia lo stress, è la cascata fisiologica di eventi che si verifica quando l'organismo sta tentando di resistere alla morte o di ristabilire un equilibrio omeostatico in seguito a un insulto (Schreck, 2010). Questa condizione sembra giocare un ruolo di primaria importanza in numerose patologie e disturbi del normale stato redox e può provocare effetti tossici attraverso la produzione di specie chimiche reattive che danneggiano le componenti della cellula incluse proteine, lipidi e acidi nucleici (Mancuso *et al.*, 2010). Lo stress ossidativo quindi deriva da un aumento dei ROS; queste molecole sono caratterizzate dall'aver una notevole reattività chimica che le rende molto instabili ed in grado di ossidare le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi, i residui amminoacidici delle proteine, i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici. Il danno ossidativo da parte dei ROS porta, in casi estremi, all'alterazione e alla compromissione della funzione di tutte le strutture e le macromolecole cellulari con conseguente morte cellulare (Uttara *et al.*, 2009). A livello degli acidi grassi polinsaturi,

contenuti in elevate concentrazioni soprattutto nei fosfolipidi delle membrane cellulari, si verifica la perossidazione dei lipidi (Zhonghua *et al.*, 2011). In seguito a tali processi degenerativi, le membrane della cellula diventano rigide perdendo la fluidità e la funzione di permeabilità selettiva che le contraddistingue (Spiteller, 2006). Il processo consiste in una serie di reazioni a catena che può essere suddivisa in tre stadi: iniziazione, propagazione e terminazione (Fig.1.1.1) in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano progressivamente in radicali lipidici ( $L^\bullet$ ), radicali perossidi ( $LOO^\bullet$ ) e perossidi lipidici ( $LOOH$ ). Questi ultimi possono decomporsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici ( $LO^\bullet$ ), aldeidi (malondialdeide, MDA), alcani, epossidi lipidici e alcool.

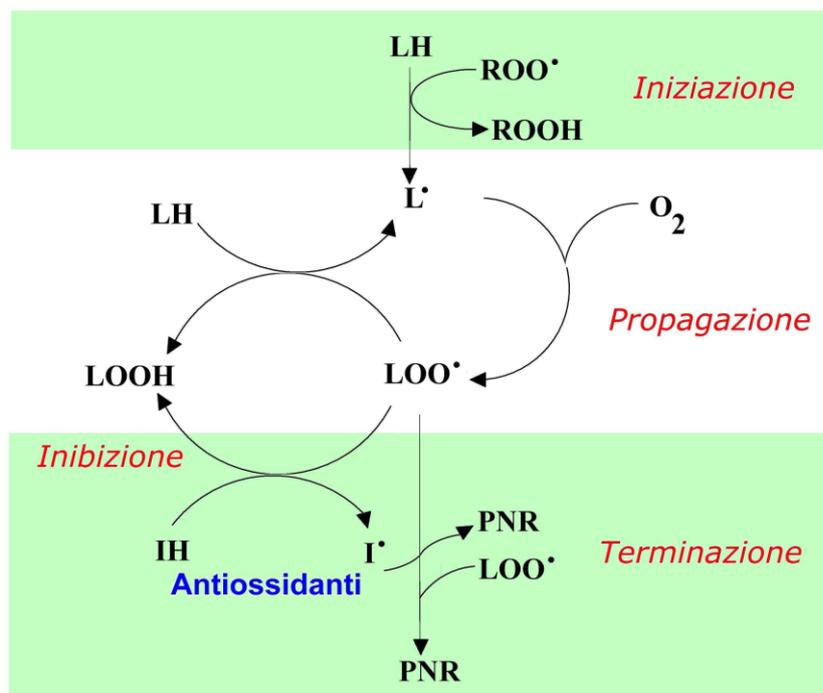


Fig. 1.1.1 Fasi del processo di perossidazione lipidica e sua inibizione

La fase di iniziazione prevede il distacco, per azione di un radicale libero ( $ROO^\bullet$ ), di un atomo di idrogeno allilico dal gruppo metilenico coniugato ad un doppio legame nella catena dell'acido grasso insaturo (LH), con conseguente formazione di un radicale ( $L^\bullet$ ) sull'atomo di carbonio corrispondente. Nello stadio di propagazione, i radicali  $L^\bullet$  reagiscono molto velocemente con l'ossigeno molecolare, generando i radicali perossidici  $LOO^\bullet$  che a loro volta sottraggono un atomo di idrogeno ad un'altra molecola di acido grasso insaturo per formare un idroperossido ( $LOOH$ ) e un altro radicale  $L^\bullet$ . Le reazioni di propagazione portano alla formazione di una catena cinetica, in

cui per ogni radicale ROO<sup>•</sup> generato vengono consumate più molecole di LH e per ogni molecola di LH che reagisce scompare una molecola di ossigeno. In fase di terminazione, i radicali liberi prodotti durante il processo reagiscono tra loro e danno origine a prodotti non radicalici, inattivi.

Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative provocate dai radicali liberi hanno come conseguenza la proteolisi o la loro aggregazione aberrante. È stato dimostrato su proteine purificate che l'azione dei ROS altera completamente le proprietà chimico-fisiche caratteristiche della proteina stessa. È stato osservato infatti sia una variazione del punto isoelettrico (causata da ossidazioni dei gruppi -R degli amminoacidi mediante carbonilazione) (Davies, 1987) sia un'alterazione del peso molecolare dovuta alla formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1986). Questi cambiamenti provocano l'attivazione di specifici enzimi proteolitici e conseguente degradazione della proteina (Dean *et al.*, 1993). La carbonilazione, laddove avvenga in maniera lieve e progressiva, è associata alla perdita irreversibile della funzione della proteina che viene eliminata dal proteasoma e dunque permette la sopravvivenza cellulare. L'eccessiva ossidazione e il conseguente *cross-linking* rende, invece, le proteine resistenti alla degradazione proteolitica e determina l'insorgenza della morte cellulare (Dalle Donne *et al.*, 2006). Tra le proteine enzimatiche, che per prime risentono dell'attacco dei radicali liberi e che quindi si denaturano, sono da ricordare la fosfofruttochinasi I (enzima chiave della via glicolitica) e il complesso I della catena respiratoria. L'inattivazione di questi due enzimi porta ad una riduzione del metabolismo energetico cellulare.

Per ciò che riguarda gli acidi nucleici, è stato dimostrato che le alterazioni ossidative inibiscono irreversibilmente i processi di trascrizione, traduzione e replicazione del DNA portando alla prematura senescenza e alla morte cellulare (Celino *et al.*, 2011). Il danno ossidativo a carico del DNA può tradursi nella rottura dei filamenti (doppi e singoli), nella formazione di legami crociati DNA-DNA o DNA-proteine, scambio dei cromatidi fratelli, modificazione delle basi azotate. Tutti e quattro i nucleotidi, infatti, possono subire modificazioni ossidative, anche se le pirimidine (citosina e timidina) sembrano essere le più suscettibili ai processi di idrossilazione, saturazione, apertura o condensazione dell'anello imidazolico. Inoltre, la guanina può andare incontro alla formazione di un derivato ossidato, quale l'8-oxoguanina (8-oxoG), che si rinviene spesso come comune denominatore di patologie neurodegenerative come il Morbo di Parkinson, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e l'Alzheimer (Martinez *et al.*, 2011). Data l'immediata vicinanza al sito di produzione dei ROS, il DNA mitocondriale rappresenta il primo bersaglio della tossicità dei ROS. Il DNA mitocondriale ha, infatti, una maggiore insorgenza di mutazioni spontanee rispetto a quello nucleare, data anche la relativamente scarsa complessità dei sistemi di riparo del DNA in questo compartimento (Martinez *et al.*, 2011). In ogni caso, le mutazioni insorte nel DNA mitocondriale

determinano, in ultimo, l'ulteriore produzione di superossido e l'attivazione della cascata apoptotica mitocondriale (Ricci *et al.*, 2008).

Molti studi effettuati in modelli *in vitro* ed *in vivo*, sono stati utilizzati per caratterizzare a livello molecolare le risposte allo stress ossidativo al fine di migliorare le conoscenze sui meccanismi che stanno alla base della fisiopatologia di numerose malattie in cui è implicato lo stress ossidativo. In cellule in coltura, lo stress ossidativo può provocare l'induzione dei "classici" geni AOE (codificanti per enzimi antiossidanti) tra cui MnSOD, CuZnSOD, CAT, e GP (Fig.1.1.2). La funzione principale di tali enzimi consiste nell'agire da *scavenger* verso le ROS ed aiutare così la cellula ad attenuare lo stato pro-ossidante al fine di mantenere la normale omeostasi cellulare (Ghanta e Chattopadhyay, 2011). Anche regolatori trascrizionali come c-Fos, c-Jun, Egr-1 e NF- $\kappa$ B giocano un ruolo critico nell'ampio evento molecolare che caratterizza la risposta cellulare allo stress ossidativo. Questi regolatori genetici potrebbero attivare alcuni dei geni menzionati o altri geni non identificati i cui prodotti sono necessari alla difesa della cellula contro insulti ossidativi (Ghanta e Chattopadhyay, 2011).

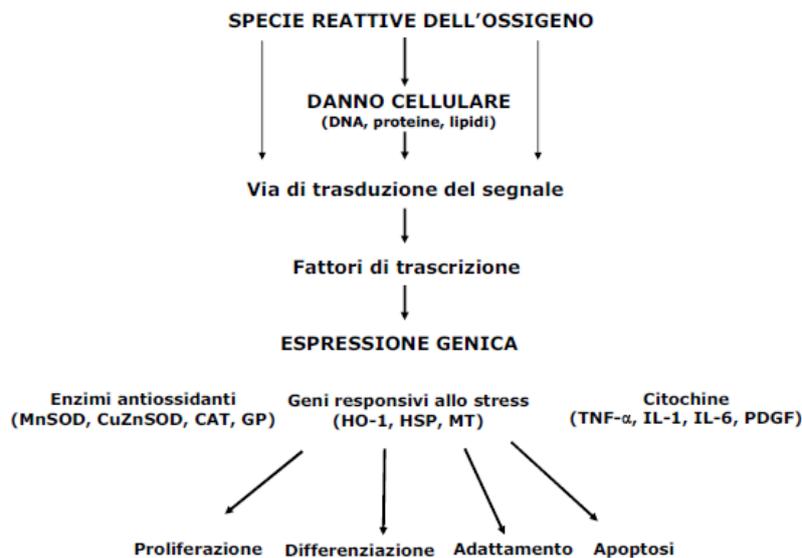


Fig.1.1.2 Diagramma dei meccanismi cellulari e molecolari che rispondono allo stress ossidativo

## 1.2 SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

L'ossigeno è una molecola essenziale per la sopravvivenza degli organismi aerobi; tuttavia, a causa della sua struttura atomica che non gli permette di accettare doppietti elettronici, può generare intermedi altamente instabili noti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Fujii e Tsunoda, 2011). Queste specie sono il risultato di successive riduzioni monoelettroniche fino alla completa riduzione dell'ossigeno ad H<sub>2</sub>O e possono essere suddivise in due categorie:

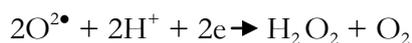
- radicali liberi dell'ossigeno (ad es. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e OH<sup>•</sup>), che contengono un elettrone spaiato;
- specie non radicaliche (ad es. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### Anione superossido

L'anione superossido è il primo radicale libero che si forma come intermedio durante le reazioni biochimiche di riduzione dell'ossigeno. Possiede carica negativa e a differenza di altri radicali liberi, ha un'emivita relativamente lunga ed è capace di attaccare un ampio numero di substrati per completare i propri orbitali. L'anione superossido si può formare:

- per interazione dell'O<sub>2</sub> con gli elettroni che talora sfuggono alla catena respiratoria quando questa funziona a regimi elevati, soprattutto nel passaggio ossido-riduttivo tra coenzima Q e citocromi.
- nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di molecole tipo adrenalina, noradrenalina o anche alcuni composti tiolici.
- per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche specifiche quali quelle catalizzate dalle xantine ossidasi, triptofano diossigenasi e indolamine diossigenasi.

La dismutazione dell'anione superossido spontanea o catalizzata dall'enzima Superossido Dismutasi (SOD) rappresenta la maggiore fonte di perossido di idrogeno nella cellula.



### Perossido di idrogeno

Il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) è una molecola reattiva relativamente stabile, in grado di oltrepassare le membrane e all'interno delle cellule ha un'emivita piuttosto lunga. Oltre che per dismutazione dell'anione superossido, il perossido di idrogeno si può formare anche per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche a livello dei microsomi, perossisomi e mitocondri. Risulta essere citotossico ma è considerato un debole agente ossidante. La tossicità risiede nel fatto che è in grado di dare origine al radicale idrossile attraverso delle reazioni catalizzate da ioni metallici.



### Radicale idrossile

Nel processo di Haber-Weiss, una molecola di superossido ed una molecola di perossido di idrogeno si combinano per formare una molecola di ossigeno, un equivalente di radicale idrossile ed uno di anione ossidrilico. Questo processo è catalizzato dagli ioni Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup>:



Nelle reazioni di Fenton, una molecola di perossido di idrogeno è convertita in un radicale idrossile ed in un anione ossidrilico con contemporanea ossidazione di Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>



Il Fe<sup>3+</sup> così formato può, a sua volta, reagire con un radicale superossido secondo la reazione seguente, rigenerando Fe<sup>2+</sup> che può nuovamente reagire con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nella reazione di Fenton.



Va precisato che il ferro, contenuto nelle cellule e nel plasma, è solitamente legato a proteine di trasporto, di deposito e funzionali e, in questa forma, non è mai reattivo. La reazione di Fenton può quindi avvenire solo in presenza di ferro libero. Il ferro si può liberare dalle proteine chelanti in seguito alla diminuzione del pH, dovuta, per esempio, all'accumulo di acido lattico in seguito ad ischemie, emorragie, traumi e per interazione di O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con la ferritina. Il radicale idrossile OH<sup>•</sup> è una molecola altamente reattiva con forti capacità ossidanti e costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi nei nostri tessuti. È in grado di collidere e danneggiare tutte le macromolecole cellulari: proteine, acidi nucleici, glicosaminoglicani e soprattutto gli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana.

## Ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$

L'ossigeno singoletto è una forma altamente reattiva di ossigeno molecolare che può nuocere ai sistemi viventi ossidando molecole organiche critiche (Fig.1.2.3). È un derivato della molecola di ossigeno in cui tutti gli elettroni di valenza hanno *spin* opposti. Da studi in vitro è emerso che  $^1\text{O}_2$  ossida molte molecole organiche inclusi lipidi di membrana, proteine, aminoacidi, acidi nucleici, nucleotidi, nucleotidi piridinici, carboidrati e tioli.  $^1\text{O}_2$  si può formare tramite esposizione a luce ultravioletta (320-380nm) o durante l'attivazione dei macrofagi. L'azione della NADPH ossidasi produce il radicale anione superossido che, spontaneamente o enzimaticamente, dismuta per formare perossido di idrogeno. La mieloperossidasi dei macrofagi o attività perossidasiche correlate, catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno per formare l'ossidante acido ipocloroso. L'acido ipocloroso e  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiscono per formare l'ossigeno singoletto.

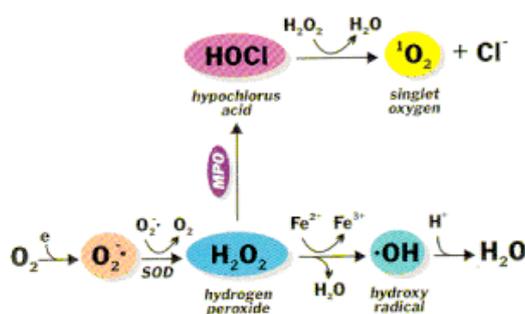


Fig. 1.2.3 Schema rappresentativo della formazione di ROS

## Specie radicaliche dell'azoto (RNS)

Accanto ai ROS esiste una famiglia di radicali liberi che interessa l'azoto e che vengono chiamati specie radicaliche dell'azoto (RNS). Appartengono a questa classe, i radicali come l'ossido nitrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) che si forma a partire dalla L-arginina in una reazione catalizzata dalla Ossido Nitrico Sintasi (NOS) e che in condizioni fisiologiche svolge una funzione di messaggero intracellulare. Se a livello cellulare risultano elevati i livelli di superossido e di  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'ossido nitrico può reagire con queste due molecole portando alla formazione di perossinitrito ( $\text{OONO}^\bullet$ ) che è un composto ad elevata citotossicità, il cui potere ossidante è maggiore di quello dell'anione superossido e del perossido di

idrogeno. Il perossinitrito ha la capacità di reagire con diverse molecole come la  $\text{CO}_2$  e a seconda delle condizioni può dare origine ad altri composti ad elevata reattività.

È noto che i ROS hanno un duplice ruolo nei sistemi biologici, sia benefico che dannoso (Valko *et al.*, 2006). Mostrano un effetto benefico quando, ad esempio, vengono utilizzati dal sistema immunitario come agenti in grado di bloccare l'azione patogena di diversi microrganismi o quando sono utilizzate come forma di comunicazione cellulare mediando la trasmissione di segnali biochimici tra le cellule. Al contrario, se le sostanze ossidanti sono presenti ad alte concentrazioni, e/o il sistema antiossidante non è in grado di neutralizzarle, possono essere danneggiate diverse componenti della cellula, i fosfolipidi di membrana con perdita di compartimentazione cellulare e dei trasporti selettivi; gli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell'espressione genica e le proteine dove l'ossidazione di alcuni gruppi aminoacidici causa modificazioni della struttura e perdita di funzione enzimatica, recettoriale e di trasporto.

### 1.3 SISTEMI DI DIFESA ANTIOSSIDANTE

Gli effetti dei radicali liberi possono essere estremamente gravi: potenzialmente possono essere in grado di attaccare qualsiasi molecola del nostro organismo determinando la produzione di numerosi danni che si ripercuotono a livello di cellule, organi e apparati. Tuttavia l'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci che permettono di neutralizzare i ROS e di bloccare la loro attività ossidante (Fig.1.3.4). In generale, i sistemi antiossidanti o prevengono la formazione di queste specie ossidanti o le rimuovono prima che possano danneggiare i componenti vitali delle cellule (Swamy, 2009).

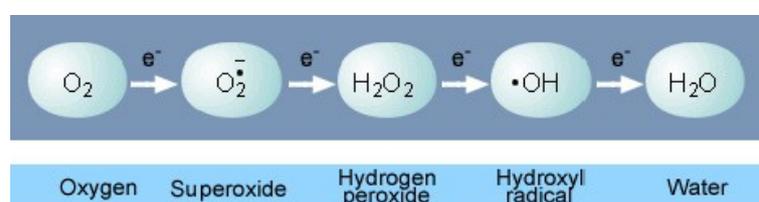


Fig. 1.3.4 Inattivazione dei composti reattivi dell'Ossigeno (ROS)

L'importanza relativa e le interazioni tra questi differenti antiossidanti è un ambito complesso, con i vari metaboliti e sistemi enzimatici che hanno effetti sinergici e interdipendenti fra di loro. L'azione di un ossidante può dipendere dalla corretta funzione degli altri membri del sistema antiossidante. La quantità di protezione fornita da un antiossidante dipende quindi dalla sua concentrazione, dalla sua reattività verso la particolare specie reattiva dell'ossigeno considerata e lo stato degli antiossidanti con cui interagisce (Vertuani *at al.*, 2004). Le cellule possiedono un complesso sistema di difesa (Fig.1.3.5) che tenta di inibire la formazione dei radicali dell'ossigeno (Swamy, 2009).

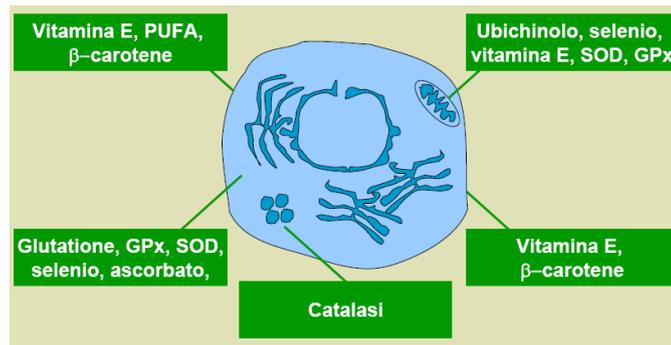


Fig. 1.3.5 Distribuzione del sistema antiossidante nella cellula

Gli antiossidanti si possono classificare in *antiossidanti primari* o *di tipo enzimatico* e *antiossidanti secondari* o *non enzimatici* (Swamy, 2009). Questa classificazione si basa non su un criterio di importanza, ma di sequenza temporale di azione.

### 1.3.1 Antiossidanti enzimatici o primari

Alla classe degli antiossidanti primari appartengono una vasta gamma di enzimi in grado di detossificare la cellula dai ROS attraverso delle reazioni enzimatiche in cui le specie radicaliche dell'ossigeno perdono la loro reattività e vengono trasformate in sostanze innocue per la cellula (Fig.1.3.1.6).

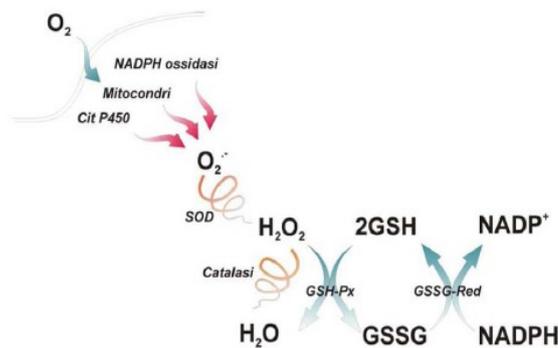
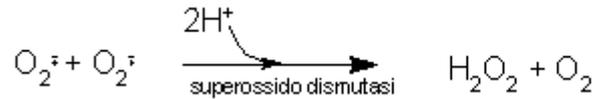


Fig. 1.3.1.6 Principali difese antiossidanti enzimatiche. SOD (superossido dismutasi); GSH-Px (glutazione perossidasi); GSSG-Red (Glutazione Redattasi); Catalasi.

### Superossido Dismutasi

L'enzima superossido dismutasi (SOD) è stato scoperto nel 1969 da McCord e Fridovich e rappresenta la prima difesa nei confronti dei ROS e in particolare del radicale superossido. La SOD infatti catalizza la reazione di dismutazione del radicale superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare.



Nei mammiferi sono presenti tre isoforme dell'enzima SOD (SOD-1, SOD-2 e SOD-3) e tutte hanno la caratteristica di avere un metallo di transizione redox attivo nel loro sito catalitico necessario per catalizzare la reazione di dismutazione (Culotta *et al.*, 2006). Le diverse isoforme dell'enzima SOD, codificate da geni diversi, si caratterizzano, oltre che per il diverso catione metallico che funge da cofattore, anche per la diversa compartimentazione; si distinguono una Cu, Zn SOD (SOD1) localizzata principalmente a livello della zona citoplasmatica e nello spazio intermembrana, una Mn SOD (SOD2) principalmente presente nella matrice mitocondriale e una Fe-SOD (SOD-3) localizzata nello spazio extracellulare. I geni che codificano per le tre famiglie di SOD, ad oggi note, derivano da due geni ancestrali tra loro non correlati. Da uno dei due geni ancestrali deriva il gruppo delle Mn-SOD e delle Fe-SOD, estremamente diffuso a livello degli organismi aerobi, dai batteri, alle piante fino all'uomo. Dall'altro discende la famiglia delle Cu, Zn-SOD, distribuito esclusivamente tra gli organismi eucariotici.

### Glutazione Perossidasi & Glutazione Reduttasi

Un altro enzima fondamentale nella detossificazione del perossido di idrogeno è la Glutazione Perossidasi (GPx). Si tratta di enzimi selenio-dipendente che convertono  $\text{H}_2\text{O}_2$  o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli (ROH) rispettivamente attraverso l'ossidazione di glutazione ridotto (GSH). Di seguito viene riportata la reazione di dismutazione del  $\text{H}_2\text{O}_2$  e gli idroperossidi organici:



Sebbene tutte le GPx catalizzano apparentemente la stessa reazione, ogni enzima differisce sia per la localizzazione cellulare (citosol, mitocondrio, ecc) che per la specificità del substrato (Brigelius-Flohe; 1999). Per esempio PHGPx/GPx4 è un enzima associato alle membrane che agisce a livello degli idroperossidi dei fosfolipidi di membrana (Ursini *et al.*, 1986).

Un altro enzima coinvolto nella detossificazione di substrati ossidati è Glutatione-S-Transferasi (GST-transferasi) che catalizza la coniugazione del GSH direttamente ai substrati ossidati che vengono poi eliminati dall'organismo. Nell'uomo e nei mammiferi sono state identificate e caratterizzate 7 diverse classi di GST-transferasi appartenenti ad un'unica famiglia di enzimi solubili citosolici e, solo recentemente, sono state identificate altre due famiglie di enzimi a localizzazione rispettivamente mitocondriale e microsomiale (MAPEG). L'attività sia delle GPx che delle GST comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare ed un aumento del GSSG; al fine di mantenere costante il rapporto GSH/GSSG, il GSSG viene rilasciato dalla cellula e degradato nell'ambiente extracellulare. Il GSH può essere rigenerato attraverso la sintesi *ex novo* o attraverso riduzione della forma ossidata GSSG ad opera della glutatione reduttasi (GR), una flavoproteina che permette di convertire GSSG in GSH utilizzando come agente riducente il NADPH. Il GSH può essere sintetizzato *ex novo* attraverso due reazioni sequenziali, ATP-dipendenti, catalizzate rispettivamente dalla  $\gamma$ -glutamilsteina sintetasi ( $\gamma$ GCS), la cui attività limita la velocità di sintesi, e dalla glutatione sintetasi (Fig. 1.3.1.7).

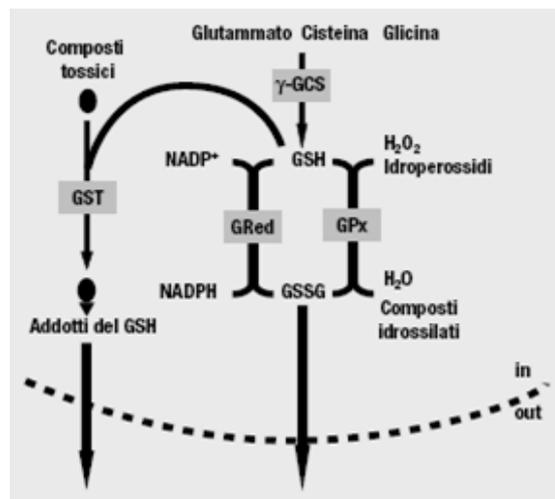
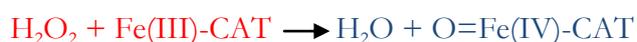


Fig. 1.3.1.7 Ciclo del Glutatione

## Catalasi

Dato che la reazione di dismutazione dell'anione superossido porta alla formazione del perossido di idrogeno, la funzione antiossidante della Cu, ZnSOD è legata all'attività di altri enzimi detossificanti, quali la catalasi e GSH-Px. La catalasi è un enzima tetramerico ad alto peso molecolare contenente porfirina nel sito attivo. La funzione principale di questo enzima è quella di eliminare il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione che avviene in due passaggi:



La reazione netta risultante è quindi:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

### 1.3.2 Antiossidanti secondari o non enzimatici

Accanto agli antiossidanti enzimatici, esiste una classe di antiossidanti non enzimatici che hanno la funzione di implementare le difese antiossidanti ripristinando, per esempio, il *pool* dei tioli oltre ad agire di per sè come *scavenger* dei radicali liberi.

## Glutazione (GSH)

Il Glutazione (GSH) di natura peptidica (glu-cys-gly) è il più importante antiossidante tiolico solubile all'interno della cellula e partecipa con vari meccanismi alla difesa cellulare dagli agenti endogeni ed esogeni nocivi (Fig. 1.3.2.8).

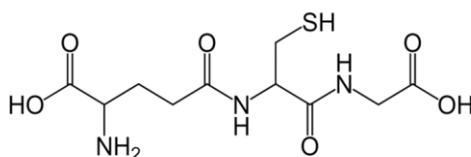


Fig. 1.3.2.8 Struttura chimica del GSH



## Vitamina C o Acido ascorbico

La vitamina C (ascorbato - Asc): è un antiossidante non enzimatico idrosolubile e spiccatamente acido. Presenta due gruppi idrossilici ionizzabili ( $\text{AscH}_2$ ): tuttavia, a pH fisiologico, il 99.9% della vitamina C è presente sottoforma di semideidroascorbato ( $\text{AscH}^-$ ). Nell'interazione con i radicali,  $\text{AscH}^-$  dona un elettrone, generando così il radicale semideidroascorbico ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ). Quest'ultimo è scarsamente reattivo ed è infatti considerato come un antiossidante terminale. Sembra, comunque, che la vitamina C abbia un ruolo importante soprattutto in reazioni di ossidoriduzione catalizzate da ossigenasi (Fig.1.3.2.10). La sua attività antiossidante si esplica principalmente in associazione ad enzimi antiossidanti, carotenoidi e vitamina E.

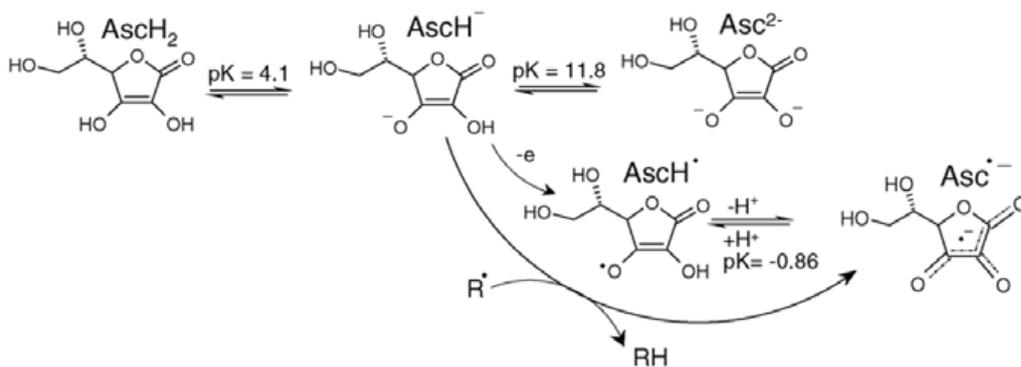


Fig. 1.3.2.10 Le diverse forme di acido ascorbico (Asc) e la reazione con i radicali ( $\text{R}^\bullet$ ).

## Vitamina E o $\alpha$ -tocoferolo

Esistono 8 tipi di vitamina E. Fra queste, l' $\alpha$ -tocoferolo (Fig. 1.3.2.11) è la forma biologicamente più potente ed attiva. E' infatti il più importante antiossidante liposolubile utilizzato dalle cellule.

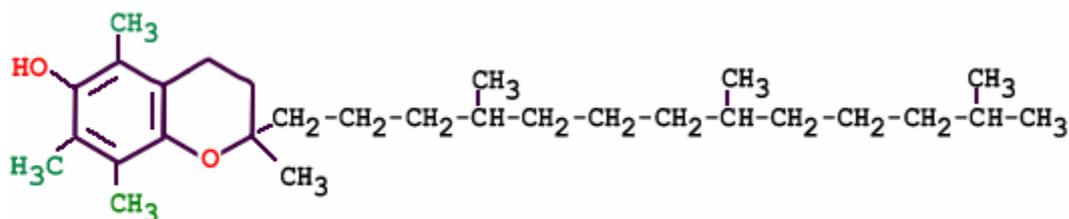


Fig. 1.3.2.11 Struttura dell' $\alpha$ -tocoferolo

La sua attività antiossidante è volta alla prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo della perossidazione lipidica. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando l'elettrone del suo gruppo idrossilico ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la loro perossidazione. Tale reazione *redox* trasforma l' $\alpha$ -tocoferolo in un radicale  $\alpha$ -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la vitamina C, il glutatione o la vitamina Q (Q10) per riformare l' $\alpha$ -tocoferolo.

## 1.4 STRESS OSSIDATIVO NEL TESTICOLO

Nella reazione di perossidazione degli acidi grassi polinsaturi si formano prodotti di degradazione che determinano alterazioni letali alla cellula in particolare quando la perossidazione lipidica interessa i fosfolipidi delle membrane biologiche, si verificano variazioni strutturali e funzionali con conseguente aumento della permeabilità cellulare, perdita della funzionalità delle proteine enzimatiche, danni al DNA e attivazione di enzimi. E' noto che gli spermatozoi così come le membrane testicolari, sono altamente ricchi di acidi grassi polinsaturi e quindi particolarmente esposti agli effetti deleteri delle specie ossigeno reattive e, di fatto, molti dei danni indotti da queste ultime sono il risultato del processo di perossidazione lipidica che causa anomalie nel tratto intermedio e nella motilità (Imai e Nakagawa, 2003). Durante la spermatogenesi si producono i ROS, si riduce il glutatione intracellulare e numerose proteine tioliche sono ossidate a bisolfuri (Puglisi *et al.*, 2005). Questa serie di eventi influenza il bilancio *ossidante/antiossidante* negli spermatozoi e nel mezzo extracellulare. La produzione di specie ossigeno reattive e l'esaurimento di glutatione nelle cellule germinali maschili di vertebrati sono eventi fisiologici richiesti per la maturazione funzionale e la capacitazione degli spermatozoi. Sebbene una eccessiva produzione di ROS possa avere effetti nocivi sugli spermatozoi, il rilascio controllato o la "pulizia" di alcune specie ossigeno reattive appaiono modulare sia la spermatogenesi che la funzione spermatica. Evidenze sperimentali mostrano che la maturazione finale e la capacità fertilizzante degli spermatozoi richiede uno "stress ossidativo controllato" accoppiato ad un'efficiente difesa antiossidante extracellulare, quest'ultima forse coinvolta nella difesa della superficie dell'ossidazione delle proteine tioliche (Puglisi *et al.*, 2005). A basse concentrazioni, il perossido d' idrogeno può promuovere *in vitro* la capacitazione degli spermatozoi, sebbene concentrazioni più alte risultino tossiche (Drevet, 2006).

La spermatogenesi è un processo replicativo capace di generare approssimativamente 1000 spermatozoi al secondo. L'alto tasso di divisione cellulare implica simultaneamente un alto livello di consumo di ossigeno mitocondriale a carico dell'epitelio germinale. Tuttavia la scarsa vascolarizzazione del testicolo indica che i livelli di ossigeno in questo tessuto sono bassi e che la competizione per questo elemento vitale è estremamente attiva (Kumagai *et al.*, 2002). Dal momento che la spermatogenesi e la funzione steroidogenetica delle cellule di Leydig sono entrambi vulnerabili allo stress ossidativo, i bassi livelli di ossigeno che caratterizzano il testicolo potrebbero essere un importante meccanismo attraverso il quale il testicolo protegge se stesso dal danno mediato dai radicali liberi. Inoltre il testicolo contiene un insieme elaborato di enzimi antiossidanti e *scavenger* di radicali liberi tali da

garantire la doppia funzione spermatogenetica e steroidogenetica di questo organo. Questi sistemi di difesa antiossidante sono di notevole importanza poiché il danno perossidativo è correntemente visto come l'unica causa della compressa funzione testicolare che scatena conseguenze patologiche dalla torsione del funicolo spermatico al diabete. Malgrado i bassi livelli di ossigeno che caratterizzano il micro-ambiente testicolare, questo tessuto è vulnerabile allo stress ossidativo per l'alto contenuto di acidi grassi polinsaturi (20:4 e 22:6) e la presenza di potenziali specie reattive dell'ossigeno. I mitocondri rappresentano la fonte metabolica primaria di ROS perché sulle loro creste sono localizzati i complessi enzimatici della catena respiratoria deputati alla fosforilazione ossidativa; essi sono la fonte di un'ampia varietà di ROS: le xantine (Kumagai *et al.*, 2002) e l'NADPH-ossidasi (Banfi *et al.*, 2001) e il citocromo P450 (Zangar *et al.*, 2004). Questi enzimi si specializzano nella produzione di ROS o producono questi metaboliti tossici come una conseguenza involontaria della loro attività biochimica. Al fine di affrontare questo rischio, i testicoli hanno sviluppato un sofisticato sistema di antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Circa i costituenti enzimatici di questo sistema di difesa, l'induzione allo stress ossidativo nel testicolo accelera una risposta da parte del fattore NF- $\kappa$ B che attiva la trascrizione di mRNA per l'attività della superossido dismutasi (SOD), della glutatione perossidasi (GPx) e della glutatione-S-transferasi (GST) (Kaur *et al.*, 2006). Data l'importanza della SOD in questa strategia di difesa del testicolo per la conversione del superossido anione ( $O_2^-$ ) a perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), non sorprende che l'organo contiene non solo le forme convenzionali di SOD (Cu/Zn e Fe/Mn) ma anche una forma insolita extracellulare (SOD-Ex) che è prodotta sia dalle cellule germinali che dalle cellule del Sertoli. C'è anche evidenza che le cellule germinali potrebbero stimolare la secrezione di SOD-Ex dalle cellule del Sertoli attraverso l'azione delle citochine come l'interleuchina-1 $\alpha$ . L'importanza della forma citosolica della SOD (SOD1) è stata recentemente enfatizzata in studi con topi SOD1-*knockout* esposti a stress testicolare da calore. Questo trattamento induce un aumento della rottura dei filamenti di DNA e la perdita del citocromo C dai mitocondri delle cellule germinali. Similmente l'importanza della forma mitocondriale di SOD (SOD2) nel controllo della perdita di  $O_2^-$  dai mitocondri del testicolo è stata enfatizzata dal dato di mRNA per questo enzima più alto nel testicolo che nel fegato diversamente dalla GPx e dalla catalasi (Baek *et al.*, 2007). Sebbene la catalasi è di limitata importanza per il testicolo, esistono diverse isoforme di GPx in questo tessuto che utilizzano il GSH come fonte di elettroni per ridurre  $H_2O_2$ . Le isoforme sono concentrate nei mitocondri, nel nucleo e a livello dell'acrosoma degli spermatozoi. La glutatione perossidasi idrossido fosfolipide (PHGPx) è una delle più importanti isoforme di GPx nel testicolo ed è espressa nelle cellule spermatogenetiche e del Leydig. Poiché la maggior parte delle GPx sono selenio-dipendenti è facile comprendere come siano coinvolte nelle funzioni testicolari e spermatogenetiche,

esaminando l'impatto che il *deficit* di selenio provoca sulla riproduzione maschile (Boitani e Puglisi, 2008). Gli animali che si nutrono di una dieta povera di selenio mostrano una significativa riduzione di attività glutatione perossidasi a livello del testicolo unitamente ad una perdita di cellule germinali dall'epitelio germinale. Oltre ai sistemi antiossidanti descritti, il testicolo è provvisto di piccoli fattori molecolari a basso peso molecolare che sono coinvolti nella protezione contro il danno ossidativo. Questi fattori includono ioni ed una vasta varietà di *scavengers* di radicali quali zinco, vitamina C ed E, melatonina e citocromo C (Dokmeci, 2006).

