



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

**P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006**  
**PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,**  
**COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI**  
**E**  
**UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE**  
**PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO**  
**INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE**  
**(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA**  
**E**  
**PROGETTO IN\_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI**  
**“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)**  
**“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO**  
**SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – SOTTO - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-**

**ASSEGNISTA DI RICERCA:**

Giuseppina Catanzaro

**Tutor/ Responsabile Scientifico:**

Prof..ssa Barbara Barboni

**Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:**

Università degli studi di Roma “Tor Vergata”

**Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:**

Prof. Alessandro Finazzi Agrò

**Durata soggiorno laboratorio ospitante:**

N. 3 Trimestri

## **Caratterizzazione del ruolo e dei meccanismi d'azione del sistema endocannabinoide nella riproduzione maschile**

Gli endocannabinoidi sono un gruppo di lipidi endogeni che include ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi polinsaturi a lunga catena. (1,2). Di questi, l'*N*-arachidonoiletanolammina, anandamide (AEA), ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) sono i principali endocannabinoidi descritti fino ad ora. (3,4). Essi svolgono le proprie azioni sui sistemi Nervoso Centrale (5) e Periferico (6) legando dei recettori di membrana, detti recettori per i cannabinoidi di tipo 1 e 2 (CB1 e CB2) (7). Recentemente è stato dimostrato che l'AEA attiva anche i recettori vanilloidi di tipo 1 (TRPV1). (8), agendo quindi da endovanilloide.

Contrariamente ai classici neurotrasmettitori e neuropeptidi, AEA e 2-AG normalmente non sono contenuti in compartimenti cellulari, ma prodotti "su richiesta" a seguito dell'attivazione recettoriale.

L'agente chiave nella sintesi dell'AEA è l'*N*-acilfosfatidiletanolammina (NAPE)-fosfolipasi D (NAPE-PLD). Essa agisce sull'*N*-arachidonoilfosfatidiletanolammina (NArPE) rilasciando AEA ed Acido Fosfatidico. La via biosintetica principale del 2-AG invece prevede l'idrolisi del Fosfatidilinositolo bifosfato di membrana da parte dell'enzima Fosfolipasi C (PLC) con conseguente liberazione dell'1-acil-2-arachidonoilglicerolo (DAG) (9,10). Il DAG è quindi convertito in 2-AG per opera di una sn-1-DAG lipasi (DAGL) (11,12).

L'attività biologica dell'AEA e del 2-AG dipende dalla loro concentrazione nello spazio extracellulare, la quale a sua volta dipende dalla degradazione di questi due composti tramite: i) un trasportatore di membrana specifico (Trasportatore di membrana per l'AEA, AMT) (13, 14), il quale sembra essere implicato nel trasporto non solo dell'AEA, ma anche del 2-AG (15,16) e ii) un'AEA idrolasi (idrolasi ammidica degli acidi grassi, FAAH) (17,18,19,20), implicata anche nell'idrolisi del 2-AG (21). Tuttavia il principale enzima responsabile della degradazione del 2-AG non sembra essere la FAAH, come dimostrato dal fatto che i livelli del 2-AG, contrariamente a quelli dell'AEA, non aumentano nei topi knockout per la FAAH (22); ma la Monoacilglicerolo lipasi (MAGL) la quale, così come la FAAH, idrolizza questo endocannabinoide rilasciando Acido Arachidonico (AA) e Glicerolo (23,24).

Gli endocannabinoidi sono implicati in vario modo nei meccanismi di crescita, differenziamento e morte cellulare; nel corso degli ultimi anni è emerso un loro ruolo in vari aspetti della riproduzione nei mammiferi. In particolare, recentemente è stato proposto un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione della riproduzione maschile.

Ad esempio le cellule del Sertoli, dette anche cellule di sostegno perché capaci di "sostenere" e nutrire le cellule germinali e, di conseguenza, implicate nella spermatogenesi, sono capaci di legare e degradare l'AEA poiché contengono i recettori CB2, l'AMT e la FAAH (25) e, nel corso di quest'ultimo anno, è stato dimostrato che contengono anche DAGL e MAGL perciò possono sintetizzare, legare e degradare anche il 2-AG (26).

Inoltre i testicoli di ratto sintetizzano AEA (27), e questo composto è stato rilevato a concentrazioni nanomolari anche nel plasma seminale umano (28). Pertanto è stato proposto un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione delle funzioni spermatiche richieste per la fecondazione anche nell'uomo (29,30) ed a questo proposito è stato effettuato uno studio volto a dimostrare che anche gli spermatozoi di verro possiedono un vero e proprio sistema endocannabinoide (31), gettando le basi per ulteriori analisi biochimiche e funzionali.

