

INDICE

1.	INTRODUZIONE	
	1.1. Proprietà elettriche degli ovociti.....	Pag. 3
	1.2. Cenni storici sull'elettrofisiologia.....	Pag. 10
	1.3. Metodi e applicazioni elettrofisiologiche.....	Pag. 13
	1.4. Le ascidie.....	Pag. 17
	1.5. Maturazione e fecondazione.....	Pag. 21
	1.6. Stimolo della maturazione meiotica.....	Pag. 31
	1.7. Calcio.....	Pag. 35
	1.8. AMP ciclico.....	Pag. 40
	1.8.1. <i>Proteine G</i>	Pag. 43
	1.8.2. <i>Adenilato ciclasi</i>	Pag. 43
	1.8.3. <i>Fosfodiesterasi</i>	Pag. 44
	1.8.4. <i>Protein chinasi A</i>	Pag. 44
	1.8.5. <i>MPF</i>	Pag. 44
	1.9. Cellule follicolari e giunzioni comunicanti.....	Pag. 46
2.	SCOPO DELLA RICERCA	Pag. 49
3.	MATERIALI E METODI	
	3.1. Modello sperimentale.....	Pag. 50
	3.2. Animali e gameti.....	Pag. 51
	3.3. Classificazione VG e test di fecondazione e sviluppo.....	Pag. 52
	3.4. Misurazioni elettriche.....	Pag. 53
	3.5. Caratterizzazione farmacologica.....	Pag. 58
	3.6. Esperimenti di GVBD <i>in vitro</i>	Pag. 59
	3.7. Ruolo delle cellule follicolari nella GVBD.....	Pag. 61
	3.7.1. <i>Studio dell'influenza delle follicolari sulla GVBD in vitro</i>	Pag. 61
	3.7.2. <i>Analisi della presenza delle giunzioni comunicanti</i>	Pag. 61
	3.8. Analisi statistica.....	Pag. 64

4.	RISULTATI	
	4.1. Classificazione VG e competenza di maturazione, fecondazione e sviluppo.....	Pag. 65
	4.1.1. <i>Competenza di maturazione</i>	Pag. 65
	4.1.2. <i>Fecondazione dello stadio GVBD</i>	Pag. 67
	4.2. Risultati elettrofisiologici e caratterizzazione farmacologica.....	Pag. 67
	4.3. GVBD <i>in vitro</i>	Pag. 77
	4.3.1. <i>Comparazione tra acqua di mare naturale e artificiale</i>	Pag. 77
	4.3.2. <i>Influenza del pH esterno</i>	Pag. 77
	4.3.3. <i>Influenza del calcio e sodio</i>	Pag. 80
	4.3.4. <i>Influenza della tripsina e del suo inibitore</i>	Pag. 80
	4.3.5. <i>Aumento dei livelli di AMP ciclico</i>	Pag. 83
	4.4. Influenza delle cellule follicolari.....	Pag. 85
	4.4.1. <i>Studio dell'influenza delle cellule follicolari sulla GVBD in vitro</i>	Pag. 85
	4.4.2. <i>Analisi della presenza delle giunzioni comunicanti</i>	Pag. 85
	4.5. Analisi statistica.....	Pag. 89
5.	DISCUSSIONE	Pag. 92
6.	CONCLUSIONI	Pag. 101
7.	BIBLIOGRAFIA	Pag. 102
8.	PUBBLICAZIONI	Pag. 130

1.INTRODUZIONE

1.1. Proprietà elettriche degli ovociti

I compartimenti extra e intracellulari sono costituiti da soluzioni acquose a differenti composizioni ioniche e molecolari: ad esempio, lo ione potassio (K^+) è presente in concentrazioni maggiori all'interno della cellula rispetto all'esterno, mentre avviene l'opposto per gli ioni calcio (Ca^{2+}) e sodio (Na^+) (Tosti e Boni 2004; Boni et al., 2007). Come tutte le cellule, anche gli ovociti variano la composizione dell'ambiente intracellulare a seconda delle proprie necessità, perciò la regolazione degli scambi tra i due compartimenti in funzione del ciclo cellulare risulta di cruciale importanza per la vita stessa della cellula. La membrana plasmatica è costituita da un doppio strato fosfolipidico che non consente il libero passaggio degli ioni, creando pertanto una differente distribuzione di cariche elettriche ai due lati della membrana che viene detto voltaggio. L'esistenza di questo gradiente genera a sua volta anche un accumulo di energia potenziale, detto "potenziale di riposo della cellula" (PR), che si misura in millivolts (mV) (Tosti e Boni, 2004). Il PR è negativo nella maggior parte delle cellule studiate fino ad oggi, oscillando dai -10 ai -100 mV (Hagiwara e Jaffe, 1979). Il valore del PR varia nel corso della vita della cellula a secondo delle fasi del ciclo cellulare e dipende principalmente dalla permeabilità della membrana e dalla diversa distribuzione ionica in particolare dello ione K^+ (De Felice, 1997).

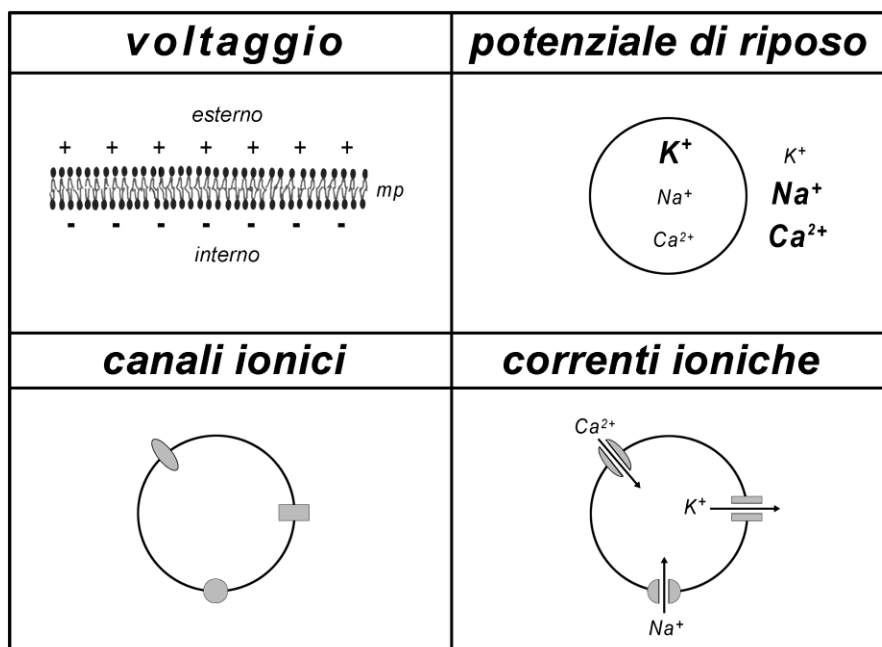


Figura 1. Rappresentazione schematica dei principali parametri elettrofisiologici. Il voltaggio è generato dalla distribuzione diseguale degli ioni positivi e negativi ai lati della membrana. Il potenziale di riposo è dovuto alla separazione delle cariche, che genera una differenza di voltaggio attraverso la membrana. Questa forma di energia potenziale è conservata come gradiente ionico, cioè differente concentrazione di ioni tra l'interno e l'esterno della cellula. I canali ionici sono specifiche proteine situate nel doppio strato fosfolipidico che permettono il passaggio di specifici ioni attraverso la membrana plasmatica. La corrente ionica è il flusso di ioni attraverso i canali (modificato da Tosti e Boni, 2004).

Essendo il doppio strato fosfolipidico impermeabile agli ioni, lo scambio ionico attraverso la membrana plasmatica avviene mediante delle proteine che fungono da *tunnel*, i “canali ionici”. Il flusso di cariche elettriche che attraversano i canali è detto “corrente ionica”, e si misura in nanoAmpere (nA) o picoAmpere (pA). Generalmente, associata alla corrente ionica vi è una variazione repentina e

transitoria del PR verso valori più positivi (depolarizzazione) o negativi (iperpolarizzazione), con conseguenti eventuali ripercussioni sul ciclo e il metabolismo cellulare.

I canali ionici sono caratterizzati da:

1) modalità di apertura: possono essere classificati in canali che si aprono in risposta ad una modifica del voltaggio (*voltage-operated channels*, VOC), o in seguito all'interazione con un ligando (*second messenger operated channels*, SMOC) (Sutcliffe et al. 1998; Terlau e Stuhmer, 1998). Questi ultimi possono essere aperti da molecole agenti su recettori esterni accoppiati direttamente al meccanismo di apertura del canale la cui probabilità di apertura dipende dalla concentrazione della sostanza. In alcuni casi gli SMOC possono essere aperti anche dall'interno come ad esempio i canali di potassio attivati dal calcio (Ogden e Stanfield, 1994).

2) specificità: un canale ionico viene considerato specifico se può essere attraversato prevalentemente da una sola specie ionica, aspecifico se ne permette il passaggio di due o più.

3) conduttanza: è la capacità di una membrana plasmatica ad essere attraversata da correnti ioniche. La conduttanza è differente per tipo di canale, in quanto i canali specifici hanno conduttanze meno elevate, nell'ordine di 5-10 picoSiemens (pS), rispetto a quelli aspecifici che possono raggiungere anche i 400 pS come

nel caso dei canali responsabili della corrente di fecondazione negli ovociti di *Ciona intestinalis* (Dale e De Felice, 1984; De Felice e Kell, 1987).

4) sensibilità agli inibitori: i canali sono sensibili ad alcune sostanze che ne riducono o ne annullano la conduttanza. Questi inibitori agiscono a livello molecolare alterandone sia la cinetica d'apertura che la funzione stessa della proteina canale. Esperimenti di *single channel* hanno dimostrato che queste sostanze agiscono sul canale competendo con i siti di legame per lo ione. Attualmente si conoscono numerosi bloccanti specifici sia organici che inorganici di tutti i canali ionici noti (Moczydlowski, 1992). Alcuni canali sono bloccati selettivamente da basse concentrazioni di tossine come ad esempio, i canali di sodio da parte della tetrodotossina, o quelli di potassio da derivati del tetraetilammonio (Ogden e Stanfield, 1994).

Naturalmente, il tipo e la densità di canali presenti in una cellula dipendono dalla sua funzione e fisiologia (Takahashi e Okamura, 1998).

La classificazione dei canali si basa essenzialmente sulla loro cinetica e risposta farmacologica. Seguendo tali criteri sono stati identificati e caratterizzati molti tipi di canali di K^+ , un solo canale di Na^+ e diversi canali di Ca^{2+} . Questi ultimi, in particolare, sono stati ulteriormente classificati in 5 tipi canali di calcio VOC: L, T, N, P/Q, R, anche in relazione alla loro densità e funzione nei diversi tessuti: il canale di calcio tipo L è un canale lento che è coinvolto in vari processi come la

maturazione ovocitaria; il tipo T è un canale veloce ed è presente principalmente nei tessuti molto eccitabili tipo i muscoli; il tipo N è un canale neuronale ed è modulato anche dal rilascio di neurotrasmettitori oltre che dal voltaggio; infine, ci sono i canali P/Q e R che non sono ancora stati completamente caratterizzati (De Felice, 1997).

I primi animali ad essere utilizzati per le ricerche sul ruolo degli ioni nella fisiologia dell'ovocita sono stati gli echinodermi: infatti, Edward Chambers, nel 1946, studiò gli scambi ionici di Na^+ e K^+ nel corso della fecondazione del riccio di mare (Chambers, 1989). Successivamente, solo parecchi anni dopo, sono state studiate le proprietà elettriche della membrana plasmatica ovocitaria anche nelle stelle di mare (Steinhardt et al., 1971; Jaffe e Robinson, 1978; Moody e Lansman, 1983).

La presenza dei canali di calcio negli ovociti fu dimostrata per la prima volta da Okamoto e colleghi in diverse specie animali (1977), mentre studi sulla membrana di ovociti nel corso della maturazione hanno dimostrato che l'ovocita immaturo ha un'alta permeabilità al potassio, che si perde nel corso delle fasi successive della maturazione (Dale e De Santis, 1981).

Per quanto concerne le ascidie, Block e Moody (1987) hanno descritto, negli ovociti di *Boltenia villosa*, la presenza di tre principali correnti ioniche transienti, in entrata e modulate dal voltaggio: 1) corrente di sodio; 2) corrente di calcio; 3) corrente rettificante di potassio. Nella *Ciona intestinalis*, una caratterizzazione delle proprietà elettriche dell'ovocita immaturo ha mostrato la presenza di correnti

di calcio di tipo L, mentre l'ovocita maturo presenta alte correnti di sodio e basse correnti di calcio (Dale et al. 1991, Cuomo et al., 2005), indicando, tra l'altro, un possibile loro ruolo nella regolazione del calcio citosolico durante i primi processi di sviluppo.

I canali ionici giocano un ruolo nei processi di maturazione anche in altre specie di invertebrati, come nei molluschi (Dubè, 1992; Guerrier et al., 1993; Moreau et al., 1996; Tomkowiak et al., 1997; Colas e Dubè, 1998; Leclerc et al., 2000; Cuomo et al., 2005), e nei vertebrati come gli anfibi dove la presenza di correnti di Cloro (Cl^-) negli ovociti sembra essere coinvolta sia nella maturazione che nella fecondazione (Schlichter, 1989; Tosti e Boni, 2004).

In relazione sia alla progressione meiotica che al raggiungimento della competenza di sviluppo, negli ovociti immaturi di mammifero sono stati descritti cambiamenti dell'assetto ionico (Mc Culloh e Levitan, 1987; Murnane e De Felice, 1993; Tosti et al. 2000; Boni et al. 2002). In particolare, negli ovociti di bovino, le correnti di calcio e la permeabilità totale della membrana decrescono durante la fase di rottura della vescicola germinale (Tosti et al., 2002). Figura 2.

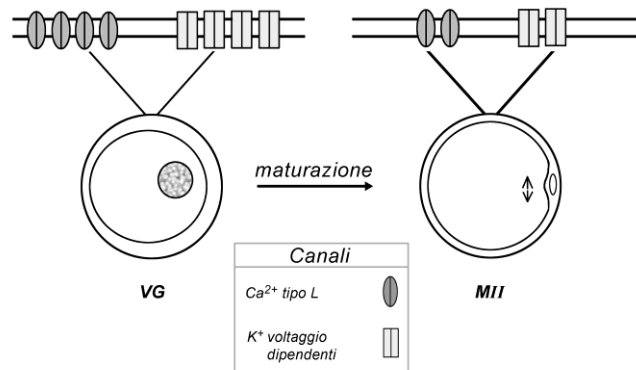


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'attività dei canali ionici nella maturazione degli ovociti di bovino. Allo stadio immaturo VG vi è una preponderanza di canali di calcio tipo L e di potassio (conduttanza) che decresce con la progressione meiotica (modificato da Tosti e Boni, 2004).

Più in generale, evidenze sperimentali hanno indicato che in diverse specie animali i canali ionici che più fortemente sono correlati alla maturazione sono i canali di calcio di tipo L (Murnane et al., 1988; Dale et al., 1991; Tomkoviak et al., 1997; Ouadid-Ahidouch, 1998; Tosti et al., 2000; Cuomo et al., 2005). Ciò è anche indicato dall'aumento di calcio citosolico nello stadio immaturo che segue l'esposizione dell'ovocita all'LH (*luteinizing hormone* o ormone luteinizzante) o a fattori di crescita (Mattioli et al., 1998; Hill et al., 1999). Purtroppo, malgrado i numerosi studi sui mammiferi, non è ancora chiaro se un aumento di calcio sia necessario per la stimolazione della meiosi da parte dell'LH (Mehlmann et al. 2006). A causa della scarsità di materiale disponibile e di ovvi motivi etici, vi sono poche informazioni sull'ovocita umano. Tra i pochi studi va citato quello di,

Feichtinger (Feichtinger et al., 1988) che usando tecniche elettrofisiologiche ha testato la variazione del potenziale di membrana in ovociti a diversi stadi di maturazione.

1.2. Cenni storici sull'elettrofisiologia

La nascita dell'elettrofisiologia sperimentale è riconducibile al 1660, quando lo studioso olandese Jan Swammerdam elaborò un preparato neuromuscolare: riuscì a indurre la contrazione del muscolo della zampa di una rana stimolandone il nervo connesso. Ma il supporto sperimentale della natura elettrica dell'impulso nervoso fu fornito 80 anni dopo dall'italiano Luigi Galvani con la sua pubblicazione “ *De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarius*” del 1791. Tale fondamentale lavoro sull'elettricità animale segna l'inizio della storia dei canali ionici. Solo più tardi, tra il 1794 e 1797, Galvani elaborò la teoria dell'eccitazione elettrica realizzando che i tessuti biologici sono in uno stato di squilibrio, cioè anche se a riposo, sono comunque pronti a rispondere a stimoli elettrici esterni (Figura 3). Galvani postulò che “l'elettricità animale” era generata dall'accumulo di cariche positive e negative sulle superfici interne e esterne di fibre muscolari o nervose. Il flusso di corrente elettrica, che avviene durante l'eccitazione, richiedeva uno specifico meccanismo, e così lo scienziato italiano intuì l'esistenza di canali riempiti di acqua, che penetrando attraverso la superficie delle fibre, le rendono eccitabili elettricamente. Il suo concetto di elettricità animale fu al centro di un'aspra diatriba e fu alla fine confutato da Alessandro

Volta il quale dimostrò che l'elettricità non era un fenomeno prettamente biologico (Verkhatsky et al., 2006).

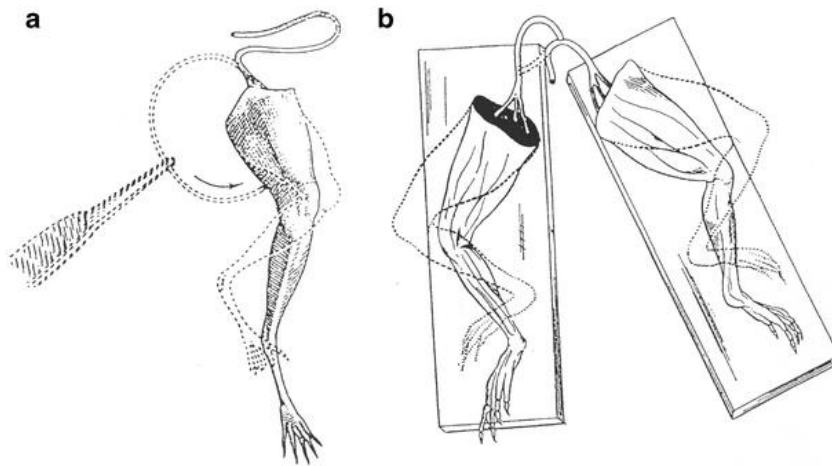


Figura 3. Esperimenti di Galvani: **a)** esperimento del 1794: quando la superficie della sezione del nervo sciatico tocca il muscolo la zampa si contrae; **b)** esperimento del 1797: quando la superficie della sezione del nervo sciatico destro tocca la superficie intatta del nervo sciatico sinistro, entrambe le zampe si contraggono.

La prima registrazione strumentale dell'elettricità animale (usando il preparato neuromuscolare di rana) fu fatta da Leopoldo Nobili, con l'ausilio di un galvanometro elettromagnetico, anche se Nobili interpretò tale registrazione in termini puramente fisici credendo di stare misurando una corrente termoelettrica che scaturiva dal differente raffreddamento delle due estremità del preparato. Diversi anni dopo, nel 1842, Carlo Matteucci ripeté questo esperimento, ma riuscì a dimostrare che il galvanometro stava misurando esclusivamente la corrente generata dal tessuto vivente.

Un aiuto importante per lo sviluppo dell'elettrofisiologia venne indirettamente dagli studi di Danielli e Dawson negli anni venti, i quali fornirono preziose informazioni sulla struttura della membrana plasmatica che fu in seguito definita come un doppio strato fosfolipidico con numerose proteine associate e dei pori acquosi che consentono il passaggio di molecole insolubili nei lipidi, inclusi gli ioni (Verkhratsky et al., 2006).

La tecnica del *patch clamp* fu usata per la prima volta da Erwin Neher e Bert Sakmann (1976), poi premi Nobel per la medicina nel 1991, per analizzare le correnti che attraversano singoli canali attivate dall'acetilcolina in pezzi (*cell-attached patches*) di membrana non recisa di muscolo scheletrico di rana. Il metodo da loro usato (descritto da Neher et al., 1978; Hamill et al., 1981; Neher, 1988; Neher, 1992; Neher e Sakmann, 1992; Lewis e Rae, 1998) ha condotto a tecniche ad alta risoluzione per la registrazione di correnti in pezzi di membrane recise in aggiunta a quelle in pezzi di membrana non distaccati dalle cellule. Le registrazioni in *single channel* hanno fornito informazioni sulla conduttanza unitaria e sul comportamento dei canali ionici. Ciò è stato possibile sfruttando anche le registrazioni in *whole cell*, che consentono l'applicazione del blocco del voltaggio sia a cellule troppo piccole per i microelettrodi, sia a cellule non elettricamente eccitabili. In tal modo si è scoperto il ruolo fisiologico dei canali ionici in cellule altrimenti inaccessibili per l'applicazione del blocco di voltaggio (Ogden e Stanfield, 1994).

1.3. Metodi e applicazioni elettrofisiologici

Il principio della tecnica *patch-clamp* consiste nell'isolare elettricamente un pezzo di membrana dalla soluzione esterna e registrare la corrente che vi fluisce. Ciò lo si ottiene premendo contro la superficie di una cellula una pipetta di vetro riempita con una soluzione elettrolitica adatta, e applicando una lieve aspirazione. A patto che sia la pipetta che la membrana siano libere da impedimenti e, quindi, direttamente accessibili, si formerà una saldatura (*seal*) ermetica tra loro, con una resistenza elettrica maggiore di 10 gigaohm ($G\Omega$). In queste condizioni la pipetta di vetro sarà a meno di 1 nm di distanza dalla membrana cellulare (Ogden e Stanfield, 1994).

Un'alta resistenza del *seal* è necessaria per due motivi: primo, maggiore è la resistenza della saldatura, più efficiente è l'isolamento elettrico del *patch*; secondo, un'alta resistenza riduce il "rumore" della corrente di registrazione permettendo una migliore risoluzione anche delle correnti *single channel*, la cui ampiezza può essere anche nell'ordine di appena 1 pA (Sigworth, 1986; Ogden e Stanfield, 1994).

Una pipetta di vetro con una piccola apertura ad una estremità è utilizzata per ottenere uno stretto contatto con una piccola area di membrana, detta appunto *patch* o pezzo di membrana. Dopo l'applicazione di una lieve aspirazione, la saldatura tra la pipetta e la membrana diviene così stretta che gli ioni non possono

fluire tra la pipetta e la membrana. Perciò, tutti gli ioni che passano quando un canale si apre nel *patch*, lo faranno nella pipetta. Sebbene ridotta, la corrente elettrica risultante può essere misurata con un amplificatore elettronico ultrasensibile connesso alla pipetta. Questa configurazione è generalmente detta metodo di registrazione “*cell-attached patch clamp*” e consente il controllo sperimentale del potenziale di membrana per caratterizzare la dipendenza dal voltaggio delle correnti di membrana (Purves et al., 2001).

La capacità di registrare le correnti che attraversano i canali ionici è un vantaggio considerevole del metodo “*cell-attached patch clamp*” rispetto agli altri; ciò nonostante, alcune sue modificazioni tecniche (Figura 4) hanno apportato ulteriori notevoli benefici: infatti, se il patch di membrana all’interno della pipetta è distrutto dalla applicazione di una aspirazione, breve ma piuttosto decisa, l’interno della pipetta diverrà un *continuum* con il citoplasma cellulare. Questa configurazione permette di misurare i potenziali elettrici e le correnti dall’intera cellula ed è perciò chiamato metodo di registrazione “*whole-cell*”. Inoltre, consente anche gli scambi diffusionali tra la pipetta e il citoplasma, fornendo un altro metodo per iniettare le sostanze all’interno delle cellule (Purves et al., 2001).

Le altre due varianti del metodo del *patch clamp* hanno origine dalla scoperta che, una volta formatasi una stretta saldatura tra la membrana e la pipetta, possono essere tirati via piccoli pezzi di membrana senza distruggere il *seal*, ottenendo un pezzo indipendente dal resto della cellula. Tale fenomeno è possibile in virtù delle proprietà del *gigaseal*, una saldatura molto forte e resistente (Sigworth, 1986).

Semplicemente ritraendo la pipetta in configurazione *cell-attached*, si può ottenere la formazione di una piccola vescicola di membrana ancora attaccata alla pipetta. Esponendo l'estremità della pipetta all'aria, la vescicola si apre per ottenere un piccolo pezzo di membrana con la sua precedente faccia citoplasmatica rivolta all'esterno. Questa configurazione, detta registrazione "*inside-out patch*", consente le misurazioni delle correnti di un singolo canale con l'ulteriore vantaggio di rendere possibile un eventuale cambio di mezzo di registrazione al quale è esposta la superficie intracellulare della membrana. Quindi, la configurazione *inside-out* risulta particolarmente preziosa per studi sull'influenza delle molecole intracellulari sull'attività dei canali. In alternativa, se la ritrazione della pipetta avviene in configurazione *whole-cell*, verrà prodotto stavolta un pezzo di membrana con la faccia extracellulare rivolta al mezzo esterno. Tale configurazione, chiamata registrazione "*outside-out*", è ottimale per studiare in che modo l'attività dei canali sia influenzata da segnali chimici extracellulari, come, per esempio, i neurotrasmettitori. È chiaro che una siffatta gamma di possibili configurazioni rende il metodo del *patch clamp* una tecnica estremamente versatile per gli studi sui canali ionici (Purves et al., 2001).

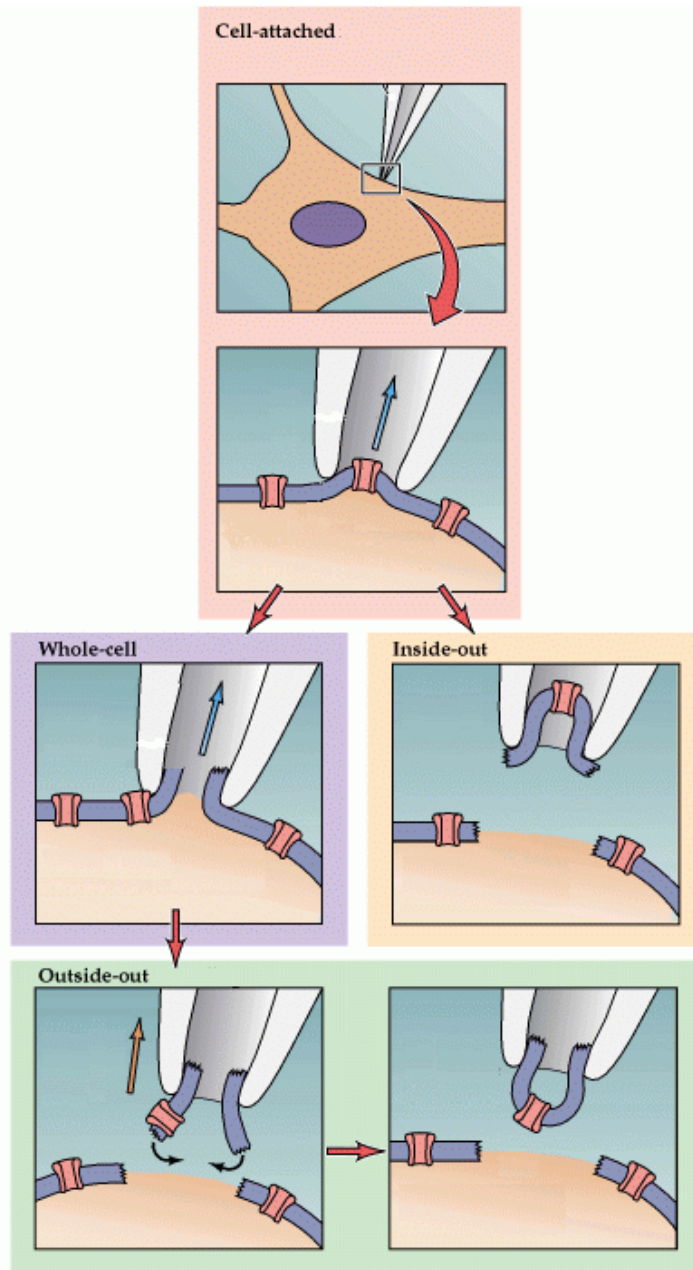


Figura 4. Le quattro configurazioni di *patch clamp*: *cell attached* (contorno rosa), *whole cell* (viola), *inside-out* (giallo) e *outside-out* (verde). Modificato da Purves et al., 2001.