## 1.5 DISTRUTTORI DELLO STATUS ANTIOSSIDANTE NEL TESTICOLO

Malgrado la protezione antiossidante nel testicolo coinvolta nella steroidogenesi e nella produzione di spermatozoi, una vasta varietà di fattori endogeni ed esogeni sono noti per perturbare questo meccanismo di difesa e generare uno stato di stress ossidativo (Sakai *et al.*, 2010).

### *Criptorchidismo*

Le elevate temperature associate al criptorchidismo sono causa di stress ossidativo nel testicolo con conseguente riduzione dell'attività di SOD e catalasi. In linea con questi risultati, l'esposizione diretta delle cellule spermatogenetiche ad elevate temperature induce meccanismi apoptotici associati ad alti livelli di  $H_2O_2$ . Tuttavia la conseguenza dello stress termico sulle cellule spermatogenetiche è acuita nei topi SOD1 *knock out* attraverso un meccanismo che potrebbe essere invertito dall'aggiunta di Tiron, uno *scavenger* contro il radicale anione superossido. Il significato clinico di questi risultati può essere visto nei livelli di DNA danneggiato e nella produzione di ROS negli spermatozoi di pazienti con una storia di criptorchidismo (Lysiak *et al.*, 2007).

### *Torsione del testicolo*

La torsione del testicolo meglio definita torsione del funicolo spermatico è una condizione che porta a ischemia testicolare ed alti livelli di stress ossidativo nei testicoli ipsilaterali associati a produzione di NO ed  $H_2O_2$  con accumulo di isoprostano, esaurimento delle risorse antiossidative e apoptosi nella linea germinale (Lysiak *et al.*, 2007). Anche brevi periodi di ischemia di 3 ore inducono stress ossidativo nel testicolo, abbassamento dei livelli testicolari di glutatione e conseguente alterazione nella spermatogenesi. I livelli di danno perossidativo osservati nel tessuto testicolare incrementano la torsione del funicolo spermatico e il danno da riperfusione. Le basi biochimiche del danno da riperfusione sembrano coinvolgere un enzima chiave metabolico, la xantina deidrogenasi che durante l'ischemia si converte in xantina ossidasi a causa dell'ossidazione dei gruppi -SH e al taglio proteolitico. Appena il tessuto è riperfuso di sangue, la xantina ossidasi si presenta con un substrato ossidabile nella forma xantina/ipoxantina e comincia a generare copiose quantità di ROS. L'ischemia testicolare è supportata dall'improvvisa induzione della perossidazione lipidica e dalla concomitante soppressione dei principali antiossidanti endogeni quali la SOD, catalasi e GSH. (Unsal *et al.*, 2006).

Il danno al tessuto può essere limitato se trattato con antiossidanti esogeni come il selenio, L-carnitina e resveratrolo (Atik *et al.*, 2006).

### ***Ipertiroidismo***

L' induzione dell'ipertiroidismo nei ratti è associata allo stress ossidativo nel testicolo, come riflette l'incremento del meccanismo di perossidazione lipidica, gli elevati livelli di GSH e l' induzione degli enzimi antiossidanti. Lo stress ossidativo sembra essere associato ad un aumento dell'attività tirosina-dipendente nel mitocondrio e alla concomitante perdita di elettroni dalla catena di trasporto degli elettroni mitocondriali (Sahoo *et al.*, 2007). Lo stress ossidativo provocato dall'ipertiroidismo può essere acuito da pinealectomia: in vivo, la melatonina è coinvolta nell'inibizione dello sviluppo delle gonadi e nel controllo dell'estro (Mogulkoc *et al.*, 2006). Negli animali che seguono ritmi stagionali, la deprivazione della ghiandola pineale o la somministrazione di melatonina modificano il ciclo riproduttivo (Kennaway *et al.*, 1995). Questi risultati sperimentali indicano che l'ipertiroidismo è associato ad una scarsa qualità del seme, in particolare alla compromessa motilità degli spermatozoi e si normalizza quando sono ristabilite le corrette funzioni della ghiandola tiroidea.

### ***Squilibrio del controllo endocrino***

L' ambiente endocrino dei testicoli ha un notevole impatto sullo *status* antiossidante di questo organo. I trattamenti includono l' esposizione a ciclofosfamide e sulfonato dimetano che decrementano la concentrazione di testosterone intratesticolare, inibiscono l'espressione testicolare degli enzimi antiossidanti quali GPx, SOD e catalasi. Tuttavia questo effetto sull'espressione antiossidante oltre il fallimento della spermatogenesi può essere invertito con la somministrazione di gonadotropine esogene per incrementare artificialmente i livelli di testosterone (Ghosh *et al.*, 2002). La soppressione di testosterone intratesticolare con steroidi esogeni, androgeni e estrogeni, implica una riduzione dell'espressione degli enzimi antiossidanti, un concomitante incremento del danno perossidativo e dell' apoptosi delle cellule germinali. È interessante notare come la ridotta attività antiossidante in risposta al trattamento degli steroidi esogeni per la maggior parte colpisca le cellule del Leydig che sono ricche di attività enzimatica GPx e catalasi, mentre le attività della SOD che sono confinate ai tubuli seminiferi, non sono drasticamente colpite sotto le condizioni sperimentali descritte. Tuttavia è possibile che il sito di generazione dei radicali liberi coinvolge gli elettroni del *pathway* steroidogenico delle cellule del Leydig inibito dallo stress ossidativo. Questi radicali liberi

attaccano poi le cellule germinali nei tubuli seminiferi inducendo meccanismi apoptotici estesi e l'alterazione della spermatogenesi: infatti l'aminoglutetimide, inibitore del citocromo P450, induce perossidazione lipidica nel testicolo e la sovrastimolazione delle cellule del Leydig ad un'esposizione cronica di HCG stimola un'elevata produzione di ROS (Aitken *et al.*, 2007).

Si deduce quindi che lo stress ossidativo è la principale causa nell'eziologia dell'infertilità maschile. A livello degli spermatozoi i ROS inducono il sistema bifasico di perossidazione lipidica e di frammentazione del DNA (Aitken *et al.*, 2007); a livello del testicolo lo stress ossidativo è "distruuttore" sia della capacità steroidogenica delle cellule del Leydig che dell'epitelio germinale di differenziare gli spermatozoi (Naughton *et al.*, 2001).

## CAPITOLO II: LE SELENIOPROTEINE

### 2.1 RUOLO BIOLOGICO DEL SELENIO

Il selenio è un oligoelemento chimico caratterizzato da un peso atomico di 78.96, un numero atomico di 34 appartenente al IV gruppo della tavola periodica; è un non metallo tossico presente nei composti organici ed inorganici in diversi stati di ossidazione. Si presenta con valenze variabili da -2 a +6, tra queste i 3 stati di ossidazione principali sono: -2 (selenuri di idrogeno), +4 (seleniti) e +6 (selenati) (Dodig e Cepelak, 2004). I selenati sono composti relativamente solubili e altamente tossici, simili ai solfati, mentre i seleniti sono praticamente insolubili tanto da poter essere considerati come forme di deposito del selenio, quei pochi che sono invece solubili sono altamente tossici e formano con ferro e alluminio dei composti stabili (Goyer, 1996). La formazione e la stabilità dei selenati (stato di ossidazione +6), è favorita da un ambiente alcalino e ossidante. Nella sua valenza -2, (selenuro di idrogeno), il selenio è un gas altamente tossico (1-4 ppb nell'aria) e reattivo, che in presenza di ossigeno si decompone rapidamente in selenio elementare e acqua. Nella forma elementare (stato di ossidazione 0), invece, il selenio è insolubile, non tossico, quando bruciato si ossida a diossido di selenio, che sublima e quando disciolto in acqua, forma acidi selenosi (Dodig e Cepelak, 2004). Il selenio, ancora, forma con i metalli pesanti, come il cobalto, dei composti stabili e insolubili. Anche altri selenuri metallici come i selenuri di arsenico, rame o cadmio sono caratterizzati da una scarsa solubilità che influenza l'assorbimento, la ritenzione e la distribuzione del corpo del selenio e del metallo pesante (Goyer, 1996). L'insolubilità di questi composti potrebbe essere alla base della detossificazione da metilmercurio con dieta a base di selenio. La seleniometionina e la seleniocisteina, analoghi selenici degli aminoacidi solforici, sono tra i composti organici del selenio più importanti dal punto di vista biologico (Beckett e Arthur, 2005). È stato identificato nella prima metà del ventesimo secolo come fattore tossico per gli animali da pascolo, successivamente è stato rivalutato per il suo ruolo di micronutriente essenziale per gli animali e per la sua valenza nella riproduzione (Maiorino e Ursini, 2002). Il selenio fu scoperto dal chimico svedese J. J. Berzelius nel 1817. Fino agli anni '50 del secolo scorso, fu considerato un elemento tossico, responsabile di malattie comunemente dette *alkali disease* o *blind stagger disease*. Queste malattie, caratterizzate da depressione, affaticamento, perdita di capelli e fragilità delle unghie, erano considerate endemiche nelle zone in cui il suolo era particolarmente ricco di selenio. In seguito, nel 1954, Pinsent osservò che alcuni batteri crescevano più velocemente in terreni di coltura arricchiti di questo elemento. Nel 1957 Swartz e Folz scoprirono che il selenio era contenuto nel "fattore 3", un

composto isolato dal rene di maiale in grado di prevenire, nel ratto, la necrosi epatica indotta da una dieta a base di saccarosio e lievito *torula*; in seguito si dimostrò che tale fattore poteva essere sostituito da diverse forme organiche e inorganiche di selenio. Da questo momento, il selenio fu considerato un oligoelemento essenziale nella nutrizione. Negli anni '60 si dimostrò che alcune malattie tipiche degli animali domestici, quali il *white muscle disease* dei bovini, il *mulberry heart disease* dei maiali e la diatesi essudativa dei polli, potevano essere attribuite ad un insufficiente apporto di selenio. Dieci anni più tardi si scoprì che, nell'uomo, la seleno-deficienza poteva predisporre o essere causa di specifiche malattie, quali la malattia di Keshan, una grave forma di cardiomiopatia in alcuni casi fatale, e la malattia di Kashin-Beck, un'osteoartrite deformante, patologie descritte per la prima volta in alcune aree rurali della Cina, dove la concentrazione di selenio nel suolo è particolarmente bassa. Il selenio è largamente distribuito in natura e la composizione del suolo condiziona il contenuto di selenio degli alimenti. Esistono aree geografiche dove il terreno è povero dell'oligoelemento ed in queste regioni si sono riscontrate le manifestazioni della selenodeficienza. La sua concentrazione nei suoli varia da meno di 0,1µg/g in alcune aree a più di 1mg/g in altre; eccetto alcune zone molto carenti ed altre molto ricche in selenio, la maggior parte dei suoli contengono una concentrazione compresa tra 1,0µg/g e 1,5µg/g. Le principali forme organiche di selenio, introdotte con la dieta, sono selenometionina e selenocisteina (Beckett e Arthur, 2005). La prima, assunta esclusivamente con la dieta, è la fonte di selenio maggiormente rappresentata in lievito, cereali, legumi e soia. È assorbita a livello intestinale, grazie al trasportatore della metionina; è immagazzinata in vari organi, quali muscolo scheletrico, pancreas, fegato, rene, stomaco, eritrociti, e successivamente, è utilizzata per la sintesi proteica (Schrauzer, 2000). Al contrario, la selenocisteina presente nelle selenoproteine non deriva direttamente dall'alimentazione, ma deve essere sintetizzata dall'organismo attraverso un meccanismo complesso, operante cotraduzionalmente: per questo motivo la selenocisteina è a pieno titolo il "ventunesimo aminoacido" (Böck, 1991). Attualmente, si ritiene che un adeguato apporto alimentare di selenio possa avere effetti benefici e ritardare processi fisiopatologici, quali invecchiamento, malattie cardiovascolari, cancro, e garantire appropriate funzioni immunitarie, endocrine e, nel maschio, la funzione riproduttiva (Maiorino e Ursini, 2002). Il selenio influenza tre aree della biochimica cellulare: la funzione antiossidante, lo status redox e il metabolismo degli ormoni tiroidei. I ruoli biologici attribuiti al selenio includono: la prevenzione del cancro, le malattie cardiovascolari e le mutazioni virali. In aggiunta, elementi in traccia di selenio sono essenziali per ottimizzare la funzione immunitaria ed endocrina e per moderare la risposta infiammatoria (Beckett e Arthur, 2005). L'importanza del selenio nel sistema endocrino è messa in evidenza dal fatto che molti tessuti endocrini hanno evoluto dei meccanismi tali da mantenere a livelli relativamente alti le concentrazioni di selenio anche quando c'è una sua deficienza nel regime

dietetico. Il selenio quindi può agire modificando la funzione tiroidea, l'omeostasi del glucosio e la fertilità (Ursini *et al.*, 1999). Da ricordare che il selenio è un componente chiave di diversi enzimi: nella glutatione perossidasi il selenio svolge insieme alla vitamina E, un ruolo nella protezione delle membrane biologiche dai danni provocati dai perossidi.

## 2.2 METABOLISMO & RUOLO FISIOLÓGICO DEL SELENIO

Le principali forme organiche del selenio, introdotte con la dieta, come visto nel paragrafo precedente, sono la selenometionina e la selenocisteina (Böck et al., 1991). La selenometionina è assorbita nell'intestino ad opera del trasportatore della metionina, mentre la selenocisteina è veicolata da un trasportatore specifico. Il selenio è assorbito anche in forma inorganica come supplemento: il selenito, Se con valenza 4+, è assorbito passivamente (30, 31) mentre il selenato, Se con valenza 6+, segue la via di assorbimento dello zolfo. Non esiste nell'uomo un controllo omeostatico dell'assorbimento duodenale del selenio, che varia dal 55% al 70% in funzione della forma somministrata. In condizioni di apporto ottimale la concentrazione ematica di selenio è pari a circa 100 ng/ml e il selenio è legato alle proteine del plasma ed ai globuli rossi. Il selenio plasmatico è associato all'albumina, alla Glutazione Perossidasi plasmatica (pGPx) e alla Selenoproteina P. Nella Glutazione Perossidasi plasmatica e nella Selenoproteina P il selenio si trova in forma di selenocisteina, mentre nell'albumina è in forma di selenometionina. Normalmente circa il 60% del selenio plasmatico è legato alla Selenoproteina P, mentre il resto è distribuito uniformemente tra pGPx ed albumina. Se viene somministrata selenometionina (sottoforma di estratti di lievito arricchito) aumenta soprattutto il selenio legato alla albumina, mentre la supplementazione con selenio inorganico incrementa ulteriormente la percentuale del selenio contenuto nella Selenoproteina P a scapito della quota legata all'albumina. La percentuale che comunque non varia è quella legata alla pGPx. La attività di questo enzima può essere quindi considerata buon indice del selenio corporeo. Nei globuli rossi il selenio è legato all'emoglobina e soprattutto alla Glutazione Perossidasi cellulare (cGPx): a seconda della forma di assunzione varia la percentuale riferibile all'una o l'altra di queste due proteine. La selenometionina si trova prevalentemente associata all'emoglobina, mentre invece il selenato porta ad incorporazione in ugual misura tra emoglobina e Glutazione Perossidasi. L'attività della Glutazione Perossidasi è proporzionale alla concentrazione ematica del selenio solo in condizioni di seleno-deficienza. In caso di seleno-adequazione (a livelli ematici di selenio attorno a 100 ng/ml) la concentrazione ematica dell'oligoelemento e l'attività della GPx sono indipendenti. La selenometionina assorbita entra a far parte del *pool* della metionina, e può essere utilizzata nella sintesi proteica al posto di quest'ultima: in questo modo il selenio viene introdotto nelle proteine in modo aspecifico. Al contrario l'introduzione della selenocisteina nelle proteine avviene in modo controllato, attraverso il cosiddetto "metabolismo regolato del selenio" (Schomburg *et al.*, 2004). Il metabolismo del selenio è volto sia a garantire l'adeguata sintesi delle selenoproteine che a mantenere bassa la concentrazione di selenocisteina e selenio inorganico per evitarne l'accumulo che risulterebbe tossico per la cellula. La concentrazione della selenocisteina è

determinata dal suo assorbimento, dalla sua liberazione per idrolisi delle selenioproteine e dalla conversione della selenometionina per trans-sulfurazione. Essa viene scissa dall'enzima SeCys- $\beta$ -liasi che libera selenio. Questo viene poi ridotto a selenuro (acido selenidrico). Il selenio inorganico (selenato e selenito) viene ridotto ad acido selenidrico attraverso la formazione di selenodiglutatione. L'acido selenidrico ( $H_2Se$ ) è il composto centrale da cui dipende l'omeostasi del selenio: esso infatti rappresenta l'intermedio nel quale viene trasformato il selenio di varia provenienza ed è il composto di partenza per i diversi destini metabolici. Il selenio è un componente chiave di diversi enzimi: nella glutatione perossidasi ad esempio svolge, insieme alla vitamina E, un ruolo nella protezione delle membrane biologiche dai danni provocati dai perossidi (Ben Amara *et al.*, 2011). Per contro il selenio tende a rimpiazzare lo zolfo formando seleno-analoghi degli aminoacidi solforati. Questo comporta inibizione dei sulfidril-enzimi, in particolare di alcune deidrogenasi come la succinico-deidrogenasi. I seleniti possono reagire con i gruppi tiolici della cisteina o del coenzima A formando selenosolfuri e rendendo inutilizzabili importanti cofattori. Si è formulata un' ipotesi di legame reversibile con i gruppi -SH dell'acetil-CoA e del malonil-CoA del selenito (Cao *et al.*, 2001). Tutto danneggerebbe i sistemi di respirazione cellulare che comporta una ridotta produzione di ATP (Vincent e Forceville, 2008). Quantità tossiche di selenio provocano anche una diminuzione del glutatione ridotto, in particolare a livello epatico (Yamasaki *et al.*, 2011). Queste alterazioni biochimiche non bastano a spiegare il meccanismo patogenetico della tossicosi da Se: si pensa che un "ipossia istotossica" in cui si ha perturbamento della respirazione cellulare e una ridotta produzione di ATP, possa determinare *deficit* funzionale dei tessuti ad alto metabolismo energetico quali il tessuto nervoso ed il miocardio (Lamarche *et al.*, 2004).

### 2.3 INCORPORAZIONE DEL SELENIO NELLE SELENIOPROTEINE

La forma biologicamente attiva del selenio (Fig.2.3.12), selenocisteina, viene incorporata nelle proteine co-traduzionalmente durante la sintesi proteica. Il meccanismo completo, chiarito nel dettaglio nei procarioti ma non ancora completamente negli eucarioti, richiede la contemporanea presenza dei prodotti di quattro geni: *SelA*, *SelB*, *SelC* e *SelD* ed il riconoscimento di uno specifico codone (UGA), segnale per l'inserimento della selenocisteina, invece che codone di stop per la sintesi proteica, come normalmente si verifica in base alle regole del codice genetico (Böck, 1991). Esiste, inoltre, a livello di mRNA, una particolare struttura a forcina, SECIS (*Selenocysteine Inserting Sequence*), che permette il riconoscimento del codone UGA. Tale struttura, nei procarioti, è situata a valle del codone UGA, mentre negli eucarioti giace a livello della regione 3' non tradotta dell'mRNA (3' UTR). Il primo passaggio nella biosintesi di selenocisteina è la formazione di selenofosfato (SeP) a partire da acido selenidrico ed ATP, ad opera dell'enzima selenofosfato sintetasi, una selenioproteina prodotta dal gene *SelD*. Il selenofosfato è essenziale per la formazione di selenocistena, a partire da L-serina, mentre l'aminoacido è legato ad uno specifico tRNA (seril-tRNAs<sup>e</sup>Cys), per azione dell'enzima selenocisteina sintetasi. Il seril-tRNAs<sup>e</sup>Cys è prodotto a sua volta dal gene *selC*. La selenocisteina sintetasi, prodotto del gene *SelA*, possiede un residuo di piridossalfosfato che forma una base di Schiff con l'amino gruppo del seril-tRNAs<sup>e</sup>Cys. Segue l'aggiunta di selenio, donato da selenofosfato. Si forma così un tRNA caricato con selenocisteina (selenocisteil-tRNAs<sup>e</sup>Cys). *SelB* costituisce un fattore di elongazione specifico, capace di riconoscere la sequenza SECIS a valle del codone UGA e di formare un complesso con selenocisteil-tRNAs<sup>e</sup>Cys e con il ribosoma, in modo da inserire la selenocisteina nella proteina nascente. Questo meccanismo, studiato originariamente nei procarioti (Burk, 1991), è stato riconosciuto anche negli eucarioti, in cui l'inserzione co-traduzionale di selenocisteina richiede la presenza del "Complesso d'inserzione della selenocisteina" (Schomburg *et al.*, 2004). Tale complesso è costituito dal codone UGA, codificante per selenocisteina, dall'mRNA SECIS della regione 3' UTR, dal selenocisteil-tRNAs<sup>e</sup>Cys, dal fattore di elongazione specifico per la selenocisteina (eEF<sup>Sec</sup>) e dalla proteina legante l'elemento SECIS, SBP2 (*SECIS Binding Protein 2*), specifica per ciascuna selenioproteina (Lesoon, 1997).

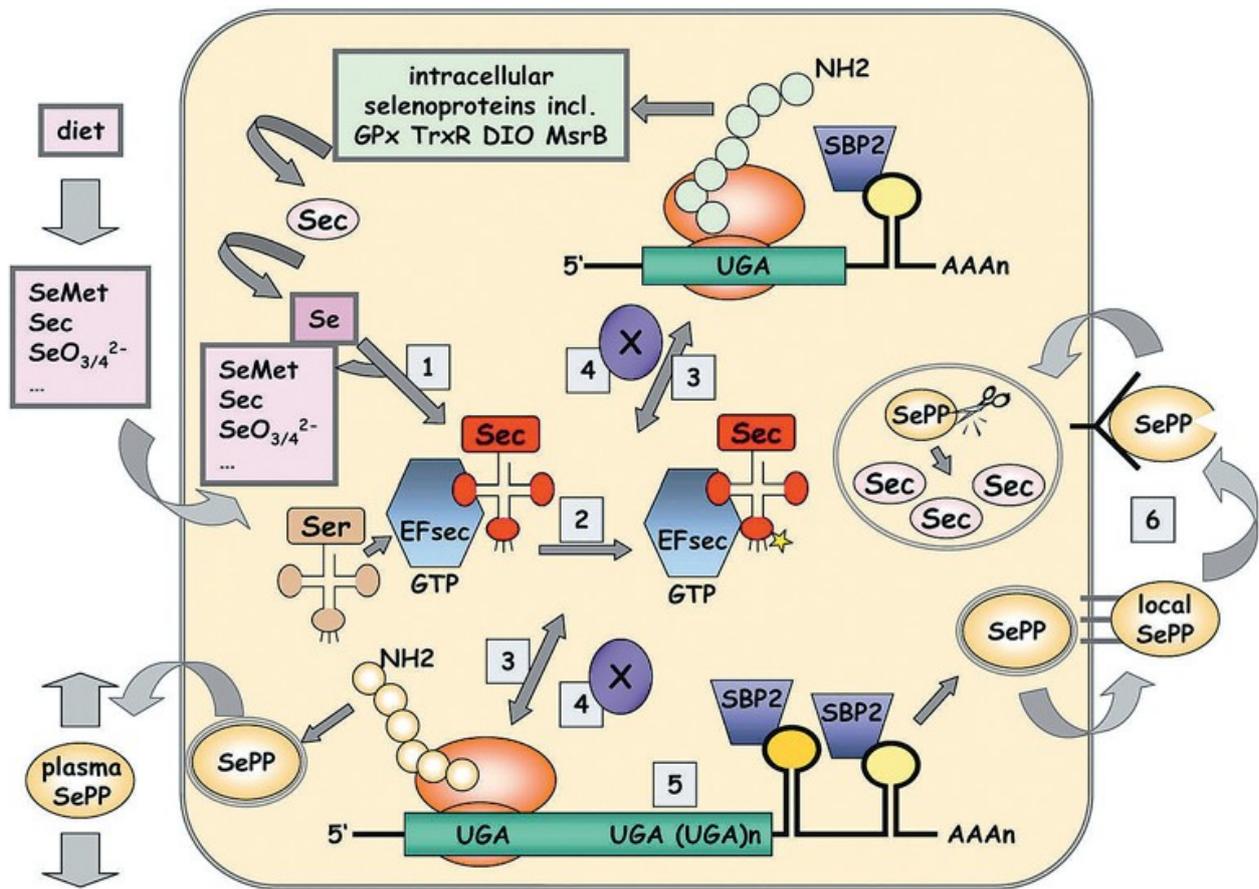


Fig. 2.3.12 Sintesi del selenio: *pathway* metabolico (Schomburg *et al.*, 2004)

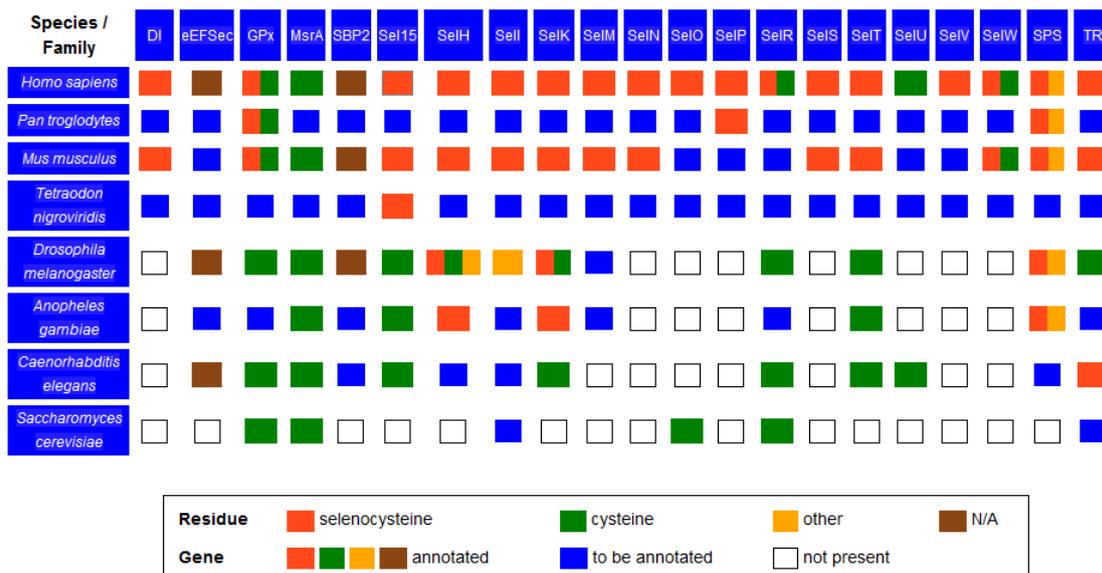
La disponibilità di selenio condiziona la sintesi delle selenoproteine in modo diverso nei diversi organi. Secondo alcuni Autori (Kollmus *et al.*, 2000) questo dipenderebbe dagli elementi SECIS responsabili di una diversa affinità per il complesso di traduzione della selenocisteina e quindi della diversa entità di sintesi delle selenoproteine specialmente quando la disponibilità di selenio è limitata. Altri elementi in grado di condizionare la espressione delle selenoproteine sono la distanza del codone UGA dall'elemento SECIS e il tipo di basi che stanno immediatamente vicine al codone UGA (Berry *et al.*, 2002). L' espressione dell'enzima Glutathione Perossidasi è regolata anche dalla stabilità del suo mRNA: in condizioni di selenodeficienza e di ridotta disponibilità di selenocisteil tRNA[Ser]Sec il messaggero dell'enzima ha un turnover aumentato perchè il codone UGA viene interpretato come codone non senso e innesca il meccanismo di degradazione del mRNA mediato dai codoni non senso. Attraverso queste diverse modalità di regolazione della espressione si crea una

vera e propria “gerarchia delle selenioproteine” caratteristica per ciascun organo per cui, anche in condizioni di selenio-deficienza, l’espressione di alcune viene privilegiata rispetto l’espressione di altre (Reszka *et al.*, 2011).

## 2.4 LE SELENIOPROTEINE: CLASSIFICAZIONE & STRUTTURA

Quasi tutto il selenio introdotto nell'organismo viene incorporato nelle proteine. Esistono diversi tipi di proteine contenenti selenio, ma sembra che questo elemento sia introdotto in modo specifico solo in un tipo di proteine, nelle quali l'ingresso della selenocisteina (Sec) è determinato dalla presenza nel DNA del codone specifico UGA. (Kryukov *et al.*, 2003). Queste proteine, contenenti selenocisteina, sono denominate selenioproteine, per differenziarle da altre proteine contenenti selenio, nelle quali i selenoaminoacidi sono introdotti in modo aspecifico. Le selenioproteine incorporano il selenio come un residuo di selenocisteina che è completamente ionizzato a pH fisiologico e agisce come un vero catalizzatore *redox*. Il vantaggio biologico dell'incorporazione nelle proteine del selenio (come selenocisteina) al posto dello zolfo (come cisteina) è da ricondursi ad alcune caratteristiche chimico-fisiche diverse dei due elementi: la costante di dissociazione ed il potenziale di ossidoriduzione dei gruppi rispettivamente selenoidrilico (SeH) e sulfidrilico (SH). Il gruppo selenoidrilico della selenocisteina ha un pK di 5.3 rispetto al pK di 8.3 del gruppo sulfidrilico della cisteina. Questo comporta che i selenoli, a pH fisiologico, si trovino prevalentemente in forma dissociata, maggiormente reattiva, diversamente dai tioli, che nelle stesse condizioni si trovano pressochè unicamente in forma indissociata. Il potenziale ossidoriduttivo della selenocisteina è marcatamente più negativo di quello della cisteina cui consegue una maggiore reattività come riducente.

Il database **SELENO DB** (Castellano *et al.*, 2006) include un *set* di annotazioni genomiche negli eucarioti, con particolare attenzione al selenoproteoma umano per la ricerca di geni, proteine e residui di selenocisteina all'interno della proteina (SECIS).



Tutte le selenio proteine caratterizzate fino ad ora tranne la selenio proteina P, contengono residui di selenocisteina (Fig.2.4.13) nei siti attivi dell'enzima, che sono incorporati nella catena polipeptidica nascente in risposta ad un codone UGA quando una specifica struttura a forcina *stem-loop* è presente nella regione 3' UTR non tradotta (Kryukov *et al.*, 2003). Tuttavia il codone UGA ha una duplice funzione: è segnale sia della terminazione della sintesi proteica che dell'incorporazione dell'aminoacido Sec.

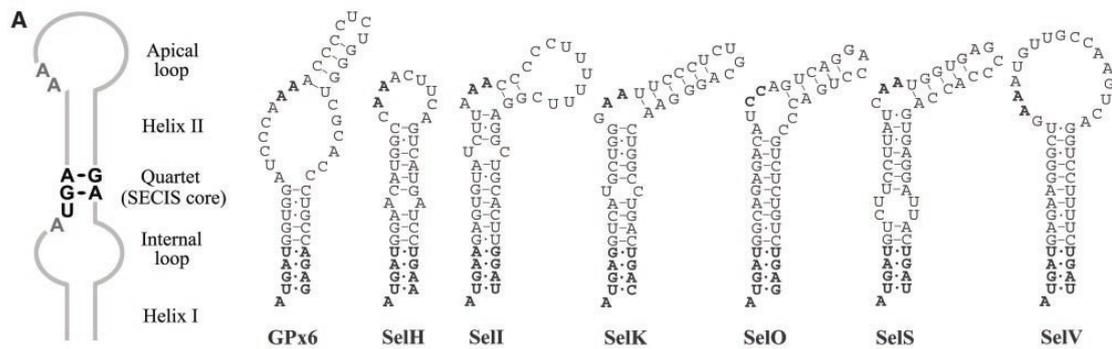


Fig. 2.4.13 Elementi SECIS nelle selenio proteine di mammiferi (Kryukov *et al.*, 2003)

Nei mammiferi sono state caratterizzate o identificate bioinformaticamente circa trenta selenio proteine (Fig.2.4.14) suddivisibili in gruppi in base alla posizione della selenocisteina nella sequenza (Kryukov *et al.*, 2003), tra le principali e meglio studiate:

- ✓ cinque sono **Glutazione Perossidasi (GPxs)**
- ✓ tre sono **Tioredoxina Reduttasi (TRs)**
- ✓ tre sono **Iodotironina Deiodinasi (DIs)**

Il primo gruppo include selenio proteine (GPxs, DIs, selenio proteine H, M, N, T, V,W e SPS2) in cui la selenocisteina si trova nella parte amminoterminale, a livello di un piccolo dominio funzionale; il secondo gruppo (TRs e selenio proteine S, R, O, I e K) è caratterizzato dalla presenza di selenocisteina, importante per la catalisi, nella regione carbossi-terminale.

Selenoprotein	Chromosomal location (number of exons)	Sec location in protein (length of protein)	Selenoprotein structure
15kDa	1p22.3 (5)	93 (162)	
DI1	1p32.3 (4)	126 (249)	
DI2	14q31.1 (2)	133 (265)	
DI3	14q32	144 (278)	
GPx1	3p21.31 (2)	47 (201)	
GPx2	14q23.3 (2)	40 (190)	
GPx3	5q33.1 (5)	73 (226)	
GPx4	19p13.3 (7)	73 (197)	
<b>GPx6</b>	<b>6p22.1 (5)</b>	<b>73 (221)</b>	
<b>H</b>	<b>11q12.1 (4)</b>	<b>44 (122)</b>	
<b>I</b>	<b>2p23.3 (10)</b>	<b>387 (397)</b>	
<b>K</b>	<b>3p21.31 (5)</b>	<b>92 (94)</b>	
M	22q12.2 (5)	48 (145)	
N	1p36.11 (12)	428 (556)	
<b>O</b>	<b>22q13.33 (9)</b>	<b>667 (669)</b>	
P	5p12 (4)	59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378 (381)	
R	16p13.3 (4)	95 (116)	
<b>S</b>	<b>15q26.3 (6)</b>	<b>188 (189)</b>	
SPS2	-	60 (448)	
T	3q24 (6)	36 (182)	
TR1	12q23.3 (15)	498 (499)	
TR2	3q21.2 (16)	655 (656)	
TR3	22q11.21 (18)	522 (523)	
<b>V</b>	<b>19q13.13 (6)</b>	<b>273 (346)</b>	
W	19q13.32 (6)	13 (87)	

Fig.2.4.14 Selenoproteine umane, loro localizzazione nei cromosomi e localizzazione del/i residuo/i di selenocisteina all'interno della proteina. Le caselle colorate includono i geni identificati più recentemente tramite analisi *in silico* (Kryukov *et al.*, 2003)

Il secondo gruppo di selenoproteine possiede la tipica struttura delle tioredoxine con motivo CXXU, che corrisponde al motivo del sito attivo delle tioredoxine CXXC (Dikiy *et al.*, 2007).

Dalla struttura appare che le funzioni della maggior parte delle selenioproteine sono coinvolte nei meccanismi *redox*: infatti la trascrizione di TR1 e GPx2 è regolata dal fattore di trascrizione *redox* Nrf2/Keap1. I due principali sistemi che sono coinvolti nella riduzione dei tioli sono la tioredoxina e la glutaredoxina: potenziali donatori di elettroni coinvolti nei meccanismi di ossidazione e “controllori” della sintesi delle selenioproteine (Papp *et al.*, 2006). La precisa funzione di numerose selenioproteine è ancora sconosciuta, tuttavia le TRs, GPxs e DIs (Fig.2.4.15) sono le tre famiglie di selenioproteine meglio caratterizzate, con differenti attività catalitiche ma tutte con attività *redox*.

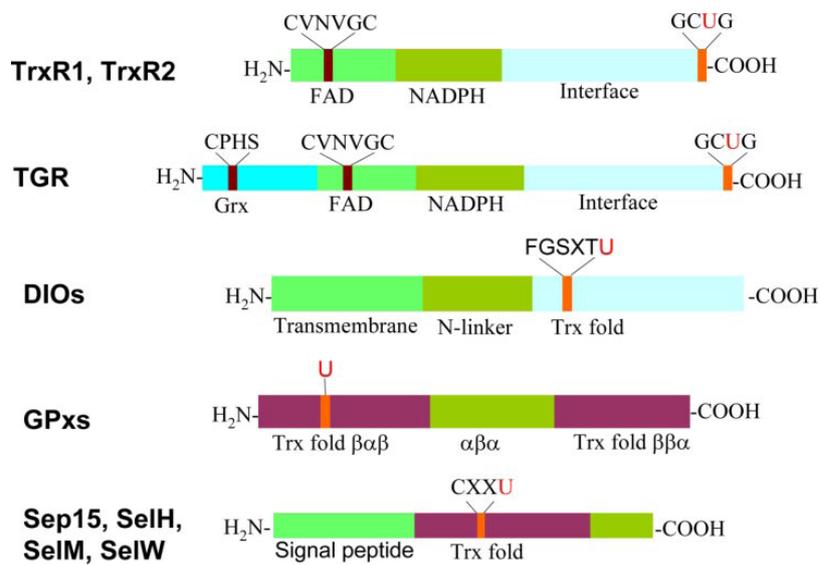


Fig. 2.4.15 Rappresentazione schematica di alcune selenioproteine (Kryukov *et al.*, 2003)

## 2.5 LE SELENIOPROTEINE: FUNZIONE

Il primo gruppo di selenioproteine include le Glutazione Perossidasi nelle quali la selenocisteina si trova nella parte N-terminale. La reazione catalizzata da questi enzimi comporta la riduzione di perossidi (ROOH) ad alcoli corrispondenti (ROH) a spese del glutatione ridotto (GSH).

### Gruppo delle Glutazione Perossidasi (Schriever *et al.*, 2009)

- ✓ Glutazione Perossidasi citosolica (cGPx o GPx-1), omotetramerica ed ubiquitaria;
- ✓ Glutazione Perossidasi intestinale (GI-GPx o GPx-2), omotetramerica, presente nel tratto gastrointestinale;
- ✓ Glutazione Perossidasi plasmatica (pGPx o GPx-3), tetramerica, presente nel plasma in forma glicosilata, secreta dal rene, esclusivamente extracellulare;
- ✓ Glutazione Perossidasi Idroperossido Fosfolipide (PHGPx o GPx-4), monomeric, è antiossidante delle membrane, proteina strutturale nello sperma ed è coinvolta nei meccanismi apoptotici;
- ✓ Glutazione Perossidasi 6 (GPx-6), recentemente identificata grazie all'analisi *in silico*; nell'uomo è una selenoproteina ma nei roditori presenta una cisteina al posto di una selenocisteina; il trascritto è stato identificato nell'embrione, ma nell'adulto la sua espressione sembra essere limitata all'epitelio olfattivo (Kryukov *et al.*, 2003).

Le Glutazione Perossidasi rispondono in modo diverso alla selenodeficienza: GPx-1 e GPx-3 diminuiscono con grande prontezza, mentre GPx-2 e GPx-4 sono risparmiate e vengono rapidamente ripristinate con la seleno-supplementazione.

