



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**Dipartimento di scienze della vita e dell'ambiente**

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare Applicata curriculum  
Tecnologie Biologiche

***Controllo centrale e periferico della riproduzione nella linea  
mutante di zebrafish per il gene Adenomatous Polyposis Coli  
(APC<sup>+/-</sup>)***

***Central and peripheral control of reproduction in zebrafish  
Adenomatous Polyposis Coli (APC<sup>+/-</sup>) mutant line***

Tesi di Laurea di:  
**Erika Giani**

Relatore:  
**Dott.ssa Francesca Maradonna**

Correlatore:  
**Chiar.ma Prof.ssa Oliana Carnevali**

Sessione straordinaria

Anno Accademico 2021/2022

## INDICE

### **1. Introduzione**

- 1.1 Il controllo della riproduzione in Zebrafish, Danio rerio: asse ipotalamo-ipofisi-gonade*
- 1.2 Crescita e maturazione degli ovociti*
- 1.3 Il sistema endocannabinoide*
- 1.4 Mutazione APC*

### ***Scopo del lavoro***

### **2. Materiali e metodi**

- 2.1 Trattamento di Zebrafish*
- 2.2 Raccolta delle diverse classi follicolari*
- 2.3 Analisi istologica con protocollo ematossilina eosina*
- 2.4 Analisi biomolecolari*
- 2.5 Estrazione dell'RNA totale e valutazione della sua qualità*
- 2.6 Sintesi del cDNA*
- 2.7 Real-Time PCR*
- 2.8 Analisi statistica*

### **3. Risultati**

- 3.1 Analisi istologica*
- 3.2 Analisi dell'espressione genica nel cervello*
- 3.3 Analisi dell'espressione genica nell'ovario*

### **4. Discussione**

### **5. Conclusione**

### **6. Bibliografia**

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1 Il controllo della riproduzione in Zebrafish, Danio rerio: asse ipotalamo-ipofisi-gonade*

La riproduzione in zebrafish, così come in tutti gli altri vertebrati, è controllata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonade che svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi degli ormoni, regolando la loro sintesi, trasporto e metabolismo (Maharajan et al. 2020). Nell'ipotalamo il controllo della riproduzione è regolato dall'attività dei neuroni Kiss. Nello zebrafish ne troviamo di due tipi, i neuroni Kiss1, la cui localizzazione è limitata al nucleo abenulare e i neuroni Kiss2 che, invece, sono distribuiti nella regione ventrale e caudale dell'ipotalamo, del talamo, dell'area preottica, del mesencefalo e del pallio (Hoo et al. 2016).

Kiss 1, essendo principalmente presente nell'abenula, non è direttamente coinvolto nella riproduzione di zebrafish, ma svolge un ruolo nella modulazione, attraverso il rilascio di serotonina, di comportamenti emotivi legati alla capacità riproduttiva, come la risposta alla paura (Ogawa & Parhar 2018). Studi recenti mostrano come, in certi casi, Kiss1 possa compensare l'assenza di Kiss2, considerata, invece, la forma maggiormente rilevante dal punto di vista riproduttivo (Zohar 2021).

Entrambi questi nuclei sono produttori della kisspeptina, un potente neurotrasmettitore in grado di agire sia a livello dell'ipotalamo, dove induce il rilascio del GnRH (de Roux et al. 2003, Seminara et al., 2004), sia a livello di ipofisi e gonade. Questo dimostra come tale neuropeptide giochi un ruolo importante nella regolazione dell'intero asse riproduttivo. In zebrafish è stato dimostrato che la kisspeptina 2 riesce a stimolare la sintesi di mRNA che codificano per gli ormoni coinvolti nella maturazione e per i loro recettori presenti sugli ovociti (Hatef et al. 2022). Trattamenti con una kisspeptina esogena (Kiss2-10) rivelano, infatti, un incremento dei livelli di mRNA di LH e FSH in modo dose dipendente (Song et al. 2020).

Oltre alla kisspeptina, un altro importante neuropeptide di origine ipotalamica è il l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH). In zebrafish sono state identificate due forme di GnRH: GnRH2 e GnRH3, localizzati rispettivamente nel tegumento del mesencefalo e nell'area del bulbo olfattivo. È noto che GnRH2 svolge un importante ruolo di collegamento tra riproduzione e condizioni fisiologiche, come regolazione del fotoperiodo e controllo dell'alimentazione. Per esempio, in zebrafish è stato osservato come i neuroni GnRH2 del mesencefalo, riescano ad innervare la ghiandola pituitaria in risposta al digiuno, permettendo al pesce di rimanere fertile anche in condizioni dietetiche non ottimali (Zohar et al. 2022).

Il GnRH3, invece, è considerato la forma ipofisiotropica di zebrafish (Abraham et al. 2010), la cui funzione è quella di stimolare la produzione delle gonadotropine. A dimostrazione di questo, sono stati valutati i livelli del recettore di GnRH3 nell'ipofisi del pesce adulto, e si è visto che, questi, arrivano ad essere fino a 4 volte superiori rispetto a quelli del recettore di GnRH2.

È chiaro, quindi, che è principalmente GnRH3 a svolgere il ruolo di regolatore della riproduzione in tutte le specie che presentano due forme di GnRH. Tuttavia, recenti studi mostrano che la perdita di GnRH3 in zebrafish, non comporta effetti sulla riproduzione e sulla deposizione delle uova (Zohar 2021). Questo dimostra come esistano tanti altri fattori cerebrali che possano compensare la sua funzione. Tra questi, kisspeptine, GnIH e secretoneurina, sono tra quelli maggiormente studiati.

Una volta raggiunta l'ipofisi, GnRH3 promuove la sintesi e il rilascio degli ormoni follicolostimolante (FSH) e luteinizzante (LH), i quali andranno ad agire a livello della gonade, legandosi ai rispettivi recettori. FSH-R, specifico per FSH, è presente sia sulle cellule della teca che in quelle della granulosa, mentre LH-R è presente solo sulle cellule della granulosa, ma specifico sia per FSH che per LH (Clelland & Peng 2009). Nei pesci con ovario asincrono, come zebrafish, sono state riscontrate variazioni molto ampie del tasso di sintesi e rilascio delle gonadotropine durante il ciclo di sviluppo ovocitario.

Tali variazioni si riflettono sull' espressione dei loro recettori da parte delle cellule somatiche della gonade. Infatti, l'espressione di FSH-R è bassa durante la fase di crescita primaria, poi aumenta significativamente durante il passaggio allo stadio pre-vitellogenico, e continua a salire fino a raggiungere un picco, allo stadio medio-vitellogenico (MV). Infine, la sua espressione diminuisce allo stadio di tarda vitellogenesi (LV), prima della maturazione e dell'ovulazione degli ovociti. Al contrario, l'espressione di LH-R aumenta lentamente nelle prime fasi della follicologenesi, per poi mostrare un significativo aumento allo stadio MV, e raggiungere il picco allo stadio di maturazione/ovulazione.

Il legame delle gonadotropine con i loro recettori induce la produzione di fattori di crescita e ormoni steroidei che favoriscono la gametogenesi.

Tra questi, il principale ormone femminilizzante coinvolto nel processo riproduttivo è il  $17\beta$ -estradiolo (E2), la cui sintesi richiede un lavoro sinergico tra le cellule della teca e quelle della granulosa. Le cellule della teca secernono anche testosterone che poi verrà trasportato nelle cellule della granulosa e convertito in estradiolo dall'aromatasi. Una volta sintetizzato, l'E2 viene immesso nel sistema circolatorio e raggiunge il fegato. Il legame dell'E2 con il recettore innesca una serie di reazioni che portano alla trascrizione del gene per la vitellogenina, la quale raggiungerà la gonade attraverso il circolo ematico, e sarà internalizzata dagli ovociti competenti.

## *1.2 Crescita e maturazione degli ovociti*

La struttura di base della regolazione ormonale all'interno dell'ovario è rappresentata dal follicolo. Esso consiste di tre parti fondamentali: l'ovocita, le cellule della granulosa e le cellule della teca. I follicoli di zebrafish contengono un singolo strato di cellule della granulosa, separate dall'ovocita dall'involucro vitellino. All'esterno delle cellule della granulosa vi è un sottile strato di teca, contenente sia fibroblasti che cellule tecali steroidogeniche.

L'ovario di zebrafish è un organo estremamente dinamico in cui i follicoli vanno incontro ad uno sviluppo asincrono (Ge 2005). All'interno dell'ovario, infatti, possiamo trovare follicoli a 5 diversi stadi di sviluppo.

Lo stadio I (20 -140  $\mu\text{m}$ ) è lo stadio di crescita primaria in cui gli ovociti iniziano ad ingrandirsi e vengono ricoperti da un singolo strato di cellule follicolari squamose. Man mano che l'ovocita cresce, si osserva la comparsa di organuli intracellulari, mentre l'ooplasma diventa più basofilo.

Poco dopo l'inizio di questo stadio, i cromosomi iniziano a decondensarsi ed entrano nella fase di diplotene, nella quale rimangono per il resto dello sviluppo degli ovociti. Lo stadio II (0,14-0,34 mm) è caratterizzato dalla comparsa di alveoli corticali ricchi di tuorlo all'interno dell'ovocita.

All'inizio di questo stadio, inoltre, l'involucro vitellino sviluppa un secondo strato: lo strato esterno rimane omogeneo e moderatamente denso di elettroni, mentre lo strato interno, appena formato, è più lucido agli elettroni.

Durante lo stadio III (0,34-0,69 mm) inizia il processo di vitellogenesi con conseguente aumento della dimensione dei follicoli. Questo stadio viene solitamente distinto in stadio IIIa (precoce), in cui gli ovociti non sono ancora in grado di maturare, e stadio IIIb (tardivo), in cui gli ovociti iniziano a rispondere agli ormoni maturativi.

Allo stadio IV (0,69-0,73 mm) comincia la vera e propria maturazione: la vescicola germinale migra verso la periferia, l'involucro nucleare si rompe, si verifica la prima divisione meiotica e i cromosomi entrano nella metafase della meiosi II dove si arrestano; a questo punto, l'ovocita diventa uovo (Selman et al. 1993). Nello stadio V le uova sono al massimo della loro grandezza e sono pronte per essere fecondate.

A regolare il passaggio da uno stadio all'altro e a permettere la ripresa della meiosi ci sono fattori paracrini e autocrini. Sotto il controllo dell'ipofisi, l'ormone luteinizzante stimola le cellule follicolari, in particolare quelle della granulosa, a produrre l'ormone che induce la maturazione (MIH).

