



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Franca Deriu

INDIRIZZO IN FARMACOLOGIA DI GENERE

Responsabile di Indirizzo: Prof. Flavia Franconi.

XXVI CICLO

**Long Glucocorticoid-induced Leucine
Zipper (L-GILZ) è essenziale per il
controllo della spermatogenesi**

Direttore:

Prof. Franca Deriu

Tutor:

Prof. Flavia Franconi

Tesi di dottorato di:

Dott. Alessandra Venanzi

Relatore:

Prof. Carlo Riccardi

Dott. Stefano Bruscoli

Anno Accademico 2012 - 2013

Indice

1. Introduzione

1.1 Glucocorticoidi

1.1.1. Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene

1.2 Glucocorticoid-induced leucine zipper e L-GILZ

1.3 Gametogenesi

1.4 Ciclo cellulare e Ras pathway

1.5 Generazione del topo Knock-out

2. Materiali e Metodi

3. Risultati

3.1 Espressione di L-GILZ negli spermatogoni e negli spermatociti primari

3.2 Generazione del topo *gilz* KO

3.3 Fenotipo aberrante dei topi *gilz* KO

3.4 Analisi del difetto spermatogenetico

3.5 Studio della proliferazione e del differenziamento negli spermatogoni di topi *gilz* KO

3.6 Controllo del *pathway* di Ras da parte di L-GILZ.

4. Discussione

5. Bibliografia

1. INTRODUZIONE

1.1 GLUCOCORTICOIDI

I glucocorticoidi (GC) sono ormoni appartenenti alla classe degli steroidi che vengono sintetizzati nella zona corticale delle ghiandole surrenali a partire dal colesterolo. Le ghiandole surrenali sono organi endocrini situati nella cavità addominale posti sopra i poli renali. Nella zona glomerulare di questi organi vengono prodotti anche i mineralcorticoidi (MC), che hanno azione sul mantenimento dell'omeostasi idro-salina e di cui il più importante rappresentante è l'aldosterone, e nella zona reticolare, vengono prodotti gli ormoni sessuali con attività androgena ed estrogena. Nella zona midollare vengono, inoltre, prodotti gli ormoni catecolaminergici (noradrenalina, adrenalina e dopamina).

Il più importante glucocorticoide nell'uomo è il cortisolo sintetizzato a partire dal colesterolo nelle cellule della zona fascicolata [1]. L'azione fisiologica dei GC è molto complessa, soprattutto a causa dei molteplici meccanismi cellulari e molecolari con cui essi esplicano i loro effetti [2] (Figura 1). Essi regolano un ampio spettro di funzioni fisiologiche essenziali per la vita e giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi basale e nella regolazione degli effetti da stress. Sono, infatti, coinvolti in processi biologici cruciali per la sopravvivenza come la riproduzione, la crescita, il metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei lipidi e nelle reazioni immuni

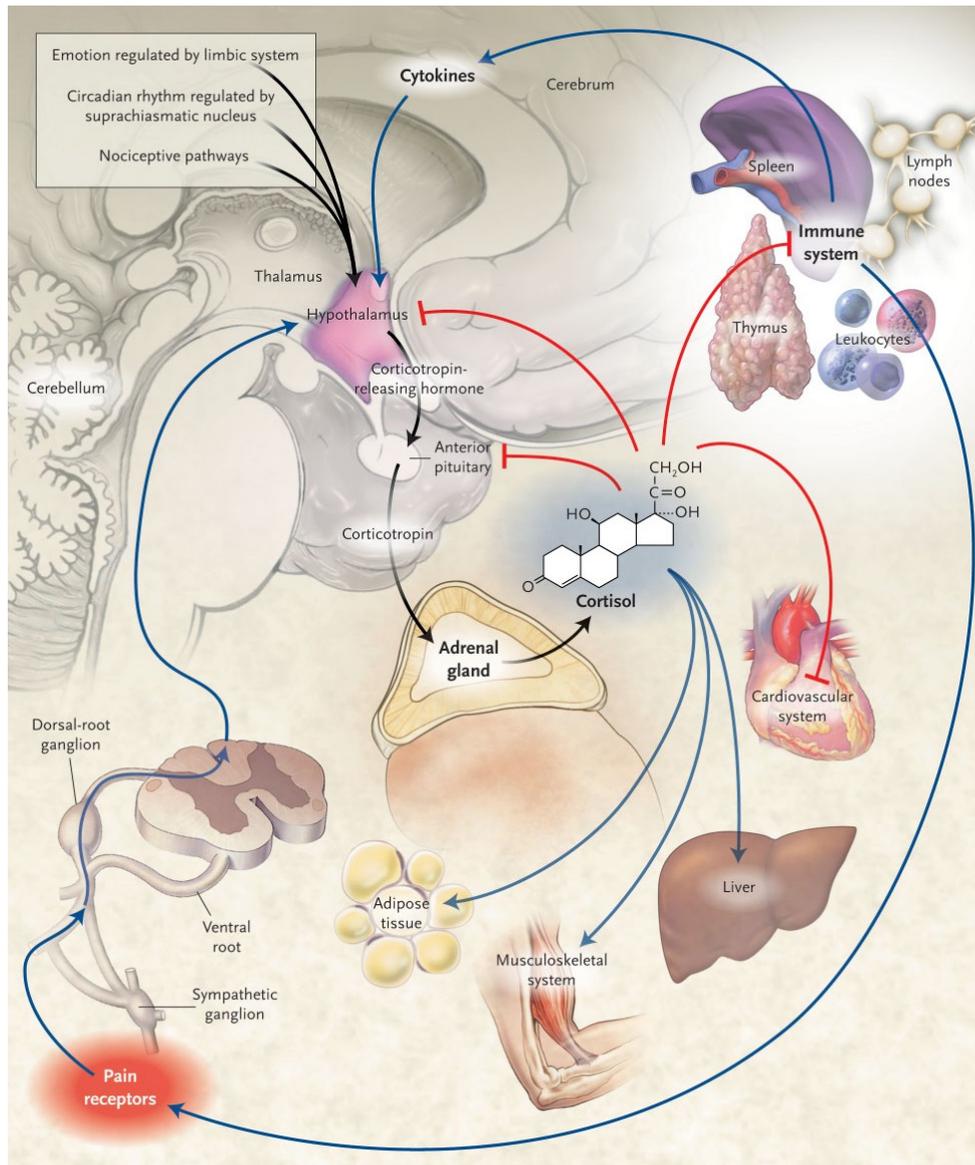


Figura 1. Il diagramma mostra il pathway di comunicazione tra il sistema immunitario, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e altri tessuti da parte di segnali infiammatori e dei GC [1].

e antinfiammatorie.

Sia gli steroidi corticosurrenali naturali che quelli sintetici sono utilizzati per la diagnosi ed il trattamento di disturbi della funzione surrenalica e, molto più frequentemente, sono usati come farmaci antinfiammatori ed immunosoppressivi in molteplici patologie autoimmuni, infettive, allergiche e in trapianti d'organo ed, infine, come antineoplastici in particolar modo nelle neoplasie

linfoemopoietiche. Tuttavia, l'uso prolungato di questi farmaci provoca seri effetti collaterali come l'osteoporosi, la cataratta, il diabete, l'ipertensione arteriosa e la sindrome di Cushing [3].

Altre sedi di sintesi e rilascio di GC, i cui effetti sono però solamente paracrini, sono le cellule epiteliali timiche e cellule a livello delle cripte del colon. In queste sedi, i GC contribuiscono, rispettivamente, al processo di selezione centrale delle cellule T e al mantenimento dell'equilibrio tollerogenico e nei confronti dei commensali del colon [4].

I GC esplicano la loro azione mediante il legame con il recettore dei glucocorticoidi (GR), che appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari degli ormoni. In assenza del ligando il GR è associato nel citoplasma ad un aggregato proteico multimerico formato da proteine come Hsp70 e Hsp90, mentre quando l'ormone si lega al GR, questo dissocia dal complesso proteico e trasloca nel nucleo, dove, in forma omodimerica o associato ad altre proteine, lega direttamente o indirettamente specifiche sequenze di DNA (GREs, glucocorticoid-responsive elements) agendo così come fattore di trascrizione, attivando o reprimendo i geni controllati.

Data la distribuzione ubiquitaria del GR, i GC hanno effetti in tutti i distretti corporei e tessuti:

- inibiscono la risposta infiammatoria riducendo la sintesi di leucotrieni e prostaglandine;
- inibiscono la risposta immunologica inducendo l'apoptosi linfocitaria e inibendo la migrazione dei monociti;
- a livello metabolico i GC stimolano la gluconeogenesi, la lipolisi ed il catabolismo proteico, mobilizzando da diversi tessuti gli amminoacidi che sono poi convertiti in glucosio;

- nei reni la parziale attività mineralcorticoide facilita l'eliminazione di acqua e aumenta la filtrazione glomerulare;
 - nel sistema nervoso centrale causano insonnia e alterazioni dell'umore;
 - nel tessuto osseo diminuiscono la mineralizzazione delle ossa e stimolano l'attività osteoclastica;
 - nel sistema muscolare regolano l'espressione delle proteine contrattili e promuovono l'atrofia muscolare e nel tessuto connettivo stimolano il catabolismo tissutale;
 - a livello cardiaco aumentano il tono arteriolare e diminuiscono la permeabilità endoteliale, mantenendo, così, la gittata cardiaca;
 - nello sviluppo embrionale favoriscono la maturazione del feto e, al momento della nascita, sono importanti per la prima respirazione; contribuiscono, inoltre, nel neonato alla maturazione degli enzimi intestinali che gli permettono la digestione del latte materno.
- La biosintesi dei GC è finemente regolata dalla secrezione di ormoni ad opera dell'ipotalamo e dell'ipofisi [5].

1.1.1 ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE

L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è un insieme di sistemi di trasmissione di segnali che connettono un'area del cervello (ipotalamo) ad una ghiandola direttamente controllata dal sistema nervoso (ipofisi), al surrene che secerne ormoni steroidei.

La produzione dei GC è controllata dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH, *Adreno Corticotrophic Hormone*) prodotto dalle cellule corticotrope dell'adenoipofisi; queste cellule, a loro volta, sono regolate dall'ormone di rilascio della corticotropina (CRH,

Corticotropin Releasing Hormone), che viene rilasciato dai neuroni del nucleo periventricolare dell'ipotalamo in risposta a molteplici segnali nervosi ed endocrini (Figura 1).

L'ACTH, come la maggior parte degli ormoni peptidici, interagisce con un recettore di membrana situato a livello surrenale, facente parte della famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G che trasduce il segnale via AMP ciclico e determina una produzione ex novo di glucocorticoidi e un' incremento della sintesi di enzimi della steroidogenesi.

Esistono tre meccanismi di regolazione dell'asse HPA: il ritmo diurno della steroidogenesi basale, la regolazione a *feedback* negativo da parte dei corticosteroidi surrenali e l'incremento della steroidogenesi in risposta allo stress.

La sintesi quotidiana di GC non è costante ma è determinata dai centri nervosi superiori in risposta ai cicli sonno-veglia, in modo tale che i livelli di GC raggiungano un picco massimo nelle prime ore del mattino e minimo alla sera, a seconda dei livelli di secrezione dell'ACTH.

La regolazione a *feedback* negativo è il meccanismo fisiologico principale mediante il quale i GC controllano la propria sintesi: quando i livelli degli ormoni in circolo sono troppo elevati, essi inibiscono l'ulteriore rilascio di CRH e ACTH attraverso azioni dirette sull'ipotalamo e sull'ipofisi.

Infine, situazioni di stress come traumi, emorragie, gravi infezioni, interventi chirurgici importanti e ipoglicemia, possono alterare i normali meccanismi di controllo, determinando un incremento della sintesi di GC essenziale per mantenere l'omeostasi corporea.

Anche alcune citochine infiammatorie come IL-2, TNF- α , IL-6 stimolano direttamente o indirettamente (mediante le prostaglandine) la sintesi di CRH con conseguente attivazione dell'asse e produzione di GC che vanno anche ad inibire la sintesi delle citochine stesse evidenziando una stretta correlazione tra HPA e sistema immunitario [6-9].

1.2 *Glucocorticoid Induced Leucine Zipper* e L-GILZ

Gilz (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) è uno tra i geni più precocemente indotti da trattamento farmacologico con diversi tipi di GC [10] ed è stato scoperto e clonato nel 1997 presso i laboratori della Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Perugia [11] Il gene *Gilz*, individuato mediante lo studio comparativo delle librerie a cDNA ottenute da timociti murini trattati e non trattati con il GC di sintesi desametasone (DEX), codifica per una proteina di basso peso molecolare (circa 15,176 kDa) appartenente alla famiglia delle Leucine Zipper. La caratteristica che accomuna le proteine comprese in questa famiglia è il “dominio a cerniera di leucina” che è formato da ripetizioni di 3 o 6 residui di leucina separati l'uno dall'altro da 7 aminoacidi, formanti una struttura ad α -elica localizzata in posizione C-terminale. La cerniera di leucina, oltre ad essere il dominio di interazione con il DNA, costituisce un dominio di dimerizzazione, interazione indispensabile per il corretto legame con il DNA.

Dal 1997, si è cercato di caratterizzare e studiare il ruolo di GILZ nella risposta immunitaria, nell'apoptosi timica e più, in generale, nel determinarne l'importanza nei processi biologici. La proteina GILZ è

prevalentemente espressa nei tessuti linfoidei (timo, milza e linfonodi), nelle cellule del sistema immunitario (mastociti, eosinofili e cellule mieloidi), nelle cellule epiteliali, ed in tessuti e linee cellulari di natura non linfoide quali midollo osseo, cuore, polmoni, fegato e reni [12].

Gilz viene chiamato anche TSC22D3 poichè ha una buona omologia con gli altri membri di proteine a cerniera di leucina appartenenti alla famiglia del *TGF- β -stimulated clone 22*, (TSC-22), fra cui TSC-22, THG-1, KIAA0669, DIP, shc, e *Drosophila-bunched gene* [13].

Dal punto di vista molecolare, *Gilz* è localizzato nel cromosoma X.

I domini proteici strutturalmente e funzionalmente importanti di GILZ murino sono tre (Figura 2):

- Regione N-terminale (aa 1-75): costituita da 70 aminoacidi con 6 residui basici (aa 18, 37, 53, 62, 64,70), che include il *TGF- β stimulated complex box domain* (TSC box; 61-75 aa).
- Regione centrale (aa 76-97): presenta 20 aminoacidi in cui si contano le 4 leucine del dominio caratteristico in posizione 76, 83, 90, 97 (*Leucine-Zipper Region*):
- Regione C-terminale (aa 103-137): è una zona ricca di proline e di acido glutamico (PER; *Prolin-Rich Region*).

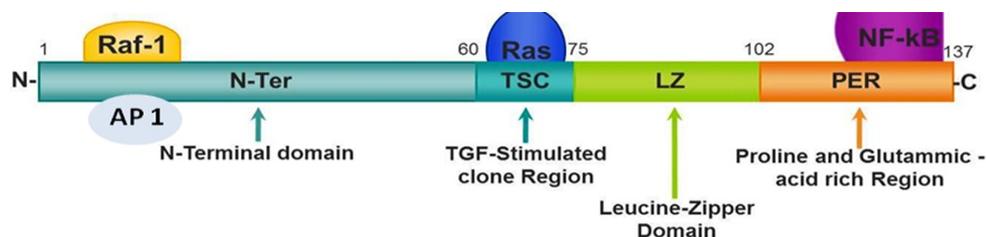


Figura.2 Domini funzionali di GILZ.

Tutti i membri della famiglia TSC-22 condividono un alto grado di omologia nel dominio di dimerizzazione (TSC-22 box e LZ), ma hanno domini differenti nella regione N-terminale e C-terminale.

La basicità di GILZ è comunque notevolmente inferiore rispetto ad altre proteine della famiglia delle *leucine zipper*; ciò fa supporre che GILZ non interagisca direttamente con il DNA, ma che possa fungere da regolatore trascrizionale, dimerizzando con altri membri della propria famiglia o interagendo con altri fattori di trascrizione, modulandone l'attività [10,16].

La sequenza del promotore di *Gilz* è stata in parte caratterizzata: essa contiene la sequenza GRE, per cui la sua trascrizione è indotta dai glucocorticoidi e, in particolare, dal DEX.

Studiando alcuni cloni di *Gilz* si è visto che il codone di inizio in posizione 206 è circondato da una sequenza (GAACCATGA) che è in buon accordo con la sequenza consenso *Kozak* per l'inizio della traduzione nelle cellule eucariote. Il codone di terminazione, in posizione 617, è seguito da una regione non tradotta di 1355 bp.

Dal momento della sua scoperta, la funzione di GILZ è stata caratterizzata prevalentemente in ambito immunologico dove i suoi effetti si sono dimostrati analoghi a quelli mediati dai GC, con un effetto di soppressione della risposta immunitaria attraverso (Figura 3):

- l'inibizione della traslocazione e dell'attività trascrizionale di NF- κ B e di AP-1, fattori trascrizionali che mediano segnali di sostegno alla risposta immune [14-16], mediante l'interazione con la subunità p65. Questo legame suggerisce che GILZ possa contribuire all'attività anti-tumorale GC-indotta dal momento che NF- κ B ha mostrato di indurre la crescita tumorale.

- l'inibizione della cascata MAP chinasi RAF/MEK/ERK, attraverso il blocco del complesso Ras-Raf-1 che sostiene l'espansione clonale linfocitaria dopo l'attivazione della cellula T stessa [17, 18].
- l'induzione di apoptosi tramite la down-modulazione di Bcl-XL, uno dei principali fattori anti-apoptotici responsabile dell'inibizione del rilascio del Citocromo C [14, 19].

Recentemente, è stato identificato il ruolo di GILZ nella regolazione della produzione delle cellule T regolatorie periferiche, attraverso il *pathways* del TGFβ (*Transforming Growth Factor β*) (dati in pubblicazione).

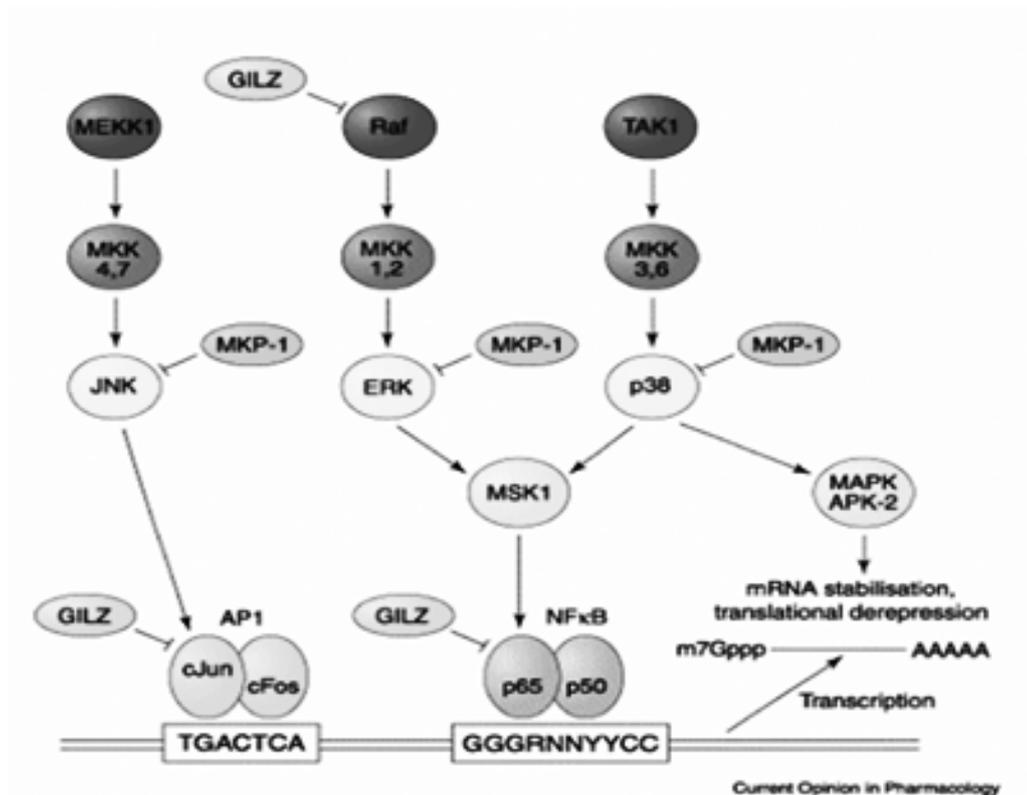


Figura 3. GILZ inibisce il pathway delle MAP chinasi e soprattutto ERK. GILZ inibisce per interazione diretta i fattori di trascrizione AP-1 e NF-κB.

In questi ultimi anni, inoltre, si è avuta evidenza del ruolo di GILZ anche in ambito non linfoide.

GILZ, infatti, ha la funzione di regolare il flusso di ioni Na^+ e K^+ nelle vie urinarie: in modo particolare GILZ è coinvolto nella modulazione dell'espressione della pompa Na^+/H^+ a livello dell'epitelio tubulare renale [20].

Altri gruppi di ricerca, hanno studiato il ruolo di GILZ in alcuni processi differenziativi ed emerge come questa proteina inibisca il differenziamento di cellule pre-adipocitarie in adipociti maturi mediante l'inibizione del fattore trascrizionale $\text{PPAR}\gamma$, fattore cardine nel promuovere il differenziamento terminale adipocitario [21]. Un altro gruppo di ricerca ha mostrato, invece, come l'espressione indotta di GILZ in cellule staminali mesenchimali, capaci di dare origine sia a osteoblasti che ad adipociti, predisponga questa linea cellulare a differenziarsi verso un profilo osteoblastico [22].

