



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO IN BIOLOGIA, GENETICA UMANA  
E BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E  
MOLECOLARI DEL FENOTIPO**

**XXII CICLO**

**DIPARTIMENTO G.F. INGRASSIA**

SEZIONE DI BIOLOGIA GENERALE, BIOLOGIA CELLULARE, GENETICA MOLECOLARE  
*G.SICHEL*

UNITÀ DI BIOMEDICINA MOLECOLARE GENOMICA E DEI SISTEMI COMPLESSI,  
GENETICA, BIOLOGIA COMPUTAZIONALE

---

**Dott.ssa Maria Rosa Guglielmino**

---

**STUDIO DI MACCHINARI MOLECOLARI IN  
OVOCITI UMANI**

---

**TESI DI DOTTORATO**

---

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. MICHELE PURRELLO

*Tutor:*  
Chiar.ma Prof.ssa CINZIA DI PIETRO

---

**Anno Accademico 2009 - 2010**

# INDICE

<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	pag. 1
<b>RIASSUNTO</b> .....	pag. 2
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	pag. 4
1.1 SVILUPPO E DIFFERENZIAMENTO DELL'OVOCITA UMANO.....	pag. 4
1.1.1 OVOGENESI, FOLLICOLOGENESI E REGOLAZIONE DEL CICLO ORMONALE.....	pag. 9
1.1.2 RELAZIONE TRA OVOCITA E CELLULE SOMATICHE.....	pag. 22
1.1.3 ACCUMULO DI mRNA DURANTE LO SVILUPPO DELL'OVOCITA .....	pag. 27
1.2 INFERTILITA'.....	pag. 28
1.2.1 APOPTOSI NELL'OVARIO .....	pag. 31
1.3 MACCHINARI MOLECOLARI.....	pag. 42
1.3.1 APPARATO GENERALE DI TRASCRIZIONE.....	pag. 44
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	pag. 50

## ANALISI DI TFIID

2.1 RICERCA DI SEQUENZE DI GENI TAF E DISEGNO DEI <i>PRIMERS</i> .....	pag. 50
2.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI.....	pag. 55
2.2.1 PRELIEVO OVOCITARIO.....	pag. 56
2.3 PREPARAZIONE DI SINGOLI OVOCITI UMANI.....	pag. 58
2.3.1 SHOCK TERMICO.....	pag. 59
2.3.2 TRATTAMENTO CON DNasi.....	pag. 59
2.4 RETROTRASCRIZIONE (RT) DI SINGOLI OVOCITI.....	pag. 60
2.5 ESTRAZIONE DI RNA DA SANGUE.....	pag. 61
2.5.1 QUANTIFICAZIONE DELL'RNA ESTRATTO.....	pag. 62

2.5.2 RT DI RNA DA SANGUE E TESSUTI.....	pag. 62
2.5.3 PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) SEMIQUANTITATIVA.....	pag. 63
2.5.4 ELETTROFORESI ANALITICA.....	pag. 64
2.5.5 DENSITOMETRIA.....	pag. 65
2.6 ANALISI DEI DATI E COSTRUZIONE DEI DOT PLOT.....	pag. 65
2.7 ANALISI STATISTICHE.....	pag. 66

**PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI DEL MACCHINARIO  
APOPTOTICO IN OVOCITI MATURI ED IN CELLULE DEL  
CUMULO**

2.8 RICERCA DI SEQUENZE DEI GENI DEL MA E DISEGNO DEI <i>PRIMERS</i> .....	pag. 68
2.9 RACCOLTA DEI CAMPIONI.....	pag. 71
2.10 COLLEZIONE DI <i>POOL</i> OVOCITARI E CELLULE DEL CUMULO.....	pag. 72
2.11 PREPARAZIONE DI POOL DI OVOCITI UMANI E MURINI.....	pag. 73
2.12 RT DI POOL DI OVOCITI UMANI E MURINI.....	pag. 74
2.13 PREPARAZIONE DELLE CELLULE DEL CUMULO.....	pag. 76
2.13.1 ESTRAZIONE DI RNA DA CELLULE DEL CUMULO...	pag. 76
2.14 REAL TIME PCR.....	pag. 77
2.14.1 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE SYBER GREEN.....	pag. 79
2.15 PREPARAZIONE DELLE PIASTRE.....	pag. 80
2.16 ANALISI DEI DATI E COSTRUZIONE DEI DOT PLOT.....	pag. 84
2.17 INTERATTOMA DEI GENI DEL MA.....	pag. 86
2.18 ANALISI STATISTICHE.....	pag. 87

**ANALISI DI TRASCRITTI OVOCITA SPECIFICI IN OVOCITI  
FRESCHI E IN OVOCITI SCONGELATI DOPO VITRIFICAZIONE**

2.19 RICERCA DI SEQUENZE DI GENI OVOCITA-SPECIFICI E DISEGNO DEI <i>PRIMERS</i> .....	pag. 88
2.20 RACCOLTA DEI CAMPIONI.....	pag. 89

2.21	PROTOCOLLI DI VITRIFICAZIONE E SCONGELAMENTO.....	pag. 89
2.21.1	VITRIFICAZIONE.....	pag. 89
2.21.2	SCONGELAMENTO.....	pag. 90
<b>3.</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>pag. 91</b>
3.1	ANALISI DI ESPRESSIONE DEL TFIID IN SINGOLI OVOCITI UMANI: NUOVI POTENZIALI MARCATORI MOLECOLARI DI QUALITÀ OVOCITARIA.....	pag. 91
3.2	PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI DEL MACCHINARIO APOPTOTICO IN OVOCITI UMANI MATURI ED IN CELLULE DEL CUMULO.....	pag. 98
3.2.1	INTERATTOMICA.....	pag. 107
3.3	ANALISI DI TRASCritti OVOCITA-SPECIFICI IN OVOCITI FRESCHI E IN OVOCITI SCONGELATI DOPO VITRIFICAZIONE.....	pag. 109
<b>4.</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>pag. 111</b>
4.1	ANALISI DI ESPRESSIONE DEL TFIID IN SINGOLI OVOCITI UMANI: NUOVI POTENZIALI MARCATORI MOLECOLARI DI QUALITÀ OVOCITARIA.....	pag. 111
4.2	PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI DEL MACCHINARIO APOPTOTICO IN OVOCITI UMANI MATURI ED IN CELLULE DEL CUMULO.....	pag. 116
4.2.1	CONFRONTO OVOCITI VS CELLULE DEL CUMULO SIA <i>OLD</i> CHE <i>YOUNG</i> .....	pag. 117
4.2.2	CONFRONTO TRA OVOCITI ( <i>OLD</i> E <i>YOUNG</i> ) E CELLULE DEL CUMULO ( <i>OLD</i> E <i>YOUNG</i> ).....	pag. 118
4.2.3	ANALISI SUI SINGOLI OVOCITI.....	pag. 122

4.2.4 INTERATTOMICA.....	pag. 124
4.3 ANALISI DI TRASCritti OVOCITA-SPECIFICI IN OVOCITI FRESCHI E IN OVOCITI SCONGELATI DOPO VITRIFICAZIONE.....	pag. 125
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag. 128</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>pag. 130</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>pag. 145</b>

## SCOPO DELLA TESI

Il lavoro presentato in questa tesi ha come oggetto di studio il gamete femminile ed in particolare il trascrittoma dell'ovocita umano.

All'interno di questa linea di ricerca abbiamo:

- Caratterizzato il TFIID [1, 2] in condizioni non patologiche per ricercare marcatori molecolari da correlare alla qualità ovocitaria [3];
- Valutato il profilo di espressione dei geni codificanti le proteine del macchinario apoptotico [4] durante l'invecchiamento riproduttivo;
- Valutato la qualità ovocitaria in risposta a specifici protocolli di congelamento (Vitrificazione) [5].

## RIASSUNTO

L'uomo è considerato il sistema biologico complesso per eccellenza in quanto è il risultato di un intricato insieme di complessi molecolari, discreti e definibili, responsabili di particolari fenomeni biologici. Questi complessi interagiscono gli uni con gli altri, nello spazio e nel tempo, legandosi a regioni comuni o distinte di DNA, per creare una network di interazioni proteina-proteina e proteina-DNA, e prendono parte a diversi meccanismi cellulari, quali trascrizione, processamento dell'mRNA, replicazione del DNA, ricombinazione, riparazione e morte cellulare [6].

Tutti questi complessi sistemi, che vanno a costituire quelli che sono i macchinari molecolari, sono presenti anche nel gamete femminile che rappresenta una delle cellule più affascinanti dell'organismo dei Vertebrati, e soprattutto dei Mammiferi e dei Primati. Infatti, pur essendo una cellula terminalmente differenziata va incontro ad un processo di differenziamento estremamente particolare e contiene a livello del suo citoplasma tutte quelle informazioni che rendono possibile poi lo sviluppo di un nuovo individuo.

Lo studio dei meccanismi che portano alla formazione di un ovocita maturo e competente potrebbe aiutarci a comprendere le basi della totipotenza dello zigote, nelle cui prime fasi di sviluppo il gamete femminile ha un ruolo fondamentale prima dell'attivazione del genoma embrionale.

Nonostante i numerosi studi fatti su modelli animali poco lavoro è stato fatto sull'uomo, e ancora oggi, poco è conosciuto riguardo il fenotipo molecolare del gamete femminile umano. Questo naturalmente è dovuto ad una scarsa

disponibilità di materiale infatti prima della **legge 40/2004 del 19 febbraio 2004** ( pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale **n. 45 del 24-02-2004**: “Norme in materia di procreazione medicalmente assistita testo in vigore dal: 10-3-2004 art 14”) anche in Italia gli ovociti prelevati venivano tutti fecondati e la selezione dell’impianto veniva effettuata sugli embrioni. Dal 19 febbraio 2004 è possibile fecondare solo 3 ovociti, e il più delle volte quindi rimangono ovociti inutilizzati per la fecondazione.

Il nostro progetto prevede appunto l’utilizzo degli ovociti non selezionati dall’embriologo.

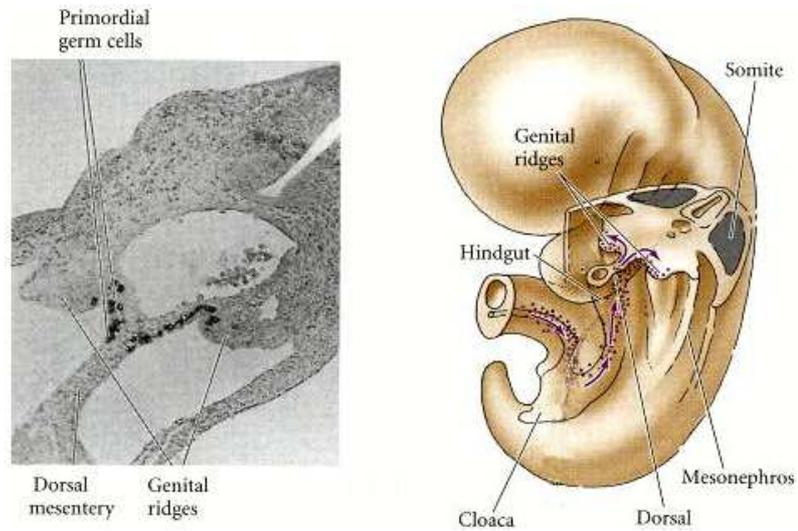
Da alcuni anni, in collaborazione con il Servizio di Procreazione Medicalmente Assistita dell’Azienda Ospedaliera Cannizzaro di Catania, abbiamo iniziato a studiare alcuni aspetti del gamete femminile ed in modo particolare abbiamo portato avanti un progetto di ricerca sullo studio di Macchinari Molecolari quali l’Apparato Generale di Trascrizione [3] ed il Macchinario Apoptotico di *Homo sapiens* [1, 2, 4] che stanno alla base, rispettivamente, della crescita e della morte cellulare. Proprio per il ruolo fondamentale svolto da questi intricati sistemi risulta di estrema importanza il loro studio.

# INTRODUZIONE

## 1.1 SVILUPPO E DIFFERENZIAMENTO DELL'OVOCITA UMANO

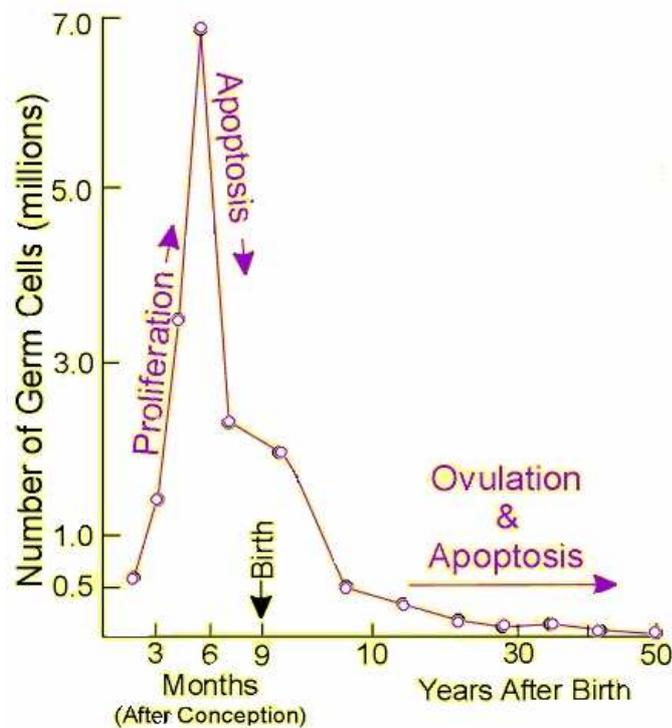
Tutti gli organismi a riproduzione sessuata si originano dall'unione di cellule altamente specializzate chiamate gameti: spermatozoo e cellula uovo.

L'ovocita è il gamete femminile e deriva da un processo di gametogenesi, noto come **ovogenesi**, che si svolge all'interno delle gonadi femminili, le **ovaie**. I precursori dei gameti sono le cellule germinali primordiali (**PGCs**, *primordial germ cells*) che durante l'embriogenesi sono specificate da interazioni tra cellule vicine. Le PGC sono le cellule sessuali diploidi indifferenziate più primitive. Inizialmente queste cellule sono localizzate all'esterno della gonade ma durante lo sviluppo embrionale si separano dalla linea cellulare somatica e migrano dal mesoderma extraembrionale verso l'abbozzo della futura gonade (**Fig. 1**); quest'ultima in seguito allo sviluppo "sesso-specifico" si differenzierà in ovaio o testicolo, a seconda del sesso dell'individuo [7], ed in questa sede le PGCs saranno definite rispettivamente oogoni e spermatogoni.



**Figura 1:** migrazione delle PGCs dal mesoderma extraembrionale verso l'abbozzo della futura gonade.

La migrazione di queste cellule all'interno dell'ovaio coincide con la loro intensa attività proliferativa attraverso successive divisioni mitotiche, che culminano verso il quinto mese di gestazione dando origine a circa 6-7 milioni di oogoni (**Fig. 2**) [8-12].

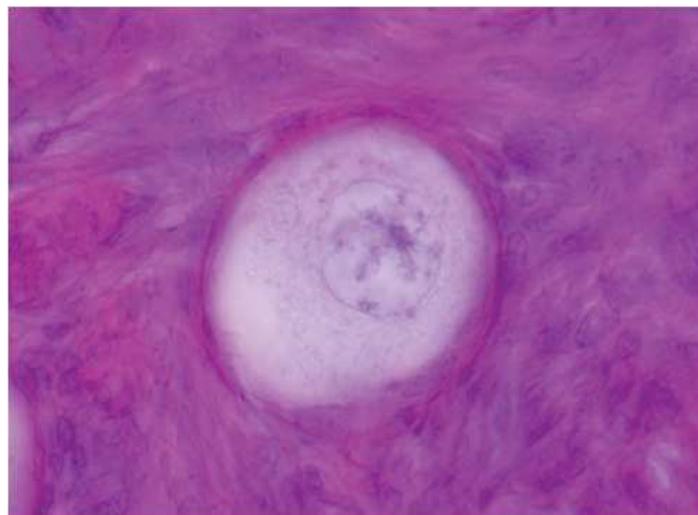


**Figura 2:** variazione del numero di oociti nell'ovario a differenti stadi di sviluppo.

Tuttavia nelle fasi successive dello sviluppo fetale il numero di oogoni si riduce progressivamente (tra 700 mila e 2 milioni alla nascita e ca. 400 mila alla pubertà) in quanto la maggior parte di essi va incontro a morte mentre i restanti 2 milioni circa, definiti ora oociti primari, intraprendono la prima divisione meiotica (**Fig. 2**).

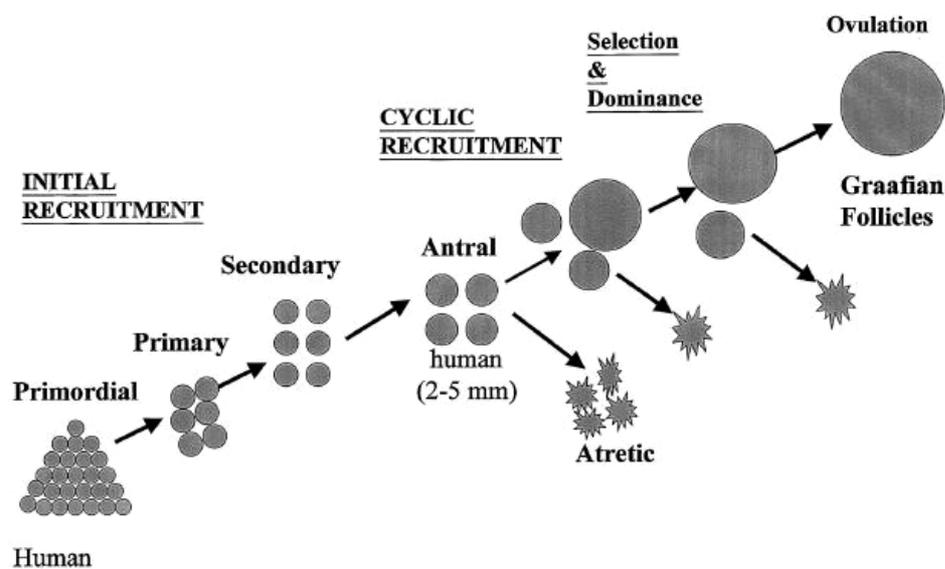
Solo una parte di tutte queste cellule riuscirà a concludere il proprio ciclo di maturazione per cui il numero totale di oociti subisce un ulteriore decremento. La prima divisione meiotica però non viene portata a termine ma piuttosto gli oociti si arrestano allo stadio di diplotene della profase I in attesa che l'individuo raggiunga la maturità sessuale, per poi poter riprendere e concludere il proprio ciclo.

A questo stadio ogni **oocita I** è circondato da un unico strato di cellule appiattite dette cellule della granulosa e nel loro insieme essi costituiscono il **follicolo primordiale** (**Fig. 3**).



**Figura 3:** follicolo primordiale circondato da cellule della granulosa appiattite.

Al momento della nascita il numero dei follicoli primordiali è ridotto approssimativamente intorno al milione rispetto ai sette inizialmente presenti. Alla pubertà i follicoli primordiali sono circa 300-400.000 e di questi soltanto 400 circa completeranno il loro ciclo di maturazione. Questi follicoli primordiali permangono in uno stato di quiescenza finché, periodicamente, vengono selezionati, attraverso un processo definito “**reclutamento iniziale**”, per proseguire il loro accrescimento ed entrare così a far parte del *pool* di follicoli in via di sviluppo. Questi ultimi passano attraverso lo stadio primario e secondario prima di acquisire una cavità antrale, ed è proprio a questo livello che la maggior parte dei follicoli va incontro ad atresia. Nonostante ciò alcuni di essi, sottoposti ad un’opportuna stimolazione ormonale che si verifica dopo la pubertà, vengono sottratti a questo destino (processo definito “**reclutamento ciclico**”) e riescono così a raggiungere lo stadio preovulatorio (**Fig. 4**) [13].



**Figura 4:** sviluppo e reclutamento dei follicoli ovarici nell'uomo.

La cospicua riduzione del numero di ovociti può essere comunque attribuita a diversi meccanismi: le cellule germinali dell'area corticale migrano verso la superficie dell'ovario e vengono incorporate all'interno dell'epitelio superficiale o vengono eliminate nella cavità peritoneale, subiscono una regressione durante la meiosi oppure fallisce il processo che porta l'ovocita ad essere circondato dalle cellule della granulosa. Quest'ultimo meccanismo ha come conseguenza la mancata formazione del follicolo primordiale ed è influenzato da geni che, in condizioni normali, reprimono attivamente la morte delle cellule germinali. Una volta che tutti i follicoli primordiali si sono formati, evento che si verifica poco dopo la nascita, si ha un'ulteriore e continua perdita di ovociti attraverso processi fisiologici quali la crescita follicolare e l'atresia, che si ripetono ciclicamente per tutta la vita della donna [8].

Considerando quindi che negli individui di sesso femminile tutti gli ovociti sono prodotti durante il periodo fetale o comunque poco dopo la nascita, le donne nascono con un numero finito di gameti bloccati in meiosi I che in seguito continua a diminuire nel corso della loro vita. Nelle donne, l'esaurimento di questo *pool* limitato di ovociti si verifica intorno ai 50 anni di età e conduce al fenomeno della menopausa.

Recenti studi hanno comunque messo in discussione questa teoria suggerendo che nelle ovaie di topi sia giovani che adulti sono presenti cellule germinali mitoticamente attive che sostengono la formazione dell'ovocita e del follicolo [14]; altri studi hanno messo in evidenza che cellule staminali germinali derivate dal midollo osseo sono distribuite alle ovaie di topo attraverso il

sangue periferico [15], così come studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità delle cellule dell'epitelio superficiale dell'ovario umano di differenziarsi in ovociti e cellule della granulosa [16]. Queste ipotesi, che necessitano di ulteriori conferme, suggeriscono che il *pool* di follicoli primari negli ovari di donne adulte possa rappresentare una popolazione dinamica piuttosto che statica, caratterizzata da strutture che degenerano e si differenziano continuamente.

### **1.1.1, OVOGENESI, FOLLICOLOGENESI E REGOLAZIONE ORMONALE**

Come detto pocanzi, gli ovociti se sottoposti ad un'opportuna stimolazione ormonale, che si verifica dopo la pubertà, ciclicamente cominciano a maturare e riprendono la meiosi divenendo **ovociti secondari**; questi ultimi si arrestano infine allo stadio di metafase II dando così origine alla cellula uovo matura, cioè pronta per essere fecondata dopo l'ovulazione. La seconda divisione meiotica sarà completata solo dopo la fecondazione (**Fig. 5**).

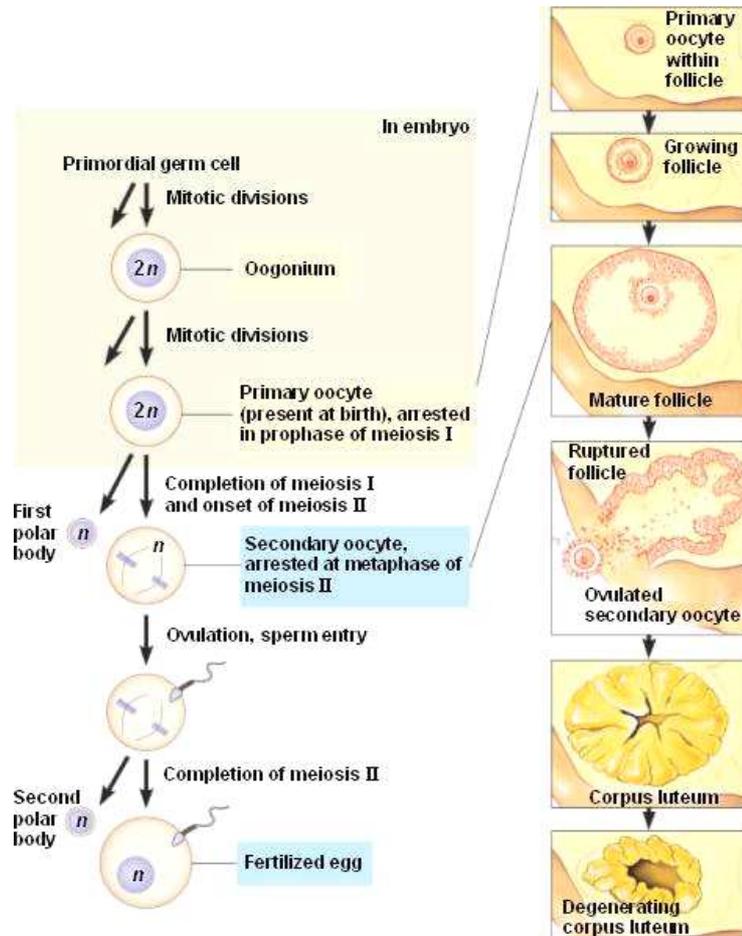


Figura 5: processo di crescita dell'ovocita.

Ovviamente la maturazione dell'ovocita I (**ovogenesi**) si accompagna comunque ad un contemporaneo sviluppo del follicolo che lo contiene, fenomeno che prende il nome di **follicologenesi** (Fig. 6). Il destino di ogni follicolo è controllato sia da fattori endocrini che da fattori paracrini [17].

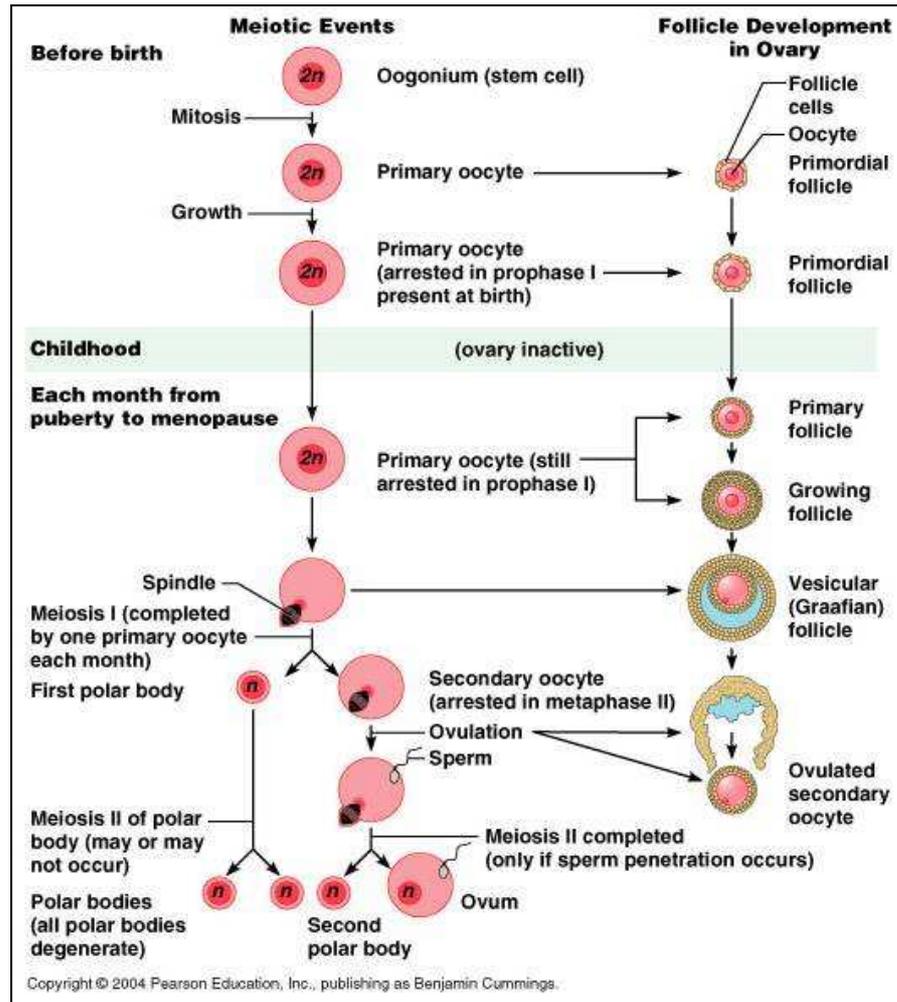
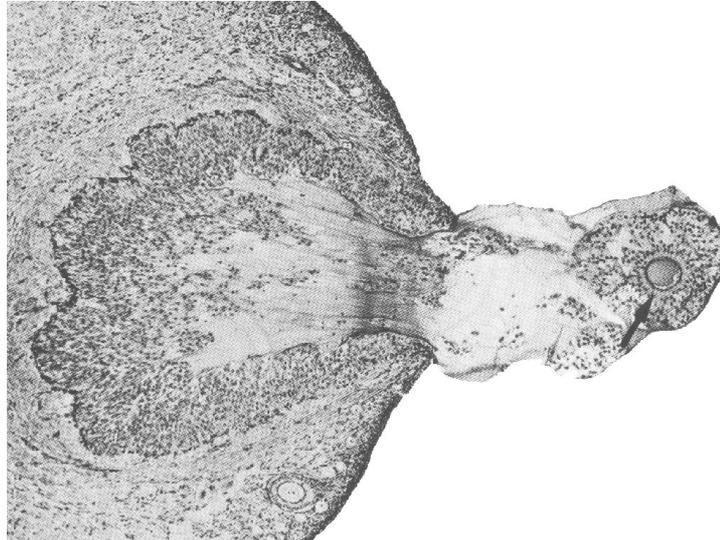


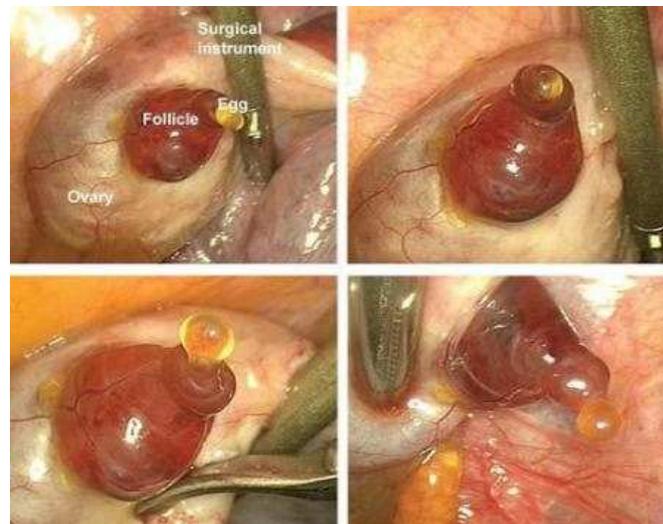
Figura 6: rapporto tra ovogenesi e follicologenesi.

Ovogenesi e follicologenesi sono processi strettamente correlati ed entrambi dipendenti dalla liberazione ciclica di elevati livelli di ormoni gonadotropi quali FSH e LH. L'ovulazione innescata dall'aumento dei livelli di LH è l'evento che segna il passaggio del gamete femminile dall'antro follicolare all'ambiente extraovarico. Complesse correlazioni funzionali tra ipotalamo, ipofisi anteriore ed ovaie, infatti, sono responsabili della maturazione mensile di un follicolo ovarico e della sua rottura con espulsione di un ovocita maturo (Fig. 7 e Fig. 8), successivamente trasportato nelle Tube di Falloppio per essere fecondato. La risposta follicolare all'aumento dell'LH, che culmina

nell'ovulazione, è un processo complesso, ma ben orchestrato, che comporta un continuo *cross-talking* fra le cellule della granulosa e l'ovocita.