Questo agisce sui recettori progestinici mPR $\alpha$  e mPR $\beta$  legati alla membrana degli ovociti.



Il profilo di espressione dei due recettori durante lo sviluppo del follicolo è in linea con le loro funzioni nel promuovere la maturazione degli ovociti (Tan et al. 2009). Infatti, la presenza di mPR $\alpha$  e mPR $\beta$  risulta bassa nei follicoli ovarici nelle prime fasi dell'oogenesi (classi I-II-IIIa), e gradualmente più elevata dopo l'inizio della fase di crescita vitellogena (classi IIIb e IV).

Un potente effetto stimolante sull'acquisizione della competenza maturativa degli ovociti è svolto dall'activina (conosciuta anche come Inhibin $\beta$ A), un fattore di crescita ovarico appartenente alla superfamiglia dei fattori di crescita TGF $\beta$ . È stato dimostrato che il knockout di InhbA nelle cellule della granulosa di zebrafish, rende il mutante subfertile, suggerendo un ruolo molto importante per  $\beta$ A nella funzione ovarica (Pangas et al. 2007).

Il segnale MIH ricevuto sulla superficie dell'ovocita viene trasdotto nel citoplasma per la formazione e l'attivazione di MPF, l'induttore finale della maturazione (Nagahama, Yamashita, 2008). Questo fattore consiste di una subunità catalitica Cdc2, e di una subunità regolatrice rappresentata dalla ciclina B (Hirai et al., 1992). È stato osservato che la ciclina B è assente negli ovociti immaturi di zebrafish, mentre il suo mRNA viene immagazzinato nel citoplasma degli ovociti previtellogeni e in quelli quasi completamente cresciuti (Kondo et al. 1997).

Pertanto, la sintesi della ciclina a partire dall'mRNA, indotta dal MIH, è un prerequisito fondamentale per la formazione e successiva attivazione di MPF, che indurrà la rottura della vescicola germinale (GVBD), la condensazione cromosomica e la formazione del fuso, permettendo, così, la ripresa della meiosi.

### ***1.3 Il sistema endocannabinoide***

Il sistema endocannabinoide (ECS) è un sistema di segnalazione cellulare ampiamente distribuito nei tessuti biologici, e coinvolto in molte attività fisiologiche, come funzioni motorie e cardiache, risposta infiammatoria, metabolismo dei lipidi, gametogenesi e riproduzione (Meccariello et al. 2020). Il sistema coinvolge sia i cannabinoidi endogeni (endocannabinoidi), come l'anandamide, sia i cannabinoidi esogeni, come  $\Delta^9$ -THC. Queste sostanze esercitano il loro effetto attraverso il legame con i recettori dei cannabinoidi accoppiati alla proteina G, noti come CB1 e CB2, anche se possono interagire con altri recettori come GPR55 (Khara et al. 2022). L'attivazione di tali recettori comporta l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi, con conseguente diminuzione di cAMP, che porta ad un'iperpolarizzazione delle membrane cellulari e all'attivazione/inibizione di specifici pathways in grado di modificare il metabolismo intracellulare (Santoro et al. 2021).

CB1 è il recettore più abbondante nel sistema nervoso centrale, ma la sua espressione è presente anche in vari tessuti periferici, sia neurologici che endocrini, come ovario e testicolo. Il recettore CB2 è anch'esso presente nel sistema nervoso, ma in minor quantità rispetto a CB1, mentre è abbondante nei tessuti del sistema immunitario, dove ha il compito di innescare effetti pro-infiammatori o antinfiammatori nelle cellule immunitarie, a seconda del ligando con cui entra in contatto (Dobovišek et al., 2020).

Gpr55, infine, è emerso recentemente come un recettore dei cannabinoidi di "tipo 3" (Yang et al. 2016). Questo recettore è altamente espresso nelle regioni del sistema nervoso centrale, incluso talamo e ipotalamo, ma è presente anche nelle cellule endoteliali e nel tratto gastrointestinale.

È noto che i cannabinoidi esercitano un potente effetto sulle funzioni riproduttive di tutti i vertebrati, compreso zebrafish. In particolare, l'ECS modula le attività del sistema ipotalamo-ipofisi-gonade di entrambi i sessi, attraverso un controllo centrale e locale della riproduzione (Meccariello et al. 2014). A livello centrale, gli endocannabinoidi e i cannabinoidi esogeni agiscono sull'ipotalamo, in particolare sui neuroni a GnRH, ricchi di CB1, e sull'ipofisi, esercitando un effetto negativo sul rilascio di gonadotropine (Cottone et al. 2013). Inoltre, svolgono un'azione anche a livello locale, con effetti diretti sulla sintesi di estrogeni e progesterone da parte delle gonadi.

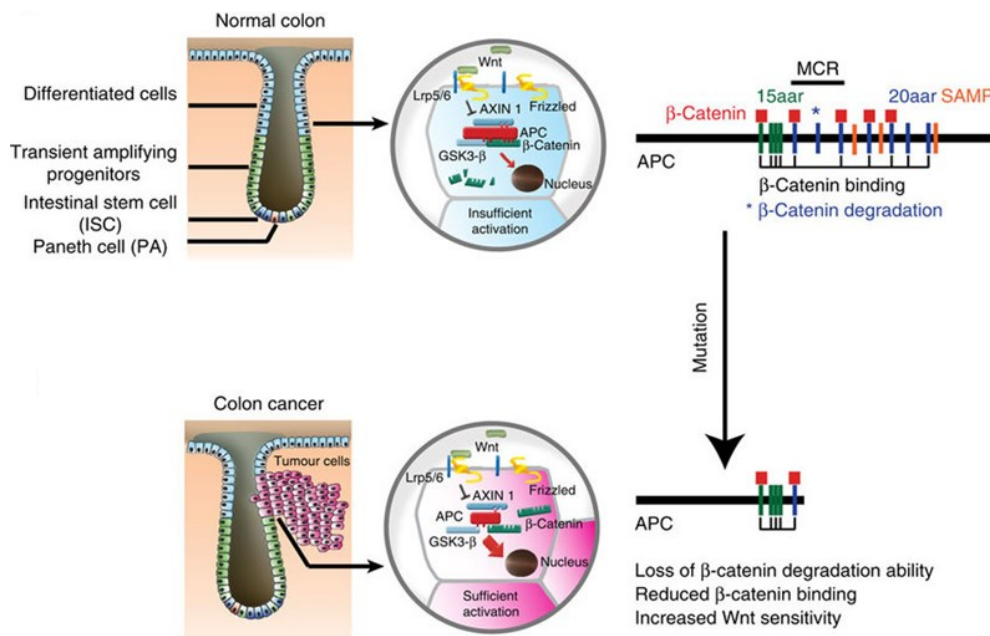
Come già detto, infatti, i recettori CB1 non sono presenti solo nell'ipotalamo, ma anche nella gonade.

In zebrafish, per esempio, l'mRNA di CB1 è stato localizzato nell'ovario, in particolare negli oociti vitellogenici di classe III e IV, mentre non è presente nelle uova mature (classe V). Questo suggerisce come CB1 sia sicuramente coinvolto nei processi di crescita e maturazione degli ovociti, ma non nelle primissime fasi dello sviluppo dell'embrione (Migliarini & Carnevali 2009).

#### ***1.4 Mutazione APC***

Il gene Adenomatous Polyposis Coli (APC) codifica per una proteina di 310 kDa, presente sia nel citoplasma che nel nucleo, ed espressa in vari tessuti. Questa proteina è costituita da molteplici domini che le consentono di interagire con numerosi partner proteici (Fearnhead et al. 2001), come microtubuli, axina e il fattore di scambio nucleotidico della guanina Asef1 (Aoki & Taketo 2007). Tra i domini più importanti ci sono quelli in grado di legare la  $\beta$ -catenina. La proteina APC, infatti, rappresenta il regolatore chiave della  $\beta$ -catenina all'interno della via di segnalazione Wnt. APC è in grado di fosforilare la  $\beta$ -catenina che, così marcata, viene ubiquitinata e destinata alla degradazione attraverso il proteasoma. Una mutazione del gene APC, produce una proteina troncata al C-terminale che non sarà più in grado di legare la  $\beta$ -catenina.

Quest'ultima, si accumulerà nel nucleo e prenderà contatto con fattori che regolano la trascrizione di geni coinvolti nell'ingresso e nella progressione del ciclo cellulare (Kerr et al. 2013). Nei mammiferi, sono presenti due geni APC: APC e APC2. Il primo è espresso nella maggior parte dei tessuti fetali e in cellule epiteliali adulte, mentre APC2 è altamente espresso nel cervello. Le mutazioni di APC sono state ritrovate in circa l'80% dei tumori del colon-retto umani (Kwong, Dove, 2009) e pazienti con mutazioni germinali di APC sviluppano la Familial Adenomatous Polyposis (FAP), una condizione caratterizzata dalla formazione di migliaia di polipi adenomatosi intestinali (Valvezan 2013). Una notevole percentuale di questi adenomi progredisce poi verso carcinomi invasivi.



**Figura 1.** Modello schematico sul ruolo della via di segnalazione Wnt nelle cellule mutanti APC.

È stato dimostrato che la mutazione APC omozigote ( $APC^{-/-}$ ) risulta letale già a livello embrionale, mentre topi mutanti eterozigoti, chiamati “Min” (multiple intestinal neoplasia) risultano essere vitali, anche se sviluppano escrescenze simili a polipi a livello dell’intestino tenue e, in misura minore, a livello del colon e dello stomaco. A differenza dei pazienti con FAP, la maggior parte dei tumori intestinali nei topi  $ApcMin/+$  sono adenomi benigni (Zeineldina, Neufeldache, 2013), che solo occasionalmente progrediscono verso l’adenocarcinoma invasivo (McCart et al. 2008). Oltre ai tumori intestinali, i topi  $ApcMin/+$  sviluppano tumori mammari, solitamente di natura invasiva, anche se con un’incidenza inferiore rispetto ai tumori intestinali e ad un’età dei topi relativamente più avanzata.