GILZ è stato, inoltre, identificato nell'utero di donne in gravidanza e sembra giocare un ruolo importante nel mantenimento della decidua e nel distacco del feto e della placenta.

Ulteriori studi hanno mostrato che l'espressione di GILZ è correlata con la proliferazione del cancro ovarico maligno in quanto aumenta la proliferazione cellulare, pAKT, CycD1 e p21, inibendo nel contempo la produzione di p21.

Sebbene l'espressione di GILZ è frequentemente indotta in presenza di glucocorticoidi, numerosi studi hanno però riscontrato l'induzione della proteina in modelli sperimentali in assenza di GC, ampliando lo spettro d'azione di questa proteina fuori da un contesto prettamente responsivo a steroidi.

E' stata recentemente descritta dal laboratorio del Prof. Riccardi dell'Università di Perugia, una nuova isoforma trascrizionale di *Gilz*, chiamata *Long- Gilz* (L-GILZ) coinvolta nella regolazione della crescita cellulare e del differenziamento [23] (Figura 4).

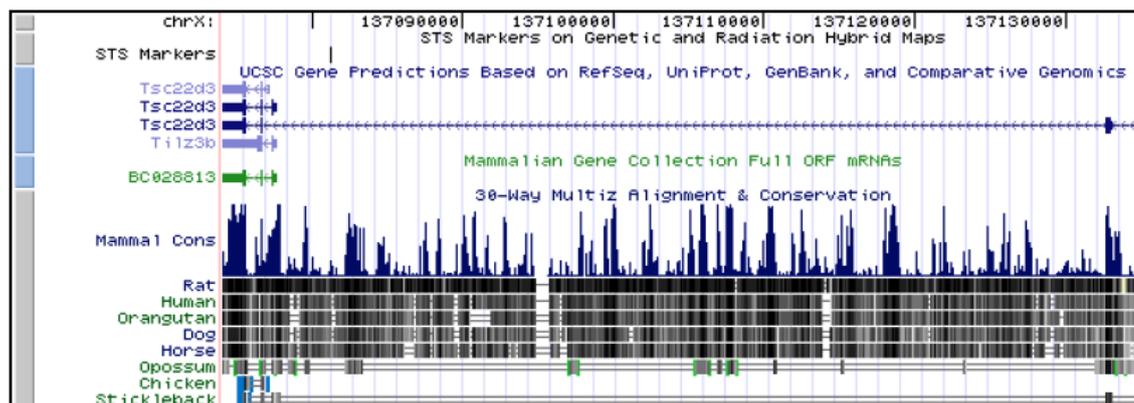


Figura 4: Locus genico di GILZ e sue possibili isoforme. (<http://genome.ucsc.edu/>).

L-GILZ condivide con GILZ tutti i domini funzionali ad oggi caratterizzati, mentre differisce per il dominio N-terminale codificato da un esone 1 alternativo (Figura 5): esso, infatti, ha un codone di inizio della traduzione non-AUG non-canonico (CUG) presente in posizione +103 rispetto al primo sito AUG presente nell'esone 1, che è caratterizzato da un alto grado di omologia per la sequenza *Kozak* di consenso. Questa isoforma lunga genera un trascritto con un ORF di 705 bp e codifica per una proteina di 234 aminoacidi con un peso molecolare di circa 28 kDa. L-GILZ ha un pattern di espressione differente se confrontato a quello di GILZ: è riscontrabile, infatti, nella milza e nei tessuti muscolari.

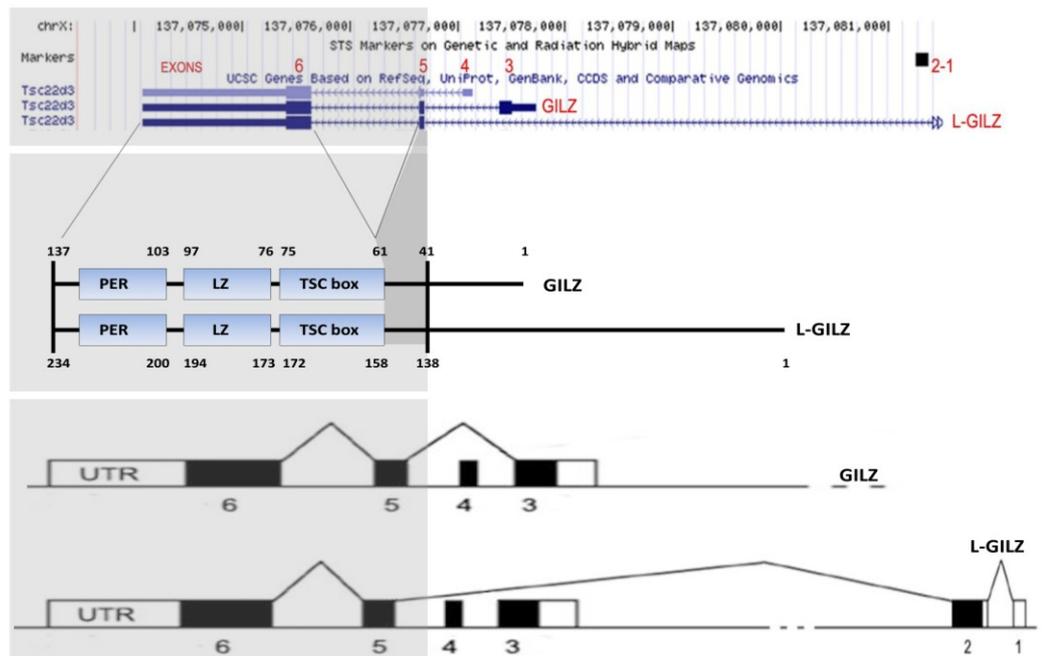


Figura 5. Omologia di struttura e domini funzionali tra le proteine GILZ e L-GILZ.

E' pertanto evidente, attraverso le conoscenze fin qui acquisite, che il ruolo fisiologico di GILZ nei processi biologici ancora non è stato del tutto chiarificato. L'interesse per le proprietà fisiologiche di questa molecola derivano anche dal fatto che, in chiave farmacologica, GILZ è uno dei principali geni velocemente indotti da trattamento con GC (sia in vitro che in vivo). Poiché GILZ si è visto mediare molti degli effetti dei GC, individuarne le proprietà biologiche potrebbe aprire nuove porte al trattamento farmacologico con GC, avente l'obiettivo di mantenere gli effetti terapeutici riducendone però gli effetti collaterali.

1.3 SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è un processo fisiologico complesso durante il quale, all'interno delle gonadi maschili, le cellule germinali proliferano e maturano passando attraverso cicli di meiosi da spermatogoni diploidi a spermatozoi maturi aploidi. La morfogenesi dei testicoli inizia poco dopo la nascita e continua fino alla pubertà, in cui la prima ondata di spermatogenesi è completata. Oltre ad essere il sito di produzione degli spermatozoi, i testicoli fungono da organo endocrino, poiché producono alti livelli di testosterone necessari per una corretta spermatogenesi e per il conferimento delle caratteristiche fenotipiche maschili.

La spermatogenesi ha luogo nel tubulo seminifero dei testicoli il quale consiste di un epitelio seminifero, composto da cellule germinali e cellule di supporto somatiche (Sertoli), dalla membrana basale e dalle cellule mioidi peritubulari. (Figura 6). Nel tessuto interstiziale, tra i tubuli seminiferi, risiedono i macrofagi interstiziali e le cellule del Leydig, deputate alla produzione di ormoni androgeni.

La cinetica della spermatogenesi non costituisce un fenomeno continuo, ma presenta un andamento ciclico, ragion per cui nei tubuli seminiferi si possono ritrovare cellule germinali in differenti stadi di evoluzione. La spermatogenesi, quindi, è un processo altamente coordinato e variegato e consta di tre differenti momenti: la spermatocitogenesi (divisione meiotica degli spermatociti primari a formare spermatociti secondari e da questi gli spermatidi), la spermioinesi (differenziazione degli spermatidi in spermatozoi maturi, durante la quale non si registrano fenomeni moltiplicativi), seguita dalla spermiazione, fase di rilascio dal testicolo [24].

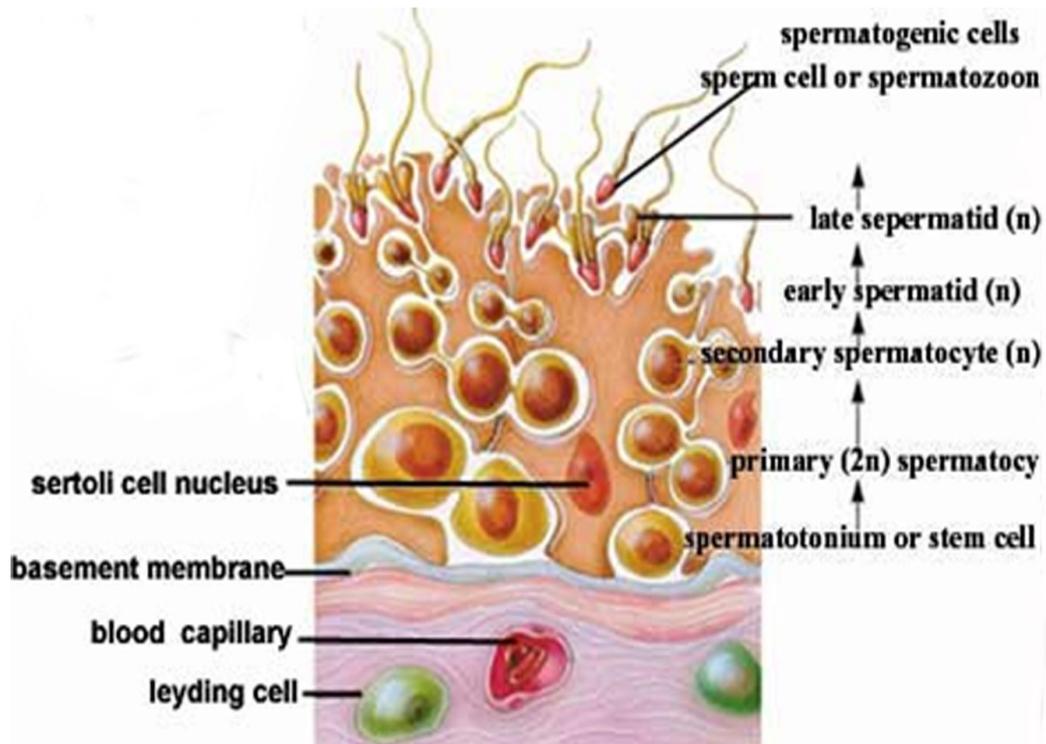


Figura 6. Illustrazione schematica della struttura dell'epitelio seminifero murino.

Gli spermatogoni derivano da cellule germinali primordiali (PGC, *Primordial Germ Cells*) le quali migrano dall'ectoderma embrionale alla cresta genitale durante la vita fetale, prendendo così parte alla formazione della gonade embrionale [25-27] e, sotto l'influenza delle cellule stromali delle gonadi in sviluppo, differenziano in gonociti, i precursori delle cellule germinali maschili, ma subiscono precocemente un arresto mitotico [26]. Appena in seguito alla nascita, i gonociti vengono riattivati, migrano verso la membrana basale e differenziano in spermatogoni [28, 29], sotto il controllo di cellule e substrati extracellulari che compongono la nicchia e controllato le funzioni degli spermatogoni (Figura 7).

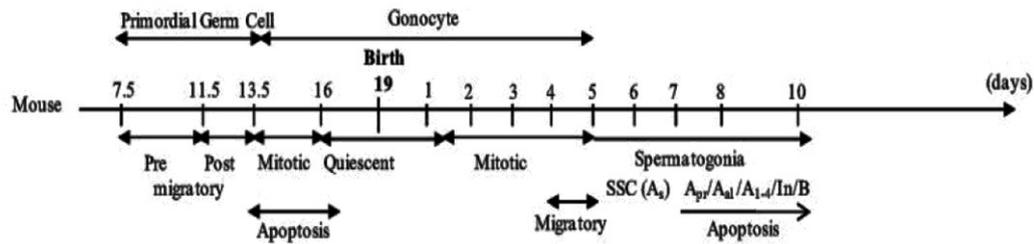


Figura 7. Rappresentazione della time-line nello sviluppo dei gonociti nel topo.

Durante la pubertà, nel testicolo avvengono notevoli cambiamenti anatomici, citologici e funzionali: le cellule del Sertoli cessano di dividersi mitoticamente; le cellule del Leydig differenziano e producono testosterone in risposta all'aumento del LH e le cellule germinali proliferano velocemente fino all'inizio della meiosi [30, 31]. Come detto in precedenza, gruppi di cellule germinali entrano nel processo spermatogenetico ad intervalli regolari [29, 32]: perciò, le cellule germinali che differiscono nel grado di maturazione, non sono distribuite casualmente nel tubo seminifero ma sono arrangiate in associazioni ben definite chiamate fasi del ciclo dell'epitelio seminifero [33].

Il ciclo dell'epitelio seminifero è l'intervallo di tempo che intercorre tra la comparsa della stessa fase in un determinato punto del tubulo. Il numero delle fasi è costante per ogni specie.

Le cellule staminali spermatogoniali (SSCs, *Spermatogonial Stem Cells*) sono cellule staminali adulte che hanno sia la capacità di *self-renewal*, ovvero rinnovare mitoticamente il *pool* di cellule staminali, sia la capacità di differenziarsi in cellule mature, e questi processi vengono regolati da segnali di nicchia estrinseci e da un' intrinseca espressione genica. Le SSCs originano, dopo la nascita, dai gonociti e sono localizzate nella membrana basale dei tubuli seminiferi. Nel testicolo murino la trasformazione dei gonociti in SSCs avviene tra 0 e

5 giorni dal parto [34] (Figura 7), simultaneamente ad un aumento transiente nella concentrazione serica del FSH (*Follicle Stimulating Hormone*), del LH (*Luteinizing Hormone*) e del testosterone.

Le cellule staminali spermatogoniali possono essere identificate usando marcatori di superficie come MHC-1 Thy-1 c-Kit, e α V-integrin.

Alcuni spermatogoni denominati As (*A single*) si ritiene possano appartenere al gruppo delle SSCs, in quanto essi mantengono la capacità di *self-renewal*, o si dividono in spermatogoni differenzianti Apr (*Apraired*) e Aal (*Aaligned*).

Durante la prima fase della spermatogenesi, gli spermatogoni As entrano in una serie di divisioni mitotiche dando origine ad un pool di cellule, gli spermatogoni Apr, che sono impegnati nel futuro sviluppo degli spermatozoi, piuttosto che nel *self-renewing*. Queste cellule si dividono formando una catena comprendente fino a 16 spermatogoni Aal; questi differenzieranno poi in spermatogoni di tipo A1, A2, A3, A4, in spermatogoni intermedi (In; *Intermediate spermatogonia*) ed infine in spermatogoni di tipo B, i precursori delle cellule meiotiche. Solo a questo punto gli spermatociti vanno incontro a 2 divisioni meiotiche per generare spermatidi aploidi, i quali a loro volta matureranno in spermatozoi durante la spermiogenesi.

Il *self-renewal* delle cellule SSC e il loro differenziamento è essenziale per garantire un continuo apporto di cellule germinali differenzianti; tale processo perciò deve essere strettamente regolato al fine di prevenire l'esaurimento del *pool* delle cellule staminali.

La spermatogenesi è sotto il controllo ormonale dell'asse ipotalamo-ipofisi: la ghiandola ipotalamica secerne il *Gonadotropin realising-hormone* (GnRH) che induce la produzione di FSH e LH da parte

della ghiandola pituitaria. Questi due ormoni ipofisari agiscono a livello trofico sulle gonadi: LH agisce soprattutto sulle cellule endocrine del Leydig, stimolando la produzione di steroidi androgeni; l'FSH controlla la spermatogenesi nel tubulo seminifero attraverso la produzione di *Androgen Binding Protein* (ABP) che lega il testosterone. L'FSH, è ritenuto fondamentale per la maturazione degli spermatidi durante la fase della spermiogenesi, che avviene a contatto dei processi citoplasmatici sertoliani, e per promuovere l'inizio della "onda spermatogenetica" all'epoca della pubertà [35]. Le cellule del Sertoli, infatti, rispondono all'FSH producendo i recettori per il testosterone: con questo meccanismo, il testosterone prodotto nelle cellule del Leydig viene internalizzato in queste cellule, inducendo l'espressione dei geni necessari per la formazione delle cellule germinali mature. L'FSH, inoltre, favorisce l'*uptake* e il metabolismo del glucosio con finale produzione di lattato, il quale funge da substrato indispensabile per garantire la sopravvivenza degli spermatociti primari in via di maturazione all'interno del tubulo.

La transizione da spermatogoni a spermatociti è mediata, inoltre, dal fattore neurotrofico GDNF, secreto dalle cellule del Sertoli. I livelli di GDNF determinano se gli spermatogoni in divisione saranno tali e continueranno a dividersi oppure se si tramuteranno in spermatociti primari: livelli bassi di GDNF favoriscono il differenziamento degli spermatogoni mentre livelli elevati ne determinano le mitosi. Poiché l'espressione del GDNF è regolata dall'ormone FSH, il sistema endocrino determina anche la quantità di spermatozoi prodotta.

Le vie di regolazione degli ormoni dell' asse ipotalamo-ipofisi anteriore- gonadi seguono i modelli generali di feedback lungo e corto: gli steroidi gonadici controllano la secrezione di GnRH, FSH,

ed LH con un circuito lungo, mentre le gonadotropine controllano il rilascio di GnRH con un circuito corto (Figura 8).

L'effetto soppressivo del testosterone sulla secrezione di LH è esercitato direttamente a livello ipotalamico sul rilascio dell'ormone rilasciante l' LH (*LH-releasing-hormone* LHRH).

Tramite questo circuito regolativo si instaura un ritmo circadiano giornaliero di concentrazione di testosterone nel siero ematico.

E' stata identificata una sostanza non steroidea di origine gonadica denominata inibina, che riveste un ruolo importante nell'inibizione della secrezione di FSH. Questa molecola è una glicoproteina secreta dalle cellule del Sertoli, costituita da due subunità denominate rispettivamente alfa e beta. Nel ratto, si è osservato che l'inibina esercita un'azione di controllo di tipo inibitorio sulla secrezione di FSH e l'effetto della contemporanea somministrazione di inibina e

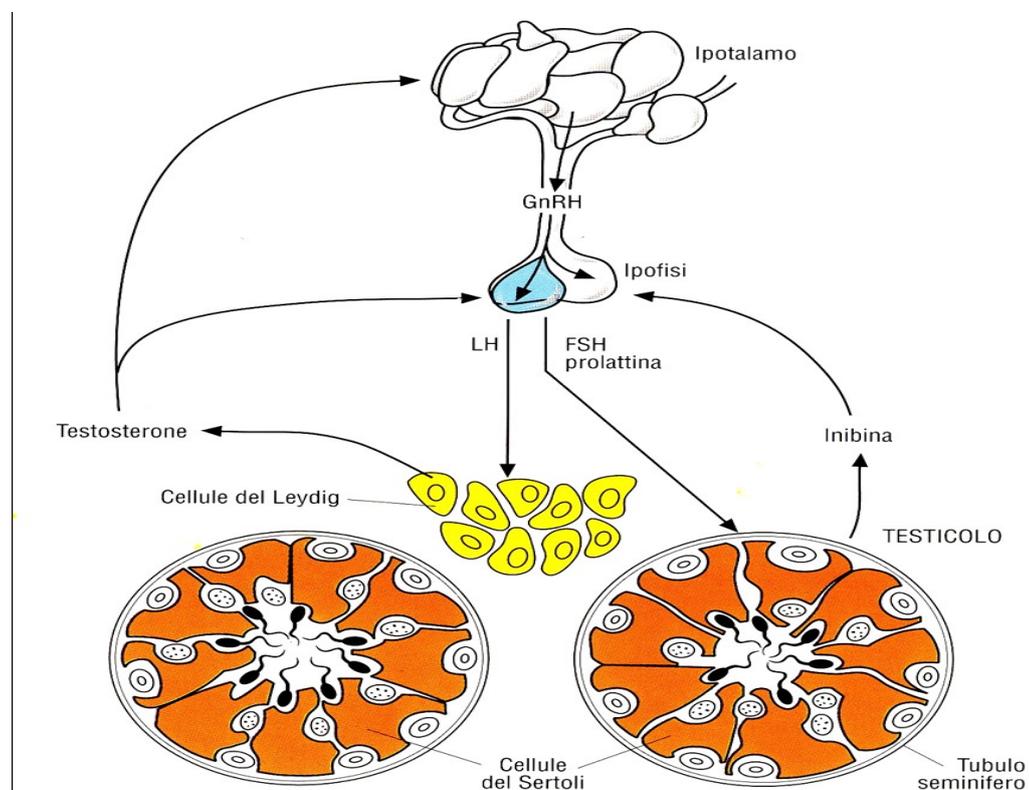


Figura 9. Controllo ormonale della spermatogenesi.

testosterone risulta sinergico nel sopprimere tale secrezione. Tuttavia, sembra che l'inibina agisca sulla regolazione della secrezione di FSH in maniera indipendente dal testosterone [36]. Alcuni neurotrasmettitori hanno un ruolo importante nella regolazione della secrezione ormonale dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi: la dopamina e la serotonina, infatti, hanno un effetto inibitorio sull'ipotalamo e sul rilascio di GnRH, mentre la norepinefrina ha effetto positivo sul rilascio di GnRH.

