

Ho svolto l'attività di stage, nell'ambito del progetto STRAIN, presso il Dip. di Medicina Sperimentale della Seconda Università degli Studi di Napoli, lavorando sotto la direzione del Prof. Sergio Minucci. Mi sono occupato principalmente dello studio dell'espressione e sub-localizzazione di polipeptidi potenzialmente coinvolti nella spermatogenesi dei vertebrati, tra cui la Protimosina alfa (Parte I). Inoltre, ho partecipato ad altre attività, dall'analisi del ruolo di fattori coinvolti nel metabolismo e nella fertilità, a studi filogenetici e su fattori di stress in zebrafish, alcune delle quali hanno portato alla produzione di lavori scientifici (elencati in Parte II).

Parte I.

La Protimosina alfa (PTMA) è una molecola estremamente acida [6], appartenente alle proteine intrinsecamente non strutturate [7]. E' stata estratta per la prima volta dal timo di ratto e caratterizzata quale fattore immunogeno [8], ma in seguito è stata identificata in molti tessuti mammiferi [9, 2], e riconosciuta in diversi processi biologici [11, 14-18]. Molto interessanti risultano i recenti sviluppi riguardo la sua associazione con la spermatogenesi [1, 3-5, 13]. PTMA è stata, infatti, rilevata nelle cellule germinali meiotiche e post-meiotiche all'interno dei tubuli seminiferi delle gonadi di tutte le specie studiate. Questo, insieme alla sua presenza negli spermatozoi (SPZ), a livello dell'acrosoma (quando presente), rivela l'evidente conservazione filogenetica e suggerisce un suo ruolo nella gametogenesi e nella fecondazione.

Sulla base di tale associazione [5], abbiamo scelto di approfondire l'attuale conoscenza concentrandoci sullo studio delle possibili differenze riscontrabili in un modello con SPZ privi di acrosoma, come il teleosteo *Danio rerio*, che accompagna tale caratteristica a una fecondazione meccanica [10]. I dati hanno confermato la buona conservazione del pattern di localizzazione del trascritto e della proteina nelle cellule germinali meiotiche e post-meiotiche, supportando un possibile ruolo di Ptma durante la meiosi e/o la differenziazione degli spermatidi in SPZ. Inoltre, la proteina è ancora rilevabile nel nucleo dei gameti a livello del lume. Tale variegata distribuzione nucleo-citoplasmatica suggerisce che Ptma possa essere coinvolta nel rimodellamento della cromatina durante la spermatogenesi e la spermiogenesi. Questi dati sono stati recentemente inclusi in un articolo, il quale è al vaglio per la pubblicazione su una rivista internazionale [12].

Alla luce delle conoscenze pregresse, abbiamo intrapreso un ulteriore studio di localizzazione preliminare di PTMA negli SPZ di topo, sia in condizioni fisiologiche, tramite animali wild type, sia in caso di alterazioni della fertilità, con esemplari knock-out per il recettore dei cannabinoidi di tipo 1 (CB1), concessici dal gruppo della Prof.ssa Gilda Cobellis. L'analisi della distribuzione di PTMA in campioni wild type conferma la preservazione filogenetica della sua associazione con il sistema acrosomale. Inoltre, i dati preliminari su SPZ di eterozigoti per CB1 indicano un'alterata distribuzione sia di PTMA, sia di IAM 38, un noto marcatore della membrana acrosomale interna, coinvolto nella fecondazione [17]. I primi, promettenti risultati pongono le basi per ulteriori esperimenti in grado di chiarire le specifiche conseguenze di tali alterazioni.