1.4. Le Ascidie

Le ascidie sono invertebrati marini sessili ubiquitari, di forma cilindrica allo stadio adulto. La classe degli ascidiacei è una delle tre classi appartenenti al subphylum degli Urocordati (Figura 5) e comprende circa 1.600 specie. Le ascidie mancano di colonna vertebrale, ma possiedono tre caratteristiche distintive, riscontrabili solo durante lo stadio larvale e che si perdono nell'adulto: una notocorda, una corda nervosa dorsale cava e fessure faringee. Tali strutture sono tipiche dei cordati e consentono di classificare le ascidie nell'ambito di tale phylum.

Phylum
CHORDATA

Subphylum
UROCHORDATA (TUNICATA)

Classe
ASCIDIACEE

Ordine
ENTEROGONIA

Sottordine
PHLEBOBRANCHIATA

Famiglia
CIONINAE

Genere
CIONA

Specie
CIONA INTESTINALIS

Figura 5. Classificazione della *Ciona intestinalis*.

Le ascidie si trovano nelle acque costiere, attaccate con una estremità della loro struttura tubulare a vari substrati naturali e non (Figura 6). Dal lato opposto terminano con i due sifoni, uno boccale e uno cloacale, che consentono il passaggio di una corrente di acqua attraverso il corpo dell'animale. L'intero corpo

di tale organismo è coperto da una tunica colorata e a volte dura, da cui il nome Tunicati. La tunica è composta principalmente da cellulosa, proteine e spicole di calcio.



Figura 6. Foto di *Ciona intestinalis*, animale adulto.

Molti tunicati sono ermafroditi, con un unico testicolo e un unico ovario che giacciono in stretto contatto con l'ansa intestinale. (Figura 7). L'ovario è posto al di sopra dello stomaco ed è una struttura a forma di sacco con due bande laterali, le aree germinali. Nell'ovario si possono rinvenire ovociti immaturi di varie dimensioni e a vari stadi di ovogenesi (Sato, 1994; Prodon et al., 2006). Gli

ovociti maturi sono trasportati nell'ovidutto, che corre parallelo all'intestino e sbocca nella cloaca di fronte l'ano. Il testicolo giace al di sotto dell'ovario ed è formato da un grappolo di piccole sacche che confluiscono nello spermidutto. Tale dotto si muove parallelamente all'ovidutto e si apre anch'esso nella cloaca.

I tunicati sono filtratori, cioè si nutrono di plancton che filtrano dall'acqua che attraversa la loro faringe. (Dale, 1989).

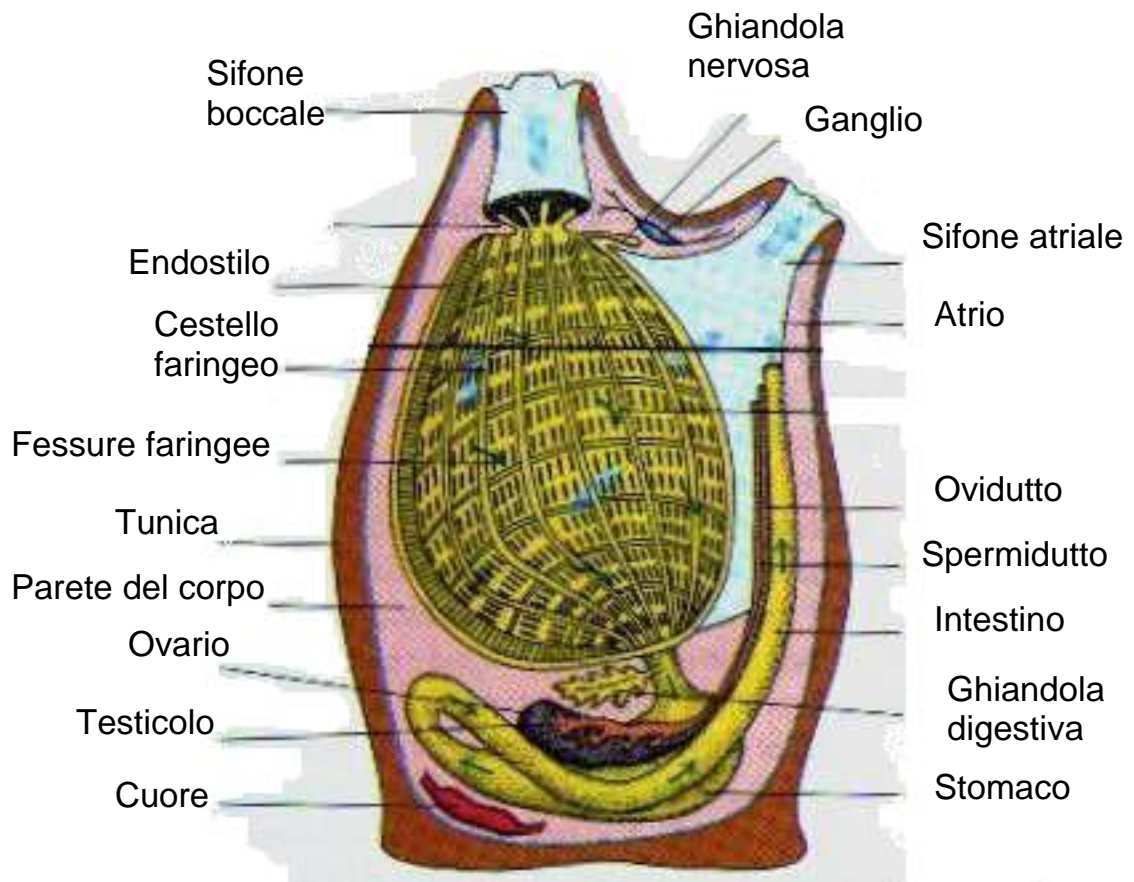


Figura 7. Rappresentazione generale dell'organizzazione anatomica interna delle ascidie

1.5. Maturazione e Fecondazione

La maturazione ovocitaria rappresenta l'ultima fase dell'ovogenesi (Figura 8), durante cui l'ovocita va incontro ad una serie di modificazioni necessarie per l'ovulazione e per la successiva ed eventuale interazione con lo spermatozoo. Più precisamente, la maturazione ovocitaria è il periodo che va dal primo al secondo arresto meiotico e coinvolge modificazioni citoplasmatiche e nucleari (Eppig, 1996).

La maturazione citoplasmatica è caratterizzata da modificazioni strutturali e fisiologiche: 1) cambiamenti nel profilo di espressione delle proteine di controllo del ciclo cellulare, responsabili nel condurre l'ovocita verso la competenza di sviluppo (Whitaker e Patel, 1990; Masui, 1996; Whitaker, 1996); 2) redistribuzione degli organelli (Ducibella et al., 1988; Santella et al., 1999; Wessel et al., 2001); 3) modificazioni della permeabilità di membrana (Carroll, 2000; Cuomo et al., 2005); 4) differenziamento del meccanismo di trasduzione del calcio (Machaca, 2004).

La maturazione nucleare è invece rappresentata dalla meiosi, il processo di divisione cellulare che avviene solo nei gameti, che porta alla formazione di cellule aploidi altamente specializzate per la fecondazione (Tosti, 2006)

In quasi tutte le specie studiate finora, gli ovociti presenti nell'ovario sono generalmente racchiusi all'interno di follicoli e arrestati allo stadio meiotico di prima profase (PI). Questo stadio è caratterizzato da un grosso e evidente nucleo,

detto vescicola germinale (VG), che contiene la cromatina solo parzialmente condensata. Nel corso di tale primo blocco avviene la crescita ovocitaria (Sagata, 1996), cioè la sintesi e l'accumulo di grandi quantità di metaboliti necessari per gli eventi successivi; per tale motivo tale stadio è caratterizzato da un'attiva trascrizione e una quantità doppia ($4n$) di DNA. In seguito all'interazione con uno stimolo ormonale, nell'ovocita si ha una ripresa meiotica, morfologicamente evidente dalla rottura della vescicola germinale (detta *germinal vesicle breakdown*, GVBD) e dalla dispersione dei nucleoli (Masui e Clarke, 1979), fino a un secondo nuovo blocco, variabile da specie a specie. Nelle ascidie e nei molluschi, il secondo blocco avviene in metafase I (MI), mentre nei vertebrati, inclusi i mammiferi, in metafase II (MII) (Thibault, 1969; Masui, 1985; Tosti e Dale, 1995; Colas e Dube, 1998). L'interazione con lo spermatozoo induce il completamento della meiosi ovocitaria e la formazione di un embrione dando così vita ad un nuovo individuo (Figura 8).

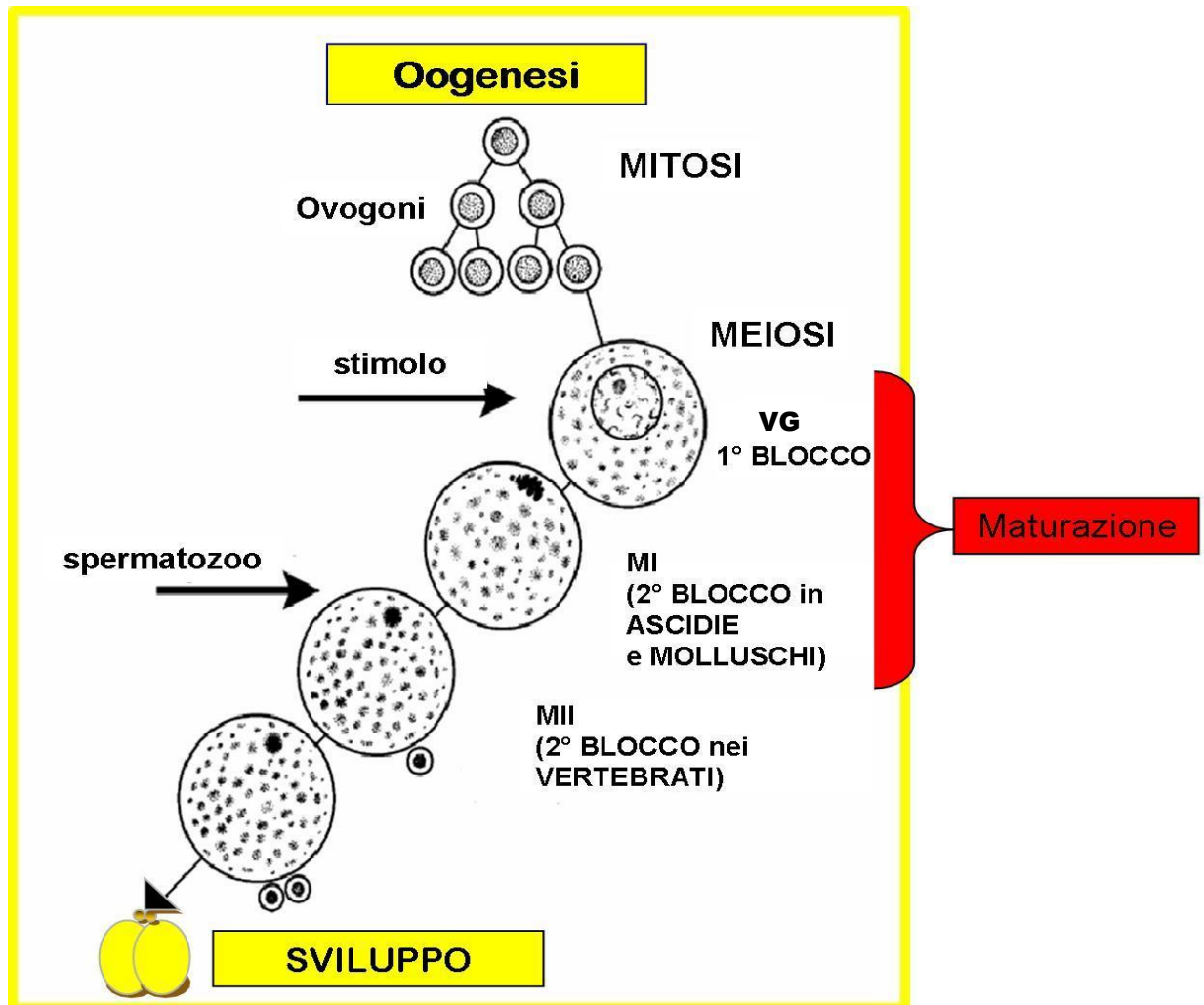


Figura 8. Rappresentazione schematica della maturazione oocitaria nei mammiferi. Le cellule germinali primordiali sono gli ovogoni che si dividono per mitosi e poi entrano in meiosi bloccandosi allo stadio di vescicola germinale (VG). Alla maturità sessuale uno stimolo fa ripartire la meiosi che si blocca nuovamente in MI o MII a seconda delle specie. Lo spermatozoo rimuove il secondo blocco a seguito della sua interazione con l'ovocita e consente l'avvio dello sviluppo di un nuovo individuo.

Subito dopo l'interazione con lo spermatozoo, l'ovocita va incontro a modificazioni elettriche, morfologiche e metaboliche (Dale, 1994), la cui sequenza temporale dipende dalle specie. Negli invertebrati, il primo evento di

fecondazione è una corrente ionica in entrata accompagnata dalla depolarizzazione del potenziale di riposo (Dale e De Felice, 1984; De Simone et al., 1998). A questo evento elettrico fa seguito un rilascio di calcio che, negli echinodermi, provoca la rottura dei granuli corticali e l'innalzamento della membrana di fecondazione (Giudice, 1985). Il rilascio di calcio alla fecondazione è un evento esplosivo e universale e si ritiene che dia il segnale di avvio per lo sviluppo (Jaffe, 1980). I meccanismi di rilascio e propagazione di calcio sono vari (Swann e Parrington, 1999) e nei mammiferi rappresentano anche il segnale per l'induzione della corrente di fecondazione, modulando i canali di potassio dipendenti dal calcio (Miyazaki e Igusa, 1981; Dale et al., 1996; Tosti et al., 2002). Agli eventi elettrici e al rilascio di calcio fanno seguito una serie di eventi metabolici a cascata. Tra questi vanno menzionati la mobilitazione dei fosfoinositidi di membrana, il rilascio di alcuni messaggeri come IP_3 e DAG, un aumento di poche unità di pH, l'inattivazione del *mitosis promoting factor* (MPF), la ripresa meiotica (Yanagimachi, 1994; Abrieu et al., 2001).

Nelle ascidie, il primo evento di fecondazione è una variazione transitoria del potenziale di riposo, che depolarizza in seguito all'apertura di canali ionici aspecifici, detti canali di fecondazione (Dale e De Felice, 1984; Dale, 1994). Questi canali danno vita ad una corrente elettrica in entrata (corrente di fecondazione), seguita da una contrazione del corpo cellulare, un processo quest'ultimo peculiare delle ascidie e dovuto alla mancanza dei granuli corticali. La contrazione è dovuta all'onda di calcio che attraversa l'ovocita dal polo vegetativo a quello animale (Brownlee e Dale, 1990). Questo processo è

temporaneo e l'ovocita ritorna alla sua classica forma sferica entro circa un minuto (Figura 9).

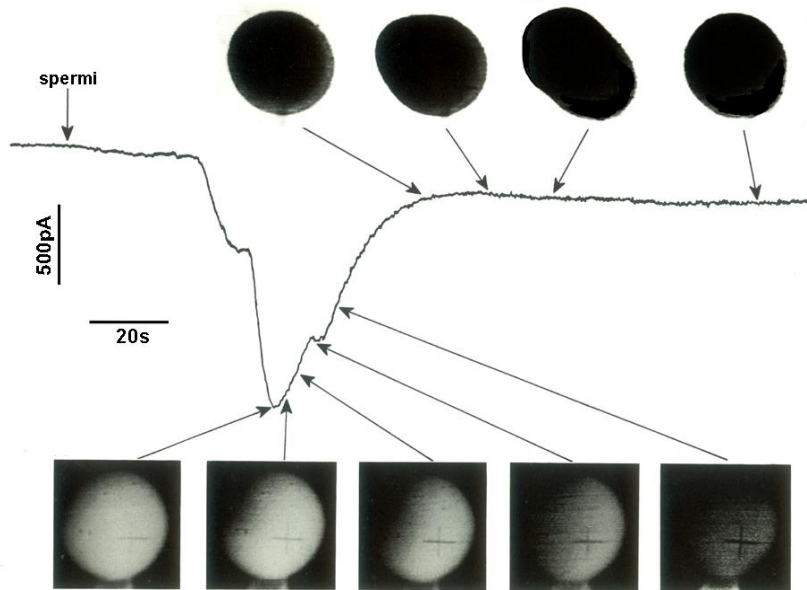


Figura 9. La corrente di fecondazione (centro), la contrazione dell'ovocita fecondato (alto) e l'onda di calcio (basso), sono gli eventi cui va incontro l'ovocita di *Ciona intestinalis* dopo l'interazione con lo spermatozoo (modificato da Brownlee e Dale, 1990).

In seguito all'interazione con lo spermatozoo, l'ovocita fecondato esce definitivamente dalla meiosi e inizia la segmentazione, con una serie di ripetute e veloci divisioni mitotiche embrionali senza accrescimento cellulare (Russo et al., 1998). La fecondazione riavvia il ciclo meiotico facendo estrudere il primo e poi il secondo globulo polare nell'arco di 20 minuti circa. Dopo circa 50 minuti, lo zigote si divide per mitosi in due blastomeri, destro e sinistro, secondo un piano

meridiano lungo l'asse animale/vegetativo (A/V). Le divisioni cellulari procedono ogni 35 minuti circa. Dopo 24 ore circa si forma una larva mobile che ha la forma caratteristica di un girino. Questo stadio è particolarmente avanzato rispetto all'animale adulto, in quanto consta di una corda, un sistema nervoso e degli organi di senso. Queste strutture si perdono durante la metamorfosi quando la corda viene riassorbita e gli organi di senso scompaiono, dando vita ad un animale adulto invertebrato (Dale, 1989).

Il processo di maturazione ovocitaria è accompagnato da modificazioni fondamentali di organelli e strutture citoplasmatiche, come gli elementi citoscheletrici e il reticolo endoplasmatico, e sono caratteristiche della progressione meiotica (Voronina e Wessel, 2003).

Gli eventi meiotici nucleari sono orchestrati e diretti dal citoscheletro cellulare. L'ovocita in accrescimento è caratterizzato da microtubuli corticali labili e allungati, i quali subiscono una serie di drastici cambiamenti durante la maturazione ovocitaria (Boyle e Ernst, 1989; Smiley, 1990). I microtubuli si disassemblano gradualmente nella cortex e vanno a formare il fuso meiotico nell'ovocita in maturazione per la segregazione dei cromosomi durante la divisione.

I microfilamenti formano una sorta di binari per il movimento degli organelli durante la maturazione ovocitaria. Nell'ovocita in accrescimento degli echinodermi i microfilamenti sono stati trovati prevalentemente a livello della

cortex cellulare (Boyle ed Ernst, 1989, Heil-Chapdelaine e Otto, 1996). Negli ovociti di stelle e riccio di mare all'inizio della maturazione avviene la polimerizzazione di actina (Heil-Chapdelaine e Otto, 1996; Wessel et al., 2002), che pur essendo stata riscontrata anche nella cortex, avviene prevalentemente nel nucleo. Questa riorganizzazione non risulta comunque critica per la rottura della vescicola germinale, in quanto, inibendo con citocalasina la polimerizzazione, la GVBD avviene normalmente (Connors et al., 1998). I filamenti di actina nella vescicola germinale sono stati visti in ovociti di molti animali, quali riccio, stella di mare e rana (Parfenov et al., 1995; Heil-Chapdelaine e Otto, 1996; Wessel et al., 2002). Nei vertebrati, la polimerizzazione actinica sembra essere richiesta per la traslocazione del fuso meiotico dal centro della cellula a una posizione corticale asimmetrica, necessaria per l'estrusione del primo globulo polare (Ryabova et al., 1986; Connors et al., 1998; Kim et al., 2000; Maro e Verlac, 2002).

Il reticolo endoplasmatico (RE) di molte specie, quali il riccio di mare, la stella di mare, la rana e il topo, va incontro a cambiamenti significativi durante il processo di maturazione. Tali modificazioni sono particolarmente interessanti poiché questi organelli rilasciano calcio alla fecondazione mediando gli eventi di attivazione e, inoltre, tale capacità è acquisita nel corso della maturazione. Gli ovociti immaturi di tutte le specie studiate posseggono una rete di tubuli di RE abbastanza uniforme, con cisterne individuali o accumulate poste in profondità nel citoplasma (Jaffe e Terasaki, 1994; Mehlmann et al., 1995; Terasaki et al., 2001; Bobinnec et al., 2003). I cambiamenti dell' RE riscontrati nel corso della maturazione includono la sua riorganizzazione (Henson et al., 1990; Jaffe e

Terasaki, 1994; Mehlmann et al., 1995; Terasaki et al., 2001) e l'accumulo di ammassi (*cluster*) di RE organizzati immediatamente al di sotto della membrana plasmatica (Henson et al., 1990; Mehlmann et al., 1995; Shiraishi et al., 1995; Terasaki et al., 2001). Diverse caratteristiche del comportamento dell' RE sono presenti solo nella meiosi: nell'ovocita in maturazione, l' RE non è associato con il fuso meiotico, mentre tale associazione è stata riscontrata nelle cellule mitotiche (Terasaki et al., 2000; Bobinsec et al., 2003). Inoltre, la formazione dei cluster corticali è richiesta per i meccanismi di rilascio del calcio alla fecondazione. Questi cluster scompaiono tempo dopo la fecondazione, non essendo più riscontrabili nelle cellule mitotiche dell'embrione (FitzHarris et al., 2003). Negli ovociti maturi di Ciona un monostrato di tubuli di reticolo endoplasmatico corre sotto la membrana plasmatica, nella cortex cellulare, con una densità che aumenta lungo l'asse animale/vegetativo (Sardet et al., 1992; Prodon et al., 2005). Benchè questo sottile strato di reticolo ruvido sia in continuità con il resto della rete di RE ovocitaria, possiede delle caratteristiche particolari: sono riscontrabili legati ad esso specifici RNA materni e proteine (Sardet et al., 2003; Nakamura et al., 2005; Prodon et al., 2005; Sardet et al., 2007).

Durante l'accrescimento ovocitario, gli ovociti sono trascrizionalmente attivi e accumulano grandi quantità di mRNA, ma il contenuto dei messaggeri cambia con la maturazione. Questa variazione nella popolazione di mRNA è ottenuta sia interrompendo la trascrizione con l'inizio della GVBD, sia degradando gruppi

selezionati di trascritti (Masui e Clark, 1979; Smith e Richter, 1985). Generalmente, la maturazione meiotica non richiede sintesi di mRNA, ma il pattern della sintesi proteica cambia significativamente: infatti, viene stimolata la traduzione di alcuni trascritti e repressa quella di altri (Smith e Richter, 1985; Hake e Richter, 1997). La repressione della traduzione può essere ottenuta sia con la degradazione degli mRNA, sia con la deadenilazione selettiva. Nel riccio di mare, per esempio, la produzione delle proteine del vitello (Wessel et al., 2000) e del contenuto dei granuli corticali (Laidlaw e Wessel, 1994) è estremamente attiva nell'ovocita in accrescimento, ma cessa all'inizio della maturazione meiotica a causa della degradazione degli mRNA. In *Xenopus* e nel topo, durante la maturazione una specifica classe di mRNA materni è deadenilata inibendone così la traduzione (Varnum e Wormington, 1990; Paynton e Bachvarova, 1994). Invece, l'attivazione della traduzione di specifici trascritti durante la maturazione è ottenuta allungando la sua coda di poli (A) (Hake e Richter, 1997) e arrivando così a incrementare di diverse volte il tasso di sintesi proteica generale (Smith e Richter, 1985; Wasserman et al., 1986). Dunque, esiste un meccanismo di regolazione negativo costituito dalla deadenilazione dei trascritti o dalla loro interazione con proteine che legano l'RNA. Viceversa, la traduzione è attivata dalla poliadenilazione citoplasmatica dei trascritti materni grazie anche all'intervento di proteine embrione-specifiche che legano la poli (A) (Bettegowda e Smith, 2007).

Cambiamenti qualitativi nel pattern della sintesi proteica sono stati osservati in molti animali come ad esempio stelle di mare, rana e topo. Le proteine prodotte

durante la maturazione sono, per la maggior parte, regolatrici del ciclo cellulare necessari per procedere avanti con la meiosi, come la ciclina B, la componente regolatrice del fattore promuovente la maturazione, e c-mos, richiesta per due divisioni consecutive di meiosi. In accordo con quanto detto, l'utilizzo di inibitori della sintesi proteica blocca la maturazione ovocitaria in molte specie, ma non in tutte. Alcuni animali sembrano avere tutte le proteine necessarie già prodotte e conservate nell'ovocita, come ad esempio il mollusco *Spisula* (Hunt et al., 1992). Altri necessitano di sintetizzare ciclina, come avviene negli ovociti di pesci e topi, ma anche nella stessa *Ciona* diversamente da altre ascidie (Lambert, 2008).

Durante la vitellogenesi, gli mRNA si spostano dalla zona perinucleare fino alla cortex cellulare. Prima della GVBD, negli ovociti post-vitellogenicici, gli mRNA legati all'ER sono localizzati al di sotto della superficie in maniera uniforme. Durante la maturazione meiotica la loro distribuzione diviene polarizzata lungo l'asse A/V insieme con il reticolo endoplasmatico. In *C. intestinalis*, tale processo impiega circa 2-3 ore dall'inizio della GVBD (Prodon et al., 2006; Sardet et al., 2007).

Gli ovociti di ascidia, una volta maturi, presentano una caratteristica notevole: una numerosa popolazione di mRNA (più di quaranta in *C. intestinalis*) distribuiti lungo l'asse animale-vegetativo secondo un gradiente crescente (Yamada et al., 2005; Yamada, 2006; Sardet et al., 2007).

1.6. Stimolo della maturazione meiotica

Il controllo della maturazione ovocitaria coinvolge una complessa serie di interazioni reciproche fra ovocita, strutture extracellulari e ambiente, con la partecipazione di numerose vie metaboliche. La ripresa della maturazione meiotica si basa su due differenti meccanismi: una stimolazione positiva e la rimozione di un segnale inibitorio. Il primo coinvolge la produzione di un ligando che agisce sull'ovocita allo stadio VG inducendo la GVBD. Mentre questo meccanismo generale è comune a quasi tutte le specie studiate, la natura del ligando che rimuove il primo blocco meiotico cambia da specie in specie (Tosti, 2006).

È stato scoperto che tale stimolo è rappresentato dalla 1 metil-adenina nelle stelle di mare (Mita, 2000), dalla serotonina nei molluschi (Colas e Dubè, 1998), dagli steroidi nei pesci (Iwamatsu et al., 1993) e negli anfibi (Schorderet-Slatkine, 1972), e infine dal picco di ormone luteinizzante (LH) nei mammiferi (Moor et al., 1981), o, forse, secondo le ultime ipotesi dallo sterolo *FF-MAS* (*Follicular Fluid Meiosis-Activating Sterol*, cioè sterolo del fluido follicolare attivante la meiosi) (Byskov et al., 1995) (Tabella 1).

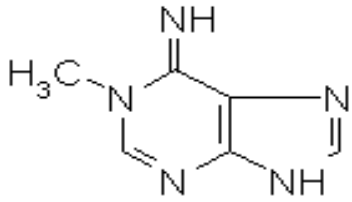
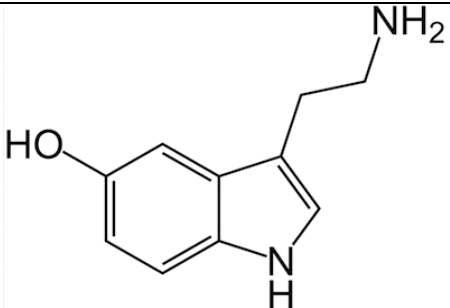
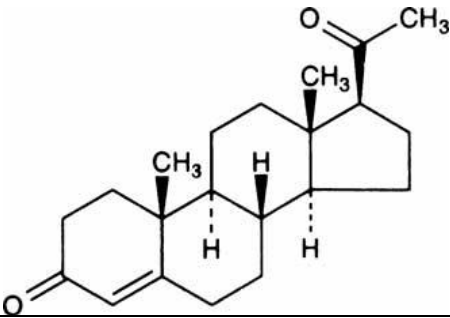
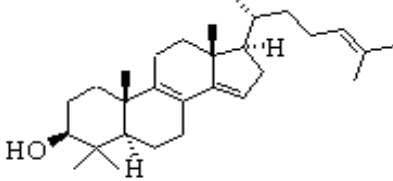
Specie	Nome Induttore	Struttura Induttore
Stella di mare	1 metil-adenina	
Molluschi	Serotonina	
Rana	Progesterone	
Mammiferi	FF-MAS	

Tabella 1. Nomi e strutture di alcuni possibili induttori della maturazione ovocitaria in varie specie animali.