1.4 CICLO CELLULARE E RAS PATHWAY

Il ciclo cellulare comprende una sequenza di eventi altamente organizzata al termine dei quali la cellula si divide producendo due cellule figlie geneticamente identiche. Questo processo è finemente regolato da molte molecole all'interno della cellula. Fra esse rivestono un ruolo importante i recettori cellulari con attività tirosin-chinasica, e recettori metabotropici accoppiati a proteina G: queste due classi recettoriali, mediante il legame con il proprio ligando, attivano molteplici vie intracellulari di trasduzione del segnale che si influenzano reciprocamente.

Un ruolo di primaria importanza nella regolazione del ciclo cellulare viene svolto dal pathway RAS/RAF/MAPK.

La proteina Ras è una piccola molecola di soli 21 kDa che ubiquitariamente media segnali di proliferazione e di trasformazione cellulare. Normalmente essa si trova associata alla membrana cellulare e funziona come un interruttore cellulare, alternando uno stato attivo in cui è legata al GTP, ad uno inattivo in cui è legata al GDP.

Tra le vie di trasduzione a valle di RAS quella più studiata è la via di RAF che consiste in una cascata di attivazioni di serina/treonina chinasi. RAF contiene un sito di legame N-terminale con cui si associa alla forma attivata di RAS e un dominio serina/treonina chinasi C-terminale. Una volta attivato, RAF fosforila e attiva una chinasi a doppia specificità, chiamata MEK, capace di fosforilare sia residui di tirosina che di treonina/serina. Il substrato più importante di MEK è ERK (extracellular signal –regulated kinase) che attiva poi fattori di trascrizione, con il risultato di stimolare l'espressione di geni responsabili del superamento del "check-point" tra la fase G1 e la fase S del ciclo cellulare [37].

Analizzando più in dettaglio il ruolo giocato dal pathway RAS/RAF/ERK nella progressione del ciclo cellulare, è possibile evidenziare che l'attivazione della proteina RAF e, conseguentemente, di ERK, porta principalmente a quattro eventi:

- l'espressione della ciclina D;
- l'inibizione della proteina p21 responsabile del blocco dell'attività di alcuni complessi cicline/cdk;
- l'espressione di c-Myc che determina il controllo trascrizionale di geni coinvolti nella proliferazione;
- l'attivazione della fosfatasi cdc25 A, coinvolta nell'avanzamento del ciclo cellulare.

L'attivazione di ERK mediata da RAS determina, quindi, principalmente la up-regulation della ciclina D, ma c'è anche una piccola attività di ERK nell'ultima parte della fase G1, fase in cui l'espressione della ciclina D diviene massimale, che suggerisce che altri effettori possano essere coinvolti nell'induzione della ciclina D.

Il fatto che più *pathways* siano coinvolti nell'induzione della ciclina D è una logica conseguenza del fatto che essa debba essere regolata in maniera altamente efficiente.

Il pathway di PI-3K/Akt/mTOR è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare in molteplici modi. Akt (o protein chinasi B), infatti, facilita il passaggio G1/S, inibendo l'azione cellulare di p21 e p27 (inibitori delle cdk) e promuove la sopravvivenza della cellula attivando direttamente fattori di trascrizione come NF-kB attraverso la fosforilazione di IKK (*IKB kinase*) [38-41].

Un altro aspetto da sottolineare è senz'altro quello della regolazione della traduzione dell'mRNA e quindi della sintesi proteica da parte sia di RAS che di PKB/Akt: quando questi due pathways operano simultaneamente possono aumentare l'espressione proteica ottimizzando la fase di iniziazione della traduzione cap (*Catabolite Activating Protein*)-dipendente.

Da questo quadro risulta come Akt possa regolare sia la sopravvivenza cellulare, sia il ciclo cellulare, sia la sintesi proteica necessaria per la crescita cellulare. Per tale motivo, una iperattivazione del *pathway* PI-3K/Akt è uno dei meccanismi che permette a molte cellule normali di oltrepassare gli stimoli apoptotici e trasformarsi in neoplastiche [42,43].

1.5 GENERAZIONE DEL TOPO *KNOCK-OUT*

La manipolazione di cellule staminali embrionali e la generazione di animali modificati geneticamente sta diventando sempre più importante per lo studio della funzione dei prodotti dei singoli geni all'interno di organismi complessi molto simili all'uomo, come ad

esempio i topi [44]. Queste tecniche integrano e superano i limiti di metodiche utilizzate nel recente passato per studiare la funzione di un gene, come la trasfezione di DNA esogeno e il *silencing* mediante RNA *interference*. Con la generazione di animali geneticamente modificati, è possibile studiare quale sia il reale contributo di un determinato gene nel differenziamento di tessuti e organi e nello sviluppo dell'organismo, e quale sia il contributo di un gene o la predisposizione oppure la resistenza a malattie in topi geneticamente modificati [45]

Considerando l'esponenziale aumento nel numero di geni identificati grazie al progetto di sequenziamento del genoma, è diventato molto importante sviluppare un metodo efficiente per la determinazione della funzione di un gene.

Oggi giorno è teoricamente possibile generare una qualsiasi mutazione nella linea germinale di topo mediante l'uso di cellule staminali embrionali (ES) e l'uso della strategia di *gene targeting*, ovvero la ricombinazione omologa di un frammento di DNA esogeno con la sequenza endogena omologa. [46-47]. Il *gene targeting* fornisce pertanto un mezzo molto potente per apportare una mutazione in un locus specifico desiderato.

La combinazione della tecnica di *gene targeting* nelle cellule ES di topo abbinata al sistema di ricombinazione Cre/loxP ha determinato, in seguito, la nascita dell'ingegneria genetica cromosomiale nel topo. Lo sviluppo di queste tecniche ha permesso, inoltre, la generazione di nuovi modelli di malattia associati a riarrangiamenti cromosomici che nell'uomo sono la principale causa di tumori, di morte fetale e di difetti nello sviluppo dell'organismo [48].

Topi geneticamente modificati possono essere generati attraverso l'iniezione diretta di DNA esogeno di un pronucleo in uno zigote fertilizzato [49], oppure mediante l'iniezione di cellule ES geneticamente modificate nella cavità di una blastocisti.

L'iniezione diretta del pronucleo provoca, però, l'integrazione causale del DNA iniettato e viene utilizzato nella maggior parte dei casi per promuovere l'aumentata espressione del gene inserito nel topo. Il vantaggio nell'uso delle cellule ES, invece, consiste nella possibilità che esse possano essere modificate mediante *gene targeting* prima di essere introdotte nella blastocisti, potendo così manipolare in modo specifico il *locus* da modificare, evitando l'integrazione casuale caratteristica dell'altra tecnica.

Nel topo *knock-out* (KO) uno o più geni vengono deleti o modificati per inibire l'espressione di una (o più) determinate proteine e valutarne quindi l'effetto sullo sviluppo e sul fenotipo dell'animale.

Topi KO vengono ampiamente utilizzati in ambito scientifico: risultano essere un ottimo modello per le malattie genetiche umane e, nell'ambito della ricerca di base, per poter studiare in dettaglio la funzione di un determinato gene.

Il metodo più largamente usato per determinare la delezione di un gene consiste nella iniziale rimozione del gene di interesse in una cellula staminale embrionale pluripotente, introducendo in essa mediante elettroporazione un costrutto targeting (*targeting vector*) che contiene una regione omologa al gene di interesse e una regione codificante per la resistenza ad un antibiotico [50-54]. Le cellule ES KO sono in seguito analizzate (*southern blot* o *PCR*) per l'avvenuta ricombinazione omologa tra il gene di interesse ed il *targeting vector*. La cellula ES KO positiva viene introdotta in una blastocisti che verrà,

a sua volta, introdotta in una madre pseudo-gravida. Il ruolo della cellula ES KO è quello di colonizzare la blastocisti, contribuendo alla formazione dell'intero organismo e delle cellule della linea germinale. I topi nati (F0) vengono esaminati per il loro grado di chimerismo che rappresenta la percentuale del contributo genetico fornito dalla cellula ES modificata. Il più alto grado di chimerismo aumenta le possibilità che la cellula ES KO contribuisca alla formazione delle cellule della linea germinale durante lo sviluppo embrionale, al fine di dare *germline transmission*, ossia la trasmissione dell'allele mutato alla nuova progenie. Per evidenziare fenotipicamente il grado di chimerismo, in genere si utilizzano cellule staminali che codificano per un colore del mantello del topo differente da quello della blastocisti nella quale vengono impiantate. L'analisi fenotipica, quando possibile, viene comunque confermata da un'analisi genomica effettuata mediante *southern blot e PCR*.

I topi con più alto grado di chimerismo vengono incrociati con altri topi per generare topi eterozigoti nella linea germinale (F1). Per generare i topi nel quale il gene di interesse è deletato in omozigosi, i topi F1 vengono incrociati fra di loro (Figura 9).

Diversi geni coinvolti in importanti *pathways* genetici sono essenziali per lo sviluppo, la vitalità e fertilità del topo. In questi casi l'approccio tradizionale di *gene KO* non può essere utilizzato in quanto la delezione di uno di questi geni porterebbe ad un fenotipo letale [55-58]. La strategia della modificazione genica condizionale usando la tecnologia Cre-Lox permette la delezione del gene di interesse all'interno di una specifica popolazione tissutale o in un determinato momento, eliminando in questo modo il problema della letalità della mutazione introdotta. Poiché la modificazione genica può essere

controllata sia dal punto di vista spaziale che temporale, il ruolo di un certo gene può venire studiato in una specifica linea popolazione cellulare o in uno specifico momento quale potrebbe essere una specifica fase dello sviluppo del topo. Infatti, questo nuovo approccio genetico ha permesso di andare a definire la funzione di diversi geni coinvolti nello sviluppo embrionale. Questo sistema sfrutta principalmente l'attività di due ricombinasi, Cre e Flp, enzimi che fanno parte della famiglia delle integrasi ricombinasi sito-specifiche.

La ricombinasi Cre è presente in natura nel batteriofago P1 ed ha un ruolo nell'instaurarsi del ciclo lisogenico; mentre la ricombinasi Flp deriva dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Le ricombinasi Cre e Flp riconoscono le sequenze loxP o FRT rispettivamente. L'inserzione di queste particolari sequenze in un locus genico non alterano in genere la funzionalità del *locus* stesso permettendo una normale espressione del gene fino a quando non sia presente nella stessa cellula anche la ricombinasi che determina il taglio della sequenza di DNA all'interno delle sequenze palindromiche. In questo modo il *locus* genico viene alterato portando alla perdita dell'espressione e della funzione del gene.

L'eliminazione tessuto-specifica di un gene di interesse o di una sua porzione, per rimuoverne l'attività, è possibile mediante l'accoppiamento di un topo modificato per un determinato gene come descritto in precedenza con un topo che esprime la ricombinasi Cre (Figura 10). Negli ultimi anni sono stati generati un numero cospicuo di topi che esprimono la ricombinasi Cre sotto il controllo di un promotore che può essere tessuto specifico, cellula specifico, sviluppo specifico o indotto da agenti esogeni come ad esempio la tetraciclina [59-63].

Il laboratorio in cui ho svolto il lavoro di tesi si è avvalso della strategia di *gene targeting* per poter generare un topo *knock-out* per il gene *gilz*, allo scopo di valutare quale sia la funzione del gene in vivo e per approfondire la comprensione di quale ruolo potesse avere all'interno dell'organismo.

I topi *gilz*, KO nascono vitali ed apparentemente normali. Comunque, nei primi giorni dopo la nascita è apparso evidente un fenotipo drammatico a livello testicolare dovuto ad una compromessa spermatogenesi nel topo geneticamente modificato.

Questa scoperta assume un ruolo importante nel contesto scientifico e, dal momento che attualmente vi è sempre una maggior richiesta di strategie cliniche che possano far fronte all'elevato numero di pazienti con problemi testicolari e di fertilità, in questo lavoro si è voluto identificare se e con quale grado *gilz*, sia coinvolto nel controllo della spermatogenesi.

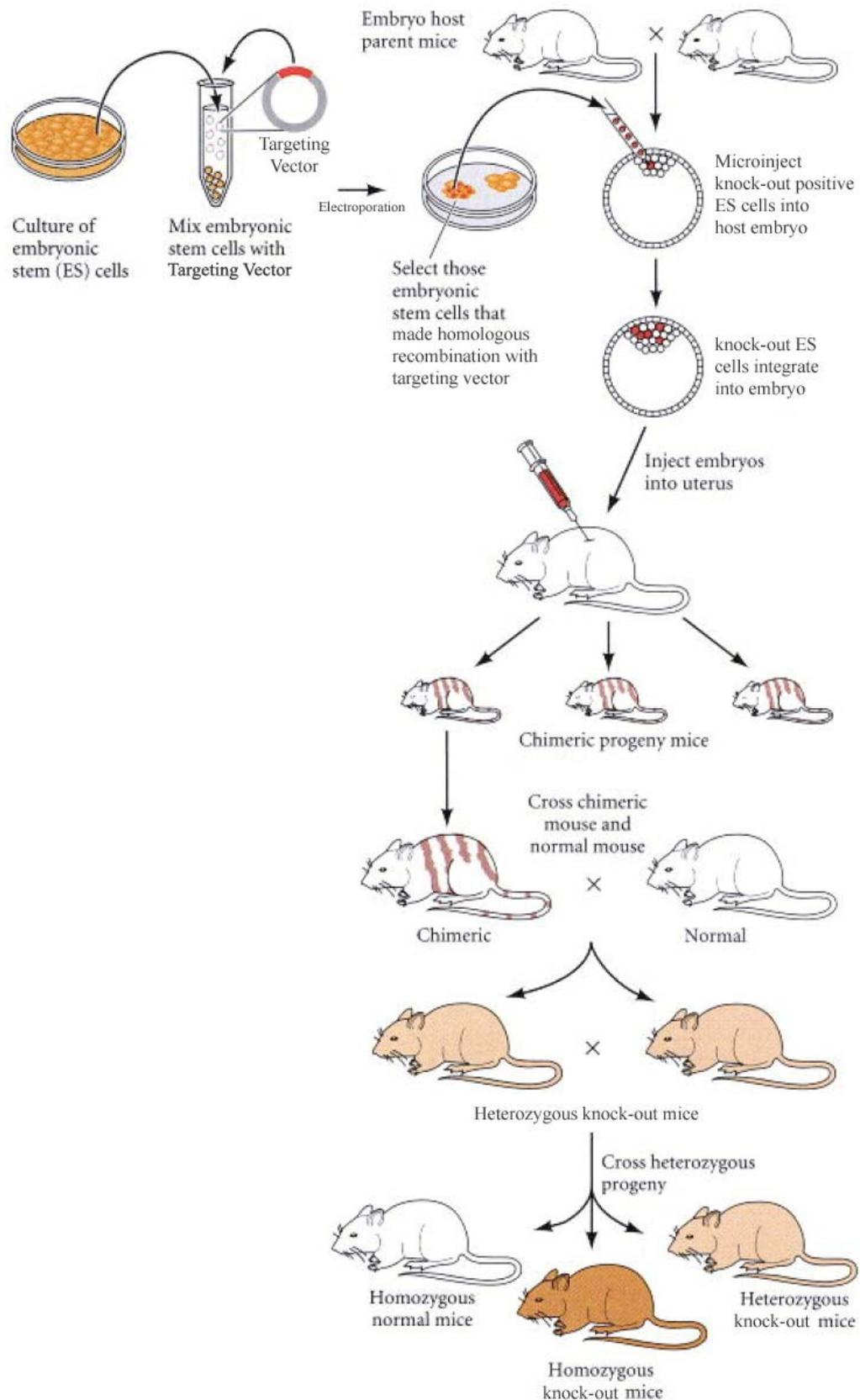


Figura 9. Rappresentazione schematica delle varie fasi necessarie per la generazione di un topo geneticamente modificato.

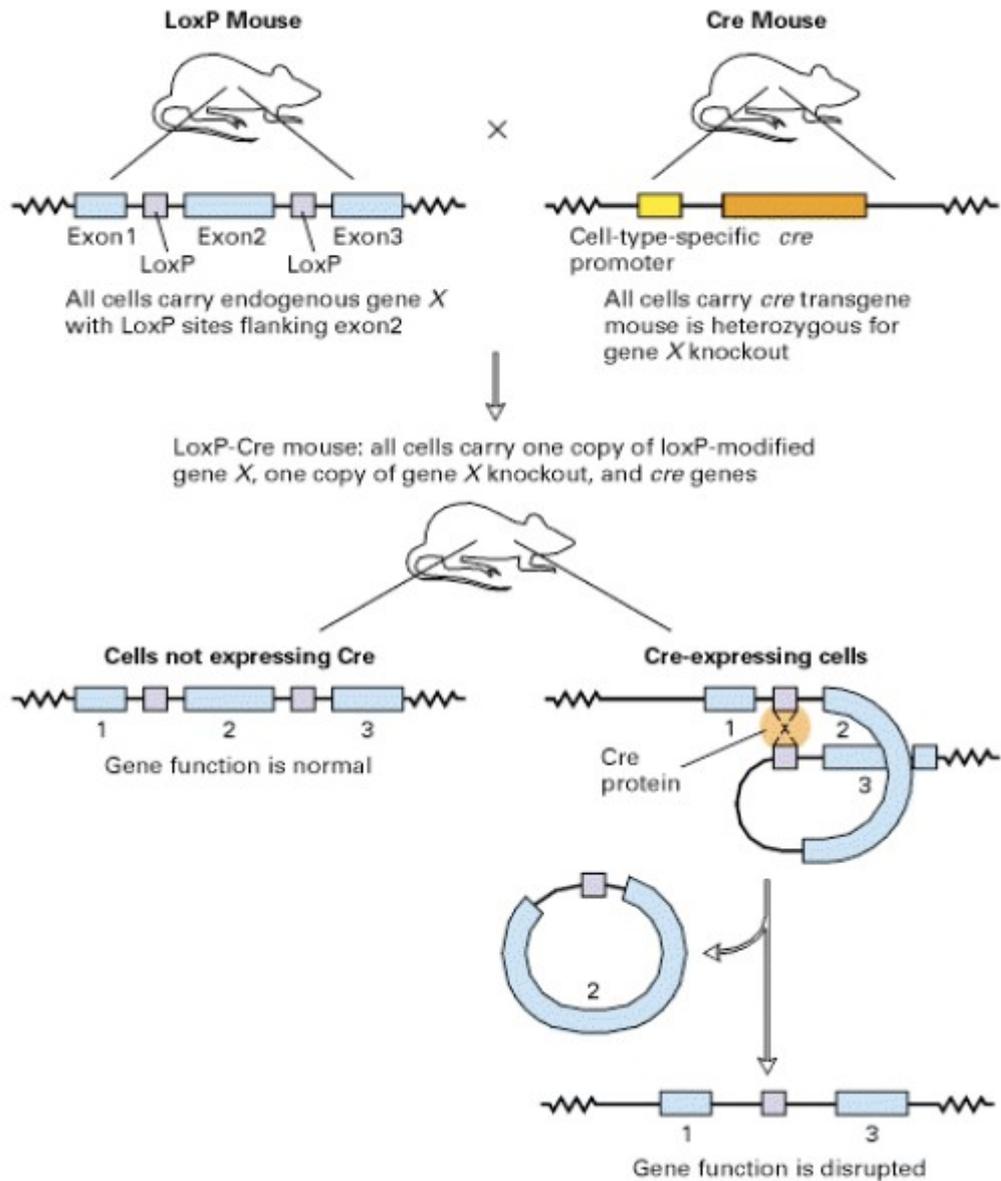


Figura 10. Generazione di un topo KO mediante incrocio di un topo CRE positivo (a destra) con un topo modificato Cre/Lox (a sinistra)

2. MATERIALI E METODI

Topi. I topi utilizzati per gli esperimenti, ceppo C57/BL6, sono stati stabulati e trattati secondo le norme Italiane (Decreto Ministeriale 116192), Europee (*Official Journal of European Commission* L 358/12/18/1986), USA (*Animal Welfare Assurance* A5594-01, *Department of Health and Human Services, Washington, DC, USA*), e sono state approvate dal comitato etico dell'Università di Perugia.

Per la genotipizzazione degli animali, il DNA genomico è stato isolato da code di topo ed i genotipi sono stati determinati tramite analisi di *Southern Blotting*. 15-20 µg di DNA sono stati digeriti con enzimi di restrizione KpnI o HindIII e separati in un gel di agarosio all'8%. Il DNA è stato trasferito su una membrana *GeneScreen Plus* (PerkinElmer Life Science) e ibridato con sonde 5' e 3'. La sonda 5' ibridizza con frammenti generati da HindIII e si ottengono bande di grandezza di 5.0-kb (WT) e 7-kb (*targeted*). La sonda 3' ibridizza con frammenti generati da KpnI si ottengono bande di grandezza di 12.4-kb (WT) e 8.4-kb (*targeted*).

Generazione di cellule germinali di topo GILZ KO. Per generare in modo specifico cellule germinali KO per GILZ (GILZ-cKO), maschi di topo GILZ^{flox/Y} sono stati incrociati con topo transgenici nei quali la ricombinasi Cre è espressa in modo selettivo sotto il controllo del promotore di Mvh [64], il quale diventa attivo in modo specifico solo nelle cellule germinali del maschio a partire dallo sviluppo delle cellule germinali primordiali.