Per quanto riguarda cambiamenti a livello della gonade dei topi  $ApcMin/+$ , questi includono un aumento del numero follicoli ovarici che non completano lo sviluppo, o vanno incontro a degenerazione, mentre nei maschi è stata riscontrata la presenza di numerosi tubuli seminiferi sottosviluppati (Zeineldin, Neufeldache, 2013). Inoltre, alcuni dati riportano come la mutazione APC, in cellule dello stroma uterino murino, causi la loro differenziazione in un fenotipo più miofibroblastico (Tanwar et al. 2011) che, accompagnato alla ridotta espressione del recettore degli estrogeni ER $\alpha$ , è sufficiente per indurre cancro all’endometrio.

È chiaro, quindi, come l'attivazione del segnale canonico Wnt giochi un ruolo essenziale nella tumorigenesi. Tuttavia, a causa dei suoi numerosi domini di legame, il mal funzionamento della proteina APC può provocare danni all'organismo anche attraverso altri meccanismi cellulari. Infatti, una mutazione di APC, in cellule epiteliali intestinali di topo, causa la diminuzione del livello di E-caderina sulla membrana cellulare, danneggiando l'integrità degli epiteli. Inoltre, la proteina APC troncata al C-terminale, può causare instabilità cromosomica, che risulta evidente sotto forma di aneuploidia nelle cellule staminali embrionali mutanti di topo.

Anche in drosophila, sono presenti due geni APC ma, a differenza dei mammiferi, mutanti omozigoti sono vitali, sebbene mostrino degenerazione neuronale e ipertrofia della retina. Una mutazione sul gene APC2 determina una diminuzione dell'adesione mediata dall'E-caderina nelle camere delle uova, e quindi un'errata localizzazione degli ovociti all'interno delle camere stesse.

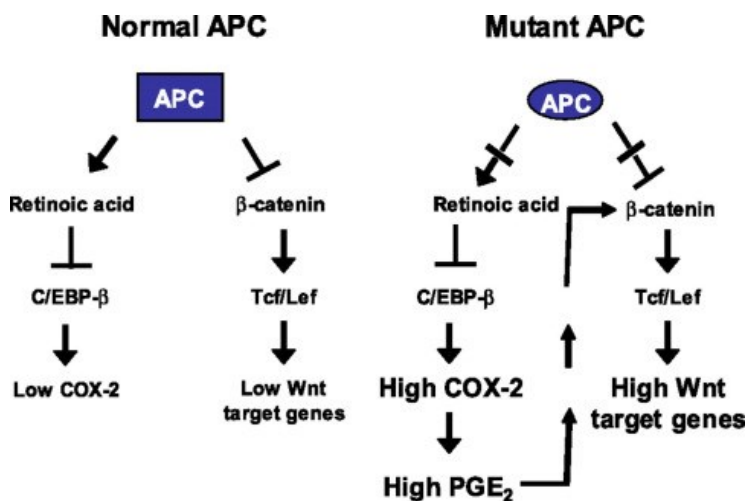
A differenza del modello murino, linee di zebrafish con mutazione omozigote del gene APC ( $APC^{-/-}$ ) eseguono una completa gastrulazione (Hurlstone et al. 2003). Tuttavia, l'embrione non sopravvive oltre le 96 ore post-fecondazione a causa di difetti di sviluppo, tra cui circolazione alterata, iperproliferazione dei cuscinetti cardiaci e fegato ingrossato (Valvezan, 2013).

Il fenotipo eterozigote, invece, risulta vitale, per cui può essere usato come modello per esaminare le conseguenze della perdita del gene APC nell'uomo. In zebrafish, infatti, il gene mutato presenta un codone di stop all'interno della regione MCR (mutation cluster region), nello specifico a livello della posizione 1318 del gene. Una situazione analoga si presenta nella mutazione del gene umano. Questo fa sì che il prodotto codificato in zebrafish sia simile a quello osservato nei tumori coloretali umani. Dagli studi fatti, è emerso che zebrafish  $Apc^{+/-}$  a 15 mesi di età sviluppa spontaneamente lesioni intestinali simili a polipi, neoplasie epatiche, spesso associate ad alterazioni cellulari come un aumento del glicogeno intracitoplasmatico, e neoplasie pancreatiche in cui le cellule acinose mostrano un'evidente diminuzione dei granuli di zimogeno. Nel complesso, queste alterazioni sono dovute ad un accumulo di  $\beta$ -catenina all'interno del nucleo e del citoplasma delle cellule coinvolte, con conseguente espressione dei geni bersaglio Wnt (Kari et al., 2007), come *cmyc* e *axin2*. Questi studi dimostrano, quindi, come la morfologia e le caratteristiche istopatologiche delle neoplasie osservate assomigliano a quelle riscontrate nei casi di FAP. Un esperimento che prevedeva l'utilizzo del cancerogeno dimetilbenzantracene su pesci wt e su mutanti  $Apc^{+/-}$ , ha dimostrato che la proteina APC in zebrafish, così come nei mammiferi, svolge una potente azione antitumorale (Haramis et al. 2006).



Alcuni studi dimostrano che un'altra delle funzioni di APC è quella di controllare l'espressione di *rdh1*, un enzima che definisce il livello di acido retinoico cellulare. Zebrafish APC mutanti hanno mostrato una carenza di questo enzima e, di conseguenza, un difetto nella biosintesi dell'acido retinoico. Questo comporta un'iperattivazione del fattore di trascrizione C/EBP- $\beta$  che determina la produzione di elevati livelli di ciclossigenasi 2 (COX-2) e, quindi, di fattori pro-infiammatori, come PGE<sub>2</sub>.

Nell'insieme questi elementi conducono all'iperattivazione della via Wnt (Eisinger et al. 2006), che porta allo sviluppo e alla progressione del tumore.



**Figura 2.** Modello di regolazione di COX-2 da parte di APC

### ***Scopo del lavoro***

Come riportato nei paragrafi introduttivi, la mutazione della proteina APC è stata associata all'insorgenza di varie neoplasie a livello dell'apparato gastrointestinale, ma al momento non ci sono dati relativamente a quale sia il ruolo di questa proteina a livello riproduttivo. L'obiettivo di questo studio è, quindi, quello di verificare se la mutazione a livello del gene APC possa influire sulla riproduzione della linea mutante. Per questo, è stata valutata, sia a livello centrale che a livello ovarico, l'espressione di una serie di geni chiave coinvolti nella regolazione ipotalamo-ipofisi-gonade. Inoltre, dato l'importante ruolo che ha il sistema ECS sulla riproduzione dei vertebrati, è stata valutata anche l'espressione dei geni che codificano per i principali recettori dei cannabinoidi, in modo da capire se questa venisse alterata dalla mutazione e, quindi, se il ECS potesse essere considerato un target per la prevenzione e cura delle diverse forme tumorali dipendenti dalla mutazione, descritte in bibliografia.

Le analisi molecolari, condotte sul cervello e sugli oociti di classe IIIb e IV, sono state associate ad osservazioni istologiche della gonade.

## 2. MATERIALI E METODI

### *2.1 Trattamento di Zebrafish*

Embrioni della linea mutante di zebrafish  $apc^{hu745}$  sono stati ottenuti incrociando adulti  $apc^{+/+}$  e adulti eterozigoti  $apc^{+/-}$ . Gli embrioni sono stati allevati secondo le procedure standard all'interno di acquari di circa 100 litri e mantenuti ad una temperatura di 28° C, con un fotoperiodo di luce-buio di 12:12. Le larve sono state genotipizzate e gli adulti, all'età di 6 mesi sono stati sacrificati. I diversi tessuti sono stati poi campionati per le analisi molecolari e istologiche.

Gli esemplari della linea mutante sono stati gentilmente forniti dalla Professoressa Luisa Dalla Valle del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

### *2.2 Raccolta delle diverse classi follicolari*

Sulla base della genotipizzazione, 6 femmine di ogni gruppo sperimentale,  $apc^{+/+}$  (omozigoti) e  $apc^{+/-}$  (eterozigoti), sono state sacrificate con una overdose letale di anestesia (500 mg/l di acido aminobenzoico a pH 7,4; Sigma).

I follicoli che costituivano ogni ovario, sono stati separati manualmente e campionati, considerando le loro dimensioni, nei diversi stadi di maturazione.

Pool di circa 30 follicoli allo stadio III b (0.52-0.65 mm di diametro) e IV (0.66-0.85 mm) sono stati campionati dalle diverse femmine, sia mutanti che wild type, in base alla frequenza, e congelati a -80°C per le successive analisi molecolari.

Per ogni gruppo sperimentale sono state collezionate almeno 3 repliche.

### ***2.3 Analisi istologica con protocollo ematossilina eosina***

Ovari di zebrafish  $+/+$  e  $+/-$  sono stati fissati per 24 ore in Bouin a temperatura ambiente. I campioni sono stati disidratati attraverso una serie di lavaggi in gradiente di etanolo e, quindi, inclusi Paraplast plus (Leica, 39602004).

I campioni sono stati tagliati in sezioni di 6  $\mu\text{m}$  su un microtomo LKB.

Dopo la reidratazione, le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina e montate con Eukit (BioOptica, 09-00100) per l'esame al microscopio.

Per la conta della frequenza degli oociti, per ogni ovario sono state raccolte 8 sezioni, separate una dall'altra per 10 tagli.

Gli oociti sono stati contati e classificati sulla base del loro stadio di sviluppo seguendo le indicazioni presenti sull'Atlas di ZFin.

## *2.4 Analisi biomolecolari*

### *2.4.1 Estrazione dell'RNA totale e valutazione della sua qualità*

L'estrazione dell'RNA dai cervelli e dai follicoli è stata fatta utilizzando come reagente l'RNazol (Sigma) seguendo il protocollo suggerito dal produttore.

L'RNA estratto è stato poi conservato a -80° C fino al suo utilizzo.

La concentrazione e la qualità dell'RNA totale estratto è stata determinata allo spettrofotometro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific), e il rapporto fra la lettura della lunghezza d'onda a 260 e quella a 280 nm ha fornito indicazioni riguardo la purezza dell'RNA estratto, rispetto alle componenti proteiche.

Per escludere la possibilità di contaminazione genomica durante le fasi di estrazione, è stata effettuata una corsa su gel d'agarosio all'1%, visualizzato grazie all'utilizzo del gelRed. Ogni campione conteneva:

- 1 µl di RNA
- 6 µl di sample buffer
- 2 µl di loading buffer
- 3 µl di H<sub>2</sub>O

La corsa elettroforetica dei campioni è stata effettuata con  $\Delta V$  di 100 V in TAE 1:50.