In assenza di uno stimolo positivo, l'arresto meiotico sembra essere mantenuto dall'ambiente che circonda l'ovocita: infatti, in alcune specie gli ovociti vanno

incontro a maturazione non appena vengono isolati dai loro follicoli o dal mezzo esterno, indicando perciò che questi ultimi contengano sostanze deputate a prevenire la ripresa meiotica degli ovociti arrestati in PI (Edwards, 1965; Tsafiriri e Pomerantz, 1986). Tale maturazione spontanea può essere indotta: 1) dalla semplice esposizione all'acqua di mare come avviene negli ovociti post-vitellogenicici delle ascidie *H. roretzi* (Sakahiri e Shirai, 1991) e *C. intestinalis* (Satoh, 1994; Prodon et al., 2006); 2) dalla rimozione degli ovociti dal loro ambiente follicolare o delle cellule accessorie che circondano gli ovociti di anfibi (Sanchez-Toranzo, 2007) e mammiferi (Edwards, 1965; Tsafiriri et al., 2002; Coticchio et al., 2004; Rossi et al., 2006 ; Ye et al., 2007).

Considerando l'esistenza di una correlazione tra i suddetti meccanismi, la GVBD potrebbe avvenire attraverso: 1) la generazione di un segnale che a sua volta è trasferito all'ovocita tramite le follicolari; 2) l'annullamento dell'inibizione ambientale tramite la rimozione del contatto tra l'ovocita e le cellule follicolari e attraverso la chiusura delle giunzioni che li connettono (Eppig, 1991).

Una volta che i follicoli hanno completato l'accrescimento, l'arresto in VG richiede una elevata attività della proteina chinasi A (PKA) all'interno dell'ovocita. Perciò, per mantenere l'arresto meiotico dell'ovocita, dopo la rimozione dall'ovario, è necessaria l'aggiunta di analoghi dell'AMP ciclico (AMPC) o inibitori delle fosfodiesterasi al mezzo di cultura (Eppig, 1989; Tornell et al., 1991; Conti et al., 1998; Dekel, 2005; Mehlmann, 2005; Jones, 2008).

In vivo, una proteina G associata ad un recettore sulla membrana plasmatica dell'ovocita fornirebbe l'adeguata quantità di AMPc per mantenere il blocco in VG (Mehlmann et al., 2002, 2004).

Rimane ancora da chiarire se il picco di LH inibisca questo recettore o stimoli le fosfodiesterasi per diminuire l'attività del PKA (Mehlmann et al., 2006). Inoltre, ci sono diversi studi in corso sugli intermediari che forniscono all'ovocita il segnale necessario dell'avvenuto aumento di LH, dal momento che tale ormone agisce sulle cellule più esterne della granulosa: infatti, le cellule del cumulo più interne e gli ovociti mancano del recettore dell'LH (Peng et al., 1991; Eppig et al., 1997; Mehlmann 2005; Jones, 2008). Forse il segnale potrebbe essere costituito dallo FF-MAS, cioè sterolo del fluido follicolare attivante la meiosi) prodotto dalle cellule del cumulo (Byskov et al., 1995, 2002; Coticchio et al., 2004; Mehlmann, 2005), ma ci sono dubbi sulla sua reale rilevanza fisiologica (Tsafirri et al., 2005). L' FF-MAS è un intermedio della sintesi del colesterolo (Schroepfer, 1982), isolato per la prima volta dal fluido follicolare umano (Byskov et al., 1995). Nel topo, i livelli di FF-mas aumentano in seguito all'iniezione di gonadotropina umana corionica, che stimola i recettori dell'LH (Baltsen, 2001). Questo sterolo è in grado di stimolare la ripresa meiotica in diverse specie di mammiferi, come nel topo, nel ratto e nella specie umana (Byskov et al., 1995, Grøndahl et al., 1998, 2000; Hegele-Hartung et al., 1999, 2001; Mehlmann, 2005). D'altro canto la maturazione meiotica nei mammiferi procede indisturbata anche quando la produzione di steroidi è rigorosamente repressa. Probabilmente gli steroidi sono coinvolti nella crescita follicolare, nella differenziazione delle cellule somatiche e

nell'acquisizione della competenza di sviluppo degli ovociti maturi migliorando la maturazione citoplasmatica (Tsafiriri e Motola, 2007; Grøndahl, 2008).

Calcio

Il ruolo delle correnti ioniche nella fisiologia dell'ovocita è descritta in molte specie animali (Hagiwara e Jaffe, 1979; Schlichter, 1989; Moody, 1998; Tosti e Boni, 2004). In particolare, è noto che le correnti di calcio sono vitali per un'ampia gamma di processi fisiologici (Carafoli, 2002; Berridge et al., 2003). L'aumento di calcio nella cellula avviene grazie a due meccanismi: un efflusso dalle riserve interne degli organelli attraverso i canali di membrana aperti da ligandi e un ingresso dall'esterno attraverso i canali ionici della membrana plasmatica (Tosti, 2006). Per quanto riguarda il primo meccanismo, in tutti i tipi cellulari sono coinvolti i canali ionici dell'RE e del reticolo sarcoplasmatico: i recettori della rianodina (Ryr) e dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃R).

Il *pathway* dei fosfoinositidi è di primaria importanza nella mobilizzazione del calcio intracellulare, dal momento che l'aumento del fosfatidil inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) genera correnti di calcio transitorie che originano dalle riserve intracellulari (Berridge, 1993; Pozzan et al., 1994).

I canali e i recettori dell' IP₃ e della RY condividono una serie di caratteristiche comuni per quanto riguarda sia l'amplificazione del rilascio di calcio mediante un

meccanismo a *feedback* positivo, sia l'arresto grazie ad un *feedback* negativo (Bootman e Berridge, 1995).

Nei tessuti eccitabili, l'ingresso di calcio nelle cellule è dovuta all'apertura dei canali di calcio sensibili al voltaggio, i quali regolano l'influsso di calcio in risposta alla depolarizzazione della membrana plasmatica (Catterall, 2000). Una connessione tra i due *pathway* è supportata dai canali aperti dalle riserve (*store operated channels*) (Parekh, 2003), attraverso i quali un influsso di calcio è indotto dallo svuotamento delle riserve interne (Putney, 1990).

È oramai ben documentato che il calcio è coinvolto nei processi fisiologici ovocitari, dall'ovogenesi alla fecondazione (Homa et al., 1993; Whitaker e Swann, 1993; Homa, 1995; Carroll et al., 1996; Stricker, 1999). In particolare, è stato descritto che la transizione da una fase meiotica alla successiva è regolata da punti di controllo (*checkpoint*) del ciclo cellulare, i quali, a loro volta, sono controllati da un aumento transitorio del calcio intracellulare (Whitaker e Patel, 1990). Una generale correlazione fra calcio e GVBD è stata dimostrata da numerosi studi. Negli ovociti di mammifero, la GVBD è bloccata da sostanze chelanti il calcio almeno fino allo stadio di prima metafase (Homa, 1995), mentre, in assenza dell'aumento del calcio intracellulare, la ripresa spontanea della meiosi non avviene *in vitro* (Carroll et al., 1994).

Dalla letteratura emerge che la ripresa meiotica è mediata da correnti di calcio sia intracellulari che della membrana plasmatica, a volte in cooperazione sinergica. Nella stella di mare non è mai stata dimostrata una diretta correlazione fra GVBD e correnti di calcio interne (Witchel e Steinhardt, 1990), ma ci sono prove del

coinvolgimento dei canali di calcio interni durante la maturazione (Chiba et al., 1990; Stricker et al., 1994; Santella et al., 1999; Iwasaki et al., 2002). Un ruolo del calcio esterno nell'induzione della GVBD nei molluschi, più precisamente in *Spisula*, è stato documentato per la prima volta da Allen nel 1953. L'afflusso di calcio dall'esterno attraverso i canali di calcio fu confermata negli ovociti di questa specie e di altri molluschi, sia quelli che sono fecondati allo stadio di PI (Dubè, 1988, Deguchi e Osanai, 1994), sia quelli allo stadio MI (Dubè e Guerrier, 1982; Cuomo et al., 2005). Ben presto fu chiaro che c'era anche un'influenza del calcio intracellulare delle riserve interne in quasi tutte le specie di molluschi studiate (Guerrier et al., 1993; Deguchi e Osanai, 1994; Juneja et al., 1994). Come regola generale nei molluschi, le correnti di calcio attive sulla membrana plasmatica generano una depolarizzazione che, a sua volta, dà origine alle correnti di calcio dalle riserve intracellulari (Colas e Dubè, 1998; Deguchi e Morisawa, 2003).

Malgrado l'ampio numero di studi sulle ascidie, ci sono solo esigue informazioni sui meccanismi che inducono il passaggio dallo stadio PI a MI (Russo et al., 1998). Recentemente Lambert (2005) ha analizzato tali meccanismi indicando che, in alcune specie, lo ionoforo per calcio induce la GVBD (Sakahiri e Shirai, 1991). Inoltre, è stato dimostrato che il calcio intracellulare può sia indurre che inibire l'inizio della GVBD (Sun e Machaca, 2004). Sebbene questi dati dimostrassero un ruolo generale del calcio, uno specifico coinvolgimento delle correnti ioniche è stato esaminato solo recentemente nell'ascidia *Ciona intestinalis*: la prima caratterizzazione elettrofisiologica della membrana plasmatica di ovociti allo

stadio VG e gli esperimenti di maturazione *in vitro* fanno ipotizzare un ruolo delle correnti di calcio nella maturazione (Cuomo et al., 2006).

Le correnti ioniche sono state ampiamente studiate negli ovociti immaturi di *Xenopus laevis* e *Rana esculenta*, dimostrando che le correnti di cloro hanno un ruolo preponderante nella fisiologia ovocitaria degli anfibi (Maller, 1985; Schlichter, 1989). Il calcio potrebbe, in qualche modo, essere coinvolto negli eventi precoci dell'induzione maturativa, in quanto in letteratura sono riportati aumenti transitori di calcio associati alla maturazione indotta da steroidi (Baulieu et al., 1978; Moreau et al., 1980). Comunque, negli anfibi, a parte un generale cambiamento della permeabilità di membrana durante la maturazione (Lau et al., 1994), non si è riuscito ancora a trovare una correlazione tra la GVBD e le attività delle correnti di calcio sia intracellulari che di membrana (Tosti, 2006).

Nella letteratura riguardante i mammiferi, è stato dimostrato che la maturazione spontanea in ovociti di topo (De Felici et al., 1991; Carroll e Swann, 1992) e maiale (Kaufmann e Homa, 1993) richiede oscillazioni di calcio intracellulare e che vi è una correlazione tra le correnti di calcio intracellulari e la maturazione ovocitaria in diverse specie (Batta e Knudsen, 1980; De Felici et al., 1991; Kaufmann e Homa, 1993; Carroll et al., 1994). A livello della membrana dell'ovocita immaturo ci sono canali sia specifici che non specifici per il calcio, che generano correnti (Yoshida, 1982, 1983; Peres 1986), mentre il calcio esterno sembra essere richiesto solo per la maturazione nel criceto (Racowski, 1985) e in altri mammiferi (Powers e Paleos, 1982; Preston et al., 1987; Goron et al., 1990; Mattioli e Barboni, 2000). Caratterizzazioni elettrofisiologiche degli ovociti

immaturi murini hanno mostrato che le correnti di calcio della membrana plasmatica aumentano selettivamente nell'ovocita in accrescimento e tale aumento precede la maturazione nucleare; perciò l'inizio della maturazione potrebbe essere regolato dalle correnti di calcio a livello intracellulare o della membrana plasmatica (Murnane e De Felice, 1993). Sempre nei topi, è stato dimostrato che gli ovociti arrestati allo stadio VG o in GVBD presentavano difetti nell'espressione dei canali di calcio, indicando quindi che la competenza meiotica ovocitaria dipende da un incremento della densità dei canali (Lee et al., 2004). L'applicazione delle stesse tecniche elettrofisiologiche sull'ovocita bovino ha evidenziato l'attività delle correnti di calcio della membrana plasmatica durante la progressione meiotica (Tosti et al., 2000) e una preponderanza delle riserve di calcio allo stadio VG (Boni et al., 2005). Questi dati indicherebbero una possibile associazione tra l'aumento di calcio indotto dall'LH e le correnti di calcio della membrana plasmatica: infatti, le correnti di calcio potrebbero fornire un meccanismo alternativo/supplementare di ingresso del calcio nel citoplasma ovocitario durante la ripresa meiotica, oltre al calcio rilasciato dalle riserve interne (Tosti, 2006). Così come nei bovini, anche gli ovociti di pecora hanno mostrato un coinvolgimento delle correnti di calcio nella transizione VG/MII (Boni et al., 2005).

1.8. AMP ciclico (AMPC)

L' Adenosina 3':5'- monofosfato o AMPC (Figura 10), è uno dei messaggeri secondari più importanti insieme allo ione calcio. L'AMPC è in grado di modificare le funzioni cellulari in tutte le cellule eucariotiche, attraverso l'attivazione di proteine chinasi AMPC-dipendenti o tramite canali ionici sensibili a tale molecola.

L'AMPC blocca la maturazione spontanea della meiosi in numerose specie, come la stella di mare (Taieb et al., 1997), *Xenopus* (Ferrel, 1999), maiale (Racowsky, 1985; Sasseville et al., 2006), bovino (Aktas et al., 1995), ratto (Dekel et al., 1981) e il topo (Vivarelli et al., 1983; Conti et al., 2002).

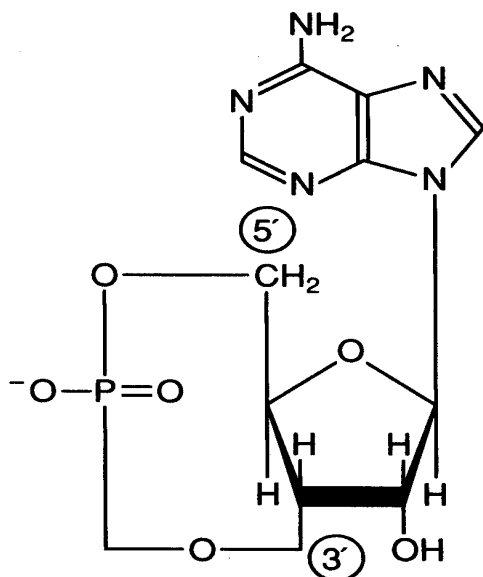


Figura 10. Struttura della molecola di AMPC

I livelli cellulari dell'AMPc riflettono il bilancio tra l'attività dell'adenilato ciclasi e delle fosfodiesterasi (Figura 11): infatti, queste due famiglie di enzimi catalizzano rispettivamente la conversione dell'ATP in AMPc e dell'AMPc in AMP.

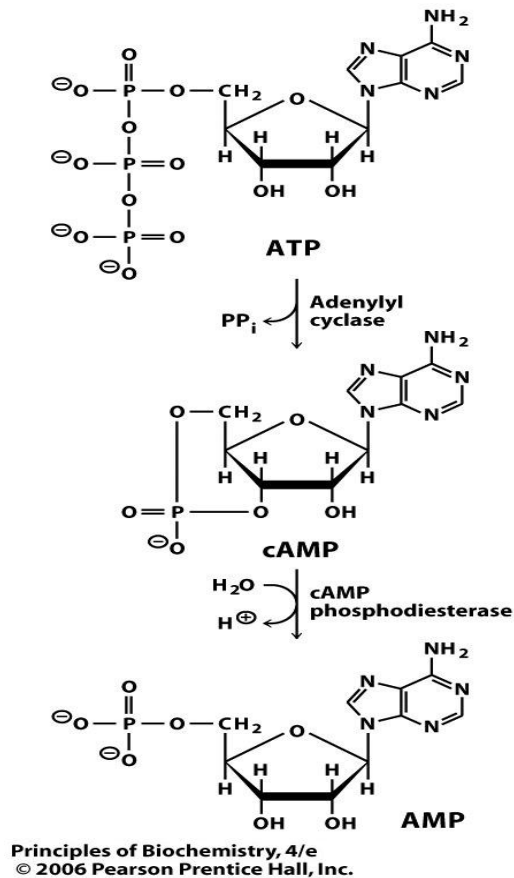


Figura 11. Biosintesi e degradazione dell'AMPc

L'AMPc potrebbe essere sintetizzato sia dall'ovocita che dalle cellule follicolari che lo circondano. Un'ipotesi di vecchia data sostiene che l'AMPc sia prodotto dalle cellule follicolari e diffonda nell'ovocita attraverso le giunzioni comunicanti (Anderson e Albertini, 1976; Bornslaeger e Schultz, 1985; Piontkewitz e Dekel, 1993; Webb et al., 2002); ciò sarebbe confermato dalla presenza di giunzioni

comunicanti tra l'ovocita e le cellule del cumulo (Albertini e Anderson, 1974; Anderson e Albertini, 1976). Un'ipotesi alternativa su come sono mantenuti alti livelli di livelli di AMPc riguarda solo l'ovocita: gli ovociti competenti per la maturazione produrrebbero da soli l'AMPc mediante un recettore presente sulla membrana plasmatica ovocitaria, il quale stimola una proteina G stimolatoria (Gs) e, quindi, l'adenilato ciclasi (Mehlmann, 2005).

L'intero *pathway* è schematizzato in figura 12.

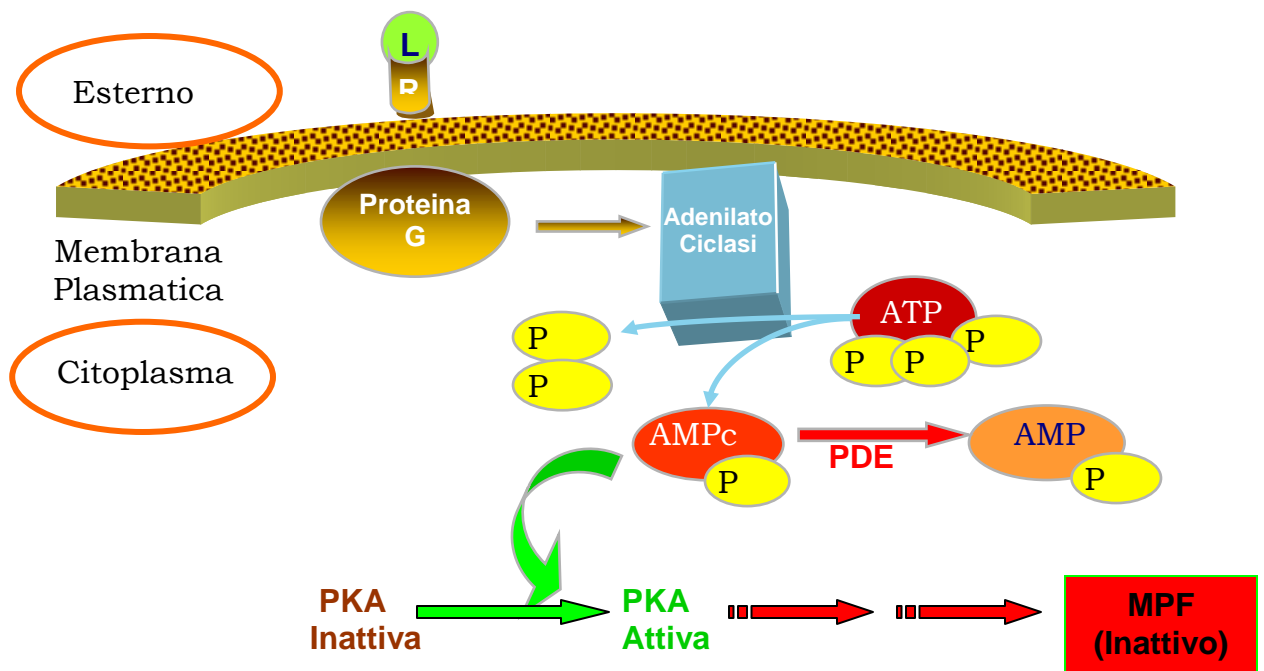


Figura 12. AMPc *pathway*. Il ligando L si lega al recettore R all'esterno della cellula. Il segnale è trasmesso all'interno della cellula tramite una proteina Gs, la quale stimola l'adenilato ciclasi per mantenere alti i livelli di AMPc. A ciò contribuisce anche la bassa attività della PDE. L'AMPc attiva la PKA che, indirettamente, mantiene l'MPF in uno stato non attivo. L=Ligando; R=Recettore; ATP=Adenosin trifosfato; P= Gruppo fosfato; AMPc= Adenosin monofosfato ciclico; AMP= adenosin monofosfato; PDE= fosfodiesterasi; PKA= Protein chinasi di tipo A.

1.8.1. Proteina G

Una delle più importanti molecole di segnalazione per la sintesi dell'AMP ciclico è la proteina G eterotrimerica (Richard, 2007). Le proteine G, sono molecole universalmente coinvolte nella trasduzione dei segnali all'interno della cellula e sono presenti nella maggior parte dei tessuti. Tali proteine di regolazione guanina-nucleotide-dipendente possono essere inibitorie (Gi) o stimolatorie (Gs) e sono formate da un complesso costituito da tre tipi di subunità: alfa (α , è una GTPasi), beta (β) e gamma (γ). L'energia necessaria per la loro azione proviene dall'idrolisi di una molecola di GTP a GDP. Differenti subunità $G\alpha$ hanno diversi bersagli e, allo stesso tempo, alcune proteine $G\alpha$ hanno effetti opposti sugli stessi obiettivi: per esempio, sia $G\alpha_s$ sia $G\alpha_i$ hanno come *target* l'adenilato ciclasi, ma $G\alpha_s$ lo attiva mentre $G\alpha_i$ lo inibisce (Voronina e Wessel, 2003).

1.8.2. Adenilato Ciclasi (AC)

È un enzima che catalizza la conversione dell'ATP in AMPc. Nei mammiferi ci sono almeno dieci distinti isozimi dell'AC, tutti legati alla membrana, tranne uno che è solubile. La maggior parte è stimolata dal diterpene forskolina, mentre la regolazione da parte del calcio è isozima specifica.

1.8.3. Fosfodiesterasi (PDE)

Catalizzano la degradazione dell'AMPc in AMP. Studi *in vitro* mostrano che il mantenimento di alti livelli di AMPc mediante il blocco farmacologico delle PDE o l'attivazione delle adenilato ciclastasi previene la maturazione meiotica.

Ciò è vero anche *in vivo*, in quanto un aumento dei livelli di AMPc dopo il *knock-out* (spegnimento) del gene *pde3a* non consente la ripresa meiotica (Masciarelli et al., 2004; Han e Conti, 2006). Il PDE3A è l'enzima predominante per l'idrolisi dell'AMPc in topo, ratto, scimmia e probabilmente anche negli ovociti umani (Masciarelli et al., 2004; Richard et al., 2001; Choi et al., 2001).

1.8.3. Proteina chinasi A (PKA)

L'AMPc si lega alla PKA, attivandola, la quale, a sua volta, tramite un serie di passaggi ancora poco chiari, regola l'attività della fosfatasi CDC25 e delle chinasi inibitorie WEE1/MYT1 (Eppig et al., 2005), determinando così lo stato di fosforilazione dell'MPF e quindi la sua attività: CDC25 defosforila CDK1 (attivando l'MPF), mentre le chinasi vanno a fosforilare (MPF inattivo) i due residui già citati (Parker e Piwnika-Worms, 1992; Fattaey e Booher, 1997; Han e Conti, 2006).

1.8.5. Fattore promuovente la fase M (MPF)

È un fattore chiave per la regolazione mitotica e meiotica (Morgan, 1995; Han e Conti, 2006). L'MPF, o fattore promuovente la maturazione o promuovente la

fase M, è un complesso formato da una subunità catalitica, la chinasi cdc2 e una regolatrice, la ciclina B, ed è universalmente conservato, dal punto di vista evolutivo, essendo presente dai lieviti fino all'uomo. Cdc2 codifica per la chinasi p34 che si attiva in seguito a due eventi: legame fisico con la ciclina B ed eventi di fosforilazione e defosforilazione in siti specifici (Solomon, 1993; Russo et al., 1992, 2000 ; Han e Conti, 2006).

Nella fase G1 del ciclo cellulare Cdc2 è inattiva perchè non ancora legata alla ciclina B e perchè fosforilata da una chinasi inibitoria (Wee1) nei residui Thr-14, Tyr-15 e Ser-39 (i numeri si riferiscono alla posizione degli amminoacidi treonina, tirosina e serina nella proteina umana). Durante la fase S la ciclina B neosintetizzata si lega a Cdc2 (pre-MPF), ed infine, in metafase, la fosfatasi Cdc25 rimuove i gruppi fosforilati in Thr-14 e Tyr-15 mentre la chinasi Cak fosforila il sito attivante Thr-161. All'uscita dalla metafase si ha una nuova fosforilazione inibitoria su Thr-14 e Tyr-15, la defosforilazione su Thr-161 e la degradazione della ciclina B (Evans et al., 1983). L' MPF, una volta attivato, fosforila vari substrati coinvolti nella transizione G2/M, tra cui l'istone H1, coinvolto nella condensazione dei cromosomi, le proteine dell'involucro nucleare (GVBD), proteine del citoscheletro (coinvolte nell'organizzazione del fuso) e fattori di trascrizione (Gilbert, 1996). Negli ovociti, l'attività MPF si mantiene bassa in P-I (stadio GV), aumenta in GVBD e raggiunge i massimi livelli in M-I e M-II, mentre decresce nell'intervallo tra le due metafasi (Sagata, 1996; Whitaker, 1996).

1.9. Cellule follicolari e giunzioni comunicanti

Gli ovociti di molte specie si sviluppano in stretto contatto con le cellule somatiche dell'ovario. Per esempio, nei mammiferi, un complesso multistrato di cellule somatiche circonda l'ovocita formando una struttura specializzata, il follicolo. Le cellule follicolari formano con l'ovocita numerosi contatti specializzati attraverso canali intercellulari detti giunzioni comunicanti (Matova e Cooley, 2001). Tali strutture di connessione sono importanti perchè riforniscono l'ovocita di nutrienti e servono per la comunicazione tra ovocita e cellule somatiche.

Le giunzioni comunicanti giocano un importante ruolo di regolazione nella maturazione ovocitaria. Nei mammiferi, gli ormoni che servono allo sviluppo ovocitario esercitano la loro azione sulle cellule somatiche del follicolo, le quali trasmettono così il segnale all'ovocita. La ghiandola pituitaria rilascia le gonadotropine FSH (*Follicle Stimulating Hormone* o ormone follicolo stimolante) e LH. L'FSH stimola la proliferazione e il differenziamento delle cellule follicolari, l'LH induce la ripresa meiotica ovocitaria e l'ovulazione. Le cellule follicolari regolano l'avvio della maturazione dell'ovocita in risposta agli ormoni (Voronina e Wessel, 2003). Anche in altri vertebrati le giunzioni comunicanti hanno un ruolo importante: nell'ovocita del pesce ayu (*Plecoglossus altivelis*), infatti, le giunzioni comunicanti tra le cellule della granulosa e gli ovociti sono

necessarie per l'acquisizione della competenza di maturazione ovocitaria indotta dall'LH (Yamamoto e Yoshizaki, 2008).

Generalmente, l'ovocita è incapace di maturare durante il periodo di accrescimento (Masui e Clarke, 1979), ma una volta terminata la crescita e acquisita la competenza meiotica, le cellule della granulosa diventano il principale inibitore della progressione meiotica. Gli ovociti defollicolati di pesci e mammiferi vanno incontro a maturazione spontanea quando posti in coltura (Patino e Purkiss, 1993; Conti et al., 2002).