Istologia: Testicoli di topo a vari stadi di sviluppo sono stati prelevati e fissati per 24 ore in formalina al 10% ed inclusi in paraffina. Sezioni semiseriali sono state colorate con ematossilina/eosina oppure utilizzate per analisi immunoistochimiche. Sezioni di testicolo di topi GILZ-WT e GILZ-KO sono state deparaffinate, reidratate ed incubate con anticorpi specifici per L-GILZ (eBioscience), PLZF (Calbiochem), GATA-1 (Santa Cruz Biotechnology), TRA98 (BioAcademia), ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology), γ H2AX (Upstate) e l'isotipo di controllo, Rat IgG2a K (BD Biosciences). Un sistema completamente automatico di colorazione (Vision BioSystem Bond Max) è stato usato per effettuare lo *staining* immunoistochimico, utilizzando un sistema coniugato di anticorpi *HRP-linked* (Bond Polymer Defined Detection; Vision BioSystems Ltd.). Il rapporto numero di cellule positive/tubulo seminifero è stato valutato in sei animali e sono stati determinati i valori di media e deviazione standard. In ogni testicolo sono stati contati almeno 60 tubuli seminiferi. Le immagini digitali sono state acquisite con un microscopio Olympus BX51 equipaggiato con una macchina Leica EC3 e analizzate con il software LAS EZ (Leica).

Saggio TUNEL. Cellule apoptotiche sono state rivelate con *ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit* (Millipore). I campioni sono stati analizzati utilizzando un microscopio a fluorescenza, (microscopio Leica equipaggiato con una fotocamera Diagnostic Instrument RT Color Camera). Le cellule positive per la colorazione TUNEL sono state contate in ogni sezione.

Valutazione dell' apoptosi mediante PCR. Per l'analisi delle vie di segnalazione apoptotiche mediante PCR, RNA estratti da testicoli di topo WT e KO per GILZ a 10 dpp (n=3) sono stati riuniti e trattati con DNasi (Turbo DNA-free; Ambion). Un totale di 1 µg di RNA è stato retrotrascritto attraverso il Kit RT-PCR (SABiosciences Corp). La qualità dei cDNA è stata testata attraverso RT2 RNA QC-Array (SABiosciences). Il sistema *Mouse Apoptosis RT2 Profiler PCR Array* è stato fornito dalla SABioscience. La PCR è stata eseguita in una macchina ABI7300 *Real Time* (Applied Biosystem). I dati sono stati importati in un database Excel e sottomessi al portale *SABiosciences PCR Array Data Analysis Web Portal* che automaticamente esegue i calcoli e interpreta i dati originali. Questi dati sono analizzati usando il metodo comparativo del ciclo soglia comparandoli e normalizzandoli a 4 geni *housekeeping*. I dati sono presentati come variazioni relative d'espressione rispetto ai valori del topo WT di controllo.

Radioimmunoassay (RIA). I topi sono stati anestetizzati con isoflurano e immediatamente è stato prelevato il sangue mediante puntura cardiaca. Il sangue è stato incubato a 37°C per 3 ore e centrifugato a 10,000 g per 10 min a 4°C per ottenere il sovrinatante costituito dal siero. La concentrazione del testosterone serico di ogni topo è stata misurata attraverso un test radioimmunologico come precedentemente descritto [65].

Trapianto delle cellule germinali. Cellule donatrici sono state isolate dai testicoli di un topo WT C57BL/6 come precedentemente descritto [66]. Le cellule germinali purificate sono state trapiantate in

topi di tre mesi GILZ KO ad una concentrazione di 10^6 cellule/ml. Tre mesi dopo il trapianto, il numero delle colonie donatrici è stato quantificato per ogni testicolo recipiente attraverso analisi microscopica. In ogni testicolo sono stati analizzati circa 200 tubuli per quantificare la percentuale dei tubuli ripopolati dalle cellule donatrici.

Colture cellulari e trasfezione. La linea cellulare di rene umano embrionale, HEK293, è stata mantenuta in fase di crescita esponenziale nel medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), sodio piruvato 1mM, antibiotici penicillina e streptomina (DMEM completo). Gli esperimenti di trasfezione della linea cellulare sono stati effettuati utilizzando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) secondo il procedimento consigliato con pcDNA3.1-Flag-L-GILZ e pCMVTag-H-Ras-myc. 24 ore dopo la trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate in 50mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 10% glicerolo, 5 mM MgCl₂ e inibitori di proteasi e fosfatasi.

Colorazioni cellulari e Citofluorimetria. I testicoli di topi a 7 dpp sono stati digeriti enzimaticamente con collagenasi di tipo I (Sigma), e la sospensione cellulare ottenuta è stata filtrata attraverso una maglia in nylon di 70- μ m di diametro, e incubata in un buffer di dissociazione cellulare (Invitrogen) per 25 minuti a 32°C. Dopo centrifugazione, le cellule sono state incubate con un anticorpo anti integrina- $\alpha 6$ ($\alpha 6$ -int; eBioscience), anti c-kit (eBioscience), o anticorpo anti AKT (Se-473) fosforilata (pAkt; Cell Signaling) per 15 minuti a temperatura ambiente in PBS con 2% FBS, e lavato due volte

in un tampone PBS con 2% FBS. Gli esperimenti di citofluorimetria sono stati condotti utilizzando BD FACSCanto (BD, Bioscience) con configurazione standard a un laser.

Saggio di Proliferazione BrdU. La proliferazione cellulare è stata misurata attraverso l'incorporazione di BrdU (Roche Applied Science). Le cellule sono state piastrate ad una concentrazione di 10^6 cellule/pozzetto in DMEM completo e trattate con 0.2 μ M wortmannina (Sigma) per 6 ore. Il BrdU è stato aggiunto durante le ultime 2 ore. Le cellule sono state marcate con anticorpi di superficie per 15 minuti, lavate e fissate in 2% paraformaldeide. Il BrdU incorporato è stato immuno-rivelato usando il FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences). I dati sono stati analizzati usando il software FlowJo (Tree Star).

Immuno-staining Whole Mount. I tubuli seminiferi sono stati rimossi dalla tunica albuginea da testicoli di topi WT e GILZ KO a 7, 10, 14, 25 e 35 dpp (n=5) e fissati in paraformaldeide al 4% a 4°C. I campioni fissati, sono stati incubati overnight a 4°C con gli anticorpi primari anti PLZF e GILZ in *staining buffer* (PBS, 0,1% Triton X-100, 1% BSA, 5% *donkey serum*) su vetrini per istologia. Dopo il lavaggio, i campioni sono stati incubati con anticorpi secondari anti-mouse Alexa Flour 488 o anti-ratto Alexa Flour 568 (Invitrogen). I nuclei sono stati contro-colorati con Hoechst 33342 e i vetrini sono stati montati con Vectashield (Vector Laboratories). Acquisizioni confocali sono state effettuate utilizzando un microscopio Leica TCS SP2 (Leica) a 3 canali (argon 488, 543, 633 nm). Ogni canale è stato acquisito separatamente usando linee laser specifiche per evitare

interferenza tra i vari fluorocromi. Le immagini sono state analizzate con il software LAS AF (Leica) a 1024 X 1024 o 2048 X 2048 pixels. I valori ottenuti dalle cellule positive sono stati elaborati usando il software ImageJ della National Institutes of Health.

Analisi quantitativa Real-Time PCR. L'RNA totale è stato estratto usando TRIzol (Invitrogen). La retrotrascrizione del DNA è stata effettuata utilizzando QuantiTect Reverse Transcription (Quiagen). Nella PCR sono stati utilizzati i primers elencati in tabella 1. La PCR è stata eseguita in un volume finale di 20 μ l con 0,02 μ M di cDNA, 0,5 μ M di primers senso e antisenso, 1,5 mM MgCl₂, e 1 unità di platinum Taq Polimerase (Invitrogen), seguendo le linee guida della casa produttrice. Il prodotto di PCR è stato corso su un gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio. La PCR quantitativa Real Time (qPCR) è stata eseguita su una macchina Applied Biosystems Real Time (ABI7300) utilizzando la Master Mix Power SYBR Green PCR (Applied Biosystem). Le quantità relative di L-GILZ e degli altri mRNA analizzati sono state calcolate con il metodo Comparativo $\Delta\Delta C(t)$.

Immunoprecipitazioni e Western Blotting. L'estratto proteico totale della trasfezione è stato immunoprecipitato utilizzando le anti-Flag M2 Beads (Sigma). Le proteine immunoprecipitate e gli *inputs* sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana PVDF. L'espressione esogena delle proteine trasfettate è stata rilevata mediante l'utilizzo di anticorpi primari anti-Flag (Sigma) e anti-myc (Invitrogen).

Gene Symbol	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
AR	AA GACCTG OCTGA TCTGTGG	TCGTTTCTGCTGGCACA TAG
Bcl6	GCAGCAGTGAAGAAGGAACC	AGCCACAGCCTCACAGTTCT
Beta Actin	OCAACOGTGA AAA GATGACC	OGTGAGGGAGAGCATAGCC
cRET	TCTTCTGTGTCTGCCAOCAC	GCCTTCTCCAGAGTTTTCC
Cyclin A1	CAGAGCTCCAAGAGTGGAG	AGTGGAGA TCTGACTTGAGC
Cyclin A2	CACCTOGAGGCATTCCGGG	CGGGTAAA GAGACAGCTGC
DAZL	TTCAGGCA TATCCTCCTTATC	ATGCTTCGGTCCACAGACTTC
ER	GATGGGCTTATTGACCAAC	CCAGGCACACTCCAGAAGG
FSH	TCAGCTTCCCCAGAAAGAGA	CCGAGCTGGGTCTTATACA
FSHR	OCAAGCTTOGAGTCA TCOCA	ATGCAAGTTGGGTAGGTTGG
GDNF	OGGACGGGACTCTAAGATGA	OGTCA TCAAACTGGTCA GGA
GFRA1	OCA TGTTOCTAGC AACTCTG	CACTGGCTTTCA CACAGTCC
GR	AACTGGAA TAGGTGCCAAGG	GAGCA CACCA GGCAGATTT
HPRT	OGTOGTGATTAGCGATGATG	ACAGAGGGCCACAATGTGAT
LH	AGTTCTGOC CAGTCTGCATC	TGAGGGCTACAGGAAAGGAG
LHR	TCA GAAGCTTTCAGGGGACT	GCA GGTTTTTGGTGTCTGG
LHX1	CCCAGCTTTCCCGAATCCT	GCGGGACGTAAATAAATAAATGG
MAGEA1	GCCCAA GACAGGTA TCCTCA	TGTA TTTCA GGCACCCTTCC
MAGEA2	CCCTGGTATCAA GGA GCTGA	CTAATTCCTGTTGGGCTGA
MAGEA3	ACCTGGAA TACAGGCAGGTG	AGGTCA GAGGAGTTGGAGCA
MAGEA5	GCTGAAACOC TGGTAAAGCA	TGGAAA TCAGCCA TTGTGAC
MAGEA6	GCTGAAACOC TGGTAAAGCA	TGGAAA TCAGCCA TTGTGAC
MVH	GATGAA GATTGGGAGGCA GA	GTTTCCAAA GOCCTTCTC
NANOS2	CCTG GATGTCTGCCTACCAT	GCTGACTGCTGTTGAGTGGA
NGN3	GCTATCCACTGCTGCTTGA	CCGGGAAAAGGTTGTTGTGT
OCT4	GAGCA CGAGTGGAAGCAAC	TTCTGCAGGGCTTTCATGTC
SOHLH1	ATGCTTTGGGATGCTGGATA	GACCA CAGGAACAATGTC
SOHLH2	AGAGACAGATGCCCATCGAG	CTCTCACTGCTCCCTCCAAA
SOX9	AGTACOCGCA TCTGCACAAC	AATOGGGTGGTCTTTCTTG
SRF-1	TCCA TTCAGCACCTTCAACA	TCA TCCAAATGGAAA GAGCC
SYCP1	TGTTGATCCAAA GTGCTGAGA	TTCAAGTTCTGATGTTAAATGATCC
SYCP2	TGCAGATAOCA TCAGATGAAAAA	GACAGCTTCCATTGGTGAT
SYCP3	GTGTTGCA GCA GTGGGAAC	GCTOGTGTATCTGTTTGATTGC
XMR	GATAATCGGCTCTGTCCAGG	GGCGGCATATTCTCATGTTT

Tabella 1: Primers utilizzati per amplificare i geni di interesse.

Le proteine estratte per condurre gli altri esperimenti di Western Blotting sono state lisate in RIPA buffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS e inibitori di proteasi e fosfatasi) , separate mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana PVDF. L'espressione proteica è stata rilevata utilizzando anticorpi primari anti-GILZ (Santa Cruz Biotechnology), anti-ERK1/2 e anti-phospho-ERK1/2, anti-AKT e anti-phospho-AKT (Ser-473) (Cell signaling), e anti- β -tubulina (Sigma Aldrich).

Gli anticorpi secondari utilizzati in questo lavoro sono coniugati a HRP (Thermo Scientific) e la visualizzazione è stata effettuata mediante il sistema ECL (Amersham Biosciences). L'intensità del segnale ottenuto nelle lastre fotografiche (NIKON) è stata valutata usando il software Scion Image (Scion Corporation). I livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando la β -tubulina.

Gene expression Profiling. L'esperimento è stato eseguito usando il sistema Affymetrix GeneChip Human Mouse ST 1.0. Lo scopo dell'analisi è stato quello di comparare il profilo di espressione genica di testicoli prelevati da topi WT e GILZ-KO di 7 dpp. L'RNA totale è stato purificato usando il sistema TRIzol (Invitrogen). 18 campioni sono stati riuniti in 6 gruppi, ognuno composto da tre replicati biologici. I due gruppi sperimentali sono stati: WT 7dpp; KO 7 dpp. Geni con espressione differenziale sono stati identificati usando il software Parker Genomic Suite 6.4. E' stata eseguita l'analisi della varianza ANOVA e geni differenzialmente espressi filtrati per un tasso di determinazione di falsi $< 0,005$. Un p-value $< 0,05$ e un *fold-change* $> 1,5$ (*in modulus*) sono stati usati per filtrare i dati (Tabella 2).

Probeset ID	Gene Symbol	RefSeq	Fold-Change(KO vs. WT)
10606989	Tsc22d3	NM_001077364	-2,37505
10576049	Foxf1a	ENSMUST00000098351	-1,74256
10576046	Foxf1a	NM_010426	-1,61412
10576051	Foxc2	NM_013519	-1,59418
10547227	Ret	NM_001080780	-1,59082
10428388	Rspo2	NM_172815	-1,5699
10466886		—	-1,51568
10468722	Gfra1	NM_010279	-1,48612
10598251	Dgkk	NM_177914	-1,461
10550181		—	-1,38541
10508907		—	-1,38478
10467979	Scd1	NM_009127	-1,36834
10364542	Cfd	NM_013459	-1,34956
10416725	Tdrd3	ENSMUST00000022596	-1,33408
10399581	3110053B16Rik	AK148766	-1,30283
10563706	EG668725	DQ386867	-1,29228
10489909	Ube2v1	NM_023230	-1,13801
10372730	Itfb	NM_054079	1,04814
10573054	Gypa	NM_010369	1,19587
10545026	V1rc24	NM_134179	1,25169
10403816		—	1,25261
10418986		—	1,27584
10602372	Alas2	NM_009653	1,29731
10484600	Ofr1062	NM_147078	1,33056
10608226			1,35665
10608492	1700040F15Rik	AK076905	1,3567
10399710	Rsad2	NM_021384	1,3905
10608523	LOC380994	BC099537	1,3969
10578136		—	1,42112
10467840	C130021O09Rik	AK081501	1,42563
10608184	Zfy2	NM_009571	1,42646
10488465	Zfp345	NM_001034900	1,4795
10599917	Fmr1nb	NM_174993	1,49604
10605633	Ret2	NM_008821	1,58541
10603926	EG382275	NM_001025607	1,6217
10603936	EG382275	NM_001025607	1,6287
10603914	EG546272	NM_001100444	1,63487
10603953	382277	NM_001040669	1,70127
10566205	Dub2a	NM_001001559	1,71279
10607454	Magea1	NM_020015	1,71553
10599064	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,78919
10603986	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,79064
10604023	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,79064
10599096	ENSMUSG00000059047	NM_001109969	1,81248
10603975	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,81248
10599075	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,81257
10599107	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,81257
10603964	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,81257
10603997	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,81257
10604008	OTTMUSG00000018086	NM_001110250	1,81257
10599673	4930527E24Rik	ENSMUST00000088740	1,90453
10603911		—	1,94255

Tabella 2: Risultato dell'analisi di espressione genica.

3. RISULTATI

3.1 ESPRESSIONE DI L-GILZ NEGLI SPERMATOGONI E NEGLI SPERMATOCITI PRIMARI

Il laboratorio del Prof. Riccardi dell'Università di Perugia ha da poco descritto una nuova isoforma proteica di GILZ chiamata L-GILZ, coinvolta nella regolazione della crescita e della differenziazione cellulare [23]. L-GILZ ha in comune con GILZ tutti i domini funzionali fino ad ora caratterizzati ma le due isoforme differiscono in quanto L-GILZ ha il dominio N-Terminale codificato da un esone 1 alternativo situato più a monte rispetto a quello del gene di *gilz*, e viene trascritto da un promotore alternativo indipendente.

Le due proteine non sono equivalenti e probabilmente non hanno una funzione ridondante, come dimostrato dal fatto che L-GILZ ha un differente pattern d'espressione se paragonato a quello di GILZ: ad esempio nei testicoli, in cui L-GILZ è l'unica isoforma rilevabile sia a livello proteico che di mRNA, si osserva un maggiore livello d'espressione di L-GILZ rispetto ad altri tessuti già nei primi giorni dopo la nascita [67] (Figura 11A e 11B).

L'espressione testicolare di L-GILZ è limitata alla linea germinale mentre è assente nelle cellule di supporto come cellule del Sertoli e cellule del Leydig (Figura 12).

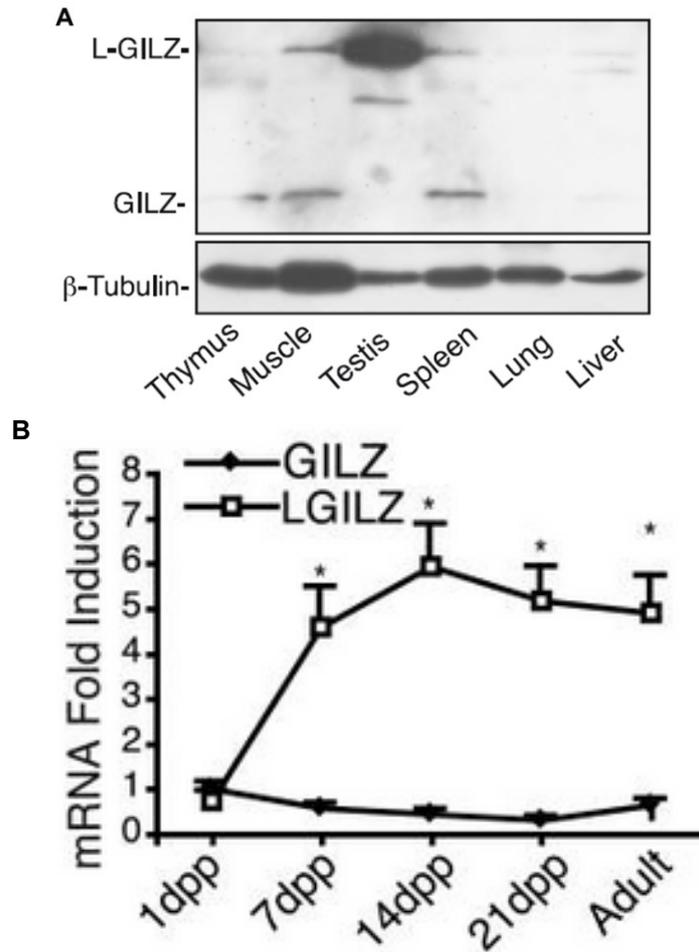


Figura 11. Espressione di L-GILZ nei testicoli adulti.

A: Espressione della proteina L-GILZ in alcuni tessuti murini, valutata mediante western blotting. B: Espressione dell'RNA messaggero di GILZ e L-GILZ a differenti età, valutata tramite qPCR [77].

Durante la prima ondata spermatogenetica, L-GILZ è espresso negli spermatogoni e nei spermatociti primari fino all'inizio della profase I (leptotene, zigotene), mentre non è rilevabile nelle fasi tardive della meiosi (spermatociti in pachitene e diplotene) né in cellule post-meiotiche (spermatidi e spermatozoi), come è stato evidenziato dalle analisi morfologiche (Figura 12). Ciò suggerisce che L-GILZ possa svolgere un ruolo importante nelle prime fasi della spermatogenesi.

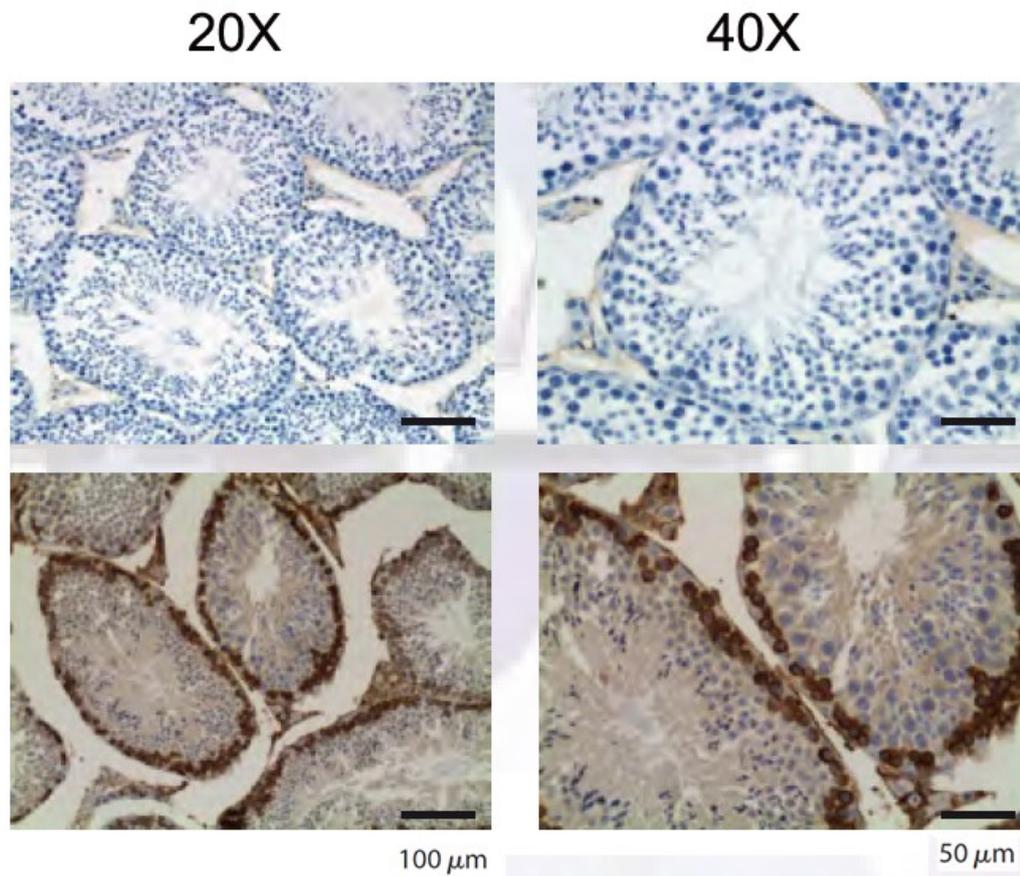


Figura 12. L-GILZ è altamente espresso negli spermatogoni e negli spermatociti primari.