Nonostante sia noto che la somministrazione cronica ad animali di laboratorio di  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo, il principio attivo della canapa (*Cannabis sativa*), induce impotenza (32), diminuisce la secrezione di testosterone e riduce la produzione, la mobilità e la vitalità degli spermatozoi (33), il ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione della fertilità maschile rimane poco studiato. Il legame dell'AEA ai recettori CB presenti negli spermatozoi del riccio di mare riduce la loro capacità di fecondazione (34,35), e omogenati interi di questi animali sono capaci di convertire N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE) in AEA (36). Gli spermatozoi eiaculati dagli animali a fecondazione intracorporea quali i mammiferi, a differenza degli animali inferiori, devono andare incontro ad una maturazione funzionale nel tratto genitale femminile, necessaria per l'acquisizione del potere fecondante. Lo spermatozoo acquisisce tale capacità dopo una lunga selezione che si realizza durante la risalita verso l'ambiente tubarico, passando attraverso distretti in cui è documentata la presenza di alti livelli di AEA (37). Durante questa "capacitazione" si realizzano una serie di modificazioni funzionali, solo parzialmente note, che implicano cambiamenti intracellulari dei livelli ionici ( $Ca^{++}$ : 38,39;  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e bicarbonato: 40) e di modulatori molecolari (cAMP:41), oltre a modificazioni della fluidità di membrana (42,43) e dell'assetto metabolico ed enzimatico (44). In primo luogo lo spermatozoo al termine della capacitazione sviluppa recettori che gli consentono di riconoscere specifiche strutture dell'oocita, quali le glicoproteine della zona pellucida (ZP) e componenti della matrice extracellulare del cumulo ooforo (45,46). Inoltre, nello spermatozoo si attivano sistemi che traducono il segnale di riconoscimento della cellula uovo in eventi intracellulari, che portano lo spermatozoo stesso ad esocitare il contenuto acrosomiale (47). La sequenza temporale di questi cambiamenti è modulata da meccanismi regolatori locali, che fanno sì che la capacitazione avvenga fisiologicamente solo quando lo spermatozoo raggiunge l'ambiente tubarico (48,49). Lo scopo specifico di questo progetto di ricerca è quello di verificare se il sistema endocannabinoide sia coinvolto in questa regolazione, che può interessare lo spermatozoo maturo durante il processo di capacitazione e di riconoscimento dell'oocita.

Lo scopo di questo progetto di ricerca è quello di valutare in che modo l'AEA ed il 2-AG sono implicati nella regolazione della spermatogenesi e se il 2-AG, oltre che l'AEA, interviene nei meccanismi di maturazione e capacitazione delle cellule spermatiche; ciò al fine di poter successivamente definire i meccanismi molecolari attraverso cui queste molecole modulano processi fisiologici di così rilevante interesse.

## Referenze

1. Fowler CJ, Jonsson K-O, Tiger G Fatty acid amide hydrolase: biochemistry, pharmacology and therapeutic possibilities for an enzyme hydrolyzing anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide and oleamide. *Biochem Pharmacol* 2001 62:517–526.
2. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R 2-Arachidonyl glyceryl ether: an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 98:3662–3665.

3. Howlett AC, Mukhopadhyay S Cellular signal transduction by anandamide and 2-Arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 2000 108:53–70.
4. Sugiura T, Waku K 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 2000 108:89–106.
5. Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system-an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:221-233.
6. Parolaro D, Massi P, Rubino T, Monti E. Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:319-332.
7. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54:161-202.
8. Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 2002;108:421-430.
9. Di Marzo V. “Endocannabinoids” and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1998. 1392: 153-175.
10. Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N. Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis.* 1998. 6: 462-473.
11. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997. 388: 773-778.
12. Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. Cloning of the first sn1- DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 2003. 163: 463-468.
13. Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agrò A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem.* 2000. 275: 31938-31945.
14. Hillard CJ, Jarrahian A. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol.* 2003. 69: 631-638.
15. Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport.* 2000. 11: 1231-1235.
16. Bisogno T, Maccarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem.* 2001b. 268: 1982-1989.

17. Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem.* 1993. 46: 791-796.
18. Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agro AF. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem.* 1998. 273: 32332-32339.
19. Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V. Fatty acid amide hydrolase, an enzyme with many bioactive substrates. Possible therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 2002. 8: 533-547.
20. Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* 2002. 298: 1793-1796.
21. Di Marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis.* 1998b. 5: 386-404.
22. Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002, 302: 73-79.
23. Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem* 1999. 264: 258-267.
24. Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, and Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1999. 57: 417-423.
25. Maccarrone M, Cecconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agrò A. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal ageing and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 2003. 144: 20-28.
26. Rossi G, Gasperi V, Paro R, Barsacchi D, Cecconi S, and Maccarrone M. Follicle-stimulating hormone activates fatty acid amide hydrolase by protein kinase A and aromatase-dependent pathways in mouse primary Sertoli cells. *Endocrinology.* 2007 Mar; 148(3): 1431-9.
27. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K. Enzymatic synthesis of anandamide an endogenous cannabinoid receptor ligand through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 218: 113-117.
28. Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida A. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem. Phys. Lipids* 2002a 121: 211-227.
29. Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Mahony MC, Giuffrida A, Picone RP, Makriyannis A Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 2002b 63:376-387.
30. Rossato M, Popa FI, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human sperm express cannabinoid receptor CB1 which activation inhibits motility, acrosome reaction and mitochondrial function *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2005 90: 984-991.

31. Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Cell Sci.* 2005 118: 4393-4404.
32. Murphy LL, Gher J, Steger RW, Bartke A. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on copulatory behavior and neuroendocrine responses of male rats to female conspecifics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 48:1011-1017.
33. Hall W, Solowij N Adverse effects of cannabis. *Lancet* 1998 352: 1611-1616.
34. Chang MC, Berkery D, Schuel R, Laychock SG, Zimmerman AM, Zimmerman S, Schuel H. Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm and its role in blockade of the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 1993 36: 507-516.
35. Schuel H, Goldstein E, Mechoulam R, Zimmerman AM, Zimmerman S. Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 91: 7678-7682.
36. Bisogno T, Ventriglia M, Milone A, Mosca M, Cimino G, Di Marzo V. Occurrence and metabolism of anandamide and related acyl-ethanolamides in ovaries of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1997 1345:338-348.
37. Paria BC, Dey SK. Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem. Phys. Lipids* 2000 108: 211-220
38. Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, Takenawa T. Phospholipase C $\alpha$ 4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* 2003 1: 79-88.
39. Wennemuth G, Babcock DF, Hille B. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J. Gen. Physiol.* 2003 122: 115-128.
40. Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem.* 2003 28;278: 7001-7009.
41. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* 1997 56: 707-719.
42. Harrison RA. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J. Reprod. Fertil.* 1997 52: S195-211.
43. Gadella BM Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000 127: 2407-2420.
44. Suarez SS, Ho HC. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol.* 2003 49: 351-356.
45. Morales P, Llanos M. Interaction of human spermatozoa with the zona pellucida of oocyte: development of the acrosome reaction *Front Biosci.* 1996 1:146-160

46. Barboni B, Lucidi P, Mattioli M, Berardinelli P. VLA-6 integrin distribution and calcium signaling in capacitated boar sperm. *Mol Reprod Dev.* 2001 59: 322-329.
47. Breitbart H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol* 2003 49: 321-327.
48. Hunter RH, Rodriguez-Martinez H. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol Reprod Dev.* 2004 67: 243-250
49. Hunter RH. Fallopian tube physiology: preliminaries to monospermic fertilization and cellular events post-fertilization. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2005 52:245-261.