Anche dal punto di vista elettrofisiologico, le cellule del cumulo trasmettono segnali all'ovocita tramite le giunzioni comunicanti, sia per il mantenimento (Aktas et al., 1995) che per la rimozione (Batta e Knudsen, 1980) dell'arresto meiotico. Nel primo caso, il potenziale di riposo dell'ovocita è mantenuto in condizioni iperpolarizzate, mentre nell'altro caso avviene una depolarizzazione in risposta all'azione delle gonadotropine sulle cellule del cumulo (Mattioli et al., 1998), che conduce quindi alla progressione meiotica. Nonostante l'esistenza di questa interazione dovuta ai canali a bassa resistenza quali le giunzioni comunicanti, le cellule del cumulo e gli ovociti mantengono differenti potenziali di membrana (Emery et al., 2001).

Quando gli ovociti di topo o pesce, racchiusi in un follicolo e arrestati in profase I, sono trattati con sostanze che stimolano la GVBD, questa viene indotta ad una frequenza maggiore rispetto a quella ottenibile solo rimuovendo le cellule follicolari (Cerdea et al., 1993; Downs, 1995). Negli ovociti avvolti dal cumulo l'induzione della maturazione meiotica dipende dalla presenza di giunzioni

funzionali tra l'ovocita e le cellule del cumulo, come valutato sia inibendo chimicamente le giunzioni comunicanti in follicoli intatti, sia separando le cellule del cumulo dall'ovocita e successivamente ponendole insieme in coltura (Downs, 1995, 2001).

L'abbondanza delle giunzioni è regolata nella cellula dalla quantità di connexina, proteine che le costituiscono. Inoltre, la “*coupling efficiency*” è ulteriormente regolata dalle modificazioni dopo la sintesi delle connexine da parte di mediatori intracellulari (Kidder e Mhawi, 2002). Si ipotizza che la regolazione all'interno del follicolo delle giunzioni comunicanti follicolari possa essere coinvolta nell'induzione della maturazione (Racowsky et al., 1989).

Le interazioni tra le cellule del cumulo e l'ovocita diminuiscono alla fine della maturazione, insieme con l'espansione del cumulo e la rottura delle giunzioni comunicanti eterologhe (Boni et al., 2007).

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo di questa tesi di dottorato sulla *Ciona intestinalis* è stato:

- Lo studio delle molecole che stimolano la progressione meiotica;
- Lo studio dei fattori in grado di influenzare la maturazione ovocitaria;
- L'identificazione del ruolo delle cellule follicolari nell'induzione della ripresa meiotica;
- L'analisi dell'effetto della maturazione *in vitro* sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale e larvale.

3. MATERIALI E METODI

3.1. *Modello sperimentale*

La *Ciona intestinalis* è stata scelta come modello sperimentale per i seguenti motivi:

- ❖ la fisiologia e l'embriologia di questo animale sono ampiamente conosciuti e utilizzati alla Stazione Zoologica di Napoli risultando, perciò, un modello ideale per studi di riproduzione e sviluppo;
- ❖ essendo una specie largamente diffusa, è di facile reperibilità nel golfo di Napoli durante gran parte dell'anno;
- ❖ da un singolo animale si possono ottenere grandi quantità di entrambi i gameti maturi perfettamente sincroni;
- ❖ la ripresa meiotica dell'ovocita è indotta dallo spermatozoo *in vitro*;
- ❖ le divisioni cellulari sono sincrone e veloci e lo sviluppo larvale avviene in tempi brevi;
- ❖ è considerata l'anello di congiunzione tra invertebrati e vertebrati.

3.2. *Animali e Gameti*

Esemplari di *Ciona intestinalis* prelevati in località Fusaro (Pozzuoli, NA) sono stati stabulati per due giorni in vasche contenenti acqua di mare circolante. Il prelievo dei gameti è stato effettuato previa anestesia degli animali con ghiaccio.

L'ovario è stato prelevato per dissezione con bisturi da un animale, e gli ovociti allo stadio immaturo di vescicola germinale (VG), liberati dopo diverse aspirazioni con una pipetta e isolati, sono stati posti in acqua di mare artificiale (AMA) a pH 5.0 in capsule Petri. L'acqua di mare artificiale è stata preparata con 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10mM CaCl₂, 10mM HEPES e il pH portato a 5.0 con HCl per bloccare temporaneamente l'inizio della maturazione. Per alcuni esperimenti di maturazione *in vitro* e per consentire l'applicazione di metodiche elettrofisiologiche sono state rimosse chimicamente le strutture extracellulari che circondano l'ovocita (corion e cellule follicolari) con una soluzione di Protease ottenuta da *Streptomyces griseus* (Sigma) ad una concentrazione finale di 0.03% (peso/volume) + acido tioglicolico 1% in AMA a pH 10.0. Gli ovociti sono stati incubati nella stessa soluzione fino al momento dell'utilizzo e poi lavati più volte con acqua di mare. Gli ovociti denudati sono posti in piastre Petri ricoperte di uno strato di agar (Sigma) all'1% (peso /volume).

Gli ovociti allo stadio di MI sono stati prelevati dall'ovidutto con una pipetta Pasteur, dallo stesso animale da cui era stato prelevato l'ovario; la rimozione delle

strutture extracellulari, quali corion e cellule follicolari, è stata eseguita manualmente con sottili aghi di acciaio. Per la fecondazione, gli spermatozoi sono stati prelevati con una pipetta Pasteur dallo spermidutto di diversi animali, mescolati e aggiunti alla piastra di fecondazione in AMA ad una concentrazione finale di 10^6 /ml. La conta degli spermatozoi è stata effettuata in una camera conta-spermi (Horwell, UK). La fecondazione, l'estrusione dei globuli polari e lo sviluppo sono stati seguiti allo stereo-microscopio (Nikon, Giappone). La fecondazione e lo sviluppo sono stati effettuati alla temperatura di 18°C ponendoli in un incubatore, valutando la morfologia larvale dopo 18- 24ore.

3.3. Classificazione VG e test di fecondazione e sviluppo

In accordo con le classificazioni degli ovociti immaturi presenti in letteratura (Jeffery e Capco, 1978; Kessel, 1983; Swalla et al., 1991; Prodon et al., 2006), è stata effettuata una suddivisione degli ovociti dell'ovario in gruppi, in funzione del diametro, della pigmentazione citoplasmatica e della forma e dimensione delle cellule follicolari. Il diametro delle cellule è stato misurato con un oculare e un vetrino millimetrato.

Per valutare l'eventuale competenza di maturazione, gli ovociti di ogni gruppo sono stati posti in AMA e dopo 3 ore è stata osservata la percentuale di *GVBD*. Per testare la vitalità degli ovociti e l'avvenuta maturazione, gli ovociti sono stati fecondati e posti in incubatore a 18°C; in questo modo è stato possibile valutare la

percentuale di divisione a 2 cellule (dopo 50' circa dalla fecondazione) la percentuale di sviluppo e la morfologia della larva natante (dopo 18-24 ore). Come controllo sono stati utilizzati ovociti MI prelevati dall'ovidutto dello stesso animale da cui era stato estratto l'ovario, effettuando una fecondazione sincrona con quella delle *GVBD*.

3.4. Misurazioni elettriche

Il sistema del *patch clamp* è costituito da un "probe", da un amplificatore di corrente, da un digitalizzatore e da un computer con software specifico.

Il *probe* o *head stage* è un convertitore corrente-voltaggio designato per essere montato su un micromanipolatore (Narishige, Nikon, Giappone) ed è direttamente attaccato alla pipetta di registrazione da un lato, all'unità principale dall'altro (Figura 13).

L'amplificatore, o unità principale, contiene tutti i comandi sia per la calibrazione, sia per la visualizzazione dei diversi parametri durante un esperimento (Figura 13).

Il digitalizzatore è un sistema per l'acquisizione ad alta velocità che permette una registrazione di una traccia in maniera rapida e continua direttamente sul disco rigido di un computer (Figura 14)

I dati elettrofisiologici sono stati acquisiti con un pc tramite il software pClamp 9 (Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, USA).



Figura 13. Amplificatore List EP7, unità principale con probe annesso (in basso a sinistra).



Figura 14. Digitalizzatore Digidata 1322A (Axon Instruments)

Le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate con la tecnica standard del “*whole cell voltage clamp*” (Figura 15). Partendo da un capillare di vetro

borosilicato con filamento (Clark Electromedical Instruments, Gran Bretagna), un *puller* (P87, Sutter Instruments, USA) ha modellato una micropipetta con una punta cava di 1-2 μm di diametro e con una resistenza di 5 MegaOhm ($\text{M}\Omega$). La micropipetta è stata riempita con una soluzione con composizione simile al citoplasma (*intracellular-like solution* o *ICS*: 200 mM K_2SO_4 , 20 mM NaCl, 200 mM saccarosio, 10 mM EGTA e 10 mM HEPES, e il pH portato a 7.5). La pipetta è stata poggiata sopra l'ovocita privo di strutture accessorie e mediante l'applicazione di una leggera aspirazione si è creata una saldatura tra il vetro del capillare e la membrana plasmatica, visualizzata da un aumento della resistenza fino ad un valore di almeno 1 $\text{G}\Omega$. In questo stadio il voltaggio è stato bloccato con un amplificatore di corrente a un determinato potenziale di partenza (PP, nel caso della *Ciona* è -80 mV) e, con un'aspirazione più forte, si è proceduto a rompere il pezzo di membrana all'interno della pipetta consentendo così di ottenere una continuità elettrica tra il citoplasma e la soluzione *ICS* all'interno della pipetta. La lettura di un potenziale di riposo negativo negativo e stabile indica il corretto accesso della pipetta nel citoplasma.

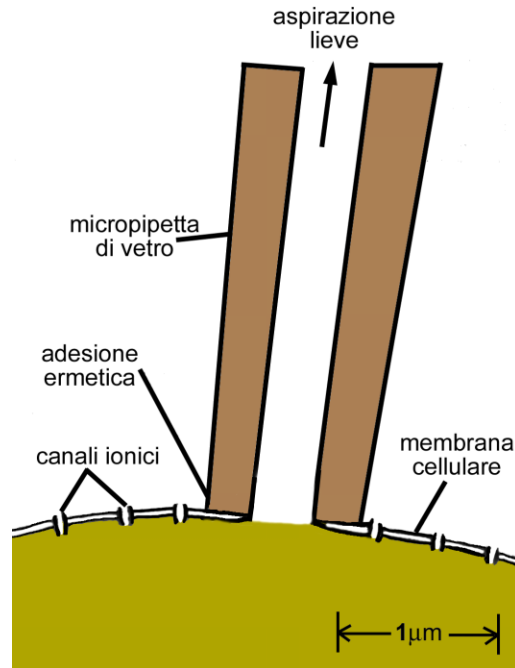


Figura 15. Rappresentazione schematica della tecnica elettrofisiologia del “*whole-cell voltage clamp*”.

Le intensità delle correnti ioniche sono state misurate in picoAmpere (pA). Sono state scelte per gli esperimenti solo le cellule che presentavano una corrente di mantenimento (*holding current*) inferiore a 200 pA. Per studiare i canali voltaggio-sensibili si è proceduto all'applicazione di stimoli di +10 mV (depolarizzanti) o -10mV (iperpolarizzanti) della durata di 500 millisecondi, inducendo così una modificazione transiente del potenziale che ha raggiunto un nuovo valore detto potenziale di arrivo (PA). Per poter valutare le componenti di correnti in entrata dovute a sodio o a calcio tipo T, si considerano i potenziali di arrivo tra -30 e -40 mV, mentre quelle dovute al calcio tipo L, si considera l'intervallo di voltaggio tra 0 e + 20 mV (Figura 16).

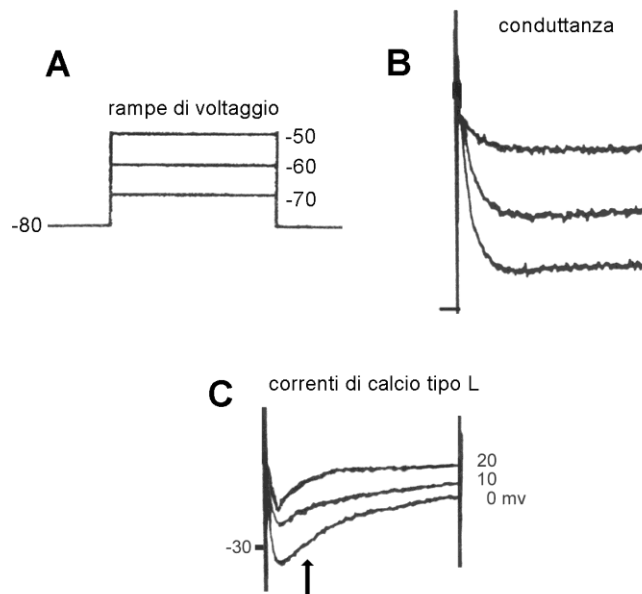


Figura 16. A) Rampe depolarizzanti di 10 mV di voltaggio dal PP di -80 mV; B) Correnti in uscita generate dalla variazione di voltaggio che costituiscono la conduttanza della membrana; C) Col PP a -30 mV la componente in entrata (freccia) dovuta a correnti di Ca^{2+} tipo L ha un picco massimo ai PA tra 0 e +20 mV.

La tecnica del “*whole cell voltage clamp*” consente di visualizzare anche le correnti di fecondazione dell’ovocita. Il voltaggio della cellula viene bloccato al PP di -80mV, poichè è il più vicino al potenziale di riposo dell’ovocita. Aggiungendo gli spermatozoi durante la registrazione è possibile osservare una corrente ionica, che, nel caso della *Ciona intestinalis*, è depolarizzante in entrata (Figura 3).

L’area della superficie delle cellule di diverse dimensioni è stata calcolata, dopo la rimozione delle strutture accessorie, con la formula $4\pi r^2$, misurando il

diametro di ogni stadio cellulare con un oculare e un vetrino millimetrato e un microscopio ottico invertito (Nikon, Giappone). Così facendo abbiamo normalizzato i risultati, che sono stati espressi in pA/mm² per le correnti, nanoSiemens/mm² (o nS/mm²) per la conduttanza.

3.5. Caratterizzazione farmacologica dei canali ionici

Specifici inibitori delle correnti sono stati aggiunti all'ovocita nel corso delle registrazioni. In particolare, sono stati usati i seguenti inibitori: per le correnti di calcio di tipo L il verapamile e la nifedipina (Sigma, USA) sciolti in dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma, USA), alla concentrazione di 100 µM finale in acqua di mare artificiale, per 5 minuti. Per inibire le correnti di Na⁺, è stata aggiunta la tetrodotossina (TTX) (Sigma, USA) in DMSO, alla concentrazione finale di 0,1 µM in AMA, per 2-5 minuti. Per inibire le correnti di calcio di tipo T, è stato usato il cloruro di nichel (NiCl₂) alla concentrazione di 400 µM finale in AMA, per 5 minuti.

L'acqua di mare senza calcio (*Ca²⁺free*) è stata preparata sostituendo CaCl₂ con 10mM MgCl₂ e aggiungendo EGTA alla concentrazione finale di 1mM. L'acqua di mare artificiale senza sodio (*Na⁺free*) è stata preparata con 50 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 10mM HEPES e sostituendo NaCl con 400mM cloruro di colina. Il pH è stato portato a 8.2 con KOH prima di procedere agli esperimenti. L'acqua di mare con alto calcio (ACa) è stata preparata secondo la seguente

formula: 400 mM NaCl, 40 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 20mM CaCl₂, 10mM Hepes, pH 8.0 with NaOH.

3.6. Esperimenti di GVBD in vitro

La *GVBD* è stata valutata come scomparsa della vescicola germinale al microscopio ottico invertito dopo 3 ore dall'inizio dell'esperimento. In questo modo è stata testata l'influenza sulla *GVBD* delle seguenti soluzioni e sostanze:

- *Acqua di mare naturale (AMN) e artificiale (AMA)*: l'acqua di mare naturale è acqua di mare prelevata dal Golfo di Napoli, bollita e filtrata, e presenta un pH intorno a 8.2;
- *AMN a diverso pH*: il pH dell' AMN è stato modificato con NaOH 1M o HCl 1M così da ottenere AMN a differenti valori di pH da testare (più precisamente: pH 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 10.0);
- *Na⁺free, Ca²⁺free, Verapamile e Nifedipina*, questi ultimi due sono inibitori specifici delle correnti di calcio, usati nelle stesse modalità descritte sopra;
- *Tripsina e inibitore della tripsina soybean (SBTI)*, rispettivamente in AMN a pH 5,0 da 1 µg/ml a 0.05 µg/ml, e in AMN da 1.6 mg/ml a 0.025 mg/ml. La tripsina (Sigma, USA) è un'endopeptidasi che scinde il legame peptidico a livello dei residui di lisina e arginina, come mostrato in figura 17. L'SBTI (Sigma, USA) inibisce in maniera specifica l'azione della tripsina legandosi ad essa.

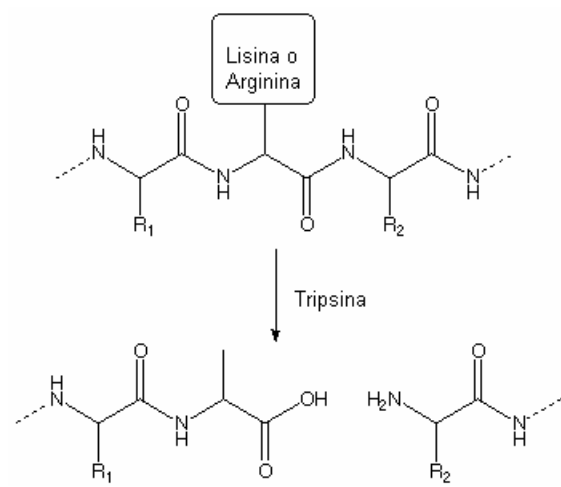


Figura 17. Meccanismo d'azione dell'enzima tripsina.

- *Ionoforo del calcio A23187*, (Sigma, USA), in concentrazione di 5-10 μM in AMN a pH 5.0;
- *Forscolina e teofillina*, (Sigma, USA) in concentrazione finale in AMN rispettivamente di 500 μM e 2 mM. La forscolina è un attivatore dell'adenilato ciclasi, la teofillina è un inibitore delle fosfodiesterasi, ma entrambe le sostanze mantengono alti i livelli intracellulari di AMP ciclico.

3.7. Ruolo delle cellule follicolari

Per studiare il ruolo delle cellule follicolari sono stati effettuati: 1) esperimenti di maturazione in vitro di ovociti con e senza follicolari; 2) esperimenti volti ad rilevare l'eventuale presenza di giunzioni comunicanti tra l'ovocita e le cellule follicolari stesse:

3.7.1. 1) Studio dell'influenza delle cellule follicolari sulla GVBD in vitro

Le cellule follicolari sono state rimosse aspirando gli ovociti più volte, a pH 4.0 in presenza di EDTA (Lambert, 2008), e dopo diversi lavaggi, gli ovociti sono stati posti in AMN a pH 8.0 o pH 5.0, rispettivamente per avviare o inibire la maturazione;

3.7.2. 2) Analisi della presenza delle giunzioni comunicanti

- **Inibizione delle giunzioni comunicanti:** per bloccare la comunicazione intercellulare tra follicolari e ovocita è stato utilizzato l'inibitore 1-ottanolo (Sigma, USA), sciolto in DMSO, a concentrazione finale di 1mM in acqua di mare.
- **Microiniezione di Lucifer Yellow:** in singole cellule follicolari è stata effettuata la microiniezione di un colorante fluorescente, il Lucifer Yellow-CH (LY, lunghezza d'onda 425 nm in eccitazione e 528 nm in emissione)

(Sigma, USA) al 5% (peso/volume) in ICS, utilizzato per lo studio delle giunzioni comunicanti. Il LY (Peso molecolare 457.2 Dalton), infatti, è troppo grande per attraversare la membrana plasmatica, ma abbastanza ridotto da passare attraverso le giunzioni comunicanti, diffondendo perciò anche nell'ovocita. Per effettuare le microiniezioni sono state utilizzate le stesse pipette (Cook IVF, Australia) impiegate di solito per la tecnica di iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Le pipette sono mostrate nelle foto in figura 18 e 19. Per effettuare le microiniezioni sono stati utilizzati micromanipolatori con sistema ad iniezione ad olio (Narishige, Nikon, Giappone). L'avvenuta microiniezione nella follicolare e l'eventuale diffusione della fluorescenza nell'ovocita o nelle altre follicolari sono state seguite con un sistema per l'acquisizione e l'elaborazione di immagini costituito da un microscopio invertito Axiovert 100 (Zeiss, Germania), camera Photometrics 1394 e shutter Lambda 10B (Sutter Instruments, USA) e dal programma Metamorph (Universal Imaging, USA) versione 7.1.3.0. che gestisce l'intero sistema.

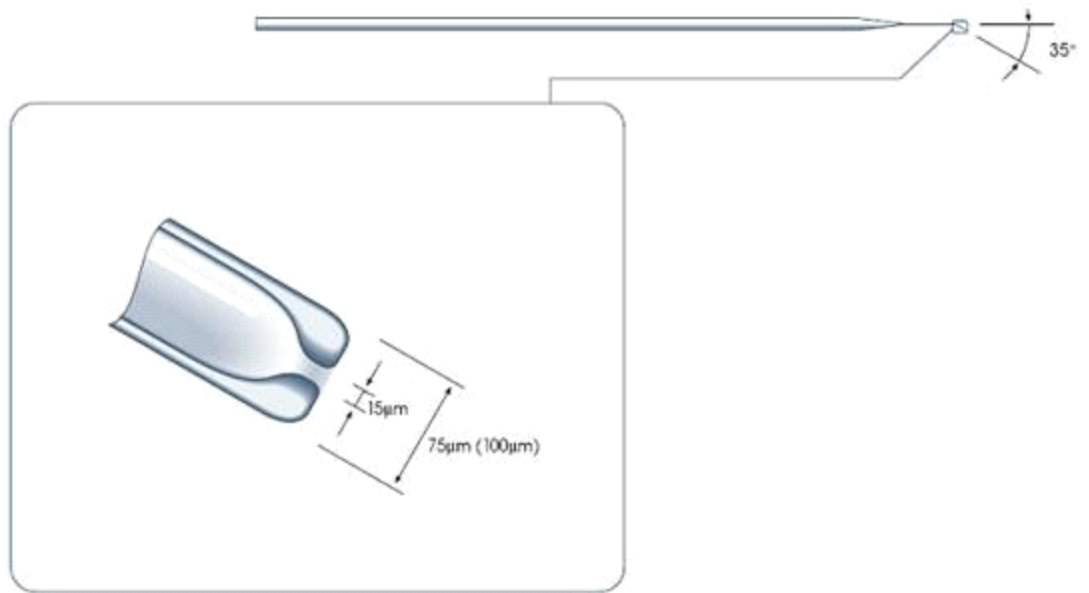


Figura 18. Pipetta *holding* utilizzata per bloccare l'ovocita durante l'iniezione.

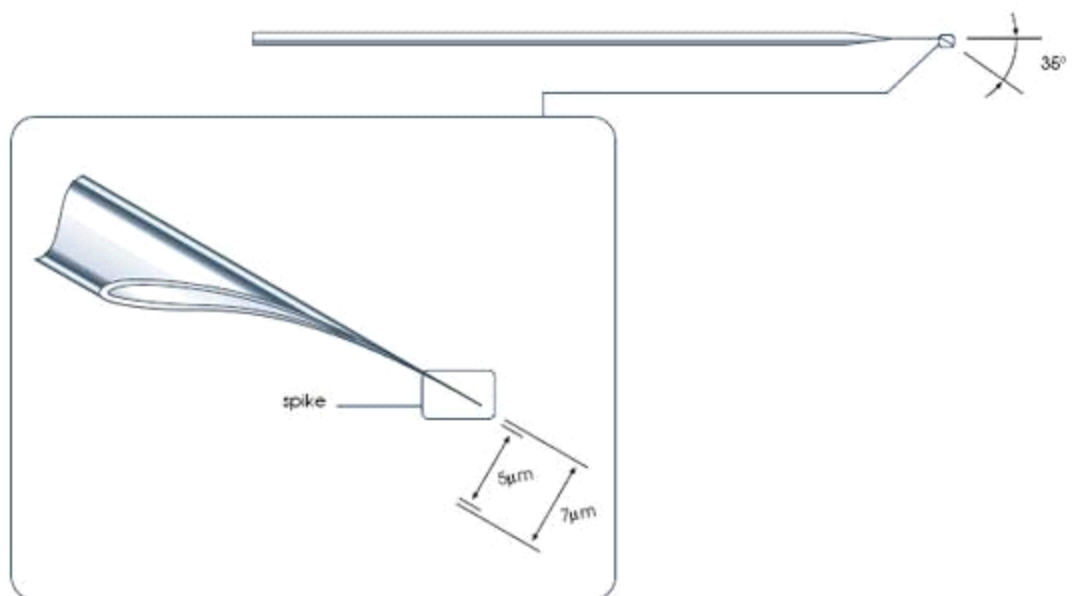


Figura 19. Pipetta per la microiniezione del colorante.

- **Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM):** ovociti allo stadio VG-C sono stati fissati in una soluzione al 2.5% glutaraldeide con 1% paraformaldeide in un tampone composto da 0.2 M di sodio cacodilato, pH 7.2 per 1 ora e successivamente fissato in una soluzione con 1% di tetrossido di osmio in 0.2 M di sodio cacodilato. Il materiale è stato quindi deidratato in etanolo, incluso in Epon 812, tagliato con un ultramicrotomo (Leica Ultracut, Germania) ed esaminata al microscopio elettronico LEO 912AB (Zeiss, Germania).

3.8. Analisi statistica

Le differenze tra i valori medi sono state analizzate mediante la procedura dell'analisi della varianza *General Linear Model* del pacchetto statistico SYSTAT (SAS, 1988). In caso di significatività del modello statistico, si è proceduto con il confronto a coppie delle medie mediante test delle differenze minime significative (*Least Significant Differences* o LSD). Per valori espressi in percentuale, i valori sono stati prima trasformati tramite la funzione arcoseno. I risultati sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{errore standard}$.

4. RISULTATI

4.1. Classificazione VG e competenza di maturazione, fecondazione e sviluppo.

Sulla base dei parametri descritti in precedenza, gli ovociti allo stadio VG sono stati classificati in tre gruppi (Figura 20), corrispondenti rispettivamente a ovociti pre-vitellogenici, vitellogenici e post-vitellogenici:

VG-A = diametro < 70 μm , citoplasma trasparente, strato di follicolari non visibile;

VG-B = diametro tra 70 e 120 μm , citoplasma giallo e follicolari di circa 16 μm di spessore;

VG-C = diametro >120 μm , citoplasma e follicolari di circa 35 μm di spessore.

Inoltre, per gli studi elettrofisiologici sono state misurate anche le GVBD ottenute dopo 3 ore di maturazione in vitro delle VG-C, le cui dimensioni sono risultate le stesse delle VG-C.