**Figura 7:** espulsione di un ovocita (circondato da cellule del cumulo ooforo) da un follicolo maturo.



**Figura 8:** espulsione di un ovocita da un follicolo maturo.

La follicologenesi ha inizio verso il settimo mese di gravidanza, quando la maggior parte degli oogoni presenti si sono trasformati in oociti I e ciascuno di essi entra nella costituzione di un **follicolo primordiale** caratterizzato da uno

strato di cellule appiattite, dette cellule della granulosa, che circonda la cellula uovo (**Fig. 3**).

Dalla pubertà alla menopausa di norma ogni 28 giorni un follicolo primordiale, e di conseguenza un oocita, completa la sua maturazione andando incontro ad una serie di trasformazioni che interessano entrambi i tipi cellulari: la cellula uovo aumenta in dimensioni e gli strati di granulosa si moltiplicano intorno ad essa formando il **follicolo primario** (**Fig. 9**).

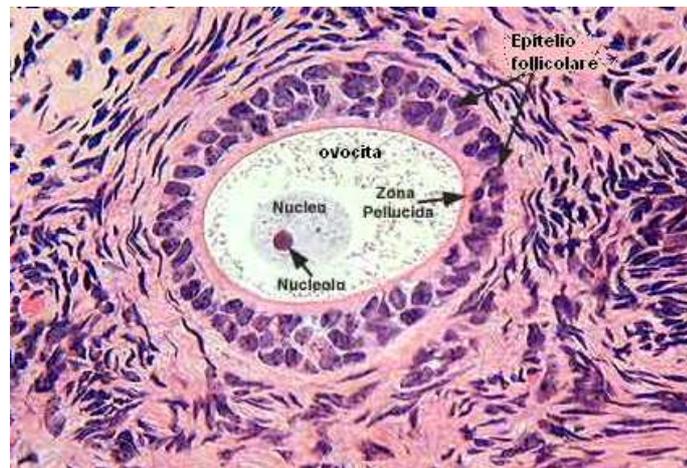


**Figura 9:** follicolo primario circondato da cellule della granulosa cuboidi.

Le cellule follicolari e l'ovocita racchiuso nel follicolo secernono un sottile strato di materiale acellulare di natura glicoproteica che si stratificherà sulla superficie esterna del gamete. Questa struttura di rivestimento detta **zona pellucida** è attraversata da *gap junction* che hanno la funzione di trasmissione di segnali chimici e di metaboliti tra le cellule follicolari e l'ovocita. Essa svolge inoltre un ruolo importante che consiste nel proteggere l'ovocita da

traumi di vario tipo e, dopo l'ovulazione, funge da barriera specie-specifica verso gli spermatozoi appartenenti a specie diverse.

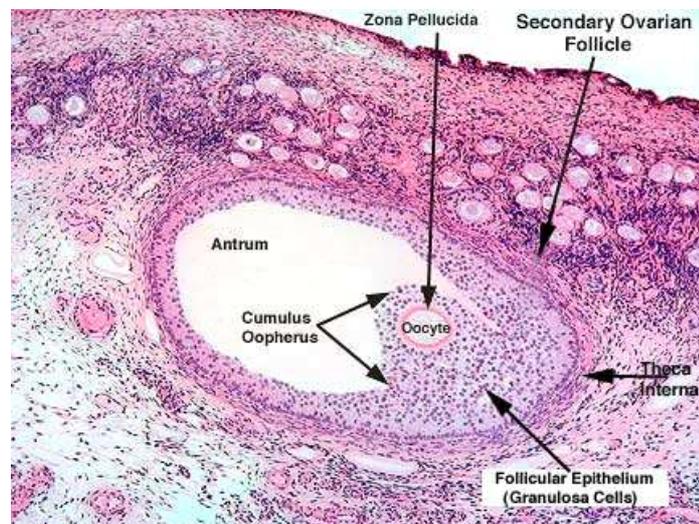
Durante il ciclo mestruale i livelli di gonadotropine aumentano ed in particolare l'FSH determina una rapida proliferazione di 6-12 follicoli ogni mese. Le cellule della granulosa proliferano rapidamente e nuove cellule derivanti dall'interstizio ovarico si dispongono a formare diversi strati all'esterno della granulosa costituendo la cosiddetta **teca**; questa comprende strati più vicini alla granulosa (teca interna) che secernono steroidi e strati più esterni (teca esterna) che formano la capsula del follicolo. Le cellule della granulosa iniziano a secernere il *liquor follicoli* contenente un'elevata concentrazione di estrogeni che si accumula all'interno del follicolo e spinge l'ovocita verso la periferia, formando così la cavità antrale ed il cumulo ooforo, ed è a questo stadio che si parla di **follicolo secondario (Fig. 10)**.



**Figura 10:** follicolo secondario.

In questo periodo dello sviluppo molti follicoli vanno incontro ad un fenomeno di degenerazione detto atresia follicolare in cui sia gli oociti quiescenti che i

follicoli già conformati vanno incontro ad apoptosi, mentre alcuni di essi, sotto stimolazione delle gonadotropine che si verifica ciclicamente dopo la pubertà, raggiungono lo stadio preovulatorio [17]. Quest'ultimo stadio di sviluppo è determinato da un ulteriore aumento delle dimensioni follicolari e dell'ovocita con la formazione del follicolo ormai maturo detto **follicolo terziario o di Graaf (Fig. 11)**.



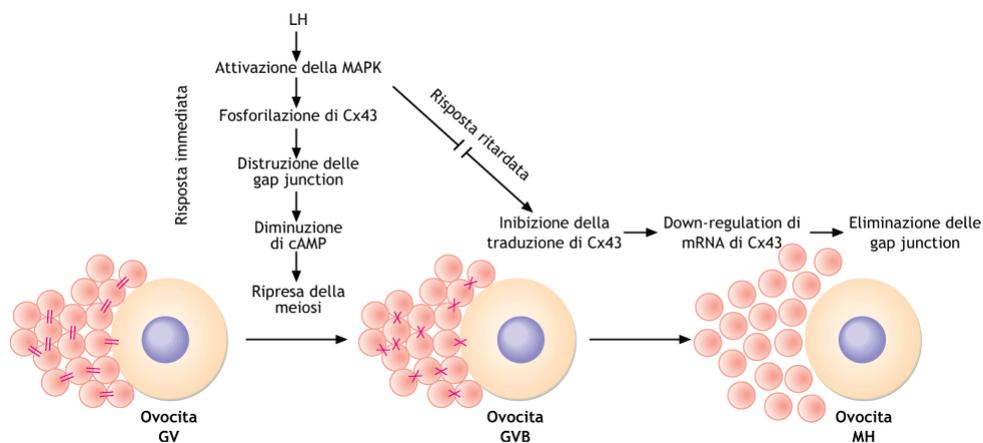
**Figura 11:** follicolo terziario o di Graaf.

Nella fase immediatamente precedente l'ovulazione, il rapido incremento di gonadotropine ed in particolare di LH determina la ripresa della meiosi nell'ovocita di I ordine che completa la I divisione meiotica e si arresta a livello della *metafase II* con formazione di due cellule:

- una cellula che conserva quasi tutto il citoplasma dell'ovocita, detta ovocita di II ordine
- una cellula con pochissimo citoplasma detta *I globulo polare*

Entrambe le cellule risultano essere aploidi (n).

La ripresa della meiosi sembrerebbe essere dovuta, oltre che all'aumento delle gonadotropine, alla chiusura delle *gap junction* che mettono in comunicazione l'ovocita con le cellule follicolari. L'interruzione della comunicazione con le cellule circostanti determina un decremento di cAMP che segnala all'ovocita di riprendere la meiosi. In particolare, la ripresa della meiosi e di conseguenza la ripresa della maturazione ovocitaria LH-dipendente sarebbe legata a due meccanismi: risposta immediata e risposta ritardata (**Fig. 12**).



**Figura 12:** sblocco della meiosi I  
(De Leo-Fasano-Ginelli "Biologia e Genetica", II Ed. Cap.8).

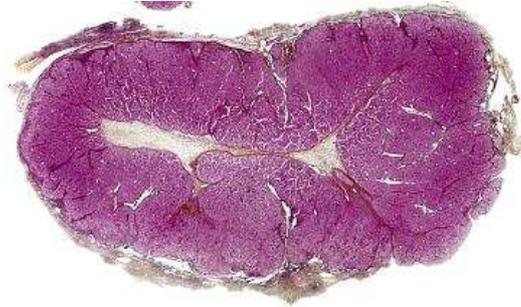
Il primo tipo di risposta induce la fosforilazione della connessina 43, in seguito all'attivazione di MAPK, che induce la ripresa della meiosi grazie alla chiusura delle *gap junction*. Tale processo si completa grazie alla risposta ritardata che prevede prima l'inibizione della traduzione di questa proteina e poi, più a monte, il blocco della trascrizione. Lo scopo finale è, comunque, l'eliminazione delle *gap junction*.

Quindi, in risposta all'aumento delle gonadotropine, durante ogni ciclo riproduttivo, i follicoli di Graaf scoppiano rilasciando nell'ovidutto l'ovocita

maturato circondato dalle cellule del cumulo ooforo che assumono la denominazione di *corona radiata* e questo processo è definito “ovulazione” (**Fig. 7 e Fig. 8**).

Questo processo si presenta solitamente dai 16 ai 12 giorni prima della mestruazione. Quando il follicolo ovarico raggiunge le sue massime dimensioni provoca un rigonfiamento visibile sulla superficie dell’ovaio, che prende l’aspetto di un’area vascolare biancastra chiamata stigma. A questo punto il follicolo è separato dalla cavità peritoneale soltanto da uno strato di cellule sottilissimo. La rottura del follicolo è provocata dall’azione di enzimi litici (plasmina, collagenasi). La pressione del liquido contenuto nel follicolo si riduce gradatamente e perciò la rottura dello stigma non è un fenomeno esplosivo: l’ovocita, circondato da alcune cellule del cumulo ooforo (che vanno a formare la corona radiata), viene espulso lentamente dall’ovaio insieme al liquido antrale. A questo punto le fimbrie dell’ovidotto, che nel periodo dell’ovulazione si sono avvicinate alle ovaie, catturano l’ovocita e lo spingono all’interno dell’ovidotto. Al momento dell’ovulazione anche la membrana propria che separava la teca dalla granulosa si rompe, vascolarizzando la granulosa e formando un coagulo al centro di quel che resta del follicolo ovulato. Inizia così la trasformazione di questa struttura in corpo luteo [18], ghiandola che secreta grandi quantità di progesterone ed estrogeni, importanti per l’annidamento e lo sviluppo dell’embrione; essi inoltre esercitano un meccanismo a *feedback* negativo sulla secrezione delle gonadotropine ipofisarie. Il corpo luteo (**Fig. 13**) raggiunge il maggior grado di differenziamento 7-8 giorni dopo l’ovulazione e successivamente degenera se

non vi è fecondazione. Progesterone ed estrogeni esercitano un *feedback* negativo sulla secrezione di gonadotropine ipofisarie.



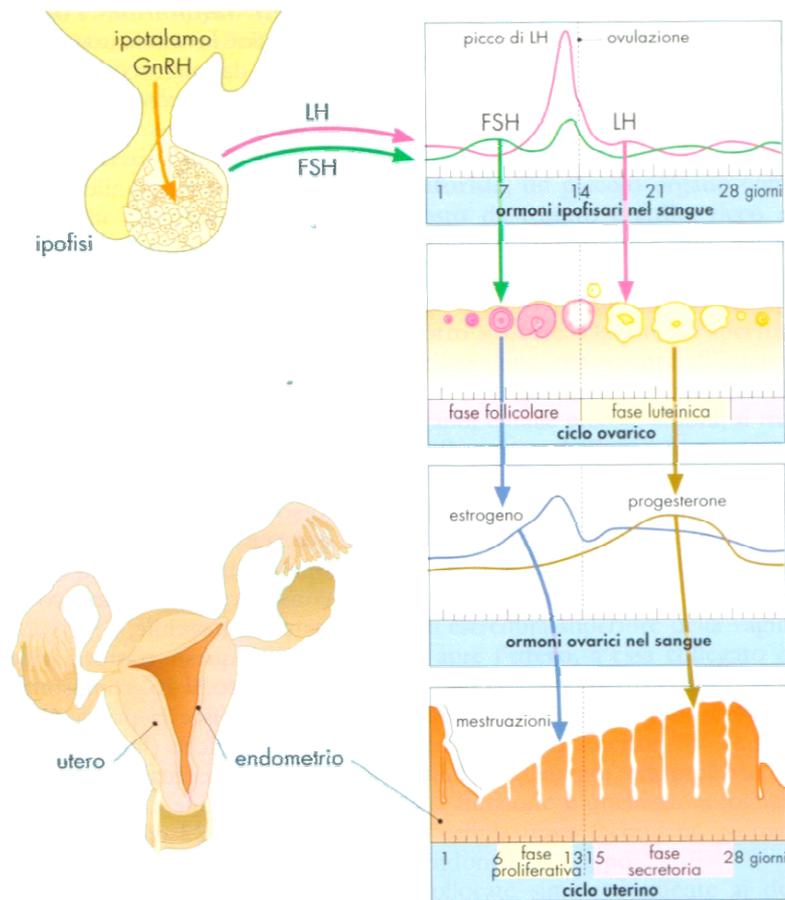
**Figura 13:** corpo luteo

Tutti questi eventi si verificano in seguito al rilascio di ormoni prodotti principalmente dalle gonadi femminili la cui funzione basilare consiste nel differenziamento e nel rilascio di un ovocita maturo e competente pronto per la fecondazione in modo da garantire il meccanismo di propagazione della specie, ma anche da parte dell'asse ipofisi-ipotalamo.

Gli ormoni in questione sono principalmente l'Ormone Follicolo Stimolante (**FSH**), l'Ormone Luteinizzante (**LH**), gli estrogeni ed il Progesterone. I primi due appartengono alla categoria delle Gonadotropine, sono secreti dall'ipofisi sotto stimolazione del Fattore di Rilascio delle Gonadotropine (**GnRH**) prodotto dall'ipotalamo ed hanno un ruolo essenziale nello sviluppo, maturazione e mantenimento delle funzioni delle ovaie. Gli altri due fanno parte della famiglia degli Steroidi, vengono sintetizzati principalmente dall'ovaio in risposta allo stimolo degli ormoni ipofisari e svolgono importantissime funzioni fisiologiche: regolano la maturazione sessuale intervenendo nell'accrescimento dell'apparato genitale, stimolano lo sviluppo

ed il mantenimento dei caratteri sessuali femminili secondari (crescita delle mammelle, distribuzione dei peli, voce, statura, ossatura, distribuzione del grasso), permettono la fecondazione e la gravidanza intervenendo nella regolazione del ciclo mestruale.

Come si può vedere nella **Figura 14** gli ormoni dell'ipotalamo, dell'ipofisi e dell'ovario concorrono ad integrare le diverse attività del ciclo ovarico, uterino e cervicale.



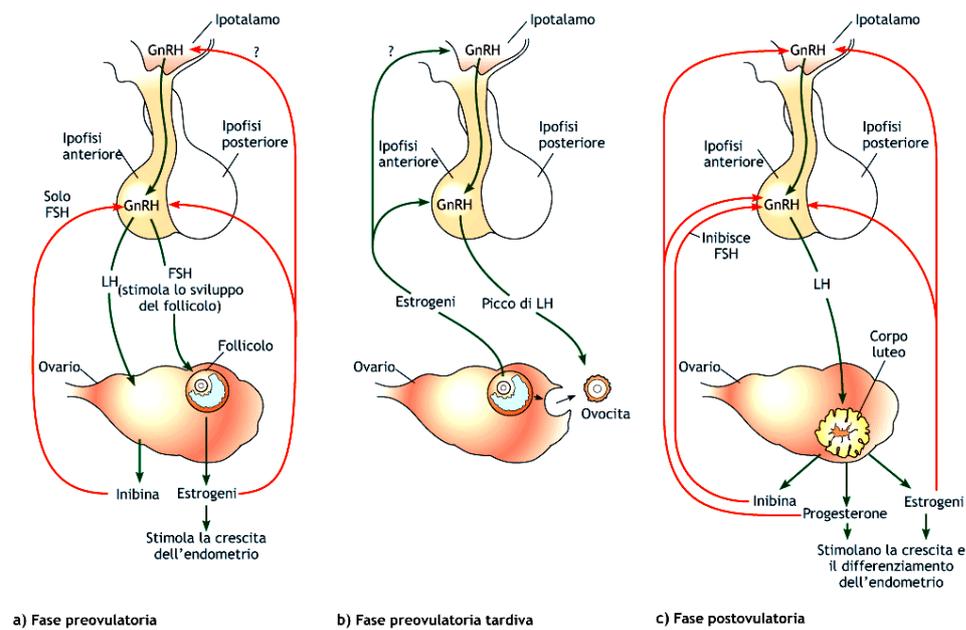
**Figura 14:** regolazione ormonale del ciclo ovarico e del ciclo uterino

Il ciclo viene diviso in due momenti: fase follicolare o proliferativa e fase luteinica o secretiva, ciascuna della durata di circa 14 giorni. Si considera come

primo giorno del ciclo il primo giorno di sanguinamento (mestruo), fenomeno che rappresenta l'eliminazione della mucosa uterina ipertrofica che era pronta ad accogliere una eventuale blastocisti. Il GnRH, prodotto dall'ipotalamo, induce il rilascio delle gonadotropine da parte dell'ipofisi. Comincia così la fase follicolare. Si osserva un iniziale incremento di FSH ed i follicoli che hanno cominciato a crescere rispondono proliferando ulteriormente. L'FSH induce la produzione di estradiolo ed anche un incremento dei recettori delle cellule della granulosa. Dopo poco l'ipofisi, in seguito al picco di estradiolo, comincia a secernere anche l'LH il cui picco induce la ripresa ed il completamento della meiosi I con la formazione del primo globulo polare e l'inizio della meiosi II fino allo stadio di metafase II. Il picco di LH induce l'ovulazione che avviene il 14° giorno del ciclo. A questo punto l'ovocita fermo in metafase II completerà la meiosi II solo se sarà fecondato, in caso contrario, sarà eliminato con le mestruazioni.

Dopo l'ovulazione comincia la fase luteinica o secretiva. Per effetto dell'LH, quello che resta del follicolo all'interno dell'ovario si trasforma in corpo luteo che secreta prevalentemente progesterone, steroide molto importante affinché l'utero si crei l'ambiente adatto all'impianto della blastocisti. Esso agisce stimolando l'ipertrofia sia della parete dell'utero che dei vasi sanguigni, ed ha come altro effetto quello di bloccare la produzione di FSH e quindi di inibire lo sviluppo di altri follicoli. Se l'ovocita non viene fecondato il corpo luteo degenera, si esaurisce la secrezione di progesterone e la mucosa uterina si sfalda. Con il decremento del progesterone, l'ipofisi riceve lo stimolo a secernere di nuovo FSH ed il ciclo ricomincia.

Questi ormoni sessuali femminili consentono quindi la creazione delle condizioni adatte alla fecondazione della cellula uovo ed al suo annidamento nella mucosa uterina (endometrio), eventi che segnano l'inizio della gravidanza. Inoltre, operando a livello dell'ipotalamo e dell'ipofisi, questi ormoni sono in grado non solo di autoregolare il proprio rilascio ma anche di indurre la liberazione del GnRH, dell'FSH e dell'LH. Questo meccanismo di controllo cosiddetto a *feedback* utilizza le informazioni sui livelli di estrogeni e di progesterone circolanti nell'organismo in un dato momento per regolare l'attività ipotalamica ed ipofisaria durante il ciclo mestruale. Il meccanismo di *feedback* può pertanto essere sia positivo che negativo. Il meccanismo di *feedback* positivo aumenta la secrezione ormonale, infatti bassi livelli circolanti di estrogeni segnalano all'ipotalamo la necessità di secernere una maggior quantità di GnRH, che stimola l'ipofisi a rilasciare l'FSH. A sua volta, l'FSH stimola la secrezione degli estrogeni da parte delle ovaie. Al contrario il *feedback* negativo spegne la secrezione ormonale: alti livelli circolanti di estrogeni e di progesterone segnalano all'ipotalamo la necessità di ridurre la secrezione di GnRH. La caduta dei livelli di GnRH segnala all'ipofisi la necessità di ridurre la secrezione di FSH e di LH; tale diminuzione dei livelli di ormoni gonadotropi segnala alle ovaie la necessità di ridurre la secrezione di estrogeni e di progesterone, come mostrato nella **Figura 15**.



**Figura 15:** meccanismi di *feedback* positivo e negativo (De Leo-Fasano-Ginelli “*Biologia e Genetica*”, II Ed. Cap.8).

## 1.1.2 RELAZIONE TRA OVOCITA E CELLULE

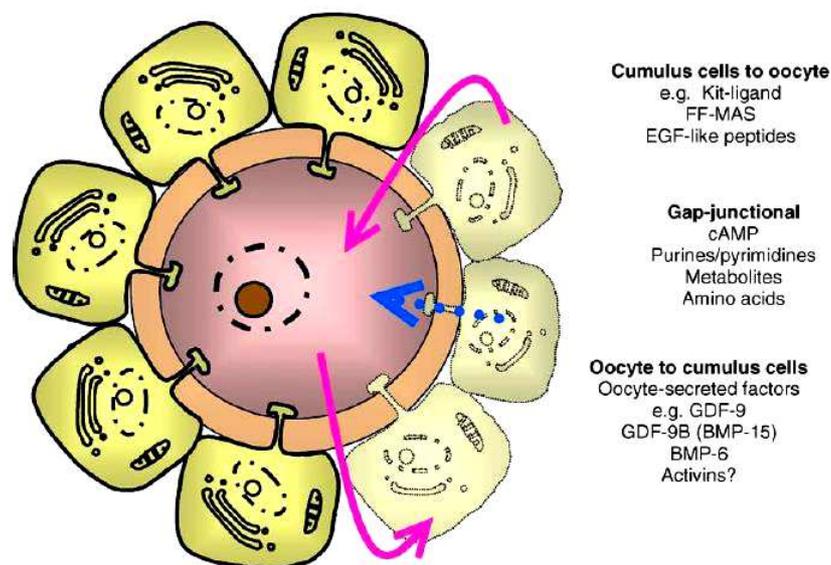
### SOMATICHE

La gametogenesi femminile inizia in uno stadio precoce dello sviluppo embrionale, quando le cellule germinali primordiali migrano verso le gonadi dove, attraverso una serie di divisioni mitotiche, iniziano a proliferare e intraprendono la prima divisione meiotica. Poiché la meiosi inizia in tutte le cellule germinali durante la fase fetale, nelle donne il *pool* ovocitario è già stabilito ancor prima della nascita dell'individuo e non vi è possibilità di rigenerare potenziali gameti femminili negli stadi di sviluppo successivi [19]. Inoltre il numero di follicoli nell'ovaio si riduce drasticamente da 7 milioni a 400.000, passando dallo stadio fetale alla pubertà, e di questi solo 400 circa riusciranno a completare il proprio ciclo di maturazione [20]. Per questi motivi

è importante che la cellula uovo sia adeguatamente protetta e sottratta all'azione di tutti gli agenti di natura chimica o fisica in grado di danneggiarla o di comprometterne lo sviluppo. Questo ruolo di primaria importanza è svolto dalle cellule follicolari che circondano il gamete femminile, provvedendo a creare intorno ad esso un microambiente adatto alla sua corretta maturazione. La capacità di un ovocita maturo di sostenere i vari stadi di sviluppo dal più precoce (la fecondazione) al più tardivo (l'impianto dell'embrione nell'utero) è definita "competenza" e può essere considerata una misura intrinseca della qualità ovocitaria. L'ovocita acquisisce una competenza sempre maggiore in maniera graduale e progressiva man mano che attraversa le varie tappe della follicologenesi, dal momento in cui esso inizia ad accrescersi e le cellule somatiche che lo circondano a differenziarsi [21]. I fattori necessari per lo sviluppo di un ovocita competente sono diversi: la grandezza del follicolo (ovociti che derivano da follicoli di dimensioni maggiori sono più competenti rispetto a quelli ovulati da follicoli più piccoli) [22], la vitalità del follicolo, cioè la sua capacità di proseguire lo sviluppo sfuggendo all'apoptosi [23, 24], la stimolazione ormonale che comporta lo sviluppo follicolare ed infine la comunicazione tra l'ovocita e le cellule del cumulo (CCs) che lo circondano [25].

Inizialmente si pensava che l'ovocita fosse una cellula passiva all'interno del follicolo, completamente soggetta al controllo delle cellule della granulosa. Numerosissime evidenze sperimentali hanno invece dimostrato che esso influenza attivamente lo sviluppo del follicolo promuovendo la sua crescita e dirigendo il differenziamento delle cellule che lo circondano. Le cellule della

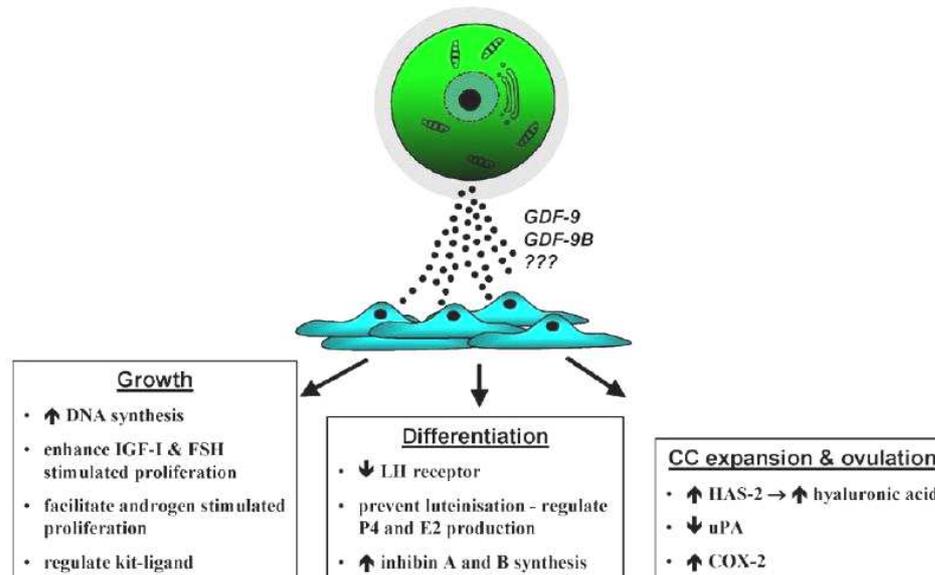
granulosa, allo stesso tempo, sono impegnate nella secrezione di sostanze nutritive, segnali chimici e mucopolisaccaridi che rispettivamente stimolano la maturazione sia del follicolo sia dell'ovocita e costituiscono un rivestimento protettivo attorno al gamete (zona pellucida e cumulo ooforo). Esse inoltre sono responsabili della produzione di enzimi e sostanze antiossidanti che hanno un potenziale impatto sulla sorte ovocitaria [26]. Risulta essere abbastanza evidente, quindi, che ovocita e cellule somatiche dipendono strutturalmente e metabolicamente le une dalle altre e che il processo che porta alla crescita del follicolo ovarico sia dovuto ad un'interazione sinergica tra le componenti cellulari che lo costituiscono. L'instaurarsi di questa relazione, indispensabile per il corretto sviluppo ed il benessere del futuro embrione [27], dipende essenzialmente da due meccanismi di comunicazione cellulare mediati rispettivamente da giunzioni di tipo *gap* e da fattori paracrini (Fig. 16).



**Figura 16:** la comunicazione tra oocita e cellule somatiche è essenziale per la crescita e lo sviluppo sia del gamete femminile che del follicolo. Questo asse di comunicazione bidirezionale è mediato da fattori paracrini (freccie continue) e dallo scambio di piccole molecole tramite giunzioni *gap* (freccia tratteggiata).

Le cellule somatiche (in particolar modo le cellule del cumulo) presentano infatti dei prolungamenti citoplasmatici, che penetrano gli involucri ovocitari, alle cui estremità sono localizzate le giunzioni *gap*; esse consentono il passaggio di ioni, metaboliti e amminoacidi di basso peso molecolare necessari per lo sviluppo dell'ovocita, mentre le molecole più grandi vengono trasportate mediante meccanismi di endocitosi mediata da recettore [28]. Le connessioni tra l'ovocita e le cellule della granulosa sono possibili grazie alla presenza della connessina 37 ed una omologa connessione è mantenuta tra le cellule della granulosa, nelle quali è invece presente la connessina 43. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che in topi deficienti per il gene della connessina 37 non si ha la formazione di follicoli di Graaf, fallisce il processo ovulatorio, si sviluppano molti corpi lutei ed inoltre l'accrescimento dell'ovocita si arresta prima che esso raggiunga la competenza [29]. Ciò dimostra che i meccanismi di comunicazione intercellulare tramite giunzioni *gap* regolano e coordinano in maniera critica il complesso *set* di interazioni cellulari richiesti affinché l'oogenesi e l'ovulazione vadano a buon fine [30].

Il secondo meccanismo di comunicazione tra oocita e cellule della granulosa è mediato da fattori paracrini, secreti da entrambi i tipi cellulari, che giocano un ruolo fondamentale nel dirigere la crescita ed il differenziamento dei follicoli ovarici così come altre funzioni cellulari importanti; ad esempio, è stato dimostrato che i fattori paracrini secreti dall'ovocita sono indispensabili affinché le cellule del cumulo si espandano e, soprattutto, mantengano il proprio fenotipo (**Fig. 17**) [28].



**Figura 17:** i fattori paracrini solubili prodotti dall'ovocita regolano aspetti fondamentali delle funzioni delle cellule somatiche quali crescita, differenziamento, espansione delle cellule del cumulo ed ovulazione.

La maggior parte degli studi riguardanti questo settore hanno focalizzato la loro attenzione su alcuni membri della superfamiglia dei *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ), quali *growth differentiation factor 9* (GDF9), *bone morphogenetic protein 15* (BMP15) ed altri. Il grande interesse rivolto verso questi fattori paracrini è dovuto principalmente al fatto che un'alterazione dell'espressione dei loro rispettivi geni compromette notevolmente le funzioni ovariche e la fertilità [28, 29, 30 e 31]. Studi effettuati su topi *knockout* hanno provato che delezioni a livello di tali fattori, coinvolti nella proliferazione delle cellule della granulosa [32], in particolare del GDF9, inducono la produzione di un fenotipo sterile in cui lo sviluppo dei follicoli si arresta, ottenendo così un unico strato di cellule a delimitare un'ovocita di grandi dimensioni [33] e ciò dimostra come le cellule della granulosa necessitano del fattore GDF9 per la propria proliferazione. Questa comunicazione di tipo *feedback* tra oocita e cellule somatiche è necessaria anche per coordinare la ripresa della meiosi da

parte del gamete femminile ed il processo di ovulazione. È stato dimostrato che gli ovociti immaturi o non competenti non interagiscono in maniera appropriata in questo sistema di comunicazione e non vengono ovulati [34, 35, 36]. Il processo ovulatorio può essere quindi considerato come un punto di controllo attraverso il quale soltanto gli oociti competenti ed in buona salute sono in grado di governare il proprio rilascio garantendo così una sorta di selezione naturale degli ovociti migliori tra tutti quelli presenti nel *pool* [37].