A corsa ultimata il gel è stato osservato ad un transilluminatore e la buona riuscita dell'estrazione è stata confermata dalla visualizzazione di tre bande, di cui due corrispondenti alle subunità ribosomiali (rRNA 18S e 28S), e una al tRNA.

#### ***2.4.2 Sintesi del cDNA***

La sintesi del cDNA è stata ottenuta partendo da 1 µg di RNA estratto precedentemente, utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) e seguendo il protocollo suggerito dal produttore. Per ogni campione è stato preparato un mix di reazione con:

- 4 µl di 5x iScript Reaction Mix
- 1 µl di iScript Reverse Transcriptase
- 1 µl di RNA
- x µl di Nuclease-Free-Water

L'acqua è stata aggiunta in funzione della quantità di RNA per ottenere un volume finale di 20 µl.

La reazione è stata condotta in un termociclatore, seguendo lo specifico protocollo: 25°C per 5 minuti, 42°C per 30 minuti e 85°C per 5 minuti.

Il cDNA prodotto viene diluito 1:10 al fine di renderlo utilizzabile nelle reazioni di Real Time PCR e conservato a -20° C.

### ***2.4.3 Real time PCR***

Le analisi in PCR Real time sono state condotte con il metodo del SYBR Green in un termociclatore CFX (BioRad). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Per ogni campione è stato preparato il seguente mix di reazione:

- 1 µl di cDNA (diluito 1/10);
- 5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Mix (BioRad);
- 0,1 µM di primer forward 0,3µM;
- 0,1 µM di primer reverse 0,3µM;
- 3,8 µl di acqua milli-Q.

Per i geni analizzati in questo studio sono state utilizzate le seguenti coppie di primers:

Gene	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')	Accession number	Source
<i>inhbaa</i>	TGCTGCAAGCGACAATTTTA	CATTCGTTTCGGGACTAAG	AF475092	Wang and Ge, 2003
<i>fshr</i>	GATTCTTCACCGTCTTCTCC	TGTAGCTGCTCAACTCAAACA	NM001001812.1	Santangeli et al., 2016
<i>lhgr</i>	GGCGAAGGCTAGATGGCACAT	TCGCAATCTGGTTCATCAATA	NM_205625.1	Santangeli et al., 2016
<i>pgrmc1</i>	CGGTTGTGATGGAGCAGATT	AGTAGCGCCAGTTCTGGTCA	NM_001007392.1	Santangeli et al., 2016
<i>pgrmc2</i>	ACAACGAGCTGCTGAATGTG	ATGGGCCAGTTCAGAGTGAG	NM_213104.1	Santangeli et al., 2016
<i>kiss1</i>	ACAGACACTCGTCCCACAGATG	CAATCGTGTGAGCATGTCCTG	NM001113489.1	Carnevali et al., 2013
<i>kiss2</i>	ATTCTCTTCATGTCTGCAATGGTCA	TGCTTCTCAGGTAAAGCATCATTG	NM001142585.1	Carnevali et al., 2013
<i>ccnb1</i>	GAAATGATGGCTCTCCGTGT	ACCACAGGTGCCTTCTCAAC	NM131513(1)	Giommi et al., 2021
<i>cnr2</i>	TCAGAGAGACGATGCTAACC	CAAAAGGCTTCCCACAGAG	NM_212964.3	Forner-Piquer et al., 2017
<i>cnr1</i>	TCTGTGGGAAGCCTGTTC	ACCGAGTTGAGCCGTTTG	NM_212820.1	Migliarini et al., 2011
<i>gpr55</i>	ACAGTTTGCAGTCCACATCC	ACGCTTCCGTACATGCTGAC	XM_005163567.3	Martella et al., 2016a
<i>gnrh3</i>	TTAGCATGGAGTGAAAAGGAA GGTTG	ACCACAGGTGCCTTCTCAAC	NM001177450.1	Carnevali et al., 2013
<i>rplp0</i>	CTGAACATCTCGCCCTTCTC	TAGCCGATCTGCAGACACA C	NM131580.1	Santangeli et al., 2016
<i>rpl13</i>	TCTGGAGGACTGTAAGAGGT ATGC	AGACGCACAATCTTGAGA GCAG	NM_212784.1	Forner et al., 2017

La quantificazione è stata effettuata utilizzando come standards interni di riferimento *rpl0* e *rpl13*. Questi geni sono stati scelti come standard dal momento che i loro mRNA risultano avere una espressione costante (housekeeping), sia negli organismi wil-type che in quelli mutati.



Il protocollo per ogni reazione è stato:

- 3 minuti a 95°C: attivazione della Taq polimerasi
- 45 cicli con il seguente profilo termico:
  - 95°C per 20 secondi: denaturazione con separazione della doppia elica
  - 50-60°C a seconda dei geni in analisi, per 20 secondi: la temperatura viene raffreddata alla temperatura di melting dei primers, permettendo l'annealing degli oligonucleotidi alla loro sequenza complementare.
  - 72°C per 20 secondi: fase di elongazione del filamento di cDNA
  - 72°C per 5 minuti: fase di estensione

Per esprimere l'espressione relativa di ogni gene i dati vengono analizzati mediante l'iQ5 Optical System Software versione 2.1 (Bio-Rad) insieme al software GeneEx Macro Conversion IQ5 e Genex file IQ macro.

#### ***2.4.4 Analisi statistica***

I dati dei livelli di espressione genica sono presentati come media  $\pm$  SD in tutti gli esperimenti.

I risultati sono stati elaborati con il programma Graph Pad Prism versione 8 e, nel cervello, sono stati analizzati utilizzando lo Student's t-test, mentre i valori di espressione degli mRNA analizzati sulle diverse classi follicolari, sono stati analizzati con il test One way ANOVA, seguito dal test Tukey.

Sono state considerate differenze significative tra i gruppi sperimentali per valore di  $p < 0.05$ . Differenze statisticamente significative tra i cervelli e le classi di oociti +/+ e +/- sono indicate dalla presenza di lettere diverse.

### 3. RISULTATI

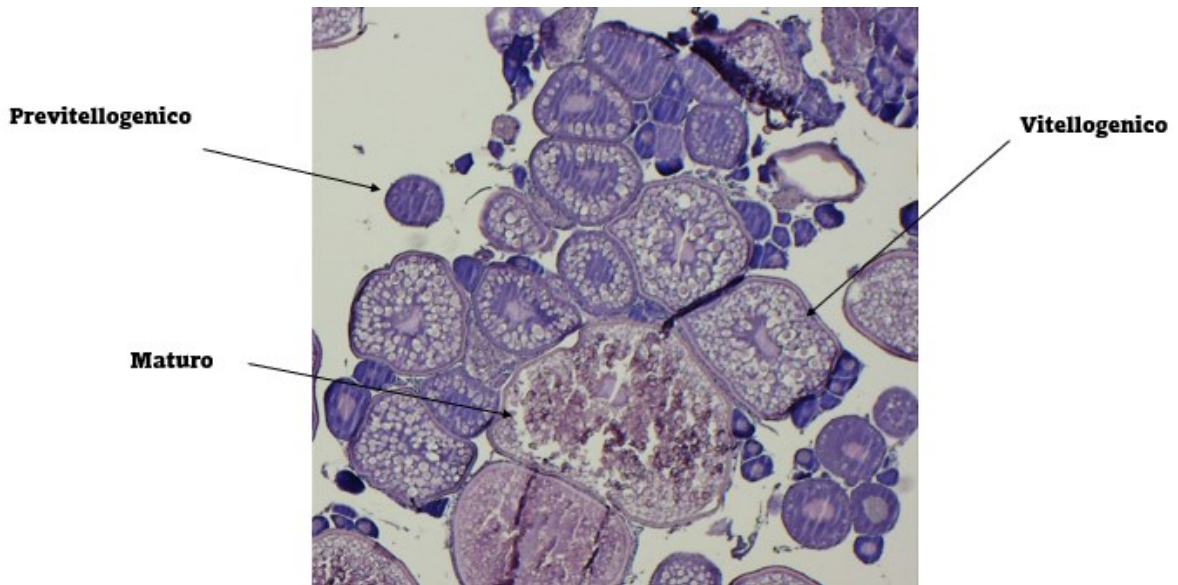
#### *3.1 Analisi istologica*

Per poter comprendere come la mutazione della proteina APC possa influenzare la maturazione degli ovociti di zebrafish, è stata misurata la quantità di follicoli, ai diversi stadi di sviluppo, presenti nelle gonadi dei controlli ( $apc^{+/+}$ ) e dei pesci mutati ( $apc^{+/-}$ ). Per questo, è stata eseguita un'analisi istologica delle gonadi, che ha permesso di distinguere i follicoli previtellogeni (classi I-II), vitellogeni (classi IIIa-IIIb) e maturi (classe IV). È stata anche analizzata la presenza di follicoli atresici, ovvero quelli che non raggiungono la completa maturazione ma vanno incontro a degenerazione.

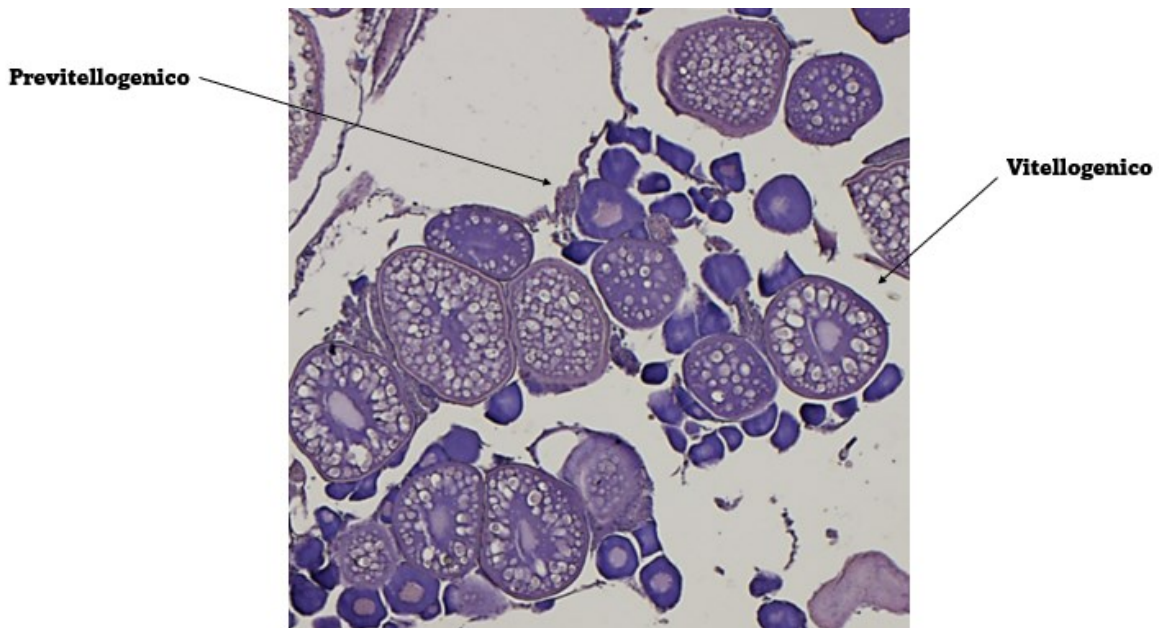
Le figure seguenti mostrano sezioni ovariche di zebrafish che sono state osservate al microscopio ottico.