4.1.1. *Competenza di maturazione*

Sono stati selezionati ovociti allo stadio VG per ogni gruppo e posti in piastre Petri contenenti AMN pH 5.0 per bloccare momentaneamente la maturazione. In tutti gli esperimenti sono stati usati almeno 100 ovociti per 5-10 repliche da differenti individui. Aliquote di ovociti sono state trasferite in AMN a pH 8.2. Dopo 3 ore di incubazione si è osservata la scomparsa della vescicola germinale che avviene nel 98% degli ovociti VG-C, 3% VG-B, mentre non c'è

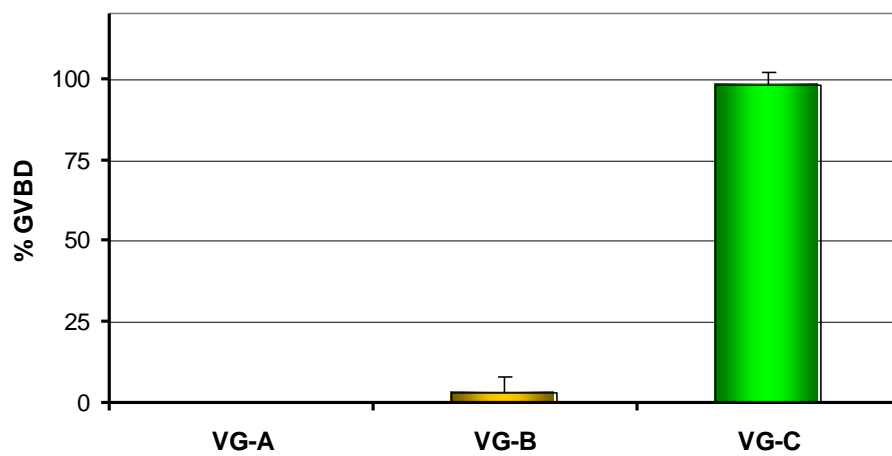
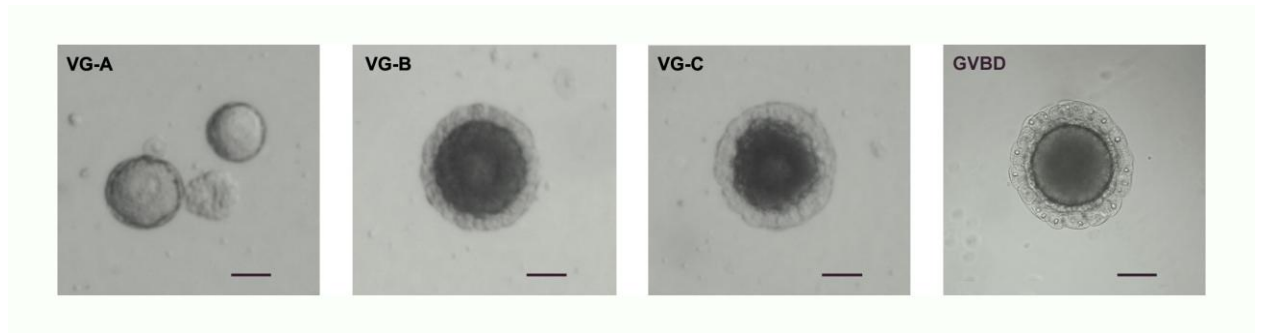


Figura 20. I tre gruppi di ovociti immaturi (VG-A, VG-B e VG-C) e lo stadio GVBD (ottenuto dopo 3 ore di maturazione dello stadio GV-C) (foto in alto, le barre corrispondono a 30 μ m in VG-A e B, 50 μ m in VG-C e GVBD). Nel grafico in basso sono riportate le percentuali di maturazione spontanea *in vitro* dei tre gruppi VG in acqua di mare dopo 3 ore.

stata nessuna maturazione spontanea in VG-A. (Figura 20, $P < 0.01$).

Essendo gli unici che hanno chiaramente acquisito la competenza meiotica, gli ovociti VG-C sono stati scelti per i successivi esperimenti di maturazione *in vitro*.

4.1.2. Fecondazione dello stadio GVBD

Ovociti VG-C sono stati fecondati dopo maturazione spontanea in AMN. In tutti gli esperimenti sono stati usati almeno 100 ovociti per 5-10 repliche da differenti individui. Il 60% di tali ovociti, dopo la fecondazione, si è diviso a 2 cellule rispetto al 90% degli ovociti MI di controllo ($P < 0.01$). Solo il 30% ha dato origine a larve sgusciate, e, di queste, ben il 70% mostra una coda ritorta e si blocca agli stadi iniziali della metamorfosi della regressione della coda (Figura 21).

4.2. Risultati elettrofisiologici e caratterizzazione farmacologica

I potenziali di riposo (PR) degli oociti nei tre stadi e in GVBD (ottenuti da ovociti VG-C dopo maturazione spontanea *in vitro*) sono mostrati in figura 22, l'analisi statistica in tabella 4.5.a. Questi potenziali aumentano in valore assoluto dal gruppo VG-A (-16.5 ± 2.5 mV, $n=20$), passando per VG-B (-55.4 ± 1.8 mV, $n=20$), VG-C (-61.8 ± 1.7 mV, $n=20$) fino a GVBD (-71.6 ± 2.5 mV, $n=20$).

La conduttanza della membrana plasmatica è 0.82 ± 0.06 nanoSiemens/mm² (nS/mm²) nel gruppo VG-A, 0.78 ± 0.04 nS/mm² nelle VG-B, 0.4 ± 0.03 nS/mm² nelle VG-C e, infine, 0.11 ± 0.02 nS/mm² nelle GVBD (Figura 22; analisi statistica in tabella 4.5.b.; $n=20$)

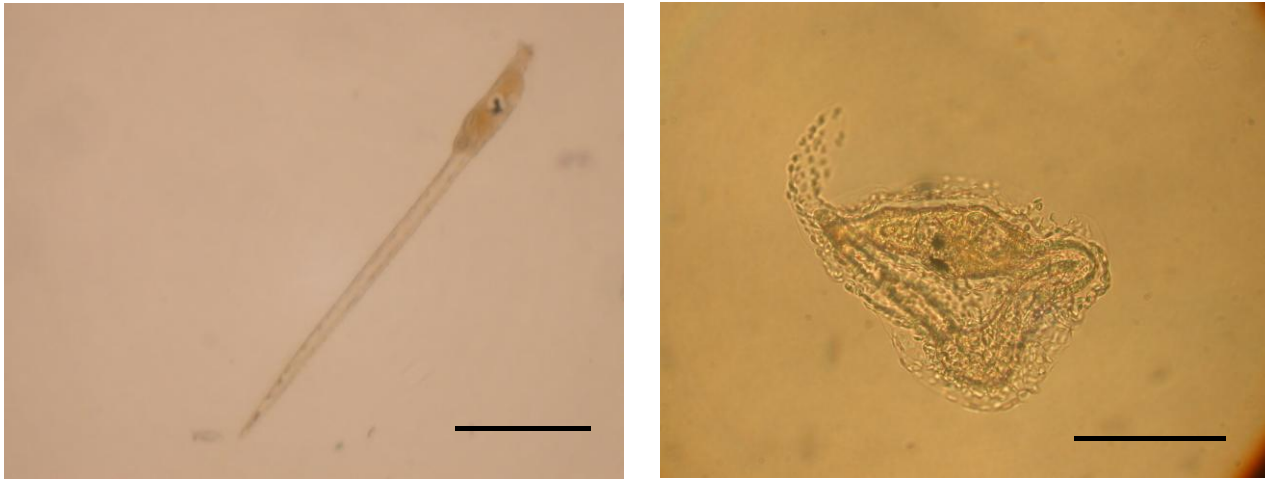


Figura 21. Larve ottenute dopo 24 ore dalla fecondazione di ovociti maturi (foto a sinistra, la barra corrisponde a 330 μm) e maturati *in vitro* da VG-C (foto a destra, la barra corrisponde a 170 μm). La larva mostrata nella foto a destra presenta una evidente anomalia della coda.

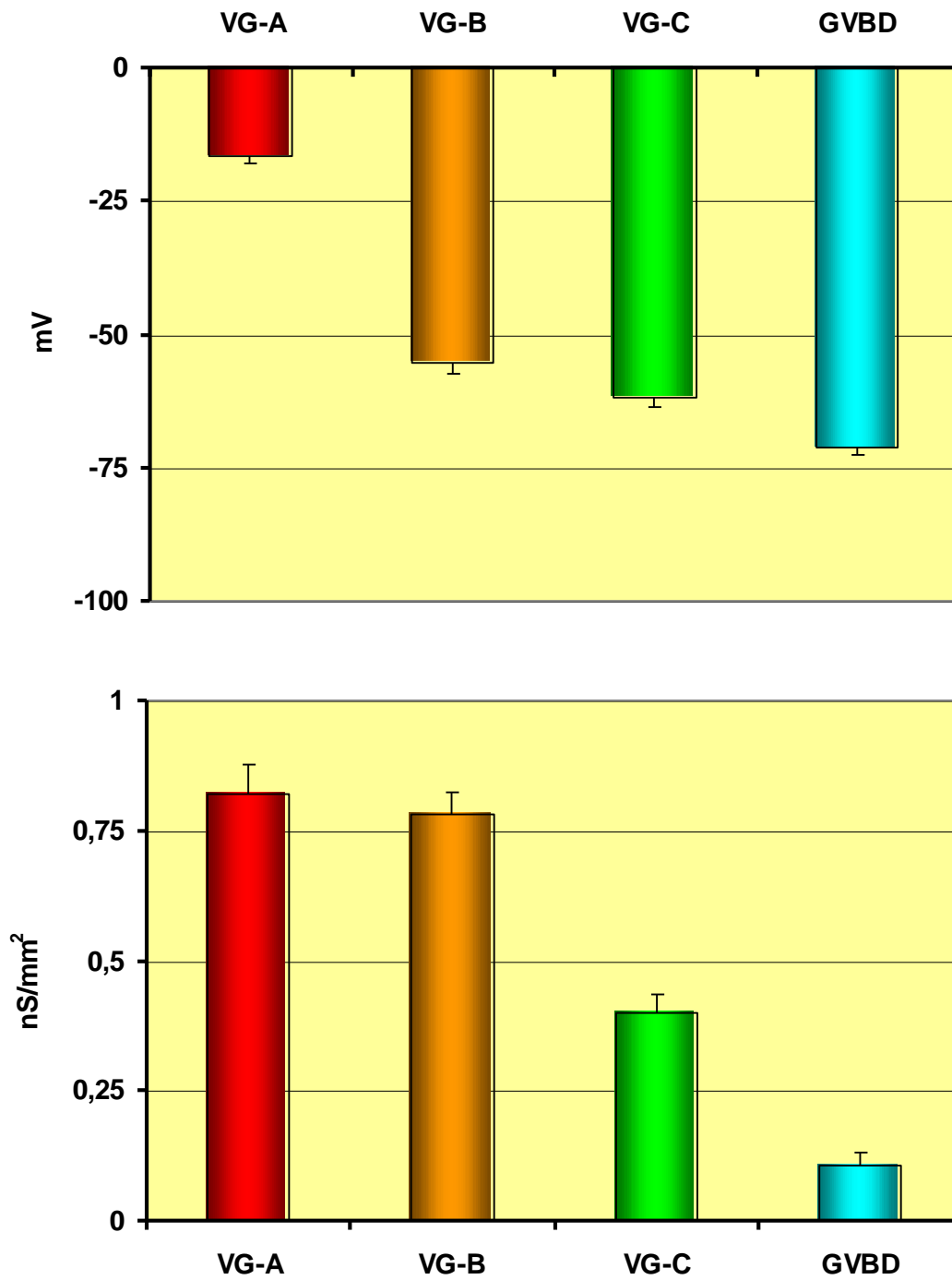


Figura 22. Valori dei potenziali di riposo (grafico superiore) e della conduttanza (grafico inferiore) registrate nei tre stadi VG e dello stadio GVBD (ottenuto dopo 3 ore di maturazione dello stadio GV-C).

Bloccando il potenziale a -30 mV e applicando rampe di voltaggio di 10 mV a ovociti VG-A, è stata osservata una corrente in entrata nella cellula con un picco tra 0 e +20mV, (14.4 ± 5.1 nA/mm²; n=20; Figura 23). Invece, bloccando il voltaggio a -80 mV non sono state riscontrate le correnti, tipicamente generate a potenziali più negativi di -30mV, come le correnti di Ca²⁺ di tipo T o di Na⁺. In accordo con Cuomo et al. (2006), usando gli inibitori specifici Verapamile or Nifedipina, abbiamo ottenuto una significativa (P<0.01) riduzione della componente in entrata delle correnti, come ci si aspetta nel caso di correnti di Ca²⁺ di tipo L (94% per il verapamile e 96% per la nifedipina, n=8). Inoltre, esperimenti eseguiti in Ca²⁺ *free* hanno mostrato 87% di riduzione di questa corrente in entrata (n=8; P<0.01), mentre, aumentando la concentrazione di Ca²⁺ nel mezzo esterno, abbiamo osservato un raddoppio dell'ampiezza di tali correnti (29 ± 3.7 nA/mm², n=8; P<0.01; Figura 24).

Nelle VG-B sono state registrate correnti di Ca²⁺ di tipo L, ma con una ampiezza significativamente inferiore (7 ± 1 nA/mm²; n=20; P<0.01) rispetto alle VG-A. D'altro canto, bloccando il potenziale di tali ovociti a -80mV, abbiamo osservato una corrente in entrata nell'intervallo di potenziale tra -30 e -40 mV, caratteristico delle correnti di Ca²⁺ di tipo T o di Na⁺ (25.8 ± 5.5 nA/mm²; n=20).

Nelle VG-C, le correnti di Ca²⁺ di tipo L erano ancora presenti seppur con ampiezza significativamente più ridotta nei confronti delle VG-A e B (1.6 ± 0.2 nA/mm²; n=20; P<0.01). Bloccando il voltaggio delle VG-C a -80mV, abbiamo

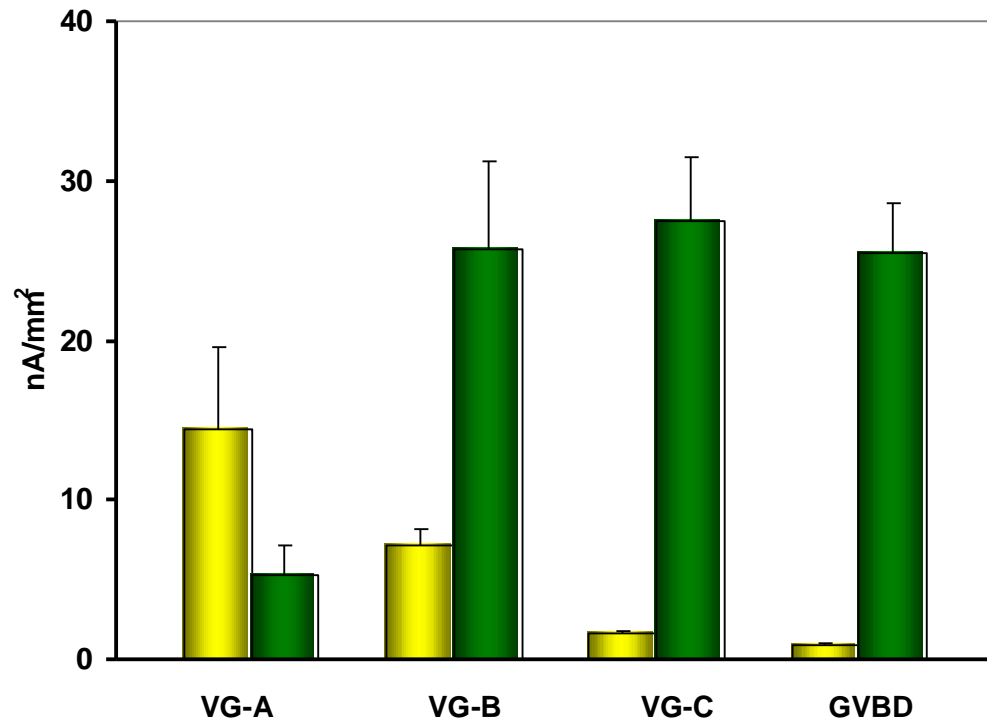


Figura 23. Valori delle correnti di calcio (in giallo) e sodio (in verde) nei tre stadi VG e nella GVBD.

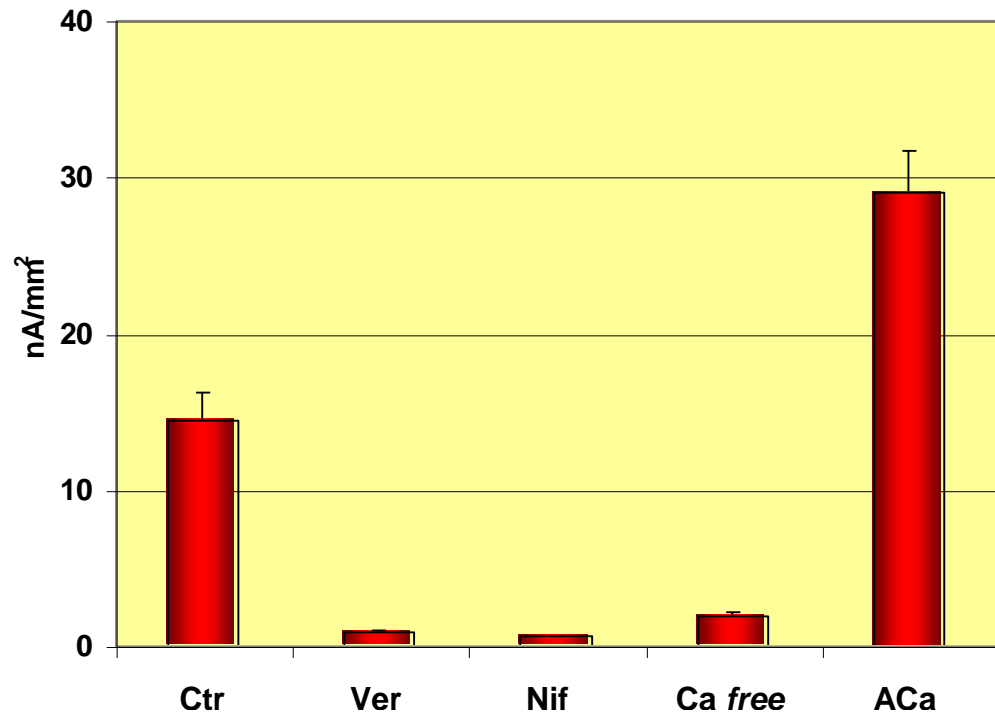


Figura 24. Valori delle intensità delle correnti di Ca^{2+} , al potenziale di partenza di -30mV , prima (Controllo in acqua di mare artificiale, Ctr) e dopo trattamento con il Verapamile $100\ \mu\text{M}$ (Ver), con la Nifedipina $100\ \mu\text{M}$ (Nif), con acqua di mare senza Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}\ \text{free}$) e con acqua di mare artificiale ad alta concentrazione di calcio (ACa), nello stadio di VG-A.

ottenuto delle correnti di ampiezza simile a quelle del gruppo VG-B (27.5 ± 4 nA/mm²; n=20).

Per quanto riguarda lo stadio GVBD, le correnti di Na⁺ erano 25.4 ± 3.2 nA/mm², mentre le correnti di Ca²⁺ di tipo L misuravano 0.9 ± 0.2 nA/mm², (n=20). In figura 23 sono mostrate le ampiezze delle correnti di Ca²⁺ di tipo L e correnti di Na⁺ registrate rispettivamente nei gruppi VG-A, B, C, e GVBD, mentre l'analisi statistica è mostrata nelle tabelle 4.5.c. e 4.5.d.

La caratterizzazione farmacologica delle correnti negli ovociti VG-B (Figura 25, n=12) e VG-C (Figura 26, n=15) ha portato una riduzione del 55% (P< 0.01), dopo incubazioni con la tetrodotossina e del 95% (P< 0.01) con acqua di mare Na⁺ free. Al contrario, NiCl₂, un inibitore delle correnti di Ca²⁺ di tipo T, non ha provocato nessuna significativa riduzione (27 ± 6 nA/mm²).

Ovociti allo stadio GVBD sono stati clampati a -80mV in modalità *whole-cell* in AMA e fecondati con l'aggiunta di spermatozoi durante la registrazione. Si è ottenuta una corrente di fecondazione ($1,400 \pm 173$ pA; n=22) simile a quella generata dagli ovociti maturi MI.

In ovociti VG-C l'aggiunta di spermatozoi ha dato origine ad una corrente di fecondazione solo nel 30% degli ovociti e comunque con un'ampiezza notevolmente ridotta (616 ± 66 ; P< 0.01; n= 23), (Figura 27).

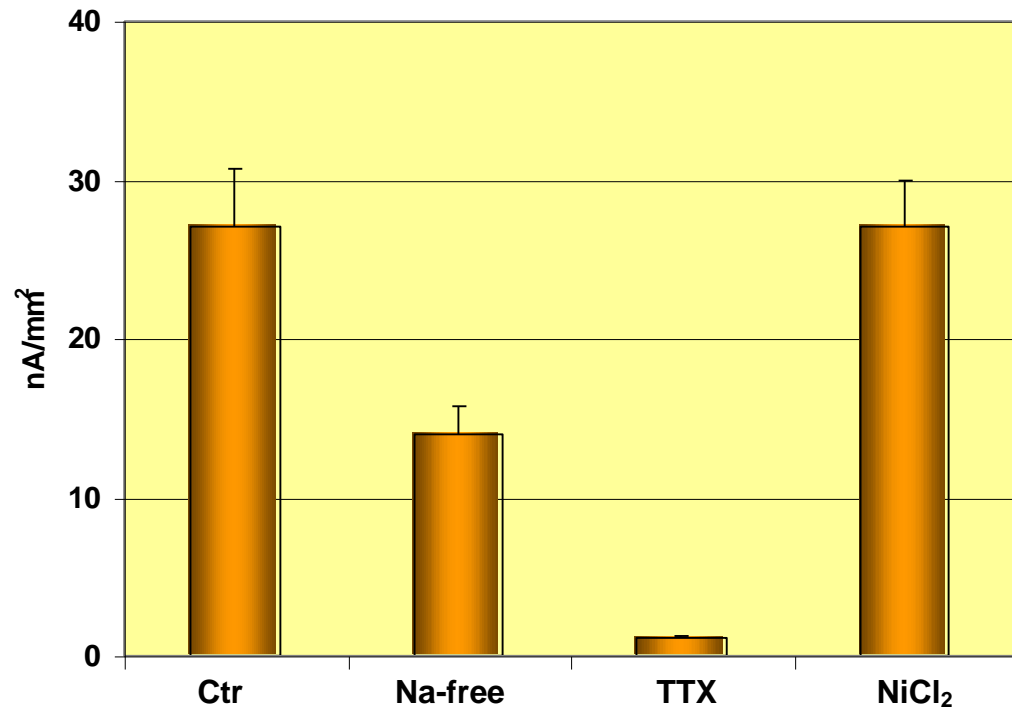


Figura 25. Valori delle intensità di corrente di sodio al potenziale di partenza di -80mV , prima (Controllo in acqua di mare artificiale, Ctr) e dopo trattamento con acqua di mare senza sodio (Na^+ free), con tetrodotossina $0.1 \mu\text{M}$ (TTX) e con cloruro di nichel $400 \mu\text{M}$ (NiCl_2), registrate nello stadio di VG-B.

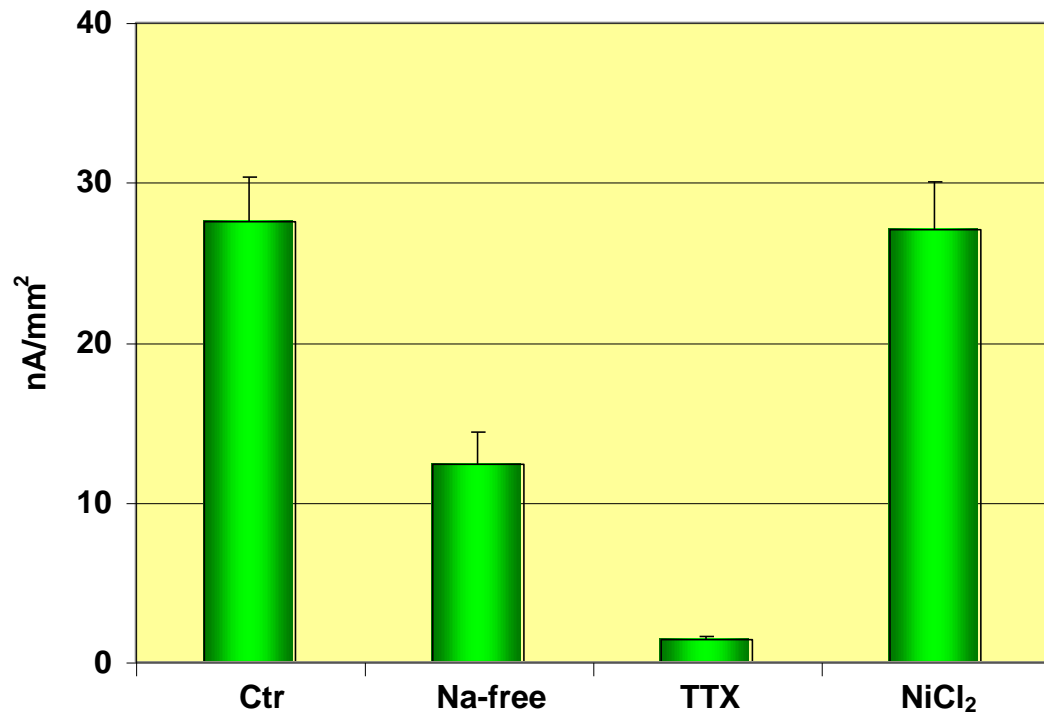


Figura 26. Valori delle intensità di corrente di sodio al potenziale di partenza di -80mV , prima (Controllo in acqua di mare artificiale, Ctr) e dopo trattamento con acqua di mare senza sodio (Na^+ free), con tetrodotossina $0.1 \mu\text{M}$ (TTX) e con cloruro di nichel $400 \mu\text{M}$ (NiCl_2) registrate nello stadio di VG-C.

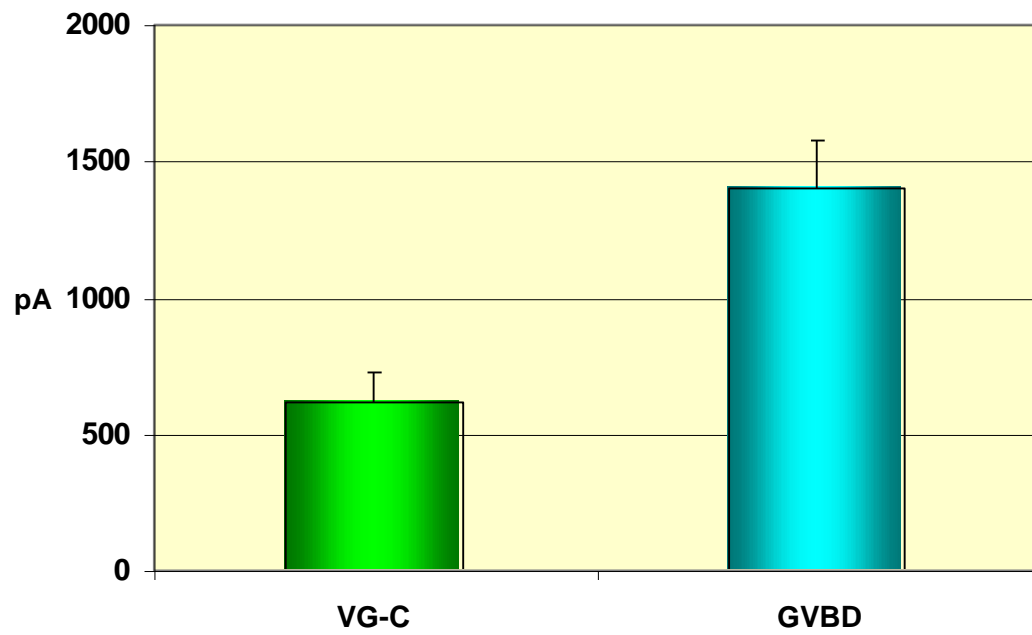
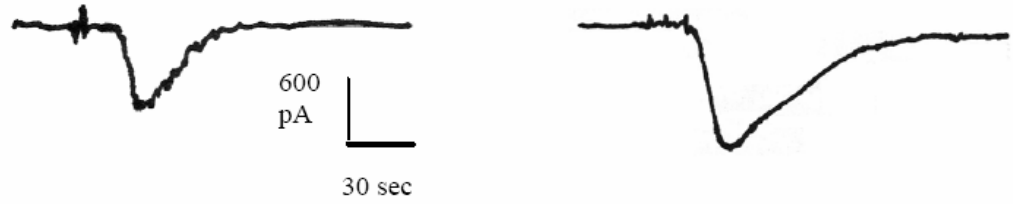


Figura 27. Correnti di fecondazione generate dallo stadio VG-C (in alto a sinistra) e dallo stadio GVBD (in alto a destra). In basso sono mostrate le ampiezze medie delle correnti di fecondazione.

4.3. GVBD *in vitro*

4.3.1. Comparazione tra acqua di mare naturale e artificiale

La percentuale di GVBD di ovociti VG-C posti in maturazione in acqua di mare non ha mostrato differenze significative con quelli in acqua di mare artificiale ($96 \pm 2.3 \%$ vs $94 \pm 2.7 \%$; n=6) (Figura 28).

4.3.2. Influenza del pH esterno

Ovociti VG-C sono stati trasferiti dall'ovario in acqua di mare ai seguenti valori di pH: 4.0- 5.0 - 6.0- 7.0- 8.2- 9.0 e 10.0 per 3 ore. Con l'aumento del pH si è osservato un incremento del tasso di GVBD con un massimo del $95.1 \pm 6.7 \%$ a pH 8.2, valore dopo il quale si raggiunge un *plateau* (Figura 29; tabella 4.3.a; analisi statistica in tabella 4.5.e.; n=15).

pH AMN	% GVBD	Errore Standard
4.0	10.8	3
5.0	13.1	2.7
6.0	50.8	3.2
7.0	79.2	2.5
8.0	95.1	1.8
10.0	94.5	3.4

Tabella 4.3.a. Percentuale di GVBD con relativo errore standard di ovociti VG-C posti in acqua di mare naturale (AMN) a differente pH.