L'analisi immunohistochimica dimostra come l'espressione di L-GILZ è limitata alla sola linea germinale. Pannello superiore: controllo; Pannelli inferiori: marcatura di L-GILZ (ingrandimento X20 e X40).

Le cellule staminali spermatogoniali (SSCs), come detto, fanno parte di una sottopopolazione di cellule germinali conosciute come spermatogoni indifferenziati [68-70], che comprendono gli spermatogoni *Asingle* i quali possono da una parte rigenerarsi attraverso successive divisioni mitotiche oppure dividersi in spermatogoni *Apaired* e *Aaligned*. Usando PLZF come marker per cellule indifferenziate e per gli spermatogoni che si stanno accingendo a dividersi [71] (*Asingle*, *Apaired*, *Aaligned*) abbiamo potuto rivelare la presenza dell'espressione della proteina L-GILZ sia in cellule PLZF

positive che in spermatogoni più differenziati PLZF negativi. (Figura 13).

Il pattern d'espressione di L-GILZ suggerisce che questa proteina potrebbe essere coinvolta nella spermatogenesi regolando la funzione di spermatogoni indifferenziati.

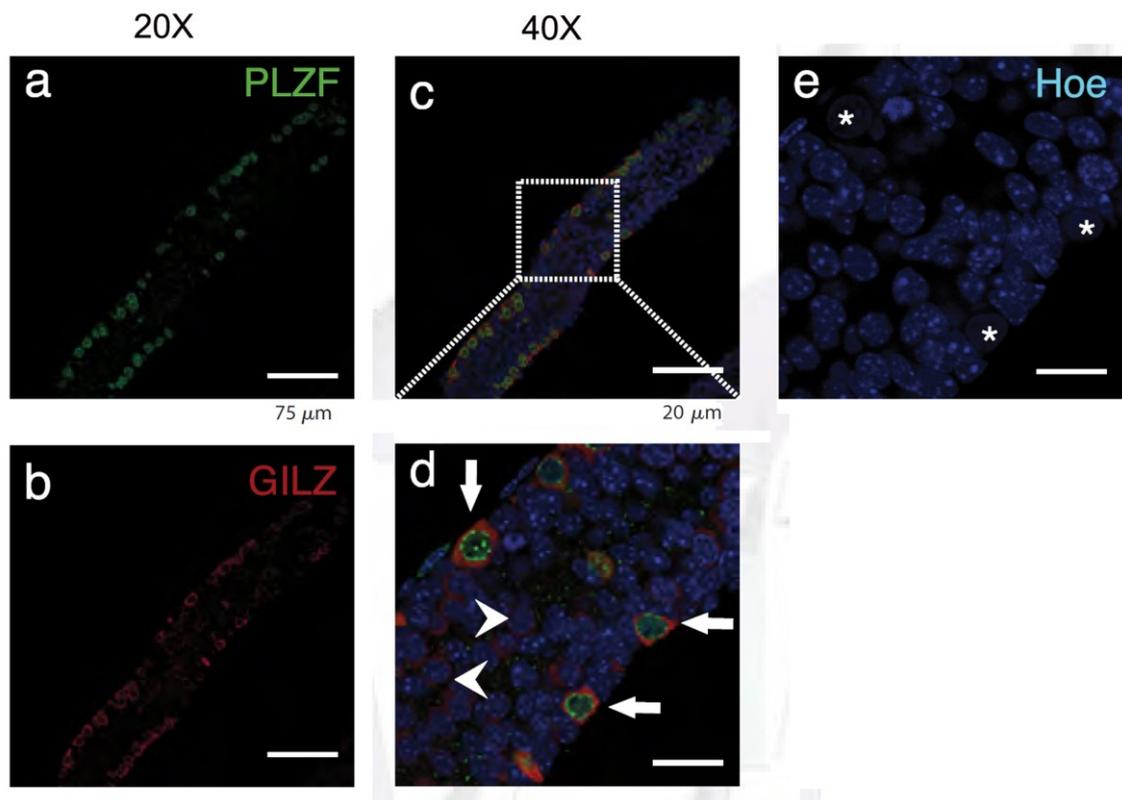


Figura 13. Co-espressione di L-GILZ e PLZF nei spermatogoni.

Whole mount Immunostaining in testicoli di topo, 9-dpp con anticorpi anti-GILZ (rosso) e anti-PLZF(verde). Le frecce bianche indicano coespressione delle due proteine in spermatogoni con grandi nuclei e con assenza di cromocentri (asterischi bianchi), come si evince da colorazione Hoechst 33342. Le punte di freccia indicano l'espressione di L-GILZ in cellule PLZF negative.

3.2 GENERAZIONE DEL TOPO *GILZ* KO

La generazione del topo KO per il gene *gilz* è stata effettuata con un approccio classico attraverso la metodologia LoxP-Cre (Figura 14A).

Il gene *gilz* è localizzato nel cromosoma X ed è composto da 6 esoni [12]. Un vettore target è stato costruito posizionando un sito LoxP a monte dell'esone 6, che è il più grande esone codificante comune a tutte le isoforme di *gilz*, e un secondo sito LoxP legato ad un marker di selezione SV40-neomicina (SV40-neo) a valle di questo esone.

La cassetta SV40-neo è stata ingegnerizzata in modo che fosse fiancheggiata da 2 siti FRT, per far sì che potesse essere successivamente deleta in vivo attraverso ricombinazione Flp. L'allele "Floxed" del gene *gilz* è stato generato attraverso ricombinazione omologa in cellule embrionali staminali (ES) di topi C57/BL6.

Due dei cloni di cellule ES che sono risultati positivi sono stati successivamente usati per produrre chimere. La correttezza della strategia di *targeting* e dell'effettiva ricombinazione è stata controllata attraverso analisi di *Southern Blotting* (Figura 14B).

Le due chimere hanno trasmesso la modificazione attraverso la linea germinale (maschi *gilz*^{flox/y} e femmine *gilz*^{flox/+}).

Topi KO "totali" per *gilz* sono stati generati attraverso l'incrocio di topi "floxed" per *gilz* con topi "general Cre-Deletor" [72] che esprimono il transgene CMV-CRE già a livello degli oociti e mediano quindi l'escissione mediata dalla ricombinasi CRE ai primi stadi dello sviluppo embrionale, generando quindi un topo difettivo per *gilz* in ogni organo e tessuto.

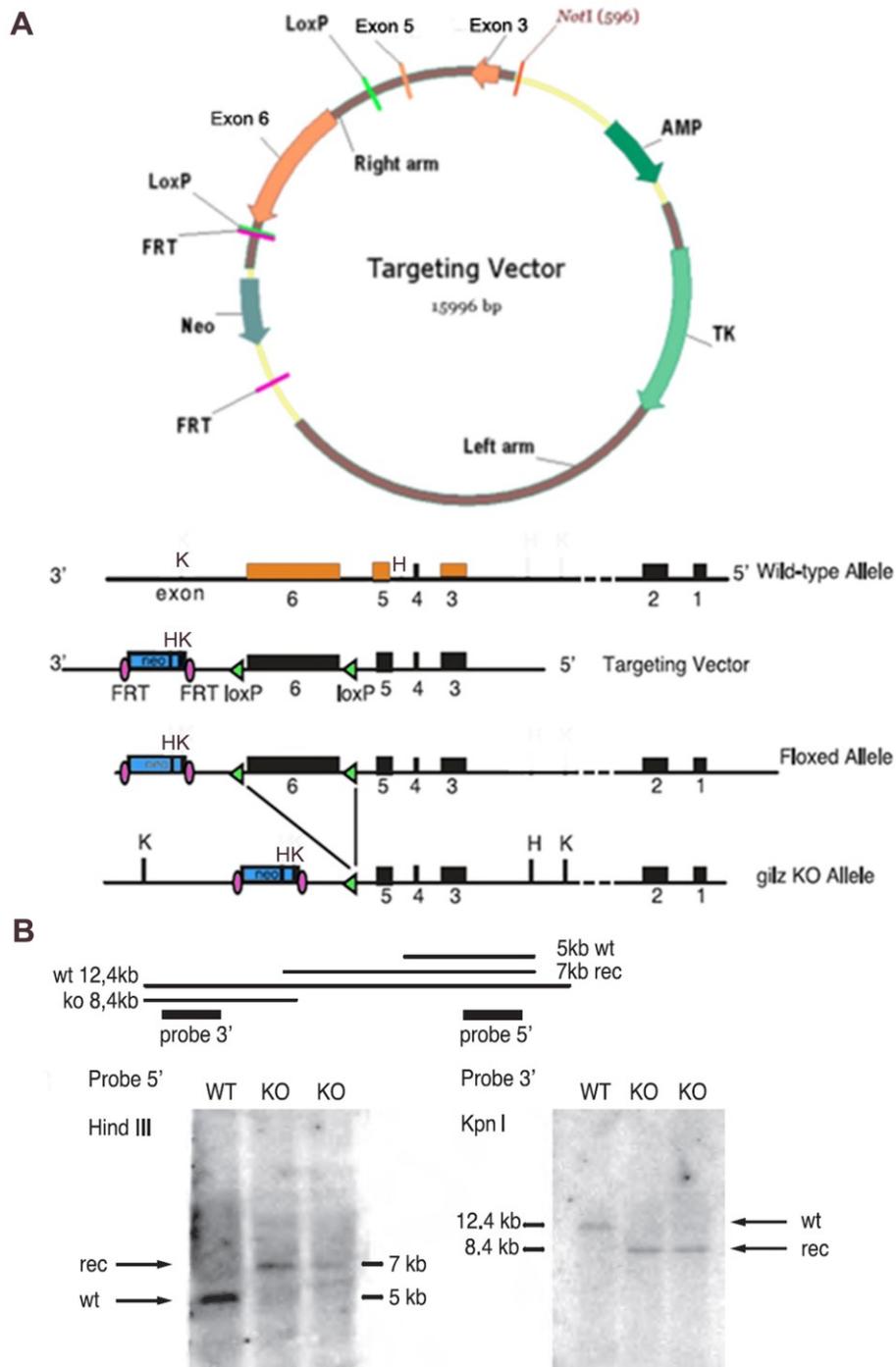


Figura 14. Knock-out del gene *gilz* murino.

A: Rappresentazione schematica dell'allele WT, del vettore Target, del locus di *gilz* Floxed e di quello ricombinante. K.KpnI; H, HindIII.

B: Analisi del genotipo di topi WT e KO attraverso analisi Southern Blot. La sonda 5' ibridizza con i frammenti generati da HindIII 5-kb (WT) e 7-kb (targeted). La sonda 3' ibridizza con i frammenti generati da KpnI 12.4-kb (WT) e 8.4-kb (targeted).

La delezione mediata da CRE dell'esone 6 fiancheggiato dai siti FloxP ha dato come risultato la terminazione prematura della trascrizione del gene *gilz*, con conseguente formazione della proteina GILZ tronca e, per questo, destabilizzata. (Figura 15).

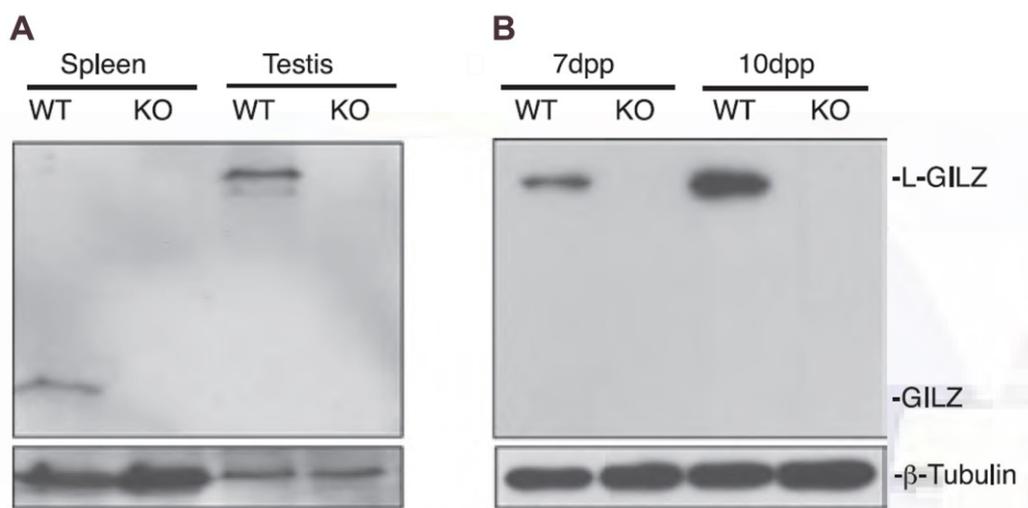


Figura 15. Espressione differenziale delle isoforme di *gilz* e controllo dell'avvenuto knock-out.

Espressione di GILZ e L-GILZ in milza e testicoli di topi WT e KO (A) e in topi di 7dpp e 10 dpp (B) valutata mediante western blotting.

I topi *gilz* KO sono nati apparentemente normali, con una frequenza Mendeliana e secondo una distribuzione sessuale attesa. A livello testicolare, però, è stato osservato un fenotipo drammatico con una riduzione della grandezza e del peso dei testicoli di circa il 70-80% rispetto ai topi WT, già nei primi giorni dopo la nascita (Figura 16). Inoltre, quando tre topi *gilz* KO sono stati messi ognuno in accoppiamento con 2 topi femmina, nessuna è rimasta gravida nell'arco di tempo di 6 mesi indicando che, sebbene i topi *gilz* KO siano vitali ed in salute (sia alla nascita che nell'età adulta), presentano un grave problema di sterilità.

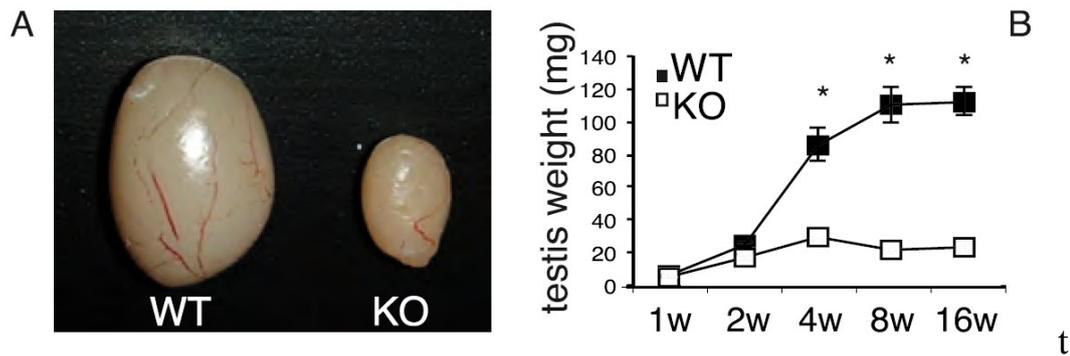


Figura 16. Differenza in peso e grandezza dei testicoli di topo *gilz*⁻KO e *gilz*⁻WT.

A: Testicoli di topi WT e KO di 12 settimane. B: Variazioni in peso dei testicoli a differenti età.

3.3 FENOTIPO ABERRANTE DEI TOPI *GILZ* KO.

Nei tubuli seminiferi dei topi *gilz* KO si osserva una perdita precoce della linea germinale (Figura 17 A-B e Figura 18): infatti, nei testicoli di topi adulti *gilz* KO i tubuli seminiferi hanno perso completamente la linea germinale e vi è possibile osservare solamente cellule del Sertoli positive per GATA-1 [73] (Figura 17 C-D). Dopo la nascita, l'analisi della conta delle cellule dei tubuli rivela che il numero delle cellule PLZF-positive decresce con il passare del tempo e sparisce completamente nei testicoli adulti dei topi *gilz* KO, suggerendo una progressiva perdita di tutta la linea germinale compresa la sottopopolazione delle SSC (Figura 17 E-G). Inoltre, l'analisi dell'espressione dei geni marker per la linea germinale [74, 75] conferma l'assenza dei trascritti di Oct-4, Nanos2, DAZL e Mvh nei testicoli dei topi KO adulti, mentre sono presenti SOX-9 e LHR, markers rispettivamente delle Sertoli e delle cellule del Leydig (Figura 19).

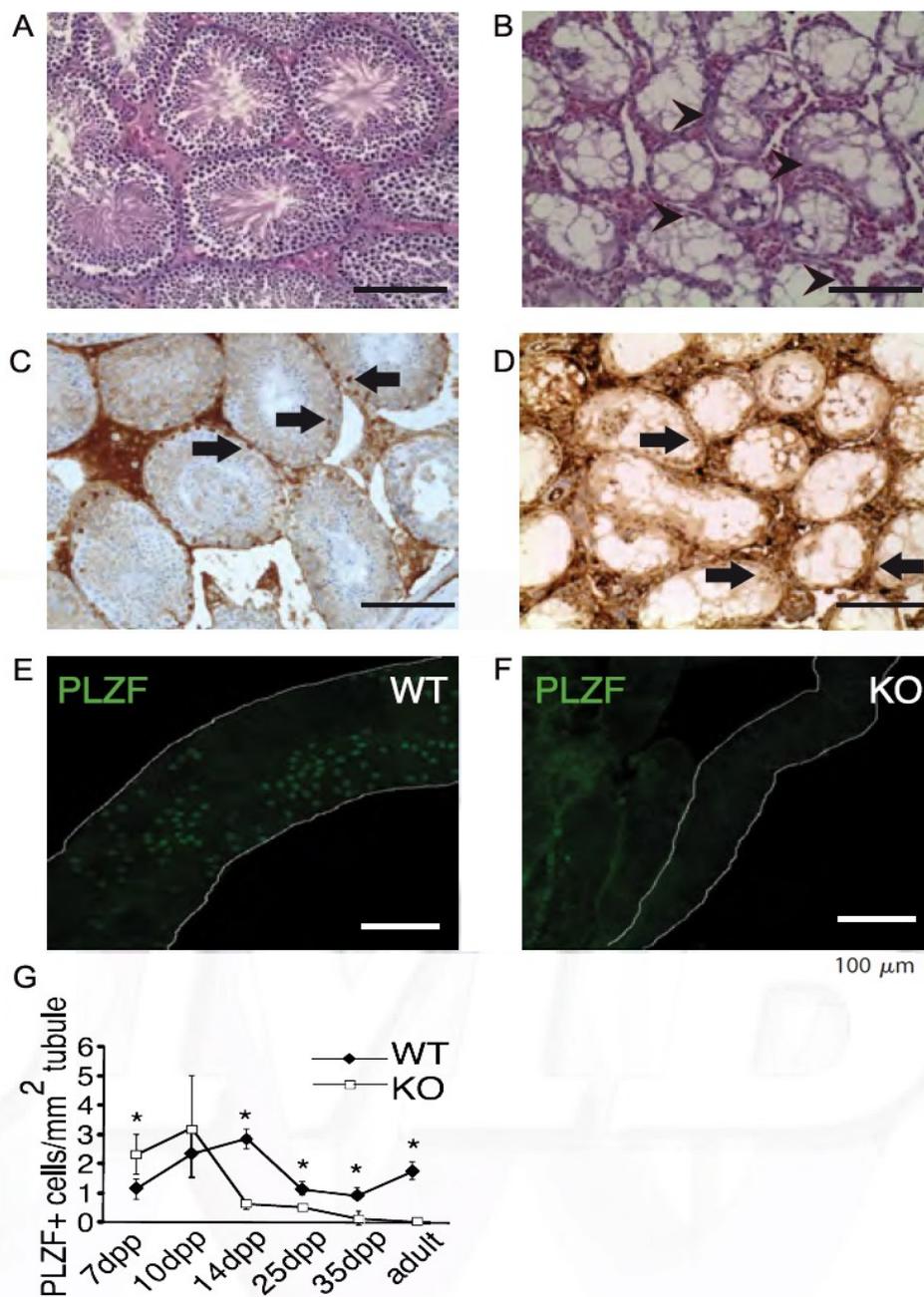
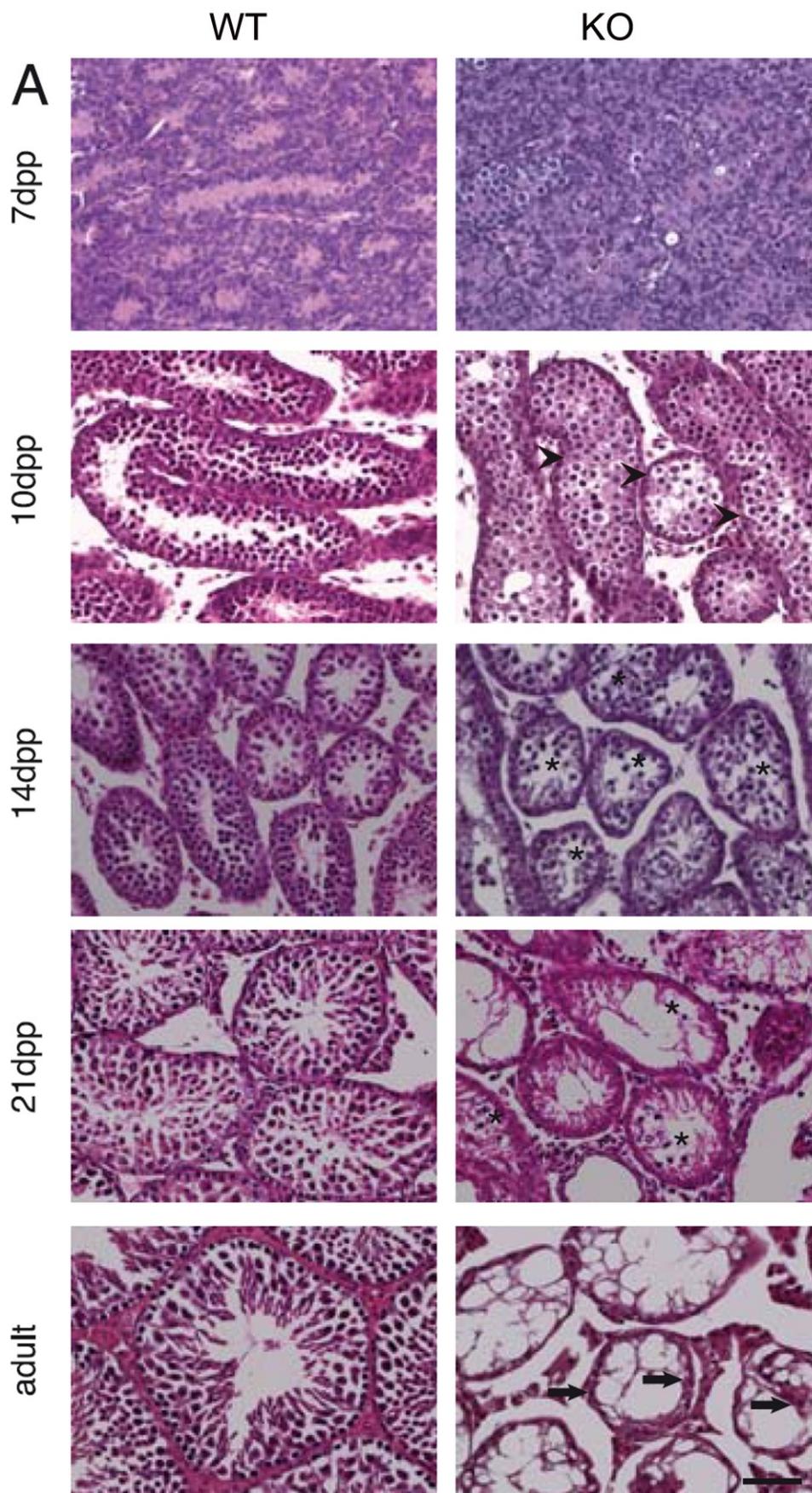