Parte II. Altri contributi

- **Dotolo R, Pariante P, Minucci S, Diano S** - Prolyl Endopeptidase (PREP) is associated with male reproductive function and gamete physiology in mice (SUBMITTED, 2015)

- **D'Agostino S, Testa M, Pariante P, Minucci S, Aniello F, Donizetti A** - Molecular evidence of long-lasting effects of prenatal stress in zebrafish larvae: expression pattern dysregulation of stress-

and neuronal activity-related genes in response to stress conditions (SUBMITTED, 2015)

- **Donizetti A, Fiengo M, G. Iazzetti, P. Pariante, S. Minucci, F. Aniello** - Analysis of gene expression pattern of zebrafish *rxfp2* homologue genes during embryonic development (SUBMITTED, 2015)

- **Donizetti A, Fiengo M, Iazzetti G, del Gaudio R, Di Giaimo R, Pariante P, Minucci S, Aniello F.** 2015. Expression analysis of five zebrafish RXFP3 homologues reveals evolutionary conservation of gene expression pattern Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 324:22-9

Bibliografia

1. **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
2. **Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Panneerselvam C, Horecker BL.** 1989. Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. Arch Biochem Biophys 269:256-63
3. **Ferrara D, Izzo G, Liguori L, d'Istria M, Aniello F, Minucci S.** 2009. Evidence for the involvement of prothymosin alpha in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. J ExpZool A Ecol Genet Physiol. 311: 1-10
4. **Ferrara D, Izzo G, Pariante P, Donizetti A, d'Istria M, Aniello F, Minucci S.** 2010. Expression of prothymosin alpha in meiotic and post-meiotic germ cells during the first wave of rat spermatogenesis. J Cell Physiol. 224:362-8
5. **Ferrara D, Pariante P, Di Matteo L, Serino I, Oko R, Minucci S.** 2013. First evidence of prothymosin α localization in the acrosome of mammalian male gametes. J Cell Physiol.228:1629-37
6. **Frangou-Lazaridis M, Clinton M, Goodall GJ, Horecker BL.** 1988. Prothymosin alpha and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs. Arch Biochem Biophys 263:305-10
7. **Gast K, Damaschun H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR, Müller-Frohne M, Zirwer D, Czarnecki J, Damaschun G.** 1995. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. Biochemistry. 34:13211-8
8. **Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL.** 1984a. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. ProcNatlAcad Sci USA. 81:1008-11
9. **Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL.** 1984b. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. ProcNatlAcad Sci USA. 81:1391-3
10. **Hirai, A.** 1988. Fine structure of the micropyles of pelagic eggs of some marine fishes. Jap. J. Ichthyol 35, 351-357.
11. **Martini PG, Katzenellenbogen BS.** 2003. Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. J Steroid Biochem Mol Biol 85:117-22
12. **Pariante P, Dotolo R, Venditti M, Ferrara D, Donizetti A, Aniello F, Minucci S.** Prothymosin Alpha Expression and Localization During the Spermatogenesis of *Danio rerio* (SUBMITTED).
13. **Prisco M, Donizetti A, Aniello F, Locascio A, Del Giudice G, Agnese M, Angelini F, Andreuccetti P.** 2009. Expression of Prothymosin alpha during the spermatogenesis of the spotted ray *Torpedo marmorata*. GenCompEndocrinol. 164:70-6
14. **Ueda H.** 2009. Prothymosin alpha and cell death mode switch, a novel target for the prevention of cerebral ischemia-induced damage. Pharmacol Ther 123:32333
15. **Ueda H, Matsunaga H, Halder SK.** 2012. Prothymosin α plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. Ann N Y Acad Sci 2012 1269:34-43
16. **Voutsas IF, Baxevanis CN, Gritzapis AD, Missitzis I, Stathopoulos GP, Archodakis G, Banis C, Voelter W, Papamichail M.** 2000. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. Cancer Immunol Immunother 49:449-58
17. **Yu Y, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P, Oko R.**2006. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zonapellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38).Dev Biol. 290:32-43.
18. **Zhang M, Cui F, Lu S, Lu H, Jiang T, Chen J, Zhang X, Jin Y, Peng Z, Tang H.** 2014. Increased expression of prothymosin- α , independently or combined with TP53, correlates with poor prognosis in colorectal cancer. Int J Clin Exp Pathol 7:4867-76