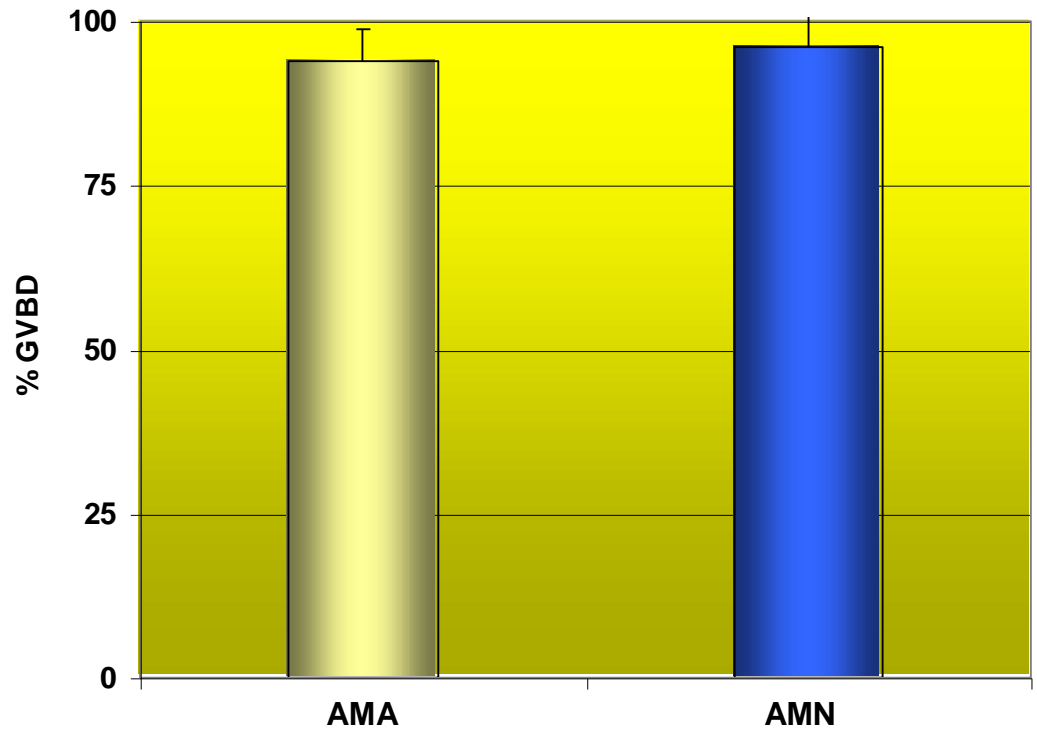


Figura 28. Percentuale di maturazione di ovociti GV-C dopo 3 ore di incubazione in acqua di mare artificiale (AMA) o naturale (AMN).

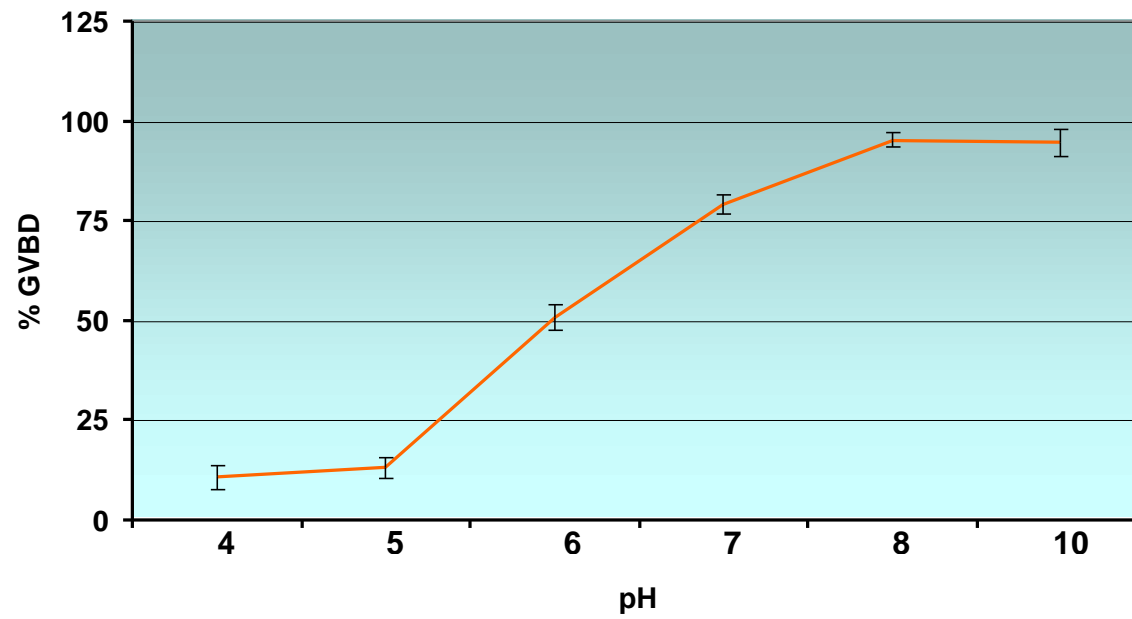


Figura 29. Percentuali di GVBD di ovociti GV-C dopo 3 ore di incubazione in acqua di mare a differenti valori di pH.

4.3.3. Influenza del calcio e del sodio

Ovociti VG-C posti in Ca^{2+} free hanno mostrato il 36 ± 5.1 % di GVBD vs 96 ± 2.2 % (n=12, $P < 0.01$) del controllo in AMN. Al contrario, le incubazioni in Na^+ free non hanno ridotto la percentuale di GVBD ($94 \pm 4.6\%$ vs $96 \pm 2.2\%$ del controllo, n=7). Gli inibitori delle correnti di calcio, Verapamile ($96 \pm 5\%$ vs $98 \pm 3\%$ del controllo, n=10) e Nifedipina ($93 \pm 6\%$ vs $98 \pm 3\%$ del controllo, n=10) in AMN non hanno indotto nessuna diminuzione della maturazione meiotica. Anche l'utilizzo di calcio ionoforo in AMN pH 5.0 non ha influenzato il tasso di GVBD rispetto al controllo in AMN pH 5.0 (19.6 ± 0.7 vs 19.3 ± 3.4 , n=12) (Figura 30).

4.3.4. Influenza della tripsina e del suo inibitore

L'aggiunta di tripsina ha indotto la ripresa meiotica in ovociti VG-C in acqua di mare a pH 5.0 (Figura 31; tabella 4.3.b.; analisi statistica in tabella 4.5.f.; n= 18). Inoltre, la maturazione spontanea di questo stadio ovocitario in acqua di mare è stata ridotta in maniera dose dipendente dall'inibitore della tripsina (Figura 31; tabella 4.3.c; analisi statistica in tabella 4.5.g.; n= 14).

Tripsina (μ g/ml)	% GVBD	Errore Standard
0	27.4	2.7
0.05	29.6	4.6
0.1	61.3	5.3
0.5	97	6.3
1.0	98	1.7

Tabella 4.3.b. Percentuale di GVBD di ovociti VG-C posti in acqua di mare naturale a pH 5.0 con differenti concentrazioni di tripsina.

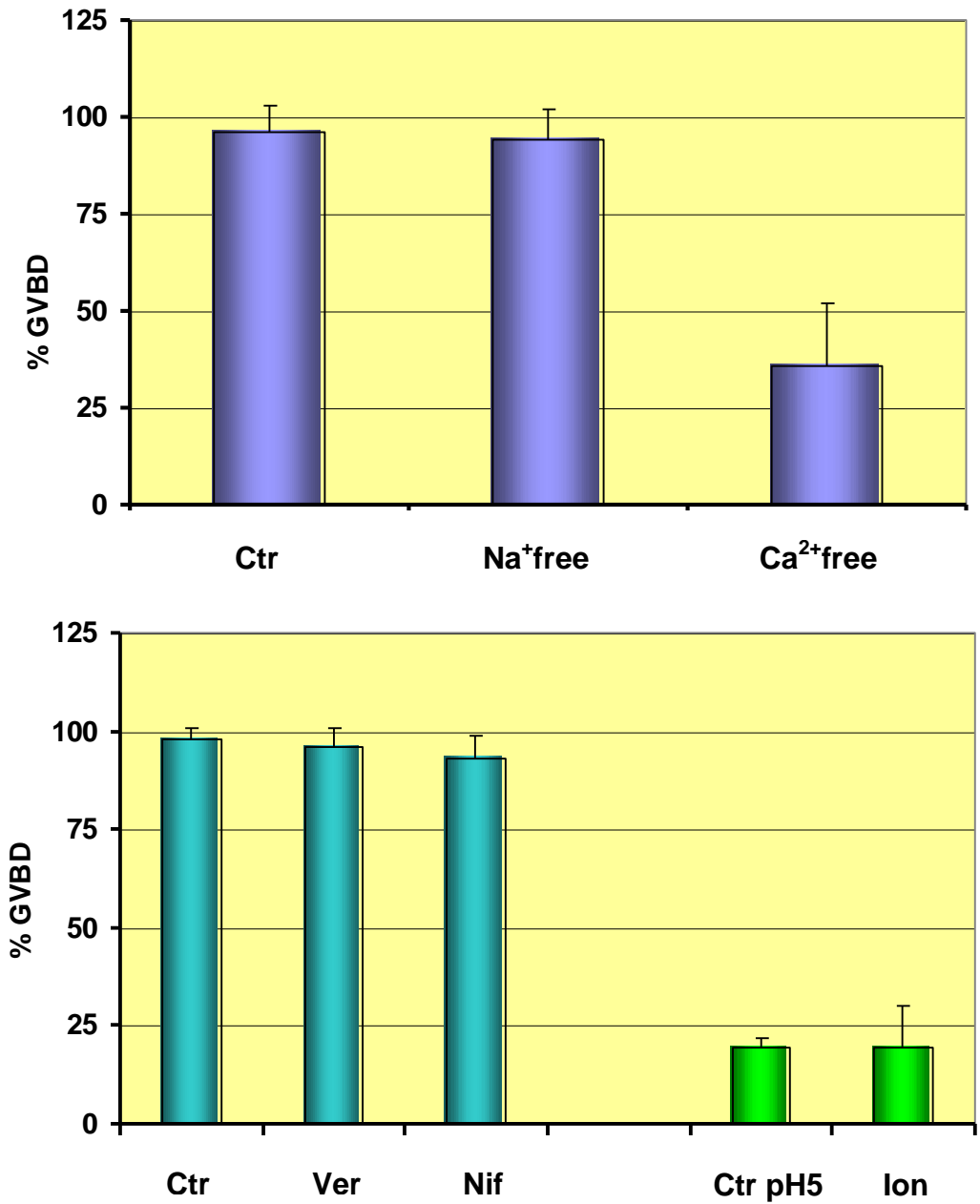


Figura 30. (In alto): Percentuali di GVBD di ovociti GV-C dopo 3 ore di incubazione in: acqua di mare (Controllo,Ctr), acqua di mare priva di sodio (Na⁺ free) e acqua di mare priva di calcio (Ca²⁺ free).

(In basso): Percentuali di GVBD di ovociti GV-C dopo 3 ore di incubazione in: acqua di mare (Controllo, Ctr), in presenza di Verapamile 100 μM (Ver), Nifedipina 100 μM (Nif); in verde sono mostrate le percentuali di GVBD di ovociti GV-C dopo 3 ore di incubazione in acqua di mare artificiale a pH 5.0 (Controllo, Ctr pH5) e dopo esposizione allo ionoforo (Ion) del calcio A23187 (10 μM) in acqua di mare a pH 5.0.

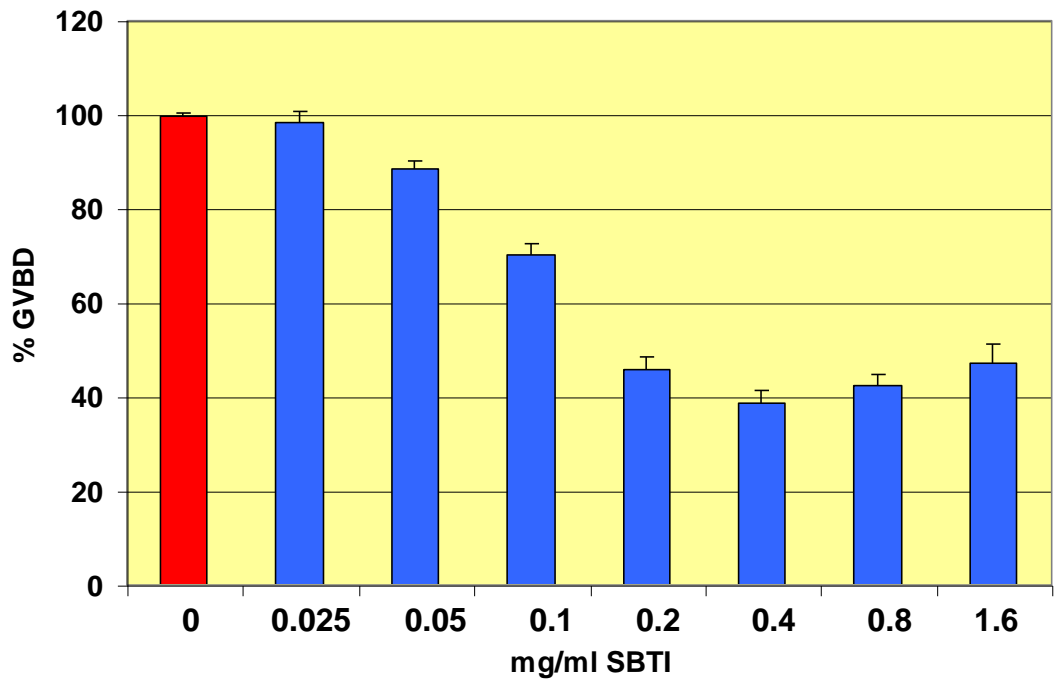
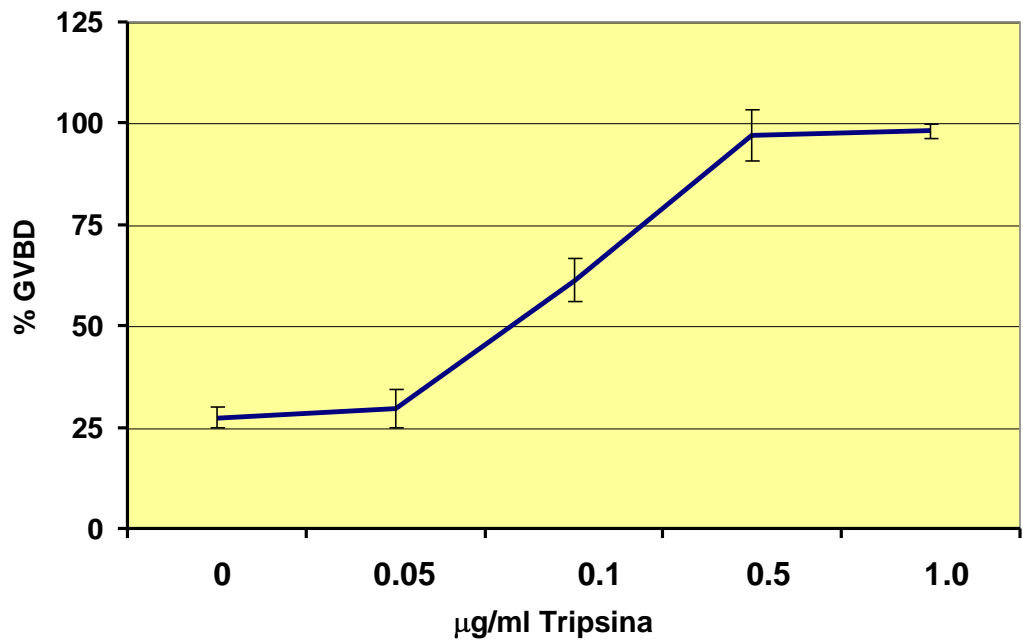


Figura 31. Percentuali di GVBD indotte in ovociti VG-C esposti a concentrazioni crescenti di tripsina in acqua di mare a pH 5.0 (in alto), o decrescenti di inibitore della tripsina (SBTI) in acqua di mare (AMN) (in basso).

SBTI (mg/ml)	% GVBD	Errore Standard
0.0	99.6	0.9
0.025	98.3	2.3
0.05	88.4	1.9
0.1	70.3	2.3
0.2	45.9	2.5
0.4	40	2.6
0.8	42.4	2.3
1.6	46	4.1

Tabella 4.3.c. Percentuale di GVBD di ovociti VG-C posti in acqua di mare naturale con differenti concentrazioni di inibitore della tripsina (SBTI).

4.3.5. Aumento dei livelli di AMPc

L'aumento dei livelli intracellulari di AMP ciclico è stato indotto usando l'attivatore dell'adenilato ciclasi, la forskolina, o l'inibitore delle fosfodiesterasi, la teofillina.

Ovociti VG-C in AMN trattati con forskolina hanno mostrato una significativa riduzione ($29.4 \pm 3.6\%$ di GVBD *vs* $91.3 \pm 3.6\%$ del controllo; $P < 0.01$; $n=8$).

Analogamente, la teofillina ha ridotto la GVBD al $25 \pm 2\%$ *vs* $85.9 \pm 3.4\%$ del controllo ($P < 0.01$; $n=9$) (Figura 32).

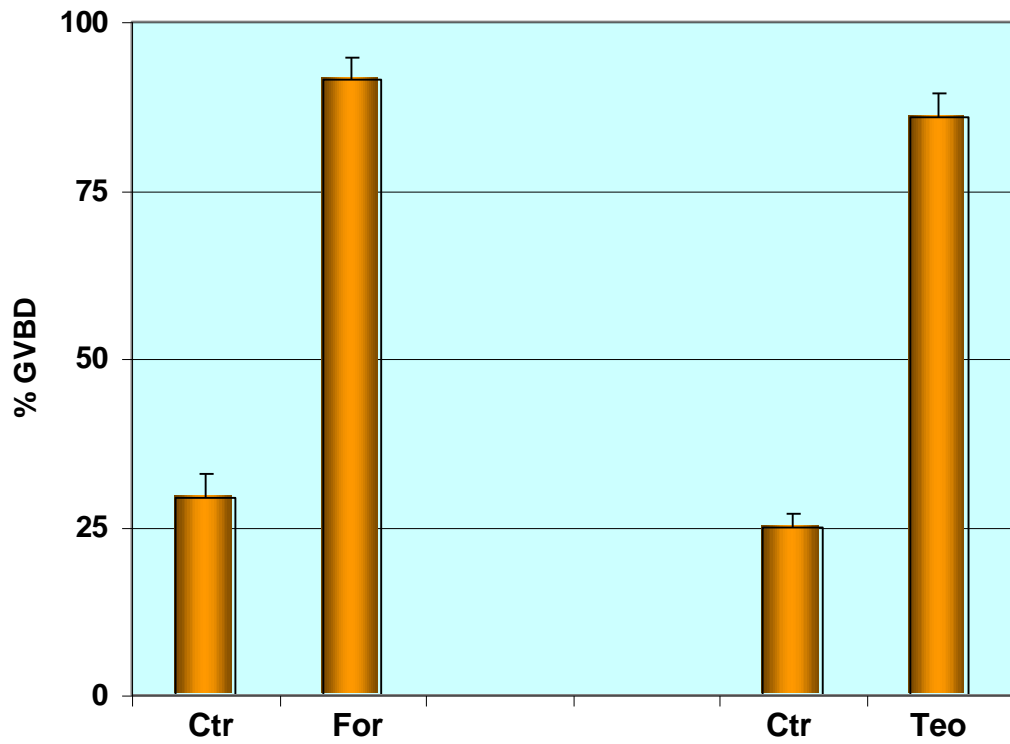


Figura 32. Percentuali di GVBD indotte in ovociti VG-C esposti a forskolina 500 μ M (For) e teofillina 2 mM (Teo) rispetto al controllo in acqua di mare (Ctr).

4.4. Influenza delle cellule follicolari

Per determinare se le cellule follicolari sono coinvolte nella diffusione di inibitori o induttori della maturazione abbiamo utilizzato differenti approcci sperimentali:

4.4.1. 1) Studio dell'influenza delle cellule follicolari sulla GVBD In vitro

La rimozione delle cellule follicolari non ha modificato la percentuale di GVBD nelle VG-C in AMN ($97.3 \pm 4\%$ vs $98.3 \pm 3.1\%$ del controllo, n=9). Analogamente, tale percentuale è rimasta inalterata rispetto al controllo anche negli ovociti defollicolati a pH 5.0 (21.5 ± 8 vs 24 ± 7.4 , n=9) (Figura 33).

4.4.2. 2) Analisi della presenza delle giunzioni comunicanti

L'assenza delle giunzioni comunicanti tra cellule follicolari e ovocita è stata confermata con tre diversi esperimenti: 1) l'utilizzo di un bloccante delle giunzioni comunicanti, l'1-Ottanolo, non ha influenzato la maturazione meiotica in AMN (Figura 33; n=6); 2) non sono individuabili strutture simili alle giunzioni comunicanti durante le osservazioni al TEM (Figura 34; n=5); 3) dopo l'iniezione del LY in una singola cellula follicolare, non c'è stata nè una diffusione del colorante nell'ovocita nè una diminuzione della fluorescenza all'interno della follicolare (Figura 35; n=4).

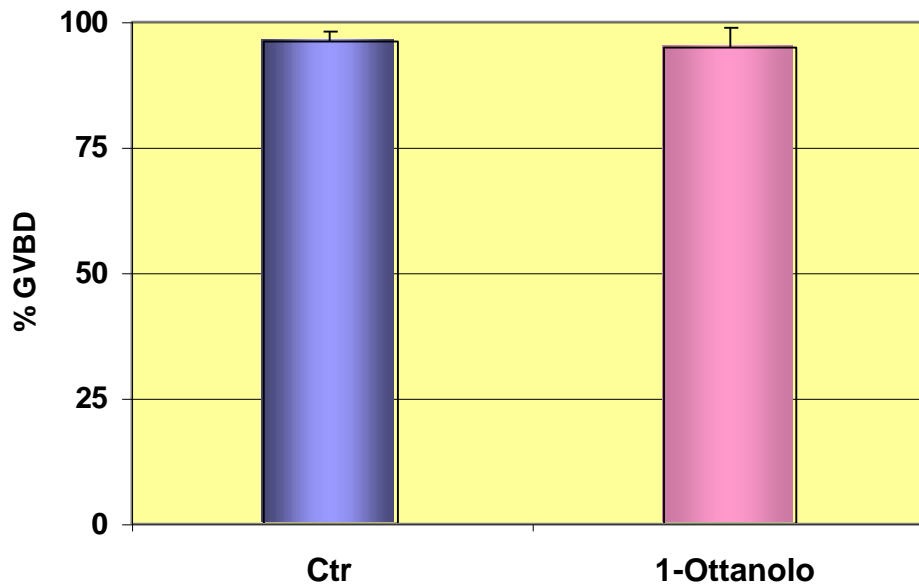
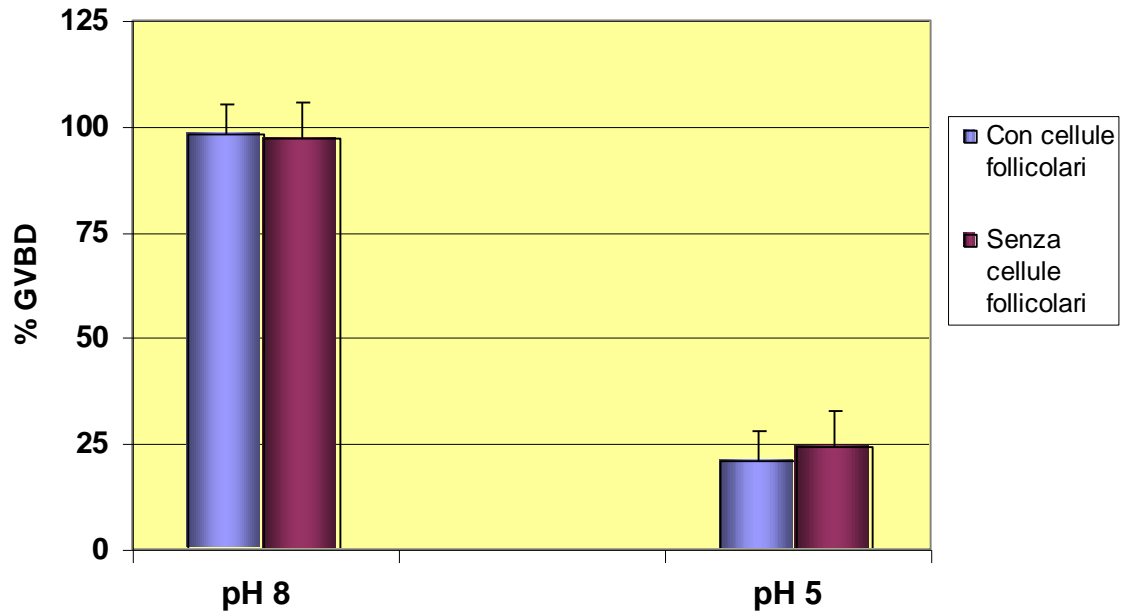


Figura 33. (In alto): percentuali di GVBD indotte in ovociti VG-C con o senza cellule follicolari esposti ad acqua di mare naturale a valori di pH 8.0 o pH 5.0.

(In basso): percentuali di GVBD in ovociti VG-C dopo 3 ore di incubazione in acqua di mare (Controllo,Ctr) o in una soluzione di 1-ottanolo 1 mM in acqua di mare.

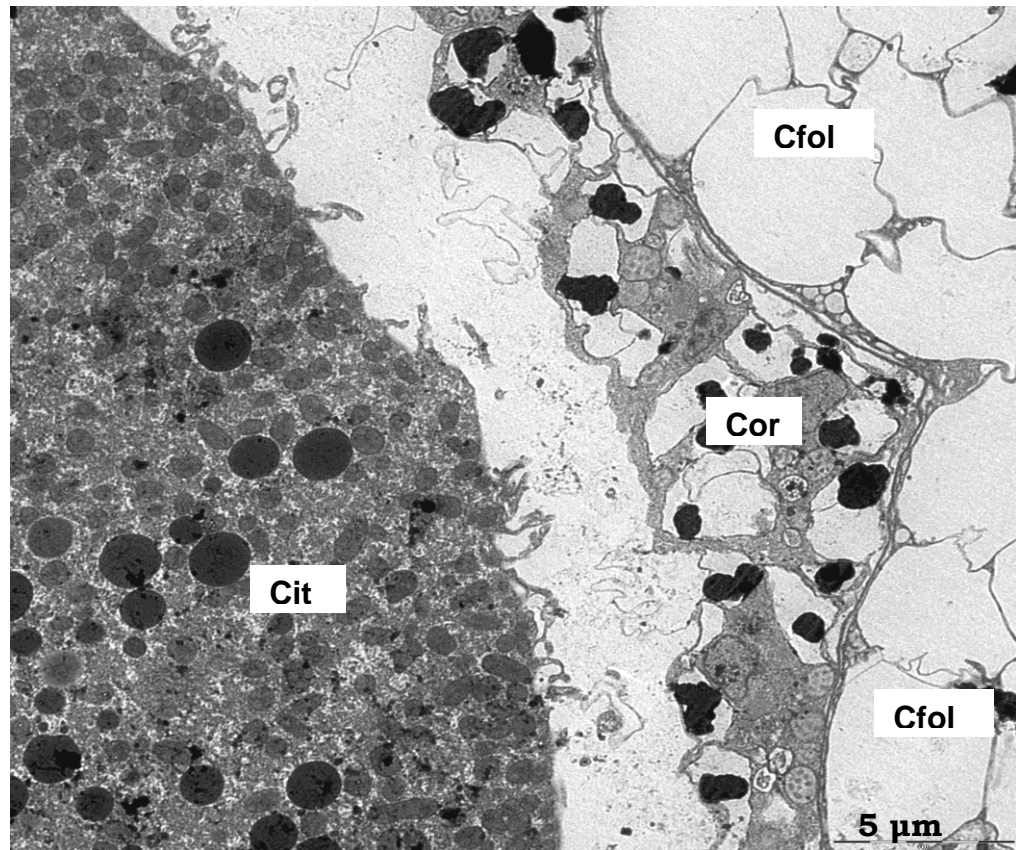


Figura 34. Osservazione di ovociti GV-C al microscopio elettronico a trasmissione. Non sono visibili strutture riconducibili a giunzioni comunicanti tra l'ovocita e le cellule follicolari. Cit= citoplasma; Cor= corion; Cfol= cellula follicolare.