Nonostante questi studi abbiano messo in evidenza importanti aspetti delle relazioni tra oocita e cellule somatiche, resta ancora molto da indagare riguardo alle *pathway* che vengono selettivamente attivate nel corso di questi eventi. Dal momento che questo asse di comunicazione bidirezionale sembra essere un prerequisito per garantire un corretto sviluppo e non compromettere la fertilità, risulta essere di estrema importanza conoscere e studiare le basi molecolari di tali eventi.

### **1.1.3 ACCUMULO DI mRNA DURANTE LO SVILUPPO DELL'OVOCITA**

La cellula uovo, prodotta durante l'oogenesi, contiene nel citoplasma una riserva di RNA (mRNA, rRNA, tRNA, *small RNAs*), enzimi, organelli e metaboliti richiesti per i processi ovocita-specifici e per il metabolismo, o accumulati per essere utilizzati successivamente durante le prime fasi dello sviluppo post-zigotico, prima che abbia inizio l'espressione del genoma embrionale (4-8 cellule nell'uomo) con la corrispondente autonomia biologica dell'organismo. La maturazione dell'ovocita non consiste dunque in un

semplice incremento della massa cellulare ma anche in cambiamenti qualitativi e quantitativi di molecole chiave per il metabolismo, la struttura e l'informazione. Durante la meiosi la cellula uovo trascrive in modo attivo quei geni che codificano per proteine che intervengono nella regolazione dei processi "ovocita specifici" e del metabolismo cellulare quando non sono ancora attivi i nuclei dello zigote e dei primi blastomeri da esso derivati. La produzione della gran parte dei messaggeri avviene dopo lo stadio di diplotene della meiosi I, in una fase di arresto prolungato nota come "*dictyate*" [38]. Alcuni mRNA sono di uso immediato ed altri vengono conservati per le prime fasi di sviluppo. I trascritti accumulati dall'ovocita sono definiti mRNA materni e rimangono quiescenti sino a quando non sono attivati durante l'ovulazione o dopo la fecondazione [39]; si ha dunque un controllo dell'espressione dei messaggeri nei diversi stadi di sviluppo. Le prime divisioni dello zigote avvengono con un ritmo regolare grazie alla continua sintesi di fattori di crescita, componenti della membrana cellulare, componenti del citoscheletro, fattori che intervengono nella divisione cellulare e altre proteine a partire dagli mRNA materni [39]. La disregolazione di alcuni di questi trascritti accumulati potrebbe alterare la competenza ovocitaria contribuendo ancor più ad aumentare i problemi correlati all'infertilità femminile.

## **1.2 INFERTILITA'**

L'infertilità è un problema sociale che interessa ogni anno molte coppie in età riproduttiva.

Con il termine infertilità si intende quella condizione in cui una coppia non riesce ad avere un figlio dopo circa un anno di rapporti sessuali non protetti, avvenuti in fase ovulatoria [40]. Quest'intervallo di tempo deve essere ridotto a sei mesi nelle coppie meno giovani, in quanto sia nella donna sia nell'uomo la fecondità ha un apice intorno ai 25 e declina gradualmente dopo i 35 anni.

Ad oggi questo problema affligge dal 10% al 20% delle coppie in età fertile e la fecondazione in vitro (IVF) rappresenta una soluzione possibile. Infatti, sono sempre più numerose le coppie che si rivolgono agli specialisti del settore per ottenere una gravidanza. Il fenomeno sembra in aumento per diversi motivi: sia perché la coppia decide di avere un figlio sempre più tardi, sia per l'influenza di alcuni fattori ambientali sfavorevoli, come l'inquinamento. L'impossibilità di avere un figlio, oltre a rappresentare un problema di carattere medico, comporta anche aspetti, non trascurabili, di ordine psicologico e comportamentale. Non ci sono regole di natura biologica o medica che possano escludere a priori la presenza contemporanea di disturbi del sistema riproduttivo in entrambi i partner, tanto è vero che problemi comuni ad entrambi sono diagnosticati nel 15-30% di coppie infertili. L'infertilità può essere distinta in **primaria** quando la coppia non ha mai avuto gravidanze, e **secondaria** quando si instaura dopo un periodo di documentata fertilità. Le cause della sterilità possono essere legate ad una condizione patologica della donna, dell'uomo o di entrambi [41]. E' possibile tuttavia che al termine del più accurato *iter* diagnostico non si giunga ad individuare un fattore capace di impedire la riproduzione. Si parla in questo caso di sterilità da causa inspiegata o **idiopatica**, la cui incidenza viene oggi calcolata intorno al 5 -10% di tutte le

forme di sterilità. E' opportuno tenere presente che la prognosi di questo tipo di sterilità è talora peggiore ai fini del recupero della fertilità, rispetto ai casi in cui è possibile individuare un preciso fattore causale. Comunque, tra le possibili cause di infertilità si indicano essenzialmente i seguenti fattori:

1. Fattore maschile

2. Fattore femminile

- Endometriosi ed endometrite;
- Fattore tubarico;
- Stress ossidativo;
- Qualità ovocitaria;
- Età materna avanzata;

3. Altre cause.

Come detto in precedenza, una possibile soluzione per molti di questi fattoti è l'IVF (*in vitro fertilization*). Tuttavia, nonostante gli enormi progressi compiuti nei cicli di fecondazione in vitro, molte coppie sono ancora oggi soggette ad un elevato numero di insuccessi e il tasso di nascite dopo l'IVF è ancora poco più del 15% [42].

Sebbene le ragioni di ciò sono subdole e complesse, la scarsa qualità degli embrioni, che è a sua volta condizionata dalla scarsa qualità dei gameti, è ovviamente un criterio importante.

Abbiamo visto precedentemente che nelle donne il numero di ovociti diminuisce con l'avanzare dell'età; questo declino della fertilità femminile in relazione all'età rappresenta una condizione di subfertilità piuttosto rilevante dal momento che le donne vengono definite in "avanzata età riproduttiva" già

dopo i 35 anni a causa del dimezzamento della probabilità di gravidanza. La fertilità della donna comincia infatti a ridursi dopo i 30 anni e decresce rapidamente soprattutto tra i 37 e i 40 anni, a causa della progressiva diminuzione del numero di ovociti presenti nel *pool* [43], sebbene si pensi che anche la riduzione della qualità dell'ovocita e delle cellule follicolari, associata ad esempio alla presenza di aneuploidie che causano l'aumento degli aborti spontanei, giochi un ruolo importante a riguardo [44, 45, 46].

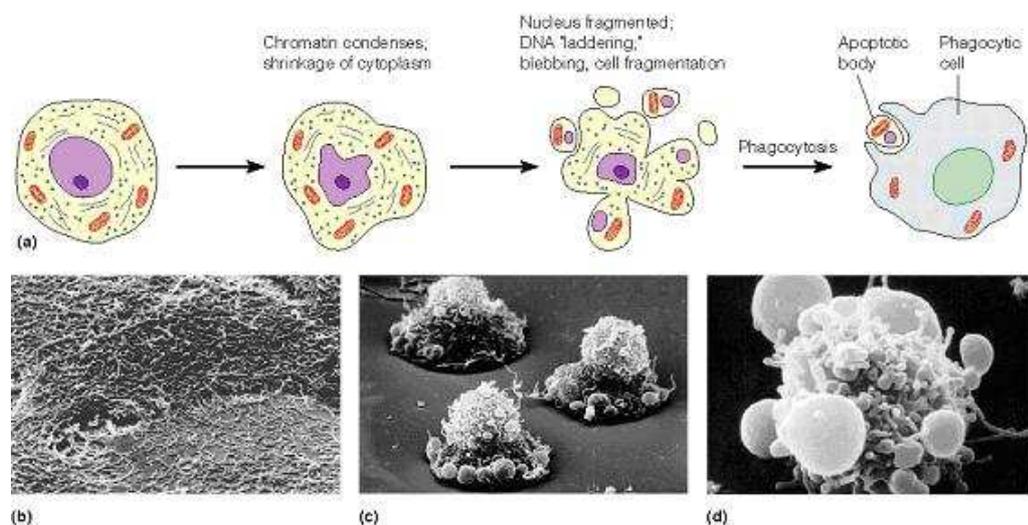
Le osservazioni emerse da alcuni studi testimoniano che il principale bersaglio dell'invecchiamento riproduttivo è rappresentato dall'ovocita e dalle cellule che costituiscono il follicolo ovarico. In particolare è stato messo in evidenza che la presenza di alterazioni morfologiche e funzionali a livello di queste cellule porta ad un fenotipo sterile. È facile infatti immaginare che follicoli contenenti ovociti e cellule che esibiscano delle alterazioni, risultino ostacolati nella produzione di gameti competenti per la fecondazione e lo sviluppo embrionale.

### **1.2.1 APOPTOSI**

L'apoptosi, o "morte cellulare programmata", è un fenomeno biologico critico che consente l'eliminazione fisiologica di cellule terminalmente differenziate, senescenti oppure in condizioni patologiche.

I cambiamenti strutturali e molecolari tipici delle cellule che vanno incontro ad apoptosi consentono di distinguere questo tipo di morte cellulare dalla necrosi. Mentre quest'ultima coinvolge un gruppo di cellule che muore contemporaneamente [47], l'apoptosi interessa sempre una singola cellula

circondata da altre che continuano a vivere [48] e porta al graduale disfacimento della cellula attraverso la ritrazione degli pseudopodi, riduzione del volume cellulare (*pyknosis*) dovuta alla condensazione del citoplasma, condensazione della cromatina, frammentazione del nucleo (*karyorhexis*), nessuna o minime modificazioni degli organelli citoplasmatici, *blebbing* della membrana plasmatica (evaginazioni della membrana che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle) ed il mantenimento dell'integrità di quest'ultima sino agli ultimi stadi del processo. Lo stadio finale sarà la frammentazione della cellula nei cosiddetti **corpi apoptotici**, preceduta dall'esposizione sulla faccia esterna della membrana plasmatica della fosfatidilserina, un segnale necessario affinché avvenga la fagocitosi dei corpi apoptotici da parte di cellule specializzate (Fig. 18) [49, 50 51]. Il risultato finale sarà un'eliminazione pulita, senza alcuna alterazione dell'architettura strutturale del tessuto e senza l'innesco di un processo infiammatorio (caratteristico della necrosi).

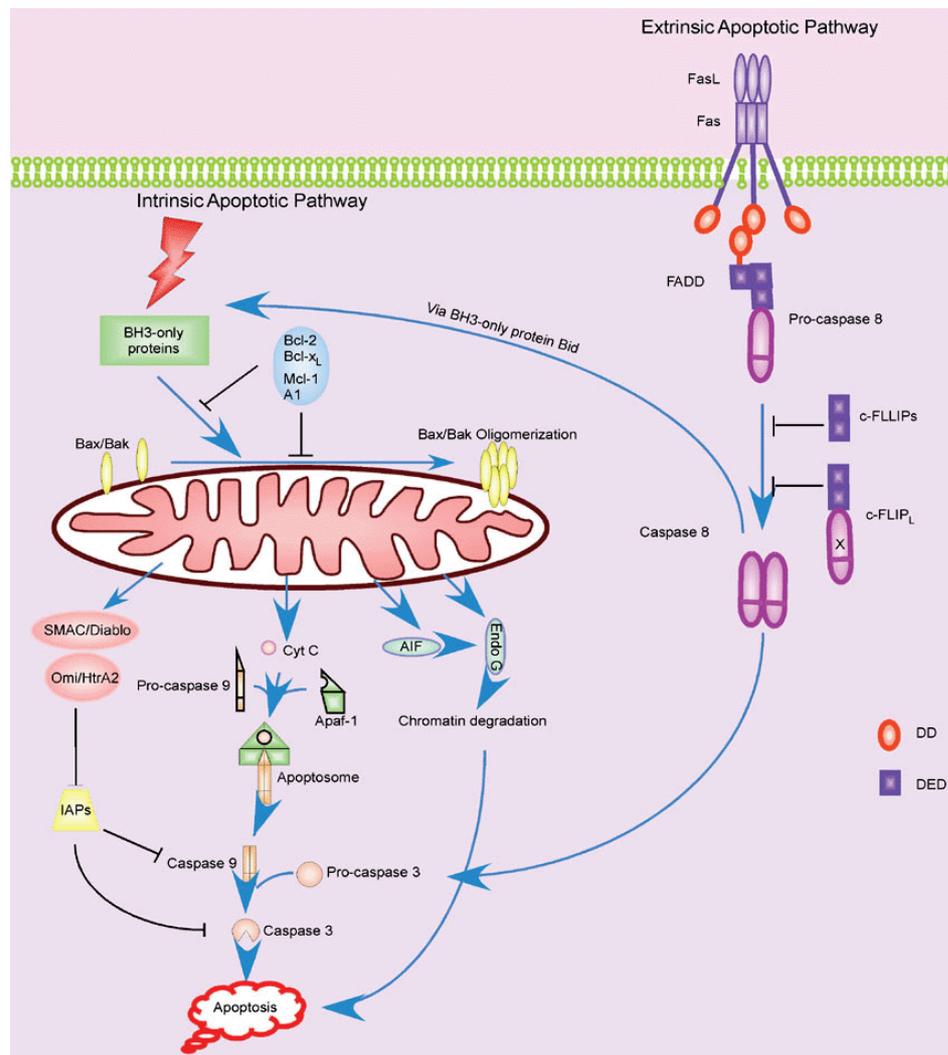


**Figura 18:** tipici cambiamenti morfologici di una cellula che va incontro ad apoptosi.

Alla base dello sviluppo e della sopravvivenza degli organismi pluricellulari, l'apoptosi svolge un ruolo tanto essenziale quanto gli stessi meccanismi di proliferazione e crescita cellulare. Essa infatti interviene in diverse fasi dello sviluppo embrionale per consentire l'eliminazione di cellule soprannumerarie, così come mantiene l'omeostasi cellulare nei tessuti adulti. Si tratta di un processo fisiologico finemente controllato da *network* complesse la cui alterazione può portare all'insorgenza di patologie quali malattie autoimmuni, neurodegenerative o cancro [52]. Durante lo sviluppo, le cellule sono prodotte in eccesso. Strutture specifici di ogni organo sono prodotti dalla ablazione selettiva di alcune cellule per apoptosi. Il numero di cellule in un organo è quindi finemente controllato da un equilibrio tra cellule proliferazione e morte cellulare. L'esempio classico è la morfogenesi delle dita che comporta la morte per apoptosi delle cellule negli spazi inter-digitali durante l'embriogenesi. Allo stesso modo, il sistema nervoso in via di sviluppo dispone di un grande eccesso di neuroni, oltre la metà dei quali saranno eliminati per apoptosi al fine di stabilire un corretto collegamento tra le reti neurali. Lo sviluppo del sistema riproduttivo non fa eccezione: per esempio i condotti mulleriani che si sviluppano nell'utero, le tube di Falloppio e la vagina sono inizialmente presenti sia nel feto di sesso maschile sia nel feto di sesso femminile, ma vengono persi nel maschio attraverso l'apoptosi [53].

A causa della sua rilevanza in campo biomedico, risulta di estrema importanza comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'apoptosi, ed è in questa prospettiva che il nostro gruppo si è occupato in passato di caratterizzare in maniera dettagliata le Omiche del Macchinario Apoptotico (MA) in *Homo*

*Sapiens* [4]. Il classico fenotipo morfologico dell'apoptosi descritto sopra è il risultato finale di una complessa cascata di eventi molecolari ben caratterizzati. In generale le cellule vanno incontro ad apoptosi attraverso due *pathways* principali: quella **intrinseca** (detta anche “via mitocondriale”) e quella **estrinseca** (o “via dei recettori di morte”) (**Fig. 19**).



**Figura 19:** *pathways* molecolari dell'apoptosi.

Sono stati identificati specifici geni che codificano proteine responsabili della regolazione di tale processo, che possono essere suddivise in due classi a

seconda della funzione svolta: quelle che ritardano o inibiscono l'apoptosi [e.g. *B-cell CLL/lymphoma 2* (BCL2), *BCL2-like 1* (BCL2L1)] e quelle che la inducono [e.g. caspasi, *BCL2-associated X protein* (BAX), *BCL2-antagonist/killer 1* (BAK1), *BH3 interacting domain death agonist* (BID)] [49]. I meccanismi molecolari dell'apoptosi convergono principalmente nell'attivazione delle **caspasi**, una famiglia di proteasi cisteina-dipendenti in grado di propagare il segnale di morte attraverso la cellula, mediante il taglio di proteine chiave nei processi cellulari [54]. Durante lo stadio fisiologico normale della cellula, le caspasi vengono sintetizzate come pro-enzimi inattivi, che possono rapidamente essere attivati da un taglio autoproteolitico o da un taglio da parte di altre caspasi. Sono stati identificati e caratterizzati diversi membri della famiglia delle caspasi, sette delle quali in grado di mediare l'apoptosi (**Tabella 1**).

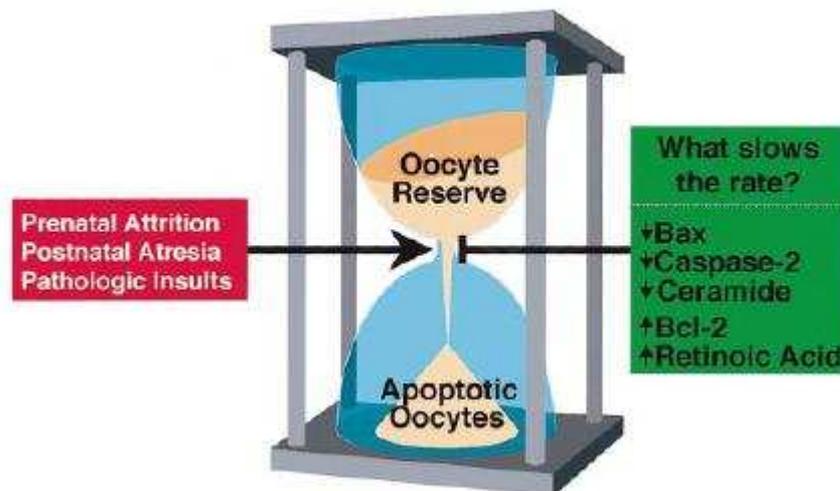
Name of caspase	Other names	Tetrapeptide preference	Function	Size of pro-domain	Pro-domain molecule	Adaptor protein
Caspases important for execution and signalling events of apoptosis						
Caspase-2	ICH-1/mNedd2	DEHD/ VDVAD	Initiator	Long	CARD	RAIDD
Caspase-8	MACH/FLICE/ Mch5	LETD/ETD	Initiator	Long	DED	FADD
Caspase-9	ICE-LAP6/ Mch6	LEHD	Initiator	Long	CARD	Apaf-1
Caspase-10	Mch4, FLICE2	IEAD	Initiator	Long	DED	FADD
Caspase-3	CPP32/ Apopain/Yama	DMQD/ DEVD	Effector	Short		None
Caspase-6	Mch2	VEID/VEHD	Effector	Short		None
Caspase-7	Mch3/ICE- LAP3/CMH-1	DEVD	Effector	Short		None
Caspases involved in control of inflammation						
Caspase-1	ICE	WEHD/ YEVD		Long	CARD	
Caspase-4	TX/ICH-2/ ICE <sub>REL-II</sub>	LEVD/(W/L) EHD		Long	CARD	
Caspase-5	TY/ICE <sub>REL-III</sub>	(W/L)EHD		Long		
mCaspase-11	ICH-3			Long		
mCaspase-12				Long		
Caspase-13	ERICE			Long		
mCaspase-14	MICE			Short		None

Tabella 1: famiglia delle caspasi.

Il termine apoptosi comunque è stato coniato da Kerr negli anni '70 del secolo scorso [55, 56] anche se, in effetti, già nel 1885 Walther Flemming osservò su campioni di ovario di coniglio segni di degenerazione cellulare che oggi associamo al fenomeno dell'apoptosi [57].

La morte cellulare programmata è un evento che si verifica continuamente nelle ovaie durante tutto il periodo di vita fetale, neonatale e *post*-neonatale e coinvolge il 99% delle cellule della linea germinale femminile. Per molti aspetti le cellule germinali femminili possono essere considerate come granelli di sabbia all'interno di una clessidra, in cui il continuo passaggio degli ovociti al di fuori del *pool* presente al momento della nascita, funziona come un "orologio biologico femminile" (Fig. 20). L'esaurimento di questa riserva

ovocitaria, infatti, porta irreversibilmente ed inevitabilmente all'infertilità ed alla senescenza ovarica, che nelle donne è definita menopausa. Dunque comprendere come e perché il corpo femminile crei un numero così elevato di cellule germinali, solo per eliminarle, è tassativo. Numerosi studi sull'apoptosi del gamete femminile, condotti in organismi inferiori ed in topi geneticamente modificati (manipolati in modo che non codifichino le proteine che regolano l'apoptosi) hanno consentito di effettuare nuove ipotesi e di studiare in maniera approfondita i meccanismi alla base di tale processo.

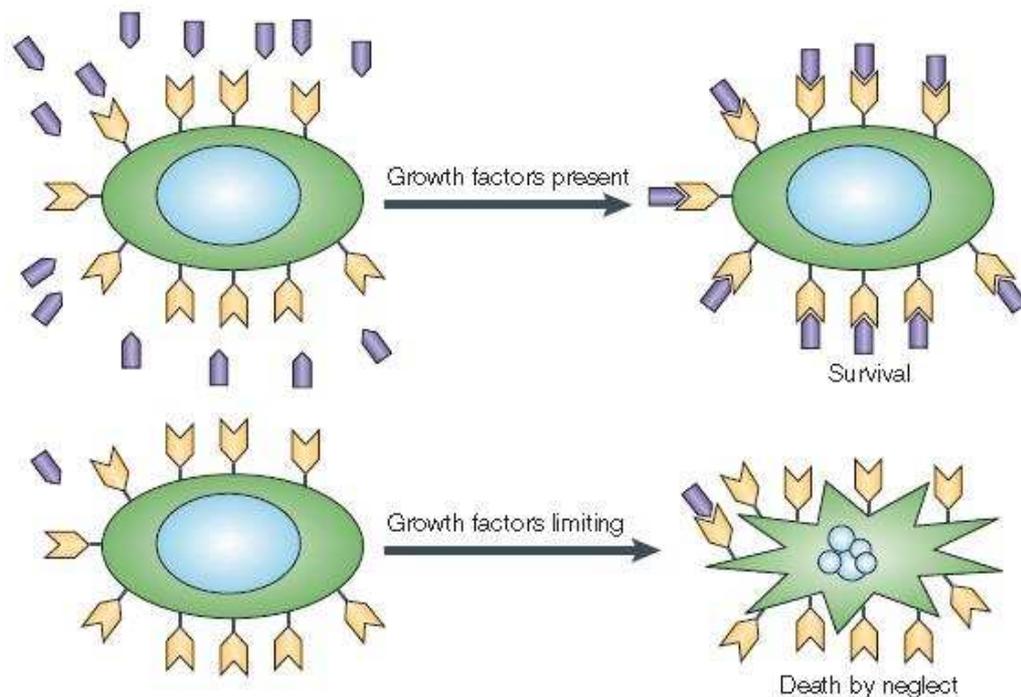


**Figura 20:** analogia tra la perdita degli ovociti attraverso apoptosi ed il passaggio dei granelli di sabbia in una clessidra per definire l'orologio biologico femminile. Possiamo considerare che ogni granello del serbatoio superiore sia un ovocita sano: così come il passaggio di tutti i granelli di sabbia dalla parte superiore a quella inferiore indica che è trascorso un determinato periodo di tempo, la velocità con cui gli ovociti sani passano irreversibilmente a far parte del *pool* apoptotico per diverse cause (*box* rosso) stabilisce per quanto tempo funzionerà l'orologio biologico femminile. Questo evento è controllato in maniera accurata da una serie di molecole che fanno parte di un programma di morte cellulare evolutivamente conservato (*box* verde).

L'obiettivo principale di ogni ciclo riproduttivo femminile è quello di produrre ovociti competenti per la fecondazione e lo sviluppo dell'embrione ed inoltre di preparare gli organi accessori (ovidotto ed utero) ad affrontare la gestazione e la nascita di un nuovo individuo. L'ovocita scelto per intraprendere

l'ovulazione e la potenziale fecondazione dovrà affrontare vari competitori che incontrerà lungo il suo cammino e sopravvivere a quelli che possiamo definire diversi meccanismi di selezione. Sono state avanzate tre ipotesi per spiegare le basi dell'apoptosi delle cellule della linea germinale femminile: (1) morte per "negligenza" (*death by neglect*), (2) morte per "imperfezione" (*death by defect*) e (3) morte "altruistica" (*death by self-sacrifice*).

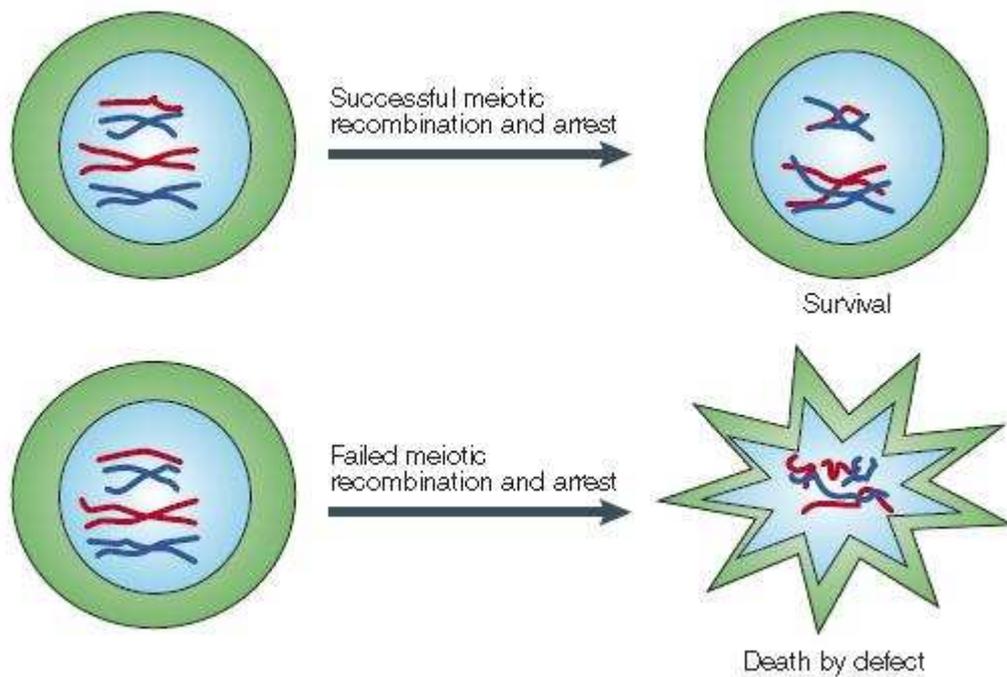
La competizione che si stabilisce tra le cellule in presenza di limitate quantità di fattori di crescita è una condizione che sembra svolgere un ruolo chiave in alcune fasi dell'organogenesi, ad esempio durante la formazione del sistema nervoso [58]. Le cellule che ricevono un sostentamento insufficiente dal microambiente che le circonda, infatti, vanno incontro ad apoptosi (**Fig. 21**).



**Figura 21:** l'apoptosi è inibita dalla presenza di fattori di crescita che agiscono legandosi a recettori localizzati sulla superficie delle cellule germinali; tuttavia, se la loro disponibilità è limitata, i segnali intracellulari di sopravvivenza non reprimono più l'apoptosi e di conseguenza si innesca la morte per carenza di nutrimento.

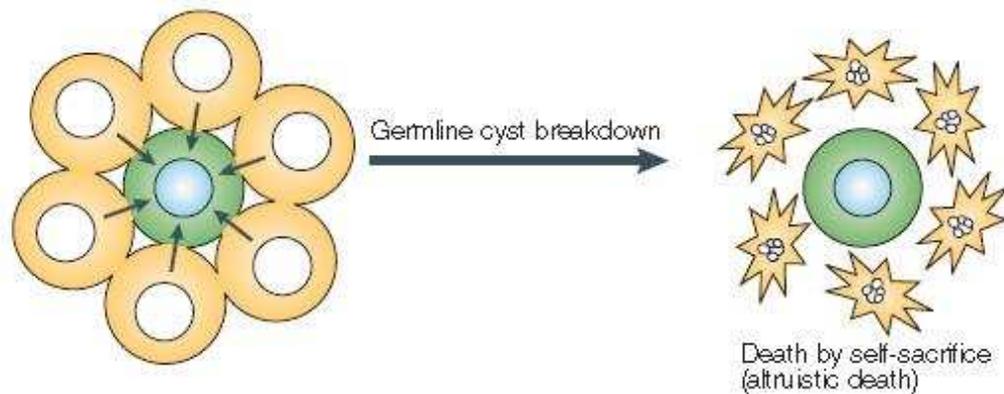
Studi condotti su topi mutanti, in cui la delezione dei geni che codificano per i fattori di sopravvivenza delle cellule germinali [e.g. *stem cell factor* (SCF)] portava ad un fallimento nel processo di gametogenesi, hanno provato che la morte per “negligenza” può interessare anche le cellule della linea germinale. Inoltre è stato dimostrato sperimentalmente che cellule di ovario murine coltivate in assenza di siero o citochine portavano ad una rapida induzione dell’apoptosi nelle cellule germinali; questo evento poteva essere vanificato aggiungendo fattori di sopravvivenza esogeni nel mezzo di coltura [59]. Tuttavia, nonostante le numerose evidenze sperimentali riguardo questa prima ipotesi, ancora non si sa con certezza se, effettivamente, questo sia un meccanismo di morte normalmente messo in atto nel corso dell’oogenesi.

Un’altra teoria avanzata per spiegare perché così tante cellule germinali vengono perse durante lo sviluppo dell’ovario suggerisce che l’apoptosi si verifichi per eliminare gli ovociti che mostrano anomalie cromosomiche (**Fig. 22**). L’idea è che ci sia una sorta di controllo di qualità, un meccanismo in grado di identificare e rimuovere gli ovociti imperfetti e conservare invece quelli competenti ed adatti alla formazione dei follicoli primordiali.



**Figura 22:** gli ovociti che completano con successo il processo di ricombinazione meiotica si arrestano in profase I e vengono utilizzati per la formazione dei follicoli primordiali; nel caso in cui questo *step* fallisca i gameti andranno incontro ad apoptosi.