Figura 17. GILZ è necessario per una progressione normale della spermatogenesi.

A-B: Istologia di testicoli di topi adulti WT e KO. I tubuli dei topi *gilz* KO contengono solo cellule del Sertoli (freccia). C-D: Analisi immunoistochimica del marker GATA-1. I testicoli dei topi adulti *gilz* KO contengono solo cellule GATA-1 positive, indicate dalla punta di freccia. E-F: Perdita delle cellule PLZF-positive nei testicoli dei topi adulti *gilz* KO. G: Analisi quantitativa delle cellule esprimenti PLZF.



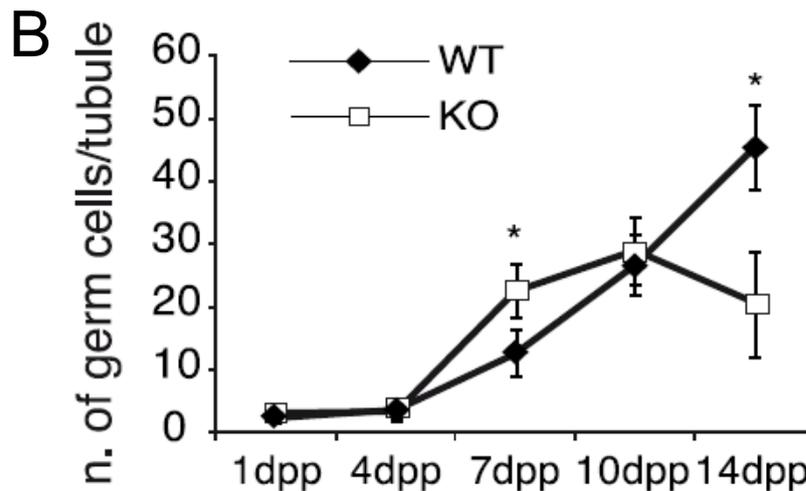


Figura 18. Caratterizzazione istologica dei testicoli di topo WT e GILZ-KO

A: Sezioni istologiche dei testicoli a vari stadi di differenziamento colorate con ematossilina/eosina. A 7-dpp i tubuli dei testicoli di topo KO contengono più cellule rispetto al WT. Cellule germinali anormali (punta di freccia) sono riscontrabili a partire dal 10 dpp. Tra il 14 e il 22 dpp la linea germinale è praticamente scomparsa nei tubuli del topo *gilz* KO e sono evidenti spermatoцитi anormali e cellule apoptotiche (asterisco). I tubuli *gilz* KO contengono solo cellule del Sertoli (freccie nere). B: Quantificazione del numero delle cellule germinali per tubulo seminifero.

Sono state condotte analisi istologiche in topi a diversi giorni dopo la nascita con lo scopo di definire quando, durante la spermatogenesi, potesse avvenire la perdita delle cellule nel testicolo dei topi *gilz* KO. Alla nascita i topi WT e *gilz* KO mostrano evidenti differenze; d'altra parte, un numero differente di cellule si è osservato a partire dal 7 giorno *post partum* (7-dpp). Il numero delle cellule germinali *gilz* KO in ogni tubulo era più alto e decresceva significativamente al 14 giorno quando gli spermatoцитi progredivano attraverso lo stadio meiotico di pachitene (Figura 18 A-B). Durante la prima fase meiotica si osservano nei tubuli dei topi *gilz* KO spermatoцитi atipici contenenti

cromatina condensata o rilassata con un forte incremento nella fosforilazione dell'istone H2AX (γ H2AX) che è normalmente associato con “*double strand breaks*” e instabilità genomica (Figura 19 B). In topi *gilz* KO al 14 dpp è evidente un'ondata massiva di apoptosi come è possibile notare in Figura 20 nel grafico del saggio TUNEL effettuato.

Inoltre, non sono stati individuati spermatidi nella fase post-meiotica di differenziamento in testicoli di topi *gilz* KO nel 21 dpp (Figura 18 A-B). E' da notare, però, che non è stato osservato un incremento nella morte cellulare nella fase di differenziazione pre-meiotica, prima del 10 giorno, come indicato da analisi TUNEL e dall'espressione dei geni correlati all'apoptosi (Figure 20 e-21).

Questi risultati dimostrano come la mancanza di L-GILZ porti alla completa perdita della linea germinale, comprese le SSCs, mostrando un fenotipo che assomiglia a quello che si manifesta nella sindrome umana *Sertoli cell-only* [76]. Pertanto, in base a questi risultati, si può concludere che L-GILZ è essenziale per il normale procedere della spermatogenesi.

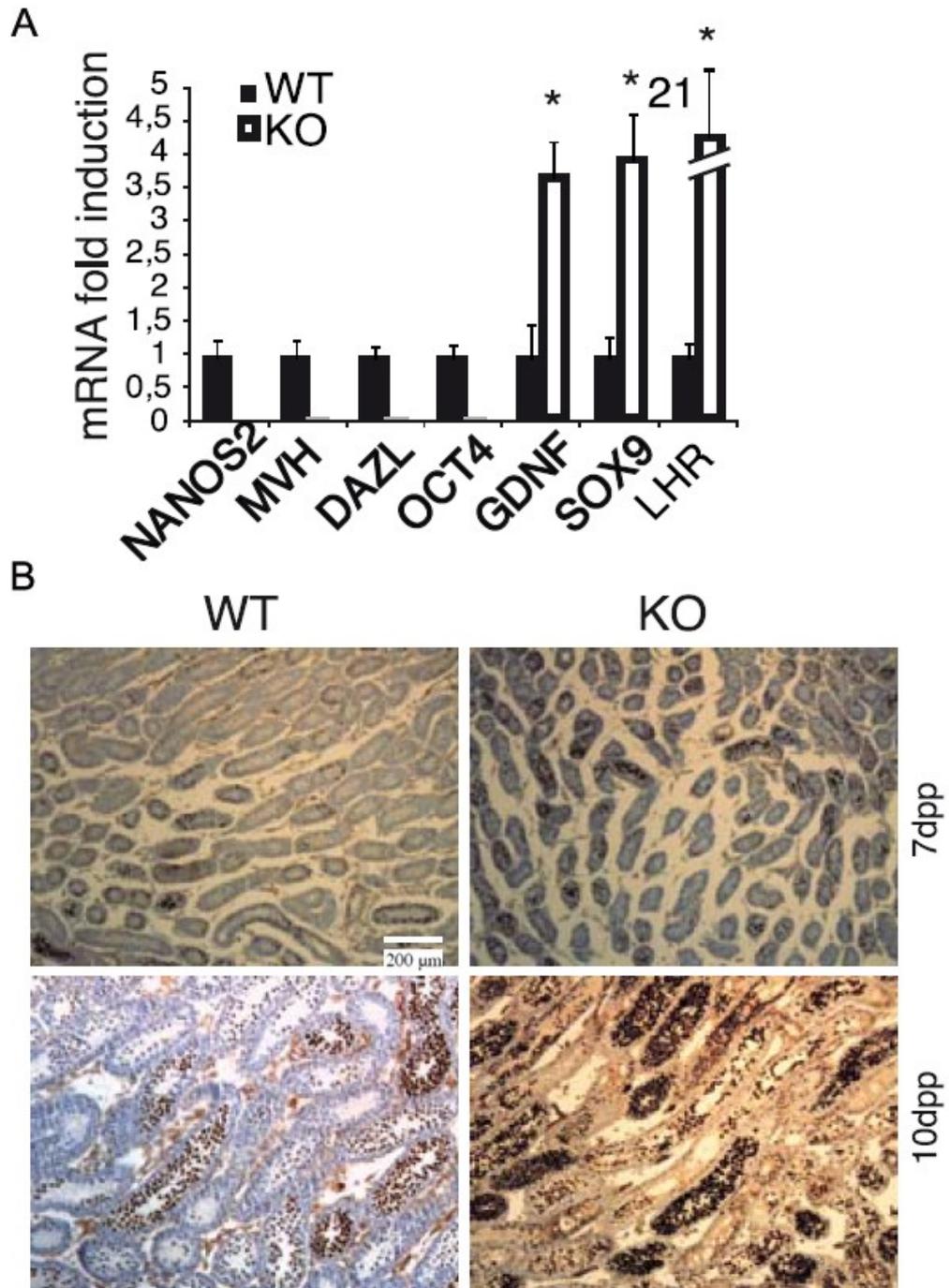


Figura 19. Espressione dei *marker* per le cellule dei testicoli.

A: Espressione relativa dei *markers* per la linea germinale e per le cellule di supporto in topi WT e *gilz* KO. B: Analisi immunohistochimica della fosforilazione dell'istone H2AX, usato come *marker* di instabilità genomica.

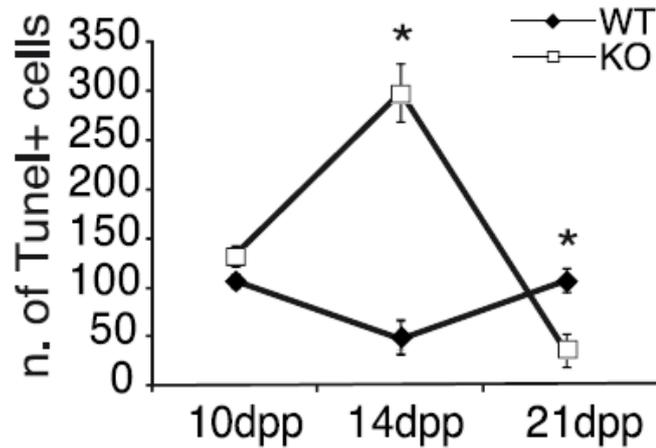


Figura 20. Apoptosi massiva negli spermatociti di topi *gilz* KO.

Valutazione mediante saggio TUNEL del numero di cellule apoptizzanti per ogni immagine effettuata.

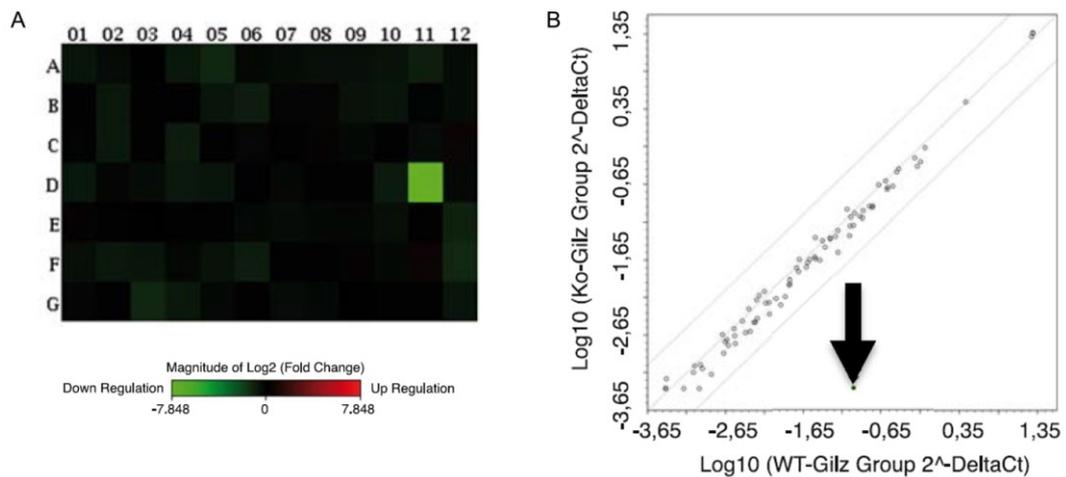


Figura 21. Gene Expression Profiling.

A: *Heat map*. Different pattern d'espressione genico in topi di 10 dpp: i geni up-regolati sono mostrati in rosso e quelli down-regolati in verde. B: *Scatter plot* che mostra la deviazione dei dati provenienti dai topi *gilz* KO rispetto ai WT. Non ci sono significative differenze nei geni apoptotici tra topi WT e *gilz* KO. L'unico gene fortemente down regolato è TSC22d3 (*alias* GILZ) (freccia nera).

3.4 ANALISI DEL DIFETTO SPERMATOGENETICO

Gli ormoni LH (*Pituitary gland-derived gonadotropins luteinic hormone*) e FSH (*Follicle-stimulating hormone*) controllano l'attività fisiologica delle cellule di supporto del Sertoli e del *Leydig*, le quali a loro volta sono essenziali nel controllo della regolazione della funzione delle cellule della linea germinale. La spermatogenesi, inoltre, è regolata dagli ormoni steroidei prodotti dalle cellule del *Leydig* [66].

Per escludere la possibilità che il difetto non sia dipeso esclusivamente dalla linea germinale ma che possa comprendere anche problemi riguardanti il corretto funzionamento delle cellule della nicchia e degli ormoni che la regolano, prima di tutto siamo andati ad analizzare i livelli degli ormoni correlati alla spermatogenesi [66]. I livelli dell'LH e dell'FSH nella ghiandola dell'ipofisi ed i livelli del testosterone sierico si sono rivelati pressoché identici nel topo *gilz* KO ed in quello WT. Inoltre, nessuna differenza è stata riscontrata nei livelli d'espressione dei recettori per gli estrogeni, per gli androgeni, nel recettore per l'ormone LH e FSH (Figura 22).

Per provare che il difetto nella spermatogenesi non fosse dovuto ad una disfunzione nelle cellule staminali della nicchia o ad una anomalia nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, abbiamo incrociato topi maschi *GILZ*^{flox/y} con topi che portavano il transgene *Mvh-Cre*, allo scopo di generare un topo *gilz* KO specifico per la linea germinale (*gilz* cKO). Come nel topo in cui il gene *gilz* è stato deletato in tutto l'organismo, i tubuli del topo adulto *gilz* cKO mostravano una completa eradicazione della linea germinale ed erano assenti pertanto i marcatori per le cellule germinali staminali (Figura 23 A-B).

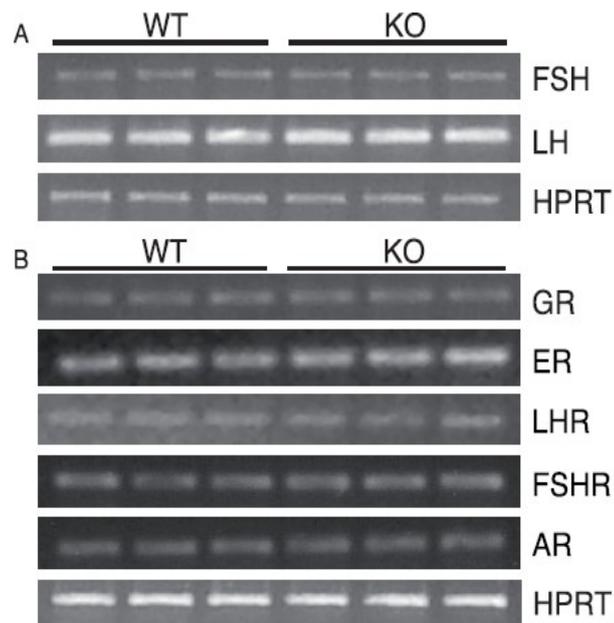


Figura 22. Analisi del livello dell'espressione degli ormoni e dei loro recettori nel topo WT *gilz* KO.

A: Analisi dell'espressione dell'mRNA del FSH e dell'LH nell'ipofisi in topi adulti. B: Analisi dei livelli di mRNA dei recettori presenti nei testicoli di topi adulti tramite RT-PCR.

L'ultima prova che dimostra come il difetto spermatogenetico nei topi *gilz* KO sia intrinseco alla linea germinale è stata ottenuta dal trapianto di cellule WT e KO della linea germinale, in testicoli di topi KO. Al contrario delle cellule KO, quelle WT sono state in grado di ricostituire una normale spermatogenesi nei testicoli recipienti (Figura 23 C-F), indicando che i testicoli dei topi *gilz* KO sono capaci di supportare una normale spermatogenesi in presenza di cellule WT della linea germinale. Questi risultati dimostrano come il difetto di spermatogenesi sia causato dall'assenza di L-GILZ nella linea germinale e non dipenda da disfunzioni a livello della nicchia oppure dal livello degli ormoni che la regolano.

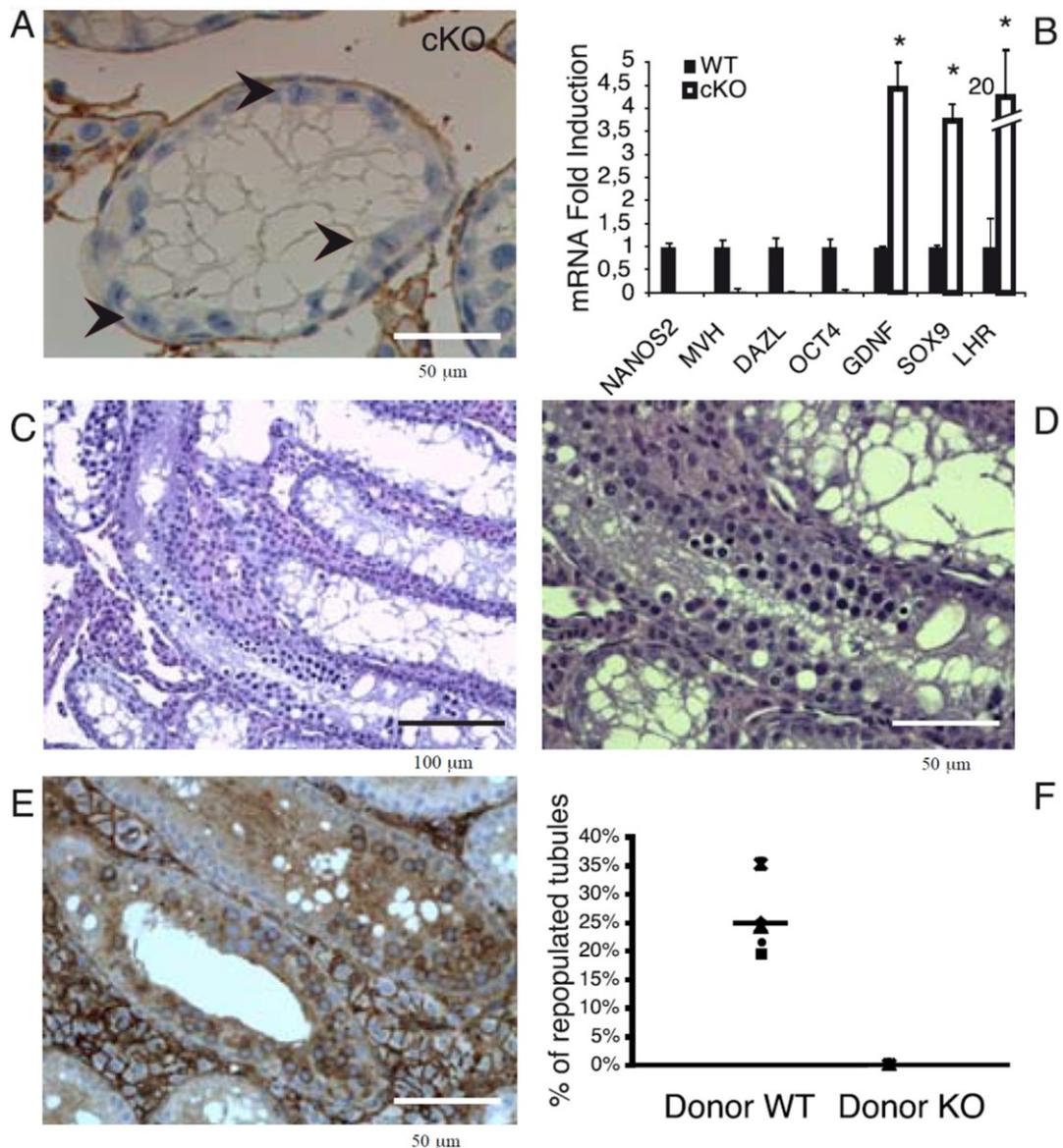


Figura 23. Il *knock-out* di GILZ nella linea germinale è sufficiente per compromettere la spermatogenesi.