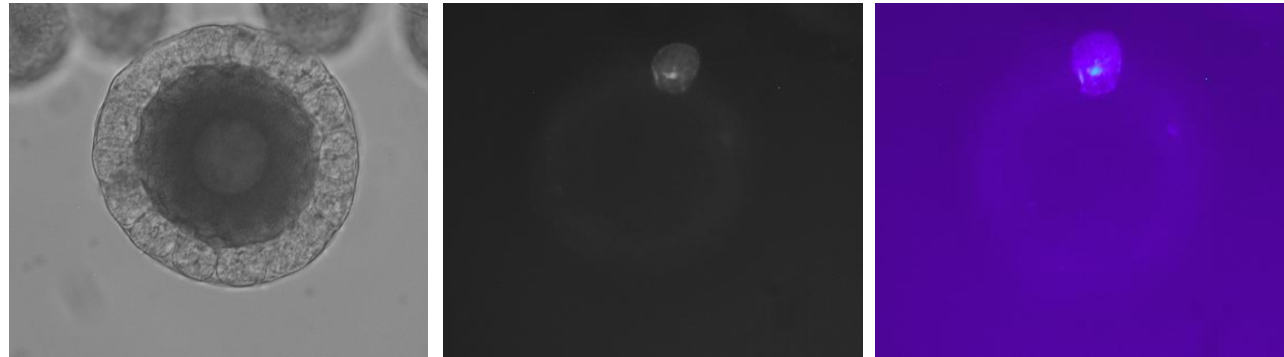


Figura 35. Iniezione del colorante fluorescente Lucifer Yellow in una singola cellula follicolare di un ovocita VG-C sotto luce trasmessa (a sinistra), fluorescente con immagine monocromatica (al centro) o elaborata con pseudo colori . Non si osserva la diffusione del colorante nell'ovocita nè una diminuzione di fluorescenza all'interno della follicolare iniettata.

4.5. Analisi statistica

Comparazione statistiche tra i dati mediante confronto a coppie *LSD*:

Potenziale di riposo

	VG-A	VG-B	VG-C	GVBD
VG-A				
VG-B	P < 0.01			
VG-C	P < 0.01	P < 0.05		
GVBD	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	

Tabella 4.5.a. Confronto a coppie delle medie dei valori di potenziale nei diversi stadi di maturazione

Conduttanza

	VG-A	VG-B	VG-C	GVBD
VG-A				
VG-B	NS			
VG-C	P < 0.01	P < 0.01		
GVBD	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	

Tabella 4.5.b. Confronto a coppie delle medie dei valori di conduttanza nei diversi stadi di maturazione

Correnti di calcio

	VG-A	VG-B	VG-C	GVBD
VG-A				
VG-B	P < 0.01			
VG-C	P < 0.01	P < 0.01		
GVBD	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	

Tabella 4.5.c. Confronto a coppie delle medie dei valori di ampiezza delle correnti di calcio registrate nei diversi stadi di maturazione dal potenziale di partenza -30 mV.

Correnti di sodio

	VG-A	VG-B	VG-C	GVBD
VG-A				
VG-B	P < 0.01			
VG-C	NS	NS		
GVBD	NS	NS	NS	

Tabella 4.5.d. Confronto a coppie delle medie dei valori di ampiezza delle correnti di sodio registrate nei diversi stadi di maturazione dal potenziale di partenza -80 mV. NS=Non significativo.

Valori di pH esterno

pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	10.0
4.0						
5.0	NS					
6.0	P < 0.01	P < 0.01				
7.0	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01			
8.0	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01		
10.0	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	NS	

Tabella 4.5.e. Confronto a coppie delle medie delle percentuali di GVBD di ovociti VG-C incubati in acqua di mare a differente pH. NS= Non significativo.

Tripsina ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.05	0.1	0.5	1
0					
0.05	NS				
0.1	P < 0.01	P < 0.01			
0.5	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01		
1	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	NS	

Tabella 4.5.f. Confronto a coppie delle medie delle percentuali di GVBD di ovociti VG-C incubati a differente concentrazione di tripsina . NS= Non significativo.

SBTI (mg/ml)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
0								
0.025	NS							
0.05	P<0.01	P<0.01						
0.1	P<0.01	P<0.01	P<0.01					
0.2	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01				
0.4	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	NS			
0.8	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	NS	NS		
1.6	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	NS	NS	NS	

Tabella 4.5.g. Confronto a coppie delle medie delle percentuali di GVBD di ovociti VG-C incubati a differente concentrazione di SBTI. NS= Non significativo.

5. DISCUSSIONE

In questa tesi di dottorato sono stati definiti due aspetti di base dell'accrescimento e della maturazione ovocitaria in *Ciona intestinalis*:

- a) una correlazione tra correnti di calcio di tipo L e correnti di sodio con l'accrescimento ovocitario allo stadio di vescicola germinale e l'acquisizione della competenza meiotica;
- b) alcune dinamiche molecolari che modulano la GVBD.

Benchè il ruolo delle correnti ioniche sia ampiamente descritto in letteratura (Hagiwara e Jaffe, 1979; Tosti e Boni, 2004; Cuomo et al., 2005, 2006; Boni et al., 2007), fino ad oggi si sa ancora poco sulle caratteristiche elettriche delle membrana plasmatica di un ovocita in accrescimento. Utilizzando la tecnica del *whole cell voltage clamp*, è stata mostrata per la prima volta la presenza di correnti di calcio voltaggio-dipendenti sulla membrana plasmatica di un ovocita in crescita bloccato allo stadio di vescicola germinale, correlate in maniera specifica alle dimensioni ovocitarie. In particolare, gli ovociti sono stati classificati in tre gruppi in base al loro diametro, alla morfologia e alla struttura delle cellule accessorie che lo circondano. Ognuno di questi gruppi è caratterizzato da una peculiare attività delle correnti di calcio e sodio. Infatti, gli ovociti VG-A, i più piccoli per dimensioni, mostrano una prevalenza delle correnti di calcio di tipo L, che decrescono in maniera significativa nei gruppi B e C. I valori di tali correnti riscontrate nei VG-C sono simili a quelli degli ovociti allo stadio MI (Dale et al., 1991; Cuomo et al., 2006). Al contrario, le correnti di sodio, assenti nei VG-A,

compaiono e aumentano gradualmente lungo il passaggio ai successivi stadi VG-B e VG-C, raggiungendo valori simili a quelli degli ovociti maturi (Cuomo et al., 2006).

La maturazione ovocitaria è un processo che include cambiamenti nucleari e citoplasmatici (Dale, 1983; Lambert, 2005). Questi ultimi coinvolgono modificazioni del quadro proteico e conducono l'ovocita all'acquisizione della competenza di sviluppo (Masui, 1996; Whitaker, 1996). Durante l'accrescimento, l'ovocita passa attraverso diversi stadi per raggiungere la piena competenza di maturazione e fecondazione (Albertini et al., 2003). È interessante che, negli ovociti dei mammifero, la competenza di maturazione dipende dalle dimensioni ovocitarie (Fulka et al., 1998; Otoi et al., 2000). Nelle ascidie, la crescita degli ovociti è correlata a profondi cambiamenti morfologici come il rigonfiamento dell'involucro vitellino, il rilascio delle cellule testali e l'estrusione delle cellule follicolari (Lambert, 2005). In varie specie, molte di queste modificazioni sono correlate a condizioni e sostanze che influenzano anche la maturazione nucleare. Nella presente tesi, la diminuzione delle correnti di calcio durante l'accrescimento indica che negli ovociti di *Ciona* gli stadi iniziali della maturazione citoplasmatica possono dipendere dal flusso di calcio attraverso la membrana plasmatica.

Il ruolo del calcio come messaggero secondario coinvolto nell'ovogenesi e nella maturazione ovocitaria è ben documentato (Whitaker e Swann, 1993; Homa, 1995; Carroll et al., 1996; Stricker, 1999). Ciò nonostante, l'influenza dell'ingresso di calcio attraverso i canali della membrana plasmatica durante la maturazione è stata descritta solo in poche specie di mammiferi (Murnane e De

Felice, 1993; Tosti et al., 2000; Lee et al., 2004) e molluschi (Dubè, 1992; Guerrier et al., 1993; Moreau et al., 1996; Tomkowiak et al., 1997; Colas e Dubè, 1998; Leclerc et al., 2000; Cuomo et al., 2005). Nella maggior parte dei casi, i canali responsabili dell'afflusso del Ca^{2+} nella cellula sono canali di calcio tipo L. Perciò, i risultati di questo studio sono in accordo con quelli di altri invertebrati marini e vertebrati, e, inoltre, confermano il ruolo giocato dalle correnti di calcio di tipo L durante gli eventi biologici alla base dell'accrescimento ovocitario allo stadio meiotico PI.

Viceversa, l'andamento inverso trovato per le correnti di sodio, simile a quello di altre specie di ascidie (Block e Moody, 1987; Hice e Moody, 1988; Coombs et al., 1992), indica una possibile funzione delle correnti di sodio negli eventi associati alla maturazione nucleare.

Questi dati sono in correlazione con il possibile ruolo delle correnti di sodio nel modulare le prime modificazioni elettriche dell'attivazione e della fecondazione dell'ovocita della *Ciona* (Cuomo et al., 2006).

Dai dati esposti emerge con chiarezza che nella *Ciona intestinalis* la maturazione dell'ovocita è associata a cambiamenti nell'attività della corrente ionica: in particolare, le correnti di calcio accompagnano la crescita e le modificazioni morfologiche, mentre le correnti di sodio sono alla base della acquisizione della competenza meiotica.

Il potenziale di riposo della membrana plasmatica iperpolarizza in maniera significativa dai VG-A ai VG-C raggiungendo in quest'ultimo il valore più negativo. Il potenziale è dovuto alla presenza di un voltaggio attraverso la plasma

membrana e, sebbene il suo ruolo non è del tutto chiaro, una variazione del potenziale durante la progressione meiotica è stata trovata in alcune specie (Tosti et al., 2000). Così come nei mammiferi, è probabile che un basso potenziale di riposo negli stadi immaturi precoci possa essere associato ad uno stato di *standby*. Probabilmente, non appena la membrana riceve il segnale per la crescita, il movimento di ioni Ca^{2+} e Na^+ potrebbe indurre lo spostamento del potenziale di riposo verso valori più vicini al potenziale fisiologico dell'ovocita maturo. La permeabilità della membrana, misurata come conduttanza *steady state*, è alta in VG e diminuisce durante la crescita indicando che la permeabilità più elevata corrisponde al primo arresto meiotico. Risultati simili sono stati osservati nei mammiferi (Murnane e DeFelice, 1993; Tosti, 2000). Forse, il sostenuto scambio ionico in questo stadio potrebbe supportare la forte attività metabolica necessaria per l'accrescimento ovocitario o preparare la membrana plasmatica per la GVBD. Uno dei primi eventi dell'avvenuta fecondazione negli ovociti di ascidia è la comparsa di una corrente ionica conosciuta come corrente di fecondazione (CF) (Dale, 1994; Tosti e Boni, 2004) che a sua volta provoca una depolarizzazione del potenziale e un massiccio rilascio di Ca^{2+} (Jaffe, 1980; Whitaker e Swann, 1993). Sebbene il significato biologico della corrente di fecondazione sia ancora poco chiaro in molti animali (Gianaroli et al., 1994; De Simone et al., 1998; Tosti et al., 2002; Glahn e Nuccitelli, 2003), alcuni recenti lavori indicano una possibile funzione nell'assicurare il corretto sviluppo dell'embrione di *Ciona intestinalis* (Tosti et al., 2003) e un ruolo delle correnti di Na^+ durante la genesi della corrente di fecondazione e il successivo sviluppo (Cuomo et al., 2006).

In questo lavoro di tesi, ovociti GVBD, ottenuti dalla maturazione *in vitro* di VG-C e fecondati, hanno mostrato una normale corrente di fecondazione un normale sviluppo fino allo stadio di larva sgusciata. Diversamente, ovociti del gruppo C allo stadio di VG, se fecondati, non hanno mostrato i normali eventi di fecondazione, indicando che, probabilmente, la formazione dei recettori per lo spermatozoo avvenga a seguito della GVBD. Inoltre, le successive fasi dello sviluppo hanno generato embrioni con morfologia anormale: infatti, le larve presentavano una coda ritorta e la fase iniziale della metamorfosi non avveniva. Una maturazione non corretta potrebbe essere l'origine dell'insuccesso della fecondazione e dello sviluppo, influenzando i recettori per gli spermatozoi presenti sulla membrana vitellina oppure inducendo anomalie citogenetiche o insufficienze biochimiche durante la maturazione citoplasmatica. In particolare, è dimostrato in letteratura che un accumulo insufficiente di mRNA durante la maturazione citoplasmatica può impedire l'attivazione del genoma embrionale durante lo sviluppo (Telford et al., 1990; Mènèzo, 2006). È noto che gli indicatori della vitalità embrionale più affidabili sono le caratteristiche morfologiche e un veloce tasso di divisione. I risultati di questa tesi indicano che la maturazione *in vitro* influenza parzialmente la competenza di fecondazione e/o la cascata di eventi successivi. Quindi, la formazione di una normale larva natante morfologicamente anomala e il fallimento della successiva regressione della coda, che è il primo evento della metamorfosi, potrebbe essere dovuto a una errata maturazione citoplasmatica (Satoh, 1994).

Nei mammiferi, si è visto che un coordinamento tra maturazione nucleare e citoplasmatica potrebbe essere essenziale per il successivo sviluppo e che richiede il mescolamento di nucleoplasma e citoplasma che avviene alla GVBD. Viceversa, alcuni processi di maturazione citoplasmatica correlati con un efficace sviluppo preimpianto possono avvenire anche senza un coordinamento con la maturazione nucleare (Eppig, 1996). Sempre nei mammiferi, è noto che l'ormone della crescita, i cui recettori sono presenti sulle cellule del cumulo e sull'ovocita, ha come effetto un incremento della velocità di maturazione e della competenza citoplasmatica (Izadyar et al., 1996, 1998; Mènèzo et al., 2003, 2006). I dati da noi ottenuti sono in accordo con quanto esposto: infatti, l'induzione della maturazione spontanea in assenza dello stimolo fisiologico potrebbe forse interferire con il corretto coordinamento tra maturazione citoplasmatica e la GVBD. Gli effetti e i meccanismi di una maturazione incompleta degli ovociti di *Ciona* sui successivi stadi di sviluppo saranno comunque oggetto di ulteriori studi.

In molti animali marini, come per esempio nelle ascidie *H. roretzi* (Sakahiri e Shirai, 1991) e *Ciona intestinalis* (Prodon et al., 2006), la maturazione è stimolata dalla semplice esposizione degli ovociti VG post-vitellogenicici all'acqua di mare (maturazione spontanea). Tra le possibili cause di tale fenomeno, dai risultati qui ottenuti possiamo escludere che la maturazione spontanea in *C. intestinalis* è dovuta a eventuali sostanze presenti nell'acqua di mare naturale. Infatti, non sono emerse differenze significative di maturazione tra ovociti immaturi in acqua di mare e in acqua di mare artificiale, contrariamente a quanto avviene negli ovociti

di alcuni vermi marini nemertini, dove sono stati riscontrati valori di GVBD più elevati in acqua di mare rispetto che in Ca^{2+} free o in acqua di mare artificiale (Stricker e Smythe, 2000).

Come descritto in altre specie di ascidie (Lambert 2005, 2008), un basso pH (5.0) blocca la maturazione negli ovociti di *Ciona*, mentre l'incubazione a pH 8.2 genera la massima percentuale di GVBD che resta costante anche a valori di pH più alcalini. D'altro canto, ovociti allo stadio VG, posti a pH 8.2 ma in acqua di mare priva di calcio, subivano una riduzione della GVBD, mentre il trattamento con lo ionoforo del calcio non era in grado di influenzare l'inibizione della maturazione a pH 5.0. È stato ipotizzato che il pH dell'acqua di mare sia in grado di indurre la produzione dell'induttore da parte delle cellule follicolari (Sakairi e Shirai, 1991), che si ritiene essere una proteasi con attività simile a quella della tripsina. In questa tesi emerge che la tripsina è in grado di indurre la GVBD, anche a valori di pH molto bassi, e che gli inibitori delle proteasi, che sono stati ritrovati negli estratti di tessuti di *Ciona* (Ødum et al., 1999), agiscono da potenti inibitori della GVBD. Un'ulteriore conferma di un possibile ruolo di molecole con attività tripsino-simili come sostanza che induce la maturazione è riportata da un recente lavoro su *C. intestinalis* (Aoyama et al., 2008), in cui è stato dimostrato che un neuropeptide secreto dalle fibre nervose che innervano l'ovario, la tachichinina, induce l'accrescimento ovocitario nell'ovocita vitellogenico facendolo progredire fino allo stadio post vitellogenico. Ciò è attuato mediante l'attivazione di proteasi sia a livello trascrizionale che enzimatico e avviene nelle cellule testali degli ovociti in accrescimento, dove è presente il recettore per le

tachichinine. Inoltre, la leupeptina, un inibitore delle serin-proteasi e cistein-proteasi, è in grado di bloccare la crescita ovocitaria allo stadio pre-GVBD nell'ascidia *Halocynthia roretzi* (Sakahiri e Shirai, 1991) e nella stella di mare *Asterina pectinifera* (Takagi-Sawada et al., 1989; Tanaka et al., 2000).

I risultati qui ottenuti hanno evidenziato che in *Ciona* le cellule follicolari non hanno un ruolo specifico nella GVBD, come invece avviene in altre ascidie (Sakairi e Shirai, 1991; Lambert 2005; 2008). Infatti, esperimenti con ovociti defollicolati non hanno mostrato cambiamenti nella GVBD. Inoltre, un'ulteriore conferma è stata fornita dall'assenza delle giunzioni comunicanti tra ovocita e cellule follicolari.

È noto in letteratura che l'AMP ciclico gioca un ruolo rilevante nella regolazione della maturazione degli ovociti dei mammiferi (Gilchrist e Thompson, 2007), ma le informazioni in letteratura risultano contrastanti, in quanto l'aumento dei livelli di AMP ciclico può avere un effetto di inibizione sulla GVBD (Eppig, 1989; Conti et al., 1998; Noguiera et al., 2003; Voronina e Wessel, 2003; Mehlmann, 2005) o di induzione (Freeman e Ridgway, 1988; Yamashita, 1988; Yi et al 2002, Stricker e Smythe, 2006; Takeda et al, 2006; Lambert, 2008) a seconda delle specie. In questa tesi, il mantenimento di alti livelli di AMPc ha provocato una inibizione della GVBD in *Ciona*, che è comparabile con ciò che avviene in *Xenopus* (Bagowski et al., 2001) e nei mammiferi (Gilchrist e Thompson, 2007). In considerazione del fatto che i complessi rapporti tra le follicolari e l'ovocita, esistenti in altre specie, sembrano essere assenti in *Ciona*, fa pensare all'esistenza

di un diverso meccanismo responsabile dell'aumento di AMP ciclico e quindi del suo ruolo nella ripresa meiotica.

Complessivamente, i dati emersi indicano che in *Ciona*:

- a) le cellule follicolari non sembrano avere un ruolo nell'indurre la GVBD e pertanto potrebbero non essere responsabili della produzione di alcuna molecola inducente o inibente la maturazione;
- b) Il primo blocco in PI sembra dipendere da alti livelli di AMP ciclico.

6. CONCLUSIONI

La maturazione nucleare e quella citoplasmatica sono eventi fondamentali che preparano l'ovocita per la fecondazione. Benchè siano stati ampiamente studiati, i meccanismi molecolari alla base di questi processi sono ancora da chiarire. Negli ovociti di ascidia sono stati proposti molti differenti meccanismi, ma rimane ancora sconosciuta la vera natura dello stimolo fisiologico che causa la ripresa meiotica e dà luogo a un ovocita competente. Nella presente tesi abbiamo chiarito alcuni aspetti di questi due processi negli ovociti della *Ciona intestinalis*. In particolare, abbiamo mostrato che:

- a) alcune correnti ioniche specifiche sono correlate al processo di crescita ovocitaria;
- b) il meccanismo di induzione della GVBD si basa sull'interazione reciproca tra pH, tripsina e calcio, ma senza il coinvolgimento delle cellule follicolari;
- c) l'AMP ciclico agisce da inibitore della maturazione in maniera simile a quanto avviene nei mammiferi, ma in contrasto con le altre specie di ascidie.

Questo ultimo dato mette in risalto la variabilità dei meccanismi biologici che esiste fra le diverse specie di ascidie, e, allo stesso tempo, conferma le sempre maggiori prove (Delsuc et al., 2006) che i tunicati condividono con i vertebrati molti meccanismi biologici comuni, rendendoli i loro parenti più prossimi e quindi un buon modello per gli studi genomici e dello sviluppo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abrieu A, Doree M, Fisher D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J. Cell Sci.* 114, 257-267.
- Aktas H, Wheeler MB, First NL, Leibfried-Rutledge ML. 1995. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP]i may have physiological relevance in bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 105(2):237-45.
- Albertini DF, Anderson E. 1974. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J Cell Biol.* 63(1):234-50.
- Albertini DF, Sanfins A, Combelles CM. 2003. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online* 6:410-415.
- Allen RD. 1953. Fertilization and artificial activation in the egg of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biol Bull*, 105:213-239.
- Anderson E, Albertini DF. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol.* 71(2):680-6.
- Aoyama M, Kawada T, Fujie M, Hotta K, Sakai T, Sekiguchi T, Oka K, Satoh N, Satake H. 2008. A novel biological role of tachykinins as an up-regulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykininergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Endocrinol* 149:4346-4356.

- Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE. 2001. The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signalling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 276:37708–37714.
- Baltsen M. 2001. Gonadotropin-induced accumulation of 4,4-dimethylsterols in mouse ovaries and its temporal relation to meiosis. *Biol Reprod.* 65(6):1743-50.
- Batta SK, Knudsen JF. 1980. Calcium concentration in cumulus enclosed oocytes of rats after treatment with pregnant mares serum. *Biol Reprod.* 22(2):243-6.
- Baulieu EE, Godeau F, Schorderet M, Schorderet-Slatkine S. 1978. Steroid induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium. *Nature.* 275:593-598.
- Berridge MJ. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315-325.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:517-529.
- Bettegowda A, Smith GW. 2007. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front. Biosci.* 12:3713-26.
- Block ML, Moody WJ. 1987. Changes in sodium, calcium and potassium currents during early embryonic development of the ascidian *Boltenia villosa*. *J Physiol* 393:619-634.
- Bobiniec Y, Marcaillou C, Morin X, Debec A.. 2003. Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 54(3):217-25.

- Boni R, Cuomo A, Tosti E. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex (COC) grade, calcium current activity and calcium stores. *Biol. Reprod.* 66, 836-842.
- Boni R, Gualtieri R, Talevi R, Tosti E. 2007. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. *Theriogenology* 68:56-64.
- Bootman MD, Berridge MJ. 1995. The elemental principles of calcium signalling. *Cell*, 83:675-678.
- Boyle JA, Ernst SG. 1989. Sea urchin oocytes possess elaborate cortical arrays of microfilaments, microtubules, and intermediate filaments. *Dev Biol.*134(1):72-84.
- Bornslaeger EA, Schultz RM. 1985. Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol Reprod.* 33(3):698-704.
- Brownlee C, Dale B. 1990. Temporal and spatial correlation of fertilization current, Ca²⁺ waves and cytoplasmic contraction in eggs of *Ciona intestinalis*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*239, 321-328.
- Burton KA, McKnight GS. 2007. PKA, germ cells and fertility. *Physiology* 22:40-46.
- Byskov AG, Yding Andersen C, Nordholm L, Thøgersen H, Guoliang X, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E, Roed T. 1995. Chemical structure of sterols that activate oocyte maturation. *Nature* 374:559–562.
- Byskov AG, Andersen CY, Leonardsen L. 2002. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.*187(1-2):189-96.

- Carafoli E. 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:1115-1122.
- Carroll J, Jones KT, Whittingham D. 1996. Ca²⁺ release and the development of Ca²⁺ release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Rev Reprod*, 1:137-143.
- Carroll J, Swann K, Whittingham D, Whitaker M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca²⁺]_i oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*, 120:3507-3517.
- Carroll J. 2000. Na⁺-Ca²⁺ exchange in mouse oocytes: modifications in the regulation of intracellular free Ca²⁺ during oocyte maturation. *J Reprod Fert*, 118:337-342.
- Catterall WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Ann Rev Cell and Dev Biol*, 16:521-555.
- Cerdá JL, Petrino TR, Wallace RA. 1993. Functional heterologous gap junctions in Fundulus ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev Biol*.160(1):228-35
- Chambers EL. 1989. An autobiographical sketch. In Nuccitelli R. Cherr G. Clark WH Jr. (editori) "*Mechanism of egg activation*" Plenum Press, New York, USA, pp. XV-XXVIII.
- Chiba K, Kado RT, Jaffe LA. 1990. Development of calcium release mechanisms during starfish oocyte maturation. *Dev Biol*, 140:300-306.
- Choi YH, Ekholm D, Krall J, Ahmad F, Degerman E, Manganiello VC, Movsesian MA. 2001. Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide

- phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *Biochem. J.* 353:41-50.
- Colas P, Dubè F. 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Seminars in Cell & Dev Biol* , 9:539-548.
- Conklin EG. 1905. Organ-forming substances in the eggs of ascidians. *Biol. Bull.* 8:205-208.
- Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. 1998. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. *Dev Biol.* 200(1):103-15.
- Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafiriri A. 1998. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Mol Cell Endocrin* 145:9-14.
- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiriri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.*187(1-2):153-9
- Coombs JL, Villaz M, Moody WJ. 1992. Changes in voltage-dependent ion currents during meiosis and first mitosis in eggs of an ascidian. *Dev Biol* 153:272-282.
- Coticchio G, Rossi G, Borini A, Grøndahl C, Macchiarelli G, Flamigni C, Fleming S, Cecconi S. 2004. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. *Hum Reprod.*19(12):2913-8.

- Cuomo A, Di Cristo C, Di Cosmo A, Paolucci M, Tosti E. 2005. Calcium currents correlate with oocyte maturation during the reproductive cycle in *Octopus vulgaris*. *J Exp Zool A*, 303:193-202.
- Cuomo A, Silvestre F, De Santis R, Tosti E. 2006. Ca^{2+} and Na^{+} current patterns during oocyte maturation, fertilization and early developmental stages of *Ciona intestinalis*. *Mol Reprod Dev* 73:501-511.
- Dale B. 1983. Fertilization in animals. In: Edward Arnold editor. London. The Camelot Pres Ltd.
- Dale B. 1989. Nonmammalian Animal Models for Biomedical Research. A. Woodhead (editore). CRC press, Boca Raton. chapter 7 , 87-103.
- Dale B. 1994. Oocyte activation in invertebrates and humans. *Zygote* 2:373-377.
- Dale B, De Felice LJ. 1984. Sperm-activated channels in ascidian oocytes. *Dev. Biol.* 101,235-239.
- Dale B, De Santis A. 1981. Maturation and fertilization of the sea urchin oocyte : an electrophysiological study. *Dev. Biol.* 85, 474-484.
- Dale B, Talevi R, DeFelice LJ. 1991. L-type Ca^{2+} currents in ascidian eggs. *Exp Cell Res* 192:302-306.
- Dale B, Fortunato A, Monfrecola V, Tosti E. 1996. A soluble sperm factor gates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13, 573-577.
- De Felice LJ. 1997. Electrical properties of cells, Patch clamp for biologists. Plenum Press, New York.