Il secondo gruppo di selenioproteine è caratterizzato dalla presenza di selenocisteina, importante per la catalisi, nella regione carbossi-terminale. Questi enzimi riducono tioredossina a spese di NADPH; la tioredossina ridotta viene ossidata ad opera dei disolfuri proteici, che si riducono. Tali reduttasi possono regolare lo stato ossidoriduttivo di alcuni fattori di trascrizione, del recettore dei glucocorticoidi e di enzimi tra i quali la ribonucleotide reduttasi.

Gruppo delle Tioredossina Reduttasi (Cai *et al.*, 2011)

- ✓ Tioredossina Reduttasi citosolica (TR1), ubiquitaria, riduce anche l'acido lipoico, la vitamina K3 e l'acido deidroascorbico; potrebbe essere coinvolta nei meccanismi che portano all'apoptosi;
- ✓ Tioredossina Reduttasi (TR2), espressa esclusivamente nel testicolo, a partire dalla pubertà;
- ✓ Tioredossina Reduttasi mitocondriale (TR3).

Tutte le proteine Disolfuro Ossido-Reduttasi appartenenti alla superfamiglia delle Tioredossine sono coinvolte nelle reazioni di formazione, rottura e isomerizzazione dei ponti disolfuro. Lo stato ridotto delle Tioredossine è assicurato dall'interazione con la Tioredossina Reduttasi. Le Tioredossine sono proteine ubiquitarie che partecipano alla riduzione di un numero elevato di enzimi citoplasmatici.

Gruppo delle Deiodinasi (Solis *et al.*, 2011)

- ✓ Iodotironina Deiodinasi di tipo I (DI1), converte T4 (3, 5, 3', 5'-tetraiodotironina) in T3 (3, 3', 5'-triiodotironina) o in T3 (3, 3', 5'-triiodotironina); si trova soprattutto in tiroide, ipofisi, rene e fegato; in caso di ipotiroidismo la sua espressione a livello tiroideo aumenta;
- ✓ Iodotironina Deiodinasi di tipo II (DI2), regola la concentrazione di T3 a livello ipofisario e controlla la secrezione di TSH; si trova in tiroide, cervello, grasso bruno e muscolo scheletrico; aumenta in caso di ipotiroidismo;
- ✓ Iodotironina Deiodinasi di tipo III (DI3), inattiva T3; è localizzata nel cervello, pelle e tessuti fetali; si riduce in caso di ipotiroidismo.

Seleniofosfato Sintetasi: è l'enzima che catalizza la sintesi di seleniofosfato, il substrato donatore di selenio nelle reazioni biologiche (Costa *et al.*, 2011).

Selenioproteina di 15 kDa: espressa soprattutto in prostata, fegato, rene, cervello e testicolo, anche in condizioni di selenodeficienza; potrebbe essere associata all'azione protettiva del selenio nei confronti dell'insorgenza del cancro (Irons *et al.*, 2010)

Selenioproteina P: possiede molte selenocisteine nella struttura primaria; è presente nel plasma ed in alcuni organi e potrebbe svolgere funzione di trasporto del selenio (Gonzalez-Moreno *et al.*, 2011).

Selenioproteina W: si trova nel muscolo e sembra sia implicata nella degenerazione muscolare che ha luogo in caso di selenodeficienza (Ou *et al.*, 2011).

## 2.6 LA SUPERFAMIGLIA DELLE GLUTATIONE PEROSSIDASI: STRUTTURA ED EVOLUZIONE

La famiglia delle Glutatione Perossidasi (GPxs) comprende più di 700 proteine distribuite in tutto il regno vivente. Le prime Glutatione Perossidasi, la cGPx e la PHGPx, vennero identificate nei mammiferi come enzimi contenenti selenio. La reazione catalizzata da questi enzimi comporta la riduzione di perossidi (ROOH) ad alcoli corrispondenti (ROH) a spese del glutatione (GSH). Poiché i perossidi sono instabili e formano, in presenza di metalli di transizione, radicali che possono danneggiare strutture biologiche come proteine, lipidi o DNA, a questi enzimi venne riconosciuto un ruolo antiossidante.



Reazione catalizzata dalle Glutatione Perossidasi: R può essere la catena alchilica di un acido grasso insaturo o un atomo di H

La cGPx venne descritta per prima, come attività antiossidante che proteggeva l'emoglobina dalla denaturazione ossidativa (Mills, 1957). La natura del suo centro ossidoriduttivo venne chiarita con la dimostrazione che l'enzima contiene Se (Rotruck *et al.*, 1972), inserito durante la traduzione in forma di Sec e che la Sec partecipa alla catalisi (Forstrom *et al.*, 1978). L'analisi cristallografica della cGPx bovina indica che il residuo di Sec si trova in una depressione della superficie delle subunità, a distanza di legame idrogeno da un Trp e una Gln, che vennero quindi suggeriti costituire una triade catalitica. Di fatto, anni più tardi, ne venne definitivamente dimostrata la funzionalità (Maiorino *et al.*, 1995). Recentemente è emerso un quarto residuo importante per la catalisi, il residuo di Asn immediatamente successivo al Trp nella sequenza primaria, particolarmente rilevante per la attivazione/dissociazione del residuo catalitico (Fig.2.6.16). Quindi il sito attivo delle GPxs è più correttamente rappresentato come una tetraide (Tosatto *et al.*, 2008). Un'analisi *in silico* del selenoproteoma umano, ha definito la dimensione della famiglia delle SecGPxs, che include cinque proteine (Kryukov *et al.*, 2003) la GPx1, o cGPx, la GPx2 o GiGPx, la GPx3 o pGPx, la GPx4, o PHGPx e la GPx6. Sebbene 5 diverse perossidasi nei tessuti di mammifero potrebbero far sospettare ridondanza, studi recenti suggeriscono che l'unico vero enzima antiossidante sia la cGPx e che le altre SeGPxs potrebbero essersi evolute come enzimi in grado di ossidare specifici tioli proteici a spese di perossidi, quando venga a diminuire la concentrazione intracellulare di GSH (Ursini *et al.*, 1995). A questo proposito l'esempio meglio studiato è quello della GPx4 che, durante la spermatogenesi, quando diminuiscono i livelli di GSH nello spermatozoo, cambierebbe substrato

riducente, usando i residui di cisteina adiacenti della SMCP (*Sperm Mitochondrion Associated Cystein Rich Proteins*) al posto del GSH. Questa reazione di ossidazione sarebbe funzionale alla maturazione dello spermatozoo (Maiorino *et al.*, 2005).

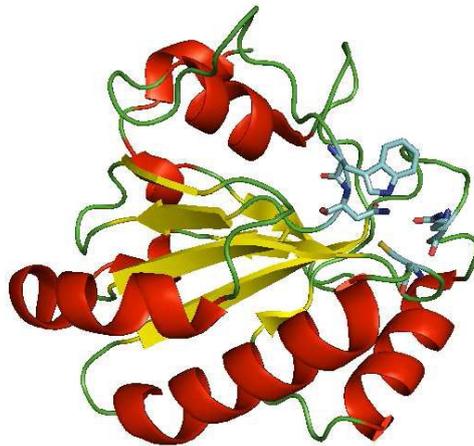


Fig. 2.6.16 Sito attivo delle glutatione perossidasi: struttura cristallizzata della GPx-4 umana. I residui che compongono la tetrate catalitica sono rappresentati come bastoncini azzurri con i loro atomi di C,N e S rispettivamente in rosso, blu e giallo

Il ciclo catalitico delle glutatione perossidasi è stato esaurientemente studiato per la cGPx e comporta un meccanismo a *ping-pong* (Fig.2.6.17) in cui la selenocisteina catalitica viene ossidata a derivato di acido selenenico legato all'enzima dal perossido (Ursini *et al.*, 1995). Questo derivato viene poi ridotto, in due passaggi, dal GSH, formando il selenolo legato all'enzima, con intermedio di reazione che rappresenta un disolfuro misto tra il selenoenzima e il GS.

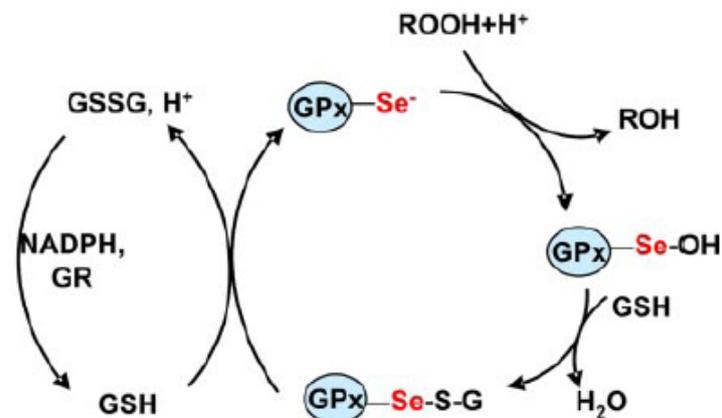


Fig. 2.6.17 Meccanismo catalitico a *ping-pong* delle GPxs: è indicato il sito attivo delle SeGPxs

Tutte le SecGPxs, eccetto la GPx4, sono proteine omotetrameriche. La PHGPx presenta infatti una delezione che include gli aminoacidi che formano la superficie per l'interazione tra i monomeri (Fig.2.6.18).

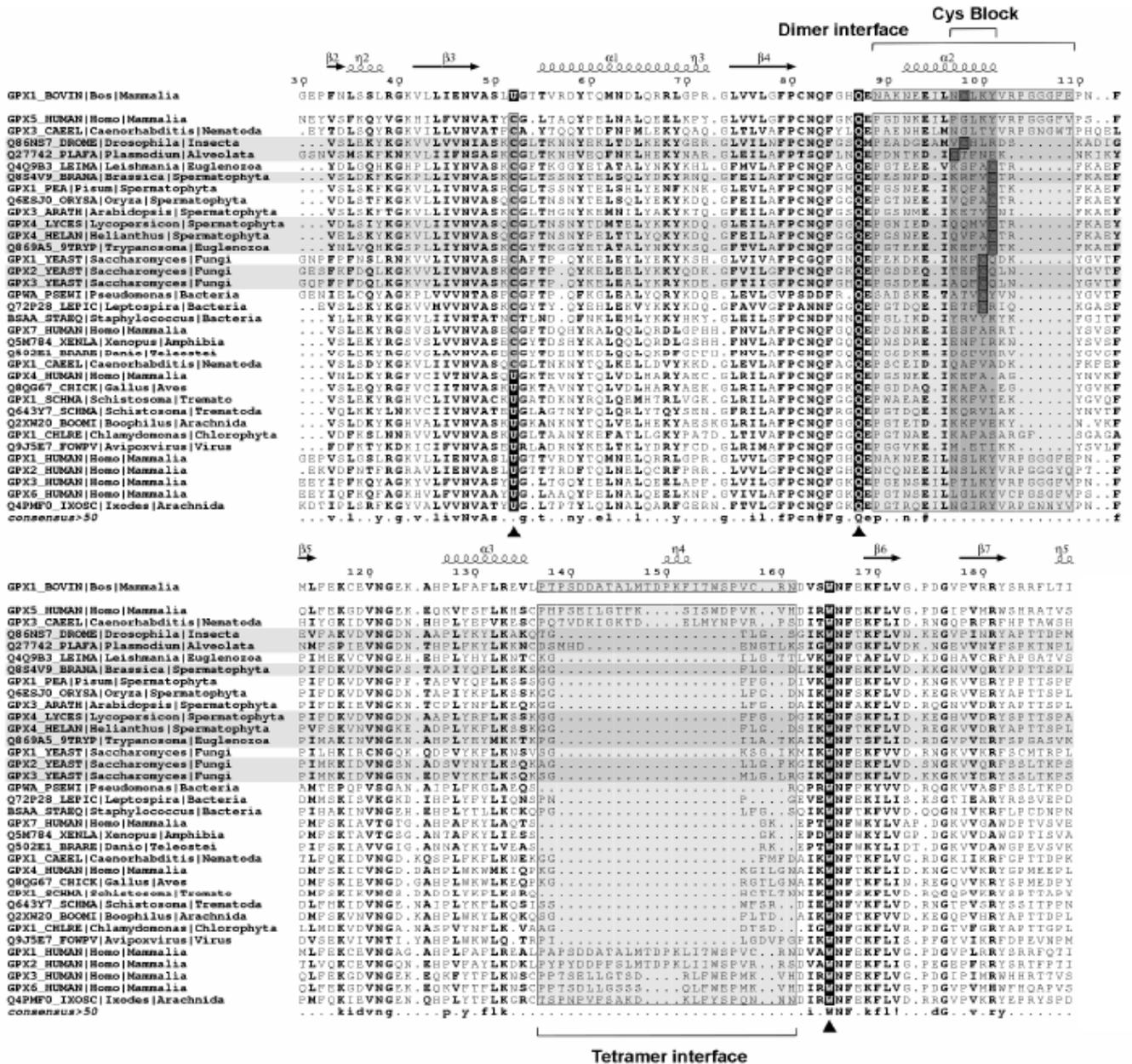


Fig. 2.6.18 Allineamento multiplo di alcuni omologhi delle GPxs

Sulla base di risultati provenienti dal sequenziamento di genomi appartenenti a svariati organismi del regno vivente, è emerso che la maggior parte delle proteine annotate come GPxs contengono un residuo di cisteina (Cys) che sostituisce la Sec nel sito attivo delle corrispondenti glutatione perossidasi di mammifero e sono pertanto chiamate CysGPxs. Come le altre GPxs, queste proteine conservano gli altri tre aminoacidi della tetrate catalitica (triptofano, glutamina, asparagina). Quindi con il nome GPxs si intende una grande famiglia di proteine, distribuita in tutto il regno vivente, dove i membri contenenti Cys prevalgono rispetto ai selenoenzimi (Maiorino *et al.*, 2007). Le CysGPxs, ma non le SecGPxs, sono infatti le Glutatione Perossidasi dei batteri, funghi, insetti, piante terrestri, e rappresentano, nell'insieme, circa il 70% di 450 sequenze non ridondanti e complete recuperabili dalle banche dati (Maiorino *et al.*, 2007). D'altra parte, l'espressione delle SecGPxs risulta confinata ai vertebrati, con una minore ed incostante presenza negli organismi inferiori. Le CysGPx possono essere di due tipi. Un primo tipo è rappresentato da proteine caratteristicamente monomeriche che contengono un secondo residuo di Cys nell'elica funzionale, tipiche dei non-vertebrati e numericamente più abbondanti (2-CysGPx). Un secondo tipo, più raro, rappresentato da GPxs monomeriche o tetrameriche che non contengono il secondo residuo di Cys (1-CysGPx) (Fig.2.6.19).

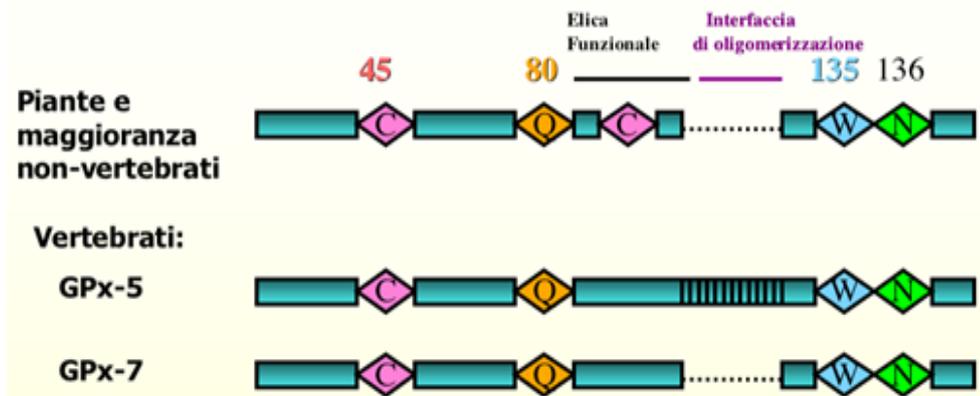


Fig. 2.6.19 I due tipi di CysGPx che si trovano nel regno vivente: le sequenze delle piante e dei non vertebrati contengono un secondo residuo di Cys nell'elica funzionale che non è presente nelle CysGPx dei vertebrati

Tali considerazioni suggeriscono che la storia evolutiva della superfamiglia delle Glutazione Perossidasi è complessa ed è il risultato di un numero di eventi evolutivi indipendenti che potrebbero essere associati a fenomeni di convergenza evolutiva per cui specie diverse che vivono nello stesso tipo di ambiente, o in nicchie ecologiche simili, sulla spinta delle stesse pressioni ambientali, si sono evolute sviluppando per selezione naturale determinate strutture o adattamenti che li hanno portati ad assomigliarsi fortemente dal punto di vista funzionale. Le analisi filogenetiche eseguite su 204 sequenze aminoacidiche di (GPx)s presenti nel database **PEROXIBASE** (Fig.2.6.20) indicano un'origine incerta del gene della superfamiglia delle GPxs e una storia evolutiva non lineare. È evidente che diversi ed indipendenti percorsi evolutivi hanno caratterizzato i singoli gruppi rendendo difficile un'origine ancestrale per molte classi di GPxs. Tuttavia è possibile distinguere tre gruppi polifiletici: il primo gruppo del regno dei metazoi comprende le GPxs di vertebrati e invertebrati. In questo I gruppo le sequenze degli invertebrati parassiti clasterizzano con le sequenze GPx1, 2, 3, 5, 6 dei vertebrati; mentre le sequenze degli artropodi clasterizzano con le GPx4s dei vertebrati. Il secondo gruppo comprende invece le sequenze di GPxs appartenenti a funghi, batteri, alghe e cianobatteri, mentre il gruppo III comprende tutte le GPxs delle piante. La maggior parte delle alghe forma un gruppo indipendente strettamente comparato ai cinetoplastidi piuttosto che alle piante e ai batteri. In questo scenario molto complesso è stato ipotizzato che nei mammiferi il gene della famiglia della Glutazione Perossidasi sia evoluto da un antenato comune per eventi di duplicazione e cambiamenti *random* del genoma (Margis *et al.*, 2008).



## CAPITOLO III: LA SELENIOPROTEINA GLUTATIONE PEROSSIDASI IDROSSIDO FOSFOLIPIDE PHGP<sub>x</sub>/GP<sub>x4</sub>

### 3.1 SELENIO: ELEMENTO CHIAVE NELLA SPERMATOGENESI

Il selenio è un elemento in traccia che gioca un importante compito in svariati processi fisiologici negli animali e nell'uomo. Esso svolge un ruolo chiave per la “normale” spermatogenesi e la sua funzione è principalmente mediata da due selenioproteine: la Glutazione Perossidasi Idrossido Fosfolipide (PHGP<sub>x</sub>/GP<sub>x4</sub>) e la selenioproteina P (Boitani e Puglisi, 2008). Il testicolo rappresenta uno specifico e privilegiato *target* di selenio: in caso di deficienza di selenio i meccanismi di regolazione si “sforzano” di mantenere un adeguato livello di questo elemento nella gonade maschile, quando il selenio è nuovamente somministrato viene fornito al testicolo con priorità a questo tessuto (Behne *et al.*, 1982). Inoltre, la deficienza di selenio colpisce la massa testicolare con danni alla motilità dello sperma, al tratto intermedio dello spermatozoo e alla forma dello spermatozoo (Shalini e Bansal, 2006). Il selenio è richiesto anche per la sintesi di testosterone e la formazione e normale sviluppo dello spermatozoo (Behne *et al.*, 1996). Sia la bassa che alta concentrazione di selenio nel plasma seminale è dannosa per la fertilità maschile: l'eccesso di selenio ed è associato ad un incremento delle anomalie nel tratto intermedio dello spermatozoo (Kaur e Prasad, 1994). Infatti i livelli di selenio e l'attività della Glutazione Perossidasi sono significativamente ridotti in topi selenodeficienti, mentre l'attività è alta in topi con dieta arricchita di selenio. La riduzione del numero di cellule germinali post-meiotiche, osservata nel gruppo selenodeficiente indica una perdita di fertilità e abilità riproduttiva. In concomitanza a questi eventi i proto-oncogeni *cjun/cfos*, componenti del fattore di trascrizione AP1, esibiscono alterazioni di espressione di mRNA, in particolare un decremento del pattern di espressione nelle cellule germinali testicolari con una conseguente *down* regolazione della spermatogenesi (Shalini e Bansal, 2006). Questo riflette il ruolo cruciale del selenio nella regolazione della proliferazione e differenziazione delle cellule germinali nel testicolo e suggerisce che il suo compito non è semplicemente limitato in qualità di antiossidante e componente della guaina mitocondriale degli spermi. Data la stretta dipendenza tra la produzione di sperma ed il selenio, particolare interesse è indirizzato alla selenioproteina P, plasmatica ed extracellulare, prodotta dal fegato, che segue il selenio verso le cellule germinali maschili (Burk *et al.*, 1991). Nel testicolo però, la maggior parte del selenio, incorporato nelle proteine come selenocisteina, è associato all'enzima PHGP<sub>x</sub>, membro delle glutazione perossidasi. (Burk *et al.*, 1991). Un'analisi comparativa dei membri studiati e caratterizzati della famiglia delle selenioproteine è stata eseguita nel testicolo di topo con real-time PCR (Hoffman

e Berry., 2008). Come menzionato l'mRNA di PHGPx è di gran lunga il più abbondante tra quelli che codificano per le selenoproteine e prove sperimentali hanno dimostrato i ruoli che questo gene svolge nella gonade maschile. Altre selenoproteine hanno livelli di trascritto 10 volte più basso di PHGPx: tra queste il prodotto del gene della tioredossina/glutazione reduttasi (TGR), membro della famiglia della tioredossina reduttasi (TR). Questa selenoproteina è espressa nel testicolo in età *post*-puberale ed è particolarmente abbondante negli "spermatidi allungati" nel sito di formazione della guaina mitocondriale, mentre è assente negli spermatozoi maturi. È stato recentemente proposto che TGR coopera con PHGPx in qualità di ponte disolfuro a livello delle componenti strutturali della proteina dello sperma (Su *et al.*, 2005). Le analisi di ibridazione *in situ* e di Northern blot mostrano per la selenoproteina V una bassa espressione di questa molecola ristretta ai tubuli seminiferi, così come per la selenoproteine W, K, 15 ed S. (Kriukov *et al.*, 2003). La selenoproteina plasmatica SPP1 è sintetizzata nelle cellule del Leydig (Koga *et al.*, 1998) e recentemente è stato dimostrato di essere richiesta per lo sviluppo dello sperma in topi *knock out* maschi sterili (Olson *et al.*, 2005). In aggiunta nel testicolo sono presenti anche fattori chiave della sintesi delle selenio proteine come la selenocisteina liasi, un enzima che catalizza la decomposizione della selenocisteina in alanina e selenio e la selenofosfato sintetasi (SPS2) che consente l'utilizzo di selenio nella biosintesi delle selenoproteine.

Tab.1 Selenoproteine espresse nel testicolo di topo

SELENIOPROTEINE	mRNA	PROTEINA
PHGPx/GPx4	++++	++++
TGR	+	+
SEPP1	+	+
SEL V	+	n.d.
SEL W	+	+
SEL K	++	n.d.
Sep 15	+	n.d.
Sel S	+	n.d.

### 3.2 PHGPx: STRUTTURA & FUNZIONE

Il gene umano della PHGPx (Fig.3.2.21) localizzato sul cromosoma 19, è composto da otto esoni che nelle diverse specie si espandono su 3-4 kilo basi di DNA (Maiorino *et al.*, 2004), con un'inserzione di selenocisteina codificata dalla tripletta UGA nella regione 3' non tradotta (Imai e Nakagawa, 2002). La struttura a cristallo della selenioperoxidasi mostra il tipico motivo a tioredoxina caratterizzato dalla presenza di uno stato foldato costituito da cinque foglietti  $\beta$  sorretti da quattro  $\alpha$ -eliche. Tale stato foldato viene denominato *thioredoxin domain* e dona alla proteina la sua attività catalitica, la sua regolazione ed il ruolo biologico attribuito in qualità di antiossidante (Scheerer *et al.*, 2007). Il gene è trascritto in mRNA di diverse lunghezza che alla fine producono isoforme diverse per la estensione N-terminale (citosolica, mitocondriale e nucleare), che indirizzano la proteina sintetizzata nei diversi compartimenti. Misurazioni effettuate con la tecnica della *real time* PCR hanno rivelato che i tre mRNA sono ubiquitari nelle cellule e l'attivazione trascrizionale ha luogo nella linea germinale maschile (Maiorino *et al.*, 2003). Il meccanismo di questa attivazione trascrizionale non è noto, così come sono ancora parzialmente oscuri i meccanismi di modulazione della espressione.

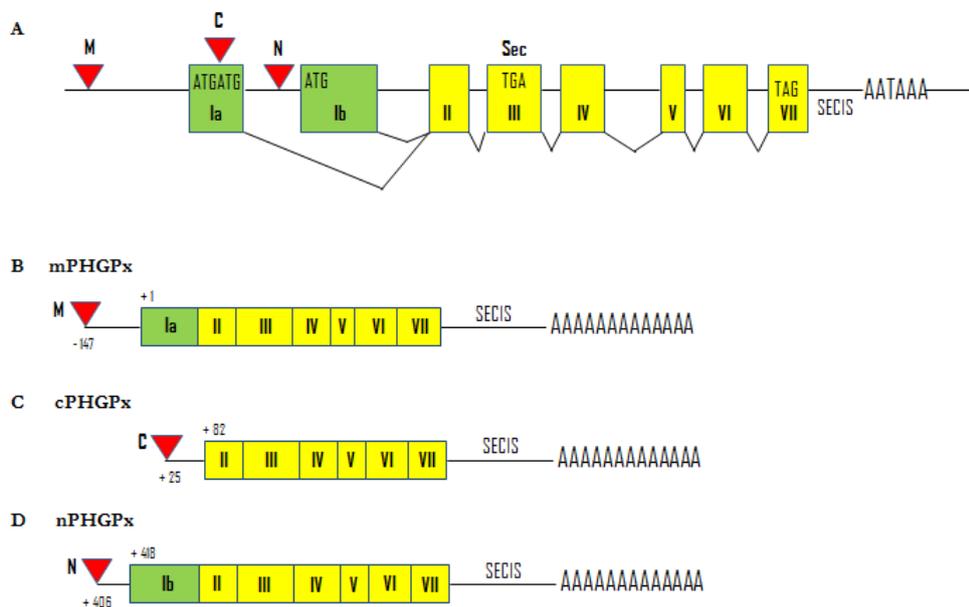


Fig.3.2.21

A: Struttura del gene della PHGPx nel topo (Accession N. AB030643)

B, C, D: Struttura delle tre isoforme di mRNA di PHGPx nel topo

L'enzima PHGPx con un peso molecolare approssimativamente intorno ai 20-22 kDa, è sintetizzato in due forme, come un polipeptide di 190 aa. che è espresso principalmente negli spermatozoi e localizzato nel corpo centrale e come una proteina di 170 aa. che predomina nella maggior parte dei tessuti somatici, localizzata nel citoplasma (Imai e Nakagawa 2002; Tosatto, 2008). Le isoforme di PHGPx sono trascritte da un gene attraverso l'utilizzo alternativo di differenti promotori (trascrizione alternativa) (Fig.3.2.22). Questo risultato è stato illustrato come il prodotto di uno *splicing* alternativo di un pre-mRNA da Pfeifer *et al.*, 2001. Intanto Moreno *et al.*, 2003 hanno dimostrato l'esistenza di un secondo promotore che crea trascrizioni multiple, compreso l'esone alternativo IB che è "splaisato" e tradotto nell'isoforma nPHGPx. Borchert *et al.*, 2003 hanno sostenuto l'idea originale di uno *splicing* alternativo di un trascritto derivato da un promotore unico a monte dell' esone 1° nelle cellule somatiche, mentre Moreno *et al.*, 2003 sostengono che il promotore alternativo non è riconosciuto nelle cellule somatiche, perché dipende probabilmente da fattori di trascrizione che regolano l' espressione dell'isoforma nPHGPx specificamente nelle cellule germinali. Tuttavia Maiorino *et al.*, 2003 descrivono nel ratto l'attività di un promotore alternativo di PHGPx anche nella linea delle cellule somatiche, rilevando trascritti che codificano per l'isoforma nPHGPx non solo nel testicolo ma anche nelle cellule somatiche e nei tessuti aprendo la prospettiva di un ruolo potenziale dell'isoforma nucleare nella regolazione della divisione cellulare aldilà della differenziazione della linea germinale.

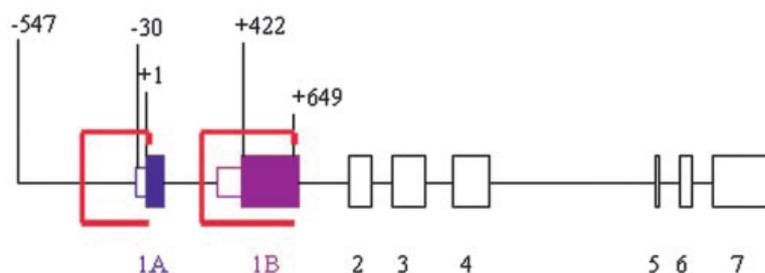


Fig. 3.2.22 Rappresentazione schematica dei promotori di PHGPx nel ratto (Maiorino *et al.*, 2003)

Il segnale *target* mitocondriale e il secondo codone di start citosolico sono nell'esone IA del DNA genomico di PHGPx (Arai *et al.*, 1999). Dopo la scissione della sequenza N-terminale mitocondriale, la proteina matura diventa identica alla proteina citosolica di peso molecolare pari a 20 kDa (Arai *et al.*, 1996). La PHGPx nucleolare è stata per prima identificata come una selenioproteina nucleospecifica di circa 34 kDa (PHGPx nucleare). Essa è sintetizzata da un promotore alternativo e il

codone di inizio è localizzato nell'esone IB del gene PHGPx (Imai *et al.*, 2006), è localizzata nei nucleoli di diverse linee cellulari e per distinguerla dall'isoforma citosolica che esiste non solo nel citosol ma anche nel nucleo, spesso è indicata come PHGPx nucleolare. (Nakamura *et al.*, 2003).

La PHGPx è una selenioproteina scoperta nel laboratorio di Ursini nel 1981 che condivide con le altre glutatatione perossidasi il meccanismo catalitico, che comprende l'ossidazione, in presenza di un idroperossido, del selenolato del sito attivo a derivato dell'acido selenenico, la riduzione di questo da parte del glutatatione (GSH) con formazione di un selenodisolfuro e quindi la rigenerazione dell'enzima nativo da parte di una seconda molecola di cosubstrato riducente. Tra le Glutathione Perossidasi, la PHGPx è la meno specifica (Ursini *et al.*, 1995); non solo riduce un ampio spettro di idroperossidi, ma anche accetta diversi tipi di tioli come riducenti (compresi i di-tioli). Questo enzima infatti, tramite la catalisi di una reazione "antiossidante" che porta alla riduzione di perossidi a spese di gruppi SH, gioca un ruolo chiave nella regolazione cellulare, nella biosintesi degli eicosanoidi, nell'espressione delle molecole di adesione, nei meccanismi apoptotici, nella costruzione di strutture sopramolecolari, nel differenziamento cellulare e negli aspetti finali della spermatogenesi (Ursini *et al.*, 1995). L'osservazione che gli animali PHGPx *-/-* vanno incontro a letalità embrionale precoce (Imai *et al.*, 2003), mette in luce l'importanza strategica della reazione catalizzata dalla PHGPx in aspetti fondamentali di fisiologia, una caratteristica mai osservata prima per una perossidasi selenio-dipendente o per un enzima antiossidante.

### 3.3 PHGPx: RUOLO NEL TESTICOLO

PHGPx è un monomero che contiene un residuo di seleniocisteina, con struttura simile a quella di una singola subunità di cGPx. E' in grado di reagire con gli idroperossidi degli acidi grassi esterificati nei fosfolipidi e la sua attività nel testicolo è in stretta correlazione con i livelli di selenio nell'organo alla pubertà rispetto alle altre GPx, suggerendo una funzione antiossidante più importante rispetto alle altre (Hirota *et al.*, 2002). È interessante notare come il testicolo esibisce la più alta attività di PHGPx misurata nei tessuti dei mammiferi (Fig.3.2.23). Lo studio dei meccanismi di trascrizione del gene nel testicolo dei vertebrati mammiferi, suggerisce infatti come la PHGPx similmente al GPx sia presente in molti tessuti, ma contrariamente i suoi livelli e il suo pattern di espressione nel testicolo sono più alti che in ogni altro tessuto/organo somatico, suggerendo come la selenioproteina svolga il suo ruolo cruciale di antiossidante nella fertilità maschile (Diaconu *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2010). I differenti livelli di espressione di mRNA sono il risultato di una associazione tra stress ossidativo, PHGPx e funzione.

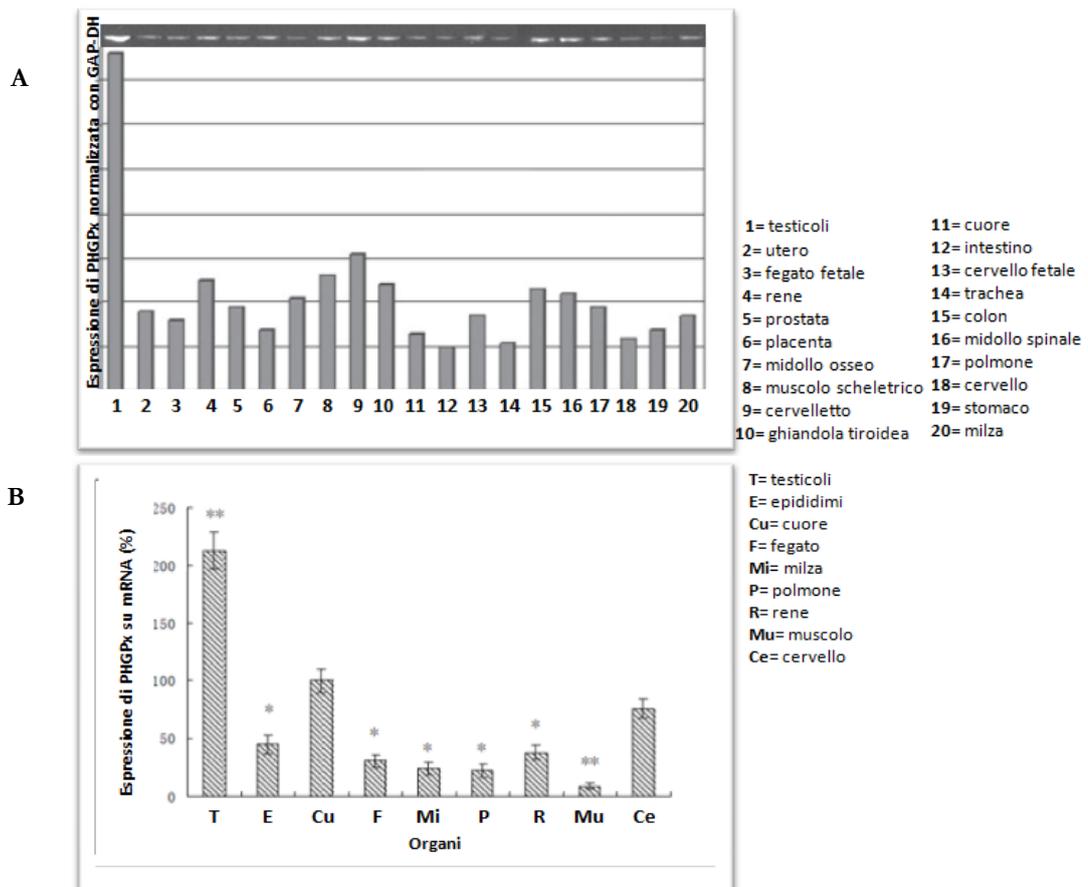


Fig. 3.3.23 Analisi RT-PCR eseguita su mRNA di PHGPx in differenti tessuti (Diaconu *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2010)

A: *Homo sapiens*; B: *Capra hircus*

Le importanti funzioni fisiologiche di PHGPx nel testicolo, sono sostenute dal fatto che il silenziamento del gene corrispondente nei topi *knock-out* è letale già negli stadi precoci della vita embrionale: in particolare è stato portato alla luce il contributo delle isoforme nPHGPx e mPHGPx durante lo sviluppo e la normale funzione nel testicolo (Fig. 3.3.24).

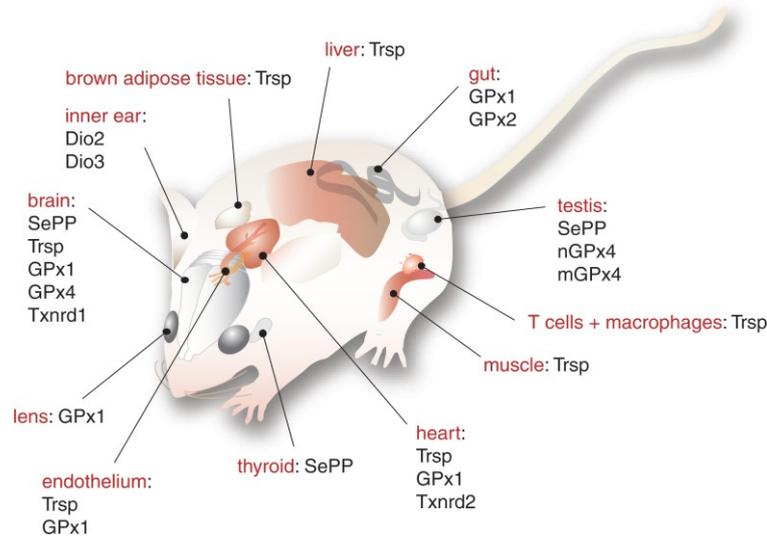


Fig. 3.3.24 Overview di organi e tessuti nel topo affetti da silenziamento di alcune selenio proteine

Nel testicolo dei roditori PHGPx è stata localizzata (Fig.3.3.25) nelle cellule interstiziali del *Leydig*, nel nucleo degli spermatidi rotondi, a livello del citoplasma e degli spermatozoi (Nayernia *et al.*, 2004). Tuttavia la sua attività enzimatica risulta molto ridotta negli spermatozoi maturi, dove acquisisce un importante ruolo strutturale costituendo una gran parte della capsula mitocondriale (Ursini *et al.*, 1999).