#### Descrizione delle attività di ricerca previste nell'ambito del programma

Le premesse descritte fanno supporre un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione della spermatogenesi e della funzionalità e maturazione degli spermatozoi. Quindi, nel corso di questo progetto di ricerca ci si propone di caratterizzare dal punto di vista biochimico tutti i componenti del sistema endocannabinoide, valutandone in modo completo la presenza e le proprietà in cellule del Sertoli ed in spermatozoi maturi di verro (*Sus scropha*), un modello animale molto vicino all'uomo. Più in dettaglio, si studierà negli spermatozoi l'effetto del sistema endocannabinoide sulle modificazioni funzionali che interessano le cellule mature dopo l'eiaculazione. Il processo di capacitazione degli spermatozoi verrà promosso in vitro, utilizzando metodi standardizzati (Barboni et al., 1995. *J. Endocrinol.* 144, 1-8). Inoltre, verrà analizzato il ruolo svolto dal sistema endocannabinoide durante l'acquisizione del potere fecondante in coltura, così come nelle fasi di riconoscimento spermatozoo/oocita ed in quelle di fecondazione riprodotte in vitro (Barboni et al., 2001. *Mol Reprod Dev.* 59, 322-329). Gli esperimenti biochimici avranno il fine di misurare i livelli di anandamide (AEA) e di 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) presenti negli spermatozoi "a riposo" ed in quelli capacitati. Allo stesso tempo, in tali cellule verranno misurate le attività enzimatiche di NAPE-PLD, AMT, FAAH, MAGL e DAGL e si procederà alla caratterizzazione del livello di legame dell'AEA ai recettori CB1R, CB2R e TRPV1 e del 2-AG ai recettori CB1R e CB2R, eventualmente presenti nelle popolazioni cellulari analizzate. Tali misure verranno fatte in modo quantitativo, usando le metodiche descritte di seguito. Verranno anche valutate le variazioni dei livelli proteici di CB1R, CB2R, TRPV1 e FAAH durante vari stadi funzionali degli spermatozoi, in particolare prima e dopo capacitazione e reazione acrosomiale, grazie alla disponibilità di anticorpi specifici di cui è stata già dimostrata la capacità di reagire con le proteine del verro (Maccarrone et al., *J. Cell Sci.* 118, 4393-4404). Allo scopo di stabilire eventuali variazioni funzionali dei recettori cannabici degli spermatozoi, verranno effettuati dosaggi quantitativi di legame del [<sup>35</sup>S]GTPγS, in seguito a stimolazione con AEA e con 2-AG. Nelle stesse cellule, la funzionalità dei recettori e degli enzimi metabolici dell'AEA sarà anche analizzata in funzione di variazioni della fluidità della membrana spermatica, ottenuta mediante deplezione/arricchimento di colesterolo (Bari et al., 2005. *J. Biol. Chem.* 280, 12212-12220). Infatti, studi recenti di relazione struttura-funzione hanno fatto ipotizzare che l'AEA incontri i suoi recettori nel doppio strato lipidico, piuttosto che sulla superficie cellulare (Reggio et al., 2004. 14th Annual Symposium on the Cannabinoids, Paestum, Italy; Bari et al., 2005. *J. Biol. Chem.* 280, 12212-12220). In questo contesto, è particolarmente interessante sottolineare come studi sugli spermatozoi di verro abbiano dimostrato che la fluidità di membrana è un parametro critico per la funzionalità spermatica (Shadan et al., 2004. *Biol Reprod.* 71, 253-265). Per valutare il grado di

fluidità di membrana, verrà dosato il contenuto in colesterolo delle membrane e verranno eseguite misure di fluorescenza con il laurdan (Maccarrone et al., 2002. *J. Neurochem.* 82, 1444-1452).

Analisi biochimiche del sistema endocannabinoide. Il nostro gruppo di ricerca è in grado di eseguire le analisi biochimiche di ognuno degli elementi ad oggi identificati del sistema endocannabinoide relativo all'AEA e al 2-AG. I livelli endogeni di AEA e 2-AG nei campioni verranno misurati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore a fluorescenza, come riportato di recente (Wang et al., 2001. *Anal. Biochem.* 294, 73-82). Il legame di [3H]AEA, di [3H]CP55,940 (un agonista sintetico dei recettori CB1 e CB2) e di [3H]resiniferatossina (un ligando ad alta affinità per TRPV1) a frazioni di membrane cellulari verrà determinato mediante analisi di filtrazione rapida, come descritto (Maccarrone et al., 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 31938-31945). Le costanti di dissociazione apparente (Kd) e di legame massimo apparente (Bmax) verranno calcolate mediante analisi di regressione nonlineare, usando il programma Prism 3 (GraphPAD Software for Science). L'attività di AMT sarà misurata come descritto in precedenza (Maccarrone et al., 2001. *J. Neurochem.* 78, 339-348). L'idrolisi di [3H]AEA da parte dell'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH) sarà dosata in estratti cellulari mediante cromatografia liquida ad alta prestazione su fase inversa, come già descritto (Maccarrone et al., 1999. *Anal. Biochem.* 267, 314-318). Le costanti cinetiche di AMT e FAAH, vale a dire la costante apparente di Michaelis-Menten (Km) e la velocità massima apparente (Vmax), verranno calcolate mediante analisi di regressione nonlineare, usando il programma Prism 3. L'attività della fosfolipasi D che sintetizza AEA (NAPE-PLD) sarà dosata misurando il rilascio di [3H]AEA da N-[3H]arachidonoil-fosfatidiletanolamina (N-[3H]ArPE), seguendo il metodo messo a punto dal nostro gruppo (Fezza et al., 2005. *Anal. Biochem.* 339, 113-120). L'attività della DAGL, che sintetizza il 2-AG, sarà dosata misurando il rilascio di [14C] 2-AG mediante cromatografia su strato sottile (Bisogno et al., 2003. *J Cell Biol* 163, pp.463-468). L'attività della MAGL, che degrada il 2-AG, sarà dosata misurando il rilascio di [3H]glicerolo come descritto (Dinh et al., 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, pp. 10819-10824). [3H]AEA, [3H]CP55,940, N-[3H]ArPE, [14C] 2-AG, [3H]glicerolo sono disponibili commercialmente. L'analisi statistica dei dati verrà eseguita mediante il test t di Student, parametrico, oppure mediante il test U di Mann-Whitney, nonparametrico, usando il programma the InStat 3 (GraphPAD Software for Science).