Nella figura 3A, è mostrata una sezione istologica rappresentativa di un ovario campionato da pesci omozigoti ( $apc^{+/+}$ ) equiparabili a wild-type, mentre la figura 3B mostra la sezione istologica di un ovario prelevato da eterozigoti  $apc^{+/-}$ .

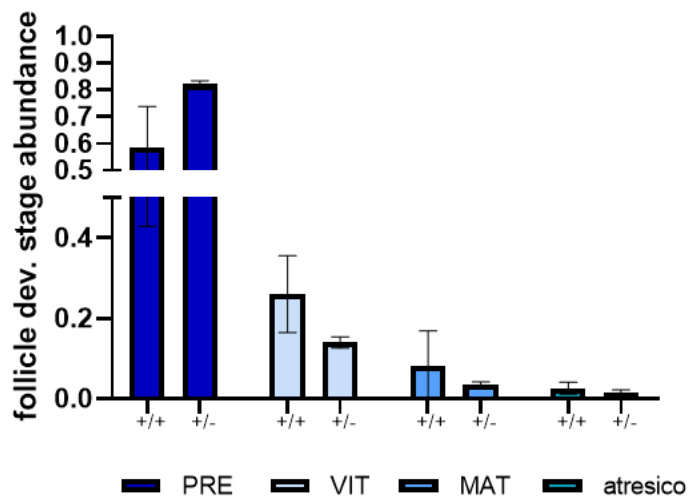
I risultati relativi all'abbondanza dei follicoli ai diversi stadi di sviluppo, all'interno delle gonadi di pesci wt e mutati, sono rappresentati nell'istogramma successivo.



**Figura 3A)** Sezione di ovario di zebrafish wild-type. Sono evidenziati oociti allo stadio previtellogenico (I-II-IIIa), vitellogenico (IIIb-IV) e maturo (V).



**Figura 3B)** Sezione ovario zebrafish *apc*<sup>+/-</sup>. Sono evidenziati oociti allo stadio previtellogenico e vitellogenico.



**Figura 4.** Istogramma rappresentativo della quantità di follicoli previtellogenici, vitellogenici, maturi e atresici presenti nelle gonadi di pesci  $apc^{+/+}$  e  $apc^{+/-}$ .

Come possiamo osservare nella figura 4, l'abbondanza dei follicoli previtellogenici risulta essere superiore nei pesci mutati rispetto ai wil-type. Una differenza significativa si può notare anche nella quantità di follicoli vitellogenici e maturi che sono presenti in numero maggiore nelle gonadi di  $apc^{+/+}$ . Per quanto riguarda la presenza di follicoli atresici, non ci sono differenze significative tra i due gruppi sperimentali.

### 3.1 Analisi dell'espressione genica nel cervello

L'espressione dell'mRNA di *kiss 1*, *kiss 2* e *gnrh3* è stata analizzata in

Real-time PCR nei cervelli di zebrafish wild-type ( $Apc^{+/+}$ ) e mutanti ( $Apc^{+/-}$ ).

Come si può vedere dalla figura 5A, i livelli di mRNA di *kiss1* sono ridotti nei pesci mutati, anche se le differenze non sono statisticamente significative.

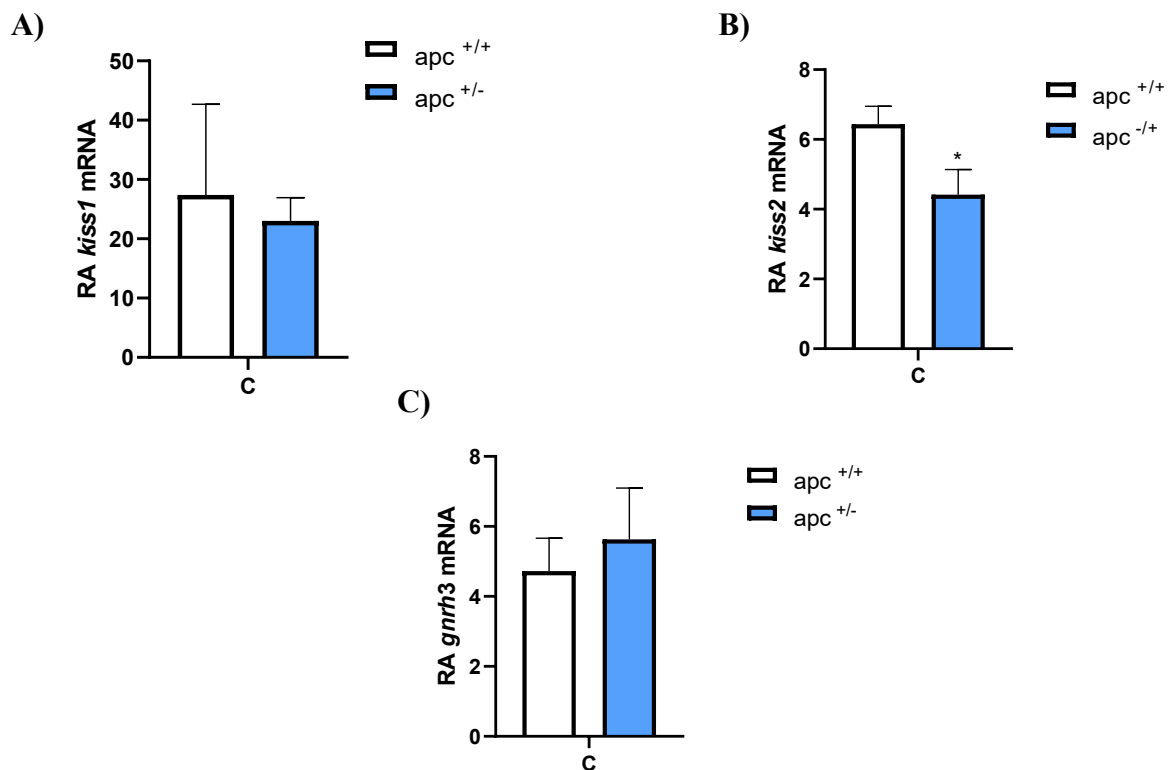
Anche il livello di *kiss 2* è minore nei pesci mutati rispetto ai wild-type (fig.

5B) ma, in questo caso, la differenza di espressione è statisticamente

significativa. Per quanto riguarda il livello di mRNA di *gnrh3* (fig. 5C),

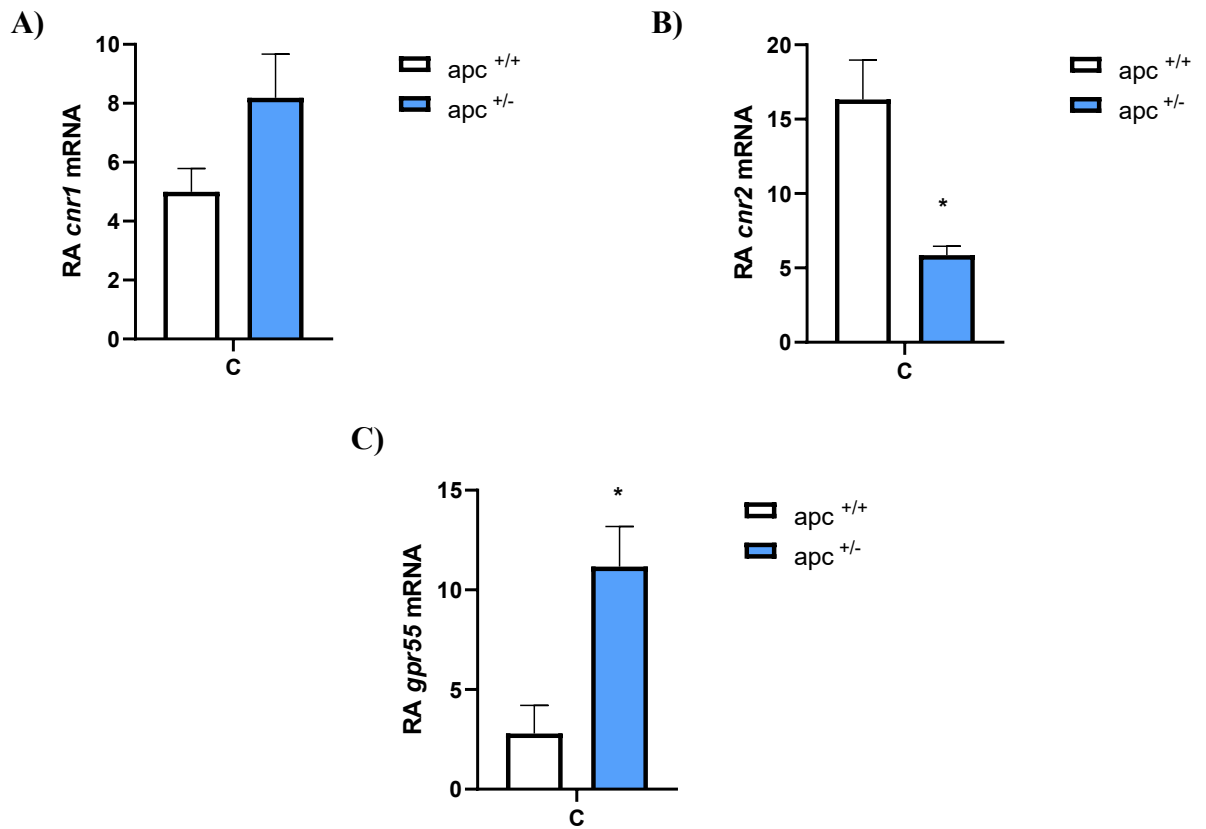
possiamo notare che risulta essere inferiore, anche se di poco, nei pesci wild-

type rispetto a quelli mutati.