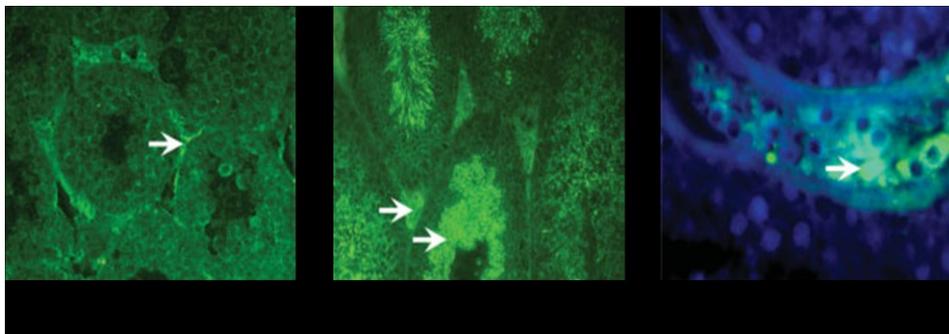


Fig. 3.3.25 Pattern di espressione di PHGPx nello sviluppo del testicolo di topo (Nayernia *et al.*, 2004)

La selenioproteina PHGPx è presente nelle tre diverse isoforme nel testicolo: come proteina citosolica, mitocondriale e nucleare. La Glutathione Perossidasi nucleo-specifica (snGPx) è identica alle isoforme mitocondriali e citosoliche di PHGPx diversamente dal tratto N-terminale. L'N-terminale ricco di arginina di snGPx, che ricorda le protammine, è codificato da un esone alternativo localizzato nel primo introne del gene di PHGPx ed è responsabile della localizzazione nucleare e dell'attacco della cromatina di snGPx (Pfeifer *et al.*, 2001). Tuttavia, nonostante l'abbondanza di PHGPx nel testicolo, ancora molto poco è conosciuto circa i meccanismi molecolari che governano la regolazione del gene in questo tessuto. L'esistenza di due promotori distinti è stata dimostrata attraverso l'analisi di geni *reporter*. (Maiorino *et al.*, 2003)- Gli elementi funzionali cis-regolatori sono identificati nella regione del promotore di nPHGPx (Borchert *et al.*, 2003), la cui espressione è mediata dal fattore di trascrizione CREM-t (Tramer *et al.*, 2004) che lega un elemento genetico localizzato nel primo introne del gene di PHGPx. In aggiunta, nei saggi di geni *reporter* eseguiti sulla linea delle cellule somatiche, l'espressione del fattore di trascrizione CREM-t attiva la regione del promotore dell'introne 1A di PHGPx (Tramer *et al.*, 2004).

Gli alti livelli di mRNA e l'immunolocalizzazione di PHGPx testicolare, segnalano dunque che le cellule germinali sono esposte ad alti livelli di stress ossidativo e quindi a specie reattive dell'ossigeno quali perossido di idrogeno o anioni ossidrilici e sono pertanto molto suscettibili ai danni da lipoperossidazione (Drevet *et al.*, 2006).

### 3.4 PHGPx: RUOLO NELLA SPERMATOGENESI

La PHGPx è una selenioproteina con funzione di protezione delle membrane biologiche dai danni ossidativi, che contiene la maggior parte del selenio presente a livello dei testicoli. Sulla base di un marcato grado di omologia tra le sequenze aminoacidiche del PHGPx nell'uomo, nel topo, nel ratto e nel maiale si ipotizza che la proteina possa giocare una funzione fondamentale nelle difese antiossidanti cellulari "conservando" il suo ruolo cruciale nella fertilizzazione (Nayernia *et al.*, 2004). L'enzima, tramite la catalisi di una reazione antiossidante, porta alla riduzione dei lipoperossidi a spese del glutatione; gioca inoltre un ruolo chiave negli aspetti finali della differenziazione durante la spermatogenesi (Ursini *et al.*, 1995). A questo proposito la PHGPx, durante la spermatogenesi, quando diminuiscono i livelli di GSH nello spermatozoo, cambierebbe substrato riducente, usando i residui di cisteina adiacenti della SMCP (*Sperm Mitochondrion Associated Cystein Rich Proteins*) al posto del GSH. Questa reazione di ossidazione sarebbe funzionale alla maturazione dello spermatozoo (Maiorino *et al.*, 2005). La PHGPx ha un ruolo principale ed insolito nella spermatogenesi: negli spermatidi è espressa abbondantemente come attiva perossidasi e durante la maturazione finale si trasforma in una proteina strutturale enzimaticamente inattiva. In tal modo costituisce almeno il 50% del materiale cheratinoso che circonda l'elica dei mitocondri nel midpiece dello spermatozoo. Fondamentale per questo cambiamento è la severa deplezione di glutatione che, generando condizioni di elevato potenziale redox conosciute essere associate a differenziamento cellulare, permette alla PHGPx di reagire con i tioli proteici come substrato alternativo al GSH (Maiorino *et al.*, 2005). Nella spermatogenesi murina (Fig.3.4.26), sia la trascrizione che la traduzione dell'isoforma nucleare iniziano nella fase post-meiotica della spermatogenesi, mentre l'isoforma mitocondriale è espressa già a livello degli spermatociti in pachitene. Per quanto riguarda la funzione svolta dall'isoforma nucleare, è stato dimostrato che la PHGPx è capace di utilizzare i tioli delle protamine come substrato riducente (Puglisi *et al.*, 2005). L'isoforma nucleare, in particolare, è coinvolta nel processo di condensazione della cromatina, che si verifica negli *steps* finali di spermatogenesi e che richiede la sostituzione della maggioranza degli istoni con proteine di transizione e protamine ritenute essenziali per la stabilizzazione del DNA e la condensazione dei spermatociti. La formazione della capsula mitocondriale è risultata essere catalizzata dalla PHGPx, ciò fornisce evidenza di uno dei principali meccanismi per cui il selenio è implicato nella fertilità. La caratteristica più evidente degli spermatozoi di animali seleniodeficienti è l'alterata architettura della regione intermedia. Questa struttura, che contiene la maggior parte del selenio dello spermatozoo, è composta da proteine legate tra di loro da ponti disolfuro tra cui, e in gran parte, anche la PHGPx (Puglisi *et al.*, 2005). La compartimentalizzazione subnucleare di questa proteina nelle cellule

germinali in diverse fasi di differenziamento, evidenzia un cambiamento di localizzazione nucleare della nPHGPx tra gli spermatidi rotondi, dove è presente esclusivamente nella matrice nucleare, e gli spermatozoi epididimali, dove è presente anche a livello della cromatina. Questi cambiamenti di localizzazione suggeriscono la possibilità che la nPHGPx possa svolgere più di un ruolo nella spermatogenesi (Boitani e Puglisi, 2009). Sulla definizione del ruolo specifico della PHGPx mitocondriale, per il quale è stata creata una linea di topi geneticamente modificati che sovraesprimono tale isoforma specificamente nella profase della prima divisione meiotica, quando cioè, la proteina endogena è solo debolmente espressa è stato dimostrato che l'anticipata e aumentata espressione di mPHGPx durante la maturazione delle cellule germinali altera la progressione della spermatogenesi, determinando una riduzione della fertilità dei topi transgenici (Puglisi *et al.*, 2007) per l'assenza dell'architettura del *midpiece* degli spermatozoi, laddove la proteina serve da stabilizzante delle strutture del citoscheletro (Olson *et al.*, 2004). La formazione della capsula mitocondriale richiede le SMCP; infatti, uno dei principali aspetti della funzione della PHGPx è la catalisi operata su cisteine adiacenti in specifiche proteine che possono funzionare come "*redox switch*" (interruttori redox) e che possono "accendere" o "spegnere" specifiche funzioni biologiche o la formazione di aggregati sopramolecolari nella spermatogenesi. L'associazione della PHGPx con le membrane nucleare e mitocondriale esterna negli spermatozoi maturi, indicherebbe quindi la perdita della sua attività enzimatica e l'acquisizione di una funzione strutturale (Haraguchi *et al.*, 2003).

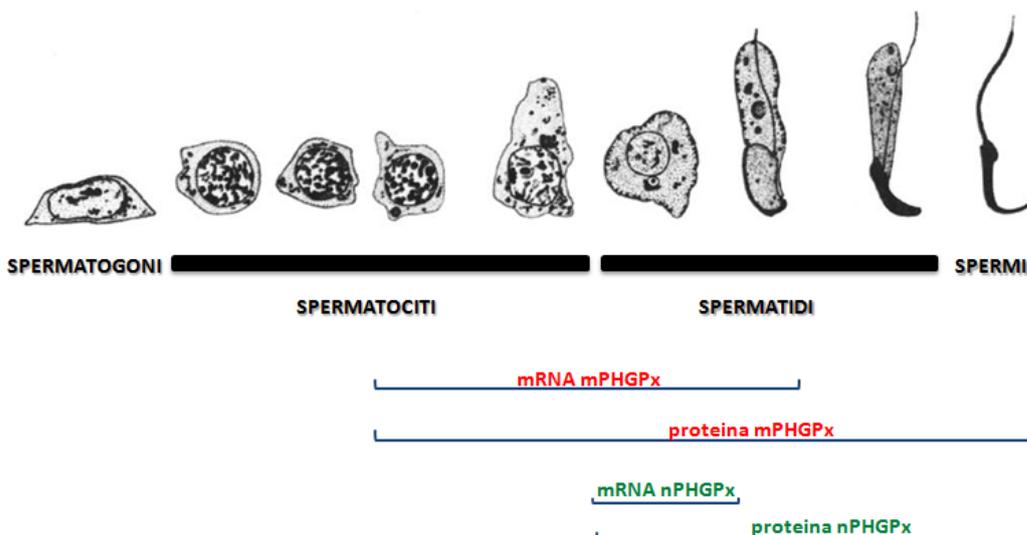


Fig. 3.4.26 Pattern di espressione delle isoforme di PHGPx nella spermatogenesi del ratto (mRNA e proteina)

La PHGPx è stata immunolocalizzata in diverse specie (Nayernya *et al.*, 2004): essa è distribuita nel *midpiece* della capsula mitocondriale degli spermatozi e suggerisce il suo ruolo nella difesa cellulare antiossidante (Fig.3.4.27).

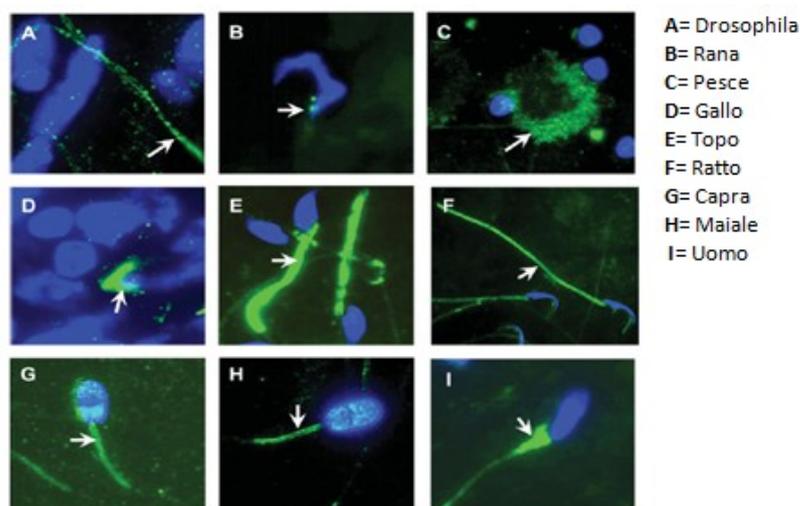


Fig. 3.4.27 Localizzazione di PHGPx nel *midpiece* dello spermatozoo di diverse specie (Nayernya *et al.*, 2004)

La colocalizzazione di PHGPx e SMCP (Fig.3.4.28) nel *midpiece* degli spermatozoi del topo, suggerisce che la selenioperoxidasi esiste in una forma citosolica nelle cellule del *Leydig* e in una forma mitocondriale nelle cellule germinali aploidi ed una delle due isoforme di PHGPx contiene un putativo segnale *target* mitocondriale che dirige la proteina verso la membrana mitocondriale interna (Nayernia *et al.*, 2004). La formazione della capsula mitocondriale tuttavia, richiede la SMCP: la sua implicazione nella formazione di legami crociati e' stata dimostrata riproducendo in vitro la polimerizzazione ossidativa catalizzata dalla PHGPx. Strumenti bioinformatici e computazionali sono stati usati per investigare le caratteristiche peculiari della SMCP. E' stato prodotto un modello strutturale di questa proteina basato sull' omologia, riconoscimento di folding e minimizzazione di energia potenziale. Il modello suggerisce che la SMCP adotti una struttura fibrosa contenente tre motivi "*knottin*", in cui una struttura beta degenerata e' imposta da una complessa serie di disolfuri. Alle estremita' della struttura sarebbero presenti due coppie di cisteine adiacenti che formano disolfuri (C27-C28 e C104-C105). In accordo con il modello e con i calcoli di minimizzazione dell'energia, il disolfuro C27-C28 (e probabilmente anche il C104-C105 per il quale, per motivi tecnici, i calcoli non sono stati possibili) sono proposti operare nel "*redox switch*" funzionale che porta

alla polimerizzazione (Tosatto *et al.*, 2004). Questi disolfuri vicinali, per la cui formazione si ipotizza un ruolo della PHGPx, risultano pronti a riarrangiarsi, formando nuovi disolfuri intercatena.

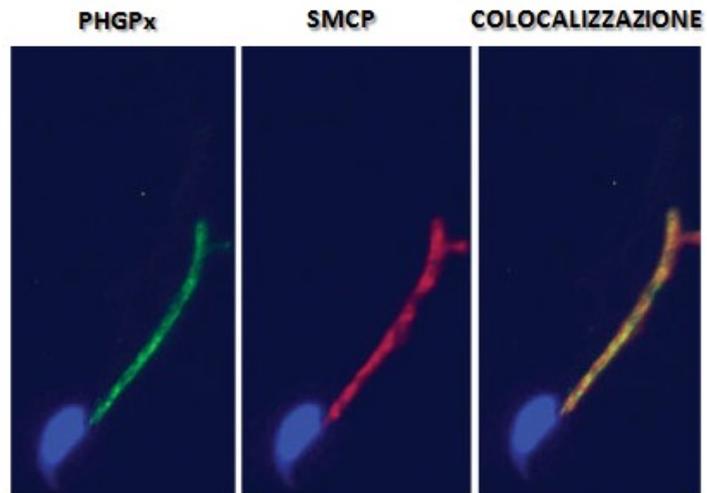


Fig. 3.4.28 Localizzazione di PHGPx nel *midpiece* dello spermatozoo di diverse specie (Nayernya *et al.*, 2004)

## CAPITOLO IV: CONTROLLO ENDOCRINO DEGLI ESTROGENI NELLA SPERMATOGENESI

### 4.1 IL CONTROLLO ENDOCRINO DELLA SPERMATOGENESI NEI VERTEBRATI NON MAMMIFERI

I processi riproduttivi si possono svolgere secondo tappe rigidamente fissate o presentare un grado più o meno ampio di flessibilità. L'andamento di tali processi risulta correlato alle variazioni di fattori endogeni (amminoacidi, neuropeptidi, gonadotropine, ormoni, recettori steroidei, antiossidanti) ed esogeni (fotoperiodo, temperatura e fattori ecologici ed etologici). Le complesse interazioni che si verificano tra fattori endogeni ed esogeni e la produzione dei gameti sono state sinora studiate ed approfondite in uno svariato numero di specie (Beckett e Arthur, 2005; Schulz *et al.*, 2009; Stradaoli *et al.*, 2009). Tra i vertebrati non mammiferi: pesci, anfibi e rettili diversi fattori esogeni (GnRH, FSH/LH, ormoni steroidei, melatonina, prolattina, ormoni tiroidei) sono coinvolti nel controllo dell'attività testicolare. L'inizio dell'ondata spermatogenetica in alcuni gruppi di vertebrati non mammiferi è solitamente basata su stimoli ambientali che vengono tradotti in segnali ormonali (Guerriero, 2009). La spermatogenesi è un processo differenziativo complesso che richiede la sintesi coordinata di diverse proteine stadio specifiche ed interazioni funzionali tra cellule germinali e una o più tipi di cellule somatiche. Tale differenziamento dipende dall'espressione successiva ed ordinata di molti geni specifici che promuovono la proliferazione degli spermatogoni, la meiosi degli spermatociti e la spermioistiogenesi. (O'Donnell *et al.*, 2001). Negli anfibi e rettili, come in altri vertebrati, lo sviluppo come l'attività gonadica ed i processi riproduttivi in generale sono sotto il controllo del sistema ipotalamo-ipofisario. Tale sistema è sostanzialmente simile tra le varie classi di vertebrati anche se la struttura e l'attività funzionale tuttavia, non mancano di presentare diversi aspetti specifici che ricerche più recenti stanno progressivamente mettendo in luce (Guerriero, 2009). Tra i fattori endogeni, il GnRH (ormone per il rilascio delle gonadotropine), un decapeptide secreto principalmente nell'ipotalamo, gioca un ruolo pilota nel controllo della riproduzione. Il GnRH, di cui sono state identificate e caratterizzate più forme molecolari comuni ai vertebrati, regola la sintesi e/o il rilascio di gonadotropine ipofisarie (FSH e LH), che a loro volta controllano l'attività gonadica di gametogenesi e steroidogenesi. Esiste una chiara evidenza della presenza di GnRH e/o dei suoi recettori nelle gonadi di alcuni vertebrati e protocordati. L'evidenza indiretta indica un effetto diretto delle sostanze GnRH-simili sull'attività della gonade, le variazioni di sviluppo e stagionali nel contenuto di GnRH del cervello, sono correlate all'attività gonadica. Gli analoghi del GnRH potrebbero aumentare l'attività mitotica spermatogoniale nella rana. Gli ormoni

steroidi sessuali (estrogeni, androgeni e progesterone) in sincronia alle gonadotropine ipofisarie favoriscono la maturazione dei gameti e allo stesso tempo sono in grado di modulare il comportamento riproduttivo e l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisario grazie alla presenza di specifici recettori nucleari e agli antiossidanti coinvolti nelle fasi di formazione e attivazione dei gameti (Guerriero, 2009; Zhang *et al.*, 2009). All'interno delle cellule bersaglio, il complesso ormone-recettore esplica la propria funzione di regolazione della trascrizione di geni specifici; gli antiossidanti neutralizzano o limitano la produzione eccessiva di ROS che potrebbero bloccare le fasi meiotiche degli eventi riproduttivi (Parminder e Bansal, 2003). Nella rana, inoltre, è stata studiata la presenza di alcune molecole in stadi spermatogenetici, compresi gli spermatogoni, di molecole tipo la protimosina alpha, activita/relaxina, MAPK ERK1 o 2, che possono rappresentare il marker di stadi specifici di spermatogenesi. L'FSH può aumentare la sintesi di DNA nelle cellule del Sertoli e l'innalzamento dei livelli di cAMP in tali cellule è probabilmente seguito dall'attivazione di una cascata di segnali di trasduzione che stimolano le cellule staminali spermatogoniali a proliferare e a differenziarsi (Aniello *et al.*, 2002; Ferrara *et al.*, 2004; De Rienzo *et al.*, 2001). Inoltre, il ruolo delle cellule del Sertoli, rispetto alla loro capacità di stimolare la proliferazione degli spermatogoni, potrebbe essere stadio-specifico. Le cellule del Sertoli sono intimamente legate alle cellule spermatogenetiche e mostrano trasformazioni strutturali associate allo stadio delle cellule spermatogenetiche con le quali si trovano a contatto (Chieffi *et al.*, 2002). Le cellule di *Leydig* e le cellule di Sertoli sembrerebbero svolgere un importante ruolo nel controllo nel processo apoptotico assumendo dunque un ruolo importante nella omeostasi spermatogenetica in definite condizioni ormonali e ambientali. L'importanza dell'integrazione fra queste strutture è evidente soprattutto nelle specie a riproduzione stagionale, nelle quali gli stimoli ambientali si integrano a livello del sistema nervoso centrale con l'ambiente ormonale interno e con gli antiossidanti endogeni per innescare il comportamento riproduttivo (Guerriero e Ciarcia, 2001). L'utilizzo di animali a riproduzione stagionale costituisce una particolare strategia di indagine sui mutamenti fisiologici della gonade ed il monitoraggio di possibili "*pathways*" molecolari che regolano la progressione di eventi che coinvolgono fasi mitotiche (moltiplicazione degli spermatogoni), meiotiche (formazione degli spermatici) e morfogenesi (formazione degli spermatozoi) (Denver *et al.*, 2002).

## 4.2 ESTROGENI E RECETTORI DEGLI ESTROGENI

Gli estrogeni sono molecole lipofile le cui azioni biologiche, essenziali per il differenziamento e la crescita, sono per la maggior parte mediate dall'attivazione di specifici recettori intracellulari (O'Donnel *et al.*, 2001). Gli estrogeni sono presenti in tutti i vertebrati e il  $17\beta$ -estradiolo (E2), il principale estrogeno femminile, ricopre il ruolo di modulatore di importanti processi fisiologici non solo a livello dell'apparato riproduttivo, ma anche in tessuti non riproduttivi, quali l'osso, il sistema cardiovascolare e il sistema nervoso centrale (Prat *et al.*, 2011). Gli estrogeni naturali sono composti a 18 atomi di C che derivano dal colesterolo; gli altri ormoni steroidei presentano 19 atomi di carbonio (quelli con struttura derivante dell'androstano) o 21 atomi di carbonio (quelli derivanti dal pregnano). Gli estrogeni, la cui struttura deriva dall'estrano, sono formati da quattro anelli fusi (ciclopentanoperidrofenantrene).

Nel processo che porta alla sintesi degli estrogeni (Fig.4.2.29), il colesterolo viene assunto dalle cellule steroidogeniche e stoccato. Attraverso proteine *carrier* e citoscheletro, il colesterolo viene trasportato verso i siti adibiti alla sintesi degli steroidi. Il passaggio successivo consiste nella riduzione degli atomi di carbonio della catena laterale. Il risultato è la produzione di un molecola di pregnenolone. Questo a sua volta può essere convertito in progesterone, oppure idrossilato a  $17\alpha$ -idrossipregnenolone. In questo secondo caso, con la perdita di una catena acilica e attraverso l'enzima  $17,20$ -liasi, il  $17\alpha$ -idrossipregnenolone viene convertito in deidroepiandrosterone. L'enzima  $5$ -ene- $3\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerasi converte il deidroepiandrosterone in androstenedione. L'androstenedione viene ridotto a testosterone dall'enzima  $17\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi. Questi due composti sono interconvertibili. Una demetilazione e una aromatizzazione del testosterone producono l'estradiolo, mentre nell'androstenedione portano all'estrone. L'estradiolo viene convertito in estrone tramite l'estradiolo deidrogenasi, anche questi due composti sono interconvertibili. Allo stesso modo il progesterone può portare alla sintesi di testosterone tramite la formazione di  $17\alpha$ -idrossi-progesterone (catalizzata da  $17\alpha$ -idrossilasi), poi di androstenedione e quindi di testosterone.

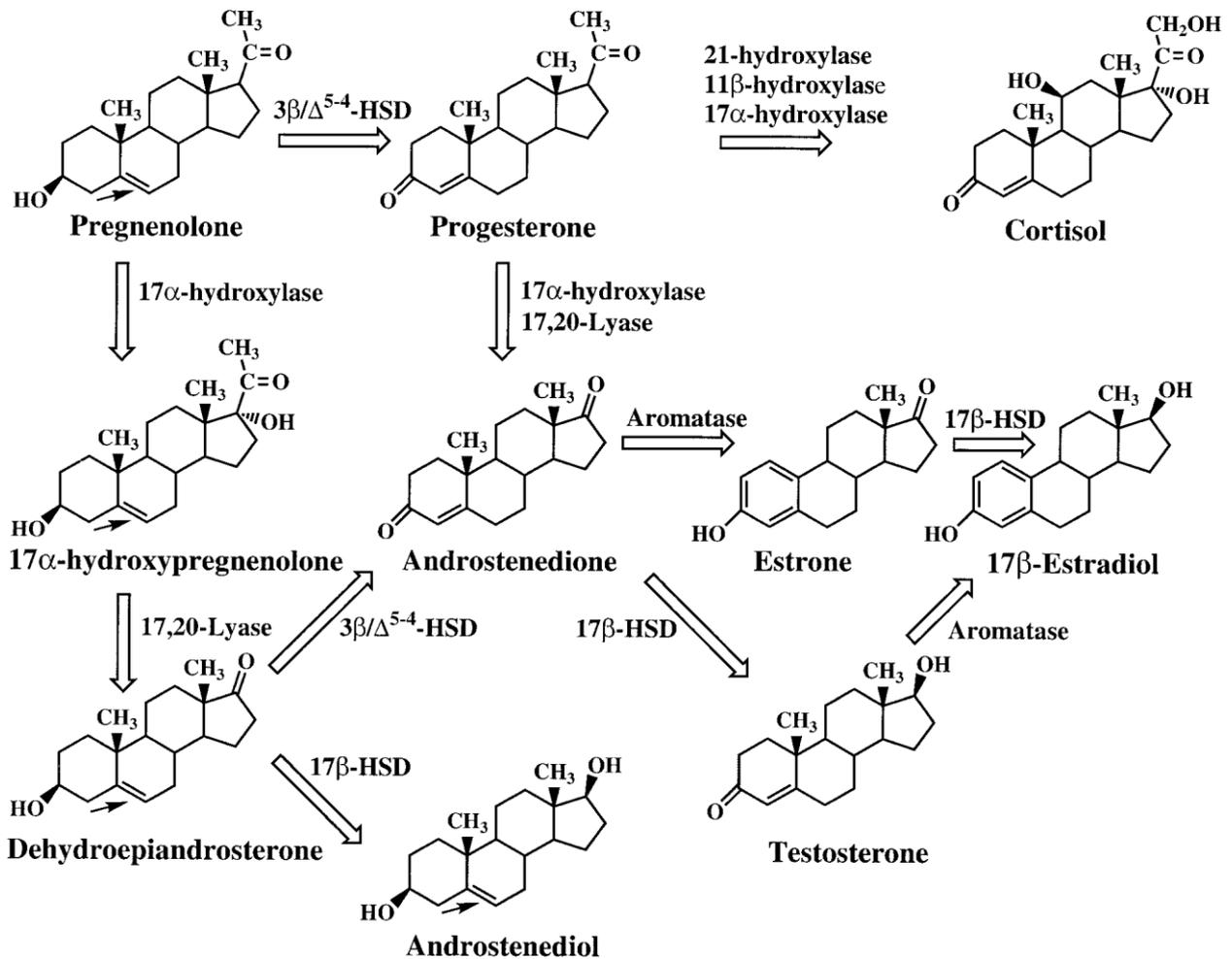


Fig. 4.2.29 *Patway* e sintesi degli steroidi sessuali

La biosintesi degli estrogeni è catalizzata da un enzima membro della superfamiglia dei citocromi P450: l'aromatasi citocromo P450, codificato dal gene *CYP19* (Baker *et al.* 2008). La superfamiglia dei citocromi P450 è molto vasta con oltre 600 membri appartenenti a circa 100 famiglie, di cui il citocromo P450 è l'unico membro della famiglia 19. Questa proteina eme è responsabile del legame del substrato degli steroidi C19 e catalizza una serie di reazioni che portano alla formazione dell'anello fenolico A caratteristico degli estrogeni (O' Donnell *et al.*; 2001). Nel plasma, l'estradiolo si trova solo in minima parte in forma libera. La maggior parte si trova legata a delle globuline chiamate *sex-hormone binding globulins* (SHBG) e all'albumina. La frazione libera corrisponde alla forma biologicamente attiva. L'inattivazione dell'estradiolo può avvenire attraverso la conversione a

composti biologicamente meno attivi come estrone ed estriolo. Nel fegato l'estradiolo viene processato ed escreto per via renale. Alcuni coniugati idrosolubili sono escreti tramite dotto biliare e in parte riassorbiti in seguito ad idrolisi dal tratto intestinale (O' Donnell *et al.*; 2001).

I recettori degli estrogeni (ER) appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari, noti per essere fattori di trascrizione inducibili da ligando. Nella categoria dei recettori nucleari vengono annoverati i recettori per gli estrogeni, per i progestinici, per gli androgeni, per i glucocorticoidi, per i mineralcorticoidi, per l'ormone tiroideo e per la vitamina D3 (Olefsky, 2001). I recettori nucleari condividono alcune caratteristiche: una regione collocata nella parte centrale del gene che lega il DNA (DBD, DNA binding domain) altamente conservata e formante un dominio a due dita di zinco mediante motivo elica-loop-elica; un dominio coinvolto nel legame col ligando, la dimerizzazione e la transattivazione (LBD, ligand binding domain) (Dalei e Mitchell, 1999); un dominio N-terminale e uno C-terminale e una regione cerniera variabile tra DBD e LBD (Gronemeyer e Laudet, 1995).

Esistono due isoforme distinte del recettore degli estrogeni, ER $\alpha$  ed ER $\beta$ , entrambe distribuite in diversi tessuti ed espresse a livello cardiovascolare (Gustafsson, 2003). Analogamente ad altri recettori nucleari, i geni che codificano per ER $\alpha$  ed ER $\beta$  sono organizzati in regioni funzionali indipendenti, ma capaci di interagire tra di loro. L'interazione con un ligando induce cambiamenti conformazionali nel recettore e porta, dopo un serie di eventi, a variazioni della velocità di trascrizione dei geni regolati dagli estrogeni. Questi eventi comprendono la dimerizzazione del recettore, l'interazione con il DNA e il reclutamento di cofattori, fino alla formazione del complesso di inizio della trascrizione (Nilsson *et al.*, 2001). I due recettori sono i prodotti di geni situati sui cromosomi separati. Le proteine ERs (Fig. 4.2.30) sono composte da sei domini funzionali (A-F), una caratteristica di tutta la superfamiglia. Il dominio A/B N' terminale è il meno conservato tra tutti i membri e dimostra solo il 17% omologia tra i due ERs. Esso contiene il fattore di attivazione (AF1), in una delle due regioni critiche per la funzione di transattivazione dei membri della famiglia dei recettori (Kuiper *et al.*, 1997). Al contrario, il dominio C è la regione più altamente conservata, essendo il dominio di legame al DNA che contiene i motivi *zinc-finger* che hanno un ruolo importante nella dimerizzazione del recettore. Il dominio E è conservato modestamente in tutta la superfamiglia e conferisce specificità: la conservazione delle sequenze amminoacidiche tra ER $\alpha$  ed ER $\beta$  in questa regione è del 60%; tuttavia l'estradiolo si lega quasi con uguale affinità, anche se il legame di altri ligandi differisce sostanzialmente tra di loro (Kuiper *et al.*; 1997). Il dominio E contiene anche la principale superficie di dimerizzazione dei recettori e la seconda funzione di transattivazione (AF2) che si trova nella regione C'-terminale (O' Donnell *et al.*; 2001). Questo dominio è coinvolto nei

processi di dimerizzazione, interazione con le *heat shock proteins*, traslocazione nucleare e modulazione della trascrizione di geni bersaglio, mediante il reclutamento di coattivatori e corepressori. Inoltre, in questo dominio è presente una regione responsabile della diverse risposte dei recettori degli estrogeni al  $17\beta$ -estradiolo e ai modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (SERM); questa regione assume conformazioni distinte a seconda del ligando e permette la distinzione tra composti agonisti e antagonisti (Kuiper *et al.*, 1998) .

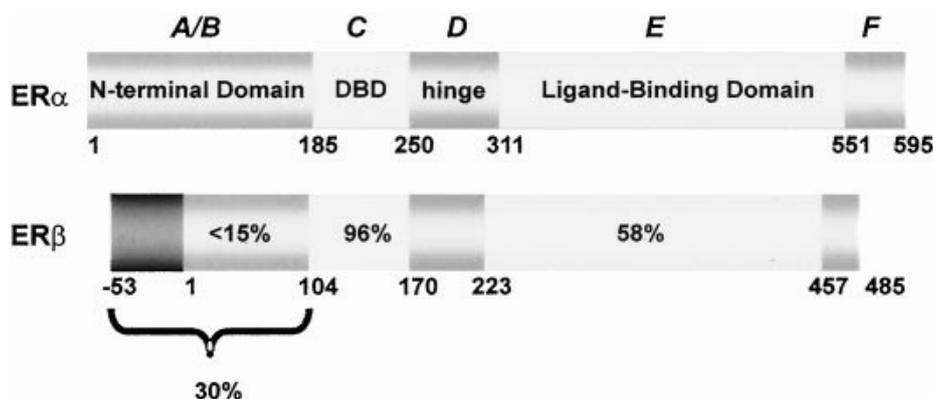


Fig. 4.2.30 Struttura dei recettori degli estrogeni ER $\alpha$  ed ER $\beta$  (O' Donnel *et al.*, 2001): sono indicati i domini funzionali e le percentuali di omologia.

Esistono diversi meccanismi (Fig. 4.2.31) con cui il recettore degli estrogeni agisce:

**Meccanismo classico o ligando dipendente:** nello stato di riposo, il recettore, in equilibrio tra citoplasma e nucleo, è legato a proteine che lo mantengono in uno stato inattivo e ne mascherano il sito di legame con il DNA (*heat shock proteins*). Questa via esercita il suo effetto modificando l'espressione genica mediante il legame diretto dell'ormone al recettore. L'interazione del *ligand binding domain* con un agonista induce un cambiamento conformazionale del recettore che porta alla dissociazione dalle proteine inibitorie hsp e all'esposizione dei siti di dimerizzazione e di legame con il DNA. La traslocazione nel nucleo avviene grazie alla proteina citosolica caveolina-1, che, interagendo col recettore, ne stimola la migrazione verso il nucleo (Schlegel *et al.*, 1999). Una volta nel nucleo, i dimeri si legano agli ERE localizzati nella regione dei promotori di geni bersaglio e modulano la trascrizione con il contributo di coattivatori e corepressori, che vengono reclutati in modo diverso dalle due isoforme recettoriali. Questa regolazione dell'espressione genica è caratteristica dei recettori nucleari e rappresenta il meccanismo d'azione classico degli estrogeni. In aggiunta a questa, sono note anche altre modalità di attivazione dei recettori degli estrogeni (Gruber *et al.*, 2002; Bolego *et al.*, 2006).

**Meccanismo ERE-indipendente:** la modulazione dell'espressione genica può avvenire anche in modo ERE-indipendente, attraverso l'interazione con altri fattori di trascrizione che regolano geni privi di ERE nella zona dei propri promotori. Per esempio, sia ER $\alpha$  che ER $\beta$  possono legare il fattore di trascrizione nucleare AP-1 (*activating protein-1*), attivando la trascrizione dei suoi geni bersaglio (Peach *et al.*, 1997). Inoltre, ER $\alpha$  è in grado di bloccare l'espressione di interleuchina-6 (IL-6), legando il fattore di trascrizione NF-kB e impedendone l'interazione con i *responsive elements* sul gene di IL-6 (Galien e Garcia, 1997).

**Meccanismo ligando-indipendente:** in assenza del ligando ormonale, il recettore può modificare la sua attività mediante una cascata di fosforilazioni che ne comportano ugualmente l'attivazione. La regolazione della trascrizione mediata dai recettori degli estrogeni non è limitata alla sola interazione con ligandi specifici. Per esempio, questi recettori possono venire attivati in seguito alla fosforilazione da parte di protein-chinasi, in risposta all'attivazione dei recettori di fattori di crescita. L'esistenza di tale *cross-talk* è stata dimostrata nel caso dell'attivazione ligando-indipendente dei recettori degli estrogeni da parte dell'insulina, dell'EGF (*epidermal growth factor*) e del TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993). La regolazione per via ligando-indipendente può avvenire anche mediante stimoli extracellulari: ad esempio, il neurotrasmettitore catecolaminergico dopamina, legandosi al suo recettore di membrana può attivare il recettore degli estrogeni nell'uomo (Power *et al.*, 1991).

**Meccanismo non genomico:** alcuni effetti degli estrogeni non possono essere giustificati con meccanismi genomici, a causa della rapidità dei loro effetti (Gruber *et al.*, 2002). Infatti, questi effetti non genomici si verificano nel giro di secondi o minuti dall'esposizione all'estradiolo e sono mediati dall'attivazione di diversi sistemi di trasduzione del segnale, quali la via delle protein chinasi PKA, PKB, PKC, delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e della PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*); inoltre, in seguito all'attivazione di ER vengono prodotti secondi messaggeri, quali Ca<sup>2+</sup>, cAMP e cGMP (Losel *et al.*, 2003). Un ruolo fondamentale nel meccanismo non genomico è quello delle MAP chinasi; esse fanno parte di una famiglia di serina-treonina chinasi e vengono attivate tramite fosforilazione da fattori di crescita cellulari (Collins e Webb, 1999): si tratta di fattori che trasducono segnali extracellulari da più recettori di membrana a bersagli intracellulari. L'attivazione di meccanismi non genomici può influenzare anche l'espressione genica; ciò implica che le azioni nucleari e quelle non nucleari degli estrogeni siano integrate (Pedram *et al.*, 2002). Gli effetti non genomici degli estrogeni sono molteplici, ma hanno alcune caratteristiche comuni: sono troppo rapidi per essere compatibili con la sintesi di mRNA e proteine, non vengono bloccati da inibitori

della trascrizione o della sintesi proteica e sono indotti anche da molecole che non attraversano la membrana cellulare, quali l'estradiolo complessato con albumina (Simoncini *et al.*, 2002). Questi effetti sembrano essere mediati da recettori degli estrogeni localizzati sulla membrana cellulare.