A: L'analisi istologica mostra come testicoli di tre mesi di topi *gilz* cKO contengano solo cellule del Sertoli (punta di freccia). B: Perdita dei marcatori specifici per la linea germinale; dati valutati attraverso un saggio qPCR. (C-D) Sezioni di testicoli recipienti *gilz* KO dopo trapianto con cellule germinali colorate con ematossilina eosina. Si osserva la ripopolazione dei tubuli seminiferi nei testicoli recipienti dei topi *gilz* KO. E: Analisi IHC di cellule germinali donatrici positive per la proteina L-GILZ. F: Percentuale di tubuli ripopolati nei testicoli *gilz* KO trapiantati.

3.5 STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE E DEL DIFFERENZIAMENTO NEGLI SPERMATOGONI DI TOPI *GILZ* KO.

Per far luce sul difetto molecolare che porta al fallimento della spermatogenesi nei topi *gilz* KO, abbiamo effettuato un'analisi di *Gene Expression Profiling* nella quale siamo andati a valutare l'espressione differenziale di geni partendo dall'mRNA di testicoli di topi a 7-dpp, giorno in cui le differenze fenotipiche diventano evidenti. Analisi di *microarray* e qPCR hanno messo in evidenza la deregolazione dell'espressione solamente di pochi geni (Figura 24 A).

Nonostante ciò, importanti ed evidenti differenze tra i testicoli *gilz* KO e WT sono state rivelate attraverso analisi GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) come per esempio la deregolazione dei geni correlati al ciclo cellulare, suggerendo che gli spermatogoni *gilz* KO proliferano più velocemente (Figura 24 B). Inoltre, i testicoli dei topi *gilz* KO a 7 e 10-dpp hanno un numero maggiore di cellule germinali positivamente marcate con TRA98, riconosciuto come marcatore specifico delle cellule staminali, [77] (Figura 24, C-E) ed i tubuli contengono più cellule positive per la ciclina D1, *marker* per spermatogoni mitoticamente attivi [78] (Figura 24, F-H). E' altresì evidente una regolazione negativa di GFR α -1/Ret, componenti del *glial cell-derived neutrophilic factor receptor*, il quale è stato dimostrato essere essenziale per il *self-renewal* delle SSC [79, 80] (Figura 24 A).

Inoltre, è possibile osservare un incremento nell'espressione dei fattori che regolano il differenziamento dei spermatogoni come *Sohlh-2*, *scp1*, *scp2*, *scp3* e *xmr* [81, 82] nei testicoli dei topi *gilz* KO e dei

trascritti di megea-1, -2, -3, -5 e -6, i quali sono specificatamente espressi negli stadi tardivi della differenziazione (Figura 24 A). Questi dati sottolineano come l'assenza di L-GILZ porti ad una aumentata proliferazione e differenziazione di spermatogoni indifferenziati, suggerendo così che L-GILZ possa regolare la funzione dei spermatogoni.

Per investigare il ruolo di L-GILZ nel controllo della proliferazione degli spermatogoni, abbiamo eseguito un'analisi di incorporazione di BrdU (Bromodeossiuridina) in spermatogoni di 7-dpp. Il grado di incorporazione di BrdU è stato valutato in spermatogoni che esprimevano $\alpha 6$ -integrina, un *marker* per la linea germinale, i quali a loro volta potevano essere positivi o negativi per l'espressione di c-KIT, un *marker* dei spermatogoni differenzianti [83]. Spermatogoni indifferenziati $\alpha 6$ -integrina positivi ($\alpha 6$ -int+) e c-Kit negativi (c-Kit-) mostrano un livello doppio nell'incorporazione per il BrdU in quelli di testicoli *gilz* KO rispetto a quelli WT (Figura 25 A-C), indicando come gli spermatogoni indifferenziati *gilz* KO proliferino più velocemente. Inoltre, con l'aumento della frequenza della popolazione $\alpha 6$ -int+/c-Kit+, si assiste ad un' accumulazione di spermatogoni differenzianti *gilz* KO (Figura 25 D). Questi dati indicano che il *subset* degli spermatogoni indifferenziati $\alpha 6$ int+/c-Kit- ha un maggiore tasso proliferativo.

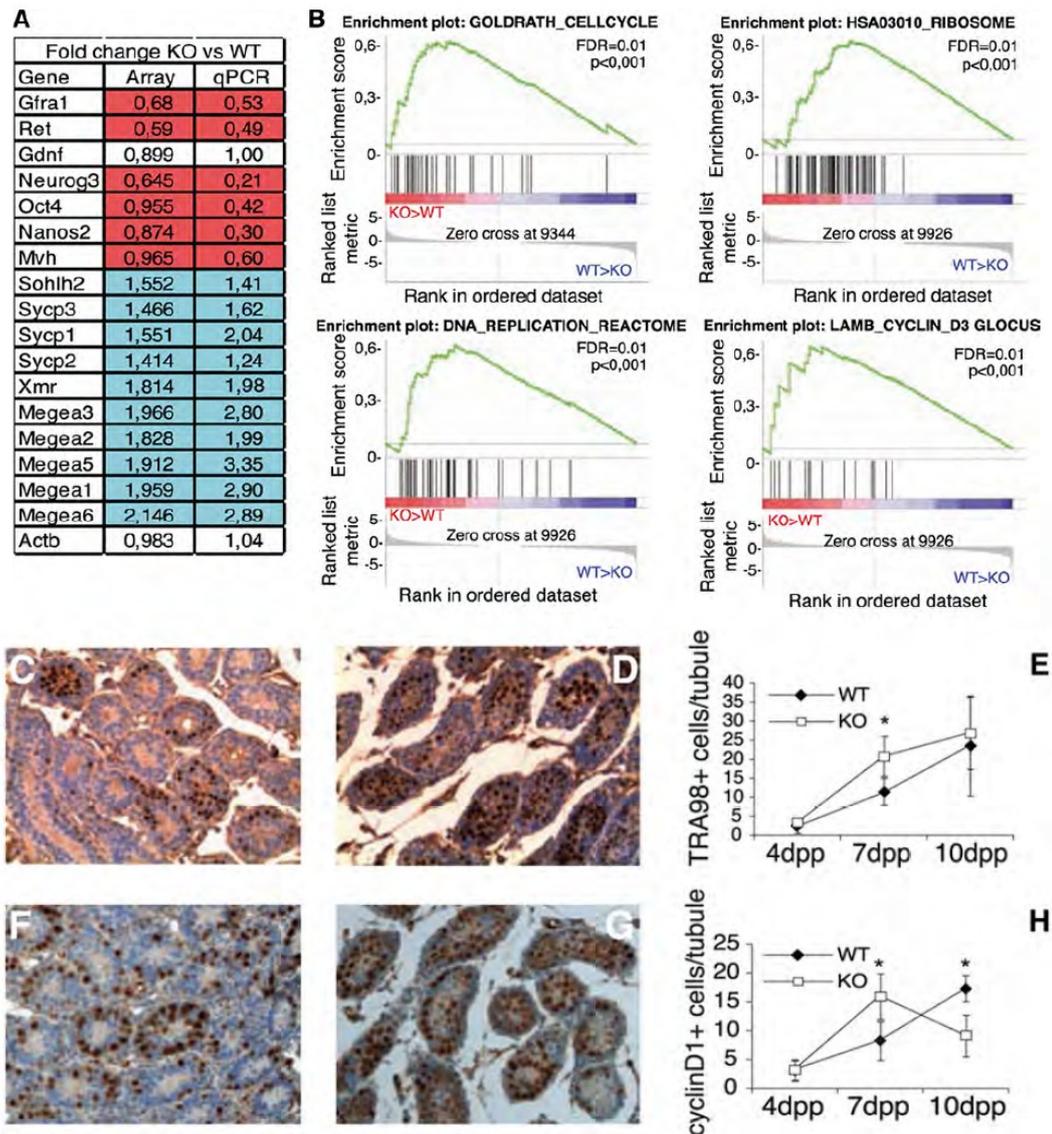


Figura 24. Aumentata proliferazione e differenziamento in spermatogoni di topi *gilz* KO

A: Analisi di *microarray* in cui viene evidenziata l'espressione genica in testicoli a 7 dpp di topo WT e *gilz* KO. I geni sono stati scelti in base ai risultati ottenuti con l'analisi di *microarray* e validati attraverso qPCR; I risultati sono visualizzati nella tabella come variazioni relative tra GILZ-KO versus WT. B: L'analisi di *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) ha identificato un incremento dei geni correlati alla proliferazione in topi *gilz* KO. C-H: Analisi immunoistochimica dell'espressione di TRA98 e ciclina D1 in sezioni di testicoli postnatali a vari stadi di sviluppo. Il numero di cellule marcate per TRA98 (C-E) e per ciclina D1 (F-H) è significativamente più alto in testicoli di topi *gilz* KO a 7-dpp, se confrontato con topi WT.

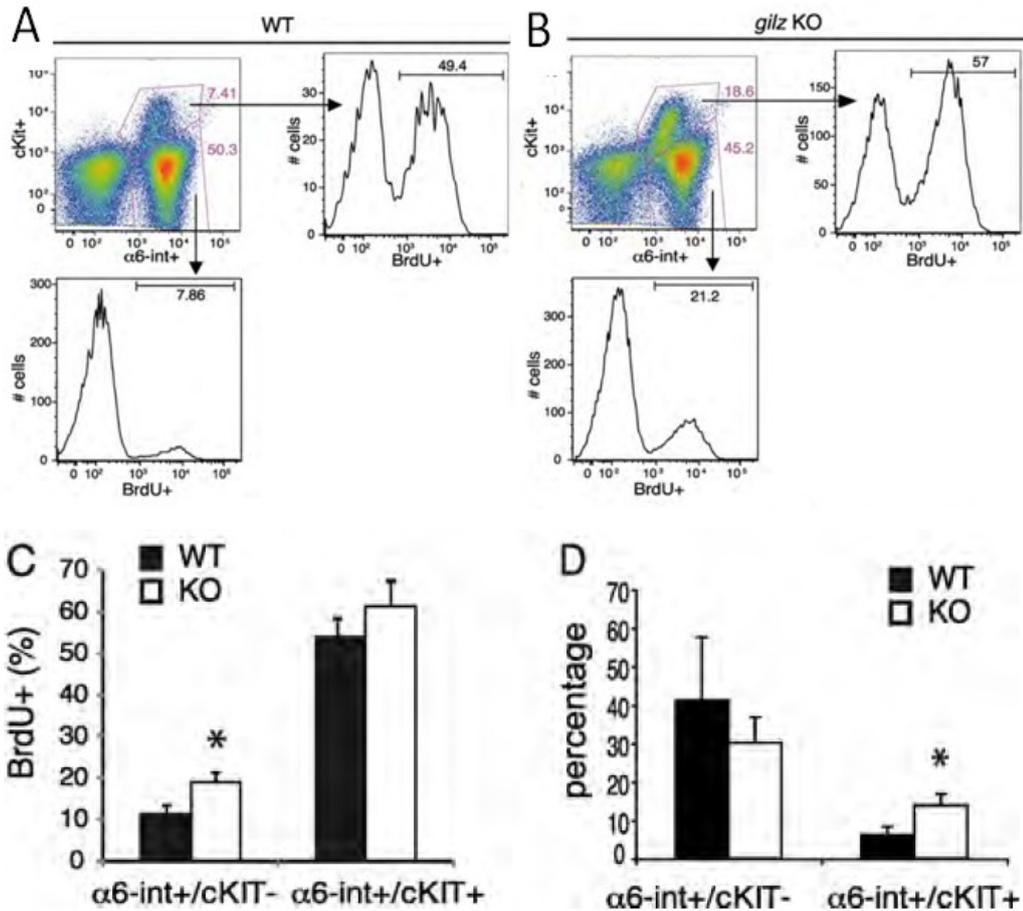


Figura 25. L-GILZ regola la proliferazione degli spermatogoni e il loro differenziamento.

A e B. Espressione in spermatogoni WT e *gilz* KO dei marcatori $\alpha 6\text{-int}$ e c-Kit. Le frequenze delle sottopopolazioni di spermatogoni $\alpha 6\text{-int}^+/\text{c-Kit}^+$ e $\alpha 6\text{-int}^+/\text{c-Kit}^-$ sono indicate nei *dot plots* e nel grafico in D. Gli istogrammi rappresentano i livelli di incorporazione del BrdU dei rispettivi *dot plots*. A-C: Proliferazione di differenti popolazioni di spermatogoni come da incorporazione di BrdU *in vitro*.

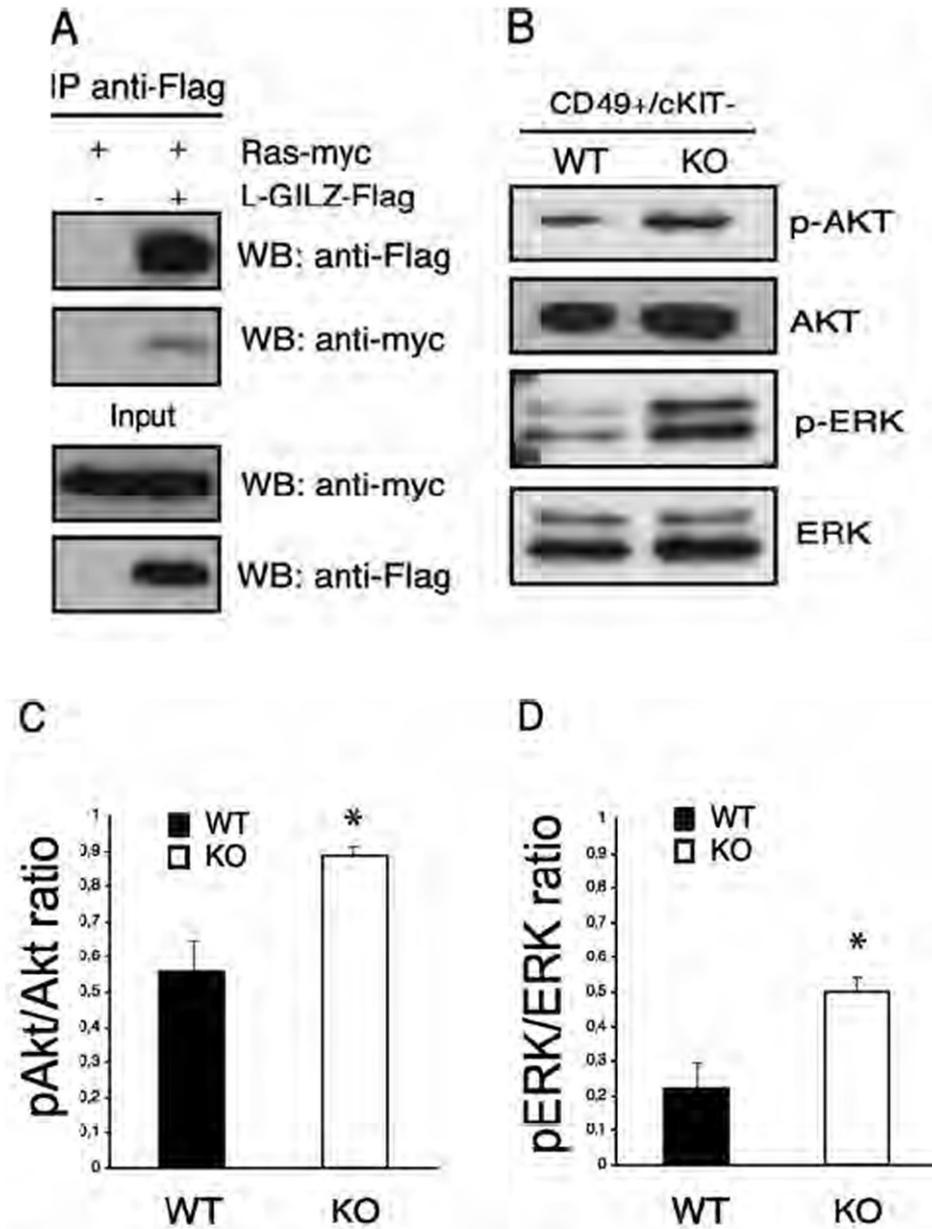
3.6 CONTROLLO DEL *PATHWAY* DI RAS DA PARTE DI L-GILZ

E' ormai noto che la via di segnalazione di Ras contribuisce in modo significativo nel controllo della proliferazione spermatogoniale. [84-86] Inoltre, è stato precedentemente dimostrato che GILZ può legare Ras e inibire la proliferazione cellulare Ras-dipendente.[17]. Siamo andati ad analizzare, quindi, mediante esperimenti di trasfezione transiente e coimmunoprecipitazione, se L-GILZ avesse la stessa capacità della sua isoforma breve di interagire con Ras, ed è stato osservato che L-GILZ è capace di legare Ras (Figura 26 A).

Per valutare se l'assenza di L-GILZ possa portare all'attivazione della cascata intracellulare di Ras in spermatogoni indifferenziati, abbiamo confrontato i livelli delle forme attive di ERK e Akt in spermatogoni *gilz* KO $\alpha6$ -int⁺/c-Kit⁻, analizzando il loro grado di fosforilazione. Abbiamo così osservato un maggior grado di fosforilazione sia di ERK che di Akt: ciò suggerisce pertanto che L-GILZ regoli la via di segnalazione di Ras in spermatogoni indifferenziati (Figura 26 B-D).

L'inibizione farmacologica di Akt con wortmannina è stata capace di revertire l'incorporazione di BrdU in spermatogoni *gilz* KO $\alpha6$ -int⁺/c-Kit⁻ confermando l'ipotesi che l'attività di Akt a valle di Ras possa contribuire al fenotipo iperproliferativo riscontrato in spermatogoni *gilz* KO (Figura 26 E). In modo consistente con l'aumentata fosforilazione di ERK e Akt e della proliferazione cellulare, abbiamo inoltre osservato un aumentato livello dell'espressione della proteina ciclina D1 in spermatogoni *gilz* KO $\alpha6$ -int⁺/c-Kit⁻ (Figura 26 F-G). Questi risultati conducono alla conclusione che L-GILZ controlli la

via di segnalazione di Ras e che contribuisca all'inibizione della proliferazione degli spermatogoni indifferenziati.



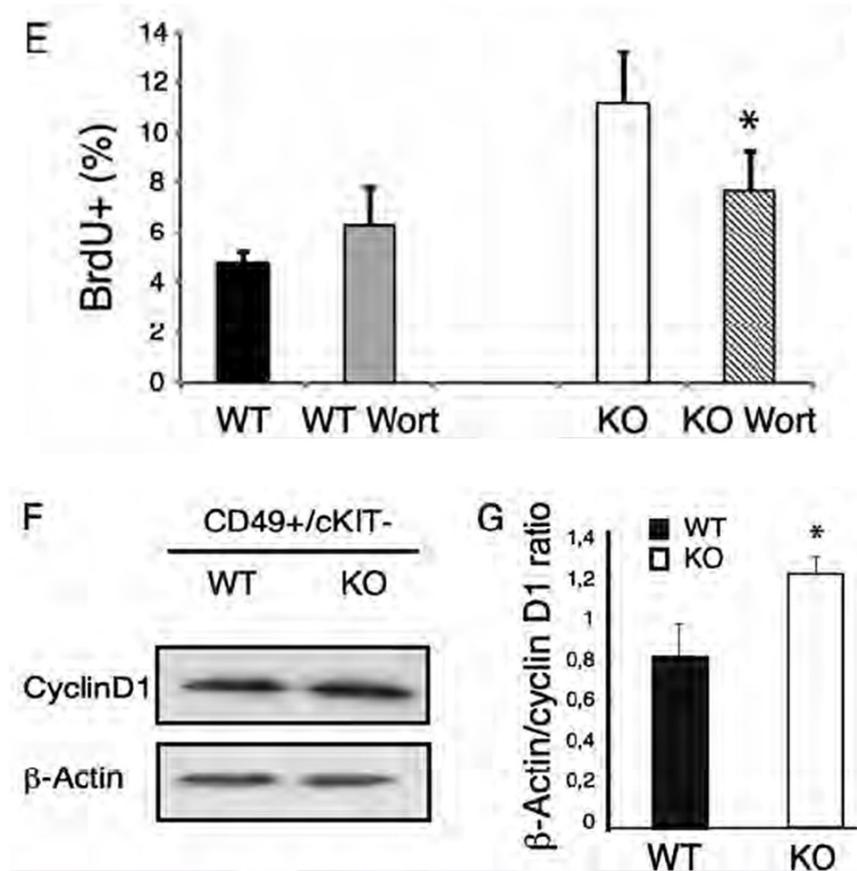


Figura 26. L-GILZ lega Ras e regola la proliferazione degli spermatogoni indifferenziati in modo Ras-dipendente.