**Figura 5.** Espressione genica relativa nel cervello di zebrafish wt e  $apc^{+/-}$ . Espressione di A) *kiss1*, B) *kiss2*, C) *gnrh3*. I dati sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono normalizzati nei confronti dei livelli di espressione di *rpl0* e *rpl13*. Gli asterischi indicano la differenza significativa tra i due gruppi sperimentali. ( $P < 0.05$ ).

Nei cervelli di zebrafish è stata anche valutata l'espressione dei geni che codificano per i recettori dei cannabinoidi: *cnr1* (cb1), *cnr2* (cb2) e *gpr55*. Come si può vedere nella figura 6A, l'espressione dell'mRNA che codifica per il recettore CB1 aumenta nei pesci mutati rispetto ai wil-type. Il contrario accade, invece, per il prodotto del gene *cnr2* (fig. 6B): in questo caso il recettore è altamente espresso negli zebrafish wil-type, mentre è significativamente ridotto in quelli mutati. Un'altra differenza statisticamente significativa la si osserva nella figura 6C, dove possiamo vedere come l'espressione di *gpr55* sia minore nei wil-type rispetto agli  $Apc^{+/-}$ .

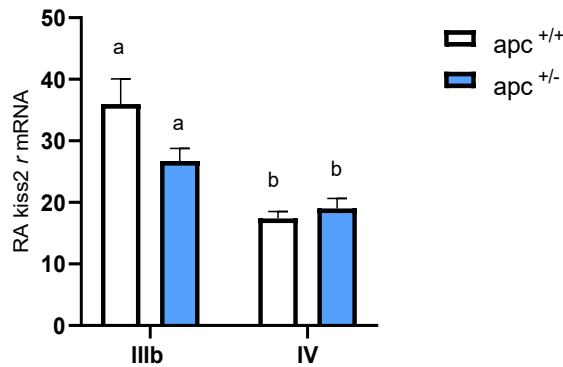


**Figura 6.** Espressione di A) *cnr1* B) *cnr2* C) *gpr55* nei cervelli di zebrafish wt e *Apc*<sup>+/-</sup>. I dati sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono normalizzati rispetto ai livelli di espressione di *rpl0* e *rplp13*. Gli asterischi indicano la differenza significativa tra i due gruppi sperimentali ( $P < 0.05$ ).



### 3.3 Analisi dell'espressione genica nell'ovario di geni coinvolti nella crescita e maturazione degli oociti

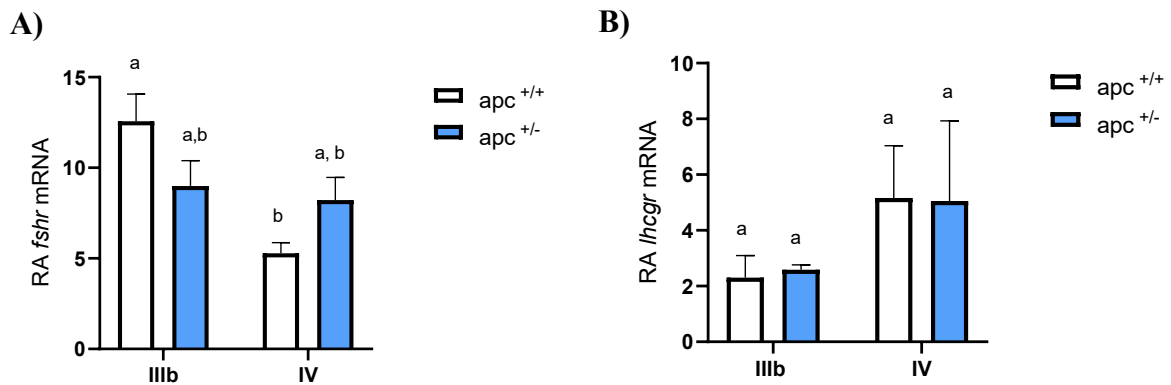
Nell'ovario sono stati valutati i livelli di espressione dei geni più importanti nella crescita e nella maturazione degli ovociti. Per questo, sono stati presi in considerazione solamente i follicoli di classe IIIb e IV. È stata analizzata la quantità di recettore della kisspeptina. Come possiamo vedere nella figura 7, i livelli di espressione di *kiss2 r* nei pesci *Apc*<sup>+/-</sup> risultano più bassi negli ovociti di classe IIIb, mentre sono leggermente più alti, rispetto al wild-type, nel caso degli ovociti di classe IV. In entrambi i casi le differenze non sono statisticamente significative.



**Figura 7.** Espressione genica di *kiss2 r* negli ovociti di classe IIIb e IV in zebrafish wt e *apc*<sup>+/-</sup>. I dati sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono normalizzati rispetto ai livelli di *rpl0* e *rplp13* ( $P < 0.05$ ).

Al fine di valutare la risposta ai fattori che promuovono lo sviluppo degli ovociti sono stati analizzati i livelli di espressione di geni che codificano per i recettori degli ormoni FSH ed LH.

L'espressione dell'*fshr* negli *apc*<sup>+/-</sup> risulta minore, rispetto ai wt, negli ovociti di classe IIIb, mentre è maggiore in quelli di classe IV (fig. 8A). Per quanto riguarda l'*lhcg*, invece, non si riscontrano differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali (fig. 8B).

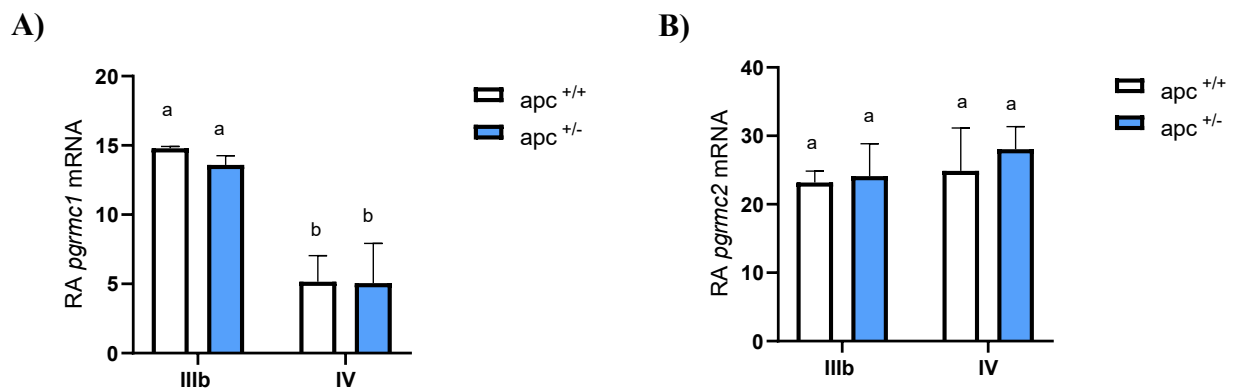


**Figura 8.** Espressione di A) *fshr* b) *lhcg* negli ovociti di classe IIIb e IV in zebrafish wt e *apc*<sup>+/-</sup>. I dati sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono normalizzati rispetto ai livelli di espressione di *rpl0* e *rplp13* ( $P < 0.05$ ). Le lettere diverse rappresentano differenze significative tra i gruppi analizzati.

Nella figura 9 sono state analizzate le espressioni relative dei due recettori di membrana del progesterone ritrovati in *zebrafish*: *pgrmc1* (mPR $\alpha$ ) e *pgrmc2* (mPR $\beta$ ). L'espressione dell'isoforma del recettore, negli organismi mutati, cala leggermente negli ovociti di classe IIIb, ma la differenza non è significativa.

Per quanto riguarda gli ovociti di classe IV, l'espressione del recettore è simile in entrambi i gruppi sperimentali. Analogamente, anche il livello di mRNA dell'isoforma  $\beta$  è molto simile tra i pesci wild-type e gli  $apc^{+/-}$ .

Possiamo notare, solo un lieve aumento di espressione nei pesci mutati, in particolare negli ovociti di classe IV.

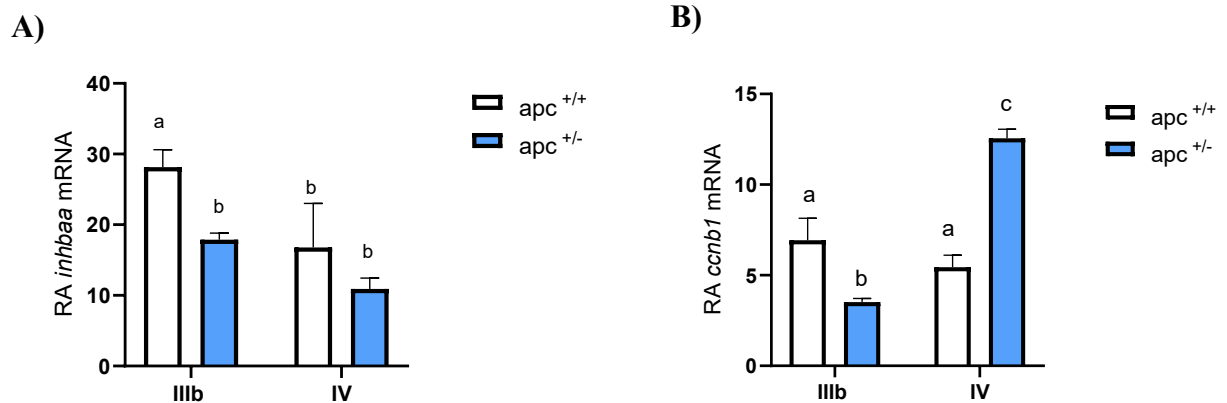


**Figura 9.** Espressione di A) *pgrmc1* e B) *pgrmc2* negli ovociti di classe IIIb e IV in zebrafish wt e  $apc^{+/-}$ . I dati sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono normalizzati rispetto ai livelli di espressione di *rpl0* e *rplp13* ( $P < 0.05$ ).

Infine, sono state osservate le espressioni di fattori che regolano la maturazione degli ovociti, mediando l'attività delle gonadotropine e del MIH.

Nella figura 10A, possiamo esaminare il livello di espressione del gene dell'activina (*inhba a*) che risulta più basso negli  $apc^{+/-}$  in entrambe le classi follicolari studiate.