Secondo la terza ipotesi, l'apoptosi massiva che si verifica nell'ovario nel corso dell'oogenesi potrebbe essere dovuta ad un comportamento altruistico da parte delle cellule che circondano l'oocita. Evidenze sperimentali hanno mostrato che, durante le fasi iniziali dell'oogenesi in molti Invertebrati, gli ovociti vengono circondati da cellule nutrici e restano connessi ad esse grazie alla presenza di ponti citoplasmatici, formando le cosiddette **cisti germinali** [20, 60, 61, 62] (Fig. 23).



**Figura 23:** cisti germinali formate dalle cellule nutrici (in giallo) che trasportano macromolecole (freccie) all'interno di una cellula germinale che si differenzierà in oocita (in verde).

Nelle cisti germinali, le cellule nutrici trasportano macromolecole all'interno di una cellula germinale affine (probabilmente per coordinare gli eventi meiotici e di sviluppo) il cui destino è quello di differenziarsi in oocita. Contemporaneamente alla formazione del follicolo, la cisti si disgrega attraverso un meccanismo che prevede l'apoptosi delle cellule nutrici, le quali quindi compiono una sorta di sacrificio morendo a vantaggio del gamete. Sebbene non ci siano evidenze dirette del contributo di queste cellule come negli Invertebrati, nei Vertebrati inferiori sono stati identificati simili *clusters* di cellule che vanno incontro ad apoptosi ma il destino ed il ruolo di queste cisti germinali resta ancora poco chiaro [63, 64]. Alla luce di queste osservazioni bisogna comprendere il vero ruolo delle cisti germinali nei Mammiferi. Forse il trasferimento di nutrienti dalle cellule nutrici potrebbe essere necessario per assicurare che l'oocita sopravviva da quando si distacca fisicamente da esse fino al momento in cui viene nuovamente circondato dalle cellule della granulosa durante la formazione del follicolo primordiale [61].

Nonostante le proposte emerse dai numerosi studi per comprendere i meccanismi dell'apoptosi nelle cellule germinali, ad oggi non sappiamo ancora perché le donne producano un numero così elevato di tali cellule durante la gametogenesi, visto che i due terzi o più verranno persi prima della nascita in seguito ad apoptosi. Ed ancora ci si chiede perché il 95% degli ovociti che sopravvivono a questa prima fase muoiono successivamente durante il periodo di vita *post*-natale. La risposta sta probabilmente, almeno in parte, nella supposizione che gli ovociti creati non siano tutti uguali. In questo modo, l'apoptosi può essere vista in un contesto analogo a quello della teoria darwiniana dell'evoluzione, la quale proclamava la sopravvivenza del più adatto [65]. Pertanto, soprattutto nelle specie come la nostra in cui ad ogni ciclo viene ovulato un singolo ovocita, l'eliminazione tramite apoptosi dei gameti che presumibilmente sono di qualità inferiore potrebbe massimizzare le probabilità di un successo riproduttivo.

Alla luce di questi studi possiamo pensare che l'apoptosi degli ovociti e delle cellule somatiche agisca come meccanismo di selezione tra i follicoli destinati ad andare incontro ad atresia e quelli che resteranno disponibili per il processo di ovulazione, in modo da garantire che solo gli ovociti migliori vengano messi a disposizione per l'eventuale fecondazione.

### **1.3 MACCHINARI MOLECOLARI**

L'Apoptosi proprio per la sua complessità è definito, insieme all'Apparato Generale di Trascrizione, un **macchinario molecolare**. Dove per macchinario molecolare si intende un complesso multimerico, discreto e

definibile, responsabile di particolari fenomeni biologici. Questi complessi interagiscono gli uni con gli altri, nello spazio e nel tempo, legandosi a regioni comuni o distinte di DNA, per creare una network di interazioni proteina-proteina e proteina-DNA, permettendo in questo modo ad uno specifico sistema di funzionare.

Questo intricato sistema, che richiede l'interazione di molte proteine con il DNA genomico mediante determinati processi cellulari quali trascrizione, processamento dell'mRNA, replicazione del DNA, ricombinazione, riparazione e morte cellulare, è reso ancor più complesso dalla necessità di un controllo molto accurato al fine di assicurare una corretta crescita cellulare e un corretto differenziamento [6].

Questi macchinari sono di fondamentale importanza in quanto quasi tutti i fenomeni biologici, dal normale sviluppo e differenziamento cellulare, all'anomalo comportamento delle cellule cancerose, ai processi della memoria e dell'apprendimento, necessitano del loro corretto funzionamento.

Proprio per la complessità di questi macchinari, si può facilmente intuire che non si può concentrare l'attenzione solo sul funzionamento dei singoli geni o delle singole proteine, in quanto questi quasi mai funzionano in maniera solitaria. Ecco come alla biologia tradizionale si preferisce la biologia dei sistemi per cercare di spiegare le proprietà ed il comportamento dei sistemi biologici complessi come i macchinari molecolari.

Nonostante svariati studi sulla funzione di ogni singolo gene o di ogni singola proteina abbiano portato alla scoperta di numerosi principi biologici, c'è ancora molto da scoprire sull'Apparato Generale di Trascrizione e il Macchinario

Apoptotico che stanno alla base, rispettivamente, della crescita e della morte cellulare, a livello del gamete femminile. Proprio per il ruolo fondamentale svolto da questi intricati sistemi, il loro studio risulta di estrema importanza.

### **1.3.1 APPARATO GENERALE DI TRASCRIZIONE**

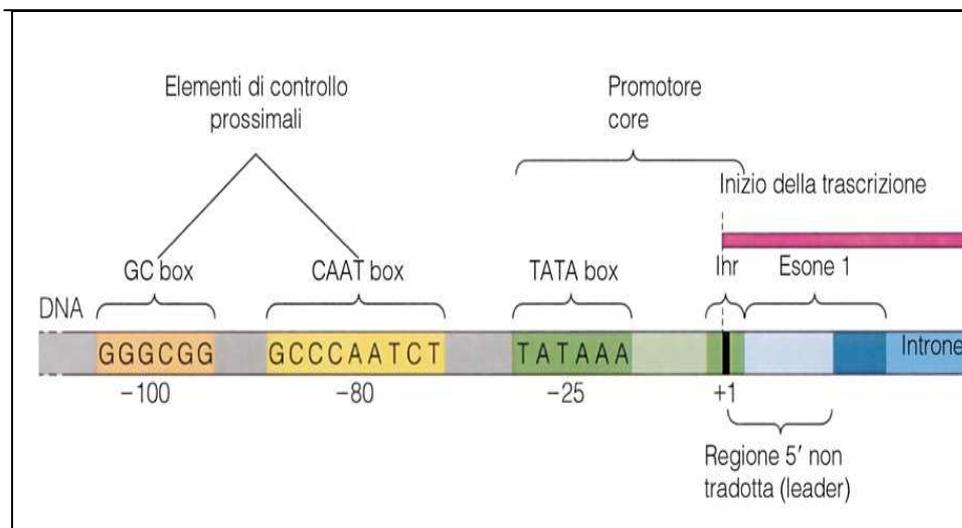
Un altro macchinario molto studiato in tutte le sue parti è l'Apparato Generale di Trascrizione. Questo grande complesso macromolecolare, costituito da più di un centinaio di proteine (indicate in modo generico come *General Transcription Factor*, **GTF**) che cooperano nell'assemblare il Complesso di Preinizio (PIC) a livello del promotore di un gene, è il protagonista del processo di regolazione dell'espressione genica [66].

L'inizio della trascrizione, infatti, rappresenta il punto di controllo più importante e regolato delle *pathways* che connettono il genotipo al fenotipo. Esso è controllato da proteine che agiscono in *trans*, chiamate *Transcription Factor* (TF), che si legano su siti di regolazione *cis*-agenti nel DNA, il tutto coordinato da alcuni enzimi chiave quali le RNA-polimerasi che, nel caso degli Eucarioti, sono 3 (RNA-pol I, II, III) e presiedono all'espressione di altrettanto differenti classi geniche (classe I, II, III). [67]

Per tutti questi fattori vale la regola del “necessario ma non sufficiente”; tuttavia, da questa moltitudine si distingue TATA-box Binding Protein (TBP) che è presente nei complessi **SL1**, **TFIID** e **TFIIIB** e interviene nella trascrizione dei geni di I, II e III classe. [68]

Un tipico promotore eucariotico dei geni di classe II comprende un *core*, fondamentale per la determinazione del punto di inizio della trascrizione

identificato dai GTF, e alcune sequenze regolatrici, controllate da fattori gene-specifici, da cui dipendono l'efficienza e la specificità della trascrizione [69]. Gli elementi costitutivi del *core*, indicati come necessari e sufficienti per un mantenimento dei livelli basali di trascrizione, sono rappresentati da una sequenza Inziatore (Inr) e dal TATA-BOX (STATAAWR / TTATA(A/T)A(A/T)), compreso in una regione che va da -10 a -30. Unico elemento a monte che ha una posizione relativamente fissa rispetto al punto di inizio e che è presente in tutti gli Eucarioti, il TATA-box agisce similmente ad un promotore di *E. coli* nel posizionare la Polimerasi II per l'inizio della trascrizione. Le sequenze regolatrici, presenti in numero variabile di copie per promotore, sono il CAAT-BOX (RRCAATS), centrato intorno a -75, e il GC-BOX (GGGCGGG), centrato intorno a -90 (**Fig. 24**).



**Figura 24** Struttura tipo di un promotore eucariotico dei geni di classe II.

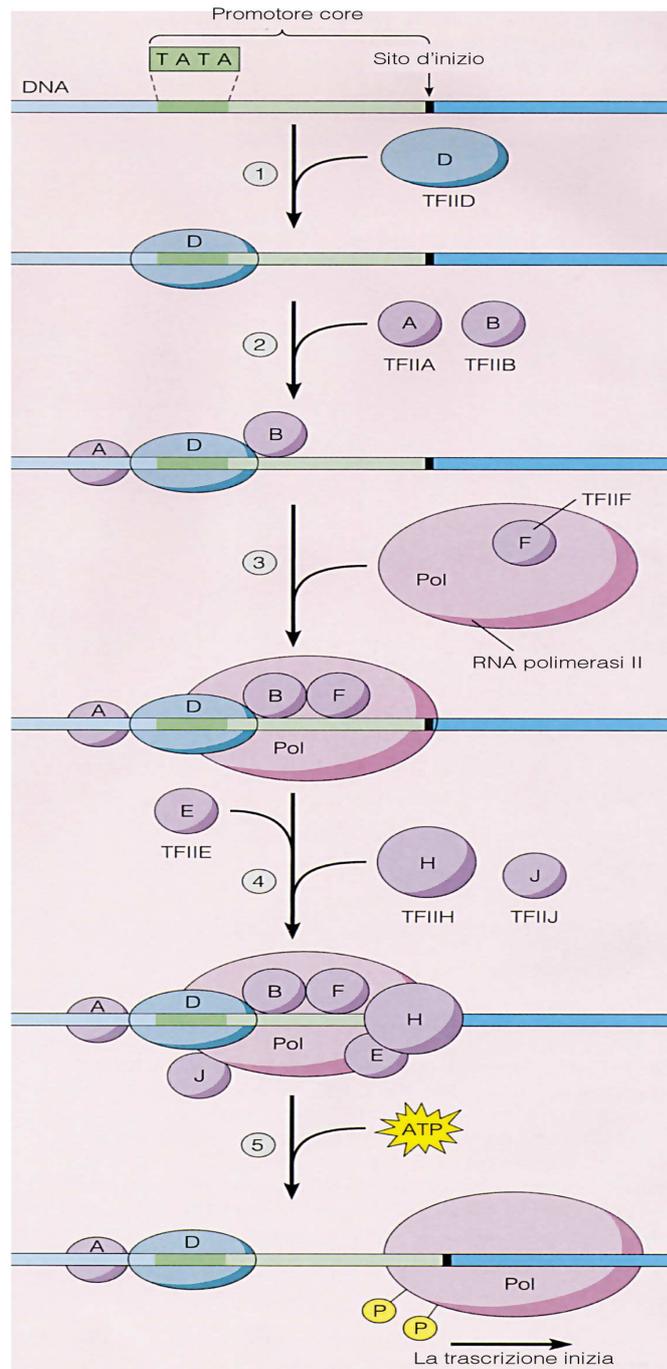
I promotori eucariotici non funzionano necessariamente da soli: in molti casi la loro attività è controllata dalla presenza di *enhancer/silencer*, elementi agenti in *cis* posti a distanza variabile dal promotore e capaci di funzionare bidirezionalmente.

L'accurato inizio della trascrizione, primo *step* della regolazione dell'espressione genica, da parte della RNA-pol II sui geni che codificano per le proteine (geni di classe II) richiede l'assemblaggio del PIC sul *core-promoter*, costituito dall'RNA-pol II e da diversi fattori generali di trascrizione (TFIIA, -B, -D, -E, -F e -H) [67] (Tabella 2).

Factor	Number of subunits	Mw (kDa)	Function	
TFIID	TBP	1	38	Core promoter recognition (TATA); TFIIIB recruitment
	TAFs	12	15-250	Core promoter recognition (non-TATA elements); positive and negative regulatory functions
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilization of TBP binding; stabilization of TAF-DNA interactions; anti-repression functions	
TFIIB	1	35	RNA Pol II-TFIIF recruitment; start-site selection by RNA Pol II	
TFIIF	2	30, 74	Promoter targeting of Pol II; destabilization of non-specific RNA Pol II-DNA interactions	
RNA Pol II	12	10-220	Catalytic functions in RNA synthesis; recruitment of TFIIE	
TFIIE	2	34, 57	TFIIH recruitment; modulation of TFIIH helicase, ATPase and kinase activities; direct enhancement of promoter melting (?)	
TFIIH	9	35-89	Promoter melting using helicase activity; promoter clearance (?) by CTD kinase activity	

**Tabella 2:** Fattori generali di inizio della trascrizione.

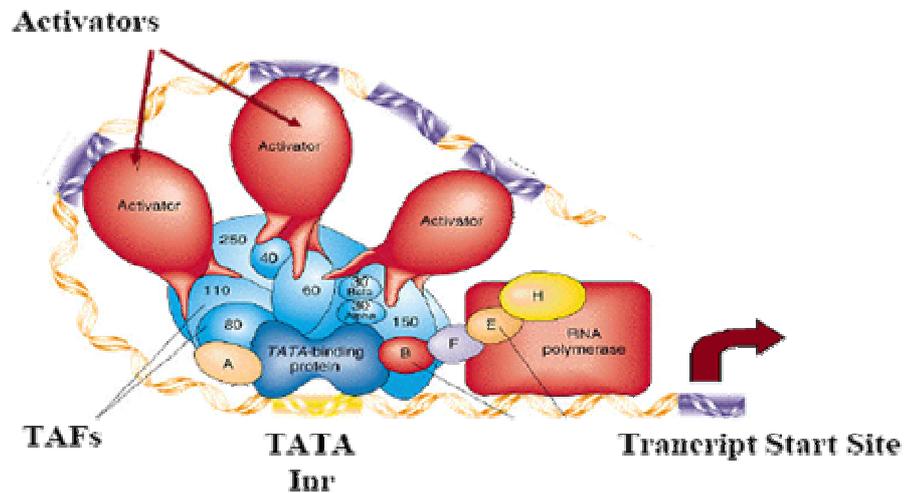
La multisubunità TFIID, proteina eteromultimerica costituita da TBP (TATA *Box Binding Protein*) e da 10-15 TAF (TBP *Associated Factors*) della seconda classe, gioca un ruolo chiave in questo processo in virtù della sua capacità di legarsi direttamente agli elementi del *core promoter* (TATA-box e Inr), determinando la posizione e l'orientamento del PIC [1, 2] (Fig. 25).



**Figura 25:** Formazione del complesso di pre-inizio.  
 (Pol II) RNA polimerasi; (E) TFIIE; (B) TFIIB; (TATA) TATA box; (A) TFIIA; (D) TFIID;  
 (F) TFIIF; (H) TFIIH; (J) TFIIJ; (TBP) TATA box binding protein.

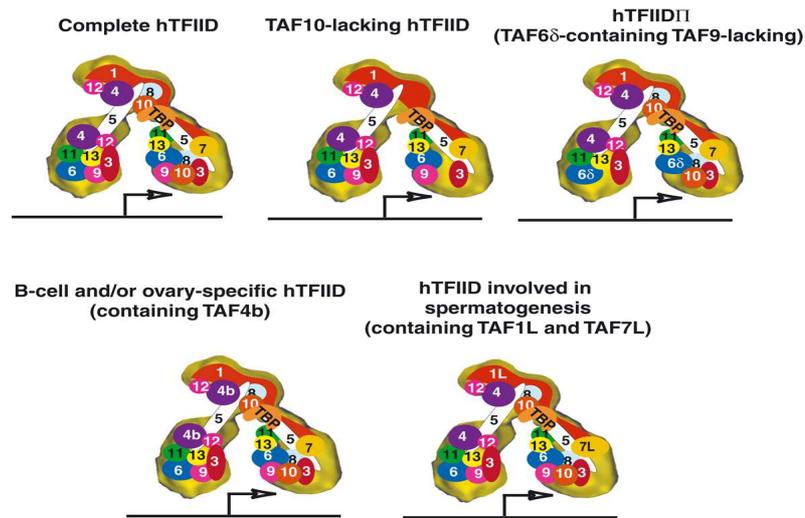
L'assemblaggio del PIC comporta una serie di passaggi, nonché un rimodellamento della cromatina: a livello di un promotore contenente un

*TATA-box* si comincia con il legame di TFIID, ed il riconoscimento dell'elemento TATA è dovuto proprio a TBP [68] (Fig. 26).



**Figura 26:** Struttura del Complesso di Preinizio.

Fattori TFIID contenenti TAF diversi possono riconoscere promotori diversi. L'esistenza di diversi complessi TFIID è stata spiegata ipotizzando che essi siano coinvolti nella regolazione selettiva dell'espressione genica grazie alla loro capacità di riconoscere in modo differenziale e tessuto-specifico i vari promotori [70] (Fig 27).



**Figura 27:** Rappresentazione dei vari complessi contenenti TAF.

Ciò serve a spiegare l'impiego di TBP su ogni classe di promotori eucariotici: SL1 e TFIIB possono essere visti come fattori composti da TBP insieme con un particolare gruppo di TAF.

Solo nelle cellule in cui sono presenti tutti questi fattori può avvenire la trascrizione di un determinato gene. Alterazioni anche di una singola subunità del macchinario possono compromettere l'utilità del sistema.

# MATERIALI E METODI

## ANALISI DI TFIID

In questo lavoro abbiamo caratterizzato, mediante RT-PCR semiquantitativa, le diverse sub unità del TFIID nel singolo ovocita umano in condizioni non patologiche e abbiamo ricercato le differenze di espressione rispetto a tessuti controllo.

Per la realizzazione di questo lavoro, pubblicato nel 2008 su **RBMonline** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765004>), abbiamo seguito alcuni *step* fondamentali che sono di seguito riportati.

## 2.1 RICERCA DI SEQUENZE DEI GENI TAF E DISEGNO DEI PRIMERS

Le sequenze dei geni che codificano per i TAF, insieme alle informazioni riguardanti le differenti varianti di trascritto e le isoforme proteiche, sono disponibili su **Entrez Gene** di NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) (**Fig. 28**) *database* che annota le informazioni relative a tutti i geni su genomi completi sia di procarioti che di eucarioti. Questo *database* permette di trovare informazioni riguardanti tutti i geni noti, riferendosi anche a quelli identificati attraverso analisi *in silico* e di recente scoperta.

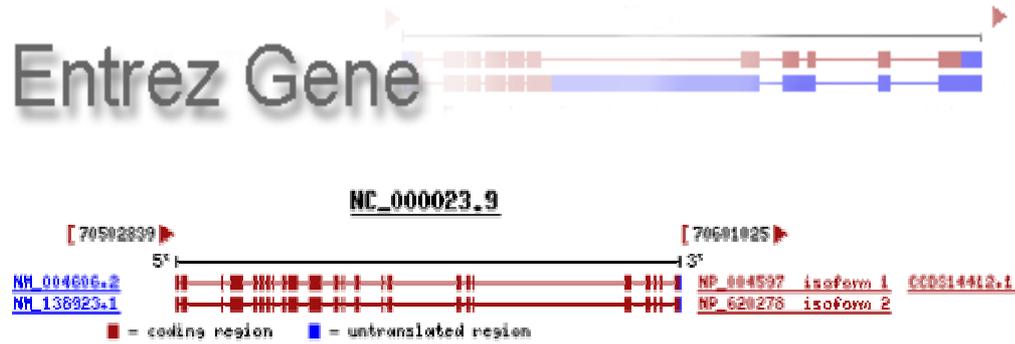


Figura 28: Home page di GENE

La **Tabella 3** mostra i differenti mRNA analizzati, la loro posizione cromosomica, il relativo *Accession Number* e una piccola descrizione di ognuno.

Name	Alias	Chromosome Position	Isoform Name	Accession Number	Transcript Variants and Protein Isoforms
TAF1	250	Xq13.1	TAF1-1	HM_004606	This variant (1) represents the longer transcript and encodes the longer isoform (1).
			TAF1-2	HM_138923	This variant (2) uses an alternate in-frame splice site, compared to variant 1, resulting in a shorter isoform (2) that lacks an internal 21 aa segment, compared to isoform 1
TAF1L	250like	9p21.1		HM_153809	
TAF2	150	8q24.12		HM_003184	
TAF3	140	10p15.1		XM_291729	
TAF4	135	20q13.33		HM_003185	
TAF4B	105	18q11.2		XM_290809	
TAF5	100	10q24-10q25.2		HM_006951	
TAF5L	PAF65b	1q42.13	TAF5L-b	HM_001025247	Variant (2) The resulting isoform (b) contains a distinct II-terminus, compared to isoform a.
			TAF5L-a	HM_014409	This variant (1) represents the shorter transcript, but encodes the longer isoform (a).
TAF6	80	7q22.1	TAF6-alfa	HM_005641	This variant (1) encodes the longest isoform (alpha).
			TAF6-gamma	HM_139122	This variant (3) is missing a region of nts found in the 5' UTR of transcript variant 1, and also uses an alternate in-frame splice site in the 3' coding region. Isoform gamma is missing 10 aa in the C-terminal portion of the protein compared to isoform alpha.
			TAF6-delta	HM_139123	This variant (4) encodes the isoform that participates in apoptosis signalling. Variant 4 is missing a region of nts found in the 5' UTR of variant 1. Isoform delta is missing 10 aa near the II-terminal end of the protein, compared to isoform alpha.
			TAF6-alfa	HM_139315	This variant (2), which also encodes the isoform alpha, is missing a region of nts found in the 5' UTR of variant 1.
TAF6L	PAF65a	11q12.3		HM_006473	
TAF7	55	5q31		HM_005642	
TAF7L	50	Xq22.1		HM_024885	
TAF8(TBII)	43	6p21.1		HM_138572	
TAF9	32/31	5q11.2-5q13.1	TAF9-a	HM_003187	This variant (1) encodes the longest isoform (a), also known as TBP-associated factor 9. Variants 1 and 4 encode the same isoform (a).
			TAF9-b	HM_016283	This variant (2) shares two exons with variant 1 but uses an upstream ATG that produces a different CDS and, therefore, encodes a different protein (isoform b). Isoform b has been alternatively referred to as adrenal gland protein AD-004.
			TAF9-c	HM_001015891	This variant (3) differs in the 5' UTR and 3' UTR and has multiple coding region differences, compared to variant 1. Variant 3 encodes isoform c. Variant 3 and variant 2 differ only in their II-terminal exon.
			TAF9-a	HM_001015892	This variant (4) differs in the 5' UTR compared to variant 1. Variants 1 and 4 encode the same isoform (a), also known as TBP-associated factor 9.
TAF9B	31L	Xq13.1-Xq21.1		HM_015975	
TAF10	30	11p15.3		HM_006284	
TAF11	28	6p21.31		HM_005643	
TAF12	20-15	1p35.3		HM_005644	
TAF13	18	1p13.3		HM_005645	
TAF15	68	17q11.1-q11.2	TAF15-1	HM_139215	This variant (1) encodes the longer protein
			TAF15-2	HM_003487	This variant (2) uses an alternate in-frame splice site, compared to variant 1, that results in a shorter protein (isoform 2).

Tabella 3: TATA box-binding protein associated factor II (TAFII).

Per il disegno di coppie di *primers* isoforma-specifici dei geni che codificano per i TAFs, i differenti mRNA sono stati allineati con **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), programma che permette l'allineamento multiplo di sequenze nucleotidiche o proteiche, e quando è stato possibile la stessa coppia di *primers* è in grado di discriminare le differenti varianti di trascritto e le isoforme proteiche per uno specifico gene (**Fig. 29**). In particolare le coppie di *primers* per i TAFs, sono state disegnate col programma **Omiga 2** (Oxford Molecular, Oxford, UK).

```

TAF1-1      ACAGAAAGATGCTGTGGACTATTCAGACATCAATGAGGTGGCAGAAGATGAAAGCCGAAGA 420
TAF1-2      ACAGAAAGATGCTGTGGACTATTCAGACATCAATGAGGTGGCAGAAGATGAAAGCCGAAGA 420
*****

TAF1-1      TACCAGCAGACGATGGGGAGCTTGCAGCCCTTTGCCACTCAGATTATGATGAAGATGAC 480
TAF1-2      TACCAGCAGACGATGGGGAGCTTGCAGCCCTTTGCCACTCAGATTATGATGAAGATGAC 480
*****

TAF1-1      TATGATGCTGATTGTGAAGACATTGATTGCAAGTTGATGCCTCCTCCACCTCCACCCCG 540
TAF1-2      TATGATGCTGATTGTGAAGACATTGATTGCAAGTTGATGCCTCCTCCACCTCCACCCCG 540
*****

TAF1-1      GGACCAATGAAGAAGGATAAAGACCAGGATTCTATTACTGGTGTGCTGAAAAATGGAGAA 600
TAF1-2      GGACCAATGAAGAAGGATAAAGACCAGGATTCTATTACTGGTGTGCTGAAAAATGGAGAA 583
*****

TAF1-1      GGCATCATCTTGCCCTCCATCAITGGCCCTTCTCTTTGGCCCTCAGAGAAAAGTGGACTTC 660
TAF1-2      -----AGAAAAGTGGACTTC 597
*****

TAF1-1      AGTAGTTCCTCTGACTCAGAATCTGAGATGGGACCTCAGGAAGCAACACAGGCAGAAATCT 720
TAF1-2      AGTAGTTCCTCTGACTCAGAATCTGAGATGGGACCTCAGGAAGCAACACAGGCAGAAATCT 657
*****

TAF1-1      GAAGATGGAAGCTGACCCTTCCATTGGCTGGGATTATGCAGCATGATGCCACCAAGCTG 780
TAF1-2      GAAGATGGAAGCTGACCCTTCCATTGGCTGGGATTATGCAGCATGATGCCACCAAGCTG 717
*****

TAF1-1      TTGCCAAGTGTACAGAACTTTTCCAGAAATTCGACCTGGAAGGTGTTACGTTTTCTA 840
TAF1-2      TTGCCAAGTGTACAGAACTTTTCCAGAAATTCGACCTGGAAGGTGTTACGTTTTCTA 777
*****

TAF1-1      CGTCTTTTGGACCAAGGAAAGAAATGTCCCATCTGTTTGGCGGAGTGCTCGGAGAAAGAGG 900
TAF1-2      CGTCTTTTGGACCAAGGAAAGAAATGTCCCATCTGTTTGGCGGAGTGCTCGGAGAAAGAGG 837
*****

TAF1-1      AAGAAGAGCACCGTGAGCTGATACAGGAAGAGCAGATCCAGGAGGTGGAGTGCTCAGTA 960
TAF1-2      AAGAAGAGCACCGTGAGCTGATACAGGAAGAGCAGATCCAGGAGGTGGAGTGCTCAGTA 897
*****

TAF1-1      GAATCAGAAGTCAGCCAGAAGTCTTTGTGGAACACGACTACGCTCCACCACCACTCCA 1020
TAF1-2      GAATCAGAAGTCAGCCAGAAGTCTTTGTGGAACACGACTACGCTCCACCACCACTCCA 957
*****

```

**Figura 29:** Allineamento di mRNA con ClustalW e *primers* (evidenziati in giallo) utilizzati per l'amplificazione di TAF1-1 e TAF1-2. I *primers* amplificano un frammento di 466 bp per TAF1-1 ed un frammento di 403 per TAF1-2.

Le sequenze dei *primers* e le condizioni di PCR per i TAF sono mostrate nella **Tabella 4**. Per evitare l'amplificazione di DNA presente nel campione (quando questo non subisce il trattamento con DNasi), i *primers* sono stati disegnati per riconoscere due differenti esoni dello stesso gene.

