



Università degli studi di Napoli “Federico II”

Stazione Zoologica di Napoli Anton Dohrn

Dottorato di Ricerca in

“Organismi modello nella ricerca biomedica e veterinaria”

XVIII ciclo

***Meccanismi molecolari che regolano la maturazione  
meiotica e la fecondazione di uova di echinodermi***

Tutor

Dott.ssa Luigia Santella

Candidata

Dott.ssa Nunzia Limatola

Coordinatore del Dottorato

Prof. Paolo De Girolamo

ANNO ACCADEMICO 2015 - 2016

## ABSTRACT

Il processo di interazione dello spermatozoo con la cellula uovo durante la fecondazione rimane uno dei più affascinanti misteri della vita. A seguito della fusione dei due gameti, l'uovo va incontro ad una serie di reazioni, dette di attivazione, che sono necessarie per un normale sviluppo embrionale. I meccanismi di attivazione dell'uovo risultano per molti versi simili a quelli riscontrabili nelle cellule somatiche stimulate da messaggeri primari, come ormoni, fattori di crescita e neurotrasmettitori, e si basano sull'aumento della concentrazione intracellulare dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ . Il normale rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  alla fecondazione è dipendente da una serie di cambiamenti morfologici, biochimici ed elettrofisiologici che avvengono durante la maturazione meiotica, che prevede a sua volta la liberazione del  $\text{Ca}^{2+}$ , un processo indispensabile per il potenziamento della capacità dell'uovo maturo di rilasciare il  $\text{Ca}^{2+}$  secondo tempi e modalità specifiche alla fecondazione. Sebbene l'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  nei processi di maturazione e fecondazione sia stato osservato in tutte le uova degli organismi viventi studiati, e sebbene siano stati individuati diversi secondi messaggeri coinvolti nella cascata di eventi della trasduzione del segnale  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{InsP}_3$ , NAADP, cADPR), il meccanismo preciso attraverso cui tale rilascio possa realizzarsi rimane oscuro. Gran parte della nostra conoscenza scientifica sulla fecondazione proviene da studi effettuati su ricci e stelle di mare, che forniscono un gran numero di gameti. Queste uova, così grandi e trasparenti, rappresentano da sempre ottimi sistemi modello per lo studio dell'attivazione dell'uovo e dello sviluppo embrionale in acqua di mare, un mezzo che è artificialmente riproducibile in laboratorio. Gli ovociti di stella di mare consentono lo studio dei cambiamenti corticali, citoplasmatici e nucleari che hanno luogo durante il processo di maturazione meiotica, che può anche essere indotto in vitro mediante stimolazione ormonale. Tali cambiamenti morfologici e biochimici assicurano il successo della fecondazione delle uova, che in questa specie avviene durante il processo di maturazione e più precisamente tra la dissoluzione dell'involucro nucleare e la fuoriuscita del primo globulo polare. Le uova di riccio di mare, invece, sono fecondate dopo il completamento della meiosi, e sono particolarmente adatte per lo studio dell'interazione spermatozoo-uovo, dei primi eventi dell'attivazione dell'uovo e dello sviluppo embrionale, perché è possibile fecondare, in maniera sincrona, un gran numero di uova mature. Le uova di stelle e ricci di mare subiscono rapidi cambiamenti nell'organizzazione dell'actina del citoscheletro concomitanti con flussi ionici in risposta alla spermatozoo fecondante o ad un qualsiasi altro stimolo esterno. La membrana plasmatica e la zona corticale dell'uovo rappresentano, quindi, "zone eccitabili" della cellula capaci di rispondere rapidamente agli stimoli esterni con rapidi cambiamenti strutturali e variazioni dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$ . Durante lo svolgimento

di questo corso di dottorato ho utilizzato le uova di riccio e stella di mare come modello sperimentale al fine di indagare i meccanismi molecolari che regolano i processi di maturazione e fecondazione, con particolare attenzione al ruolo regolatorio svolto dall'actina del citoscheletro. A tal fine ho adoperato tecniche di microiniezione associate all'uso del microscopio confocale e camere digitali per misurare i cambiamenti della concentrazione citoplasmatica del calcio e seguire in tempo reale i cambiamenti strutturali dell'actina del citoscheletro e tutti gli altri eventi morfologici associati ai processi di maturazione e fecondazione, inclusi l'estrusione dei globuli polari dopo maturazione, l'incorporazione dello spermatozoo e lo sviluppo embrionale. Ho inoltre adoperato tecniche di fissazione per visualizzare, mediante microscopia elettronica, la conformazione ultrastrutturale della zona corticale adiacente alla membrana plasmatica di ovociti e di uova trattate con diversi agenti. Infine ho effettuato saggi biochimici per misurare in vitro l'attività della nicotina sui filamenti di actina per compararla con quella delle proteine canoniche come ad es. la cofilina e profilina che si legano all'actina (actin-binding proteins), regolandone l'organizzazione strutturale e la sua dinamicità. Nel corso di questo lavoro di tesi presenterò dati che mostrano come i rapidi e dinamici riarrangiamenti dell'actina del citoscheletro nel cortex dell'ovocita/uovo in seguito alla stimolazione ormonale o spermatica siano fondamentali per la modulazione del segnale  $Ca^{2+}$  e per gli altri eventi associati alla fecondazione, come l'esocitosi dei granuli corticali ed il controllo della monospermia. I risultati sperimentali della mia tesi di dottorato hanno evidenziato che le perturbazioni dell'organizzazione strutturale dell'actina del citoscheletro tramite l'utilizzo di vari agenti farmacologici o attraverso il processo fisiologico di invecchiamento ovocitario compromettono seriamente la buona riuscita del processo di fecondazione ed il proseguimento dello sviluppo embrionale.