A: L-GILZ interagisce con Ras; esperimento di co-immunoprecipitazione tra L-GILZ-Flag e Ras-myc. B-D: Livelli di fosforilazione di ERK e Akt come rivelato da *Western Blotting* (WB). C-D: Analisi densitometrica dei livelli di fosforilazione di ERK e Akt, rispetto ai livelli delle proteine totali. E: Trattamento *in vitro* con wortmannina che inibisce l'iperattività della via di Akt nei spermatogoni *gilz* KO $\alpha 6$ -int+/c-Kit-. F: Negli spermatogoni a 7-dpp di topi *gilz* KO l'espressione della proteina ciclina D1 è aumentata nella popolazione $\alpha 6$ -int+/c-Kit-.

4. DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo dimostrato come la proteina L-GILZ è altamente espressa nella linea germinale ed è fondamentale per il suo mantenimento. In particolare, la delezione del gene *gilz* in ogni tessuto del topo *gilz KO*, analogamente al *knock out* limitato alla linea germinale nel topo *gilz cKO*, porta ad un fenotipo drammatico caratterizzato dalla completa perdita della linea germinale associato ad una proliferazione alterata degli spermatogoni indifferenziati, un aberrante differenziamento e ad un'apoptosi massiva durante la prima fase della meiosi.

Studi precedenti avevano mostrato come l'isoforma più corta, GILZ, inibisce l'attivazione e la proliferazione delle cellule T del sistema immunitario. [11, 16, 17, 87-89]. E' stato inoltre dimostrato che GILZ controlla la proliferazione e il differenziamento in altri tipi cellulari come adipociti, osteoblasti e mioblasti [21-23]. La conservazione di molti dei domini funzionali di GILZ nell'isoforma L-GILZ suggerisce anche che questa possa agire come soppressore della crescita cellulare e del differenziamento.

In questo lavoro abbiamo dimostrato che L-GILZ, ma non GILZ, è altamente espresso in spermatogoni indifferenziati e negli spermatociti primari. La mancanza di L-GILZ porta ad una completa perdita della linea germinale entro poche settimane dalla nascita. Nessuna cellula germinale dopo lo stadio di pachitene è stata osservata in testicoli *gilz KO*: ciò è dovuto alla massiva apoptosi che avviene durante la prima fase meiotica. Non è stato però osservato nessun incremento di apoptosi nelle cellule *gilz KO* prima dell'inizio della meiosi, indicando che l'assenza di L-GILZ comporta la morte cellulare delle cellule

prima che queste entrino nella fase di differenziamento. Tuttavia, non abbiamo osservato nessun accumulo di spermatogoni pre-meiotici nei testicoli *gilz* KO ma al contrario questi topi mostravano tubuli completamente vuoti, ad eccezione delle cellule del Sertoli.

La proteina L-GILZ è espressa non solo negli spermatociti primari ma anche nei spermatogoni, inclusi quelli indifferenziati positivi per PLZF. Il numero di cellule PLZF-positivo vanno progressivamente diminuendo durante il procedere dello sviluppo per poi scomparire completamente nei testicoli adulti dei topi *gilz* KO, suggerendo quindi che L-GILZ giochi un ruolo importante negli spermatogoni indifferenziati, incluse le cellule staminali spermatogoniali SSCs.

Abbiamo dimostrato che L-GILZ agisce come un inibitore della proliferazione degli spermatogoni indifferenziati: infatti, la mancanza di L-GILZ comporta una proliferazione aumentata della sottopopolazione degli spermatogoni indifferenziati $\alpha 6$ -int⁺/c-Kit⁻ e di un concomitante aumento della frequenza negli spermatogoni differenzianti $\alpha 6$ -int⁺/c-Kit⁺.

E' noto, in base ai risultati ottenuti in vari esperimenti su modelli animali, che la via di Ras è importante nel controllo della proliferazione cellulare e nel differenziamento [90-92]. Gli effettori a valle della via di segnalazione di Ras, MAPK/ERK e PI3K/AKT, giocano un ruolo importante nel controllo della sopravvivenza cellulare, nella proliferazione e nel differenziamento anche degli spermatogoni, come dimostrato in molti modelli sperimentali [80, 85, 86, 93]. L'interazione tra GILZ e Ras è stata inoltre caratterizzata in altri tipi cellulari ed è stato dimostrato che GILZ è in grado di inibire la via di segnalazione di Ras e la proliferazione cellulare [17]. In questo lavoro è stato dimostrato che L-GILZ lega Ras e che gli

spermatogoni *gilz* KO hanno una via di Ras iperattivata: infatti questi spermatogoni mostrano un livello aumentato della fosforilazione di ERK e Akt, un conseguente aumento dell'espressione di ciclina D1 e un aumento della proliferazione. Questi risultati sono in linea con molti studi volti a mettere in evidenza come la via di segnalazione di Ras sia molto importante nella proliferazione e differenziazione degli spermatogoni indifferenziati [80, 85, 86, 94-96].

In questo lavoro viene quindi identificato un nuovo link tra L-GILZ e Ras, punto chiave nella regolazione degli spermatogoni indifferenziati, della loro proliferazione, differenziamento e sopravvivenza.

In conclusione, questi studi dimostrano come la mancanza di L-GILZ causi la completa eradicazione della linea germinale e conduca a sterilità nel modello murino maschio, con un fenotipo molto simile alle caratteristiche patologiche riscontrate nella sindrome da *Sertoly-only* nell'uomo.

Il fenotipo aberrante nei testicoli *gilz* KO è il risultato di tre eventi patologici principali: (i) l'accelerazione di proliferazione di spermatogoni indifferenziati associata con l'iperattivazione della via di segnalazione di Ras; (ii), l'aberrante differenziamento spermatogoniale; (iii) l'apoptosi massiva durante la fase meiotica. Non possiamo escludere che questi processi siano interconnessi, ma sono necessari ulteriori studi per analizzare in modo più ampio ulteriori ruoli di L-GILZ nella spermatogenesi.

Queste scoperte comportano un ulteriore passo in avanti nella comprensione degli eventi che avvengono durante la spermatogenesi e identificano la proteina L-GILZ come un eventuale *target* importante

per nuove terapie volte al trattamento di patologie cui consegue la sterilità maschile.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Rhen, T., and Cidlowski, J.A. *Antiinflammatory action of glucocorticoids-
-new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. 353(16): p. 1711-23.
2. McEwan, I.J., Wright, A.P., Gustafsson, J.A. *Mechanism of gene
expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein
interactions*. Bioessays, 1997. 19(2): p. 153-60.
3. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Haegeman, G. *Mechanisms of anti-
inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids:
negative interference of activated glucocorticoid receptor with
transcription factors*. J Neuroimmunol, 2000. 109:16-22.
4. Sonnenberg, A., McCarthy, O.J., Jacobsen, S. *Geographic variation in
inflammatory bowel disease within the United States*. Gastroenterology,
1991. 100:143-149.
5. Simpson, E.R., and Waterman, M.R. *Regulation of the synthesis of
steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH*. Annu Rev
Physiol, 1988. 50: p. 427-40.
6. Baus, E., Andris, F., Dubois, P.M., Urbain, J., Leo, O. *Dexamethasone
inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T
lymphocytes*. J Immunol, 1996, 156:4555-4561.
7. Green, D.R. *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. Cell, 1998. 94:695-
698.
8. Hengartner, M.O. *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. 407:770-
776.
9. Rhen, T., and Cidlowski, J.A. *Antiinflammatory action of glucocorticoids-
-new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. 353:1711-1723.
10. Bruscoli, S., Di Virgilio, R., Donato, V., Velardi, E., Baldoni, M.,
Marchetti, C., Migliorati, G., Riccardi, C. *Genomic and non-genomic
effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis*. Eur J
Pharmacol, 2006. 529(1-3): p. 63-70.
11. D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A.,
Cannarile, L., Migliorati, G., Riccardi, C. *A new dexamethasone-induced*

- gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. Immunity, 1997. 7(6): p. 803-12.*
12. Cannarile, L., Zollo, O., D'Adamio, F., Ayroldi, E., Marchetti, C., Tabilio A., Bruscoli, S., Riccardi C. *Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. Cell Death Differ, 2001. 8(2): p. 201-3.*
 13. Ash, D.M., Hackney, J.F., Jean-Francois, M., Burton, N.C., Dobens, L.L. *A dominant negative allele of the Drosophila leucine zipper protein Bunched blocks bunched function during tissue patterning. Mech Dev, 2007. 124(7-8): p. 559-69.*
 14. Mittelstadt, P.R., and Ashwell, J.D. *Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. J Biol Chem, 2001. 276(31): p. 29603-10.*
 15. Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vacca, C., Riccardi, C. *Inhibited cell death, NF-kappaB activity and increased IL-10 in TCR-triggered thymocytes of transgenic mice overexpressing the glucocorticoid-induced protein GILZ. Int Immunopharmacol, 2006. 6(7): p. 1126-34.*
 16. Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G., Riccardi, C. *Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. Nucleic Acids Res, 2007. 35(2): p. 517-28.*
 17. Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., Riccardi, C. *GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. J Clin Invest, 2007. 117(6): p. 1605-15.*
 18. Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., Riccardi, C. *Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. Mol Cell Biol, 2002. 22(22): p. 7929-41.*

19. Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P., Riccardi, C. *Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice*. Blood, 2004. 104(13): p. 4134-41.
20. Muller, O.G., Parnova, R.G., Centeno, G., Rossier, B.C., Firsov, D., Horisberger, J.D. *Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(5): p. 1107-15.
21. Shi, X., Shi, W., Li, Q., Song, B., Wan, M., Bai, S., Cao, X. *A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells*. EMBO Rep, 2003. 4(4): p. 374-80.
22. Zhang, W., Yang, N., Sh, X.M. *Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)*. J Biol Chem, 2008. 283(8): p. 4723-9.
23. Bruscoli, S., Donato, V., Velardi, E., Di Sante, M., Migliorati, G., Donato, R., Riccardi, C. *Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2010. 285(14): p. 10385-96.
24. Sharpe, R. *Regulation of spermatogenesis*. In the Physiology of Reproduction, 1994. ed. E. Knobil, J.D. Neill, 1:1363-434. New York: Raven.
25. Meachem, S., von Schonfeldt, V., Schlatt, S. *Spermatogonia: stem cells with a great perspective*. Reproduction, 2001. 121(6): p. 825-34.
26. Sutton, K.A. *Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells*. Rev Reprod, 2000. 5(2): p. 93-8.
27. Tegelenbosch, R., and De Rooij, D.G. *A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid-mouse*. Mutat. Res, 1993. 290:193-200.
28. Print, C.G., and Loveland, K.L. *Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis*. Bioessays, 2000. 22(5): p. 423-30.
29. De Rooij, D.G. *Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells*. Reproduction, 2001. 121(3): p. 347-54.
30. Chemes, H.E. *Infancy is not a quiescent period of testicular development*. Int J Androl, 2001. 24(1): p. 2-7.

31. Griswold, M.D. *The central role of Sertoli cells in spermatogenesis*. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9(4): p. 411-6.
32. Grootegoed, J.A., Siep, M., Baarends, W.M. *Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis*. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2000. 14(3): p. 331-43.
33. Clermont, Y. *The cycle of the seminiferous epithelium in man*. *Am J Anat*, 1963. 112: p. 35-51.
34. Clermont, Y., and Perey, B. *Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats*. *Am. F. Anat*, 1957. 100:241- 67.
35. Means, A.R., Fakunding, J.L., Huckins, C., Tindall, D.J., Vitale, R. *Follicle Stimulating Hormone, the Sertoli cells and spermatogenesis*. *Rec. Prog. Horm. Res*, 1976.32: 477-525.
36. Abeyawardena, S.A., and Plant, T.M. *Evidence in support of the view that testicular inhibin plays a major role in the regulation of FSH secretion in the Rhesus Monkey*. The American Society, 1988. Abstract 908.
37. Kerkhoff, E., and Rapp, U.R. *Cell cycle targets of Ras/Raf signalling*. *Oncogene*. 1998. 17:1457-1462
38. Krasilnikov, M.A. *Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation*. *Biochemistry (Mosc)*. 2000. 65:59-67
39. Kerfoot, C., Huang, W., Rotenberg, S.A. *Immunohistochemical analysis of advanced human breast carcinomas reveals downregulation of protein kinase C alpha*. *J Histochem Cytochem*, 2004. 52:419-422.
40. Lee, J.T., Jr., Steelman, L.S., McCubrey, J.A. *Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells*. *Cancer Res*. 2004. 64:8397-8404.
41. Olson, M.F., and Marais, R. *Ras protein signalling*. *Semin Immunol*. 2000. 12:63-73.
42. Brazil, D.P., and Hemmings, B.A. *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. *Trends Biochem Sci*. 2001. 26:657-664.
43. Maira, S.M., Galetic, I., Brazil, D.P., Kaech, S., Ingley, E., Thelen, M., Hemmings, B.A. *Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a*

- negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane.* Science. 2001. 294:374-380.
44. Melo, E.O., Canavessi, A.V., Franco, M.M., Rumpf, R. *Animal transgenesis: state of the art and applications.* J Appl Genet, 2007. 48(1): p. 47-61.
 45. Yoshiki, A. and Moriwaki, K. *Mouse phenome research: implications of genetic background.* ILAR J, 2006. 47(2): p. 94-102.
 46. Capecchi, M.R. *Altering the genome by homologous recombination.* Science, 1989. 244(4910): p. 1288-92.
 47. Ramirez-Solis, R., Liu, P., Bradley, A. *Chromosome engineering in mice.* Nature, 1995. 378(6558): p. 720-4.
 48. Shaffer, L.G. and Lupski, J.R. *Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans.* Annu Rev Genet, 2000. 34: p. 297-329.
 49. Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. *Germ-line transformation of mice.* Annu Rev Genet, 1986. 20: p. 465-99.
 50. Chisaka, O. *Functional analysis of mouse Hox genes by gene targeting.* Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1991. 36(14): p. 2409-17.
 51. DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., Robertson, E.J. *A growth-deficiency in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting.* Nature, 1990. 345(6270): p. 78-80.
 52. Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R., Rajewsky, K. *A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene.* Nature, 1991. 350(6317):p. 423-6.
 53. Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M., Chambon, P. *Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression.* Cell, 1991. 66(6): p.1105-19.
 54. Schorle, H., Holtschke, T., Hünig, T., Schimpl, A., Horak, I. *Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting.* Nature. 1991. 352(6336): p. 621-4.
 55. Kos, C.H. *Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models.* Nutr Rev, 2004. 62(6 Pt 1): p. 243-6.

56. Zhang, D., Penttila, T.L., Morris, P.L., Teichmann, M., Roeder, R.G. *Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene*. Science, 2001. 292(5519): p. 1153-5.
57. Gerard, M., Hernandez, L., Wevrick, R., Stewart, C.L. *Disruption of the mouse necdin gene results in early postnatal lethality*. Nat Genet, 1999. 23(2): p. 199-202.
58. Celli, J., Duijf, P., Hamel, B.C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A.P., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R.C., Van Buggenhout, G., van Haeringen, A., Woods, C.G., van Essen, A.J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D.A., Yang, A., McKeon, F., Brunner, H.G., van Bokhoven, H. *Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome*. Cell, 1999. 99(2): p. 143-53.
59. Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Chambon, P., Metzger, D. *Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(26): p. 14559-63.
60. Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., Chambon, P. *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): p. 10887-90.
61. Li, M., Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P. *Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis*. Nature, 2000. 407(6804): p. 633-6.
62. Vooijs, M., Jonkers, J., Berns, A. *A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent*. EMBO Rep, 2001. 2(4): p. 292-7.
63. Vooijs, M., van der Valk, M., te Riele, H., Berns, A. *Flp-mediated tissue-specific inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor gene in the mouse*. Oncogene, 1998. 17(1): p. 1-12.
64. Gallardo, T., Shirley, L., John, G.B., Castrillon, D.H. *Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre*. Genesis, 2007. 45(6): p. 413-7.

65. Resko, J.A. *Endocrine control of adrenal progesterone secretion in the ovariectomized rat*. Science, 1969. 164(3875): p. 70-1.
66. Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S. *Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood*. Reproduction, 2003. 125(6): p. 769-84
67. Bruscoli, S., Velardi, E., Di Sante, M., Bereshchenko, O., Venanzi, A., Coppo, M., Berno, V., Mameli, M.G., Colella, R., Cavaliere, A., Riccardi, C. *Long glucocorticoid-induced leucine zipper (L-GILZ) protein interacts with ras protein pathway and contributes to spermatogenesis control*. J Biol Chem. 2012 Jan 6; 287(2):1242-51.
68. Oatley, J.M. and Brinster R.L. *Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008. 24: p. 263-86.
69. Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., Yoshida, S. *Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment*. Science, 2010. 328(5974): p. 62-7.
70. De Rooij, D.G. *The spermatogonial stem cell niche*. Microsc Res Tech, 2009. 72(8): p. 580-5.
71. Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., Pandolfi, P.P. *Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells*. Nat Genet, 2004. 36(6): p. 653-9.
72. Su, H., Mills, A.A., Wang, X., Bradley, A. *A targeted X-linked CMV-Cre line*. Genesis, 2002. 32(2): p. 187-8.
73. Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J.D., Yamamoto, M. *Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells*. Development, 1994. 120(7): p. 1759-66.
74. Wong, M.D., Jin, Z., Xie, T. *Molecular mechanisms of germline stem cell regulation*. Annu Rev Genet, 2005. 39: p. 173-95.
75. Matzuk, M.M., and Lamb, D.J. *The biology of infertility: research advances and clinical challenges*. Nat Med, 2008. 14(11): p. 1197-213.

76. Chaganti, R.S., Jhanwar, S.C., Ehrenbard, L.T., Kourides, I.A., Williams, J.J. *Genetically determined asynapsis, spermatogenic degeneration, and infertility in men.* Am J Hum Genet, 1980. 32(6): p. 833-48.
77. Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., Saga, Y. *The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells.* Science, 2009. 325(5946): p. 1394-8.
78. Beumer, T.L., Roepers-Gajadien, H.L., Gademan, I.S., Kal, H.B., de Rooij, D.G. *Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse.* Biol Reprod, 2000. 63(6): p. 1893-8.
79. Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H. *Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF.* Science, 2000. 287(5457): p. 1489-93.
80. Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. *Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling.* J Biol Chem, 2007. 282(35): p. 25842-51.
81. Calenda, A., Allenet, B., Escalier, D., Bach, J.F., Garchon, H.J. *The meiosis-specific Xmr gene product is homologous to the lymphocyte Xlr protein and is a component of the XY body.* EMBO J, 1994. 13(1): p. 100-9.
82. Wang, P.J. and Pan, J.. *The role of spermatogonially expressed germ cell-specific genes in mammalian meiosis.* Chromosome Res, 2007. 15(5): p. 623-32.
83. Blume-Jensen, P., Jiang, G., Hyman, R., Lee, K.F., O'Gorman, S., Hunter, T. *Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility.* Nat Genet, 2000. 24(2): p. 157-62.
84. Almog, T. and Naor, Z. *Mitogen activated protein kinases (MAPKs) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions.* Mol Cell Endocrinol, 2008. 282(1-2): p. 39-44.
85. He, Z., Jiang, J., Kokkinaki, M., Golestaneh, N., Hofmann, M.C., Dym, M. *Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to*

- promote mouse spermatogonial stem cell proliferation*. Stem Cells, 2008. 26(1): p. 266-78.
86. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Takashima, S., Oshimura, M., Toyokuni, S., Shinohara, T. *Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation*. Cell Stem Cell, 2009. 5(1): p. 76-86.
87. Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F., Riccardi, C.. *Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB*. Blood, 2001. 98(3): p. 743-53.
88. Cannarile, L., Cuzzocrea, S., Santucci, L., Agostini, M., Mazzon, E., Esposito, E., Muià, C., Coppo, M., Di Paola, R., Riccardi, C. *Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis*. Gastroenterology, 2009. 136(2): p. 530-41.
89. Cannarile, L., Fallarino, F., Agostini, M., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Vacca, C., Genovese, T., Migliorati, G., Ayroldi, E., Riccardi, C. *Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines*. Blood, 2006. 107(3): p. 1039-47.
90. Katz, M.E. and McCormick, F. *Signal transduction from multiple Ras effectors*. Curr Opin Genet Dev, 1997. 7(1): p. 75-9.
91. Gille, H. and Downward, J. *Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression*. J Biol Chem, 1999. 274(31): p. 22033-40.
92. Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsihchlis, P.N., Rosen, N. *Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway*. J Biol Chem, 1998. 273(45): p. 29864-72.
93. Burgering, B.M. and Coffey, P.J. *Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction*. Nature, 1995. 376(6541): p. 599-602.
94. Hobbs, R.M., Seandel, M., Falciatori, I., Rafii, S., Pandolfi P.P. *Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1*. Cell, 2010. 142(3): p. 468-79.

95. Hofmann, M.C. *Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche*. Mol Cell Endocrinol, 2008. 288(1-2): p. 95-103.
96. Lee, J. and Shinohara, T. *Epigenetic modifications and self-renewal regulation of mouse germline stem cells*. Cell Res, 2011. 21(8): p. 1164-71.