Gene	Isoforms	Primers	cDNA	PCR conditions
TBP		5'CCCGAAACGCCGAATATAATCC3' 5'CACACCCTGCAACTCAACATCC3'	583bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;60°C 90 sec;72°C 120 sec)31x; 72°C 10 min;
TBPL1		5'GGAGCAACAAGTGAAGAAGAGC3' 5'TTCCACAGCAGTAGCAACAGC3'	309 bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;55°C 90 sec;72°C 120 sec)31x; 72°C 10 min;
TBPL2		5'CATAACTCCCATGACACCAATGACC3' 5'CAACACAACCTTTCCAGATACAAGATAAGC3'	500bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;60°C 90 sec;72°C 120 sec)31x; 72°C 10 min;
TAF1	TAF1-1	5'GAGGTGGCAGAAGATGAAAGC3' 5'TCCCTGGTCCAAAAAGACG3'	466 bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;55°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
	TAF1-2		403 bp	
	TAF1-1	5'AGCCTGGACCCAATGACC3' 5'CATCACTCCAGCATCTTCC3'	298 bp	
TAF1L	TAF1L		385 bp	
TAF2		5'CCTGGAACCTCAGAAATACGTGG3' 5'AACATCTCTCATAGCGGAGC3'	315bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;50°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF3		5'GACTCACATTCCTCCAAACACC3' 5'CGTGCAATCACAGCATCG3'	210bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;50°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF4		5'GTGTCTCAGGCCAGACAACG3' 5'CCATCCAGTAAATTCGCAGGAGC3'	311bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;57°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF4B		5'CAAGACAATGGGGATAGATTGTGC3' 5'TTCCACCTCTTCCCTTGG3'	268bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;56°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF5		5'GGTCGGTAACACCCAAAAGC3' 5'CCCTTGTGTCAGTGAAGATCC3'	520bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;59°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF5L	TAF5L-a	5'GACAGCTCAGGGTTGCTCTC3' 5'TACGTCCGATCAATGACCA3'	194bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;50°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
	TAF5L-b	5'ACACCCAGCAATCCACTTC3' 5'TCCACTGCATGCACACACTA3'	139bp	
TAF6	TAF6-alfa	5'ACGACCCCTCTTGTAAACC3' 5'GCGGAAAGGAATGAACTCC3'	380 bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;54°C 60 sec;72°C 120 sec)34x; 72°C 10 min;*
	TAF6-delta		350 bp	
	TAF6-alfa	5'ATTGACCAGGATTGGAGCAGACC3' 5'GAGCCAGGAACCTTCAGCAAGC3'	293 bp	
	TAF6-gamma		263 bp	
TAF6L		5'AGGTGACTCGTGTGCTAGG3' 5'CAGAAGATGTGGCTGAGCAGG3'	340bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;55°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF7		5'ACGACAAGGAGACGCTCG3' 5'CAATGCCAAGTCCAACC3'	314bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;55°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF7L		5'ACCTTTCCTCCAGAAGCAAGC3' 5'TCCTCATCTCATCTCATCC3'	418bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;50°C 90 sec;72°C 120 sec)31x; 72°C 10 min;
TAF8		5'AGTCCCTGATCCCCACACC3' 5'TGCTGTCTGTTCATCTGCTCC3'	296bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;57°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF9	TAF9-a	5'CTTCCGAACATCTGCTCACC3' 5'GCCAATCGCACATCATCTGC3'	353bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;59°C 60 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
	TAF9-b	5'TGTTGCTCCGAACATCC3' 5'ATGAAACCAGCGTTCAGG3'	269bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;50°C 60 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF9B		5'CCCTTGGCCACTGATTAAGC3' 5'CAACTTTAATTGGGCAGACACC3'	212bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;55°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF10		5'GAGGGGGCCATATCTAACG3' 5'ATACTCGCTGAGGGCAGG3'	357bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;55°C 90 sec;72°C 120 sec)34x; 72°C 10 min;
TAF11		5'ACCGACACCGATGGAATCC3' 5'CACTTCTCACACATCCAGTGC3'	437bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;53°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF12		5'GAGCAGTTGGATGAAGATGTGG3' 5'TGAGATGGCAGGGAAAAGG3'	481bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;57°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF13		5'GCAGATGAGGAAGAACCC3' 5'TATCTTCAACTGTACTCGACC3'	253bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;54°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
TAF15	TAF15-1	5'CGCCTGGCTTTCGATTCCG3' 5'ACCTTGGCTTCTGATGATTCC3'	361bp	94°C 4 min; (94°C 60 sec;59°C 90 sec;72°C 120 sec)29x; 72°C 10 min;
	TAF15-2		352bp	

**Tabella 4:** condizioni di PCR per i TAFs.

\* condizioni di PCR più stringenti.

I *primers* così disegnati sono stati testati utilizzando un programma di PCR elettronica (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>).

Per la messa a punto delle condizioni sperimentali di amplificazione dei *primers*, sono state utilizzate temperature di *annealing* di 5-8 °C inferiori rispetto alla temperatura di *melting*. Inoltre per singola coppia di *primers* sono state messe a punto in modo opportuno le condizioni di reazione (il tempo di *annealing* e il numero dei cicli).

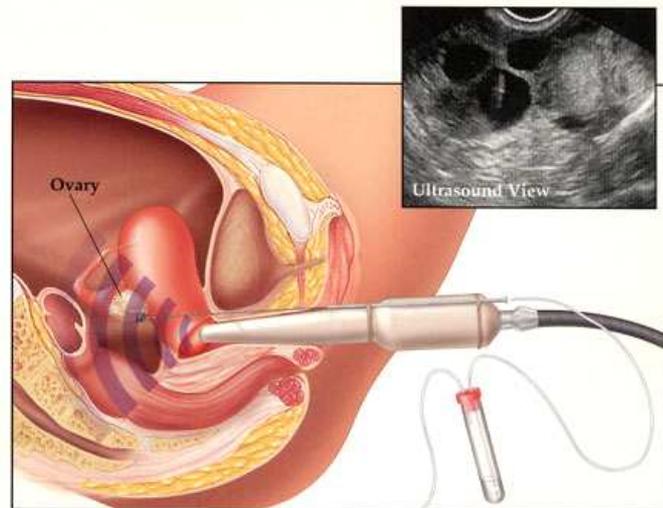
## **2.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI**

Le donne coinvolte nel nostro studio, previo consenso informato, sono state sottoposte ad un'induzione della crescita follicolare multipla (ICFM) in quanto facenti parte di un programma di fecondazione *in vitro*, presso il Servizio di PMA (Procreazione Medicalmente Assistita) dell'*Azienda Ospedaliera Cannizzaro* di Catania. Il ricorso alla tecnica è dovuto principalmente a causa di infertilità maschile in modo da escludere eventuali patologie, quali endometriosi o ovario policistico, che avrebbero potuto inficiare i risultati. Da queste donne sono stati prelevati i follicoli da cui è stato possibile ottenere gli ovociti. In particolare, per lo studio del TFIID, sono stati collezionati 200 ovociti da 50 differenti donne. In questo studio infatti sono stati utilizzati 150 ovociti in MII che mostravano ottima morfologia.

### **2.2.1 PRELIEVO OVOCITARIO**

Il prelievo ovocitario detto anche *pick-up* è stato effettuato in seguito a stimolazione ovarica e monitoraggio follicolare. Tutte le pazienti hanno dato il loro consenso per l'uso degli ovociti soprannumerari.

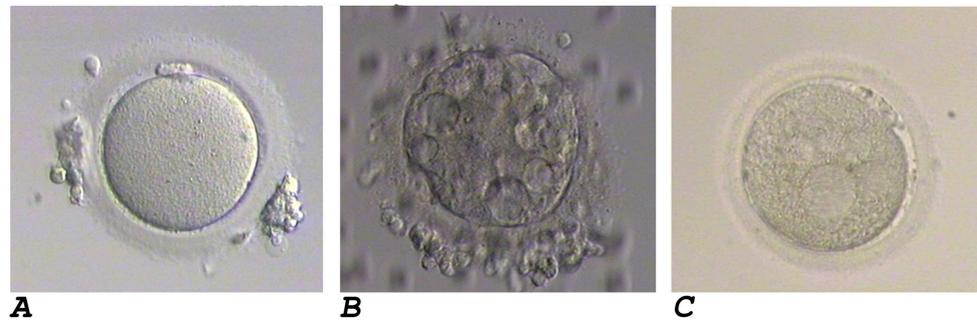
La stimolazione ormonale è stata condotta utilizzando un protocollo classico che prevede il trattamento con agonisti (triptorelin o busserelin) dell'ormone che rilascia le gonadotropine (GnRH), seguito da stimolazione ovarica con l'ormone follicolo stimolante ricombinante (rFSH) e la gonadotropina umana menopausale (HMG). Entrambi gli ormoni sono stati somministrati (concentrazione sierica di estradiolo <40 ng/l) per un numero di giorni variabile in funzione della risposta individuale della paziente al fine di stimolare la crescita di un numero elevato di follicoli. La stimolazione è stata monitorata utilizzando le concentrazioni sieriche di estradiolo e misurando il numero ed il diametro dei follicoli tramite ultrasuoni. L'ovulazione è stata indotta con 10000 IU di gonadotropina corionica umana (HCG, Gonasi), dopo che i follicoli hanno raggiunto i 18-20 mm di diametro e la concentrazione di estradiolo nel siero ha raggiunto 150-200 ng/l. 34-36 h dopo la somministrazione di HCG, il liquido follicolare contenente l'ovocita è stato aspirato mediante un lungo ago che, sotto guida ecografica per evitare di danneggiare gli organi circostanti, è stato fatto passare attraverso la parete vaginale ed indirizzato all'interno di ciascun follicolo. Il prelievo degli ovociti è stato effettuato in *Day Hospital* con un'anestesia locale. **(Fig. 30)**



**Figura 30:** Prelievo ovocitario o *pick-up*.

Una volta prelevati e privati delle cellule del cumulo ooforo, gli ovociti sono stati incubati per un breve periodo a 37°C in 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 2 h, sono stati trattati con ialuronidasi (Synvivo Hyadase; Medicult, Jyllinge-Denmark) ad una concentrazione finale di 80 IU/ml. Dopo l'incubazione, per alcuni secondi, gli ovociti sono stati sciacquati tre volte in terreno di coltura (IVF; VitroLife AB, Kungsbacka, Sweden). In accordo con la legge italiana, è stata posta particolare attenzione per assicurare la totale assenza di cellule della corona dagli ovociti al fine di poterne scegliere i 3 migliori in MII da utilizzare per la ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*). A questo punto per valutarne la qualità ed individuare tutti i parametri strutturali (zona pellucida, *polar body*, citoplasma), gli ovociti sono stati osservati con un invertoscopio ad ingrandimento 200X. Solo dopo la fine della procedura di iniezione gli ovociti in sovrannumero sono stati preparati per l'analisi molecolare, scegliendo quelli con ottima morfologia. I parametri utilizzati per la selezione sono puramente morfologici e comprendono alterazioni a carico del reticolo endoplasmatico liscio (SER), presenza di vacuolizzazione, forma ovocitaria,

granulosità e aumento dello spazio perivitellino. Sono stati così classificati in “good” e “bad” (Fig. 31) [71].



**Figura 31:** (A) Ovocita maturo in MII con ottima morfologia (*good*). (B) Ovocita (MII) che mostra larghi vacuoli citoplasmatici (*bad*). (C) Ovocita (MII) che mostra alterazioni del reticolo endoplasmatico liscio (REL) (*bad*).

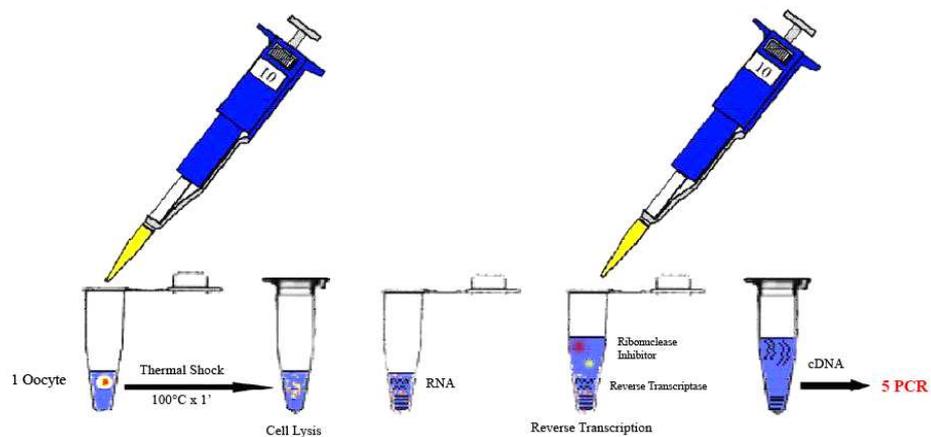
I singoli ovociti sono stati sciacquati in acqua RNase-free diverse volte per rimuovere eventuali tracce proteiche dal terreno di coltura; sono stati poi posti in tubi PCR da 0.2 ml e congelati in azoto liquido per evitare la degradazione dei messaggeri.

### 2.3 PREPARAZIONE DI SINGOLI OVOCITI UMANI

I singoli ovociti, dopo essere stati conservati in azoto liquido, per evitare la degradazione degli acidi nucleici, sono stati sottoposti ad un trattamento che prevede essenzialmente due fasi: *shock* termico e trattamento con DNasi. Tutto l'mRNA ricavato dopo questi step è stato sottoposto a retrotrascrizione (RT). Il cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante RT-PCR semiquantitativa, per verificare la riuscita della reazione, ed infine gli amplimeri sono stati separati ed analizzati mediante elettroforesi analitica su gel di agarosio.

### 2.3.1 SHOCK TERMICO

Dopo essere stati conservati in azoto liquido i singoli ovociti hanno subito uno *shock* termico a 100°C per 1' (**Fig. 32**) attraverso una reazione eseguita in un *Thermal Cycler Eppendorf* in modo da consentire la lisi cellulare ed il rilascio dell'mRNA da parte delle cellule.



**Figura 32:** Trattamento del singolo ovocita umano.

### 2.3.2 TRATTAMENTO CON DNasi

L'mRNA degli ovociti, ricavato in seguito allo *shock* termico, è stato successivamente trattato con 1 µl della diluizione 1:20 della *DNasi I Amplification Grade* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), precedentemente preparata e conservata in frigo a -20 °C, vortexato velocemente e spinnato; la DNasi si lascia agire per 15' mentre i campioni si trovano in ghiaccio al fine di eliminare il DNA contaminante. Trascorsi i 15' ai campioni è stato aggiunto 1 µl di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), un agente chelante gli ioni metallici utilizzato per inattivare la DNasi, poi sono stati vortexati velocemente

e spinnati ed infine posti a 65 °C per 10' in un *Thermal Cycler Eppendorf* per bloccare l'azione dell'EDTA.

## 2.4 RETROTRASCRIZIONE (RT) DI SINGOLI OVOCITI

### UMANI

Il protocollo usato è una modifica di un protocollo pubblicato in precedenza [72].

Gli mRNA provenienti dai singoli ovociti sono stati retrotrascritti in un volume finale di 20µl usando l'enzima *Superscript II* (Invitrogen S.R.L., Milan, Italy) e gli esanucleotidi *random* come *primers* secondo il protocollo standard (**Fig. 32**):

RNA totale	x
Esanucleotidi <i>random</i>	12.5 ng/µl
dNTP <i>mix</i>	500 µM
Buffer	1 X
DTT	10 mM
<i>SuperScript<sup>TM</sup> II</i>	200 U

La reazione è stata condotta in un *Thermal Cycler Biometra* secondo i seguenti *steps*:

**Step 1** → 42 °C per 50'

**Step 2** → 72 °C per 15'

Da un singolo ovocita sono state effettuate cinque differenti reazioni di PCR semiquantitativa utilizzando *Platinum Taq polymerase* (Invitrogen S.R.L., Milan, Italy) (**Fig. 32**).

## 2.5 ESTRAZIONE DI RNA DA SANGUE

Il sangue prima di essere trattato con il **Trizol** ha subito un trattamento preventivo. Il sangue prelevato (5ml) è stato raccolto all'interno di un falcon da 50 ml con 100 µl di EDTA 0,5M (anticoagulante). Successivamente è stato centrifugato a 2000 rpm per 10 minuti, in modo da ottenere tre fasi che corrispondono al siero (parte più superficiale), ai leucociti (parte centrale) e agli eritrociti (parte più bassa). Il siero, che rappresenta la parte più superficiale del surnatante, è stato aspirato e nella parte corpuscolare rimanente sono stati aggiunti 15 ml di cloruro d'ammonio in modo da lisare i globuli rossi. Dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 10 min. è stato eliminato il surnatante e il *pellet* di bianchi è stato risospeso direttamente in Trizol (1 ml di *Trizol* per ogni *pellet* di cellule) e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente; successivamente è stato aggiunto il Cloroformio (0,2 ml di cloroformio per ogni ml di *Trizol*) per permettere, dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 10 minuti a 4°C, la formazione di 2 fasi: una organica ed una acquosa contenente il nostro RNA. Quest'ultima fase è stata prelevata, posta in una *eppendorf* da 1,5 ml e ad essa è stato aggiunto l'Isopropanolo (0,5 ml di isopropanolo per ogni ml di *Trizol*); dopo un ulteriore *step* di centrifugazione, con le medesime condizioni precedentemente usate, il surnatante ottenuto è stato eliminato ed il *pellet*, costituito dall'RNA precipitato, è stato lavato con Etanolo al 75%. Effettuata l'ultima centrifugazione con le condizioni sopra riportate, è stato aspirato tutto l'etanolo ed il *pellet* di RNA totale è stato risospeso in un volume appropriato di H<sub>2</sub>O deionizzata sterile [73].

### 2.5.1 QUANTIFICAZIONE DELL' RNA ESTRATTO

Per quantificare la concentrazione di RNA totale estratto, utilizzando “*geneQuant pro RNA/DNA Calculator*”, è stata effettuata una diluizione 1:10 del campione di partenza. Con questa procedura è possibile determinare non solo la concentrazione del campione ma anche la sua purezza. Per determinare la massa del campione vengono automaticamente effettuati dei calcoli quali:

$$(\text{RNA})\mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{dilution} \times 40.0$$

- ◇  $A_{260}$  = absorbance a 260nm
- ◇ Dilution = dilution factor
- ◇ 40.0 = extinction coefficient of RNA

Per determinare la purezza del campione:

- ◇ Un campione di RNA puro ha un ratio  $A_{260}/A_{280}$  di 2 con un range di  $\pm 0.15$
- ◇ Un campione di DNA puro ha un ratio  $A_{260}/A_{280}$  di 1.8 con un range di  $\pm 0.15$
- ◇ In caso di contaminazione da parte di proteine, queste aumentano l'assorbanza a 280 nm e generalmente decrementano il rapporto  $A_{260}/A_{280}$ .

### 2.5.2 RT DI RNA DA SANGUE E TESSUTI

L'RNA di tessuto umano, da *Human Total RNA Master Panel II* (BD Biotech Clontech-TaKaRa Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France), e l'RNA di sangue sono stati retrotrascritti usando *Superscript II* (Invitrogen S.R.L., Milan,

Italy) e amplificati con *Platinum Taq polymerase* (Invitrogen S.R.L., Milan, Italy) secondo il protocollo standard [74].

### 2.5.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*) SEMIQUANTITATIVA

Di tutto il cDNA ottenuto un'aliquota di 4µl del singolo ovocita, corrispondente a 1/5 del cDNA totale, un'aliquota di 2 µl del sangue e dei tessuti sono state amplificate, con la coppia di *primers* specifica per l'HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) (Tabella 5), gene usato sia come controllo che come gene di riferimento, e l'enzima *Platinum Taq polymerase* (Invitrogen S.R.L., Milan, Italy), per verificare la qualità del cDNA retroscritto, secondo il protocollo:

cDNA

<i>PCR Buffer</i>	1 X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
<i>Primer Mix</i>	1µM
<i>dNTP Mix</i>	400 µM
<i>Platinum<sup>R</sup> Taq DNA Polymerase</i>	1 U

La reazione è stata eseguita in un *Thermal Cycler Biometra* secondo i seguenti *steps*:

**step 1.** 94°C per 10' (denaturazione del DNA)

**step 2.** 94°C per 1' (denaturazione)

**step 3.** temperatura di *annealing* variabile per 1'30'' (attacco dei *primers* al bersaglio)

**step 4.** 72°C per 2'(estensione)

*step 5.* 72°C per 10' (estensione finale)

Gene	Primers	cDNA (bp)	PCR conditions
HPRT	5'CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG3' 5'CTTCGTGGGGTCCTTTTCACCAGC3'	280bp	94°C 4min; 94°C 60sec; 60°C 90sec; 72°C 120sec)30X; 72°C 10min

**Tabella 5:** sequenza dei *primers* per HPRT e condizioni di PCR

Gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi analitica su gel d'agarosio.

### 2.5.4 ELETTROFORESI ANALITICA

I frammenti ottenuti con la PCR sono stati analizzati su un gel d'agarosio (*midi-gel*, lunghezza 10 cm).

- Agarosio 1,5%
- Tampone di corsa TBE 0,5X
- Tris 8,9 mM
- Acido borico 8,9 mM
- EDTA 0,2 mM
- Campo elettrico 100 V/cm
- Tempo di corsa 1ora 30 min.

Per controllare il peso molecolare dei cDNA amplificati e verificare l'assenza di frammenti aspecifici, il gel è stato colorato con Syber Safe alla concentrazione di 1 µg/ml ed è stato visualizzato tramite raggi UV con lo strumento *Image Master* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK).

Il peso molecolare dei campioni è stato valutato paragonando la velocità di

migrazione degli amplificati a quella di un *ladder* di riferimento (*ladder 100bp* - Amersham Pharmacia Biotech).

### **2.5.5 DENSITOMETRIA**

L'immagine del gel è stata analizzata allo scopo di ottenere il valore densitometrico del campione amplificato, questo avviene grazie all'utilizzo dello strumento *Imag eMaster VDS* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), tramite il quale per mezzo dell'*Image Master Total Lab V1.00* l'immagine ottenuta subisce una digitalizzazione.

La densità delle bande è stata calcolata in base al numero di *Pixel* ed alla loro intensità.

Il valore così ottenuto tramite analisi densitometrica, di ciascuno dei vari campioni, è stato normalizzato dividendolo per il valore densitometrico ottenuto dall'analisi del gene *housekeeping* sugli stessi campioni.

### **2.6 ANALISI DEI DATI E COSTRUZIONE DEI DOT-PLOT**

I dati ottenuti negli esperimenti di PCR semiquantitativa sono stati analizzati e utilizzati per la costruzione dei dot-plot.

Ogni TAF è stato analizzato su aliquote (1/5 di cDNA) provenienti da 3 differenti ovociti e la relativa massa di cDNA è stata normalizzata con HPRT.

La normalizzazione è stata ottenuta caricando nello stesso gel i cDNA in studio insieme con HPRT, indipendentemente amplificati da un'aliquota identica dello stesso campione [74].

Successivamente, per stimare la differente espressione di ogni mRNA negli ovocita umani, abbiamo comparato i valori densitometrici del cDNA amplificato, normalizzato con HPRT, negli ovociti umani (tre differenti ovociti sono stati testati per ogni coppia di *primers*) con due tessuti umani (sangue e cervello) usati come controllo.

In alcuni casi per confermare che gli amplificati fossero quelli corretti è stata effettuata una doppia PCR, utilizzando gli stessi *primers* utilizzati nel primo ciclo di reazione ed un'aliquota di 0.2µl del primo amplificato.

I dati ricavati dalle varie analisi, sono stati organizzati in un *file* di testo (\*.txt), necessario per effettuare un *clustering* dei valori di espressione dei geni analizzati nei campioni presi in esame.

Con l'aumentare del numero dei campioni analizzato è stato necessario utilizzare dei metodi che permettessero un'immediata visualizzazione e contemporaneamente un'analisi statistica. Il *clustering* è stato effettuato utilizzando il *software* **Cluster 3.0** attraverso il seguente percorso: **Absolute Correlation Centred – Centroid Linkage – City Block Distance**. I dati sono stati poi visualizzati tramite il *software* **Java Treeview** in Dot Plot.

## **2.7 ANALISI STATISTICHE**

I valori di espressione genica dei GTF, normalizzati per il gene *housekeeping*, sono stati assegnati ad uno dei due gruppi: gruppo A (ovociti) e gruppo B (tessuti controllo). A questi valori è stato applicato lo *Student's* t-test utilizzando il *software* MeV 4.0 (MultiExperiment Viewer).

I geni la cui media dei ln dei rapporti di espressione tra i due gruppi era statisticamente significativa sono stati assegnati ad un cluster, mentre i geni le cui variazioni tra i due gruppi non sono risultate statisticamente significative sono stati assegnati ad un altro cluster (P-value < 0.01).

## PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI DEL MACCHINARIO APOPTOTICO IN OVOCITI MATURI ED IN CELLULE DEL CUMULO

Un altro importante lavoro ci ha visti impegnati nello studio del ruolo che l'apoptosi riveste nel determinare una riduzione di competenza dell'ovocita in avanzata età riproduttiva. Abbiamo paragonato, mediante tecnologia *High Throughput*, il profilo di espressione genica di alcuni dei geni codificanti proteine apoptotiche durante l'invecchiamento riproduttivo, analizzando follicoli provenienti da donne *under 35 (young)* e follicoli provenienti da donne *over 38 (old)*.

### 2.8 RICERCA DI SEQUENZE DEI GENI DEL MA E DISEGNO DEI *PRIMERS*

Anche in questo caso abbiamo utilizzato **Entrez Gene** di NCBI (**National Centre for Biotechnology Information**) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) per la ricerca delle sequenze dei geni che codificano per le proteine del Macchinario Apoptotico.

La **Tabella 6** mostra i differenti mRNA analizzati, la loro posizione cromosomica, il relativo *Accession Number* e una piccola descrizione di ognuno.

Gene	Accession Number	Cromosome position	Transcript Variant and Protein isoforms (NCBI Data)
ABL1	HM_007313	9q34.1	Transcript variant b
BAD	HM_004322	11q13.1	Transcript variant 1
	HM_032989		Transcript variant 2
BAG3	HM_004281	10q25.2-q26.2	
BAX	HM_138764	19q13.3-q13.4	Transcript variant epsilon
	HM_138764		Transcript variant sigma
	HM_138761		Transcript variant alpha
	HM_004324		Transcript variant beta
BCL2	HM_000633	18q21.3	Transcript variant alpha
	HM_000657		Transcript variant beta
BCL2L1	HM_138578	20q11.21	This variant (1) encodes the longer isoform which acts as an apoptotic inhibitor
	HM_001191		This variant (2) encodes the shorter isoform which acts as an apoptotic activator
BCL2L11	HM_138621	2q13	Transcript variant 1
	HM_006538		Transcript variant 6
BHIP1	HM_001205	5q33-q34	Transcript variant BHIP1
	HM_013978		Transcript variant BHIP1-a
	HM_013979		Transcript variant BHIP1-b
	HM_013980		Transcript variant BHIP1-c
BHIP2	HM_004330	15q22.2	
CASP8	HM_001228	2q33-q34	Transcript variant A
	HM_033355		Transcript variant B
	HM_033356		Transcript variant C
	HM_001080124		Transcript variant F
	HM_001080125		Transcript variant G
CD40	HM_001250	20q12-q13.2	Transcript variant 1
	HM_152854		Transcript variant 2
CFLAR	HM_003879	2q33-q34	Transcript variant 1
	HM_001127183		Transcript variant 2
	HM_001127184		Transcript variant 3
IGF1R	HM_000875	15q26.3	
MCL1	HM_021960	1q21	This variant (1) encodes the longer isoform which acts as an apoptotic inhibitor
	HM_182763		This variant (2) encodes the shorter isoform which acts as an apoptotic activator
HAIP	HM_004536	5q13.1	Transcript variant 1
	HM_022892		Transcript variant 2
TNFRSF10A	HM_003844	8p21	
TNFRSF21	HM_014452	6p21.1	
TP73	HM_005427	1p36.3	TAp73 var1
	HM_001126241		$\Delta$ Hp73 var3
	HM_001126242		$\Delta$ Hp73 var4
MMP73	HM_011642.3	4	TAp73 var alfa
	HM_001126330.1		$\Delta$ Hp73 var alfa

Tabella 6: geni del MA.

Le coppie di *primers* per i geni del MA sono state disegnate con il programma **Primer3** (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (**Fig. 33**).

The screenshot shows the Primer3 web interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'Primer3plus interface', 'More primer/oligo tools', 'disclaimer', and 'Primer3 Home'. Below this, there are links for 'Old (0.3.0) interface', 'cautions', and 'FAQ/Wiki'. The main area contains a text input field for the DNA sequence, which is populated with a long sequence of nucleotides. Below the sequence, there are several checkboxes and input fields for selecting primer options, such as 'Pick left primer, or use left primer below', 'Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below', and 'Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)'. There are also buttons for 'Pick Primers' and 'Reset Form'. At the bottom, there are several input fields for parameters like 'Sequence Id', 'Targets', 'Excluded', 'Regions', 'Product Size Ranges', 'Number To Return', 'Max 3' Stability', 'Max Repeat Mispriming', and 'Pair Max Repeat Mispriming'.

**Fig. 33:** Schermata del programma Primer3.

L'efficacia dei risultati ottenuti dalla costruzione di coppie di *primers*, con tale metodica, è dovuta all'importanza che il programma stesso pone nel considerare diversi fattori, quali temperatura di *melting*, contenuto in GC, lunghezza, stabilità del 3' etc [75].

Nella **Tabella 7** sono riportate le condizioni di reazione per le coppie di *primers* utilizzate per amplificare in Real Time PCR gli mRNA dei geni del MA che sono risultati alterati nella nostra analisi e la dimensione in paia di basi (bp) dell'amplificato atteso.

Gene	Primers	cDNA (bp)	PCR conditions
ABL1	5'CGAGGCATGGGGTCCACAC3' 5'CGAGCGGCTTCACTCAGACCC3'	103bp	95°C 20 sec; (95°C 1 sec;60°C 60 sec)x40; 95°C 15 sec; 60°C 15 sec; 95°C 15 sec.
BAD	5'CGGAGGATGAGTGACGAGTT3' 5'CCACCAGGACTGGAAGACTC3'	123bp	
BAG3	5'ACACGAGCAGAACGTTACCC3' 5'GTACACAGGCTGGTGGGTCT3'	109bp	
BAX	5'CTGGACCCGGTGCCCTCAGGA3' 5'GAGTCTGTGTCCACGGCGGC3'	122bp	
BCL2	5'CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA3' 5'GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA3'	83bp	
BCL2L1	5'GGGGTCGCATTGTGGCCTTT3' 5'ATCCAGCCGCCGTTCTCCT3'	158bp	
	5'GCATATCAGAGCTTTGAACAGGATAC3' 5'GAGCCAGCAGAACCACGCC3'	140bp	
BCL2L11	5'CCTTCAACCACTATCTCAGTGCAA3' 5'TCTCCAATACGCCGCAACTC3'	103bp	
BH1P1	5'TCCACGTCCGGATCTGTAAC3' 5'AAGGGTCTGAACAATCACG3'	91bp	
BH1P2	5'AGCTCGAAATTCAGCCAAAA3' 5'GCATTCTGGTATGCCAACG3'	93bp	
CASP8	5'AAGCAAACCTCGGGGATACT3' 5'GGGGCTTGATCTCAAATGA3'	164bp	
CD40	5'GGCCAAGAAGCCAACCAATA3' 5'GATCGTCGGGAAAATTGATCTC3'	71bp	
CFLAR	5'ACAGAGTGAGGGCAGTTTGACCTGC3' 5'CCTCACCAATCTTGCCATCAGC3'	129bp	
IGF1R	5'TCCATCTGATCATCGCTCTG3' 5'CAGAGGCATACAGCACTCCA3'	126bp	
MCL1	5'CGTAAGGACAAAACGGGACTGGC3' 5'ACCTGCAAAAGCCAGCAGCACA3'	118bp	
	5'CGGCCTTCAAGGATGGGTTTG3' 5'GCTCCTACTCCAGCAACACCTGC3'	104bp	
NAIP	5'TTCAAGCCGTCCCATTTGTTGC3' 5'TGGCCACTCGATAAATTCATCCCA3'	180bp	
TNFRSF10A	5'ACAGCAATGGGAACATAGCC3' 5'GGTGTAAACCCACACCCTCTG3'	106bp	
TNFRSF21	5'AGCACCGGAGAAACGATGTT3' 5'GGGCTCATCGGGAGAGCTA3'	94bp	
TP73	5'AGGTGGTGGGCGGAACGGAT3' 5'CGGCCTGCTCTGGGGTGTAG3'	153bp	
	5'CCAGCCTCGTCAGGACCTGG3' 5'GGCGCTGCAGTCCCTGAG3'	173bp	
	5'TACAGAGGCCGCCCGGGAT3' 5'GCAGTGGGACCCGAGACCA3'	108bp	
MMP73	5'GATGGCCCAGACCTTTCTT3' 5'TGGGGGAGGTCAAAGTAGGT3'	90bp	
	5'CCACGAGCCTACCATGCTTT3' 5'CATGGCACTGCTGAGCAAAT3'	82bp	

Tabella 7: condizioni di Real Time PCR per i geni MA.