Analisi dell'espressione e dosaggi funzionali del sistema endocannabinoide. L'espressione proteica di CB1R, CB2R, TRPV1 e FAAH verrà valutata mediante separazione dei lisati cellulari tramite SDS-PAGE e successiva analisi in Western blot, usando anticorpi anti-CB1R, anti-CB2R, anti-TRPV1 ed anti-FAAH, disponibili in commercio. Variazioni dell'espressione degli mRNA degli stessi componenti del sistema endocannabinoide saranno valutati mediante RT-PCR semiquantitativa e Real-Time PCR quantitativa (Dainese et al., 2004. *Anal Lett.* 37, 1139-1150). Il saggio di legame con il [35S]GTP $\gamma$ S verrà effettuato come descritto precedentemente (Breivogel et al., 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 16865-16873). Il contenuto di colesterolo nelle membrane plasmatiche e la fluidità di membrana verranno determinate, come già descritto precedentemente (Maccarrone et al., 2002. *J. Neurochem.* 82, 1444-1452), negli spermatozoi e se possibile nelle altre cellule in studio.

Analisi dell'effetto del sistema endocannabinoide sulle modificazioni funzionali nello spermatozoo maturo. Il processo di capacitazione, il riconoscimento spermatozoo-oocita e la fecondazione in vitro verranno riprodotti in presenza od in assenza dell'analogo stabile dell'AEA, la Met-AEA.

Per poter esaminare la regolazione della trasduzione del segnale legata al sistema endocannabinoide, verrà inoltre fatto uso di inibitori o di antagonisti specifici per i singoli recettori od enzimi coinvolti. S'intende analizzare quanto segue: a) livelli intracellulari di cAMP; b) livelli basali di Ca<sup>++</sup>; c) polimerizzazione dell'actina e stato del citoscheletro; d) distribuzione degli enzimi responsabili della reazione acrosomiale; e) effetto delle proprietà di membrana sul coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella capacitazione. In tale contesto, va ricordato che cAMP e Ca<sup>++</sup> sono due modulatori fondamentali per le modificazioni funzionali che si associano



alla capacitazione (Baldi et al., 1996. *Frontiers Bioscience.* 1, 189-205; Breitbart et al., 1999. *Reviews of Reproduction.* 4, 151-159).

I livelli intracellulari di cAMP verranno valutati sui campioni di seme a diversi stadi funzionali, mediante kit di dosaggio disponibili commercialmente (Maccarrone et al., 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 31938-31945).

I livelli basali di Ca<sup>++</sup> intracellulare verranno valutati parallelamente attraverso l'uso di sonde fluorescenti e mediante spettrofluorimetria, così come verrà studiata la "clearance" dello ione associando analisi di microscopia confocale (Wennemuth et al., 2003. *J. Gen. Physiol.* 122, 115-128; Wiesner and Hagen, 1999. *Photochem. Photobiol.* 49, 112-9) ad indagini di "intake" di calcio radiomarcato (<sup>45</sup>Ca) dall'ambiente extracellulare (Fraser and McDermott, 1992. *J. Reprod. Fertil.* 96, 363-367; Fraser, 1995. in *Human sperm acrosome reaction*. Eds Fenichel P. Parinaud J. Colloque/INSERM John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, France vol 236, 17-33).