- De Felice LJ, Kell MJ. 1987. Sperm-activated currents in ascidian oocytes. *Dev. Biol.* 119:123-128.
- De Simone ML, Grumetto L, Tosti E, Wilding M, Dale B. 1998. Non specific currents at fertilization in sea urchin oocytes. *Zygote* 6:11-15.
- Deguchi R, Morisawa M. 2003. External Ca^{2+} is predominantly used for cytoplasmic and nuclear Ca^{2+} increases in fertilized oocytes of the marine bivalve *Macra chinensis*. *J Cell Sci*, 116:367-376.
- Deguchi R, Osanai K. 1994. Meiosis reinitiation from the first prophase is dependent on the levels of intracellular Ca^{2+} and pH in oocytes of the bivalves *Macra chinensis* and *Limaria hakodatensis*. *Dev Biol*, 166:587-599.
- Dekel N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 234(1-2):19-25.
- Dekel N, Lawrence TS, Gilula NB, Beers WH. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol.* 86(2):356-62.
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439:965-968.
- De Simone ML, Grumetto L, Tosti E, Wilding M, Dale B. 1998. Non specific currents at fertilization in sea urchin oocytes. *Zygote* 6:11-15.
- Downs SM. 1995. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol.* 167(2):502-12.

- Downs SM. 2001. A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. *Zygote*. 2001 Feb;9(1):71-82.
- Dubè F, Guerrier P. 1994. Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes by sperm or KCl, but not by NH₄ Cl, requires a calcium influx. *Dev Biol* 1982, 92:408-417.
- Dubè F. 1988. The relationships between early ionic events, the pattern of protein synthesis, and oocyte activation in the surf clam, *Spisula solidissima*. *Dev Biol*, 126:233-241.
- Dubè F. 1992. Thapsigargin induces meiotic maturation in surf clam oocytes. *Bioch Biophys Res Comm* 189:79-84.
- Ducibella TA, Anderson DF, Albertini F, Aalberg J, Rangarajan S. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during maturation. *Dev. Biol.* 130:184-197.
- Edwards RG. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208 (5008):349-351.
- Emery BR, Mirrel RL, Carrell DT. 2001. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. *BMC Dev Biol*.1:14.
- Eppig JJ. 1989. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *J Reprod Fertil Suppl* 38:3-8.
- Eppig JJ. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* , 13:569-574.

- Eppig JJ. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:485-489.
- Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, Wigglesworth K. 1997. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod.* 12(11 Suppl):127-32.
- Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK. 2005. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod.* 73(2):351-7.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin egg that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Fattaey A, Booher RN. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog. Cell Cycle Res.* 3:233-40.
- Feichtinger W, Osterode W, Hoyer J. 1988. Membrane potential measurements in human oocytes. *Arch. Gynaecol. Obstet.*, 243, 123-129.
- Ferrell JE Jr. 1999. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bioessays.* 21(10):833-42.
- FitzHarris G, Marangos P, Carroll J. 2003. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell.* 14(1):288-301.

- Freeman G, Ridgway EB. 1988. The role of cAMP in oocyte maturation and the role of the germinal vesicle contents in mediating maturation and subsequent developmental events in hydrozoans. *Roux Arch Dev Biol* 197:197-211.
- Fulka J Jr, Karnikova L, Moore RM. 1998. Oocyte polarity: ICSI, cloning and related techniques. *Hum Reprod* 13:3303-3305.
- Gianaroli L, Tosti E, Magli C, Iaccarino M, Ferraretti AP, Dale B. 1994. Fertilization current in the human oocyte. *Mol Reprod Dev* 38:209-214.
- Gilbert SF. 1996. *Biologia dello sviluppo*. Zanichelli.
- Gilchrist R, Thompson JG. 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67:6-15.
- Giudice G. 1985. "The sea urchin embryo" A developmental biological system. Springer Verlag.
- Glahn D, Nuccitelli R. 2003. Voltage-clamp study of the activation currents and fast block to polyspermy in the egg of *Xenopus laevis*. *Dev Growth Diff* 45:187-197.
- Grøndahl C. 2008. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Dan Med Bull*. 55(1):1-16.
- Grøndahl C, Ottesen JL, Lessl M, Faarup P, Murray A, Grønvald FC, Hegele-Hartung C, Ahnfelt-Rønne I. 1998. Meiosis-activating sterol promotes resumption of meiosis in mouse oocytes cultured in vitro in contrast to related oxysterols. *Biol Reprod*. 58(5):1297-302.

- Guerrier P, Leclerc-David C, Moreau M. 1993. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Dev Biol*, 159:474-484.
- Hagiwara S, Jaffe LA. 1979. Electrical properties of egg cell membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 8:385-416.
- Hake LE, Richter JD. 1997. Translational regulation of maternal mRNA. *Biochem. Biophys. Acta*, 1332:M31-M38.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*391(2):85-100.
- Han SJ, Conti M. 2006. New Pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B Complex in Oocytes Wee1B as a Potential PKA Substrate. *Cell Cycle* 5:3, 227-231.
- Heil-Chapdelaine RA, Otto JJ. 1996. Characterization of changes in F-actin during maturation of starfish oocytes. *Dev Biol.* 177(1):204-16.
- Henson JH, Beaulieu SM, Kaminer B, Begg DA. 1990. Differentiation of a calsequestrin-containing endoplasmic reticulum during sea urchin oogenesis. *Dev Biol.* 142(2):255-69.
- Hice RE, Moody WJ. 1988. Fertilization alters the spatial distribution and density of voltage-dependent sodium current in the egg of the ascidian *Boltenia villosa*. *Dev Biol* 127:408-420.
- Hill JL, Hammar K, Smith PJ, Gross DJ. 1999. Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca²⁺ efflux in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev*, 53, 244-253.

- Homa ST, Carroll J, Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum Repr*, 8:1274-1281.
- Homa ST. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Repr Dev*, 40:122-134.
- Hunt T, Luca FC, Ruderman JV. 1992. The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol*. 116(3):707-24.
- Iwamatsu T, Toya Y, Sakai N, Terada Y, Nagata R, Nagahama Y. 1993. Effect of 5-Hydroxytryptamine on steroidogenesis and oocyte maturation in pre-ovulatory follicles of the medaka *Oryzias latipes*. *Develop Growth & Differ*, 35:625-630.
- Iwasaki H, Chiba K, Uchiyama T, Yoshikawa F, Suzuki F, Ikeda M, Furuichi T, Mikoshiba K. 2002. Molecular characterization of the starfish inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and its role during oocyte maturation and fertilization. *J Biol Chem*. 277:2763-2772.
- Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. 1996. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 45:372-377.
- Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. 1998. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev* 49:444-453.
- Jaffe LF. 1980. Calcium explosions as triggers of development. *Annals of New York Acad. Sci. of USA*. 339, 86-101.

- Jaffe LA, Robinson KR. 1978. Membrane potential of the unfertilised sea urchin egg. *Dev. Biol.* 62, 215-228.
- Jaffe LA, Terasaki M. 1994. Structural changes in the endoplasmic reticulum of starfish oocytes during meiotic maturation and fertilization. *Dev Biol.* 164(2):579-87.
- Jones KT. 2008. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update.* 14(2):143-58.
- Juneja R, Ito E, Koide SS. 1994. Effect of serotonin and tricyclic antidepressants on intracellular calcium concentrations in *Spisula* oocytes. *Cell Calcium*, 15:1-6.
- Kidder GM, Mhawi AA. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction.* 123(5):613-20.
- Kim NH, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP, Lim JH. 2000. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 8(1):25-32.
- Laidlaw M, Wessel GM. 1994. Cortical granule biogenesis is active throughout oogenesis in sea urchins. *Development.* 120(5):1325-33.
- Lambert C. 2008. Signaling pathways in ascidian oocyte maturation: the role of cyclic AMP and follicle cells in germinal vesicle breakdown. *Dev Growth Differ* 50:181-188.
- Lambert CC. 2005. Signalling pathways in ascidian oocyte maturation: effects of various inhibitors and activators on germinal vesicle breakdown. *Dev Growth Differ*, 47:265-272.

- Leclerc C, Guerrier P, Moreau M. 2000. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biol Cell* 92:285-299.
- Lee JH, Yoon SY, Bae IH. 2004. Studies on Ca²⁺-channel distribution in maturation arrested mouse oocyte. *Mol Reprod Dev* 69:174-185.
- Levis RA, Rae JL. 1998. Low-noise patch-clamp techniques. *Methods Enzymol.* 293:218-66.
- Machaca K. 2004. Increased sensitivity and clustering of elementary Ca²⁺ release events during oocyte maturation. *Dev Biol*, 275:170-182.
- Maller JL. 1985. Oocyte maturation in amphibians. *Dev Biol*,1:289-311.
- Maro B, Verlhac MH. 2002. Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol.* 4(12):E281-3.
- Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M, Manganiello V. 2004. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J. Clin. Invest.* 114:196-205.
- Masui Y. 1985. Meiotic arrest in animal oocytes. In *Biology of Fertilization Volume 1*. Edited by: Metz CB, Monroy A. New York: Academic Press; 189-219.
- Masui Y. 1996. A quest for cytoplasmic factors that control the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* 2:1-13.
- Masui Y, Clarke HJ. 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* 57: 185-182.

- Matova N, Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol.* 231(2):291-320.
- Mattioli M, Gioia L, Barboni B. 1998. Calcium elevation in sheep cumulus-oocyte complexes after luteinising hormone stimulation. *Mol Reprod Dev.* 50(3):361-9.
- McCulloh DH, Levitan H. 1987. Rabbit oocyte maturation: changes of membrane resistance, capacitance and the frequency of spontaneous transient depolarization. *Dev. Biol.* 120, 162-169.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130:791–799.
- Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.* 170(2):607-15.
- Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science.* 297(5585):1343-5.
- Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. 2004. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 306(5703):1947-50.
- Mehlmann LM, Kalinowski RR, Ross LF, Parlow AF, Hewlett EL, Jaffe LA. 2006. Meiotic resumption in response to luteinizing hormone is independent of a Gi family G protein or calcium in the mouse oocyte. *Dev Biol.* 299(2):345-55.

- Ménézo Y. 2006. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. *Reprod Biomed Online* 12: 616-621.
- Ménézo Y, el Mouatassim S, Chavrier M, Servy EJ, Nicolet B. 2003. Human oocytes and preimplantation embryos express mRNA for growth hormone receptor. *Zygote* 11:293-297.
- Mita M. 2000. 1-Methyladenine: a starfish oocyte maturation inducing substance. *Zygote*, 8S:9-11.
- Miyazaki S, Igusa Y. 1981. Ca^{2+} -dependent action potential and Ca^{2+} -induced fertilization potential in golden hamster eggs. In Ohnishi ST. e Endo M. (editori.) *The Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes*, Academic Press, New York, USA, pp. 305-311.
- Moczydlowski E. 1992 Analysis of drug action at single-channel level. In “*Methods of Enzymology*” Rudy e Iverson (editori), 207, 791-806.
- Moody W. 1998. The development of voltage-gated ion channels and its relation to activity-dependent development events. *Curr Top Dev Biol* , 39:159-185.
- Moody WJ, Lansman JB. 1983. Developmental regulation of Ca^{2+} and K^{+} currents during hormone-induced maturation of starfish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3096-3100.
- Moor RM, Osborne JC, Cran DG, Walters DE. 1981. Selective effect of gonadotropins on cell coupling, nuclear maturation, and protein synthesis in mammalian oocytes. *J Embryol Exp Morphol*, 61:347-365.

- Moreau M, Vilain JP, Guerrier P. 1980. Free calcium changes associated with hormone action in amphibian oocytes. *Dev Biol*, 78:201-214.
- Moreau M, Leclerc C, Guerrier P. 1996. Meiosis reinitiation in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca) involvement of L- type calcium channels in the release of metaphase I block. *Zygote* 4:151-157.
- Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-4.
- Murnane JM, DeFelice LJ, Cohen J. 1988. Development of ionic currents in mouse oocyte. *J. Cell Biol.* 107, 4664 (abstr).
- Murnane JM, DeFelice LJ. 1993. Electrical maturation of murine oocytes: an increase in calcium current coincides with acquisition of meiotic competence. *Zygote* 1, 49-60.
- Nakamura Y, Makabe KW, Nishida H. 2005. POPK-1/Sad-1 kinase is required for the proper translocation of maternal mRNAs and putative germ plasm at the posterior pole of the ascidian embryo. *Development* 132:4731–4742.
- Neher E, Sakmann B, Steinbach JH. 1978. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch.* 375(2):219-28.
- Neher E, Sakmann B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260(5554):799-802.
- Neher E, Sakmann B. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 1266(3):44-51.
- Neher E. 1988. The use of the patch clamp technique to study second messenger-mediated cellular events. *Neuroscience.* 26(3):727-34.

- Neher E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. *Science*. 256(5056):498-502.
- Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, Cortvrindt R, Bourgain C, Devroey P, Smits J. 2003. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod* 69:1042–1052.
- Ødum L, Bundgaard JR, Johnsen AH. A Kazal-type trypsin inhibitor from the protochordate *Ciona intestinalis*. *Eur J Biochem* 259:872-876.
- Ogden D, Stanfield P. 1994. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. In Ogden D. editor. *Microelectrode Techniques, The Plymouth Workshop Handbook*, second edition. The Company of Biologists Ltd., Cambridge. 53-78.
- Okamoto H, Takahashi K, Yamashita N. 1977. Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.* (Lond.) 267, 465-495.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. 2000. Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54:535-542.
- Ouadid-Ahidouch H. 1998. Voltage-gated calcium channels in *Pleurodeles* oocytes: classification, modulation and functional roles. *Zygote* 6, 85-95.
- Parekh AB. 2003. Store-operated Ca^{2+} entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol*, 547:333-348.
- Parker LL, Piwnicka-Worms H. 1992. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*. 257:1955-7.

- Parfenov VN, Davis DS, Pochukalina GN, Sample CE, Bugaeva EA, Murti KG. 1995. Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. *Exp Cell Res.* 217(2):385-94.
- Patiño R, Purkiss RT. 1993. Inhibitory effects of n-alkanols on the hormonal induction of maturation in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes: implications for gap junctional transport of maturation-inducing steroid. *Gen Comp Endocrinol.* 91(2):189-98.
- Paynton BV, Bachvarova R. 1994. Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Mol Reprod Dev.* 1994 Feb;37(2):172-80.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology.* 129(6):3200-7.
- Piontkewitz Y, Dekel N. 1993. Heptanol, an alkanol that blocks gap junctions, induces oocyte maturation. *Endocrine Journal.* 1:365-372.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev,* 74:595-636.
- Prodon F, Dru P, Roegiers F, Sardet C. 2005. Polarity of the ascidian egg cortex and relocalization of cER and mRNAs in the early embryo. *J Cell Sci* 118:2393–2404.
- Prodon F, Chenevert J, Sardet C. 2006. Establishment of vegetal-animal polarity during maturation in ascidian oocytes. *Dev Biol,* 290:297-311.

- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM. 2001. In Neuroscience second edition Edited by Purves et al.
- Putney JW. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 11:611-624.
- Racowsky C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J Reprod Fertil*. 74(1):9-21.
- Racowsky C, Baldwin KV, Larabell CA, DeMarais AA, Kazilek CJ. 1989. Down-regulation of membrana granulosa cell gap junctions is correlated with irreversible commitment to resume meiosis in golden Syrian hamster oocytes. *Eur J Cell Biol*.49(2):244-51.
- Richard FJ. 2007. Regulation of meiotic maturation. *J Anim Sci*. 85(13 Suppl):E4-6.
- Richard FJ, Tsafriiri A, Conti M. 2001. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol. Reprod*. 65:1444-51.
- Rossi G, Macchiarelli G, Palmerini MG, Canipari R, Cecconi S. 2006.Meiotic spindle configuration is differentially influenced by FSH and epidermal growth factor during in vitro maturation of mouse oocytes. *Hum Reprod*. 21(7):1765-70.
- Russo GL, Vandenberg MT, Yu I J, Bae YS, Franza BR, Marshak DR. 1992. Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J Biol Chem* 267, 20317-25.
- Russo GL, Wilding M, Marino M, Dale B. 1998. Ins and outs of meiosis in ascidians. *seminars in Cell Dev Biol*, 9:559-567.

- Russo GL, Van Den Bos C, Sutton A, Coccetti P, Baroni MD, Alberghina L, Marshak DR. 2000. Phosphorylation of Cdc28 and regulation of cell size by the protein kinase CKII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 351, 143-150.
- Ryabova LV, Betina MI, Vassetzky SG. 1986. Influence of cytochalasin B on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Cell Differ.* 19(2):89-96.
- Sagata N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanism and biological significance. *Trends Cell Biol.* 6:22-28.
- Sakairi K, Shirai H. 1991. Possible MS production by follicle cells in spontaneous oocyte maturation of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev Growth Differ* 33:155-162.
- Sánchez-Toranzo G, Oterino J, Zelarayan L, Bonilla F, Bühler MI. 2007. Spontaneous and LH-induced maturation in *Bufo arenarum* oocytes: importance of gap junctions. *Zygote* 15:65-80.
- Santella L, De Riso L, Gragnaniello G, Kyozuka K. 1999. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by InsP3-mediated Ca²⁺ release. *Exp Cell Res.* 248:567-574.
- Sardet C, Speksnijder J, Terasaki M, Chang P. 1992. Polarity of the ascidian egg cortex before fertilization. *Development.* 115(1):221-37.
- Sardet C, Nishida H, Prodon F, Sawada K. 2003. Maternal mRNAs of PEM and macho 1, the ascidian muscle determinant, associate and move with a rough endoplasmic reticulum network in the egg cortex. *Development* 130(23):5839-49.

- Sardet C, Paix A, Prodon F, Dru P, Chenevert J. 2007. From oocyte to 16-cell stage : cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo. *Dev. Dynamics* 236:1716-1731.
- SAS. 1998. User's guide/STAT (Release 6.03 edition) Cary, NC: statistical analysis system institute.
- Sasseville M, Côté N, Guillemette C, Richard FJ. 2006. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Dev Biol.* 12;6:47.
- Satoh N. 1994. *Developmental Biology of Ascidians* . Cambridge University Press.
- Sasseville M, Côté N, Guillemette C, Richard FJ. 2006. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *Dev. Biol.* 6:47.
- Shiraishi K, Okada A, Shirakawa H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Miyazaki S. 1995. Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca²⁺ release during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol.*170(2):594-606.
- Schlichter LC. 1989. Ionic currents underlying the action potential of *Rana pipiens*. *Dev Biol* , 134:59-71.
- Schorderet-slatkine S. 1972. Action of progesterone and related steroids on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. An *in vitro* study. *Cell Differ*, 1:179-189.
- Schroepfer GJ Jr, Parish EJ, Kisic A, Jackson EM, Farley CM, Mott GE. 1982. 5 alpha-Cholest-8(14)-en-3 beta-ol-15-one, a potent inhibitor of sterol biosynthesis, lowers serum cholesterol and alters distributions of cholesterol in lipoproteins in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(9):3042-6.

- Sigworth FJ. 1986. The patch clamp is more useful than anyone expected. *Fed Proc.* 45(12):2673-7.
- Smiley S. 1990. A review of echinoderm oogenesis. *J Electron Microsc Tech.* 16(2):93-114.
- Smith LD, Richter JD. 1985. Synthesis, accumulation and utilization of maternal macromolecules during oogenesis and oocyte maturation, in *Biology of Fertilization*, Vol 1, Academic Press, pp. 141-188.
- Solomon, M. J. 1993. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 180-186.
- Steinhardt RA, Lundin L, Mazia D. 1971. Bioelectric responses of the echinoderm egg to fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 2426-2430.
- Stricker SA. 1999. Comparative biology of calcium signalling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 211:157-176.
- Stricker SA, Centonze VE, Melendez RF. 1994. Calcium dynamics during starfish oocyte maturation and fertilization. *Dev Biol*, 166:34-58.
- Stricker SA, Smythe TL. 2000. Multiple Triggers of Oocyte Maturation in Nemertean Worms: The Roles of Calcium and Serotonin. *J. of Exp. Zoology* 287:243-261.
- Stricker SA, Smythe TL. 2006. Differing mechanisms of cAMP- versus seawater-induced oocyte maturation in marine nemertean worms I. The roles of serine/threonine kinases and phosphatases. *Mol Reprod Dev* 73:1578-1590.
- Sun L, Machaca K: Ca²⁺ cyt negatively regulates the initiation of oocyte maturation. *J Cell Biol* 2004, 165:63-75.

- Sutcliffe MJ, Smeeton AH, Wo ZG, Oswald RE. 1998. Molecular modelling of ligand-gated ion channels. In Conn M. (editore) *Methods in Enzymology*, 293, Ion Channels, part B, Academic Press, USA, pp. 589-620.
- Swann K, Parrington J. 1999. Mechanism of Ca²⁺ release at fertilization in mammals. *Mol. Dev. Evol.* 285, 267-275.
- Taieb F, Thibier C, Jessus C. 1997. On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol Reprod Dev.* 48(3):397-411.
- Takagi-Sawada M, Someno T, Hoshi M, Sawada H. 1989. Inhibition of starfish oocyte maturation by leupeptin analogs, potent trypsin inhibitors. *Dev Biol* 133:609-612.
- Takahashi K, Okamura Y. 1998. Ion channels and early development of neural cells. *Physiol. Rev.* 78, 307-337.
- Takeda N, Kyojuka K, Deguchi R. 2006. Increase in intracellular cAMP is a prerequisite signal for initiation of physiological oocyte meiotic maturation in the hydrozoan *Cytaeis uchidae*. *Dev Biol* 298: 248-258.
- Tanaka E, Takagi-Sawada M, Sawada H. 2000. Enzymatic properties of the proteasome purified from starfish oocytes and its catalytic subunits involved in oocyte maturation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 125:215-223.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26:90-100.

- Terasaki M. 2000. Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol Biol Cell*.11(3):897-914.
- Terasaki M, Runft LL, Hand AR. 2001. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol Biol Cell*.12(4):1103-16.
- Terlau H. Stuhmer W. 1998. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften*, 85, 437-444.
- Thibault C. 1969. Formation et maturation des gametes. In *Traité de Zoologie: Anatomie, Systematique, Biologie Volume 16*. Edited by: Grasse PP. Paris Masson et Cie; 799-853.
- Tomkoviak M, Guerrier P, Krantic S. 1997. Meiosis reinitiation of mussel oocytes involves L-type voltage gated calcium channels. *J. Cell Biochem*. 64, 152-160.
- Törnell J, Billig H, Hillensjö T. 1991. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum Reprod* 6(3):411-22.
- Tosti E. 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol* 4:26.
- Tosti E. Dale B. 1995. Fecondazione in vitro. Edizioni Scientifiche Italiane.
- Tosti E, Boni R, Cuomo A. 2000. Ca²⁺ current activity decreases during meiotic progression in bovine oocytes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, 279, C1795-C1800.
- Tosti E, Boni R. Cuomo A. 2002. Fertilization and activation currents in bovine oocytes. *Reproduction* 124, 835-846.

- Tosti E, Romano G, Buttino I, Cuomo A, Ianora A, Miralto A. 2003. Bioactive aldehydes from diatoms block the fertilization current in ascidian oocytes. *Mol Reprod Dev* 66:72-80.
- Tosti E, Boni R. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Human Reprod. Update* 10(1):53-65.
- Tsafiriri A, Pomerantz SH. 1986. Oocyte maturation inhibitor. *Clin Endocrinol Metab*, 15:157-170.
- Tsafiriri A, Cao X, Vaknin KM, Popliker M. 2002. Is meiosis activating sterol (MAS) an obligatory mediator of meiotic resumption in mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 187(1-2):197-204.
- Tsafiriri A, Motola S. 2007. Are steroids dispensable for meiotic resumption in mammals? *Trends Endocrinol Metab*. 18(8):321-7.
- Varnum SM, Wormington WM. 1990. Deadenylation of maternal mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation does not require specific cis-sequences: a default mechanism for translational control. *Genes Dev*.4(12B):2278-86.
- Verkhatsky A, Krishtal OA, Petersen OH. 2006. From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch*. 453(3):233-47.
- Vivarelli E, Conti M, De Felici M, Siracusa G. 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differ*. 12(5):271-6.
- Voronina E, Wessel GM. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Curr. Top. Dev. Biol*. 58:53-110.

- Wasserman WJ, Penna MJ, Houle JG. 1986. The regulation of *Xenopus laevis* oocyte maturation, in: Gametogenesis and the early embryo. Edited by JG Gall. New York: Alan R. Liss, 111-130.
- Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. 2002. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol.* 246(2):441-54.
- Wessel GM, Zaydfudim V, Hsu YJ, Laidlaw M, Brooks JM. 2000. Direct molecular interaction of a conserved yolk granule protein in sea urchins. *Dev Growth Differ* 42(5):507-17.
- Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S. 2001. The biology of cortical granules. *Int. Rev. Cytol.* 209:117-206.
- Wessel GM, Conner SD, Berg L. 2002. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development.* 129(18):4315-25
- Whitaker M, Patel R. 1990. Calcium and cell cycle control. *Development*, 108:525-542.
- Whitaker M, Swann K. 1993. Lighting the fuse at fertilization. *Development*, 117:1-12.
- Whitaker M. 1996. Control of meiotic arrest. *Rev. Repr* 1:127-135.
- Witchel HJ, Steinhardt RA. 1990. 1-Methyladenine can consistently induce a fura-detectable transient calcium increase which is neither necessary nor sufficient for maturation in oocytes of the starfish *Asterina miniata*. *Dev Biol*, 141:393-398.

- Yamada L. 2006. Embryonic expression profiles and conserved localization mechanisms of pem/postplasmic mRNAs of two species of ascidian, *Ciona intestinalis* and *Ciona savignyi*. *Dev Biol* 296:524–536.
- Yamada L, Kobayashi K, Satou Y, Satoh N. 2005. Microarray analysis of localization of maternal transcripts in eggs and early embryos of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* 284:536–550.
- Yamamoto Y, Yoshizaki G. 2008. Heterologous giunzioni comunicantis between granulose cells and oocytes in ayu (*Plecoglossus altivelis*): formation and role during luteinizing hormone-dependent acquisition of oocyte maturational competence. *J. Reprod. and Dev.* 54:1-5.
- Yamashita M. 1988. Involvement of cAMP in initiating maturation of the brittle star *Amphipholis kochii* oocytes: induction of oocyte maturation by inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases and activators of adenylate cyclase. *Dev Biol* 125:109-114.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In Knobil E. Neil J (editori) *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York.
- Ye J, Coleman J, Hunter MG, Craigon J, Campbell KH, Luck MR. 2007. Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and developmental potential of pig oocytes in vitro. *Reproduction*. 133(5):877-86.
- Yi JH, Lefevre L, Gagnon C, Anctil M, Dube F. 2002. Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *J Cell Sci* 115:311-320.

8. Pubblicazioni

Boni R, Cocchia N, **Silvestre F**, Tortora G, Lorizio R, Tosti E. Juvenile and adult immature and in vitro matured ovine oocytes evaluated in relation to membrane electrical properties, calcium stores, IP3 sensitivity and apoptosis occurrence in cumulus cells. (**Mol Reprod Dev.** 2008; 75(12):1752-60)

Shmukler YB, **Silvestre F**, Tosti E. 5-HT-receptive structures are localized in the interblastomere cleft of *Paracentrotus lividus* early embryos. (**Zygote.** 2008. 16(1):79-86)

Shmukler YB, Tosti E, **Silvestre F**. Effect of local microapplication of serotonergic drugs on membrane currents of *Paracentrotus lividus* early embryos. (**Ontogenez.** 2007; 38(4):254-61).

Comes S, Locascio A, **Silvestre F**, d'Ischia M, Russo GL, Tosti E, Branno M, Palumbo A. Regulatory roles of nitric oxide during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis*. (**Dev Biol.** 2007; 306(2):772-84)

Cuomo A, **Silvestre F**, De Santis R, Tosti E. Ca²⁺ and Na⁺ current patterns during oocyte maturation, fertilization, and early developmental stages of *Ciona intestinalis*. (**Mol Reprod Dev.** 2006; 73(4):501-11).

Ringraziamenti

Si ringraziano i dottori Annunziata Cuomo, Stefania Bilotto, Alessandra Gallo, Gian Luigi Russo, il Prof. Raffaele Boni e il Sig. Vincenzo Monfrecola per l'aiuto offerto nello svolgimento del lavoro e preparazione della tesi.

Si ringrazia il professor Rafael A. Fissore, che mi ha dato l'opportunità di lavorare per sei mesi nel suo laboratorio dell'Università del Massachusetts.

Si ringrazia il servizio di "Acquacoltura di Organismi Marini" della Stazione Zoologica "Anton Dohrn".

Si ringraziano i Sig. Giuseppe Gargiulo e Giampiero Lanzotti del servizio "Acquisizioni ed elaborazioni di immagini" per il lavoro grafico.