## 2.9 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Anche in questo studio le donne arruolate fanno parte di un programma di fecondazione *in vitro*, presso il Servizio di Procreazione Medicalmente

Assistita dell'*Azienda Ospedaliera Cannizzaro* di Catania. Da queste donne sono stati prelevati i follicoli da cui è stato possibile ottenere, ovociti e rispettive cellule del cumulo (CC), sia singoli che in *pool*. Nell'ambito di questo studio sono stati utilizzati ovociti murini (ceppo FVB, allevati in omozigosi, albi e con alta prolificità) provenienti dallo stabulario del CBA (Centro Biotecnologie Avanzate) di Genova coordinato dal Professore Massimo Romani.

## **2.10 COLLEZIONE DI *POOL* OVOCITARI E CELLULE DEL CUMULO**

Per questo studio sono stati utilizzati 35 ovociti provenienti da 15 differenti donne suddivise in due gruppi a seconda dell'età:

- **Gruppo A:** donne di età  $\leq 35$  anni → ***OVOCITI YOUNG***
- **Gruppo B:** donne di età  $\geq 38$  anni → ***OVOCITI OLD***

Prima di tutto, per ogni gruppo e da una singola donna, sono stati individualmente aspirati cinque follicoli maturi e da ognuno di essi sono stati separati ovociti e cellule del cumulo. Gli ovociti sono stati poi raccolti in *eppendorf* da 0,2 ml contenenti H<sub>2</sub>O deionizzata. Le cellule del cumulo, invece, sono state sottoposte ad alcuni lavaggi in *medium* di coltura e successivamente ad una centrifugazione su gradiente di densità (*Sil Select 45%*) a 300 giri per 20 minuti al fine di rimuovere eventuali cellule estranee (cellule ematiche, fibroblasti etc.). Il surnatante è stato completamente rimosso e le cellule trasferite in tubi da 5 ml precedentemente refrigerati e conservati a -20° C. I

*pool* così ottenuti sono serviti per ottenere sufficiente mRNA per l'analisi degli 84 geni del macchinario.

Anche i topi, a cui sono stati prelevati gli ovociti, sono stati suddivisi in due gruppi sempre in funzione dell'età:

- Topi di età compresa tra 5 e 8 settimane: ***OVOCITI YOUNG***;
- Topi di età compresa tra 6 e 7 mesi: ***OVOCITI OLD***.

Le topine sono state super ovulate mediante iniezione intraperitoneale di FSH e LH. Dopo il 5° giorno di stimolazione le topine sono state sacrificate mediante CO<sub>2</sub>, sono state asportate le ovaie e da queste sono stati recuperati gli ovociti. Le cellule del cumulo sono state eliminate mediante trattamento con ialuronidasi. Dopo l'incubazione, per alcuni minuti, gli ovociti sono stati sciacquati tre volte in PBS, contate e subito congelate in azoto liquido per evitare la degradazione degli acidi nucleici.

## **2.11 PREPARAZIONE DI *POOL* DI OVOCITI UMANI E MURINI**

I *pool* di ovociti sono stati sottoposti allo stesso trattamento seguito per le singole cellule (vedi paragrafo 2.3 a pagina 58) ovvero *shock* termico e trattamento con DNasi.

## 2.12 RT DI *POOL* DI OVOCITI UMANI E MURINI

Gli mRNA provenienti dai *pool* di ovociti sono stati retrotrascritti allo stesso modo dei singoli (vedi paragrafo 2.4 a pagina 63) in un volume finale di 100.

Gli ovociti murini sono stati suddivisi in 3 eppendorf (1 cellula, 2 cellule e 4 cellule) e in 2  $\mu$ l di volume, e successivamente sottoposti a 100°C per 1'. Gli mRNA ottenuti sono stati retro trascritti in un volume finale di 40  $\mu$ l con il kit **WT-Ovation** (*RNA Amplification System, Nugen Technologies*) che permette di ottenere grandi quantità di cDNA partendo da piccole quantità di RNA.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

RNA totale	2 $\mu$ l
------------	-----------

### SINTESI DEL PRIMO *STRAND* DI cDNA

Buffer A1	2 $\mu$ l
-----------	-----------

Spinnare per 2" ed incubare a 65°C per 5' (*ANNEALING PRIMERS*)

Buffer A2	5 $\mu$ l
-----------	-----------

H <sub>2</sub> O	0.5 $\mu$ l
------------------	-------------

Enzima	0.5 $\mu$ l
--------	-------------

Il tutto si incuba per:

- 4°C per 1'
- 25°C per 10'
- 42°C per 10'
- 70°C per 15'
- 4°C

### SINTESI DEL SECONDO *STRAND* DI cDNA

Buffer B1	9.75 $\mu$ l
-----------	--------------

Buffer B2 0.25  $\mu$ l

Il tutto si incuba per:

- 4°C per 1'
- 25°C per 10'
- 50°C per 30'
- 70°C per 5'
- 4°C

ULTERIORE SINTESI

Buffer B1 1.9  $\mu$ l

Buffer B3 0.1  $\mu$ l

Il tutto si incuba per:

- 4°C per 1'
- 37°C per 15'
- 80°C per 20'
- 4°C

SPIA AMPLIFICATION

Buffer C2 5  $\mu$ l

Buffer C3 10  $\mu$ l

Buffer C1 5  $\mu$ l

Il tutto si incuba per:

- 4°C per 1'
- 47°C per 60'
- 95°C per 5'
- 4°C

La reazione è stata condotta in un *Thermal Cycler Eppendorf*.

Prima di effettuare le differenti reazioni di Real Time PCR utilizzando **SYBR PREMIX DIMER ERASER<sup>TM</sup>** (Qiagen, Milan, Italy), il cDNA ottenuto è stato diluito (1/40, 1/80 e 1/25).

## **2.13 PREPARAZIONE DELLE CELLULE DEL CUMULO**

I campioni di cellule del cumulo sono stati conservati in azoto liquido, da ognuno di essi è stato estratto l'RNA (seguendo il protocollo *Invitrogen*) e quantificato. Tutto il volume di RNA ricavato è stato sottoposto al trattamento con DNasi (vedi paragrafo 2.3.2 pagina 59), retrotrascritto in un volume finale di 20 µl, analizzato mediante PCR ed elettroforesi. Per i dettagli vedere quanto descritto precedentemente per i singoli di ovociti (paragrafo 2.4 pagina 60).

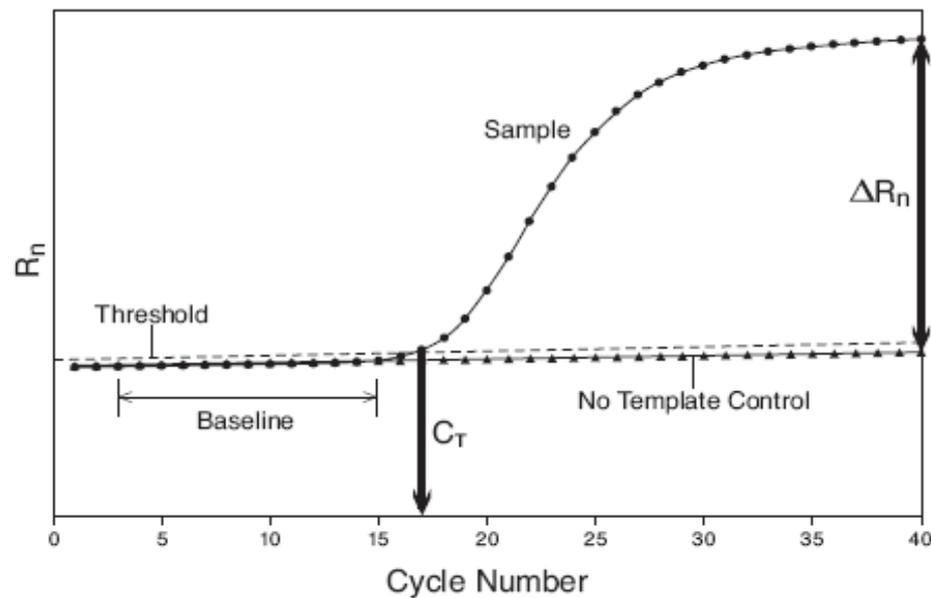
### **2.13.1 ESTRAZIONE DI RNA DA CELLULE DEL CUMULO**

Ogni campione, congelato dopo il prelievo per evitare la degradazione dell'RNA, è stato risospeso direttamente in *Trizol* (1 ml di *Trizol* per ogni *pellet* di cellule) e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente; successivamente è stato aggiunto il Cloroformio (0,2 ml di cloroformio per ogni ml di *Trizol*) per permettere, dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 10 minuti a 4°C, la formazione di 2 fasi: una organica ed una acquosa contenente il nostro RNA. Quest'ultima fase è stata prelevata, posta in una *eppendorf* da 1,5 ml e ad essa è stato aggiunto l'Isopropanolo (0,5 ml di isopropanolo per ogni ml di *Trizol*); dopo un ulteriore *step* di centrifugazione, con le medesime condizioni precedentemente usate, il surnatante ottenuto è stato eliminato ed il

*pellet*, costituito dall'RNA precipitato, è stato lavato con Etanolo al 75%. Effettuata l'ultima centrifugazione con le condizioni sopra riportate, è stato aspirato tutto l'etanolo ed il *pellet* di RNA totale è stato risospeso in un volume appropriato di H<sub>2</sub>O deionizzata sterile [73].

## **2.14 REAL TIME PCR**

La *Real Time*, denominata anche PCR quantitativa, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA: essa misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza dell'amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione vengono determinati a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia ( $C_t$ ), permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale *end point* (**Fig. 34**). Più elevato è il numero di copie iniziali della sequenza da amplificare, più basso sarà il  $C_t$ . Il diagramma di  $C_t$  su DNA stampo è lineare, e la pendenza della retta (*slope*) fornisce una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti forniscono dati relativi alle curve di dissociazione o di *melting* che seguono il completamento della PCR, questi dati danno un'indicazione sulla purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di eventuali dimeri di *primers*.



**Figura 34:** Tipica curva di amplificazione di una PCR. Il ciclo soglia ( $C_t$ ) è rappresentato dall'intersezione della linea di *threshold* con la curva di amplificazione.

La *Real Time* PCR prevede due metodi di quantificazione del prodotto amplificato: una quantificazione assoluta ed una quantificazione relativa. La quantificazione assoluta richiede l'utilizzo di *standard* di cui sia nota la concentrazione assoluta; interpolando i valori di  $C_t$  del campione in esame sulla curva *standard* è possibile ottenere un valore quantitativo preciso rispetto a quello di un gene espresso costitutivamente. La quantificazione relativa è utilizzata per analizzare cambiamenti nell'espressione di un gene in un dato campione in relazione ad un campione di riferimento; in questo caso non è necessaria la costruzione di una curva *standard*: gli *unknown* vengono quantificati paragonando il loro  $\Delta C_t$  con quello del controllo endogeno detto anche calibratore.

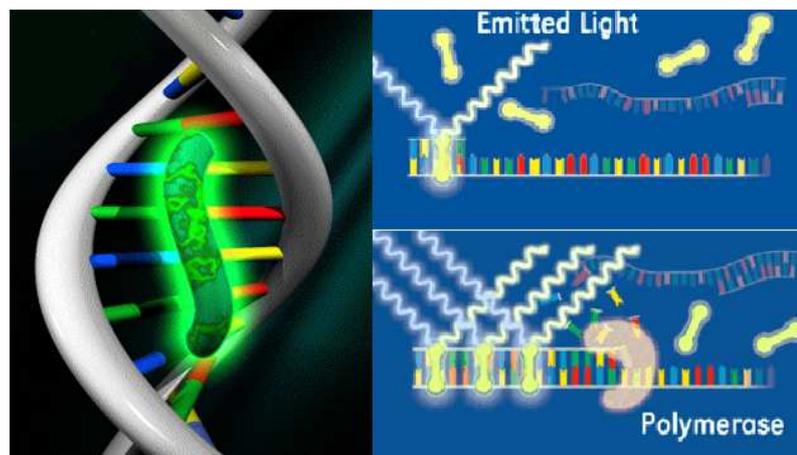
La quantificazione dell'amplificato viene effettuata mediante la rilevazione della fluorescenza che si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche. Le chimiche principali sono basate sul legame di coloranti

fluorescenti che si intercalano nella doppia elica del DNA, come il *SYBR green*, o sull'ibridazione di sonde specifiche.

### 2.14.1 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE SYBR GREEN

Il *SYBR green* è un composto aromatico dotato di attività fluorofora che si comporta da agente intercalante in grado di legarsi preferenzialmente al DNA a doppio filamento inserendosi a livello del solco minore del DNA (**Fig. 35**).

Durante la reazione di amplificazione il *SYBR green* si lega alle doppie eliche:



**Figura 35:** meccanismo con cui il *SYBR green* agisce sul DNA a doppio filamento durante la fase di estensione della PCR.

si osserva così un incremento della fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone (**Fig. 35**); la molecola fluorescente si lega aspecificamente a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di *primers* ed eventuali prodotti aspecifici. Dopo l'amplificazione, i campioni vengono riscaldati e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di dissociazione.

## 2.15 PREPARAZIONE PIASTRE

Le piastre utilizzate nei nostri esperimenti sono piastre **RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array System** (*SuperArray*) costituite da 96 pozzetti in cui sono già spottati i *primers* per specifici geni. In particolare, nelle piastre utilizzate per i *pool* di ovociti e cellule del cumulo, 84 pozzetti (dalla lettera A alla lettera G) contengono le coppie di *primers* per i geni della *pathway* apoptotica; i pozzetti H1-H5 contengono le coppie di *primers* per i geni *housekeeping* usati per normalizzare i dati di PCR Array; il pozzetto H6 contiene la coppia di *primers* per il controllo da DNA genomico (GDC); i pozzetti H7-H9 contengono i controlli per la retrotrascrizione (RTC) ed infine i pozzetti H10-H12 contengono le coppie di *primers* per il controllo della PCR (PPC) (**Fig. 36**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABL1	AKT1	APAF1	BAD	BAG1	BAG3	BAG4	BAK1	BAX	BCL10	BCL2	BCL2A1
B	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11	BCL2L2	BCLAF1	BFAR	BID	BIK	NAIP	BIRC2	BIRC3	BIRC4
C	BIRC6	BIRC8	BNIP1	BNIP2	BNIP3	BNIP3L	BRAF	NOD1	CARD6	CARD8	CASP1	CASP10
D	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7	CASP8	CASP9	CD40	CD40LG	CFLAR
E	CIDEA	CIDEB	CRADD	DAPK1	DFFA	FADD	FAS	FASLG	GADD45A	HRK	IGF1R	LTA
F	LTBR	MCL1	NOL3	PYCARD	RIPK2	TNF	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF11B	TNFRSF1A	TNFRSF21	TNFRSF25
G	CD27	TNFRSF9	TNFSF10	CD70	TNFSF8	TP53	TP53BP2	TP73	TRADD	TRAF2	TRAF3	TRAF4
H	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

**Figura 36:** piastra per *Real Time*.

Naturalmente questa tecnica prevede l'utilizzo di una massa adeguata di mRNA ed è proprio per questo motivo che in questo caso sono stati utilizzati dei *pool* di ovociti anziché ovociti singoli, dai quali non si sarebbe ricavato materiale sufficiente per analizzare i 96 geni della piastra.

L'esperimento su piastra è stato allestito preparando la *mix* dei componenti elencati in **Tabella 8**, per pool di ovociti e cellule del cumulo all'interno di tubi autoclavati da 5ml; successivamente sono stati dispensati 25µl di tale *mix* in ogni pozzetto della piastra.

	<b>OVOCITI</b>	<b>CUMULO</b>
<b>SuperArray PCR master mix</b>	1275 µl	1275 µl
<b>cDNA</b>	100 µl	20 µl
<b>H2O</b>	1145 µl	1225 µl

**Tabella 8:** mix per Real Time PCR.

L'analisi di tutte le piastre è stata condotta utilizzando la “*Stratagene Instruments MX 3005*”; le condizioni di reazione prevedevano 40 cicli totali di cui il primo a 95°C per 10 minuti, in modo da attivare l'enzima *HotStart DNA polimerase* ed i rimanenti a 95°C per 15 secondi ed a 60°C per 1 minuto, fase in cui la macchina legge la fluorescenza.

Nelle **Tablelle 9a** e **9b** sono elencati gli 84 geni apoptotici della piastra che abbiamo preso in considerazione per le nostre analisi (esclusi i controlli di reazione) con i rispettivi *Gene Name* e *Gene Symbol* cosicché d'ora in avanti, per comodità, li menzioneremo facendo riferimento ai loro *Gene Symbol*.

GENE SYMBOL	GENE NAME
ABL1	c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAG1	BCL2-associated athanogene
BAG3	BCL2-associated athanogene 3
BAG4	BCL2-associated athanogene 4
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2A1	BCL2-related protein A1
BCL2L1	BCL2-like 1
BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BCL2L2	BCL2-like 2
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1
BFAR	bifunctional apoptosis regulator
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
BIRC4	X-linked inhibitor of apoptosis
BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6
BIRC8	baculoviral IAP repeat-containing 8
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
CARD6	caspase recruitment domain family, member 6
CARD8	caspase recruitment domain family, member 8
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP14	caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase

Tabella 9a

CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
CD40LG	CD40 ligand
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CIDEA	cell death-inducing DFFA-like effector a
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
DAPK1	death-associated protein kinase 1
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
HRK	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
LTBR	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
NOL3	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
PYCARD	PYD and CARD domain containing
RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
TNFRSF25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
CD27	CD27 molecule
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
CD70	CD70 molecule
TNFSF8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
TP53	tumor protein p53
TP53BP2	tumor protein p53 binding protein, 2
TP73	tumor protein p73
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4
B2M	beta-2-microglobulin
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPL13A	ribosomal protein L13a
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	actin, beta

Tabella 9b

Per quanto riguarda invece, l'esperimento su piastra degli ovociti murini, è stato allestito preparando la *mix* dei seguenti componenti:

cDNA	2 $\mu$ l
Buffer	64 $\mu$ l
Foward	4.8 $\mu$ l
Reverse	4.8 $\mu$ l

H<sub>2</sub>O

54.4 µl

all'interno di *eppendorf* da 0.2 µl; successivamente sono stati dispensati 10 µl di tale *mix* in ogni pozzetto della piastra (**Fig. 37**).

	TA		DN		HPRT	
<i>Ovociti OLD</i>	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3	3
<i>Ovociti YOUNG</i>	4	4	4	4	4	4
	5	5	5	5	5	5
	6	6	6	6	6	6
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

**Figura 37:** piastra per *Real Time*.

L'analisi della piastra è stata condotta utilizzando la “*Eppendorf Multiplex Instruments*”; le condizioni di reazione prevedevano 40 cicli totali di cui il primo a 95°C per 30 minuti, in modo da attivare l'enzima *HotStart DNA polimerase* ed i rimanenti a 95°C per 5 secondi ed a 60°C per 30 secondi, fase in cui la macchina legge la fluorescenza, ed infine *melting curve*.

## 2.16 ANALISI DEI DATI E COSTRUZIONE DEI DOT-PLOT

Abbiamo calcolato i valori dei livelli di espressione dei geni MA, sia nei *pool* che nei singoli campioni, mediante il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [76]. La normalizzazione dei dati è stata condotta utilizzando HPRT (**Tabella 10**) come controllo

endogeno, gene scelto sulla base del fatto che i valori di Ct risultano essere costanti in tutti i campioni analizzati.

Gene	Primers	cDNA (bp)	PCR conditions
HPRT	5'TGACACTGGCAAACAATGCA3' 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3'	90bp	95°C 20 sec; (95°C 1 sec;60°C 60 sec)x40;
MM HPRT	5'CCTAGATGAGCGCAAGTTGAA3' 5'CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA3'	82bp	95°C 15 sec; 60°C 15 sec; 95°C 15 sec.

**Tabella 10:** sequenza dei *primers* per HPRT e condizioni di Real Time PCR

I dati di espressione sono mostrati come  $\ln$  del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  dei geni MA normalizzati rispetto ad HPRT e al campione/i utilizzato/i come calibratore (*pool* di ovociti *young*, *pool* di cellule del cumulo *young* e ovociti *young*). Al fine di identificare geni del MA differenzialmente espressi in ovociti rispetto alle cellule somatiche, abbiamo effettuato dei confronti tra i livelli di espressione dei geni MA in ovociti *young* utilizzando come calibratore cellule del cumulo *young* e in ovociti *old* utilizzando come calibratore cellule del cumulo *old*. Invece, per identificare geni del MA differenzialmente espressi in ovociti in relazione all'età abbiamo confrontato i livelli di espressione dei geni MA in ovociti *old* utilizzando come calibratore gli ovociti *young*.

Per identificare geni del MA differenzialmente espressi, abbiamo utilizzato un *fold change* stringente ( $FC \leq 0.33$  per la *down-regulation* e un  $FC \geq 3$  per l'*up-regulation*, equivalente ad un  $\ln = \pm 1$ ) al fine di considerare un gene del MA come *up-* o *down-*regolato.

I dati ricavati dalle varie analisi, sono stati organizzati in un *file* di testo (\*.txt), necessario per effettuare un *clustering* dei valori di espressione dei geni analizzati nei campioni presi in esame.

Con l'aumentare del numero dei campioni analizzato è stato necessario utilizzare dei metodi che permettessero un'immediata visualizzazione e contemporaneamente un'analisi statistica. Il *clustering* è stato effettuato utilizzando il *software Cluster 3.0* attraverso il seguente percorso: **Absolute Correlation Centred – Centroid Linkage – City Block Distance**. I dati sono stati poi visualizzati tramite il *software Java Treeview* in Dot Plot.

## 2.17 INTERATTOMICA DEI GENI DEL MA

La *network* dei geni del MA è stata generata mediante il *plug-in APID2NET* di *Cytoscape* ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)), software in grado di visualizzare come *network* un *file* di testo (\*.txt) opportunamente organizzato.

Da un punto di vista grafico, una *network* non è altro che una serie di **nodi** (le proteine o i metaboliti) le cui interazioni (che possono essere di varia natura) sono visualizzate con **archi** che connettono i vari nodi. Nodi ed archi insieme costituiscono una *network*.

Fondamentalmente possono essere distinti due tipi di interazioni:

- Di **tipo fisico** (la proteina A interagisce fisicamente con la proteina B);
- Di **tipo funzionale** (la proteina A interagisce con la proteina B attraverso fenomeni di fosforilazione, defosforilazione, ecc.).

Alla *network* così fatta sono stati caricati i valori di espressione dei geni del MA ottenuti nei nostri esperimenti. L'analisi di centralità della rete è stata

effettuata utilizzando il *plug-in Network Analyzer*, che permette di recuperare tutti i parametri di centralità di un nodo da una rete consolidata [77].

Dalla *network* si può vedere come molti di questi geni risultino alterati negli ovociti *old* rispetto agli *young*. Alcuni di questi geni alterati costituiscono degli *hub* ovvero dei punti centrali della *network*.

## **2.18 ANALISI STATISTICHE**

Abbiamo dimostrato mediante l'applicazione del Student's t-test ai valori di  $\Delta Ct$  tra ovociti *old* e *young* che ci sono variazioni statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda i geni analizzati.

## ANALISI DI TRASCRITTI OVOCITA-SPECIFICI IN OVOCITI FRESCHI E IN OVOCITI SCONGELATI DOPO VITRIFICAZIONE

In questo lavoro abbiamo valutato, mediante RT-PCR *Real Time*, la qualità ovocitaria in risposta a specifici protocolli di congelamento (Vitrificazione).

I risultati ottenuti in questo studio sono stati pubblicati su **Fertility and Sterility** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542504>).

Di seguito sono riportati la procedura utilizzata.

### 2.19 RICERCA DI SEQUENZE DI GENI OVOCITA-SPECIFICI E DISEGNO DEI *PRIMERS*

Le sequenze dei geni codificanti proteine importanti per lo sviluppo dell'embrione sono state ricavate su **Entrez Gene** di NCBI

Le coppie di *primers* sono state disegnate con **Primer3** e nella **Tabella 11** sono riportate le condizioni di reazione per le coppie di *primers* utilizzate e la dimensione in paia di basi (bp) dell'amplificato atteso.

Gene	Primers	cDNA (bp)	Real Time PCR conditions
HPRT	5'TGACACTGGCAAACAATGCA3' 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3'	90bp	95°C 20 sec; (95°C 1 sec;60°C 60 sec)x40; 95°C 15 sec; 60°C 15 sec; 95°C 15 sec.
GAPDH	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3' 5'GGCATGGACTGTGGTCATGAG3'	87bp	
TAF4B	5'TGGATGCAAAAATCGAAGCA3' 5'TCGTAAGGCAACCACGCTTT3'	113bp	
GDF9	5'CTCGGCAGAGCTCCATACTC3' 5'TTGAGGCCACTAAAGGTTG3'	113bp	
BMP15	5'GGCACTTCATCCTTGGACAT3' 5'GCCCCTGGGAAGAAATTTAG3'	90bp	
FIGLA	5'AAAACCTCCAGTTGGTGCTG3' 5'GGCACAAGTGCCTTCAATCT3'	106bp	
OCT4	5'GAAGGATGTGGTCCGAGTGT3' 5'GCCTCAAATCCTCTCGTTG3'	90bp	

**Tabella 11:** geni ovocita-specifici.

## **2.20 RACCOLTA DEI CAMPIONI**

Anche per questo studio sono stati utilizzati ovociti soprannumerari provenienti da donne sottoposte a cicli di fecondazione in vitro (IVF).

In particolare, per questo studio, un totale di 25 ovociti in MII sono stati collezionati da 5 differenti donne. Da ognuna sono stati prelevati 2 ovociti freschi e 3 vitrificati, scegliendo quelli con buona morfologia, per un totale di 10 freschi e 15 vitrificati. Per quel che riguarda il prelievo ovocitario, la preparazione degli ovociti vedere paragrafo 2.2 e 2.3.

## **2.21 PROTOCOLLI DI VITRIFICAZIONE E SCONGELAMENTO**

Per le procedure di vitrificazione e scongelamento è stato utilizzato il kit Irvine Vitrication Freeze (Vit Kit-Freeze; Vit Kit-Thaw , Santa Ana, CA) che comprende due soluzioni per la vitrificazione e tre per lo scongelamento.

### **2.21.1 VITRIFICAZIONE**

La procedura di vitrificazione è stata condotta a temperatura ambiente (23-25°C). Su un coperchio Petri sono state allestite 1 goccia da 20 µl di medium (Gamete; Vitrolife, Goteborg, Sweden); 3 gocce da 20 µl di soluzione di equilibratura (ES1, ES2, ES3) ed 1 goccia da 20 µl di soluzione di vitrificazione (VS).

Tre ovociti, con un minimo volume di terreno dalla piastra di coltura (37°C-5%CO<sub>2</sub>), sono stati trasferiti nella goccia di medium per 1 minuto, dopo di che

hanno subito 3 passaggi nelle gocce di soluzione equilibrante per 2 minuti, 2 minuti e 3 minuti rispettivamente. Da qui gli ovociti sono stati trasferiti nelle 3 gocce di soluzione di vitrificazione per 5 secondi, 5 secondi e 10 secondi rispettivamente. A questo punto gli ovociti sono stati immediatamente caricati, in un minimo volume di soluzione di vitrificazione, sulla parte più distale di un capillare (HSV; CryoBioSystem, L'Aigle, France). Il capillare è stato inserito immediatamente in un HSV straw e sigillato mediante l'utilizzo di una sigillante termica (CryoBio-System).

In meno di un minuto dall'inizio dell'esposizione alla soluzione di vitrificazione, il campione è stato vitrificato mediante il tuffo dell' HSV in azoto liquido.

### **2.21.2 SCONGELAMENTO**

Allo scongelamento le HSV sono passate dall'azoto liquido (-196°C) al bagnetto termostato a 37°C dove vi sono rimasti per 3 secondi circa.

Dopo gli ovociti sono stati scaricati dal capillare nella prima goccia di soluzione di scongelamento per 1 minuto e poi trasferito in una seconda goccia (20 µl) di soluzione di scongelamento per un altro minuto. Successivamente, gli ovociti sono stati incubati per due volte consecutive in gocce (20 µl ognuna) di soluzione di diluizione per 2 minuti ognuna e susseguentemente in 3 gocce (20 µl ognuna) di soluzione di scongelamento per 3 minuti ciascuna. Dopo questa procedura i singoli ovociti sono stati utilizzati per gli esperimenti di *Real Time* condotti su ABI Prism 7900HT (*Applied Biosystems*).

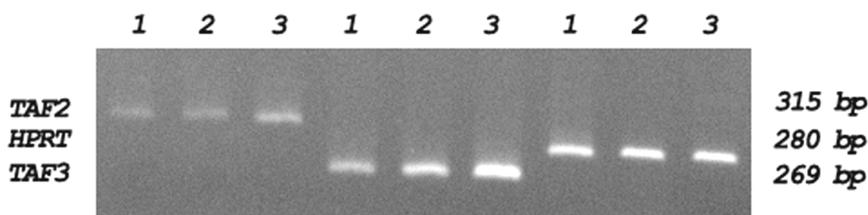
## RISULTATI

### **3.1 ANALISI DI ESPRESSIONE DEL TFIID IN SINGOLI OVOCITI UMANI: NUOVI POTENZIALI MARCATORI MOLECOLARI DI QUALITÀ OVOCITARIA**

Come specificato in maggior dettaglio in materiali e metodi (vedi paragrafo 2.2 “Raccolta dei campioni” pagina 55), mediante RT-PCR semiquantitativa abbiamo analizzato l’espressione dei geni codificanti le differenti subunità di TFIID su un totale di 150 ovociti umani maturi (**Metafase II**) provenienti da 50 differenti donne.

Verificata la qualità della reazione di retrotrascrizione mediante l’amplificazione di HPRT su una aliquota del cDNA dell’ovocita, abbiamo esaminato l’espressione dei diversi mRNA codificanti le varie subunità di TFIID in aliquote di uguale volume provenienti da 3 differenti ovociti. La stima della massa di cDNA per ogni mRNA amplificato è stata ottenuta normalizzando con HPRT. La diversa espressione delle differenti isoforme è stata calcolata mediante il rapporto dei cDNA ottenuti dalla amplificazione con la stessa coppia di primers.

Questa prima analisi ha mostrato che molti dei geni TAF analizzati sono presenti nel gamete femminile ed i livelli di espressione, a parte le variazioni sperimentali, sono fondamentalmente simili in tutti gli ovociti (**Fig. 38**).