L'espressione dell'mRNA della ciclina B (*ccnb1*) è invece rappresentata nella figura 10B. Gli ovociti di classe IIIb dei pesci mutati presentano una riduzione dei livelli di mRNA. Accade il contrario negli ovociti di classe IV di pesci mutati che mostrano un aumento significativo dell'espressione della ciclina B.



**Figura 10.** Espressione di A) *inhba* e B) *ccnb1* negli ovociti di classe IIIb e IV in zebrafish wt e *apc*<sup>+/-</sup>. I dati sono riportati come la media  $\pm$  SD e sono normalizzati rispetto ai livelli di espressione di *rpl0* e *rpl13* ( $P < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio hanno permesso di indagare il ruolo della mutazione della proteina APC nella riproduzione femminile di zebrafish.

I possibili cambiamenti tra pesci  $apc^{+/+}$ , geneticamente equiparabili a pesci wild-type, e mutanti +/- sono stati ricercati prendendo in considerazione l'intero asse riproduttivo, che coinvolge ipotalamo, ipofisi e gonade.

Le analisi istologiche delle gonadi di zebrafish sono state utili per ricercare la presenza di possibili alterazioni e/o differenze tra gli ovociti dei due gruppi sperimentali, i quali sono stati distinti e associati, sulla base della loro dimensione e morfologia, in tre differenti stadi di sviluppo.

I risultati mostrano la presenza di un maggior numero di ovociti previtellogenicici (stadi I-II-IIIa), all'interno delle gonadi di pesci mutati e, contestualmente, una riduzione degli ovociti vitellogenicici (stadio IIIb) e in fase di maturazione (stadio IV), rispetto ai pesci wild-type. È stata valutata anche la presenza di follicoli atresici, ma non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi sperimentali. Questo fa pensare che la mutazione possa avere un effetto negativo sui processi che regolano la crescita dei follicoli di zebrafish, ma che non sia in grado di provocare gravi alterazioni a livello dello sviluppo della gonade.

Per approfondire i risultati osservati nell'istologia, è stata valutata l'espressione genica di diversi markers coinvolti nel processo riproduttivo, espressi sia nel cervello che nell'ovario.

A livello ipotalamico è stata analizzata l'espressione di *gnrh3*, *kiss1* e *kiss2*.

I risultati mostrano una deregolazione del sistema kiss-gnrh3, con un aumento dell'espressione di quest'ultimo e una riduzione di entrambe le forme di kisspeptina. Il cambiamento di maggior rilevanza si osserva per *kiss2*, la cui espressione risulta essere significativamente diminuita in zebrafish APC<sup>+/-</sup>.

La kisspeptina è nota per essere coinvolta in vari meccanismi fisiologici come riproduzione, memoria e metabolismo. Essa interagisce con i sistemi adrenergico, serotonergico e GABAergico; pertanto, è considerata un modulatore chiave della funzione cerebrale.

Diversi studi hanno esaminato gli effetti causati da diversi tipi di stress, quali stress psicologico, metabolico e immunologico, sull'espressione genica di questo neurotrasmettitore a livello ipotalamico. In tutti i casi elencati, i risultati evidenziano una down-regolazione sia dell'mRNA che del suo recettore (JS Kinsey-Jones et al., 2009). Un altro studio, condotto su femmine di zebrafish, dimostra come i livelli di kisspeptina 2 vengano regolati da geni coinvolti nella modulazione della funzione cerebrale in risposta allo stress, come ad esempio l'infiammazione (Moriya et al. 2017).

Nel complesso questi dati hanno portato a chiarire come la sintesi di kisspeptina sia effettivamente influenzata dai processi infiammatori acuti. Per questo una riduzione del livello di espressione della kiss 2, nei pesci mutati, potrebbe essere associata ad un'inflammatione localizzata anche a livello cerebrale, causata dalla mutazione, oltre ai ben noti casi di infiammazione descritti a livello gastrointestinale ed epatico.

Analizzando l'espressione genica nei cervelli ci si è concentrati anche sui principali recettori del sistema endocannabinoide. I risultati più significativi si osservano nei cambiamenti del livello di espressione dei geni *gpr55* e di *cb2* tra zebrafish  $APC^{+/+}$  e  $APC^{+/-}$ . La quantità di mRNA di *gpr55* è maggiore nei pesci mutati rispetto ai wild-type, al contrario l'espressione di *cb2* risulta significativamente ridotta. Questi due elementi del sistema endocannabinoide svolgono un ruolo importante nella modulazione della risposta immunitaria, attraverso l'attivazione dei leucociti e alla conseguente produzione di citochine. È stato dimostrato che *cb2* può indurre il rilascio di IL-10, una citochina antinfiammatoria, suggerendo quindi una sua possibile azione immunosoppressiva (Zhou et al. 2016). Al contrario *gpr55* è collegato a processi pro-infiammatori; infatti, un suo aumento di espressione è stato osservato in diverse linee cellulari tumorali, come prostata, ovaie e colon (Hasenoehrl et al. 2018).

Recenti studi hanno dimostrato che l'utilizzo di vari composti antagonisti di GPR55, su cellule microgliali primarie, ha ridotto significativamente il rilascio di PGE2, indotto da LPS, inibendo così l'infiammazione (Saliba et al. 2018). Nel caso dei cervelli di zebrafish mutati, l'aumento del livello di gpr55 rafforza l'idea che possa essere in atto un processo neuroinfiammatorio. Questa ipotesi sarebbe d'altronde coerente con lo sviluppo di tutte le neoplasie riscontrate nei mutanti APC.

A livello ovarico, sono stati analizzati i livelli di mRNA di diversi geni, coinvolti nella regolazione della crescita e sviluppo dei follicoli. In questo modo, si è cercato di comprendere se ciò che era stato osservato nelle gonadi di zebrafish APC<sup>+/-</sup>, ovvero l'accumulo di numerosi ovociti previtellogenicici, fosse collegato ad alterazioni dell'espressione genica. Sono stati presi in considerazione solo gli ovociti delle classi IIIb e IV, i quali, raggiunto l'accrescimento necessario dato dall'accumulo di vitellogenina, acquisiscono la competenza per rispondere agli ormoni maturativi.

Sui follicoli appartenenti a queste classi è stata analizzata l'espressione del recettore della kisspeptina 2. Diversi studi su teleostei forniscono prove che Kiss2 agisca attraverso due diversi percorsi per modulare l'azione delle gonadotropine.



Oltre ad agire come neuropeptide ipofisiotropico, infatti, Kiss2 è in grado di agire come fattore autocrino/paracrino, influenzando direttamente l'attività degli ormoni gonadotropi (Espigares et al. 2015). Come già detto nel paragrafo introduttivo, la kisspeptina2 induce la maturazione dei follicoli ovarici attraverso un incremento dell'espressione di mRNA endocrini (Hatef et al., 2022), che codificano per gli ormoni LH e FSH e per i loro recettori. I risultati ottenuti in questo studio mostrano una diminuzione, anche se non statisticamente significativa, dell'espressione di kiss2r negli ovociti di classe IIIb mutati. Questa riduzione della kisspeptina a livello ovarico potrebbe determinare, a sua volta, una diminuzione dei livelli delle due gonadotropine. Per verificarlo, è stata analizzata l'espressione degli ormoni ipofisari FSH ed LH, coinvolti rispettivamente nella fase di crescita follicolare e nella fase di maturazione ed ovulazione. Più precisamente l'analisi si è focalizzata sui recettori di tali ormoni, presenti sulle cellule follicolari, ipotizzando che ad un aumento dei livelli del recettore potesse corrispondere anche un aumento dei livelli degli ormoni stessi.

I risultati mostrano che i livelli dell'mRNA di *lhgcr* non variano significativamente tra i due gruppi sperimentali. Degno di nota è, invece, il cambiamento di espressione di *fshr* negli ovociti APC<sup>+/-</sup>, rispetto ai wild-type.

Quello che è stato osservato, nei pesci con la mutazione, è una diminuzione della quantità di recettore allo stadio IIIb e, al contrario, un aumento di espressione durante lo stadio IV.

È noto che l'ormone follicolo stimolante permetta il passaggio dei follicoli allo stadio vitellogenico attraverso la produzione di steroidi gonadici (So et al. 2005). Esso, infatti, induce la sintesi di estrogeno, agendo prima sulle cellule della teca, dove avviene la trasformazione del colesterolo in testosterone e successivamente a livello delle cellule della granulosa, dove si ha la conversione in estradiolo. Questo stimola la sintesi di vitellogenina che permette lo sviluppo e l'accrescimento dei follicoli. Una diminuzione del recettore dell'FSH, durante la vitellogenesi, fa ipotizzare ad una compromissione della crescita follicolare. Inoltre, un successivo aumento di FSH, potrebbe essere collegato ad un rallentamento generale dello sviluppo ovocitario. Questo confermerebbe ciò che era stato osservato durante le analisi istologiche delle gonadi di zebrafish APC<sup>+/-</sup>.

In questo studio è stata analizzata anche l'espressione di un membro della superfamiglia dei fattori di crescita trasformante  $\beta$ , localizzato a livello delle cellule somatiche del follicolo: l'activina.

Nello specifico ci si è concentrati sulla subunità  $\beta A$  (inhba a), la cui espressione risulta bassa durante i primi stadi di sviluppo (fase di crescita primaria e stadio previtellogenico), mentre aumenta costantemente durante la follicologenesi, raggiungendo un picco allo stadio medio-vitellogenico (MV), per poi diminuire nuovamente durante la maturazione (Zhao et al. 2022). Questo pattern di espressione suggerisce come l'activina  $\beta A$  svolga un ruolo di promotore della crescita ovarica e follicolare. Molti studi dimostrano che le concentrazioni sieriche di questo fattore riflettono la qualità e il numero di ovociti presenti nella gonade (Corson et al. 1999). Una minor secrezione di activina  $\beta A$ , infatti, è spesso associata alla presenza di ovociti più piccoli e ad una diminuzione generale del pool follicolare ovarico. Nel caso degli zebrafish mutanti  $APC^{+/-}$ , l'espressione genica dell'activina risulta diminuire significativamente rispetto ai wild-type in entrambe le classi follicolari analizzate, in particolare allo stadio IIIb, proprio quando invece dovrebbe raggiungere il massimo livello. Questa deregolazione dell'activina conferma una compromissione della crescita ovocitaria all'interno della gonade di zebrafish  $APC^{+/-}$ .