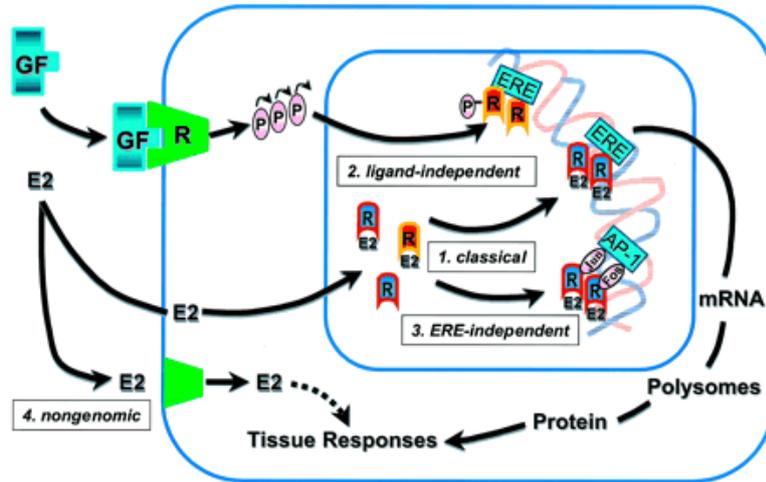
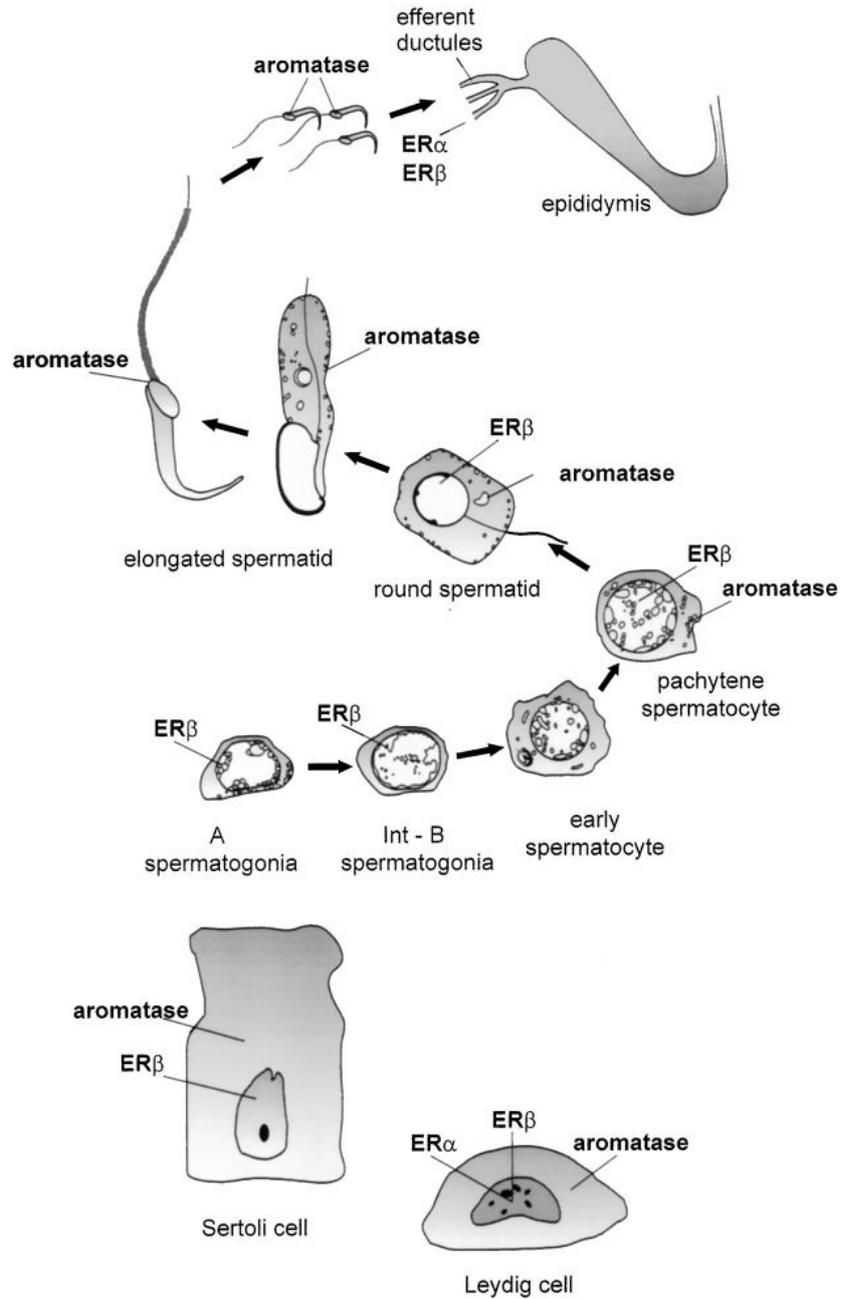


Fig. 4.2.31 Meccanismi di azione dei recettori per gli estrogeni

### 4.3 PRODUZIONE DI ESTROGENI NEL TESTICOLO, RECETTORE DEGLI ESTROGENI E AROMATASI

La visione tradizionale dell' estradiolo come l' ormone "femminile" e del testosterone come l'ormone "maschile" è stata messa in discussione negli ultimi anni (Sharpe, 1997). In letteratura esistono numerosi studi che avvalendosi delle tecniche di RT-PCR quantitativa hanno indagato l' espressione tessuto-specifica dei due recettori degli estrogeni. Nei Mammiferi, la localizzazione di ER $\alpha$  è risultata essere più ampia di ER $\beta$ : i tessuti in cui è risultato maggiormente espresso sono mammella, utero, cervice e vagina; tuttavia si è potuta rilevare la sua attività anche su fegato, rene, cuore (Couse e Korach, 1999). ER $\beta$  invece, ha come principali tessuti di espressione l' ovario, la prostata ed il testicolo; a più bassi livelli di espressione è stato localizzato anche nella milza, nel polmone, nell'ipotalamo e nel timo (Jefferson *et al.*, 2000). Chiaramente la maggior parte dei dati sul ruolo pilota degli estrogeni nella spermatogenesi è stata ottenuta da evidenze "indirette": gli approcci sperimentali sono stati progettati per esaminare il ruolo fisiologico degli estrogeni nei roditori maschi utilizzando antagonisti degli estrogeni, inibitori dell'aromatasi, trattamenti *in vivo* con gli estrogeni e studi *in vitro* con modelli animali *knockout*. La spermatogenesi è un complesso e coordinato processo che porta alla formazione degli spermatozoi. Questo evento è sotto il controllo di fattori endocrini e paracrini, inclusi gli estrogeni che esercitano i loro effetti attraverso i recettori nucleari (ERs). Gli estrogeni, che sono biologicamente espressi nel testicolo del ratto, sono sintetizzati dall'aromatasi e rappresentano l'ultimo *step* del *pathway* steroidogenico. Nei topi ER $\alpha$ KO Lubahn *et al.*, (1993) hanno dimostrato come gli estrogeni siano necessari a raggiungere una completa maturazione degli spermatozoi; infatti Eddy *et al.*, (1996) e Hess *et al.*, (1997) hanno mostrato che un eccesso di fluido incrementa la pressione nei tubuli seminiferi e porta alla distruzione delle cellule germinali nei topi KO. Al contrario nei topi ER $\beta$ KO non sono state registrate variazioni nella spermatogenesi (Couse *et al.*, 1997) anche se c'è un'ampia distribuzione di ER $\beta$  nel testicolo, che suggerisce tuttavia il suo ruolo nella fisiologia testicolare. Nei modelli sperimentali ArKO sebbene la spermatogenesi nei primi *steps* non sia inibita, successivamente si verifica che tutti i maschi sono infertili con un decremento in numero e in qualità (formazione dell'acrosoma) degli spermatidi allungati, suggerendo un ruolo diretto degli estrogeni nella maturazione e differenziazione degli spermatociti a spermatidi (Robertson *et al.*, 2002). Nei ratti neonati la somministrazione di estrogeni induce un incremento del numero di spermatogoni al giorno 16 (Kula *et al.*, 2001) e per la presenza di ER $\beta$  negli spermatogoni l'androstenediolo stimola la sintesi del DNA (Wahlgren *et al.*, 2008). I risultati ottenuti sui gonociti nei ratti immaturi dimostrano che il loro numero è in parte sotto il controllo dell'estradiolo e del

fattore di crescita PDGF (Thuillier *et al.*, 2010); tuttavia risultati opposti sono stati ottenuti nei topi con estradiolo endogeno che inibisce lo sviluppo dei gonociti (Delbès *et al.*, 2004). Ulteriori risultati hanno dimostrato un miglioramento della spermatogenesi nei criceti *golden* (Pak *et al.*, 2002). Inoltre Jin *et al.*, (2005) hanno chiaramente dimostrato che dopo un trattamento in vivo, l'estradiolo stimola la motilità dello spermatozoi nei criceti *golden*; in parallelo è osservato un incremento dei livelli di gonadotropine. Nell'arvicola rossastra immatura, l'esposizione a basse dosi di estradiolo induce un'accelerazione dell'inizio della spermatogenesi che è bloccata dall'iniezione dell'antiestrogeno ICI 182,780 (Gancarczyk *et al.*, 2004). Gli estrogeni e i fitoestrogeni mostrano un effetto protettivo attraverso il ruolo di antiossidanti contro le specie reattive dell'ossigeno (Hamden *et al.*, 2008): ciò può essere motivato dalla prolungata deficienza di testosterone nei ratti, che causa un'assenza degli steps 9 e 19 degli spermatidi mentre un trattamento con  $17\beta$  estradiolo per 20 giorni mostra un mancanza di apoptosi negli steps 1-6 degli spermatidi rotondi (D' Souza *et al.*, 2005). L'osservazione dello sviluppo anormale dell'acrosoma nei topi ArKO suggerisce che la biogenesi dell'acrosoma potrebbe essere un processo estrogeno-dipendente (Robertson *et al.*, 1999). Questa ipotesi è supportata dagli alti livelli di aromatasi nel complesso del Golgi durante lo sviluppo degli spermatidi (Nitta *et al.*, 1993), oltre alla presenza dei recettori degli estrogeni negli spermatidi (O'Donnel *et al.*, 2001). La spermatogenesi è tuttavia in parte sotto il controllo degli estrogeni, che giocano un ruolo pilota nella sopravvivenza delle cellule germinali (Pentikainen *et al.*, 2010) esercitando un effetto mitogenico nei maschi trattati con un inibitore dell'aromatasi (Shetty *et al.*, 1998). Come menzionato precedentemente, è nota la presenza di ERs nello sperma e di recettori capaci di legare gli steroidi sulla membrana (Luconi *et al.*, 2004). Questi recettori di membrana sono collegati ai *pathways* di trasduzione del segnale come il complesso calcio/calmodulina, l'ossido nitrico, l'attivazione di ERK che sono noti per la mobilità dello sperma e la capacitazione. Allo scopo di esercitare un ruolo biologico, gli estrogeni testicolari interagiscono con ERs che a turno mediano la trascrizione dei geni tessuto-specifici. Fino al 1996 il solo dato sui recettori degli estrogeni interessava ER $\alpha$  ma con la scoperta di un nuovo ER, chiamato ER $\beta$  il ruolo degli estrogeni è stato rivalutato soprattutto nel tratto genitale maschile. Nella gonade maschile è stata accuratamente studiata la distribuzione di ER $\alpha$  e ER $\beta$  e dell'aromatasi (Fig. 4.3.32): ER $\alpha$  è osservato principalmente nelle cellule del *Leydig*, mentre ER $\beta$  è localizzato nella gran parte delle cellule testicolari eccetto negli spermatociti di primo ordine e negli spermatidi allungati. Nel testicolo dei mammiferi è noto che l'aromatasi è localizzato nelle cellule del *Leydig* (Carreau, 2007): la quantità di trascritto di aromatasi è più alta negli spermatociti piuttosto che negli spermatidi aploidi, invece l'attività dell'aromatasi è più alta nelle cellule germinali aploidi piuttosto che nelle cellule più giovani. (Carreau e Hess, 2010). Pertanto il gene dell'aromatasi è presente in tutte le fasi delle cellule germinali ma la sua espressione è maggiore nelle fasi meiotiche.



. Fig. 4.3.32 Localizzazione di ER $\alpha$ , ER $\beta$  e aromatasi nel testicolo adulto dell'uomo (O' Donnel *et al.*, 2001)

#### 4.4 ESTROGENI & PHGPx

Il gene della PHGPx è trascritto in mRNA di diverse lunghezze che alla fine producono isoforme diverse per la estensione N-terminale (citosolica, mitocondriale e nucleare), che indirizzano la proteina sintetizzata nei diversi compartimenti. I tre mRNA sono ubiquitari ma una elevatissima attivazione trascrizionale ha luogo nella linea germinale maschile (Maiorino *et al.*, 2003). Il meccanismo di questa attivazione trascrizionale non è noto, così come sono ancora parzialmente oscuri i meccanismi di modulazione della espressione. La sintesi di questo selenoenzima inizia negli spermatidi rotondi. Nelle ultime fasi della spermatogenesi la PHGPx inizia a catalizzare l'ossidazione di tioli proteici e si ritrova, alla fine, come proteina strutturale enzimaticamente inattiva (Behne *et al.*, 1996). La formazione della capsula mitocondriale richiede le SMCPs; infatti, uno dei principali aspetti della funzione della PHGPx è la catalisi operata su cisteine adiacenti in specifiche proteine che possono funzionare come "interruttori redox" e che possono "accendere" o "spegnere" specifiche funzioni biologiche o la formazione di aggregati sopramolecolari. Di particolare rilevanza è lo studio che mostra astenozoospermia in topi generati con una delezione nel gene per le SMCPs: la fecondazione in vitro ha dimostrato che l'infertilità dei maschi è da ricondurre alla scarsa motilità degli spermatozoi e a un decremento nella capacità degli stessi di penetrare negli ovociti (Nayernia *et al.*, 2002). Le cause che contribuiscono ad avere soggetti infertili, prevedono a monte la valutazione dei livelli ormonali: questa informazione suggerisce che il bilancio tra le azioni degli androgeni e estrogeni può essere importante ai fini del mantenimento della spermatogenesi (O' Donnell *et al.*, 2001). La concentrazione di estradiolo nel plasma seminale di uomini azoospermici è significativamente più alta di quella verificata negli uomini normospermici, mentre i livelli di testosterone sono significativamente più bassi nel gruppo di azoospermici comparato a quello di normospermici (Diaconu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Gli ormoni steroidei non attivano direttamente la trascrizione ed il testosterone in vivo è stato documentato promuovere l'espressione solo come conseguenza della induzione della spermatogenesi (Maiorino *et al.*, 1998). Inoltre, l'espressione di PHGPx nei mammiferi può essere controllata dagli estrogeni negli organi riproduttori maschili (testicoli, epididimo e prostata). Il  $17\beta$  estradiolo, un estrogeno intrinseco nei vertebrati, ha il suo recettore espresso nei testicoli durante l'intero processo di spermatogenesi (Miura *et al.*, 1999). L'espressione del trascritto di PHGPx incrementa in seguito al trattamento con  $17\beta$  estradiolo (Pettersson *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2003), per cui il recettore  $\beta$  che funziona come un regolatore dominante del segnale degli estrogeni è correlato con PHGPx (Fig.4.4.33). Da ciò emerge che nei mammiferi gli estrogeni esogeni influenzano il pattern di espressione del gene per il PHGPx tramite il loro recettore  $\beta$  (Sang *et al.*, 2003).

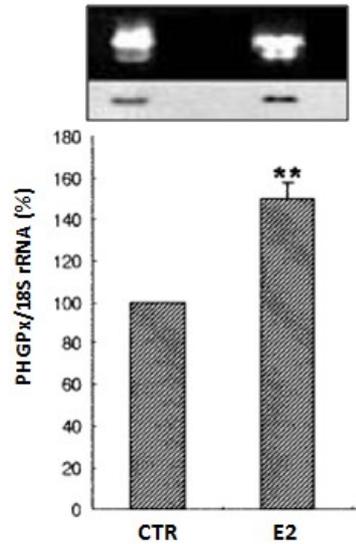


Fig. 4.4.33 Analisi *Northern blotting* nel testicolo dei ratti trattati con estradiolo (E2) (Nam *et al.*, 2003)

Nei feti di topo è stata comparata l' espressione della cGPx e PHGPx, i due selenoenzimi contenenti selenio e glutatione nelle cellule, a differenti dosi di  $17\beta$  estradiolo (In *et al.*, 2011). L'*up*regolazione dell' espressione di PHGPx a concentrazioni crescenti di E2 contrariamente ai livelli di cGPx che non differiscono significativamente dal gruppo di controllo, suggerisce come la trascrizione di PHGPx sia regolata anche dagli estrogeni, modulatori della spermatogenesi e dello sviluppo e funzione del sistema riproduttivo maschile (Fig.4.2.34)

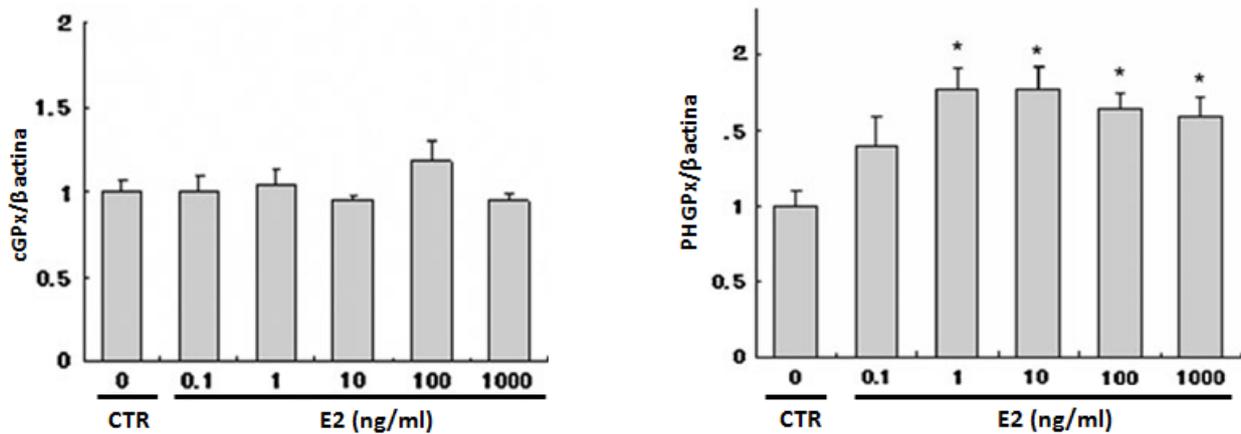


Fig. 4.2.34 Espressione del trascritto di cGPx e PHGPx nei feti di topo esposti a dosi di E2 (In *et al.*, 2011)

## SCOPO DELLA TESI

Dalla letteratura risulta ben evidente il ruolo svolto da diversi fattori endogeni ed esogeni sulla spermatogenesi degli animali oggetto della ricerca. In particolare è evidente che lo sterone testosterone eserciti un rilevante effetto regolatore sulla spermatogenesi e sullo sviluppo e funzione del sistema riproduttivo anche se la localizzazione di recettori degli estrogeni  $\beta$  nelle cellule del Sertoli e nelle cellule germinali suggerisce che gli estrogeni esercitino un'influenza diretta sulla funzione e maturazione delle cellule germinali. Ciò solleva la possibilità che alcuni degli effetti del testosterone sulla spermatogenesi potrebbero verificarsi direttamente sulle cellule germinali dopo conversione del testosterone ad estradiolo, suggerendo quindi l'esistenza di una origine locale di estrogeni nel testicolo e di un suo ruolo nell'avviare la spermatogenesi e di una relazione funzionale tra steroidi e PHGPx. Poiché nel testicolo dei vertebrati non mammiferi, l'organizzazione degli stadi maturativi delle cellule germinali e degli elementi somatici è molto meno complessa di quella dei mammiferi uno studio che si avvale di modelli sperimentali più facilmente manipolabili, permette la comprensione di processi anche più complessi.

Pertanto i riproduttori stagionali si pongono come modelli sperimentali idonei a definirne gli eventi responsabili che regolano la spermatogenesi, partendo dalla identificazione e caratterizzazione della sequenza nucleotidica e aminoacidica di PHGPx e dallo studio delle sue variazioni stagionali di espressione tissutale in natura e in trattamenti sperimentali.

Per il lavoro di tesi è stato utilizzato come modello sperimentale il maschio di un vertebrato non mammifero con tipica riproduzione stagionale, il *Lacertidae Podarcis sicula* il cui noto meccanismo riproduttivo è influenzato da molteplici fattori molecolari che governano le numerose ed importanti relazioni che si instaurano lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade.

## CAPITOLO V: MODELLO SPERIMENTALE

### 5.1 CICLO RIPRODUTTIVO & SPERMATOGENETICO NEL MASCHIO DEL *LACERTIDAE Podarcis sicula*

La Lucertola *Podarcis sicula* (Fig.5.1.34) è piuttosto diffusa nell'Italia Centro-Meridionale; il suo areale può essere ricondotto all'Europa Centro-Meridionale, alle zone costiere della Slovenia, Croazia e parte del Montenegro. Tuttavia l'Italia viene considerata l'area di origine e il centro di espansione della specie (Radovanovi, 1956; Gorman *et al.*, 1975). È una lucertola di medie dimensioni (nei maschi si arriva ai 26 cm di lunghezza), con una corporatura robusta e una testa piramidocefala. La regione ventrale è chiara, generalmente biancastra. Solo la fila delle squame ventrali esterne può presentare delle macchie azzurre o nere. Di regola non presenta punteggiature o macchie oscure né sulla gola, né sul ventre, ma una maculatura azzurra nella regione ascellare. La colorazione dorsale è generalmente verde, dalle tonalità che vanno dall'oliva a quelle del giallastro senape, o a volte al marrone. Sulla colorazione di base si riconoscono delle macchie a formare un disegno striato o reticolato; le striature dorso laterali possono essere a volte continue, ma non sono mai a contatto della zona temporale. La banda occipitale, se è presente, è costituita da macchie nere, talvolta in contatto tra loro, che nei maschi sono più larghe e più scure. Il disegno dorsale rappresenta un carattere di variabilità geografica, lungo la penisola italiana (Corti e Lo Cascio, 1999).



Fig. 5.1.34 Il *Lacertidae Podarcis sicula*

*Podarcis sicula* è una specie eliofila e mostra un'ampia valenza ecologica: è presente spesso in aree fortemente antropizzate e colonizza ambienti di gariga, di macchie di collina, dove predilige le aree aperte ai margini del bosco o le radure e i terreni sabbiosi o petrosi e si rifugia nei muri a secco e nei cespugli (Corti e Lo Cascio, 1999). Nella parte settentrionale dell' areale *Podarcis sicula* è una specie prevalentemente praticola, che occupa zone pianeggianti anche antropizzate ed ambienti dunali,. Nel sud Italia progressivamente diventa una specie sempre più euriecia, colonizzando ogni tipo di ambiente, anche i più montani, raggiungendo ad esempio i 2200 m di altitudine sull'Etna, in Sicilia (Turrisi e Vaccari, 2001). In generale *P. sicula* è predatrice e caccia sul suolo. Le componenti principali della sua dieta sono estremamente variabili, rendendola particolarmente generalista: in studi localizzati sono stati individuati differenti spettri alimentari in relazione alle tipologie di territori occupati. In ogni caso in qualità di predatore si nutre soprattutto di Insetti e Imenotteri Formicidi, di Crostacei Isopodi, di Araneidi e di piccoli Gasteropodi, pur non trascurando alimenti di natura vegetale (Rugiero, 1994).

Il maschio del lacertide *Podarcis sicula* si riproduce con ritmo stagionale che va da aprile alla metà di luglio. In questo periodo (*fase riproduttiva*) la spermatogenesi è estremamente attiva, il tessuto interstiziale è in piena attività, gli epididimi sono molto sviluppati e i caratteri sessuali secondari sono ben evidenti. Alla fine del periodo riproduttivo (fine luglio), quando ancora le condizioni ambientali sono favorevoli, l'intero apparato genitale entra in regressione. Nei tubuli seminiferi sono presenti solo spermatogoni e cellule del Sertoli, mentre l'interstizio è ridotto e le cellule del Leydig non si distinguono dai fibroblasti. Tale fenomeno fisiologico detto *refrattarietà* risulta essere un fattore importante nella strategia riproduttiva di questo lacertide in quanto previene i processi riproduttivi in autunno con la conseguente schiusa delle uova e nascita dei piccoli nella stagione invernale. Dalla metà di agosto a livello testicolare si notano mitosi spermatogoniali. All'inizio di settembre anche se molto lentamente, l'attività spermatogenetica riprende e nei tubuli si osservano alcuni spermatoцитi e spermatici ed anche qualche spermatozoo. Questo processo di *spermatogenesi autunnale* continua, sebbene molto lentamente, fino a novembre, ma non ha fini riproduttivi dal momento che non è accompagnato da alcun rilascio di spermatozoi nei tubuli dei dotti deferenti ne c'è un adeguato sviluppo degli epididimi o dei caratteri sessuali secondari. Da dicembre l'intero apparato riproduttivo e i processi spermatogenetici sono notevolmente rallentati (*stasi invernali*) e vari elementi della linea germinale vanno incontro a degenerazione. Tale stasi dura fino alla fine di febbraio/metà marzo. A marzo, c'è una graduale ripresa della spermatogenesi (*recrudescenza primaverile*) con la formazione di nuovi spermatozoi, in piccola parte derivanti dalla maturazione di vecchi elementi della linea germinale che erano rimasti quiescenti in inverno, ma per la maggior parte derivanti dalla

trasformazione di una nuova generazione di spermatogoni in divisione. Infatti molti elementi della vecchia linea germinale degenerano nelle prime settimane di ripresa riproduttiva. Bisogna precisare che i limiti delle varie fasi del ciclo descritto non sono da considerare rigidi e piccole modificazioni possono anche verificarsi dal momento che dipendono dai cambiamenti climatici, sperimentalmente agendo su fotoperiodo e temperatura è possibile inoltre favorire o meno la ripresa dell'attività spermatogenetica.

**5.2 CONTROLLO ENDOCRINO NEL CICLO RIPRODUTTIVO DEL MASCHIO DEL LACERTIDAE *Podarcis sicula***

*Podarcis sicula* è una specie che presenta un tipico ciclo sessuale che si caratterizza in modificazioni della gonade e delle vie genitali, accompagnate da variazioni delle concentrazioni degli ormoni steroidei: l'attività spermatogenetica del *Lacertidae* è regolata quindi da un meccanismo endocrino (Andò *et al.*, 1990). In tale animale gli androgeni aumentano subito dopo l'emergenza dai rifugi invernali e raggiungono valori più elevati in marzo-aprile, momento in cui i maschi sono più aggressivi ed effettuano lotte tra loro per stabilire la territorialità. Il periodo riproduttivo comprendente il corteggiamento, gli accoppiamenti e la piena attività spermatogenetica si prolunga dalla prima metà di aprile sino a giugno e con minore frequenza anche a metà luglio. I valori degli androgeni durante il periodo riproduttivo e di intensa attività spermatogenetica sono elevati ma nettamente più bassi di quelli della precedente fase di aggressività. La fine del periodo riproduttivo e l'inizio della fase refrattaria, quando si manifesta l'involutione del processo spermatogenetico, sono caratterizzati da un netto calo degli androgeni e un innalzamento degli estrogeni. Gli estrogeni si mantengono elevati per tutta la durata del periodo refrattario (Fig. 5.2.35).

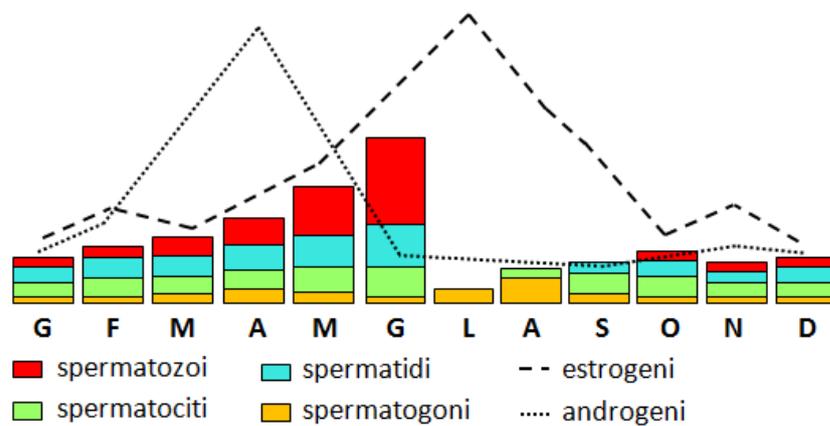


Fig. 5.2.35 Andamento degli androgeni ed estrogeni nel corso del ciclo riproduttivo del maschio di *Podarcis sicula*

E' dimostrata un' interessante correlazione tra l'attività spermatogenetica e il livello dei recettori del testosterone: infatti l'attività dei recettori è più alta solo quando è attiva la spermatogenesi (Paolucci *et al.*, 1992). Dal momento che in qualsiasi fase del ciclo spermatogenetico il livello di testosterone

intra-gonadale è sufficientemente alto da mantenere un livello saturo dei recettori, è stato proposto che i recettori piuttosto che l'ormone potrebbero essere il fattore limitante nella regolazione della spermatogenesi. Significative quantità di  $17\beta$  estradiolo e del suo recettore sono state trovate nel testicolo (Paolucci *et al.*, 1992). In diversi vertebrati si è supposto che gli estrogeni regolano il tasso di moltiplicazione spermatogoniale e/o la morte delle cellule del *Leydig* al termine del ciclo di differenziazione (Fasano *et al.*, 1991). Nei testicoli di *Podarcis sicula* il  $17\beta$  estradiolo e il suo recettore sono presenti durante la moltiplicazione spermatogoniale (autunno e tardo inverno) e nuovamente in estate quando le cellule del *Leydig* si atrofizzano. L'effetto inibitorio sull'attività delle cellule del *Leydig* spiega la forte azione antigonadale degli estrogeni nel tratto riproduttivo maschile e suggerisce che gli estrogeni innescano il periodo refrattario attraverso un *feed-back* locale negativo (Pierantoni e Fasano, 1991). L'immunoreattività specifica per ER $\beta$  nel testicolo di *Podarcis sicula* (Fig. 5.2.36) nel nucleo degli spermatogoni, spermatociti, spermatidi e cellule del Sertoli indica che gli estrogeni legandosi al recettore esercitano un ruolo significativo nella normale funzione testicolare, nonché un'influenza diretta sulla funzione e maturazione delle cellule germinali (Chieffi e Varriale, 2004).

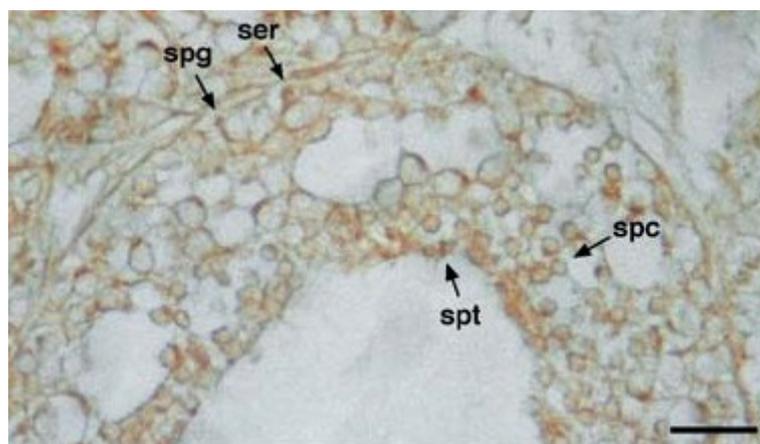


Fig. 5.2.36

Immunoreattività di ER $\beta$  nel testicolo di *Podarcis sicula*

Ciò suggerisce la possibilità che alcuni degli effetti del testosterone sulla spermatogenesi si verificano direttamente sulle cellule germinali dopo la conversione del testosterone in estradiolo attraverso l'azione dell'aromatasi, proponendo l'esistenza di una fonte locale di estrogeni nel testicolo (Weniger, 1993).

# *MATERIALI E METODI*

## CAPITOLO VI: ESPERIMENTI *IN VIVO*

### 6.1 RACCOLTA DI ANIMALI & TESSUTI

Maschi adulti di *Podarvis sicula* sono stati catturati durante la stasi riproduttiva (N=17), nella massima attività gonadica (N=20) e nella stasi estiva (N=3), nelle vicinanze di Napoli. Aliquote di vari tessuti quali testicoli, encefalo, fegato ed intestino sono stati prelevati ed opportunamente conservati a -80°C, fino al loro uso per le indagini biochimiche e biomolecolari.

Tab.2 Raccolta di animali e tessuti

ESEMPLARE	NOME SCIENTIFICO	N°. ANIMALI	PERIODO	ORGANI PRELEVATI
lucertola	<i>Podarvis sicula</i>	17	stasi riproduttiva	testicoli- encefalo- fegato- intestino
lucertola	<i>Podarvis sicula</i>	20	massima attività gonadica	testicoli- encefalo - fegato- intestino
lucertola	<i>Podarvis sicula</i>	3	stasi estiva	testicoli- encefalo - fegato intestino

## 6.2 TRATTAMENTI SPERIMENTALI

### Trattamenti con Gonadotropina Corionica umana (HCG)

Maschi adulti di *Podarcis sicula* (N=14) catturati nel periodo di stasi riproduttiva (gennaio) sono stati sottoposti ad un regime sperimentale di termo-fotoperiodo tipico del periodo primaverile (D:L/T 8:16/28°C) con alimentazione *ad libitum*. Dopo una settimana di acclimatazione nel terrario (Fig.5.2.37), ad ogni animale è stata somministrata una dose intramuscolare di Gonadotropina Corionica Umana (HCG Profase HP – Boeringher Ingelheim); 7µg/0,25ml/21 giorni (Sonar e Patil, 1994). Subito dopo la cattura sono stati sacrificati animali (N=3) per verificarne lo stato riproduttivo. Le gonadi prelevate hanno rappresentato il controllo in natura e per tutti gli animali sono stati annotati i dati biometrici. I testicoli sono stati immediatamente pesati e congelati nel -80°C per le indagini biochimiche. Al termine del trattamento sperimentale gli animali sottoposti alle dosi giornaliere di HCG (N=8) e gli animali di controllo trattamento (N=3) ai quali, invece, è stata somministrata soluzione fisiologica, sono stati sacrificati dopo 24 hrs dall'ultima iniezione.



Fig. 6.2.37 Terrario delle lucertole trattate con Gonadotropina Corionica Umana (HCG)

Trattamenti con ICI 182-780

Maschi adulti di *Podarcis sicula*, catturati durante la massima attività gonadica (maggio), sono stati sottoposti ad un regime termo-fotoperiodico tipico del periodo invernale (D:L/T 16:8/10°C) e trattati ogni 24 hrs con una dose sottocutanea (Fig.5.2.38) di anti-estrogeno ICI 182-780 (Tocris; 6 µg/0,25 ml olio di mandorle) (Chieffi *et al.*, 2002). Agli animali di controllo (N=5) veniva somministrato una dose *pro die* sottocutanea di olio di mandorla (0,25 ml). Subito dopo la cattura sono stati sacrificati tre animali per verificarne lo stato riproduttivo e le gonadi prelevate sono state opportunamente trattate per le indagini biochimiche. I prelievi degli animali trattati (N=12) sono avvenuti il 1°-2°-3° e 21° giorno dall'inizio del trattamento rispettivamente in numero di 3. Il prelievo degli animali di controllo è avvenuto il giorno dopo l'ultimo trattamento di *Podarcis sicula*.



Fig. 6.2.38 Dose sottocutanea di ICI 182-780

## CAPITOLO VII: INDAGINI BIOCHIMICHE

### 7.1 ESTRAZIONE DI PROTEINE

I tessuti di *Podarcis sicula* (testicoli, encefalo, fegato, intestino) sono stati omogeneizzati in 8-10 volumi di tampone (20ml finali) in omogenizzatore tipo *dounce* in un buffer di lisi freddo (500 ml di saccarosio 0,32M e da 5ml di Tris-HCl pH 7,5 10 mM). I campioni sono stati, poi, centrifugati a 10000g a 4°C, per 30 min, per ottenere un lisato chiarificato. La quantità di proteine totali è stata valutata usando il metodo di Lowry *et al.*, 1951.

### 7.2 PREPARAZIONE DEL GEL DI ACRILAMIDE

Il tampone per il carico su SDS/PAGE, aggiunto ad ogni campione per denaturare le proteine, è così composto: TrisHCl 0.6 M pH 7.8, SDS 2% p/v, glicerolo 20 % (v/v) e 2 mercaptoetanolo 5mM. In questa tesi sono stati utilizzati gel delle dimensioni di 8 x 10 cm dello spessore di 0,75 cm e con percentuale di poliacrilamide del 15% (p/v). I gel si costruiscono in apposite macchinette e sono formati da una parte superiore (*stacking gel*) a pH 6.8, che serve per compattare le proteine del campione ad uno stesso livello (Tris HCl pH 6.8 1 M, 40% Acrilammide/Bisacrilammide 19:1, 20% SDS, 10% APS, 100% TEMED) e una parte inferiore (*running gel*) a pH 8.8, in cui avviene la vera e propria separazione delle bande proteiche, in base al peso molecolare (Tris HCl pH 8.8 1 M, 40% Acrilammide/Bisacrilammide 19:1, 20% SDS, 10% APS, 100% TEMED).

La corsa elettroforetica avviene nell'apposito apparecchio a 150 V per un tempo variabile, che solitamente è di un'ora circa.

### 7.3 TRASFERIMENTO SUL FILTRO

Le proteine (25µg) sono trasferite dal gel su membrana di polivinilidenefluoruro o PVDF (Millipore) (Laemmli *et al.*, 1970) precedentemente bagnata per circa 1 minuto in metanolo 100%, passata per un paio di minuti in acqua milliQ ed infine immersa nel tampone di blotting.

#### 7.4 INCUBAZIONE CON GLI ANTICORPI

A trasferimento avvenuto i siti aspecifici sul filtro sono bloccati immergendolo in una soluzione di Tris-HCl pH 8, NaCl 150mM (TBS) e latte non grasso in polvere al 5%, per circa 1h, con leggera agitazione a temperatura ambiente (RT). Nella stessa soluzione sono diluiti gli anticorpi. Le membrane con l'anticorpo primario policlonale anti-PHGPx (Abnova, PAB 1206), diluito 1:1000 e con anti-mouse IgG (Promega), diluito 1:500 sono state incubate con leggera agitazione a RT per 1h. Il filtro è stato lavato 5 volte per 5 minuti in TTBS (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 150mM e Tween-20 0,1%) e una volta per 5 minuti ancora in TBS. È stato poi reimmerso per 1h nella soluzione bloccante (TBS e latte al 5%) con l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con perossidasi (1:5000) e lavato come sopra.

#### 7.5 IMMUNORIVELAZIONE (ECL)

La rivelazione del segnale è stata effettuata su lastra autoradiografica mediante l'utilizzo di un substrato chemiluminescente (ECL, Amersham Biosciences). Il sistema di rivelazione prevede l'utilizzo di una soluzione contenente luminolo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che, per azione della perossidasi, dà luogo ad una reazione di chemiluminescenza, in corrispondenza del punto in cui si è formato il complesso antigene/anticorpo.

#### 7.6 ANALISI DENSITOMETRICA

La quantizzazione delle bande ottenute è stata effettuata attraverso analisi densitometrica dei livelli di espressione di PHGPx nei tessuti. Le immagini sono state acquisite ed elaborate utilizzando il software *Quantity One* (Bio Rad) e i dati sono stati riportati come intensità per mm<sup>2</sup> (INT\*mm<sup>2</sup>). Ogni esperimento è stato ripetuto diverse volte ed è stata considerata la media risultante. Al fine di confrontare campioni caricati in gel differenti, i dati sono stati riportati come rapporto tra la densità di banda specifica dei campioni e del controllo standardizzato.

## CAPITOLO VIII: INDAGINI BIOMOLECOLARI

### 8.1 ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE

Un *pool* di RNA totale è stato estratto dai tessuti di testicolo di *Podarcis sicula* a partire da esemplari campionati durante la stasi riproduttiva, la massima attività gonadica e la stasi estiva usando il reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), come da protocollo. L' RNA totale è stato trattato per 30 min a 37°C con *DnaseI* (10U per campione) (Amersham Pharmacia Biotech, Chalfont St Giles, UK) per eliminare eventuali contaminanti di DNA genomico. La quantità e l'integrità dell'RNA estratto sono state determinate mediante analisi spettrofotometrica a 260/280 nm ed elettroforesi. Per valutare l'integrità dell'RNA totale, questi campioni sono stati analizzati usando il sistema automatico di elettroforesi Experion (Bio-Rad). Il software Experion mostra automaticamente in forma di una tabella-elettroferogramma i risultati (concentrazione RNA ribosomiale e il numero di RNA indicatore di qualità) e il gel virtuale, che è simile a un tradizionale gel di RNA gel.