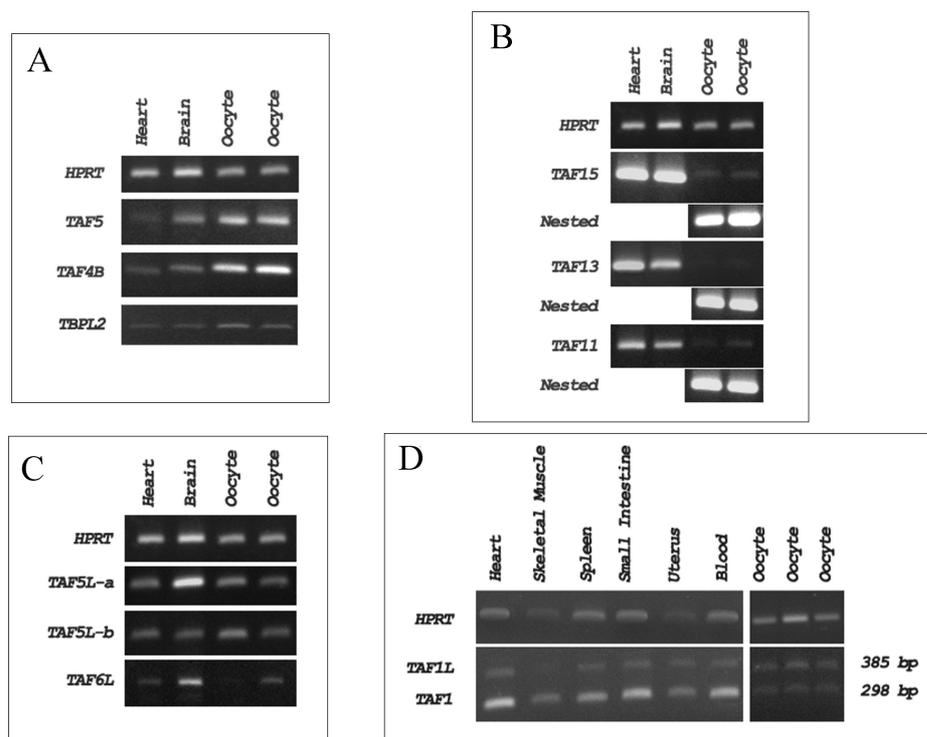
**Figura 38:** RT-PCR di TAF2 e TAF3 in tre differenti ovociti. I dati sono stati normalizzati caricando nello stesso gel il cDNA oggetto di studio e il gene di riferimento HPRT. Il cDNA è stato indipendentemente amplificato da un'aliquota identica dello stesso campione.

Risultano assenti solo gli mRNA che codificano per TAF7L, paralogo di TAF7 che riveste un'importante funzione nella spermatogenesi [78, 79] e per l'isoforma delta del TAF6, coinvolto nell'apoptosi [80].

Tra le differenti varianti trascrizionali presenti su Entrez Gene, TAF1 variante 1, TAF6 isoforma alfa e TAF9 isoforma a sembrano essere maggiormente espresse rispetto a TAF1 variante 2, TAF6 isoforma gamma e TAF9 isoforma b.

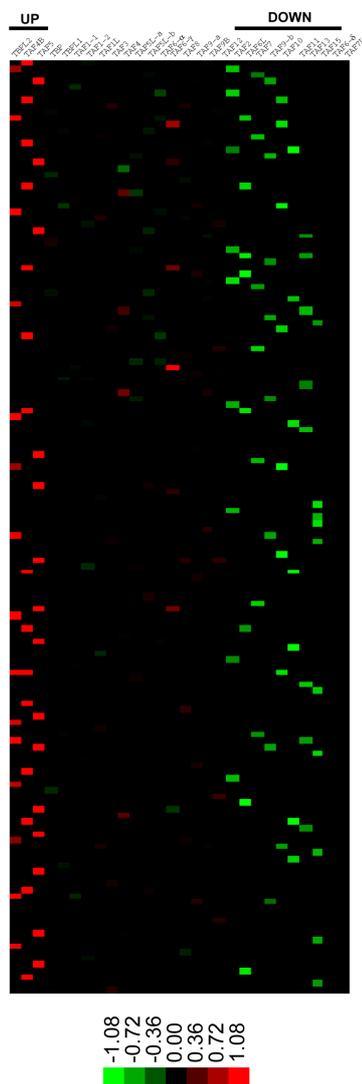
Paragonando l'espressione dei singoli mRNA nei tessuti controllo e negli ovociti abbiamo osservato che esistono delle notevoli differenze di espressione tra le diverse subunità di TFIID. I trascritti per TAF4B, TAF5 e TBPL2 sono molto abbondanti negli ovociti e la loro espressione è molto più alta rispetto ai tessuti controllo (**Fig. 39A**). Di contro, TAF11, TAF13 e le differenti isoforme di TAF15 hanno un livello di espressione molto basso e possono essere messi in evidenza solo dopo *nested* PCR (**Fig. 39B**). Contrariamente a TAF6L, le due isoforme di TAF5L sono ben rappresentate nella cellula germinale femminile (**Fig. 39C**). Il cDNA di TAF1L sembra essere presente nell'ovocita e nei

tessuti usati come controllo (**Fig. 39D**). Questo dato, in contrasto a quanto precedentemente pubblicato [81], è stato verificato estendendo l'analisi ad altri tessuti (**Fig. 39D**). Infine, TAF9-a ed il suo paralogo TAF9B sono entrambi espressi negli ovociti umani a livelli simili rispetto agli altri tessuti.



**Figura 39:** (A) cDNAs di HPRT, TAF5, TAF4B e TBPL2 amplificati da tessuto umano (lane 1 cuore, lane 2 cervello) e da ovociti umani (lanes 3 e 4). E' evidente che i TAF e TBPL2 sono abbondantemente espressi negli ovociti. (B) cDNA di HPRT, TAF11, TAF13 e TAF15 amplificati da tessuti umani (lane 1 cuore, lane 2 cervello) e da ovociti umani (lanes 3 e 4). I frammenti di TAF11, TAF13 e TAF15 sono visualizzabili solo dopo nested PCR. (C) I cDNA per HPRT, le due isoforme di TAF5L e TAF6L (lane 1 cuore, lane 2 cervello) e da ovociti umani (lanes 3 e 4). Il gene paralogo di TAF5 mostra rispetto a TAF6L una maggiore espressione. (D) cDNA di TAF1 e TAF1L amplificato da tessuti umani (lane 1 cuore, lane 2 muscolo scheletrico, lane 3 milza, lane 4 intestino, lane 5 utero, lane 6 sangue) e da ovociti umani (lanes 7-9) usando la stessa coppia di primers. Aliquote identiche dello stesso campione sono state analizzate con i primers per HPRT.

I valori densitometrici dei cDNA amplificati (normalizzati con HPRT) per ogni ovocita , così come per i tessuti controllo, sono stati analizzati statisticamente (Student's *t*-test), dimostrando che l'espressione di TAF2, TAF4B, TAF5, TAF6L, TAF7, TAF9-b, TAF10, TAF11, TAF13, TAF15, TBPL2, sono statisticamente differenti ( $P$ -value<0.01). Inoltre, TAF4B, TAF5 e TBPL2 hanno mostrato un più alto livello di espressione in tutti gli ovociti. Il ln dei valori densitometrici normalizzati, ottenuto dal rapporto tra i valori densitometrici normalizzati degli ovociti e la media dei valori densitometrici dei tessuti controllo, è stato usato per generare un dot plot (*software tree view* 1.0.13) (**Fig. 40**).



**Figura 40:** Dot plot: I risultati sono organizzati in una matrice *gene-expression*, dove ogni colonna rappresenta un mRNA (contrassegnato dal corrispondente gene symbol) e ogni riga un singolo ovocita. La *colour scale* indica i relativi livelli di espressione di ogni gene. Il *bar code* alla base rappresenta la *colour scale* del  $\ln$  dei valori.

Schematizzando è possibile suddividere i seguenti livelli di espressione delle subunità di TFIID in 4 gruppi (**Tabella 12**):

- a) espressione più alta nell'ovocita rispetto ai tessuti controllo (TBPL2, TAF4B e TAF5);

- b) espressione paragonabile (TBP, TBPL1, TAF1-1, TAF1-2, TAF1L, TAF3, TAF4, TAF5L-a, TAF5L-b, TAF6alfa, TAF6gamma, TAF8, TAF9-a, TAF9B e TAF12);
- c) espressione inferiore (TAF2, TAF6L, TAF7, TAF9-b, TAF10, TAF13, TAF15-1 e TAF15-2)
- d) nessuna espressione (TAF6delta eTAF7L).

<b>Gruppo 1</b>	<b>TBPL2</b>
	<b>TAF4B</b>
	<b>TAF5</b>
<b>Gruppo 2</b>	<b>TBP TBPL1</b>
	<b>TAF1-1 TAF1-2 TAF1L</b>
	<b>TAF3</b>
	<b>TAF4</b>
	<b>TAF5L-a TAF5L-b</b>
	<b>TAF6alfa TAF6gamma</b>
	<b>TAF8</b>
	<b>TAF9-a TAF9B</b>
	<b>TAF12</b>
<b>Gruppo 3</b>	<b>TAF2</b>
	<b>TAF6L</b>
	<b>TAF7</b>
	<b>TAF9-b</b>
	<b>TAF10</b>
	<b>TAF11</b>
	<b>TAF13</b>
	<b>TAF15-1 TAF15-2</b>
<b>Gruppo 4</b>	<b>TAF6delta</b>
	<b>TAF7L</b>

**Tabella 12:** differenti gruppi di espressione delle subunità di TFIID tra ovociti e tessuti controllo.

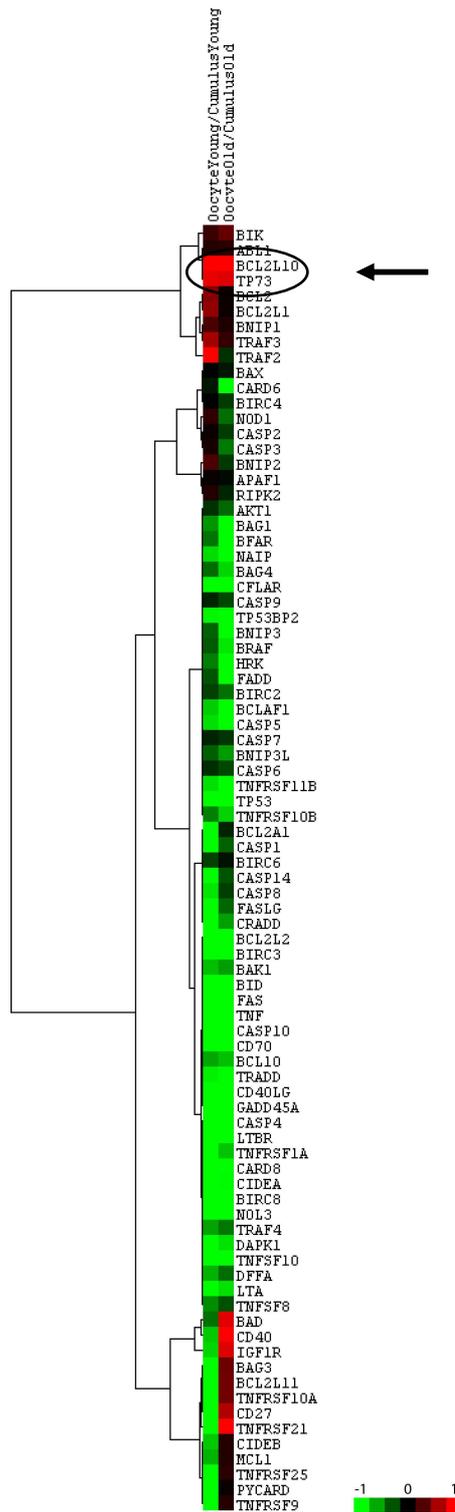
### 3.2 PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI DEL MACCHINARIO APOPTOTICO IN OVOCITI UMANI MATURI ED IN CELLULE DEL CUMULO

Per l'analisi del profilo d'espressione dei geni MA sono stati utilizzati 35 ovociti provenienti da 15 differenti donne suddivise in due gruppi a seconda dell'età (vedi paragrafo 2.9 "Raccolta dei campioni" pagina 71).

Partendo da *pool* composti da 5 ovociti soprannumerari prelevati da una singola donna, al fine di evitare variazioni individuali, abbiamo analizzato le differenze di espressione di 84 geni codificanti proteine coinvolte nell'apoptosi (**Tabella 9a e 9b**) tra ovociti *young* e ovociti *old*. Abbiamo inoltre effettuato l'analisi anche tra i *pool* delle rispettive cellule del cumulo.

In seguito all'analisi dei dati RT PCR *Real Time* con il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (vedi paragrafo 2.16 Analisi dei dati e costruzione dei Dot-Plot" pagina 84) sono stati identificati alcuni mRNA differenzialmente espressi tra ovociti e cellule del cumulo della stessa donna ed alcuni mRNA *up* o *down* regolati in relazione all'età materna ( $\ln 2^{-\Delta\Delta Ct} < -1$  *down regulated* e  $\ln 2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$  *up regulated*).

Dal confronto tra ovociti e cellule del cumulo abbiamo trovato che, indipendentemente dall'età materna, la maggior parte dei geni risulta *down* regolata negli ovociti fatta eccezione per BCL2L10 e p73 che invece risultano essere abbondantemente espressi negli ovociti, sia *old* che *young*, rispetto alle cellule del cumulo (**Fig. 41**).



**Figura 41:** Dot Plot. Normalizzazione mediante il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  tra *ovociti young* e rispettive cellule del cumulo ed *ovociti old* e rispettive cellule del cumulo.

Inoltre, abbiamo individuato alcune differenze correlate all'età materna, suggerendo che alcuni geni che codificano per proteine proapoptotiche (BAD, CD40, BAG3, TNFRSF10A, TNFRSF21 e CD27) sono *up* regolati negli ovociti rispetto alle cellule del cumulo in donne *over* 38.

Dal confronto tra ovociti *old* ed ovociti *young* abbiamo trovato che il profilo di espressione dei geni del macchinario è fortemente dipendente dall'età materna. Infatti, i risultati mostrano che su 57 geni con funzione proapoptotica 32 non variano in maniera significativa, 9 sono *down* regolati e 16 sono *up* regolati. Considerando i geni con funzione antiapoptotica su 27 geni 11 non variano in maniera significativa, 5 sono *up* regolati e 11 sono *down* regolati (**Tabella 13**).

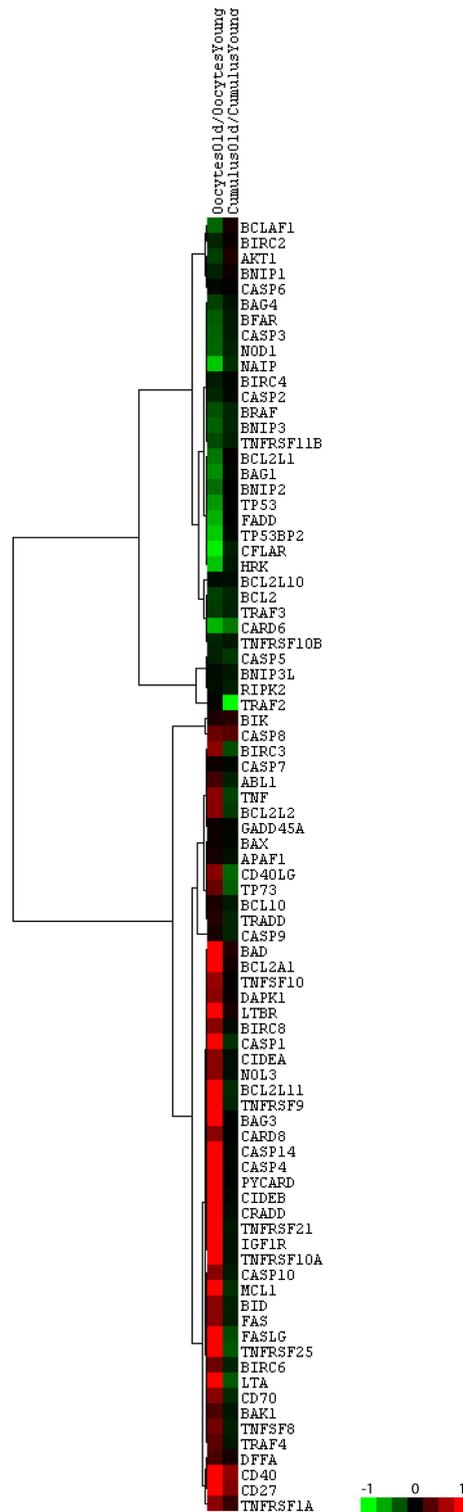
GENES	In 2-ΔΔCt	
BAD	3.486530318	PROAPOPTOTIC
BCL2L11	6.25911904	
BCLAF1	-1.559581156	
BNIP2	-1.628895874	
BNIP3	-1.490266438	
CASP1	6.099695189	
CASP14	3.133025256	
CASP3	-1.504129382	
CASP4	3.306312051	
CD40	8.601956511	
CIDEB	2.862697856	
CRADD	4.741126715	
FADD	-2.446809547	
FASLG	4.006390704	
HRK	-2.668616645	
LTA	2.751794307	
LTBR	3.930144514	
NOD1	-1.552649684	
PYCARD	3.1468882	
TNFRSF10A	5.309507403	
TNFRSF21	8.886146855	
TNFRSF25	4.657949053	
TNFRSF9	5.240192685	
TP53	-2.14875626	
TP53BP2	-2.758725779	
AKT1	-1.088241073	
BAG1	-2.023989767	
BAG3	4.470799315	
BAG4	-1.122898433	
BCL2	-1.081309602	
BCL2A1	3.91628157	
BCL2L1	-1.746730895	
BFAR	-1.441746136	
BRAF	-1.296185228	
CARD6	-2.488398378	
CD27	6.806705313	
CFLAR	3.174614087	
IGF1R	5.302575931	
MCL1	3.063710538	
NAIP	-2.703274004	
TNFRSF11B	-1.219939038	

Tabella 13: geni pro e antiapoptotici differenzialmente espressi in ovociti *old*.

Analizzando le cellule del cumulo abbiamo osservato che la variazione coinvolge un numero minore di messaggeri e non si evidenziano correlazioni tra apoptosi ed invecchiamento. Infatti abbiamo riscontrato una variazione dei livelli di espressione soltanto di 11 geni rispetto agli 84 analizzati, e come si evince dalla **Tabella 14** e dalla **Figura 42** (seconda colonna del Dot Plot), la maggior parte di questi geni risultano essere *down*-regolati.

GENES	$\ln 2-\Delta\Delta Ct$	
CASP8	1.043186507	PROAPOPTOTIC
CD40	1.667018969	
CD40LG	-1.251130661	
LTA	-1.050117979	
TNFRSF25	-1.029323563	
TP73	-1.105569753	
CARD6	-1.4382804	ANTIAPOPTOTIC
CD27	1.535321005	
TRAF2	-3.503858998	

**Tabella 14:** geni pro e antiapoptotici differenzialmente espressi in cellule del cumulo *old*.

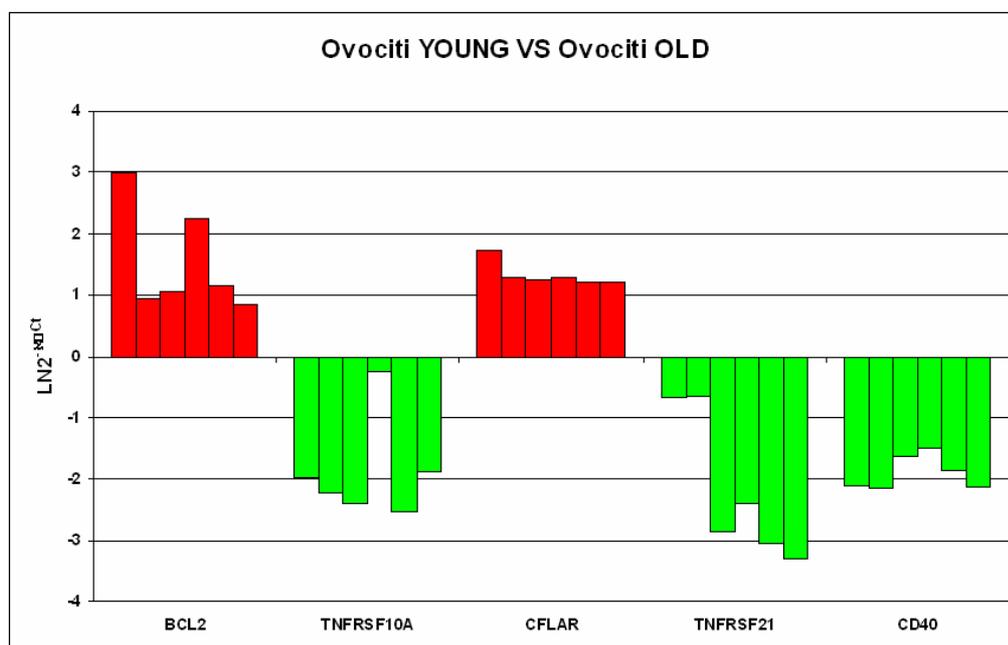


**Figura 42:** Dot Plot. Normalizzazione mediante il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  tra oociti old contro oociti young e cellule del cumulo old contro cellule del cumulo young.

Al fine di confermare i dati ottenuti nei *pool* di ovociti *old*, abbiamo esteso l'analisi alle singole cellule selezionando alcuni geni (NAIP, BCL2L1, BCL2, TNFRSF10A, TNFRSF21, CFLAR, CD40 e BAD) che mostravano nel *pool* un *pattern* di espressione profondamente differente in relazione all'età materna ( $0.33 \leq 2^{-\Delta\Delta Ct} \leq 3$ ) e il cui ruolo risulta essere rilevante nell'attivazione della *pathway* estrinseca dell'apoptosi ed altri come BCL2L1, MCL1 e p73 che presentano isoforme trascrizionali che svolgono funzioni biologiche opposte (BCL2L1 long, BCL2L1 short, MCL1 long, MCL1 short, TAp73 e  $\Delta Np73$ ). Dal momento che i *primers* spottati nelle piastre della *SuperArray* non sono in grado di discriminare tali isoforme, abbiamo disegnato delle coppie di *primers* in grado di distinguere l'isoforma proapoptica dalla anti e ne abbiamo analizzato l'espressione sui singoli ovociti.

Ognuno di questi geni è stato analizzato in singoli ovociti provenienti da 9 differenti donne (6 *young* e 3 *old*) sottoposte a stimolazione per IVF (*in vitro fertilization*). Per ogni ovocita, mediante RT PCR *Real Time*, abbiamo analizzato 5 mRNA e HPRT come gene di riferimento.

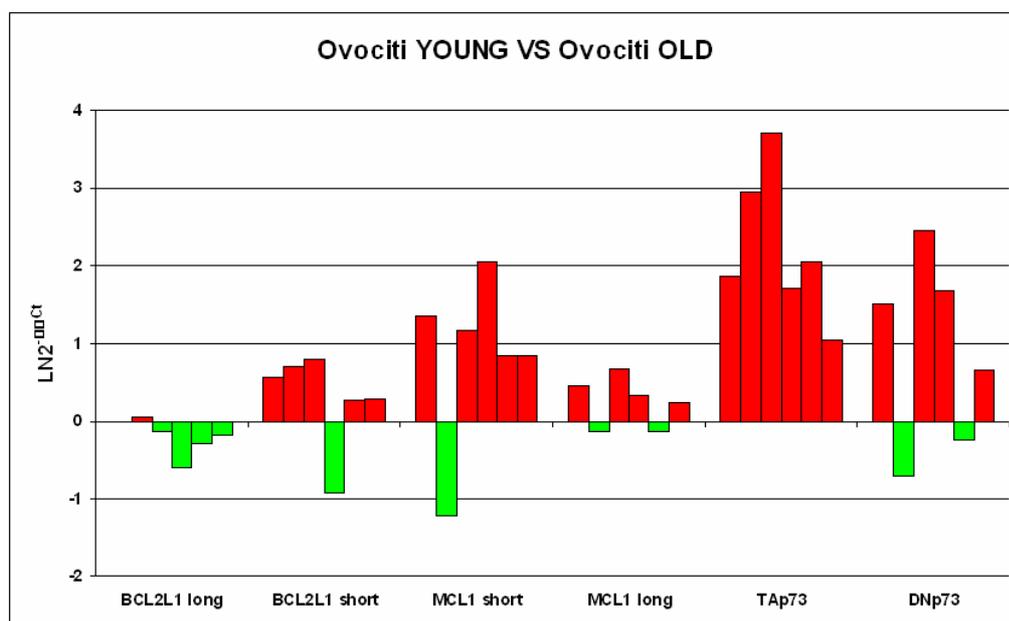
Questa analisi ha confermato che le differenze di espressione per BCL2 e CFLAR sono statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) e che questi trascritti anti apoptotici sono molto più abbondanti negli ovociti *young* rispetto agli *old* (**Fig. 43**).



**Figura 43:** trascritti più abbondanti in ovociti *young* rispetto ad ovociti *old*.

Allo stesso modo CD40, TNFRSF10A, TNFRSF21 sono più abbondanti negli ovociti *old* rispetto agli *young* ( $p < 0.05$  o  $p < 0,01$ ) (**Fig. 43**). Di contro, le differenze di espressione per BCL2L11, BAD e NAIP non sono risultate statisticamente significative.

L'analisi delle isoforme trascrizionali di BCL2L1 e MCL1 ha mostrato che entrambe le isoforme sono espresse nel gamete femminile e che i rapporti dei  $\Delta C_t$  tra ovociti *old* e *young* sono molto simili con una piccola sovra espressione dell'isoforma anti (short) rispetto alla pro (long) in ogni campione (**Fig. 44**).



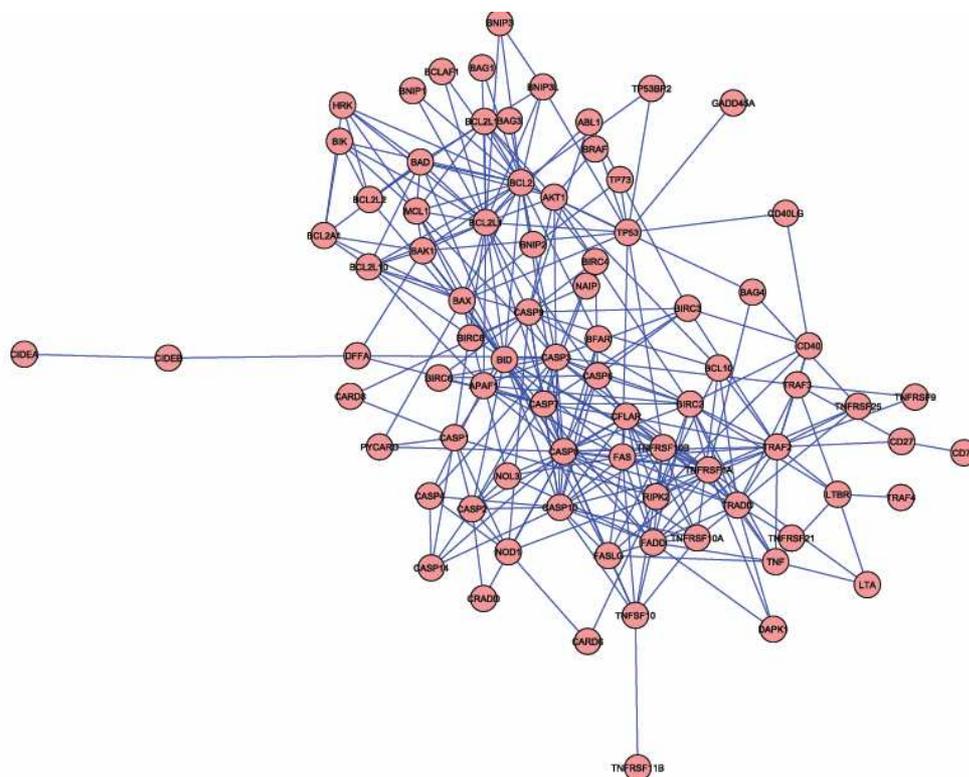
**Figura 44:** trascritti più abbondanti in ovociti *young* rispetto ad ovociti *old*.

Sempre riguardo le isoforme trascrizionali, abbiamo trovato che l'isoforma TAp73 è espressa esclusivamente negli ovociti *young* (negli ovociti *old* Ct > 40), mentre la ΔNp73 isoforma γ, avente funzione antiapoptotica, nonostante sembri essere sovraespressa in 3 ovociti *young* ( $\ln 2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ ), all'analisi statistica (t-test) non mostra differenze statisticamente significative tra ovociti *old* e ovociti *young*.

L'assenza dell'isoforma TAp73 negli ovociti *old* è stata particolarmente interessante per cui abbiamo voluto riconfermare il dato su un altro modello. Abbiamo quindi effettuato la stessa analisi su ovociti murini, e dai dati ottenuti si evince che anche in questo modello l'isoforma TAp73 risulta essere abbondantemente espressa negli ovociti provenienti da topine *young*.

### 3.2.1 INTERATTOMICA

La *network* degli 84 geni del MA (**Fig. 45**) è una tipica *network* biologica costituita da molti nodi con poche interazioni e da pochi nodi con molte interazioni (*hubs*). E' stata costruita utilizzando i dati di interazione estrapolati dal *database Gene* elaborati con il *software Cytoscape* (vedi Materiali e Metodi). Nella *network* i geni rappresentano i **nodi** mentre le loro interazioni ne costituiscono gli **archi**.



**Figura 45.** Rappresentazione grafica della *network* degli 84 geni del Macchinario Apoptotico

Inoltre, ai dati di interazione sono stati sovrapposti quelli riguardanti i valori di espressione dei geni del MA ottenuti dal confronto tra *pool* di ovociti *old* e *pool* di ovociti *young* (Fig. 46).

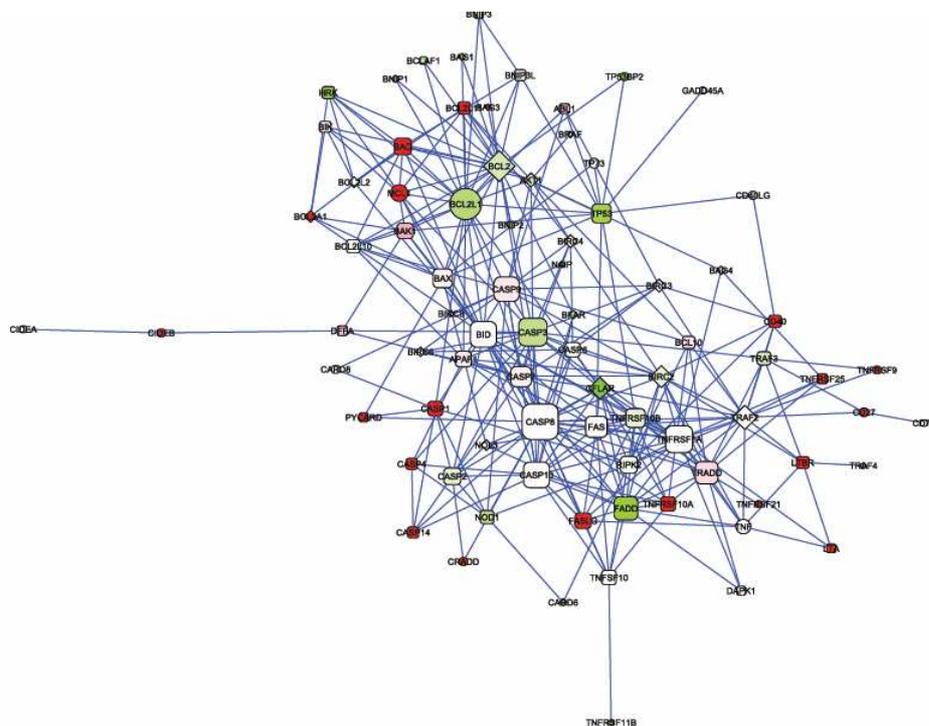


Figura 46: *network* dei geni del MA.