Per capire se la mutazione potesse influenzare, oltre che la crescita, anche il processo di maturazione dei follicoli, sono stati analizzati i livelli di espressione dei due recettori del progesterone, *pgrmc1* e *pgrmc2*.

Nei teleostei questi recettori si trovano sulla membrana plasmatica degli oociti che hanno raggiunto la competenza alla maturazione, e sono conosciuti per mediare la segnalazione progestinica non genomica che indurrà la maturazione finale degli ovociti (Hanna & Zhu 2009). Sia nei follicoli di classe IIIb, che in quelli di classe IV, l'espressione dei due recettori non cambia notevolmente tra zebrafish wild-type e mutati. Questo fa presupporre che la mutazione non interferisca sul processo di maturazione dei follicoli.

Un altro fattore che agisce nella fase finale della maturazione degli ovociti è la ciclina B. Dopo la stimolazione da parte di MIH, questa proteina viene sintetizzata a partire dall'mRNA immagazzinato negli ovociti e si lega a cdc2 per formare l'MPF. Questo fattore induce la ripresa della meiosi attraverso la GVBD e l'estrusione del primo corpo polare (Li et al. 2019). Diversi studi dimostrano che la ciclina B è essenziale per l'attivazione dell'MPF e che un suo incremento, permetta agli ovociti di entrare prematuramente nella fase M. Analizzando l'espressione genica della ciclina B1 nei pesci mutati si osserva una riduzione dei livelli di mRNA negli ovociti di classe IIIb e un loro significativo aumento in quelli di classe IV. Questo risultato conferma il fatto che la mutazione APC non vada a compromettere il processo maturativo dei follicoli. Al contrario sembra che la sintesi dell'MPF e la ripresa della meiosi siano favorite negli oociti di zebrafish APC<sup>+/-</sup>.

## 5. CONCLUSIONE

In conclusione, i risultati in questo studio mostrano che la mutazione APC<sup>+/-</sup> in zebrafish è associata alla presenza di alcune alterazioni a livello riproduttivo.

Le prime differenze tra gli ovari di pesci mutati e di quelli wt si sono osservate attraverso le analisi istologiche della gonade; infatti, nelle sezioni di ovario di zebrafish APC<sup>+/-</sup> sono più frequenti gli ovociti nei primi stadi di sviluppo, rispetto a quelle dei wt in cui sono presenti più ovociti di classe III e IV.

Le differenze maggiormente significative osservate attraverso le analisi molecolari inducono a pensare che vi sia una compromissione di tutti quei meccanismi che inducono la crescita ovarica. La maturazione degli ovociti, invece, non sembrerebbe essere intaccata dalla mutazione; al contrario sembra che i processi finali che portano l'ovocita ad essere pronto per l'ovulazione siano favoriti negli zebrafish mutati.

Sarebbe interessante, comunque, approfondire il ruolo del sistema endocannabinoide, anche a livello periferico, e la modulazione della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, che è descritta come responsabile dell'insorgenza del cancro al colon, a livello gonadico in zebrafish APC<sup>+/-</sup>.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, Palevitch et al. 2010. "Targeted gonadotropin-releasing hormone-3 neuron ablation in zebrafish: Effects on neurogenesis, neuronal migration, and reproduction." *Endocrinology* 151:332–340.
- Aoki, Taketo 2007. "Adenomatous polyposis coli (APC): A multi-functional tumor suppressor gene." *J Cell Sci* 120:3327–3335.
- Clelland, Peng 2009. "Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development." *Mol Cell Endocrinol* 312:42–52.
- Corson, Gutmann et al. 1999. "Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women." *Hum Reprod* 14:2818–2821.
- Cottone, Pomatto, Bovolín 2013. "Role of the endocannabinoid system in the central regulation of nonmammalian vertebrate reproduction." *Int J Endocrinol*;941237.
- de Roux, Genin et al. 2003. "Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54." *Proc Natl Acad Sci USA*. 10972-6.

Dobovišek, Krstanović et al. 2020. "Cannabinoids and Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Treatment." *Cancers (Basel)* 25;12(3):525.

Eisinger, Nadauld et al. 2006. "The adenomatous polyposis coli tumor suppressor gene regulates expression of cyclooxygenase-2 by a mechanism that involves retinoic acid." *J Biol Chem* 281:20474–20482.

Espigares, Zanuy, Gómez 2015. "Kiss2 as a regulator of lh and fsh secretion via paracrine/autocrine signaling in the teleost fish european sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." *Biol Reprod* 93:1–12.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF (2001) The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10:721–733.

Ge 2005. "Intrafollicular paracrine communication in the zebrafish ovary: The state of the art of an emerging model for the study of vertebrate folliculogenesis." *Mol Cell Endocrinol* 237:1–10.

Hanna, Zhu 2009. "Expression of membrane progesterin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary." *Gen Comp Endocrinol* 161:153–157.

- Haramis, Hurlstone et al. 2006. "Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia." *EMBO Rep* 7:444–449.
- Hasenoehrl, Feuersinger et al. 2018. "G protein-coupled receptor GPR55 promotes colorectal cancer and has opposing effects to cannabinoid receptor 1." *Int J Cancer* 142:121–132.
- Hatef, Rajeswari, Unniappan 2022. " Kisspeptin stimulates oocyte maturation, and food deprivation modulates the abundance of kisspeptin system in zebrafish gonads." *Aquac Fish* 7:484–493.
- Hirai, Yamashita et al. 1992. "Cyclin B in fish oocytes: its cDNA and amino acid sequences, appearance during maturation, and induction of p34cdc2 activation." *Mol Reprod Dev*;33(2):131-40.
- Hoo, Kumari et al. 2016. "Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research." *Biomed Res Int*; 9732780.
- Hurlstone, Haramis, Wienholds 2003. "The Wnt / b -catenin pathway regulates cardiac valve formation." *Nature*;425(6958):633–637.
- Kari, Rodeck, Dicker 2007. "Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery." *Clin Pharmacol Ther*;82(1):70-80.



- Kerr, Thomas et al. 2013. "APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: A review of the mayo clinic experience with 1591 consecutive tests." *J Mol Diagnostics* 15:31–43.
- Khara, Amin, Ali 2022. "Inhibiting the endocannabinoid degrading enzymes FAAH and MAGL during zebrafish embryogenesis alters sensorimotor function." *J Exp Biol* 225.
- Kinsey-Jones, Li 2009. "Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat." *J Neuroendocrinol* ;21(1):20-9.
- Kondo, Yanagawa et al. 1997. "Introduction of cyclin B induces activation of the maturation-promoting factor and breakdown of germinal vesicle in growing zebrafish oocytes unresponsive to the maturation-inducing hormone." *Dev Biol* 190:142–152.
- Kwong, Dove 2009. "APC and its modifiers in colon cancer." *Adv Exp Med Biol.* 2009;656:85-106.

- Li, Qian, Sun 2019. "Cyclins regulating oocyte meiotic cell cycle progression." *Biol Reprod* 101:878–881.
- Maharajan, Muthulakshmi et al. 2020. "Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes." *Sci Total Environ* 735:139496.
- McCart, Vickaryous, Silver 2008. "Apc mice: Models, modifiers and mutants." *Pathol Res Pract* 204:479–490.
- Meccariello, Battista et al. 2014. "Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system." *Int J Endocrinol*; 412354.
- Meccariello, Santoro et al. 2020. "The epigenetics of the endocannabinoid system." *Int J Mol Sci* 21:1–25.
- Migliarini, Carnevali 2009. "A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development." *Mol Cell Endocrinol* 299:172–177.
- Moriya, Tahsin, Parhar 2017. "Bpifcl modulates kiss2 expression under the influence of 11-ketotestosterone in female zebrafish." *Sci Rep* 7:1–10.
- Nagahama, Yamashita 2008. "Regulation of oocyte maturation in fish." *Dev Growth Differ* ;50 Suppl 1:S195-219.

- Ogawa, Parhar 2018. "Biological significance of kisspeptin-Kiss 1 receptor signaling in the habenula of teleost species." *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:1–8.
- Pangas, Jorgez et al. 2007. "Intraovarian activins are required for female fertility." *Mol Endocrinol* 21:2458–2471.
- Saliba, Jauch et al. 2018. "Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells." *J Neuroinflammation* 15:1–13.
- Santoro, Mele, 2021. "The complex interplay between endocannabinoid system and the estrogen system in central nervous system and periphery." *Int J Mol Sci* 22:1–25.
- Selman, Wallace et al. 1993. "Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*." *J Morphol* 218:203–224.
- Seminara, Messenger, 2004. "The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty." *Obstet Gynecol Surv* 59:351–353.

So, Kwok, Ge 2005. "Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits - Their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity." *Biol Reprod* 72:1382–1396.

Song, Chen et al. 2020. "Kisspeptin2 regulates hormone expression in female zebrafish (*Danio rerio*) pituitary." *Mol Cell Endocrinol* 513:110858.

Tan Q, Zagrodny A, Bernaudo S, Peng C (2009) Regulation of membrane progesterin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, activin, TGF- $\beta$  and BMP-15. *Mol Cell Endocrinol* 312:72–79.

Tanwar, Zhang et al. 2011. "Stromal deletion of the APC tumor suppressor in mice triggers development of endometrial cancer." *Cancer Res* 71:1584–1596.

Valvezan 2013. "Novel Roles for the Tumor Suppressor APC Through Regulation of GSK-3." *Publicly Accessible Penn Dissertations*; 716.

Yang, Zhou, Lehmann 2016. "GPR55 - A putative 'type 3' cannabinoid receptor in inflammation." *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 27:297–302.

Zeineldin, Neufeld 2013. "More than two decades of Apc modeling in rodents." *Biochim Biophys Acta*. 1836(1):80-9.

Zhao, Zhai 2022. "Genetic analysis of activin/inhibin  $\beta$  subunits in zebrafish development and reproduction." *PLoS Genet*;18(12).

Zhou, Burkovskiy et al. 2016. "CB2 and GPR55 receptors as therapeutic targets for systemic immune dysregulation." *Front Pharmacol* 7:1–7.

Zohar 2021. "Fish reproductive biology – Reflecting on five decades of fundamental and translational research." *Gen Comp Endocrinol* 300:113544.

Zohar, Zmora 2022. "A half century of fish gonadotropin-releasing hormones: Breaking paradigms." *J Neuroendocrinol* 34:1–13.