### 8.2 TRASCRIZIONE INVERSA DELL'RNA (RT-PCR)

Per preparare i cDNA (SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, INVITROGEN) mediante la reazione di trascrizione inversa sono stati utilizzati *pool* di RNA totale (TRI REAGENT, SIGMA) estratti da testicoli prelevati da *Podarcis sicula* catturati durante la stasi riproduttiva, nella massima attività gonadica e nella stasi estiva. La reazione di trascrittasi inversa è stata eseguita utilizzando 5 µg di RNA totale in un volume finale di 20 µl, come da protocollo (Fig. 6.2.39). Come controllo negativo, è stato usato l' RNA totale non trattato con Trascrittasi Inversa. L'integrità del cDNA sintetizzato è stata determinata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, utilizzando come controllo interno la subunità 18S rRNA (~400 bp) di *Podarcis sicula*.

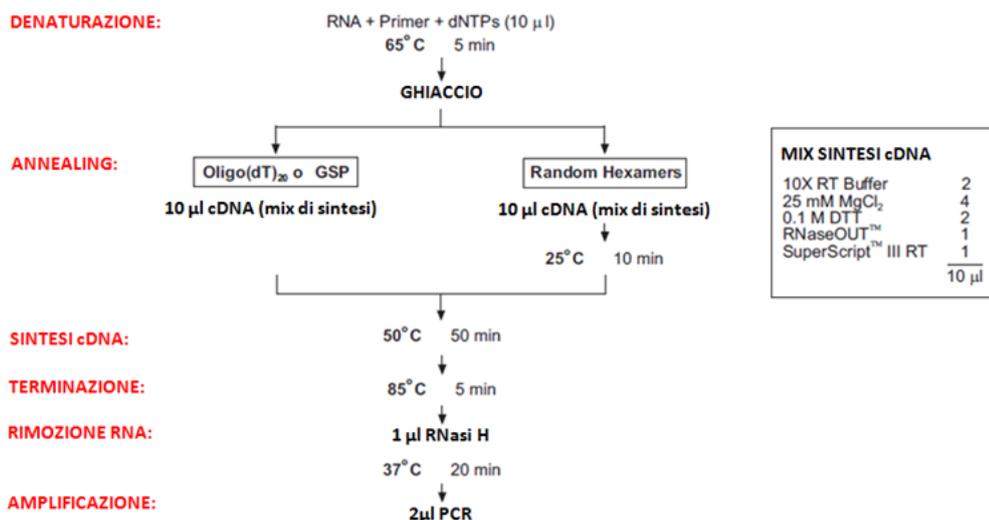


Fig. 6.2.39 Protocollo di sintesi cDNA (SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, INVITROGEN)

### 8.3 AMPLIFICAZIONE MEDIANTE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Le PCR sono state condotte utilizzando come DNA stampo il cDNA a singola elica ottenuto dalla reazione di trascrizione inversa. Come innesco della reazione sono stati utilizzati i *primers* degenerati disegnati da Hudson *et al.*, sulla base dei motivi conservati in corrispondenza delle sequenze proteiche dei tre organismi, per amplificare il gene PHGPx nell'anfibio anuro *Cyclorana alboguttata* (Tab.3). La miscela di reazione delle PCR prevede: un'aliquota di cDNA a singola elica (2 µl); AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (APPLIED BIOSYSTEM) (0,2 µl); 50 µM di ciascuno dei primers citati; 2,5 mM (concentrazione finale) di dNTPs in Tris/HCl 10 mM pH8,3 contenente KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM.

Tab.3 Sequenze dei primers e del programma di PCR usato per l'amplificazione del cDNA

GENE	SEQUENZE PROTEICHE	PROGRAMMA PCR	PRIMER Fw	PRIMER Rw
PHGPX	<i>Danio rerio</i> (AY216591)	94°C per 45"	TACMGGGGYTWYGTSTGYATC	CTTRGTGAARTCCACTTGAT
	<i>Gallus gallus</i> (NM_204220)	55°C per 50"		
	<i>Homo sapiens</i> (NM_002085)	72°C per 1'.30"		

#### **8.4 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE**

Dopo avere ottenuto i prodotti di amplificazione, i campioni sono stati purificati mediante l'utilizzo di Microcon 100 ( Millipore-Amicon, Belforf, MA, USA) assemblati con opportuno filtro. All'interno di questi filtri è stato immesso il DNA amplificato facendolo diluire in acqua distillata sterile, in quantità in funzione della concentrazione di DNA iniziale a disposizione, fino ad arrivare ad un volume finale di circa 500 $\mu$ l. In seguito le microcon sono state centrifugate a temperatura ambiente per 20' a 2500 rpm. I filtri (nei quali la resina ha trattenuto il DNA) sono stati capovolti in nuove eppendorf e ulteriormente centrifugati a 3500 rpm per 5'; poi è stata effettuata una diluizione con 10 $\mu$ l di acqua distillata sterile. Le eppendorf con all'interno il filtrino capovolto sono state infine centrifugate per 3' a 3500 rpm. Il DNA purificato è stato successivamente corso in un gel d'agarosio 2% a 80 V per 8' usando un marcatore di peso molecolare noto Marker II (Lambda/Hind III). In particolare per ogni campione sono stati caricati 1 $\mu$ l di colorante 6x loading e 0.3 $\mu$ l di DNA purificato.

#### **8.5 ANALISI DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE SEPARAZIONE SU GEL DI AGAROSIO**

I prodotti delle amplificazioni di circa 340 bp sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in tampone TEB, con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 40 min a 80 Volts costanti; come indicatore di peso molecolare è stata usata una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto, mentre come controllo positivo la subunità 18S rRNA. Il gel d'agarosio è stato preparato al 2% in quanto a questa concentrazione il gel ha un range di separazione che va dalle 500 alle 7000 bp. Per la preparazione del gel per la corsa sono stati fatti sciogliere 0.168 g di AGAROSIO 0.8% in 21 ml di TAE riscaldando opportunamente la soluzione. Non appena si è sciolto tutto l' agarosio è stato necessario far raffreddare la soluzione prima di aggiungervi 0.3  $\mu$ l di bromuro di etidio che, essendo una sostanza fluorescente in grado di intercalarsi negli acidi nucleici è capace di emettere luce se colpita da raggi UV, risulta molto utile per localizzare l'RNA. A questo punto la soluzione agarosio-tampone è stata versata su di un supporto dotato di un pettine che consente la formazione dei pozzetti nel gel una volta raffreddato.

Dopo aver atteso il tempo necessario per consentire alla soluzione di solidificarsi, è stato rimosso il pettine dallo stampo e il gel è stato immerso nella camera per la corsa contenente tampone TAE e a cui è stato aggiunto bromuro d'etidio. Sono stati caricati i campioni e il marker nei pozzetti. I campioni caricati sono stati preparati usando 2 $\mu$ l di RNA, 1 $\mu$ l di colorante e 3 $\mu$ l di acqua. La vaschetta è stata così, collegata ad un voltmetro e la corsa è stata eseguita per circa 20' a 100 V.

## 8.6 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA (SQ-RT-PCR)

La PCR semi quantitativa (SQ-RT-PCR) ha permesso di quantificare indirettamente il numero di copie di DNA nel campione oggetto di studio. Essenzialmente questa tecnica ha previsto l'amplificazione, con *primer* specifici, dei diversi *target* esaminati; le intensità relative all'amplificato sono state poi rapportate all'intensità del segnale di uno *standard* o controllo interno. Poiché l'intensità del segnale è proporzionale al numero di copie del nostro *target* le diverse concentrazioni vengono così determinate. I campioni sono rapportati ad un controllo interno che è un *housekeeping* gene. Un buon controllo interno, per definizione, deve avere un livello d'espressione costante, assumendo che le condizioni sperimentali non ne alterano i livelli d'espressione. Al fine di normalizzare la quantità di trascritto per PHGPx le intensità relative di amplificato sono state rapportate all'intensità del segnale costante del gene *housekeeping* 18S rRNA, assumendo che le condizioni sperimentali non ne alterassero i livelli d'espressione. I prodotti di PCR sono stati così analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. L'immagine del gel è stata acquisita usando "Quantity one" e l'intensità delle bande (densità ottica). Poiché l'intensità del segnale è proporzionale al numero di copie del target, le diverse concentrazioni sono state così determinate; quindi ogni valore di densità ottica è stato normalizzato con lo *standard* ed ogni esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte.

## 8.7 SEQUENZIAMENTO

I prodotti purificati, per la fase di sequenziamento sono stati sottomessi al Servizio di Sequenziamento (Primm srl). La sequenza grezza ottenuta è stata processata con il programma *BioEdit ver. 7.0.8*: questo software prevede di eliminare gli estremi non utilizzabili delle sequenze,

minimizza la presenza di basi dubbie e fissa lunghezze uniformi e correggere le basi nominate “N”, valutando i picchi massimi e dando ad ognuno il valore della base corrispondente. Completato il “progetto” di sequenziamento si è proceduto alla fase di annotazione ovvero di determinazione dei relativi prodotti di espressione come l'mRNA, attraverso la determinazione di “Open Reading Frames” (ORFs) sufficientemente lunghe. La sequenza nucleotidica in *input* del cDNA è stata inserita nel programma *ORF Finder* disponibile presso il sito NCBI che ha ricercato ORFs in tutte e sei le *frame* di lettura della sequenza

## CAPITOLO IX: ANALISI BIOINFORMATICA

Il frammento ottenuto dal clonaggio parziale e dalla reazione di sequenziamento, è stato sottoposto ad analisi bioinformatica al fine di determinarne l'annotazione strutturale e funzionale. I principali *server* e programmi utilizzati sono stati i seguenti:

**N.C.B.I.** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Il *National Center for Biotechnology Information* è una divisione della *National Library of Medicine* (NLM), presso il *National Institute of Health* (NIH), USA. Fondato nel 1988 per decisione governativa, ha lo scopo di fornire un supporto alla ricerca nella biologia molecolare. Gestisce *database* pubblici e sviluppa software per l'analisi di dati genomici. Le analisi di similarità sono state condotte utilizzando **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool), un programma per la ricerca di similarità locale tra una sequenza data ed una serie di sequenze depositate nella banca dati scelta. Le ricerche sono state effettuate nei database di sequenze dell'NCBI, EBI e JGI utilizzando i parametri di default. Nei casi in cui non si riusciva ad identificare facilmente gli ortologhi, avendo a disposizione una sequenza di una specie, si selezionava un database di sequenze derivanti da un singolo organismo evolutivamente vicino. Le sequenze ottenute tramite BLAST sono state inizialmente allineate utilizzando il programma CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1997) in grado di elaborare allineamenti multipli di sequenze sia proteiche che nucleotidiche, evidenziandone le zone di similarità. Successivamente gli allineamenti sono stati corretti manualmente.

**JALVIEW** Per quanto riguarda la visualizzazione degli allineamenti è stato utilizzato Jalview per una migliore rappresentazione grafica dell'allineamento. Jalview è un editor per un allineamento multiplo scritto in Java ed è utilizzato in pagine web come il ClustalW server dell'EBI o anche Pfam.

**PROSITE** (<http://prosite.expasy.org/>). Per analizzare i pattern creati sulle sequenze è stato utilizzato il programma ScanProsite, che confronta un pattern inserito dall'operatore con il database proteico di Swiss-Prot e TrEMBL, dando come output le sequenze contenenti frammenti che soddisfano le caratteristiche del pattern.

**UNIPROT** (<http://www.uniprot.org/>). UniProt, comprende due sezioni: Swiss-Prot che contiene record annotati manualmente con informazioni estratte dalla letteratura, e TrEMBL i cui record sono prodotti in modo automatico. In Swiss-Prot si possono distinguere due classi di dati: i dati principali (core data) e le annotazioni. I dati principali comprendono la sequenza, le referenze bibliografiche e i dati tassonomici; le annotazioni invece consistono in informazioni su funzioni della

proteina, modificazioni posttraduzionali, presenza di domini o siti di legame, struttura secondaria e quaternaria, similarità con altre proteine, malattie associate a deficienze della proteina, presenza di diverse varianti, ecc. TrEMBL deriva dalla traduzione automatica di tutte le sequenze annotate nei database nucleotidici DDBJ/EMBL/GenBank e contiene tutte le altre sequenze proteiche inserite in UniProt.

**PSORT** (<http://psort.hgc.jp/>). E' un programma che ha consentito di predire i siti di localizzazione subcellulare e i segnali di *sorting* nelle sequenze amminoacidiche. PSORT comprende vari sottoprogrammi che predicono sequenze segnale diverse utilizzando metodi statistici, empirici o di apprendimento automatico.

**PSIPRED** (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Riguardo alla struttura è stato utilizzato come programma di predizione di struttura secondaria PSIPRED. La procedura per la predizione comprende l'esecuzione di PSI-BLAST che permette di individuare un gruppo di sequenze omologhe alla sequenza *query*, ma piuttosto distanti dal punto di vista filogenetico e genera anche il profilo corrispondente che viene utilizzato direttamente per il metodo di predizione evitando la costruzione del multiallineamento, un passaggio che richiederebbe un tempo di esecuzione piuttosto lungo. Fornendo la sequenza da modellizzare, questi programmi cercano, attraverso analisi di similarità (PSI-BLAST), una proteina (o una sua porzione) con struttura depositata che agisce da template per la riproduzione della struttura della sequenza in esame. I programmi estraggono le restrizioni geometriche attraverso la corrispondenza degli atomi tra il template e la sequenza, e la ricostruzione 3D della proteina avviene usando l'approccio di distanza geometrica.

**Conserved Domains Database (CDD)** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Questa banca dati è specializzata in domini proteici conservati e si avvale sia di allineamenti curati dallo *staff* dell' NCBI che di domini annotati in altre banche dati come Pfam e SMART

**MEGA5** Le analisi filogenetiche sono state effettuate utilizzando il metodo Neighbor-Joining (NJ) attraverso il programma MEGA versione 5 esportando i dati da CLUSTALW con le distanze evolutive derivate dagli allineamenti dei residui amminoacidici dedotte.

## CAPITOLO X: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 10.1 VALUTAZIONE BIOCHIMICA DELLA PHGPX

L'analisi di Western blotting condotta ha permesso di segnalare che l'anticorpo *cross* reagisce anche su tessuti di rettili così come nel controllo positivo ovvero su cellule di mammifero promielocitiche di leucemia, HL-60 (Fig.6.2.40).

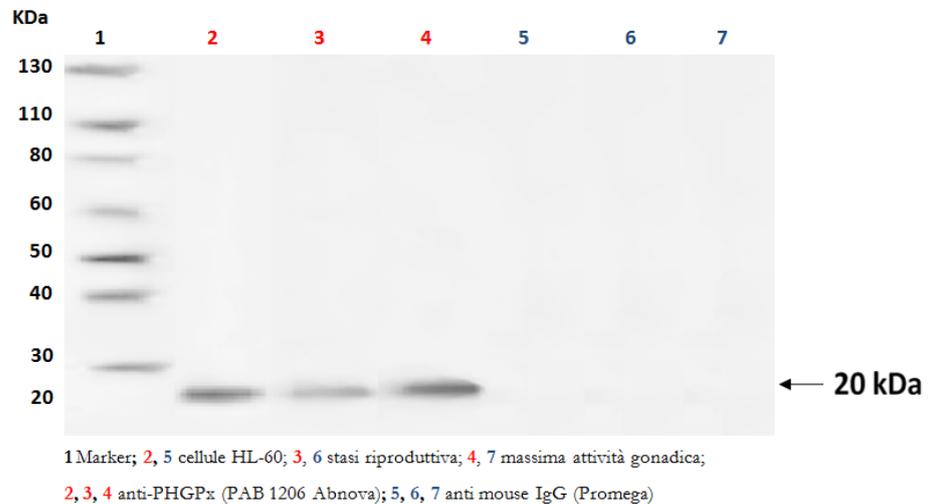


Fig. 10.1.40 Analisi di Western blotting della selenioproteina PHGPx eseguita su proteine totali (25µg) estratte da tessuti di *Podarvis sicula* nelle varie fasi del ciclo riproduttivo.

Si evidenzia infatti, per tutti i tessuti esaminati (testicolo, encefalo, fegato, intestino) durante la stasi riproduttiva e la massima attività gonadica una banda del peso molecolare di circa 20kDa (Fig.10.2.41), come già risultato in altre specie appartenenti a diverse classi di Vertebrati.

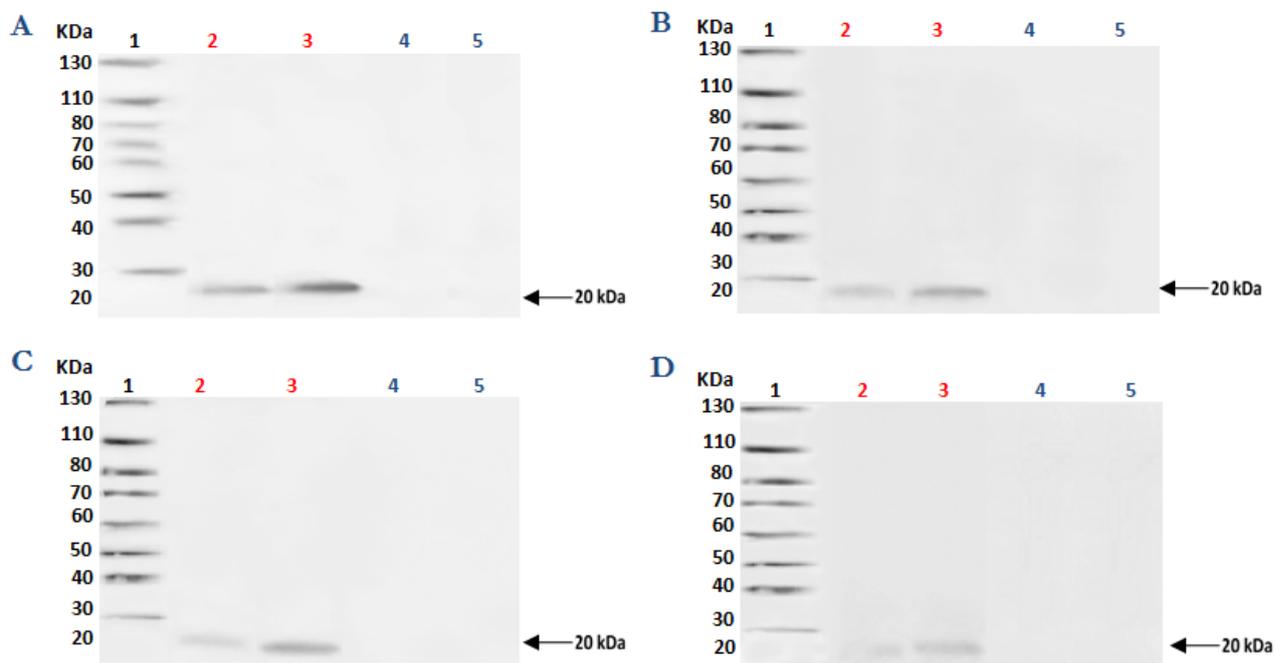


Fig. 10.1.41 Analisi di Western blotting della selenioproteina PHGPx eseguita su proteine totali (25 $\mu$ g) estratte da tessuti di *Podarcis sicula* nelle varie fasi del ciclo riproduttivo.

A: Testicolo  
 B: Encefalo  
 C: Fegato  
 D: Intestino

1 marker  
 2, 4 stasi riproduttiva  
 3, 5 massima attività gonadica

2, 3 anti-PHGPx  
 4, 5 anti-mouse IgG

L'analisi quantitativa densitometrica nei diversi tessuti di *Podarvis sicula* di ciascun blot (Fig.10.1.41), conferma una predominante espressione del PHGPx nel testicolo in piena attività spermatogenetica rispetto alla fase di stasi; l'intestino mostra la più scarsa attività di PHGPx nelle fasi del ciclo esaminate.

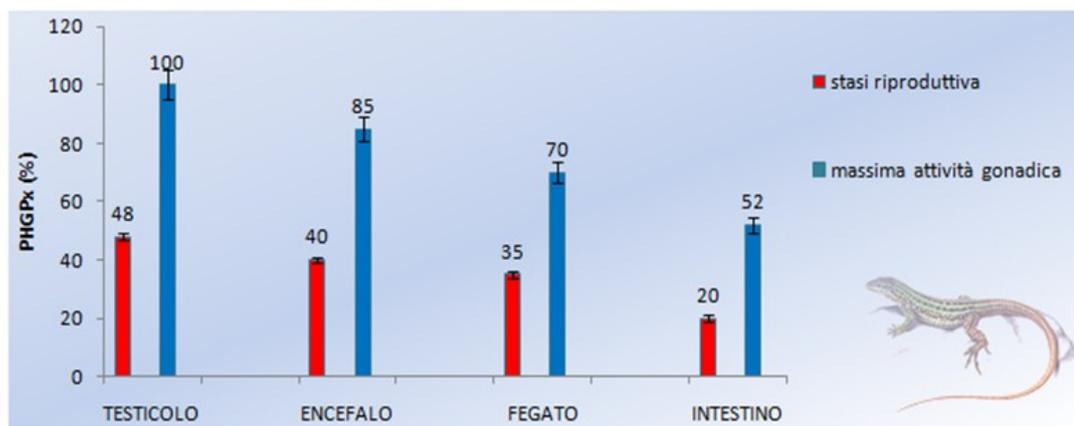


Fig. 10.1.41 Analisi quantitativa densitometrica di PHGPx nei tessuti di *Podarvis sicula*

## 10.2 ESPRESSIONE DEL PATTERN PROTEICO DI PHGPX DOPO TRATTAMENTI SPERIMENTALI

### Trattamento condotto durante la stasi riproduttiva

Al termine del trattamento sperimentale condotto durante la fase di stasi riproduttiva, gli animali sottoposti alle dosi giornaliere di HCG e gli animali di controllo trattamento ai quali, invece, è stata somministrata soluzione fisiologica, sono stati sacrificati dopo 24 hrs dall'ultima iniezione. L'aspetto generale del testicolo degli animali, dopo 21 giorni di trattamento con HCG, è tipico del periodo riproduttivo: nei tubuli seminiferi si notano tutti gli stadi della spermatogenesi con molti spermatozoi compatti. Anche l'epididimo si presenta ben sviluppato con cellule secernenti binucleate ed abbondante secreto e numerosissimi spermatozoi nel lume. Le analisi di Western blotting (Fig. 10.2.42), condotte su proteine totali estratte da un pool di testicoli di animali durante il trattamento sperimentale mostra una banda di circa 20 kDa, propria del PHGPx, con una maggiore immunoreattività nei testicoli stimolati dalla somministrazione di HCG.

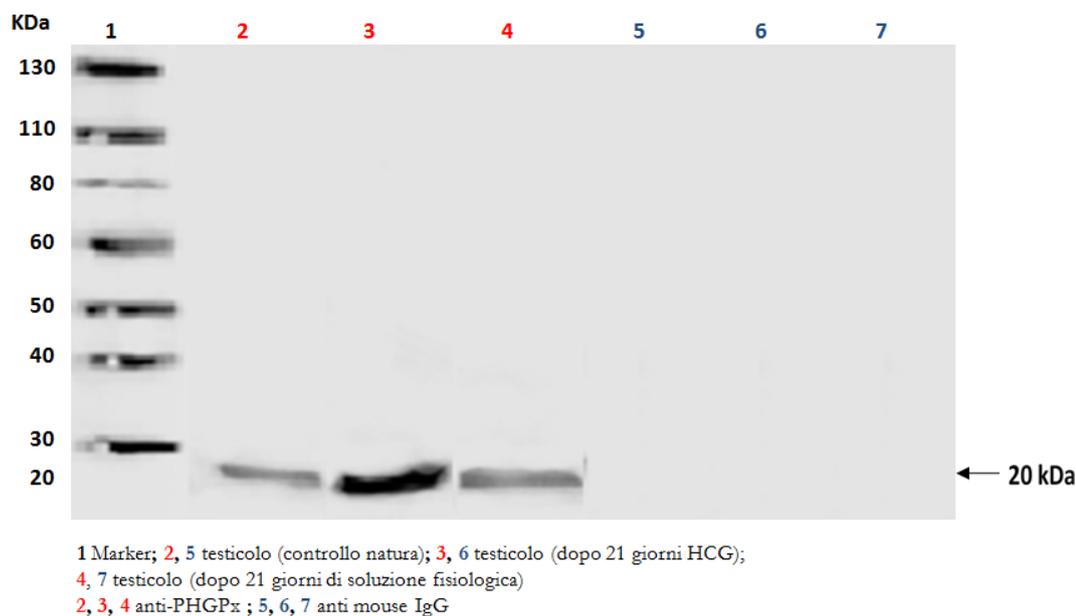


Fig. 10.2.42 Analisi di Western blotting della selenioproteina PHGPx eseguita su proteine totali (25µg) estratte da testicolo di *Podarcis sicula*

Trattamento condotto durante la massima attività gonadica

I prelievi degli animali trattati durante il periodo di massima attività gonadica sono avvenuti il 1°-2°-3° e 21° giorno dall'inizio del trattamento rispettivamente in numero di 3. Il prelievo degli animali di controllo è avvenuto il giorno dopo l'ultimo trattamento di *Podarcis sicula*. Nei tubuli seminiferi degli animali sottoposti a trattamento con ICI si riscontra una progressiva degenerazione a carico degli ultimi stadi della spermatogenesi. Dopo 21 giorni di trattamento la gonade presenta un aspetto tipico del periodo invernale. Anche nell'epididimo, completamente involuto, si nota una completa assenza di spermatozoi. L'analisi di Western blotting (Fig.10.2.43) mostra come il trattamento con l'anti-estrogeno ICI 182-780 induca una progressiva riduzione dell'immunoreattività di PHGPx.



1 Marker; 2, 8 testicolo (controllo in natura);  
 3, 9 testicolo (dopo 1 giorno ICI 182-780);  
 4, 10 testicolo (dopo 2 giorni ICI 182-780);  
 5, 11 testicolo (dopo 3 giorni ICI 182-780);  
 6, 12 testicolo (dopo 21 giorni ICI 182-780);  
 7, 13 testicolo (controllo 21 giorni dopo olio di mandorla);  
 2, 3, 4, 5, 6, 7 anti-PHGPx; 8, 9, 10, 11, 12, 13 anti mouse IgG

Fig. 10.2.43 Analisi di Western blotting della selenioproteina PHGPx eseguita su proteine totali (25µg) estratte da testicolo di *Podarcis sicula*

I risultati dei trattamenti sperimentali mettono in evidenza che, anche in *Podarcis sicula*, l'attività della selenioproteina PHGPx è strettamente correlata all'attività spermatogenetica. Sembra esserci, infatti, una dipendenza ormonale dell'espressione di PHGPx: il testosterone, nei mammiferi media l'espressione della PHGPx, in vivo, tramite l'induzione della spermatogenesi (Maiorino *et al.*, 1998); ma l'espressione di PHGPx negli organi riproduttori maschili può essere influenzata anche da estrogeni (Nam *et.*, 2003) e in particolare risulta che un basso livello di  $17\beta$  estradiolo sembra essere necessario per avviare la spermatogenesi. L'espressione del pattern proteico di PHGPx nel testicolo di *Podarcis sicula* in natura e dopo trattamenti sperimentali, rileva quindi che l'attività della selenioproteina è strettamente correlata all'attività spermatogenetica e avvalorata l'ipotesi che sia coinvolta per la biosintesi del testosterone.

### 10.3 ESTRAZIONE ED ANALISI DELL'RNA TOTALE

E' stato valutato per gli RNA totali estratti da testicolo di *Podarcis sicula* nelle varie fasi del ciclo riproduttivo, l' integrità e la purezza attraverso la corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% (Fig.10.3.44) e la valutazione del rapporto di densità ottica 260/280: per tutti i campioni analizzati è espressa una buona preparazione di RNA totale con una densità compresa tra 1,83 e 2,03 (Fig.10.3.45).

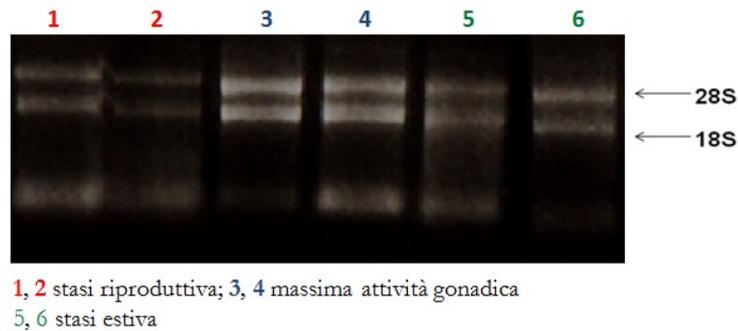


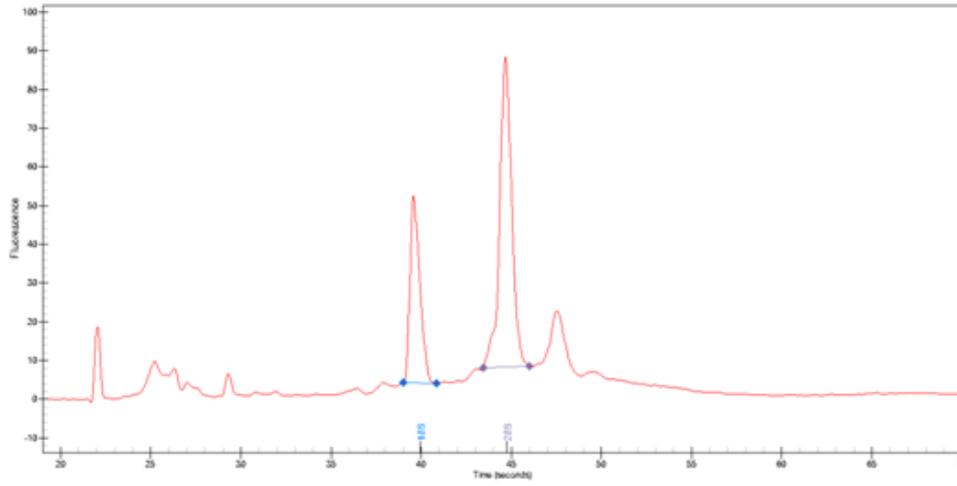
Fig. 10.3.44 Corsa elettroforetica degli estratti di RNA totale da testicolo di *Podarcis sicula*

	STASI RIPRODUTTIVA	MASSIMA ATTIVITÀ GONADICA	STASI ESTIVA
	TESTICOLO	TESTICOLO	TESTICOLO
A260/280	1,87	2,03	1,83

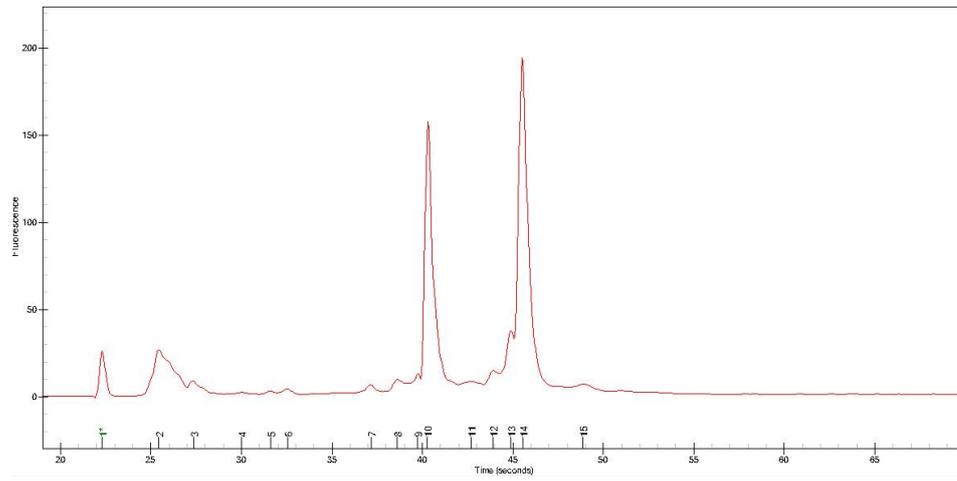
Fig. 10.3.45 Quantizzazione dell'RNA totale nel testicolo di *Podarcis sicula*

In Fig.10.3.46 sono forniti per i testicoli di *Podarcis sicula* delle varie fasi del ciclo riproduttivo gli elettroferogrammi generati dal *Experion HighSens LabChip* tramite esame degli RNA 18S/28S, i cui picchi indicano l'intensità della fluorescenza.

A



B



C

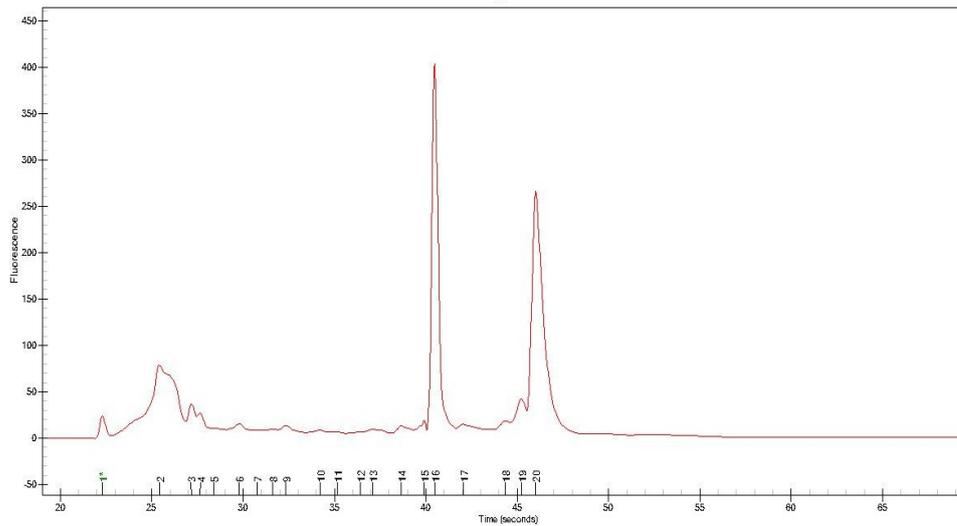


Fig. 10.3.46 Analisi qualitativa dell'estratto di RNA da testicolo di *Podarcis sicula*

**A:** stasi riproduttiva; **B:** massima attività gonadica; **C:** stasi estiva

#### 10.4 PCR RETROTRASCRIZIONALE (RT-PCR) & AMPLIFICAZIONE SU cDNA DEL GENE PHGPX

La reazione di trascrittasi inversa è stata eseguita utilizzando 5 µg di RNA totale in un volume finale di 20 µl, come da protocollo. Come controllo negativo, è stato usato l'RNA totale non trattato con Trascrittasi Inversa. L'integrità del cDNA sintetizzato è stata determinata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Fig.10.4.47), utilizzando come controllo interno la subunità 18S rRNA (~ 400 bp) di *Podarcis sicula* (senso 5'GGACACGGGAAAGGTTTGACA3' e antisenso 5'AGGGACTTAATCAACGCGAGC 3') (Verderame e Limatola, 2010).

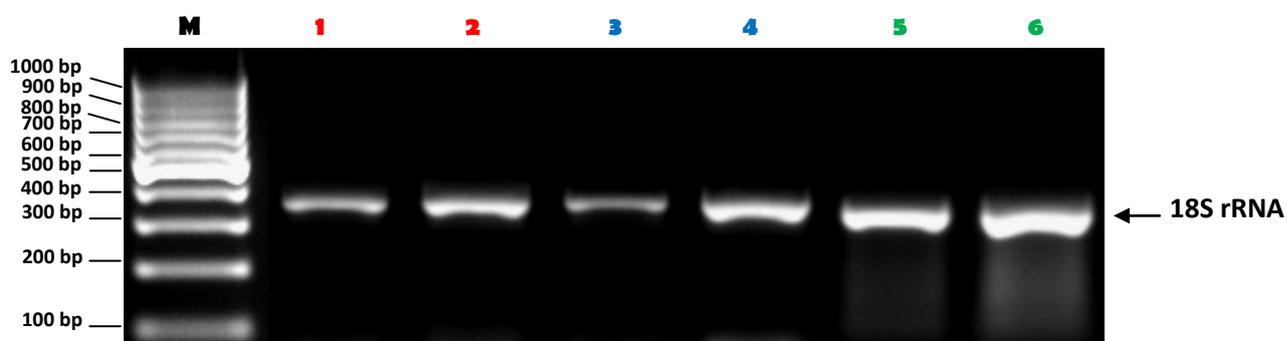


Fig. 10.4.47 Corsa elettroforetica del cDNA di testicolo in *Podarcis sicula*. M marker O'Gene Ruler 100bp (fermentas); 1, 2 stasi riproduttiva ; 3 ,4 massima attività gonadica; 5, 6 stasi estiva

Le PCR sono state condotte utilizzando come DNA stampo il cDNA a singola elica ottenuto dalla reazione di trascrizione inversa. Come innesco della reazione sono stati utilizzati i *primers* degenerati disegnati da Hudson *et al.*, sulla base dei motivi conservati in corrispondenza delle sequenze proteiche dei tre organismi, per amplificare il gene PHGPx nell'anfibio anuro *Cyclorana alboguttata*. La miscela di reazione delle PCR prevede: un'aliquota di cDNA a singola elica (2 µl); AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (APPLIED BIOSYSTEM) (0,2 µl); 50 µM di ciascuno dei primers citati; 2,5 mM (concentrazione finale) di dNTPs in Tris/HCl 10 mM pH8,3 contenente KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM. I prodotti delle amplificazioni di circa 340 bp sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% (Fig.10.4.48) in tampone TEB, con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 40 min a 80 Volts costanti; come indicatore di peso molecolare è stata usata una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto, mentre come controllo positivo la subunità 18S rRNA. Tramite *primers* degenerati realizzati sulle regioni maggiormente conservate del gene di PHGPx in *Danio rerio*, *Gallus gallus* e *Homo sapiens*, già validati nell'anuro *Cyclorana alboguttata*, è stato

ottenuto un amplicone omologo di cDNA parziale di circa 340 bp in *Podarcis sicula*, che suggerisce la conservazione nei vertebrati non mammiferi.