Durante la capacitazione diminuisce il contenuto di G actina e si assiste ad una progressiva polimerizzazione della proteina che si localizza nella struttura acrosomiale ed a livello di regione post-equatoriale (Castellani-Ceresa et al., 1993. *Mol. Repr. Dev.* 36, 203-211; Brener et al., 2003. *Biol. Reprod.* 68, 837-45). Lo stato di polimerizzazione dell'actina verrà analizzato attraverso metodiche di microscopia a fluorescenza mediante l'uso di falloidina legata a fluorocromi, così come mediante indagini di tipo ultrastrutturale che consentiranno di documentare in modo più puntuale l'assetto citoscheletrico e la sua topografia.

Poiché la polimerizzazione dell'actina durante la capacitazione assolve alla necessità di ancorare sulla membrana ed in regioni specifiche della testa dello spermatozoo enzimi coinvolti nel processo di reazione acrosomiale (Brener et al., 2003. *Biol. Reprod.* 68, 837-845; Barboni et al., 2004. *Vet. Res. Commun.* 28 Suppl 1, 157-160), indagini ultrastrutturali consentiranno di valutare la effettiva rilocalizzazione di tali enzimi e la loro colocalizzazione con proteine citoscheletriche rilevanti (Shetty et al., 2003. *J. Biol. Chem.* 15, 278; Fouquet and Kann, 1994. *Biol. Cell.* 81, 89-93; Breitbart, 2002. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 139-144). Al tempo stesso, grazie all'uso di anticorpi specifici, sarà possibile allestire studi di immunocitochimica volti anche a determinare se durante il processo di capacitazione si assiste ad una rilocalizzazione di recettori ed enzimi propri del sistema endocannabinoide, e se questo si associa alla riorganizzazione del citoscheletro. A tal fine, oltre a studi immunoenzimatici di colocalizzazione si potrà anche procedere ad inibire selettivamente il processo di polimerizzazione dell'actina mediante l'uso di specifici inibitori (citocalasina D).

Infine, poichè la capacitazione si associa a cambiamenti della composizione e, quindi, delle proprietà biofisiche delle membrane cellulari, quest'ultime saranno oggetto di verifica attraverso l'uso di varie tecniche. Saranno ottenute informazioni circa la dinamica dei cambiamenti verificatisi nella composizione lipidica grazie alla possibilità di marcare in modo selettivo e sensibile il colesterolo con sonde fluorescenti, quali la filipina (Flesch et al., 2001. *J. Cell. Sci.* 114, 3543-3555), valutare l'esposizione della fosfatidilserina mediante legame con l'annessina V coniugata con FITC (Gadella et al., 2002. *Biol. Reprod.* 67, 340-350), nonché il grado di disordine delle strutture lipidiche costituenti la membrana cellulare mediante saggio di legame con la merocianina (Gadella and Harrison, 2000. *Development.* 127, 2407-2420). In ultimo verrà valutata la fluidità di membrana grazie all'uso di specifiche tecniche di microscopia confocale, quali la FRAP (Fluorescence Redistribution After Photobleaching; Mackie, 2001. *Biol. Reprod.* 64, 113-119).

Al termine della capacitazione, per valutare se gli endocannabinoidi siano in grado di modulare il processo di riconoscimento spermatozoo/oocita, gli spermatozoi stessi verranno esposti agli agonisti fisiologici (i.e. proteine della zona pellucida od estratti proteici del cumulo solubilizzato), capaci di promuovere negli spermatozoi capacitati il processo di reazione acrosomiale. In tale ottica, oltre a valutare l'incidenza della reazione acrosomiale indotta verranno studiate in parallelo, mediante microscopia confocale sul singolo spermatozoo, le variazioni dei livelli intracellulari di Ca<sup>++</sup> promosse dagli stimolanti sopra descritti. Ciò al fine di documentare in modo dinamico eventuali variazioni spazio-temporali del rilascio intracellulare dello ione, che potrebbero influenzare tale processo.

Lo spermatozoo capacitato non solo deve essere in grado di riconoscere la cellula uovo, ma successivamente deve attraversare la zona pellucida e raggiungere l'oolemma fondendosi con esso. Questo evento conclusivo del processo di acquisizione del potere fecondante nello spermatozoo maturo verrà valutato riproducendo in vitro il processo di fecondazione, o mediante l'allestimento di un test consolidato di valutazione del potere fecondante: l' "hamster test" (Xu et al., 1998. J. Anim. Sci. 76, 3079-3089; Braundaier et al., 2004. J. Anim. Sci. 82, 452-458).