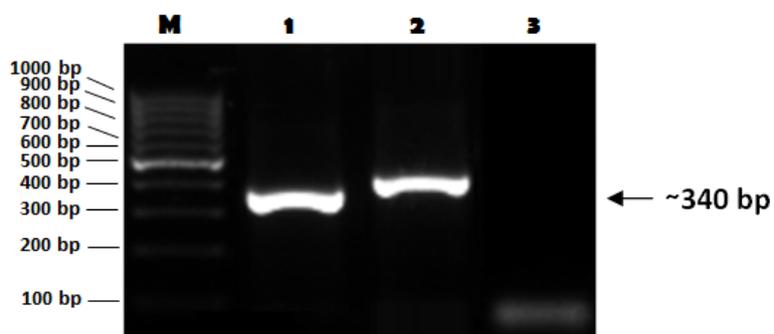


Fig. 10.4.48 Amplificazione del gene PHGPx nel testicolo di *Podarcis sicula*. M marker O'Gene Ruler 100bp (fermentas); 1 *Podarcis sicula* PHGPx; 2 18s rRNA (400 bp); 3 controllo negativo

## 10.5 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI PHGPX NELLE FASI PIÙ SIGNIFICATIVE DI SVILUPPO DEL TESTICOLO

L'analisi dell'espressione di PHGPx è stata condotta a carico dell'RNA messaggero mediante RT-PCR semiquantitativa nelle fasi più significative dell'attività spermatogenetica di *Podarvis sicula* (stasi riproduttiva, massima attività gonadica e stasi estiva). Per lo studio dell'espressione dei messaggeri è stata utilizzata la coppia di *primers* descritta, ottenendo un frammento di circa 340 bp. Al fine di normalizzare la quantità di trascritto per PHGPx le intensità relative di amplificato sono state rapportate all'intensità del segnale costante di un gene *housekeeping* 18S rRNA, assumendo che le condizioni sperimentali non ne alterassero i livelli d'espressione. I prodotti di PCR sono stati così analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%, fotografati, quindi le bande ottenute densitometrate mediante *Quantity One® 1-D Analysis Software Bio-Rad* (Fig.10.5.49)

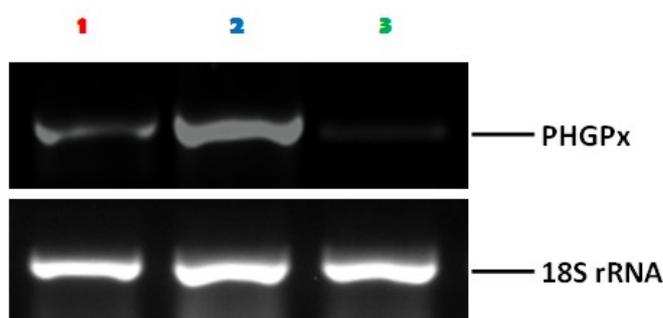


Fig. 10.5.49 Amplificazione dei geni PHGPx e 18S rRNA nel testicolo di *Podarvis sicula*. 1 stasi riproduttiva; 2 massima attività gonadica; 3 stasi estiva

Poiché l'intensità del segnale è proporzionale al numero di copie del *target*, le diverse concentrazioni sono state così determinate; quindi ogni valore di densità ottica è stato normalizzato con lo *standard* ed ogni esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte. I livelli relativi di espressione di mRNA sono definiti come  $100 \times \text{GPx4}/18\text{SrRNA}$  (Fig.10.5.50).

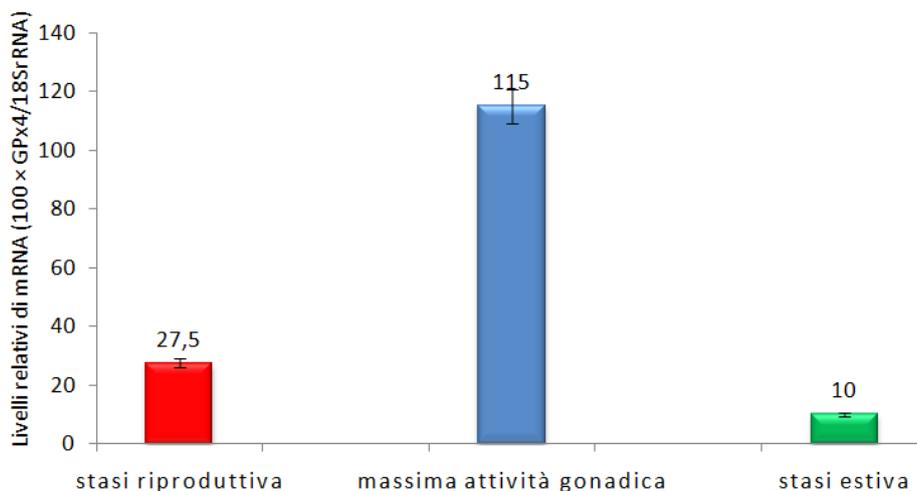


Fig. 10.5.50 Valutazione del livello di espressione di PHGPx condotto in varie fasi di sviluppo del testicolo di *Podarcis sicula* (MEDIA  $\pm$  S.D. ;P<0,05)

I risultati ottenuti dimostrano che l'espressione testicolare di PHGPx, nel ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, aumenta nella massima attività gonadica e diminuisce drasticamente nella stasi estiva. I differenti livelli di espressione di mRNA fanno ipotizzare che la selenioproteina PHGPx possa giocare un ruolo antiossidante anche nella spermatogenesi di *Podarcis*. Il crollo di espressione di PHGPx nella stasi estiva, quando la gonade di *Podarcis sicula* entra in regressione, làdove nei tubuli seminiferi sono presenti solo spermatogoni e cellule del Sertoli, suggerisce che l'attività spermatogenetica possa essere inattiva per l'assenza dell'architettura della capsula mitocondriale che contiene la maggior parte del selenio incorporato come residuo di selenocisteina nella PHGPx (Maiorino *et al.*, 2005).

## 10.6 SEQUENZIAMENTO NUCLEOTIDICO E AMINOACIDICO DI UN FRAMMENTO PARZIALE DI cDNA CODIFICANTE IL GENE PHGPX

I frammenti amplificati sono stati successivamente purificati mediante il “PCR DNA Purification Kit” (Qiagen, Italia). I prodotti purificati, per la fase di sequenziamento sono stati sottomessi al Servizio di Sequenziamento (Primm srl). La sequenza grezza ottenuta è stata processata con il programma *BioEdit ver. 7.0.8* (Fig.10.6.51): questo software ha eliminato gli estremi non utilizzabili delle sequenze ed ha minimizzato la presenza di basi dubbie e fissato lunghezze uniformi.

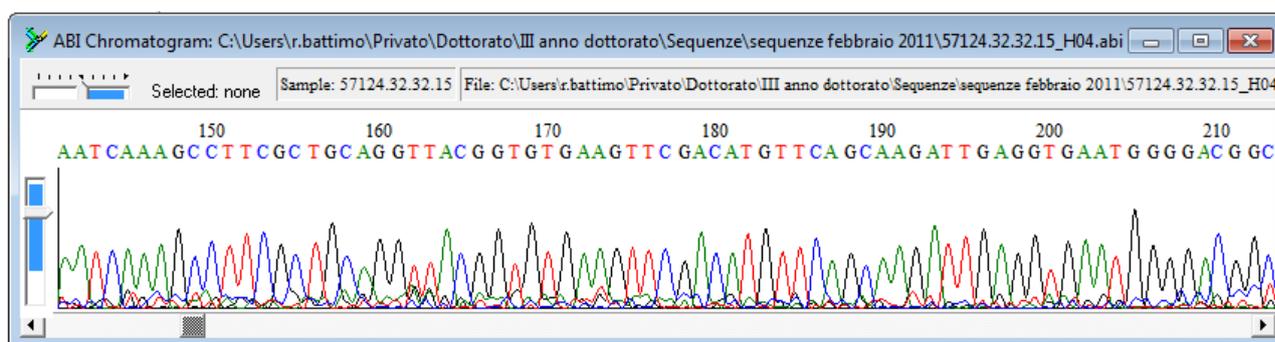


Fig. 10.6.51 Elettroferogramma della sequenza nucleotidica del cDNA di PHGPx in *Podarcis sicula*

Completato il “progetto” di sequenziamento si è proceduto alla fase di annotazione ovvero di determinazione dei relativi prodotti di espressione come l’ mRNA, attraverso la determinazione di “Open Reading Frames” (ORFs) sufficientemente lunghe. La sequenza nucleotidica in input del cDNA di PHGPx in *Podarcis sicula* è stata inserita nel programma *ORF Finder* disponibile presso il sito NCBI che ha ricercato ORFs in tutte e sei le *frame* di lettura della sequenza (Fig.10.6.52). La Figura rappresenta il risultato di *ORF Finder* sull’ mRNA codificante per la proteina PHGPx in *Podarcis sicula*. Come si può notare la ORF funzionale, che corrisponde alla più lunga sequenza aminoacidica, è riportata in viola; le altre ORFs anche piuttosto lunghe si osservano nelle altre *frame* di lettura. Per analizzare l’ mRNA sono stati considerati nella strategia di predizione metodi comparativi attraverso analisi comparative con il gene noto di PHGPx depositato nei *database* informatici in altri organismi filogeneticamente correlati.

Per analizzare l'mRNA sono stati considerati nella strategia di predizione metodi comparativi attraverso analisi comparative con il gene noto di PHGPx depositato nei *database* informatici in altri organismi filogeneticamente correlati.

**NCBI ORF Finder (Open Reading Frame Finder)**

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

Anonymous

Program: blastp Database: nr BLAST  with parameters Cognitor

View 1 GenBank Redraw 100 SixFrames

Frame	from	to	Length
+3	33..260	229	
-2	60..260	201	
+1	4..153	150	
-3	143..259	117	

Length: 76 aa

Accept ATG Initiation Codon

```

33 ttgtacagcagatagctgagagagcttbaagcattctggggttc
  L Y S R Y A E R A L R I L G F
78 cectgtaaccagtttggcaagcaggagccgggcaaccaagaggaa
  P C N Q F G K Q E P G T N E E
123 atcaaaagccttcgctgcaggttacggtgtgaagttcgacatgttc
  I K A F A A G Y G V K F D M F
168 agcaagattgaggtgaatggggacggcgcacccccctctggaag
  S K I E V N G D G A H P L W K
213 tggatgaaagagccagcccaaggccgggggagctgggcaacgcc
  W M K S Q P K G R G T L G N A
258 atca 261
  I
    
```

Fig. 10.6.52 ORF Finder: sei possibili fasi di lettura della sequenza di PHGPx in *Podarcis sicula* (in direzione 5'→3' e 3'→5')

## 10.7 ALLINEAMENTO COMPARATIVO DELLA SEQUENZA NUCLEOTIDICA E AMINOACIDICA DEDOTTA DI PHGPx CON LE SEQUENZE DEL GENE PRESENTE NEI BASSI VERTEBRATI

Sulla base della sequenza nucleotidica, è stata dedotta la sequenza aminoacidica. Per poter stabilire il grado di identità tra le varie sequenze di PHGPx, sia la sequenza nucleotidica che quella aminoacidica sono state allineate con le sequenze codificanti complete di bassi vertebrati. La sequenza codificante una proteina di 76 aminoacidi (aa) di PHGPx in *Podarcis sicula*, è stata allineata con diverse sequenze depositate in banca dati per effettuare ricerche di similarità. Gli allineamenti condotti (Tab.4) hanno rivelato un range di identità nucleotidica compreso tra il 71 e l'85% nell'ambito dei vertebrati non mammiferi e tra il 76 e il 79% nell'ambito dei vertebrati mammiferi. Anche la sequenza aminoacidica dedotta di PHGPx è stata confrontata alle altre sequenze disponibili in Banca dati, rivelando un range d'identità compreso tra il 68 e il 92% nell'ambito dei vertebrati non mammiferi e tra il 79 e l'83% tra i vertebrati mammiferi. E' interessante notare come la più bassa identità nucleotidica sia a livello dei pesci mentre sia il gene che la proteina rivelano un alto grado di identità nucleotidica ed aminoacidica con i rettili.

Tab.4 Identità nucleotidica (nt) ed aminoacidica (aa) espressa in percentuale tra PHGPx di *Podarcis sicula* e di altri organismi

	PHGPx	% identità nt*	Lunghezza cds (nt)	% identità (aa)	Residui aa	ID accesso (NCBI)
<b>Vertebrati non mammiferi</b>	<i>M. gallopavo</i>	81	477	86	158	XM_003213259
	<i>A. carolinensis</i>	85	270	82	89	XM_003230768
	<i>C. alboguttata</i>	76	283	80	94	EF080965
	<i>X. laevis</i>	76	590	79	195	NM_001171744
	<i>X. tropicalis</i>	77	209	68	69	XM_002937378
	<i>D. rerio</i>	74	560	68	186	NM_001007282
	<i>I. punctatus</i>	73	338	82	112	NM_001200688
	<i>O. niloticus</i>	71	560	75	186	XM_003439869
	<i>C. carpio</i>	76	496	80	165	FJ65212
<b>Vertebrati mammiferi</b>	<i>H. sapiens</i>	79	593	83	197	NM_002085
	<i>M. mulatta</i>	79	594	83	197	NM_001118889
	<i>B. taurus</i>	76	593	80	197	NM_174770
	<i>S. scrofa</i>	76	593	80	197	NM_214407
	<i>M. musculus</i>	76	761	80	252	NM_001037741
	<i>R. norvegicus</i>	76	593	79	197	NM_017165

\* L'identità nucleotidica è riferita alle sequenze codificanti (cds)

La sequenza nucleotidica del trascritto del frammento sequenziato in *Podarcis sicula* segnala con *Anolis carolinensis* (XM\_003230768) la più alta matrice di identità pari al 85% (Fig.10.7.53).

```
>  ref|XM_003230768.1|  PREDICTED: Anolis carolinensis phospholipid hydroperoxide glutathione
peroxidase, mitochondrial-like (LOC100563257), partial
mRNA
Length=270

GENE ID: 100563257 LOC100563257 | phospholipid hydroperoxide glutathione
peroxidase, mitochondrial-like [Anolis carolinensis]

Score = 178 bits (196), Expect = 2e-42
Identities = 134/158 (85%), Gaps = 0/158 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 102 GAGCCGGGCACCAACGAGGAAATCAAAGCCTTCGCTGCAGGTTACGGTGTGAAGTTCGAC 161
          ||||| ||||| | | ||| ||||| ||||| || | | ||||| ||||| |||||
Sbjct 1   GAGCCGGGCACCGAGGCGGACATCAAGGCCTTTGCGGCGGGCTACGGGTGAAGTTCGAC 60

Query 162 ATGTTTCAGCAAGATTGAGGTGAATGGGGACGGCGCCACCCCTCTGGAAGTGGATGAAG 221
          ||||| ||||| ||||| || || ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 61  ATGTTTCAGCAAGATTGAAGTCAACGGGGAGGGTGCCACCCGCTCTGGAATGGATGAAG 120

Query 222 AGCCAGCCCAAAGGCCGGGGGACGCTGGGCAACGCCAT 259
          ||||| ||||| ||| ||||| || ||||| ||||| |||
Sbjct 121 AGCCAGCCCAAAGGCCAGGGGCACCCTGGGAAACGCAAT 158
```

Fig. 10.7.53 Allineamento delle sequenze nucleotidiche della selenioproteina PHGPx di *Podarcis sicula* e di *Anolis carolinensis*

Gli allineamenti aminoacidici multipli sono restituiti dal software CLUSTALW (Fig.10.7.54). Negli allineamenti si sono immediatamente individuate alcune caratteristiche peculiari nella composizione amminoacidica delle diverse regioni strutturali. Secondo il programma PSORT II, con il punteggio “NNCN” di 94,1% stabilito da Hicks e Raikhel, calcolato sulla base della composizione amminoacidica, la proteina PHGPx in *Podarcis sicula* è localizzata a livello subcellulare nel citoplasma. L’allineamento multiplo di sequenze omologhe stabilisce l’appartenenza di PHGPx alle selenioproteine e la sua valenza come antiossidante per la conservazione degli aminoacidi della tetraide catalitica *triptofano* (W), *glutamina* (Q), *asparagina* (N). Per facilitare la lettura dell’allineamento multiplo ed evidenziare rapidamente i blocchi aminoacidici conservati, eventuali somiglianze/differenze sono state mostrate con il programma JalView (Fig.10.7.55) con l’indicazione della conservazione dei residui, della qualità di questa conservazione e della sequenza *consensus*.

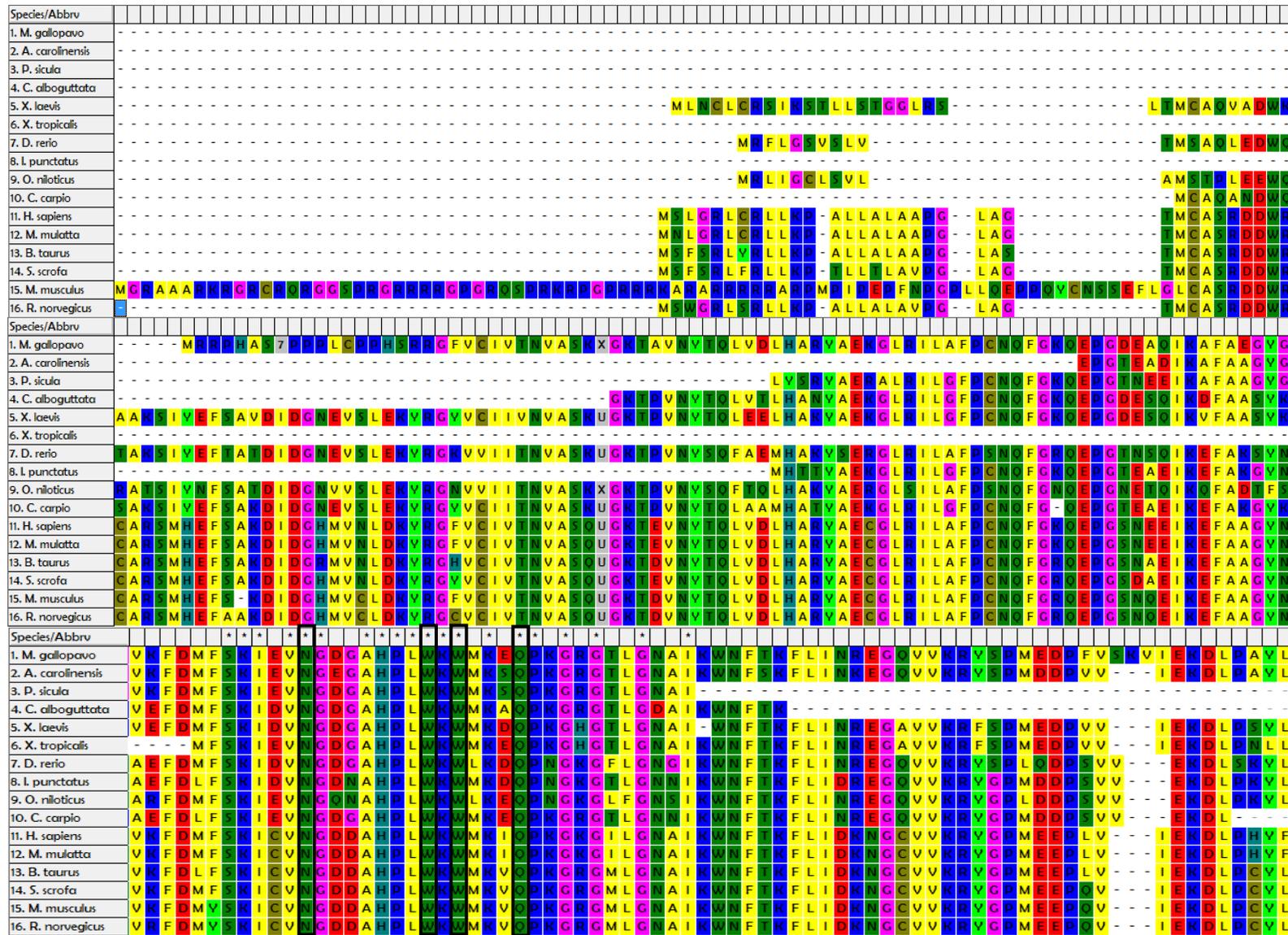


Fig. 10.7.54 Allineamenti delle sequenze aminoacidiche complete di PHGPx, depositate in Banca dati con il software ClustalW



Un approccio comunemente utilizzato nella predizione di funzione si basa sul concetto che proteine con sequenze simili molto spesso mostrano funzioni simili. Per l'identificazione di ortologhi sono state consultate risorse di annotazioni funzionali e risorse che raggruppano sequenze di domini in famiglie evolutivamente relate. Per analizzare i *pattern* creati sulle sequenza aminoacidica di *Podarcis sicula* è stato utilizzato il programma ScanProsite, che confronta un *pattern* inserito con il database proteico di *Swiss-Prot* e *TrEMBL*, dando come *output* le sequenze contenenti frammenti che soddisfano le caratteristiche del *pattern*. Mentre in alcuni casi un *consensus* può mostrare in una certa posizione il "residuo più rappresentato", il *pattern* non perde informazione in quanto normalmente descrive tutti i residui presenti nella posizione.

Da un'analisi sulle banche dati ScanProsite e SMART cinque corrispondono a *pattern* proteici conosciuti (Tab.5):

- *Glutazione Perossidasi*: selenoenzima che catalizza la reazione degli idroperossidi ( $H_2O_2$  o ROOH) con la presenza di Glutazione (GSH) per la difesa dai danni dei radicali liberi (Bhabak e Muges, 2010).
- *Proteinchinasi II (CK-2)*: enzima con attività costitutiva, riveste un ruolo molto importante, poichè fra i suoi numerosi substrati molti sono coinvolti in processi chiave della vita cellulare, come la regolazione del metabolismo, la traduzione del segnale, la proliferazione e l'apoptosi (Ren *et al.*, 2011).
- *Sito di N-Miristilazione (Myr)*: la miristilazione consiste nel legame di molecole di acido miristico a residui di glicina posti all'N-terminale della proteina; questo si verifica poichè l'acido miristico è sufficientemente idrofobico da essere incorporato all'interno del doppio strato di fosfolipidi della membrana cellulare delle cellule eucariotiche (Cao *et al.*, 2011).



Tab.5 Analisi bioinformatica dei *pattern* proteici di PHGPx in *Podarvis sicula*

<b>Pattern</b>	<b>Residui aa</b>	<b>ID accesso</b>
<b>GLUTATHIONE_PEROXID_3</b>	<b>1-76</b>	<b>PS51355</b>
<b>GLUTATHIONE_PEROXID_2</b>	<b>13-20</b>	<b>PS00763</b>
<b>CK2_PHOSPHO_SITE</b>	<b>27-30 46-49</b>	<b>PS00006</b>
<b>MYRISTYL</b>	<b>70-75</b>	<b>PS00008</b>

Attraverso il database (CDD) di NCBI (Fig.10.7.56) è stato possibile definire la superfamiglia dei domini proteici strutturali e funzionali derivati da allineamenti multipli di sequenze in putative famiglie evolutive. La sequenza nucleotidica del trascritto di PHGPx in *Podarvis sicula* allineata in banca dati, segnala la sua appartenenza alla superfamiglia delle Tiorredossine (TRXs). All'interno della superfamiglia è stato possibile tuttavia annoverare alcune grandi biomolecole quali le proteine Glutazione Perossidasi (CD00340); in particolare il membro delle selenioproteine PHGPx (PLN02399). Gli enzimi impegnati ad assicurare lo stato redox intracellulare appartengono alla superfamiglia delle tiorredossine di cui fanno parte le proteine responsabili della formazione dei ponti disolfuro. Le proteine contenenti gruppi cisteinici ad attività ditiolo-disolfuro ossido reduttasi giocano un ruolo chiave nei processi di regolazione redox. Le tiorredossine vengono considerate infatti, le principali fonti di attività disolfuro reduttasica responsabile del mantenimento dello stato ridotto delle proteine all'interno della cellula. A questo proposito l'esempio meglio studiato è quello di PHGPx che, durante la spermatogenesi, quando diminuiscono i livelli di GSH nello spermatozoo, cambierebbe substrato riducente, usando i residui di cisteina adiacenti della SMCP ("Sperm Mitochondrion Associated Cystein Rich Proteins" al posto del GSH. Questa reazione di ossidazione sarebbe funzionale alla maturazione dello spermatozoo (Maiorino *et al.*, 2005).

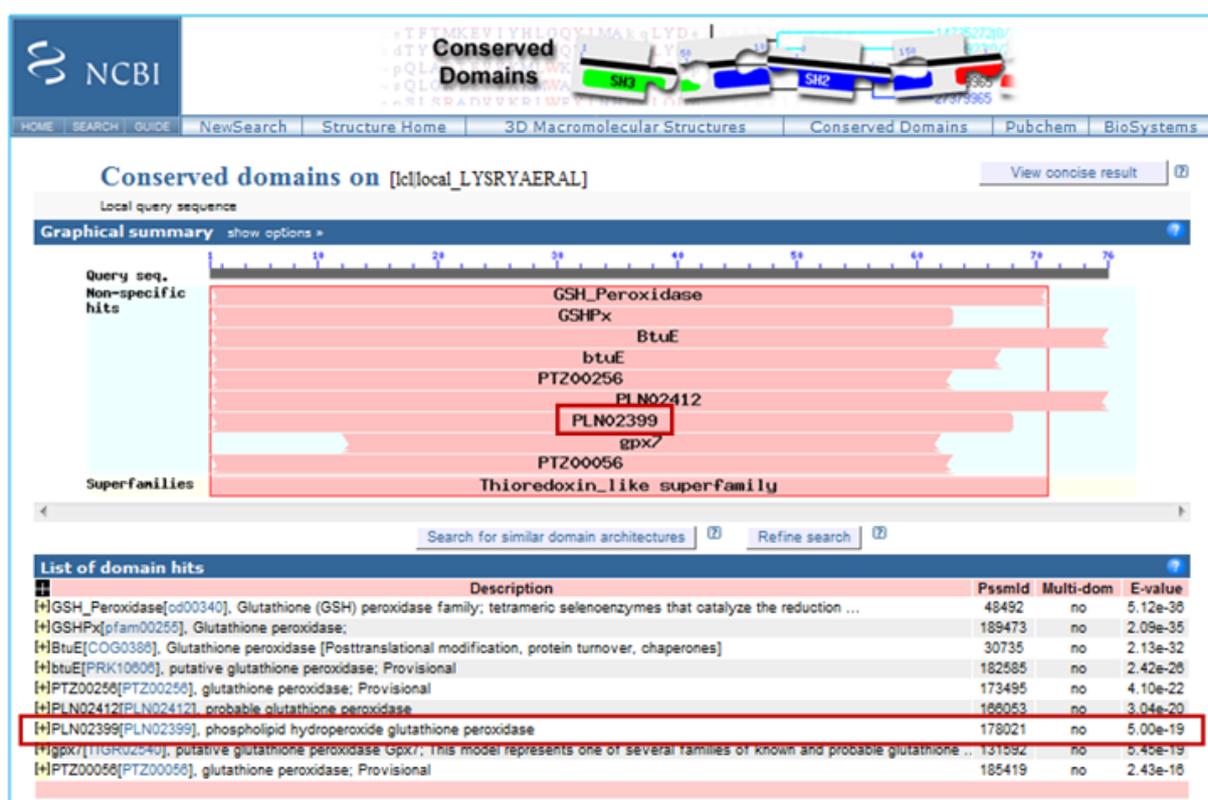


Fig.10.7.57 Analisi dei domini proteici “Conserved Domain Database” (CDD) di PHGPx in *Podarvis sicula*

Il metodo PSI-PRED ha permesso di predire gli elementi di struttura secondaria della proteina. E' un metodo di terza generazione, che raggiunge un'accuratezza di predizione del 77% utilizzando informazioni evoluzionistiche sulla famiglia di proteine omologhe e nell'utilizzare un sistema per la predizione della struttura secondaria. La struttura secondaria è una caratteristica della catena polipeptidica che costituisce un primo passo per la classificazione di una proteina e il *modelling*. Esistono due elementi di struttura secondaria che ricorrono più frequentemente:  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -strand e in generale circa il 50% dei residui di una proteina si trova strutturato in queste conformazioni. I residui che non sono impegnati in strutture secondarie  $\alpha$  o  $\beta$  costituiscono le regioni di ripiegamento casuale (*random coil* e *loop*). E' quindi possibile distinguere tre classi di elementi di struttura secondaria:  $\alpha$ -elica (H), filamento  $\beta$  (E=extended) e *coil/loop* (C).

Il metodo di predizione di struttura secondaria PSI-PRED ha predetto (Fig.10.7.58):

- tre  $\alpha$ -elica rispettivamente nelle regioni aa. 2-7; 28-37; 57-64;
- due filamenti  $\beta$  rispettivamente nelle regioni aa. 11-14; 48-50;
- residui aminoacidi non strutturati *coil*.

La struttura mostra il tipico motivo a tioredossina dotato degli elementi di struttura secondaria  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -sheet. Le Tioredossine presentano una struttura tridimensionale simile, infatti contengono tutte il “*thioredoxin domain*” costituito da un core centrale di cinque  $\beta$ - foglietti circondati da quattro  $\alpha$ -eliche (Scheerer *et al.*, 2010).

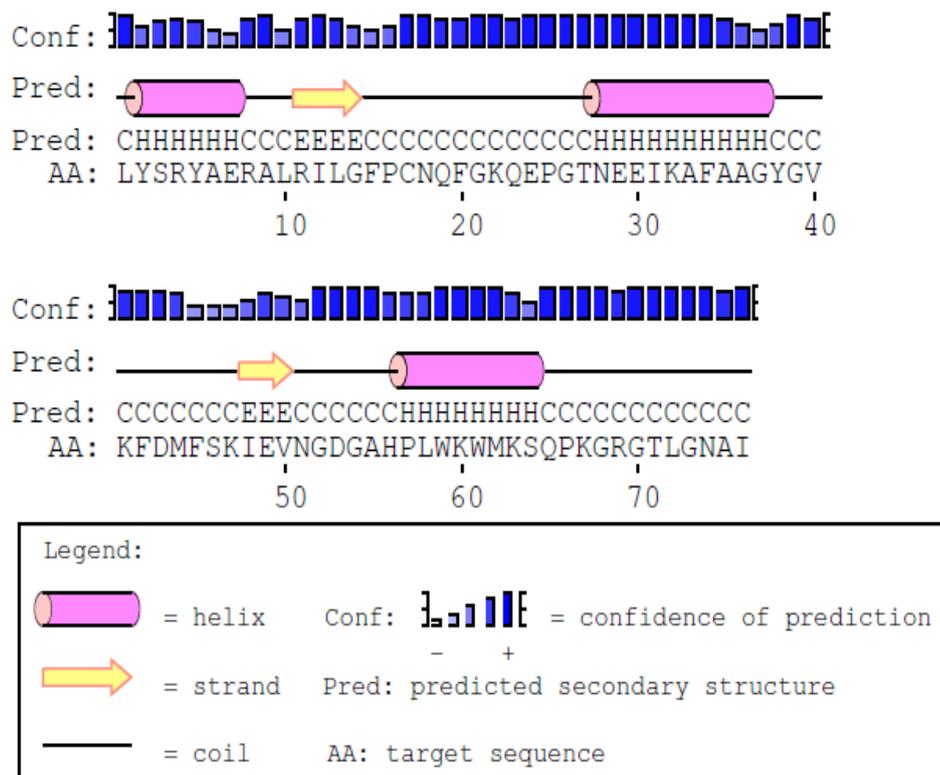


Fig. 10.7.58 Predizione della struttura secondaria “PSI-PRED” di PHGPx in *Podarcis sicula*

L’analisi di predizione della struttura secondaria è proseguita con l’utilizzo del server JPred per l’assenza di una struttura sperimentale. Il software applica diversi metodi di predizione sulla

sequenza di *input* e dal confronto pesato con i vari *output* fornisce una predizione definita struttura *consensus*. JPred ha costruito allineamenti multipli per ottenere predizioni più accurate fornendo informazioni strutturali e funzionali riguardo la proteina di interesse. L'analisi di predizione eseguita con la banca dati *Protein Data Bank* (PDB) mostra come la sequenza della proteina sconosciuta sia omologa, con un *e-value* significativo ( $E \leq 1 \cdot 10^{-3}$ ), all'isoforma mitocondriale umana di PHGPx [10] con una percentuale di identità pari all'82% (Fig.10.7.59).

```
>2obi_A mol:protein length:183 Phospholipid hydroperoxide glutathione
      peroxi
      Length = 183

Score = 135 bits (341), Expect = 1e-32
Identities = 63/76 (82%), Positives = 67/76 (88%)

Query: 1  LYSRYAERALRILGFPCNQFGKQEPGTNEEIKAFAGYGVKFDMFVKIEVNGDGAHPLWK 60
          L++RYAE LRIL FPCNQFGKQEPG+NEEIK FAAGY VKFDMFSKI VNGD AHPLWK
Sbjct: 72  LHARYAECGLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKEFAAGYNVKFDMFSKICVNGDDAHPLWK 131

Query: 61  WMKSQPKGRGTLGNAI 76
          WMK QPKG+G LGNAI
Sbjct: 132 WMKIQPKGKGILGNAI 147
```

Fig. 10.7.59 Allineamento della sequenza proteica di PHGPx di *Podarcis sicula* e di *Homo sapiens*

La struttura secondaria della catena polipeptidica target (Fig. 10.7.60) lunga 165 residui aminoacidici è rappresentata da:

- 21,2%  $\alpha$ -elica;
- 7,9% 3-10 elica;
- 18,8% filamenti  $\beta$ ;
- 52,1% residui aminoacidi non strutturati *coil*.

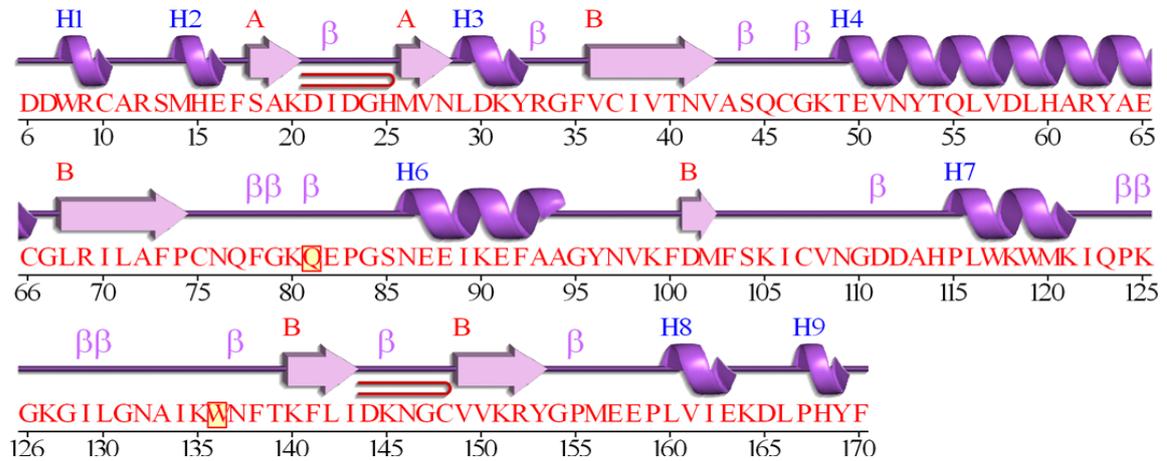


Fig. 10.7.60 Struttura secondaria dell'isoforma mitocondriale umana di PHGPx

La struttura a cristallo mostra come gli aminoacidi che compongono la triade catalitica Gln81 (Q) e Trp136 (W) (Fig.10.7.61) siano esposti sulla superficie della proteina in maniera da avere un'interazione con i monomeri adiacenti e catalizzare la riduzione di un ampio spettro di idroperossidi, ma anche di accettare diversi tipi di tioli come riducenti (compresi i di-tioli): rilevante è la capacità di PHGPx di ossidare tioli proteici nelle fasi finali della spermatogenesi.

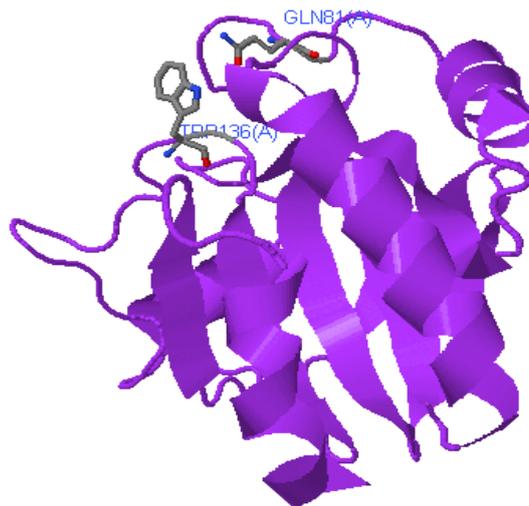


Fig. 10.7.61 Struttura tridimensionale dei residui aminoacidici Gln81 e Trp136

## 10.8 ANALISI FILOGENETICA

Dopo aver fatto gli allineamenti delle sequenze aminoacidiche, è stato costruito un albero filogenetico (Fig.10.8.62) usando l'algoritmo *Neighbor Joining* esportando i dati da CLUSTALW (MEGA5). Sulla base della relazione filogenetica stimata per le sequenze di PHGPx nei vertebrati, si conferma una relativa divergenza tra le sequenze di PHGPx nei vertebrati non mammiferi e mammiferi. Gli aminoacidi che compongono la triade catalitica, *triptofano* (W), *glutamina* (Q), *asparagina* (N) sono conservati in tutte le specie suggerendo un'attività conservata dal punto di vista evolutivo. Le ipotesi filogenetiche ricostruite dalle sequenze identificano tre gruppi monofiletici rappresentati da un ancestore comune (*Anolis carolinensis*, *Podarcis sicula*, *Cyclorana alboguttata*, *Meleagravis gallopavo*, *Cyprinus carpio*, *Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*; *Ictalurus punctatus*, *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*; *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*). I rettili raggruppano insieme in un *cluster* che è il *sister group* del clade formato da *M. gallopavo* e l'isoforma GPx4b di *C. carpio*. I nostri risultati sulle sequenze aminoacidiche omologhe disponibili presso banche dati hanno suggerito che le regioni conservate contengono informazioni filogenetiche sufficienti per dedurre relazioni evolutive all'interno di singoli gruppi.

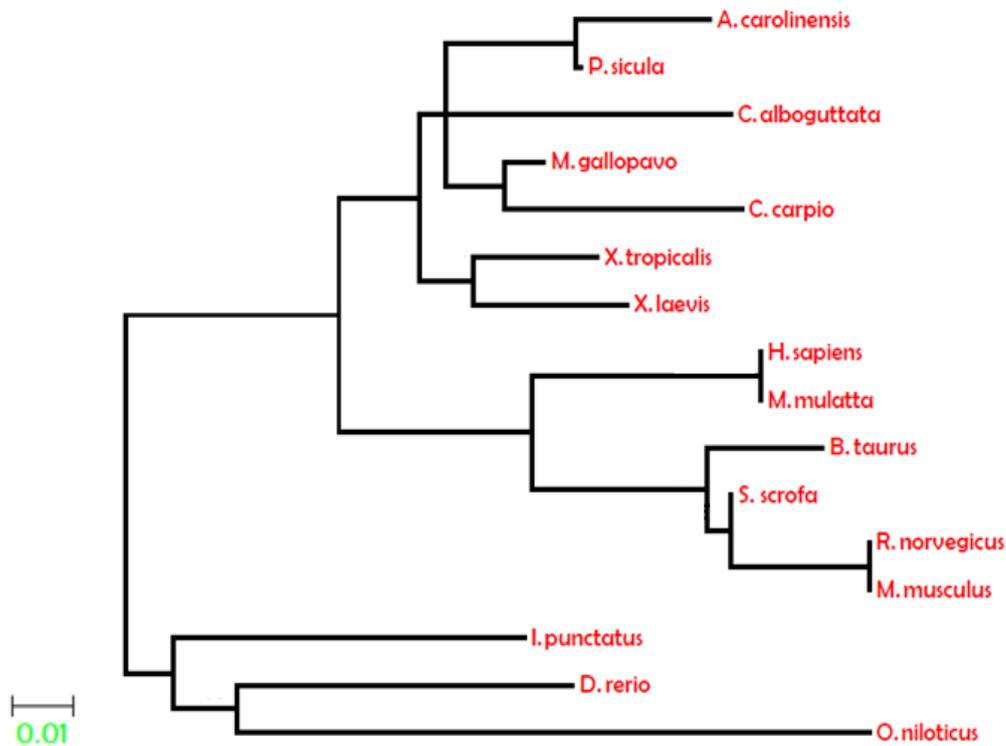


Fig. 10.7.62 Analisi filogenetica *Neighbor Joining* (MEGA5) di PHGPx nei vertebrati

Nel dettaglio, è stato costruito un albero *unrooted* (Fig.10.8.63) che descrive esclusivamente le relazioni evolutive tra i vertebrati non mammiferi e *Homo sapiens*: conoscendo la matrice di distanze a coppie fra le sequenze omologhe (Tab.6), i livelli di divergenza rilevati tra le dieci sequenze dei vertebrati non mammiferi e *H. sapiens* sono compresi tra 0,030 e 0,333. Nell'ambito dei vertebrati non mammiferi i livelli di divergenza calcolati per *P. sicula* sono compresi tra 0,030 e 0,273: la minima distanza evolutiva è con *M. gallopavo* e *A. carolinensis* ben diversamente dalla significativa distanza con *O. niloticus*. La sequenza di PHGPx in *H. sapiens* è filogeneticamente più vicina a *M. gallopavo*, *P. sicula*, *X. laevis*, *X. tropicalis*, mentre è più distante con *O. niloticus*.

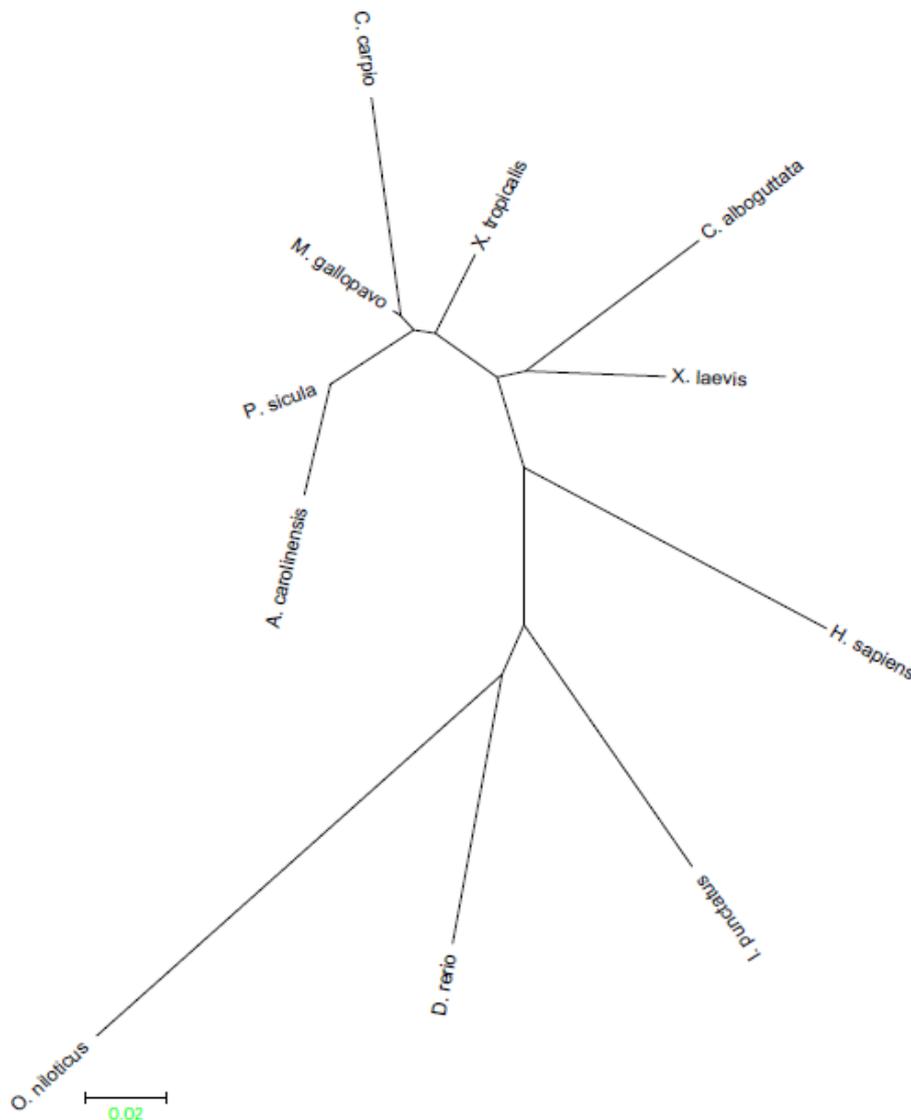


Fig. 10.7.62 Analisi filogenetica *Neighbor Joining* (MEGA5) di PHGPx nei vertebrati non mammiferi e *Homo sapiens*

L'analisi filogenetica delle sequenze aminoacidiche di PHGPx si inserisce in un contesto molto più complesso che tende a ricostruire le relazioni filogenetiche nell'ambito della superfamiglia delle Glutazione Perossidasi (GPxs). Nei vertebrati i geni delle famiglie delle glutazione perossidasi si sono evoluti attraverso processi di duplicazione genica da un gene ancestrale comune probabilmente correlato alla sequenza di PHGPx. Dopo il primo evento di duplicazione genica nei vertebrati, questo gene ancestrale si è differenziato in due gruppi: il primo si è evoluto nelle sequenze di PHGPx, il secondo ha prodotto i gruppi di GPx1, GPx2, GPx7 e i *clusters* GPx3, GPx5, GPx6. Il *cluster* delle sequenze degli animali di PHGPx, unitamente a quelle delle piante e dei funghi suggerisce l'esistenza di una convergenza evolutiva. Tuttavia, la rigorosa conservazione del sito catalitico delle glutazione perossidasi suggerisce che il precursore di questo clade era già presente nelle cellule ancestrali prima della divergenza tra vertebrati ed invertebrati.

Nell'ambito dei bassi vertebrati l'analisi dei residui aminoacidici che risultano conservati, segnala l'appartenenza di PHGPx alle selenioproteine indicandone indirettamente una sua valenza come antiossidante.

## CONCLUSIONI

Nei mammiferi, il ruolo della selenoperossidasi PHGPx è ben documentato in letteratura a partire dalla sua scoperta nel 1981. Questo enzima infatti, tramite la catalisi di una reazione "antiossidante" che porta alla riduzione di perossidi a spese di gruppi SH, gioca un ruolo chiave nel modulare la biosintesi degli eicosanoidi, l'espressione delle molecole di adesione, l'apoptosi e gli aspetti finali della differenziazione durante la spermatogenesi. PHGPx condivide con le altre Glutathione Perossidasi il meccanismo catalitico, che comprende l'ossidazione, in presenza di un idroperossido, del selenolato del sito attivo a derivato dell'acido selenenico, la riduzione di questo da parte del glutathione con formazione di un selenodisolfuro e quindi la rigenerazione dell'enzima nativo da parte di una seconda molecola di cosubstrato riducente. Tra le Glutathione Perossidasi, la PHGPx è la meno specifica; non solo riduce un ampio spettro di idroperossidi, ma anche accetta diversi tipi di tioli come riducenti (compresi i di-tioli). Particolarmente rilevante appare la capacità della PHGPx di ossidare tioli proteici nelle fasi finali della spermatogenesi. Il gene della PHGPx è composto da otto esoni che, a seconda delle specie, sono distribuiti su 3 - 4 kb di DNA. È trascritto in mRNA di diversa lunghezza che danno origine a tre diverse isoforme che indirizzano la proteina in diversi compartimenti e che differiscono per la loro estensione N-terminale: un mRNA citosolico, uno mitocondriale e uno nucleare. Misurazioni effettuate con la tecnica della real time PCR hanno rivelato che i tre mRNA sono ubiquitari nelle cellule e che nel testicolo c'è una notevole attivazione trascrizionale.

L'utilizzo di bassi vertebrati, come modello sperimentale, facilita tale comprensione, data la rilevante semplicità della loro organizzazione anatomica, rispetto al modello mammifero. Per tale motivo, convinto del fatto che se un sistema biologico svolga una funzione importante e basilare nei mammiferi debba essere conservato in un basso vertebrato, mi sono avvalso del *Lacertidae Podarcis sicula* per lo studio del ruolo della PHGPx.

Nella prima parte dei nostri studi, ci siamo occupati di studiare le variazioni stagionali di espressione di PHGPx in natura e dopo trattamenti sperimentali. Una banda del peso molecolare di circa 20 kDa è visibile in tutti i tessuti esaminati: l'analisi densitometrica identifica il testicolo come il tessuto con una predominante espressione, il cui segnale incrementa in piena attività spermatogenetica. Dalla letteratura è evidente l'esistenza di un'origine locale di estrogeni nel testicolo e di un suo ruolo nell'avviare la spermatogenesi e che in vivo, il testosterone media l'espressione della PHGPx tramite

l'induzione della spermatogenesi. I trattamenti sperimentali condotti con HCG ne aumentano l'immunoreattività mentre l'anti-estrogeno ICI 182-780 ne induce una sua riduzione, dimostrando un coinvolgimento della PHGPx nella maturazione degli spermatozoi e una relazione funzionale tra steroidi e PHGPx.

Nella seconda parte degli studi ci siamo occupati di identificare e caratterizzare la parziale sequenza nucleotidica e aminoacidica di PHGPx nel *Lacertidae*. La valutazione del livello di espressione di PHGPx è stata condotta su mRNA in varie fasi di sviluppo del testicolo con analisi semiquantitativa (SQ-RT-PCR): le variazioni di PHGPx nel ciclo riproduttivo di *P. sicula* sono significative, infatti i più alti livelli di trascritto sono trovati nel testicolo durante la massima attività gonadica, nella stasi riproduttiva i livelli di trascritto sono discreti mentre sono veramente ridotti nella stasi estiva in concomitanza della regressione della gonade per l'assenza dell'architettura della capsula mitocondriale che contiene la maggior parte del selenio incorporato come residuo di selenocisteina nella PHGPx. Una proteina di 76 aa è stata dedotta dalla regione parzialmente clonata di circa 340 bp: la valenza come antiossidante è ritrovata per la conservazione di motivi aminoacidici della tetrate catalitica *triptofano* (W), *glutamina* (Q), *asparagina* (N), con altri vertebrati non mammiferi, noti per essere importanti siti di regolazione, suggerendo appunto un'attività conservata dal punto di vista evolutivo come dimostrato anche dall'analisi filogenetica.

In conclusione, il nostro studio sull'antiossidante PHGPx ne ha permesso l'identificazione, la parziale caratterizzazione nel *Lacertidae Podarcis sicula* e la sua conservazione evolutiva. L'analisi dell'espressione stagionale ne ha evidenziato, inoltre, un suo coinvolgimento nella maturazione degli spermatozoi e una sua dipendenza ormonale.

**BIBLIOGRAFIA**

- Aitken AE, Lee CM, Morgan ET. (2007). Roles of nitric oxide in inflammatory downregulation of human cytochromes P450. *Free Radic Biol Med.*; 44(6):1161-8.
- Andò S., Panno M.L., Ciarcia G., Imbrogno M., Buffone M., Beraldi E., Sisci D., Angelini F., Botte V. (1990). *J. Reprod. Fert.*; 90, 353-360.
- Aniello F., Branno M., De Rienzo G., Ferrara D., Palmiero C. Minucci S. (2002). First evidence of prothymosin alpha in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. *Mech. Dev.*; 110:213-7.
- Arai, M., Imai, H., Koumura, T., Madoka, Y., Emoto, K., Umeda, M., Chiba, N., and Nakagawa, Y. (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) play a major role in preventing oxidative injury to cells. *J. Biol. Chem.*; 274, 4924–4933.
- Arai, M., Imai, H., Sumi, D., Imanaka, T., Takano, T., Chiba, N., and Nakagawa, Y. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 227, 433–439.
- Atik E, Ergin M, Erdoğan S, Tuncer I. (2006). Inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human B cell lymphomas. *Mol Cell Biochem.*; 290(1-2):205-9.
- Baker, M. E. (2008). Trichoplax, the simplest known animal, contains an estrogen-related receptor but no estrogen receptor: Implications for estrogen receptor evolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 375 (4): 623-627.
- Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G, Mussoni L, Sironi L, Hamsten A, Tremoli E. (2001). Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes.*; 50(7):1522-30.
- Baek I.J., Jung K.Y., Yon J.M., Lee S.R., Lee B.J., Yun Y.W., Nam S.Y. (2011). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene is regulated via an estrogen and estrogen receptor signaling in cultured mouse fetuses. *In Vitro Cell.Dev.Biol.–Animal.*; DOI 10.1007/s11626-011-9438.
- Bock E.(1991). Cell-cell adhesion molecules. *Biochem Soc Trans.*; 19(4):1076-80.
- Boitani C., Puglisi R. (2008). Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Adv Exp Med Biol.*; 636:65-73.
- Bolego C, Vegeto E, Pinna C, Maggi A, Cignarella A (2006) Selective agonists of estrogen receptor isoforms new perspectives for cardiovascular disease *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 26:2192-9.
- Borchert, A., Savaskan, N.E., and Kuhn, H. (2003). Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *J. Biol. Chem.*; 278, 2571–2580,.

- Beckett G.J. and Arthur J.R. (2005). Selenium and Endocrine Systems (Review). *Journal of Endocrinology*; 184, 455-465.
- Behne D, Höfer T, von Berswordt-Wallrabe R, Elger W. (1982). Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *J Nutr.* 1982 Sep; 112(9):1682-7.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Weiss-Nowak C, Kalckloesch M, Westphal C, Gessner H. (1996). Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. *Biol Trace Elem Res.*; 55(1-2):99-110.
- Ben Amara I, Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. (2011). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol Environ Saf.*; 74(4):811-9.
- Berry MJ, Martin GW 3rd, Tujebajeva R, Grundner-Culemann E, Mansell JB, Morozova N, Harney JW. (2002). Selenocysteine insertion sequence element characterization and selenoprotein expression. *Methods Enzymol.*; 347:17-24.
- Bhabak and Mugesh. (2010) Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. *Acc. Chem. Res.*; 43 (11), pp 1408–1419.
- Brigelius-Flohé R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* Nov; 27(9-10):951-65.
- Burk RF. (1991). Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.*; 5(9):2274-9.
- Cai W, Zhang L, Song Y, Wang B, Zhang B, Cui X, Hu G, Liu Y, Wu J, Fang J. (2011). Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase. *Free Radic Biol Med.* [Epub ahead of print]
- Cao W, Sumikoshi K, Nakamura S, Terada T, Shimizu K. (2011). Prediction of N-myristoylation modification of proteins by SVM. Prediction of N-myristoylation modification of proteins by SVM. *Bioinformation.* 2011; 6(5):204-6. Epub.
- Carreau S. (2007). Leydig cell aromatase: from gene to physiological role. In: Payne AH, Hardy MP, editors. The Leydig cell in health and disease. Totowa, NJ, USA: *Human Press Inc.*; p. 189-95.
- Carreau S, Hess RM. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc B*; 365: 1517-35.
- Castellano I, Di Maro A, Ruocco MR, Chambery A, Parente A, Di Martino MT, Parlato G, Masullo M, De Vendittis E. (2006). Psychrophilic superoxide dismutase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*: biochemical characterization and identification of a highly reactive cysteine residue. *Biochimie.*; 88(10):1377-89.
- Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Miura T. (2009). Arsenic inhibits in vitro spermatogenesis and induces germ cell apoptosis in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Reproduction*; 138(2):279-87.

- Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T, Miura T.(2009). Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One.*; 18;6(2) 16938.
- Chieffi P., Colucci D'Amato G.L., Guarino F., Salvatore G., Angelini F.(2002). 17- $\beta$  Estradiol Induces Spermatogonial proliferation Through Mitogen-Activated Protein Kinase (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1) Activity In The Lizard (*Podarvis s. sicula*). *Mol. Reprod. Dev.*; 61: 218-225.
- Chieffi P. and Varriale B. (2004). Estrogen receptor  $\beta$  localization in the lizard (*Podarvis s. sicula*). *Zygote* ; 12, pp.39-42.
- Collins, P. e Webb, C. (1999). Estrogen hits the surface. *Nat. Med.*, 5: 1130-1131.
- Corti C. e Lo Cascio P. 1999. I lacertidi italiani. *L'Epas* (Ed.) Palermo pp.11-14 e 35-61.
- Costa FC, Oliva MA, de Jesus TC, Schenkman S, Thiemann OH. (2011). Oxidative stress protection of Trypanosomes requires selenophosphate synthase. *Mol Biochem Parasitol.*; 180(1):47-50. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.04.007.
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptorbeta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*; 138:4613–21.
- Couse, J. F. e Korach, K. S. (1999). Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocr. Rev.*; 20 (3): 358-417.
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta.*; 1763(7):747-58.
- D'Souza R, Gill-Sharma MK, Pathak S, Kedia N, Kumar R, Balasinor N. (2005). Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. *Mol Cell Endocrinol*; 241:41–8.
- Davies MJ, Donkor R, Dunster CA, Gee CA, Jonas S, Willson RL. (1987). Desferrioxamine (Desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide. *Biochem J.*; Sep 15;246(3):725-9.
- Dalei, S. e Mitchell, A. L. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.*; 103 (12): 1617-1618.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.*; Apr;52(4):601-23.
- Dean RT, Giese S, Davies MJ. (1993). Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci.*; 18(11):437-41.

- Delbès G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A. (2004). Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*; 145:3395–403.
- Diaconu M, Tangat Y., Bohm D., Kuhn H., Michelmann H.W., Schreiber G., Haidl G., Glander H-J., Engel W. and Nayernia K. (2006). Failure of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene. *Journal Compilation*; 38:152-157.
- Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2007). SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry*; 12;46(23):6871-82.
- Dodig S, Cepelak I. (2004). The facts and controversies about selenium. *Acta Pharm.*; 54(4):261-76.
- Dokmeci D. (2006). Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. *Folia Med (Plovdiv)*; 48(3-4):16-21.
- Drevet JR (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol.*; 250(1-2):70-9.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996; 137:4796–805.
- Fasano S, D'Antonio M, Pierantoni R. (1991). Sites of action of local estradiol feedback mechanism in the frog (*Rana esculenta*) testis. *Gen Comp Endocrinol.* 1991 Mar; 81(3):492-9.
- Ferrara D, Palmiero C, Branno M, Pierantoni R and Minucci S (2004) Testicular activity of Mos in the frog, *Rana esculenta*: a new role in spermatogonial proliferation. *Biol Reprod* 11; (Epub ahead of print).
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*; 17(13):2639-44.
- Fujii J, Tsunoda S. (2011). Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process. *Asian J Androl.* May; 13(3):420-3.
- Galien R, Garcia T (1997) Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res* ; 25:2424-29.
- Gancarczyk M, Paziewska-Hejmej A, Carreau S, Tabarowski Z, Bilinska B. 2004. Dose- and photoperiod-dependent effects of 17beta-estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoeexpression in immature bank voles. *Acta Histochem*; 106:269–78.

- Gorman G.C., Saulè M., Yang S.Y. e Nevo E. (1975). Evolutionary genetics of insular Adriatic lizards. *Evolution* ; 29:52-71.
- Goyer RA. (1996). Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environ Health Perspect.*;104(10):1050-4.
- Ghosh D, Das UB, Misro M. (2002). Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. *Free Radic Res.*; 36(11):1209-18.
- Ghanta S, Chattopadhyay S. (2011). Glutathione as a signaling molecule: another challenge to pathogens. *Plant Signal Behav.*; 6(6):783-8.
- Gonzalez-Moreno O, Boque N, Redrado M, Milagro F, Campion J, Endermann T, Takahashi K, Saito Y, Catena R, Schomburg L, Calvo A. (2011). Selenoprotein-P is down-regulated in prostate cancer, which results in lack of protection against oxidative damage. *Prostate.*; 71(8):824-34. doi: 10.1002/pros.21298.
- Gronemeyer, H. e Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Prot. Profile*; 2: 1173 - 1308.
- Guerriero G. (2009). Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Annals New York Academy of Sciences*; 1163:154-68.
- Guerriero G. and Ciarcia G. (2001). Progesterone receptor: some viewpoints on hypothalamic seasonal fluctuations in a lower vertebrate. *Brain Research Reviews.*; 37: 172-177.
- Guerriero G. and Ciarcia G. (2006). Stress biomarkers and reproduction in fish. Review. In: *Fish Endocrinology*. M Reinecke, G. Zaccone, & B. G. Kapoor, Eds. Sci Publ Inc Enfield (NH). USA; Plymouth, U.K. Vol.2. pp 665-692.
- Gustafsson JÅ (2003) What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling *Trends Pharmacol Sci*; 24:479-85.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. e Huber, J. C.(2002). Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.*; 346 (5): 340-52.
- Hamden K, Silandre D, Delalande C, El Feki A, Carreau S. (2008). Protective effects of estrogens and caloric restriction during aging on various rat testis parameters. *Asian J Androl*; 10:837-45.
- Herbette S, Roeckel-Drevet P and Drevet J.R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J* ; 274, 2163-2180.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*; 390:509-12.

- Hoffmann PR, Berry MJ. (2008). The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res.*; 2008 Nov;52(11):1273-80.
- Hudson N.J. , Lehner S. A., Ingham A. B., Symonds B., Franklin C. E., and Harper G. (2006). Lessons from an estivating frog: sparing muscle protein despite starvation and disuse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 290: R836–R843.
- Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A. e Korach, K. S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.; U S A.* ; 89 (10): 4658-4662.
- Imai H.; Hirao F.; Sakamoto T.; Sekine K.; Mizukura Y.; Saito M.; Kitamoto T.; Hayasaka M.; Hanaoka K.; Nakagawa Y. (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 305: 278–286.
- Imai H. and Nakagawa Y. (2002). Biological significance of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*; 145-169.
- Imai H.; Nakagawa Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*; 34: 145–169.
- Imai, H., Saito, M., Kirai, N., Hasegawa, J., Konishi, K., Hattori, H., Nishimura, M., Naito, S., and Nakagawa, Y. (2006). Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biochem.*; 140, 573–590.
- Irons R, Tsuji PA, Carlson BA, Ouyang P, Yoo MH, Xu XM, Hatfield DL, Gladyshev VN, Davis CD. (2010). Deficiency in the 15-kDa selenoprotein inhibits tumorigenicity and metastasis of colon cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).*; 3(5):630-9.
- Jin W, Arai KY, Watanabe G, Suzuki AK, Takahashi S, Taya K. (2005). The stimulatory role of estrogen on sperm motility in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Androl*; 26:478–84.
- Kaur T, Bansal MP. (2006). Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. *Nutr Hosp.* Nov-Dec; 21(6):704-8.
- Kaur R, Parshad VR. (1994). Effects of dietary selenium on differentiation, morphology and functions of spermatozoa of the house rat, *Rattus rattus* L. *Mutat Res.*; 309(1):29-35.
- Kennaway DJ, Rowe SA. (1995). Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995; 49:423-35.
- Kobayashi SD, DeLeo FR. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*; Nov-Dec;1(3):309-33.
- Koga M, Tanaka H, Yomogida K, Tsuchida J, Uchida K, Kitamura M, Sakoda S, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y. (1998). Expression of selenoprotein-P messenger ribonucleic acid in the rat testis. *Biol Reprod.*; 58(1):261-5.

- Krishna P. Bhabak and Govindasamy Mugesh. (2010). Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. *Acc. Chem. Res.*; 43 (11), pp 1408–1419.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. *Endocrinology*; 139:4252–4263.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*; 138 863–870.
- Kula K, Walczak-Jedrzejowska R, Slowikowska-Hilczer J, Oszukowska E. (2001). Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*; 178:89–97.
- Kumagai K, Ohno I, Imai K, Nawata J, Hayashi K, Okada S, Senoo H, Hattori T, Shirato K. (2002). The involvement of matrix metalloproteinases in basement membrane injury in a murine model of acute allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*; 32(10):1527-34.
- Lamarche F, Signorini-Allibe N, Gonthier B, Barret L. (2004). Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. *Alcohol*; 33(2):127-38.
- Lesoon A, Mehta A, Singh R, Chisolm GM, Driscoll DM. (1997). An RNA-binding protein recognizes a mammalian selenocysteine insertion sequence element required for cotranslational incorporation of selenocysteine. *Mol Cell Biol*; 17(4):1977-85.
- Losel RM, Falkstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions and answers *Physiol Rev*; 83:955-1016.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*; 193:265–275.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci*; 1993;90: 11162–6.
- Lysiak JJ, Zheng S, Woodson R, Turner TT. Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2. *Cell Tissue Res*; 328(2):411-9.
- Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi I. (2004). Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*; 69:553–9.
- Maiorino, M., and Ursini, F. (2002). Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Biol Chem*. ;383:591-597.
- Maiorino, M., Roveri A., Benazzi, L.; Bosello, V.; Mauri, P., Toppo S., Tosatto S.C., Ursini F. (2005) Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm

mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *J Biol Chem.*; 280:38395-38402.

Maiorino M., Scapin M., Biasolo M., Ursini F., Bosello V., Flohé L. (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase variants. *Journal of Biological Chemistry*; 278: 34286-34290.

Maiorino M, Ursini F, Bosello V, Toppo S, Tosatto SC, Mauri P, Becker K, Roveri A, Bulato C, Benazzi L, De Palma A, Flohé L. (2007). The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *J Mol Biol.*; 365(4):1033-46.

Maiorino M., Wissing J.B., Flohé R. B., Calabrese F., Roveri A., Steinert P., Ursini F., and Flohé L. (1998). Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *The FASEB Journal*; vol.12.

Mancuso M, Orsucci D, Logerfo A, Rocchi A, Petrozzi L, Nesti C, Galetta F, Santoro G, Murri L, Siciliano G. (2010) Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation. *J Neurol.*; 257(5):774-81.

Margis R., Dunand C., Teixeira F.K. and Margis-P.M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS Journal*; 275 3959–3970.

Martines F, Dispenza F, Gagliardo C, Martines E, Bentivegna D. (2011). Sudden sensorineural hearing loss as prodromal symptom of anterior inferior cerebellar artery infarction. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*; 73(3):137-40.

Mills GC. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.*; 229(1):189-97.

Moreno G.L., Brielmeier M., Bornkamm G. W. and Conrad M. (2003). Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological Chemistry*; 384 (4) : 635-643.

Mogulkoc R, Baltaci AK, Aydin L, Oztekin E, Tuncer I. (2006). Pinealectomy increases oxidant damage in kidney and testis caused by hyperthyroidism in rats. *Cell Biochem Funct.*; 24(5):449-53.

Nasim MT, Jaenecke S, Belduz A, Kollmus H, Flohé L, McCarthy JE. (2000). Eukaryotic selenocysteine incorporation follows a nonprocessive mechanism that competes with translational termination. *J Biol Chem.*; 275(20):14846-52.

Nakamura, T., Imai, H., Tsunashima, N., and Nakagawa, Y. (2003). Molecular cloning and functional expression of nucleolar phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 311, 139–148.

Nayernia K, Adham IM, Burkhardt-Göttges E, Neesen J, Rieche M, Wolf S, Sancken U, Kleene K, Engel W. (2002). Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol Cell Biol.*; 22: 3046-52.

- Nayernia K., Diaconu M., Aumuller G., Wennemuth G., Schwandt I., Kleene K., Kuehn H. and Engel W. (2004). Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase: expression pattern during testicular development in mouse and evolutionary conservation in spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 67:458-464.
- Nam S.Y., Baek I.J., Lee B.J., In C.H., Jung E.Y., Yon J.M., Ahn B., Kang J.K., Yu W.J. and Yun Y. W. (2003). Effect of 17 $\beta$  estradiolo and Tamoxifen on the selenoprotein Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx) mRNA expression in male reproductive organs of rats. *Journal of Reproductive and Developmet.*; 198 245-249.
- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. (2001). Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update.*; 7(5):473-81.
- Nei M. and Kumar S. (2001). Molecular Evolution and Phylogenetics. *Heredity*; 86, 385-386.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Milette CF, .1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*; 132:1396–401.
- O'Donnell L., Robertson K. M., Jones M. E. and Simpson E. R. (2001). Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews*; 22 (3): 289-318.
- Olefsky, J. M., (2001). Nuclear Receptor. Minireview series. *J. Biol. Chem.*; 276 (40): 36863-36864.
- Olson G.E., Winfrey V.P., Hill K.E., Raymond R.F. (2004). Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction*; 127:335-42.
- Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF. (2005). Selenoprotein P is required for mouse sperm development. *Biol Reprod.*; 73(1):201-11.
- Ou BR, Jiang MJ, Lin CH, Liang YC, Lee KJ, Yeh JY. (2011). Characterization and expression of chicken selenoprotein W. *Biometals.*; 24(2):323-33.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites *Science*; 277:1508-10.
- Paolucci M, Di Fiore MM. 2002. Putative steroid-binding receptors and nonreceptor components and testicular activity in the lizard *Podarcis sicula sicula*. *J Reprod Fertil.* 1992; 96(2):471-81.
- Papp LV, Lu J, Striebel F, Kennedy D, Holmgren A, Khanna KK. (2006). The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function. *Mol Cell Biol.*; 26(13):4895-910.
- Parminder K. and Bansal M.P. (2003). Effect of selenium-induced oxidative stress on the oxidation reduction system and reproduction ability of male mice. *Biological Trace Element Research* ; Vol 97.
- Pak TR, Lynch PS, Tsai PS. 2002. Estrogen accelerates gonadal recrudescence in photoregressed male Siberian hamsters. *Endocrinology*; 143:4131–4.

- Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CCW, Levin ER (2002) Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen - Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology *J Biol Chem*; 277:50768-75.
- Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro (2000). *J Clin Endocrinol Metab*; 85: 2057–67.
- Pettersson K., Delaunary F., Gustafsson J. (2000). Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*; 19: 4970-4978.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., and Behne, D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.*; 15, 1236–1238.
- Power, R. F., Mani, S. K., Codina, J., Conneally, O. M. e O' Malley, B.W. (1991). Dopaminergic and ligandindependent activation of steroid hormone receptors. *Science*; 254 (5038): 1636-1639.
- Prat A, Behrendt M, Marcinkiewicz E, Boridy S, Sairam RM, Seidah NG, Maysinger D. A novel mouse model of Alzheimer's disease with chronic estrogen deficiency leads to glial cell activation and hypertrophy. (2011) *J Aging Res.*; Doi:10.4061/2011/2515172011.
- Puglisi R., Tramer F., Carlomagno G., Gandini L., Panfili E., Stefanini M., Lenzi A., Mangia F., Boitani C. (2005). PHGPx in spermatogenesis: how many functions? *Contraception*; 72 291-293.
- Radovanovic M. 1956. Rassenbildung bei eidechsen auf Adriatischen Inseln. Denkschrift der Osterreichischen. Akademie Der Wissenschaften, Mathematisch-Naturawissenschaftliche Klasse, 110:1-82.
- Ren K, Xian S, He F, Zhang W, Ding X, Wu Y, Yang L, Zhou J, Gao X, Zhang J. (2011). CK2 phosphorylates AP-2 $\alpha$  and increases its transcriptional activity. *BMB Rep*; 44(7):490-5.
- Reszka E, Jablonska E, Gromadzinska J, Wasowicz W. (2011). Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. *Genes Nutr*.
- Ricci LA, Schwartzer JJ, Melloni RH Jr. (2008). Alterations in the anterior hypothalamic dopamine system in aggressive adolescent AAS-treated hamsters. *Horm Behav.*; Feb;55(2):348-55.
- Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, (1999). Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci*; 96:7986–91.
- Robertson KM, O'Donnell L, Simpson ER, Jones ME.(2002). The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology*; 143:2913–21.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Hoekstra WG. (1972). Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. *J Nutr.*; 102(5):689-96.

- Rugiero L. 1994. Foodhabits of the ruin lizard, *Podarcis sicula* (Rafinesque-Schmoltz, 1810) from a coastal dune in central Italy. *Herpetozoa*; 7 (1/2): 71-73.
- Sahoo DK, Roy A, Bhanja S, Chainy GB. (2007). Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. *Gen Comp Endocrinol.*; 1;156(1):63-70.
- Sakai H, Kurihara Y, Hashimoto Y, Chiba Y, Misawa M. (2010). Involvement of multiple PKC isoforms in phorbol 12,13-dibutyrate-induced contraction during high K(+) depolarization in bronchial smooth muscle of mice. *J Smooth Muscle Res.*; 46(5):225-33.
- Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJ. (1990). *J Biol Chem.*; Jul 15;265(20):11919-27.
- Scheerer P., Borchert A., Krauss N., Wessner H., Gerth C., Hohne W., and Kuhn H. (2007). Structural Basis for Catalytic Activity and Enzyme Polymerization of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*; 46, 9041-9049.
- Schlegel, A., Wang, C., Katzenellenbogen, B. S., Pestell, R. G. e Lisanti, M. P. (1999). Caveolin-1 potentiates estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) signaling: caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*; 274: 33551-33556.
- Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci.*; 61(16):1988-95.
- Schreck (2010). Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocrinol.*; Feb 1;165(3):549-56.
- Schriever SC, Barnes KM, Evenson JK, Raines AM, Sunde RA. (2009). Selenium requirements are higher for glutathione peroxidase-1 mRNA than gpx1 activity in rat testis. *Exp Biol Med (Maywood).*; 234(5):513-21. Epub 2009 Feb 20.
- Schulz R.W., de Franca L.R., Lareyre J-J, LaGac F., Chiarini-Garcia H., Nobrega R.H., Miura T. (2009). Spermatogenesis in fish. *General Comparative Endocrinology* doi: 10.1016/j.ygcen.2009.02.013.
- Shalini S, Bansal MP. (2006). Role of selenium in spermatogenesis: differential expression of cjun and cfos in tubular cells of mice testis. *Mol Cell Biochem.*; 292(1-2):27-38.
- Sharpe RM. (1997). Do males rely on female hormones? *Nature*; 390: 447-448
- Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar AS, Moudgal NR. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). (1998). *Steroids*; 63:414-20.
- Shi L.G., Xun W.J., Yue W.B., Zhang C.X., Ren Y.S., Wang Q., Wu X.Y., Shi L., Yang R.J., Lei FL. (2010). Cloning, characterization, and expression analysis of goat (*Capra hircus*) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Int J Biol Sci.*; 10;6(4):316-26.

- Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK, Genazzani AR (2002) Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase *Steroids*; 67:935-9.
- Spiteller G. (2006). Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med.* ; Aug 1;41(3):362-87.
- Stradaioli G, Sylla L, Monaci M, Maiorino M. (2009). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. *Theriogenology.*; 1;72(1):91-8.
- Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem.*; 280(28):26491-8.
- Swamy M, Sirajudeen KN, Chandran G. (2009). Nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, glutamine synthetase, and oxidative status in kainic acid-mediated excitotoxicity in rat brain. *Drug Chem Toxicol.*; 32(4):326-31.
- Tosatto, S. C., Bosello, V., Fogolari, F., Mauri, P., Roveri, A., Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Maiorino, M. (2008). The Catalytic Site of Glutathione Peroxidases. *Antioxidants Redox Signal* ; Vol. 10, No. 9: 1515-1526.
- Tramer F, Vetere A, Martinelli M, Paroni F, Marsich E, Boitani C, Sandri G, Panfilì E.(2004). cAMP-response element modulator-tau activates a distinct promoter element for the expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. *Biochem J.* 1; 383(Pt 1):179-85.
- Thuillier R, Mazer M, Manku G, Boisvert A, Wang Y, Culty M. (2010). Interdependence of platelet-derived growth factor and estrogen-signaling pathways in inducing neonatal rat testicular gonocytes proliferation. *Biol Reprod*; 82:825–36.
- Turner TT and Lysiak JJ (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl.*; 29(5):488-98.
- Turrisi G. F., Vaccaro A. (2001). Distribuzione altitudinale di Anfibi e Rettili sul Monte Etna (Sicilia Orientale). Atti 3° Congresso Nazionale di Erpetologia. 13.335-338.
- Unsal A, Eroglu M, Avci A, Cimentepe E, Guven C, Derya Balbay M, Durak I. (2006). Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Scand J Urol Nephrol.*; 40(1):17-22.
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. (1986). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tissue React.*; 8(2):99-103.

- Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohé R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., and Flohé L. (1995). The diversity of Glutathione Peroxidases. *Methods of Enzymology*; 252: 38-53.
- Ursini F., Heim S., Kieß M., Maiorino M., Roveri A. Wissing J. and Flohé, L. (1999) Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*; 285, 1393-1396.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.*; 7(1):65-74.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.*; 2006 Mar 10;160(1):1-40.
- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.*; 10(14):1677-94.
- Vincent JL, Forceville X. (2008). Critically elucidating the role of selenium. *Curr Opin Anaesthesiol.*; 21(2):148-54.
- Wahlgren A, Svechnikov K, Strand ML, Jahnukainen K, Parvinen M, Gustafsson JA, (2008). Estrogen receptor beta selective ligand 5alpha-Androstane-3beta, 17beta-diol stimulates spermatogonial deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous epithelium in vitro. *Endocrinology*; 140:2917–22.
- Weniger JP. (1993). Estrogen production by fetal rat gonads. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; 44(4-6):459-62.
- Wolf RE, Graeber GM, Burge JR, DeShong JL, MacDonald JL, Zajtchuk R. (1986). Evaluation of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase in experimental myocardial infarction, atriectomies, and thoracotomies. *Ann Thorac Surg.*; 41(4):378-86.
- Yamasaki K, Sakuma Y, Sasaki J, Matsumoto K, Anzai K, Matsuoka K, Honda C, Tsukada M, Endo K, Enomoto S. (2011). Biliary excretion of essential trace elements in rats under oxidative stress caused by selenium deficiency. *Anal Bioanal Chem.*; 401(8):2531-8.
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.*;199(3):316-31.
- Zhang Q., Bai Q., Yaun Y., Liu P. (2010) Assessment of Seminal Estradiol and Testosterone Levels as Predictors of Human Spermatogenesis. *J. Androl.*; Vol. 31, No. 2.
- Zhonghua L. Dong W. Sheng Z. Ye Bing Z. Z.. (2011). Studying the lipid peroxidation index, morphology and apoptosis in testis of male BALB/c mice exposed to polybrominated diphenyl ether (BDE-209). *Anhui Medical University*; 29(4):294-8.

## SITOGRAFIA

- ✓ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ✓ <http://prosite.expasy.org/>
- ✓ <http://www.uniprot.org/>
- ✓ <http://psort.hgc.jp/>
- ✓ <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
- ✓ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml/>
- ✓ <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do/>
- ✓ <http://www.pantherdb.org/>
- ✓ <http://www.geneontology.org/>
- ✓ <http://www.ebi.ac.uk/interpro/databases.html>
- ✓ [http://www.bioinformatik.de/cgi-bin/browse/Catalog/Software/Online\\_Tools/](http://www.bioinformatik.de/cgi-bin/browse/Catalog/Software/Online_Tools/)