Le proteine del MA con il maggior numero di interazioni (proteina-proteina e proteina-DNA) all'interno del macchinario stesso (numero di interazioni  $\geq 10$ ) sono CASP8, BCL2L1, BCL2, CASP3, TNFRSF1A, FADD e CFLAR. Queste proteine costituiscono i nodi strutturalmente e funzionalmente più importanti della *network*, che, se soggetti ad alterazioni, potrebbero compromettere criticamente la stabilità della *network* e, conseguentemente, il corretto funzionamento della cellula.

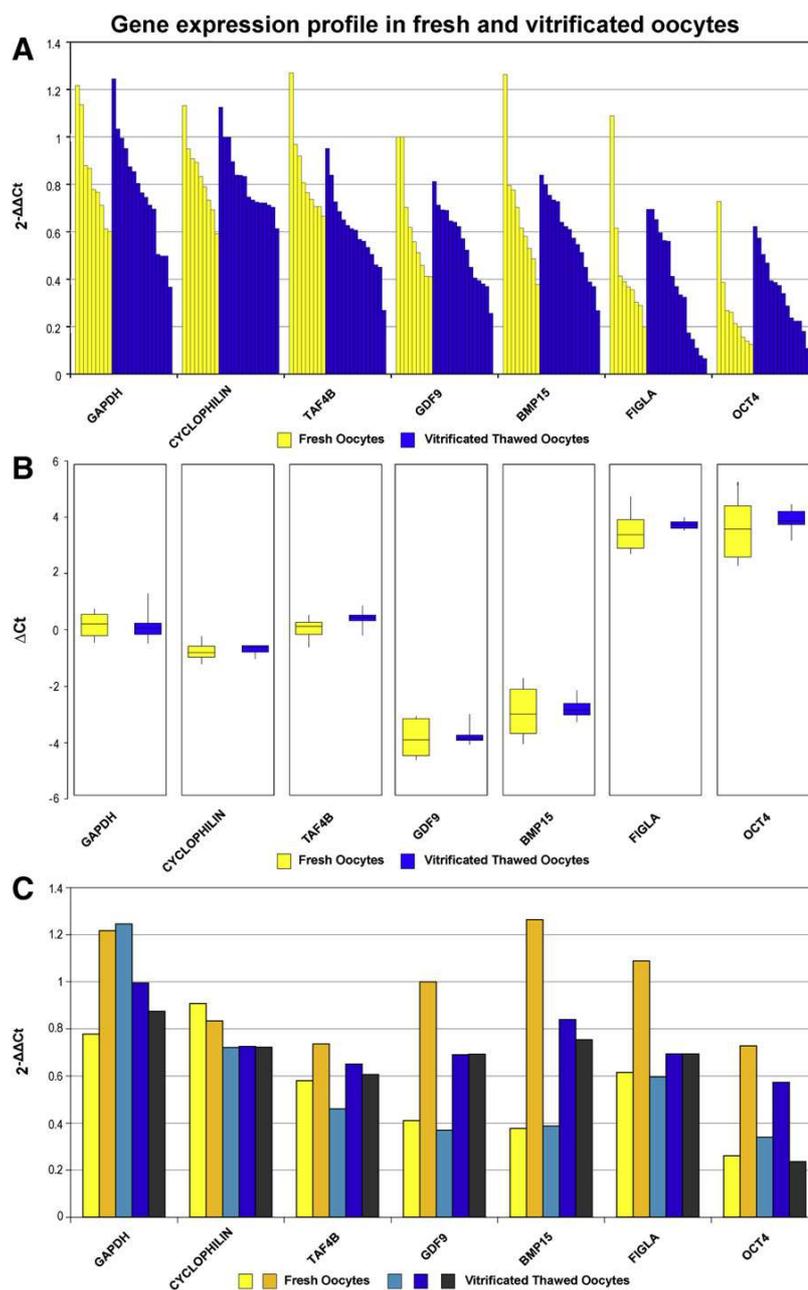
### **3.3 ANALISI DI TRASCRITTI OVOCITA-SPECIFICI IN OVOCITI FRESCHI E IN OVOCITI SCONGELATI DOPO VITRIFICAZIONE**

I nostri dati sono stati normalizzati mediante il metodo classico del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [76]. Questo metodo prevede il confronto tra i valori di  $C_t$  del campione di interesse e un ovocita fresco utilizzato come calibratore. I valori di  $C_t$  sia del controllo che del campione di interesse sono stati normalizzati con HPRT [82].

I nostri dati mostrano chiaramente che il profilo di espressione dei geni, scelti come biomarcatori (TAF4B, GDF9, BMP15, FIGLA e OCT4), non cambia tra ovociti freschi e vitrificati ( $0,3 < 2^{-\Delta\Delta C_t} < 1,3$ ) (**Fig. 47A**).

Per validare statisticamente i nostri risultati, abbiamo confrontato i valori di  $C_t$ , normalizzato per HPRT ( $\Delta C_t$ ), in ovociti freschi ed in ovociti vitrificati. Sebbene alcuni siano stati raccolti dalla stessa donna, consideriamo ogni singolo ovocita come un campione indipendente: ciò è dovuto allo specifico differenziamento cui vanno incontro i gameti anche se provenienti dallo stesso individuo. Infatti, ogni gamete può subire specifiche alterazioni a livello genomico o modifiche epigenetiche del DNA mostrando un evidente livello di diversità molecolare con conseguente differenza nella competenza ovocitaria, tasso di fecondazione e tasso di gravidanza. Per l'analisi statistica abbiamo utilizzato lo *Student's t-test* indipendente che ha dimostrato che non ci sono variazioni statisticamente significative tra ovociti freschi e ovociti scongelati dopo vitrificazione ( $P < 0,01$ ) (**Fig. 47B**). Ciò è stato ulteriormente confermato

dal confronto di cinque ovociti diversi (due freschi e tre vitrificati), raccolti dalla stessa donna durante lo stesso protocollo di stimolazione ovarica (Fig. 47C).



**Figura 47:** profilo di espressione genica in ovociti freschi ed in ovociti scongelati dopo vitrificazione.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dimostrano come alcuni degli mRNA analizzati possano essere considerati buoni marcatori di qualità ovocitaria.

In particolare, l'analisi dei fattori generali di trascrizione ci ha permesso di individuare dei geni, quali il TAF4B, importanti candidati nel corretto sviluppo e differenziamento del gamete femminile umano in condizioni fisiologiche. La valutazione del profilo di espressione dei geni del macchinario apoptotico ci ha permesso di individuare dei geni candidati per la riduzione di competenza dell'ovocita durante l'invecchiamento riproduttivo ed infine grazie all'analisi di specifici trascritti è stato possibile valutare la qualità ovocitaria in risposta a specifici protocolli di congelamento (Vitrificazione).

### **4.1 ANALISI DI ESPRESSIONE DEL TFIID IN SINGOLI OVOCITI UMANI: NUOVI POTENZIALI MARCATORI MOLECOLARI DI QUALITÀ OVOCITARIA**

TFIID gioca un ruolo fondamentale nell'inizio della trascrizione dei geni codificanti proteine, così non sorprende che tutti gli mRNA che codificano le sue subunità sono presenti anche a livello degli ovociti umani.

Tuttavia, le marcate differenze di espressione tra i geni che codificano le differenti subunità di TFIID sono interessanti e degne di nota: più

precisamente, alcuni di questi geni sono espressi a livelli più alti nelle cellule germinali femminili rispetto alle cellule somatiche.

I dati ottenuti mettono in risalto la peculiare funzione di TFIID all'interno dell'apparato generale di trascrizione e confermano il suo importante ruolo nell'ovogenesi umana e nelle prime fasi dello sviluppo dell'uomo. Infatti, è stato dimostrato che l'mRNA che codifica TAF4B e TAF5, così come quello per TBPL2, risultano essere altamente espressi negli ovociti umani maturi (figura 39A). Il coinvolgimento di queste proteine nell'ovogenesi e nell'embriogenesi in diversi organismi modello è già stata dimostrata, così come il ruolo dei geni della famiglia TBP durante le prime fasi di sviluppo [83, 84].

TAF5 è stato caratterizzato come una subunità TFIID nel 1996 [85, 86], ma è stato poco studiato sugli esseri umani fino ad oggi. Taf-5, il suo gene ortologo in *Caenorhabditis elegans*, sembra avere un ruolo importante nella la maggior parte degli eventi della trascrizione embrionale [87].

TAF4B è stato inizialmente identificato come un paralogo tessuto-specifico di TAF4 nelle cellule B [88]; ora sembra essere un fattore di regolazione importante nella gametogenesi femminile dei mammiferi [89].

E' stato dimostrato che topi *knockout* per taf4b, di sesso femminile, sono sterili, e presentano difetti nella formazione dei follicoli precoci, nella maturazione degli ovociti e nella scissione dello zigote [90], mostrando anche un invecchiamento riproduttivo prematuro [91]. Recenti lavori hanno dimostrato

che la proteina TAF4B è espressa in cellule della granulosa di topo e regola l'espressione di geni tessuto-specifici in risposta a diversi segnali ovarici attraverso l'induzione di c-jun [92] e della ciclina D3 [93].

L'elevata quantità di TAF4B negli ovociti umani lascia supporre che anche nell'uomo la proteina giochi un importante ruolo durante la gametogenesi e quindi una sua deficienza possa essere correlata con una cattiva qualità ovocitaria.

TBPL2 sembra essere coinvolto nella gametogenesi femminile e nell'embriogenesi [94]. Diversi studi hanno dimostrato il suo ruolo centrale nelle specie *zebrafish* e *Xenopus* [95, 96]; la proteina sembra essere altamente espressa nelle ovaie di topo [97]. Questo studio dimostra per la prima volta che gli mRNA di TAF4B, TAF5, TBPL2 sono altamente espressi in ovociti umani, sottolineando la loro importanza per la riproduzione umana. Si crede che sia TAF4B e TAF5 potrebbero rappresentare buoni biomarcatori di qualità ovocitaria.

Anche se il loro ruolo molecolare nell'ovogenesi e nelle prime fasi dello sviluppo embrionale deve essere ulteriormente chiarito, è possibile che cambiamenti nella loro regolazione potrebbero essere correlati a cambiamenti nella morfologia degli ovociti associato con l'infertilità. Questi studi rappresentano un punto di partenza per ulteriori indagini sul ruolo fisiologico dei GTF e il loro possibile coinvolgimento nei disordini riproduttivi. Per quanto riguarda gli altri geni analizzati, è emerso che le due varianti

trascrizionali di TAF5L erano ben rappresentati negli ovociti umani; al contrario, l'mRNA di TAF6L era presente a un livello molto basso (**Fig. 39C e Tabella 12**). È interessante notare che, TAF5L, anche chiamato PCAF-associated factor 65 beta (beta PAF65), e TAF6L o PAF65 alfa, sono stati identificati come subunità del complesso istone acetylase PCAF [98]. Le differenze di espressione tra di loro potrebbero indicare un ruolo aggiuntivo per TAF5L nella gametogenesi umana. È interessante notare che, il suo ortologo in *Drosophila* (Cannonball) codifica per una proteina specifica della linea germinale [99].

Si è constatato che TAF1L è espresso negli ovociti così come in ogni tessuto di controllo analizzato (**Fig. 39D**): di conseguenza, non sembra essere testicolo-specifico. TAF9 e il suo paralogo TAF9B sono entrambi espressi negli ovociti umani a livelli simili agli altri tessuti. I dati in accordo con altri studi [100] mostrano che entrambi i geni codificano subunità di TFIID e sono essenziali per la vitalità cellulare, ma possono giocare diversi ruoli nella regolazione dell'espressione genica.

L'analisi effettuata su Entrez Gene ha rivelato che la proteina codificata da TAF9 isoforma b non è una subunità TFIID. In realtà, è stato caratterizzato come proteina della ghiandola surrenale AD-004. La traduzione di questa proteina è iniziata da un ATG alternativo e utilizza una cornice di lettura diversa (**Tabella 3**). Non è comune per un gene codificare due proteine completamente differenti.

Infine, l'allineamento dei dati mostra che, nonostante le somiglianze strutturali tra TAF5 e TAF5L e tra TAF6 e TAF6L, non potevano avere una comune origine evolutiva. L'allineamento della sequenza peptidica eseguita mediante ClustalW mostra il 28% di identità e 43% di somiglianza per TAF5-TAF5L e il 20% di identità e il 35% di somiglianza per TAF6-TAF6L (Similarity Matrix: BLOSUM62). Oltre ad identificare i geni che sono importanti per la riproduzione umana, la caratterizzazione delle diverse subunità di TFIID in ovociti umani ci ha permesso di ottenere nuovi dati sul principale complesso coinvolto nell'inizio della trascrizione. La sua complessità, in contrasto al semplice ruolo meccanico che queste proteine sembrano effettuare, suggerisce una partecipazione ancora da scoprire in complesse funzioni biologiche, come il controllo della proliferazione cellulare [66].

Studi del trascrittoma dell'ovocita umano sono importanti per una migliore comprensione della ovogenesi, follicologenesi, fecondazione e sviluppo embrionale. Infatti, alcuni lavori hanno riportato l'analisi dell'espressione genica in ovociti umani utilizzando la tecnologia *microarray* [101, 102, 103]. I risultati del presente studio validano alcuni di questi dati di *microarray* e caratterizzano le subunità del complesso, principalmente coinvolte nella trascrizione dei geni di classe II che codificano per proteine. In questo lavoro, si suggerisce che TAF4B, TAF5, TBPL2 e anche TAF5L (anche se espressa in ovociti in modo analogo alle cellule somatiche) potrebbero rappresentare geni candidati per i disordini riproduttivi.

L'analisi su singole cellule ha consentito una ricerca di correlazioni tra un marcatore molecolare e disturbi specifici di ovocita: di conseguenza, dovrebbe essere possibile associare ad un'alterata morfologia dell'ovocita, disturbi di infertilità non ancora ben caratterizzati, o le abitudini quotidiane, così come la dieta, il fumo o l'esposizione ad agenti inquinanti, ai difetti molecolari degli ovociti. Inutile dirlo, sarà estremamente importante sviluppare una tecnologia che potrebbe permettere la selezione dei gameti che esprimono appropriati *biomarkers* e poi utilizzarli nelle tecniche di riproduzione assistita.

#### **4.2 PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI DEL MACCHINARIO APOPTOTICO IN OVOCITI UMANI MATURI ED IN CELLULE DEL CUMULO**

Al fine di investigare il ruolo dell'apoptosi nel determinare la riduzione della competenza ovocitaria in avanzata età riproduttiva, abbiamo determinato il trascrittoma del MA in *pool* di ovociti MII maturi, e rispettive cellule del cumulo, e abbiamo comparato il profilo di espressione dei geni del MA in ovociti *young* e *old* ed in cellule del cumulo *young* e *old*.

Gli ovociti facenti parte del *pool*, così come le cellule del cumulo, provengono da follicoli soprannumerari prelevati da una singola donna. La scelta di utilizzare inizialmente dei *pool* provenienti dalla stessa donna è stata dettata dalla necessità di voler diminuire il più possibile il numero di variabili

individuali. Solo in seguito, sulla base dei dati ottenuti nei *pool*, si è passati all'analisi nelle singole cellule dei geni trovati differenzialmente espressi.

#### **4.2.1 CONFRONTO OVOCITI VS CELLULE DEL CUMULO SIA *OLD* CHE *YOUNG*.**

Utilizzando la normalizzazione relativa con il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , abbiamo paragonato il profilo di espressione dei geni del MA negli *ovociti young* con le rispettive cellule del cumulo e negli *ovociti old* con le rispettive cellule del cumulo (**Fig. 41**). Questa normalizzazione ci ha permesso di identificare nel gamete femminile i geni *up-* o *down-* regolati rispetto a delle cellule somatiche dello stesso individuo.

Da questo confronto è emerso che, indipendentemente dall'età materna, la maggior parte dei geni risulta *down* regolata negli ovociti fatta eccezione per **BCL2L10** e **p73** che invece risultano essere abbondantemente espressi sia negli ovociti *old* che negli *young*, rispetto alle cellule del cumulo (**Fig. 41**).

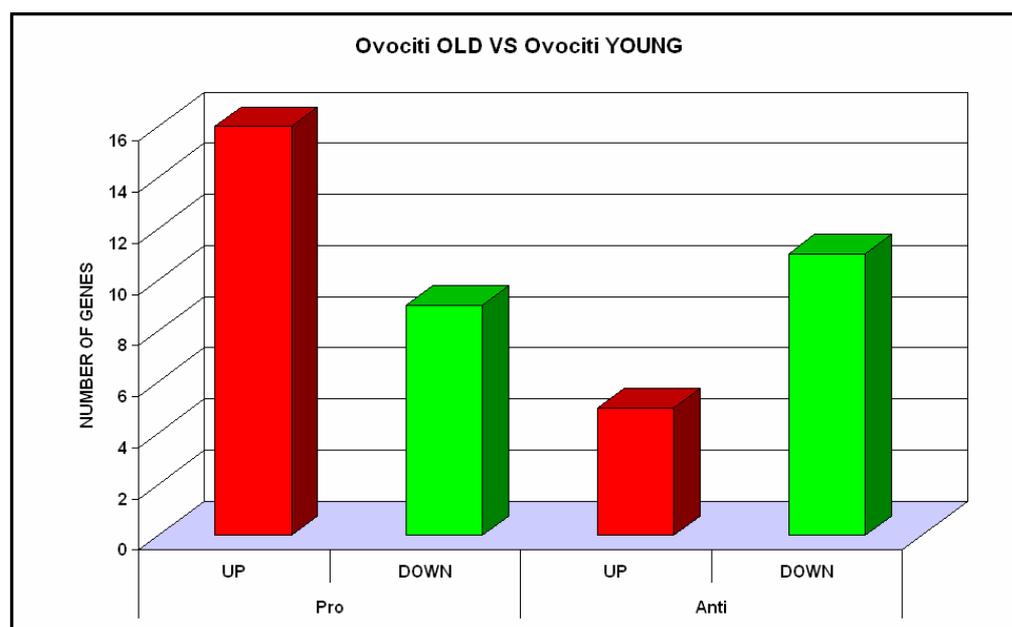
BCL2L10, paralogo di BCL2 nell'uomo, codifica per una proteina antiapoptotica la quale è altamente espressa nell'ovario di topo [104]; è stato inoltre dimostrato che l'espressione di questo gene è elevata in ovociti di topo in metafase II ed è stato ipotizzato che il ruolo di BCL2L10 sia associato alla maturazione degli ovociti, in particolare durante il passaggio dalla prima alla seconda divisione meiotica. [105]. Ulteriori studi per la determinazione del *pattern* di espressione dei geni della famiglia BCL2 in vari tessuti inclusi gli ovociti, hanno mostrato una espressione ovocita specifica di BCL2L10 [106]. I

dati ottenuti nel nostro studio indicano l'importanza di questo gene nella maturazione degli ovociti e nello sviluppo embrionale precoce dell'uomo anche se, come vedremo in seguito, non sembra essere correlato con l'invecchiamento. La famiglia dei geni p53 (p53, p63, p73), conservata lungo la scala evolutiva, ha l'importante funzione, oltre che come regolatore della divisione cellulare, quello di assicurare integrità genomica e la fedeltà del processo di sviluppo della linea germinale [107]. E' stato dimostrato infatti che la perdita di uno di questi geni in topi di sesso femminile provoca una significativa riduzione della fertilità. È stato inoltre ipotizzato che le proteine codificate da questi geni possano svolgere un ruolo importante nel controllo della ploidia cellulare [108, 109]. La sovraespressione di p73 che abbiamo riscontrato negli ovociti non ancora riportata in letteratura, ci induce a ipotizzare un ruolo importante di p73 nell'ovogenesi e/o nelle prime fasi di sviluppo embrionale. Per tale motivo e per il fatto che questo gene presenta delle isoforme trascrizionali con diversa funzione (pro ed antiapoptotica), è stato selezionato tra quelli che sono poi stati analizzati sui singoli ovociti. Questo gene infatti, insieme agli altri membri della famiglia, possiede due promotori: uno più a monte del primo esone che genera isoforme contenenti il dominio TA (proapoptotiche) e uno intronico che genera isoforme troncate nella parte amimo-terminale con funzione antiapoptotica.

#### **4.2.2 CONFRONTO TRA OVOCITI (*OLD E YOUNG*) E CELLULE DEL CUMULO (*OLD E YOUNG*)**

Sempre mediante il metodo del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , abbiamo confrontato *ovociti old* rispetto ad *ovociti young* e cellule del cumulo *old* rispetto a cellule del cumulo *young* (**Fig. 42**). I nostri dati mostrano come il profilo di espressione dei geni del MA è fortemente dipendente dall'età materna. Infatti, come è possibile notare nella **Tabella 13**, abbiamo osservato un'*up*-regolazione di geni antiapoptotici in ovociti provenienti da donne *young* e di geni proapoptotici in ovociti provenienti da donne *old*. Analizzando le funzioni di questi geni abbiamo trovato che negli *ovociti old* sono molti di più i geni proapoptotici *up*-regolati rispetto agli *ovociti young*. Lo stesso risultato si evince dall'analisi dei geni antiapoptotici (**Fig. 48**): il numero di questi geni che risultano essere sottoespressi è maggiore rispetto a quelli che risultano sovraespressi.

In particolare abbiamo riscontrato che molti mRNA *up* regolati codificano per recettori di morte o proteine proapoptotiche intracellulari e risultano essere down regolati alcuni geni codificanti componenti antiapoptotiche.



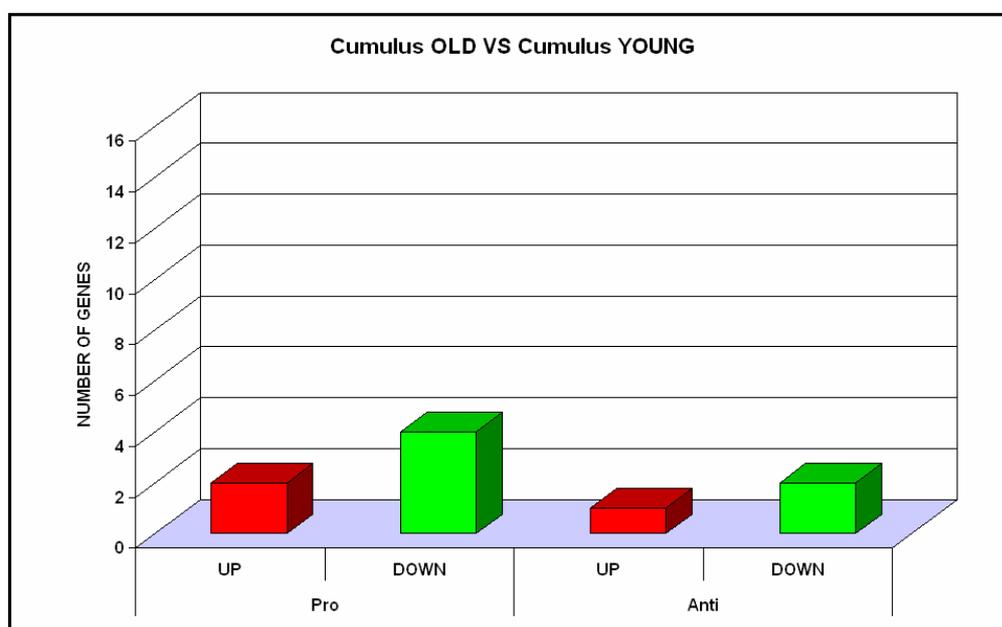
**Figura 48:** numero di geni pro- ed antiapoptotici che sono *up*- e *down*-regolati negli *ovociti old* rispetto agli *ovociti young*.

Inoltre, dati di letteratura dimostrano che la maggior parte dei geni differenzialmente espressi hanno una regolazione trascrizionale in modo da poter ipotizzare che gli ovociti *old* durante la loro maturazione hanno selettivamente collezionato mRNA in grado di attivare la via estrinseca dell'apoptosi e allo stesso tempo sono privi degli mRNA che codificano per fattori di sopravvivenza in grado di controbilanciare l'attivazione dell'apoptosi. Ciò sembrerebbe dimostrare che il gamete prodotto da una giovane donna sia più protetto dalla morte cellulare programmata rispetto alla stessa cellula prodotta da una donna anziana da un punto di vista riproduttivo.

Considerando che le cellule che abbiamo analizzato sono dei gameti terminalmente differenziati e pronti per essere fecondati si potrebbe asserire che gli embrioni prodotti da una donna *over 38* possano più facilmente andare

incontro ad apoptosi, in quanto gli ovociti che derivano da esse conservano dei messaggeri necessari a produrre le proteine che possono scatenare la morte cellulare programmata. Contemporaneamente il gamete prodotto da una giovane donna è protetto dall'apoptosi da geni antiapoptotici. E' noto che aumentando l'età riproduttiva, il rischio di aneuploidie diventa notevolmente superiore [43, 110] e l'apoptosi potrebbe rappresentare un meccanismo di selezione naturale che permette di eliminare gli embrioni non adatti.

Analizzando le cellule del cumulo abbiamo osservato che la variazione coinvolge un numero minore di messaggeri e non si evidenziano correlazioni tra apoptosi ed invecchiamento, inoltre, la maggior parte dei geni proapoptotici sono *down*-regolati a livello delle cellule del cumulo (**Fig. 49**).



**Figura 49:** numero di geni pro- ed antiapoptotici che sono *up*- e *down*-regolati nelle cellule del cumulo *old* rispetto alle cellule del cumulo *young*.

I risultati ottenuti mostrano come i profili di espressione variano in maniera preponderante negli ovociti delle donne in avanzata età riproduttiva, che sembrano avere un assetto molecolare che li predispone all'apoptosi.

Questo approccio ci ha permesso di identificare alcuni geni candidati le cui variazioni di espressione possono determinare le differenze di competenza età dipendenti. Per confermare il coinvolgimento specifico di questi geni, considerando che il trascrittoma dell'ovocita maturo dipende da un numero molto elevato di fattori tra cui l'età materna è uno solo, abbiamo analizzato le differenze di espressione di alcuni di questi geni su singoli ovociti provenienti da diverse donne.

#### **4.2.3 ANALISI SUI SINGOLI OVOCITI**

Alcuni geni come NAIP, BCL2L11, BCL2, TNFRSF10A, TNFRSF21, CFLAR, CD40 e BAD sono stati selezionati perché la loro espressione era fortemente differente in relazione all'età materna mentre BCL2L1, MCL1 e TP73 sono stati selezionati per la presenza di isoforme trascrizionali avente opposta funzione.

Il dato emerso dall'analisi dei suddetti geni conferma che soltanto per alcuni le differenze osservate sono statisticamente significative ( $p < 0.01$ ). Tra i geni *up-regolati* in maniera statisticamente significativa negli ovociti *old* abbiamo trovato 3 membri della superfamiglia di TNF-receptor: CD40, TNFRSF10A, TNFRSF21. Lo specifico ruolo di questi nell'ovocita o nell'embrione precoce

non è stato mai analizzato anche se è noto il coinvolgimento di questi nella crescita, nel differenziamento e nell'attivazione della *pathway* estrinseca dell'apoptosi. Di contro la sottoespressione di geni come BCL2 e CFLAR, in grado di controbilanciare l'attivazione di questa *pathway*, dimostrano ulteriormente che i gameti prodotti da una donna *over 38* accumulano dei messaggeri necessari a produrre le proteine che possono scatenare la morte cellulare programmata e quindi si potrebbe asserire che gli embrioni prodotti da tali gameti possano più facilmente andare incontro ad apoptosi.

Contemporaneamente il gamete prodotto da una giovane donna è protetto dall'apoptosi da geni antiapoptotici.

Dall'analisi sul singolo è emerso che l'isoforma TAp73 (proapoptotica) è espressa esclusivamente negli ovociti *young* a differenza della  $\Delta Np73$  (antiapoptotica) che è presente in entrambi i gruppi. E' noto che l'espressione di TAp73 diminuisce con il naturale invecchiamento; ovociti provenienti da giovani topi *knockout* per questo gene e topi *wild tipe old* presentano la stesse anomalie del fuso [108] suggerendo che questa isoforma è coinvolta nel mantenimento della stabilità genomica nella linea germinale femminile. L'assenza di TAp73 negli ovociti *old* analizzati potrebbe spiegare l'incremento di aneuploidie che si osserva con l'aumentare dell'età materna.

Lo stesso dato è stato confermato quando abbiamo analizzato la TAp73 negli ovociti di topo. Infatti, da questa analisi è emerso che anche nel modello

murino l'isoforma TAp73 è particolarmente abbondante negli ovociti di topine *young*.

#### **4.2.4 INTERATTOMICA**

Tra le proteine con il maggior numero di interazioni, sono stati riscontrati degli *hubs* disregolati quali BCL2 e CFLAR (ovociti *old*) che potrebbero essere considerati dei buoni candidati per un importante coinvolgimento nell'alterazione della *network*. È noto in letteratura che, comunemente, gli *hubs*, se alterati (qualitativamente o quantitativamente), sono in grado di trasmettere alterazioni del trascrittoma ad una buona parte delle proteine con cui stabiliscono relazioni funzionali. Questo accade sia perché l'*hub* controlla direttamente l'espressione di questi geni (in maniera positiva o negativa), sia attraverso sistemi di regolazione *feedback*, positivi o negativi, che dipendono da caratteristiche qualitative e quantitative dell'*hub*.

### **4.3 ANALISI DI TRASCritti OVOCITA-SPECIFICI IN OVOCITI FRESCHI E IN OVOCITI SCONGELATI DOPO VITRIFICAZIONE**

La crioconservazione degli ovociti è una tecnica utile per preservare la fertilità in donne a rischio di perdere la loro funzione ovarica dopo trattamento chirurgico o chemioterapico [111]. Inoltre, questa tecnica permetterebbe di evitare la crioconservazione dell'embrione risolvendo problemi religiosi, etici e

legali connessi alle leggi che regolano la riproduzione medicalmente assistita in diversi paesi. Esistono due principali tecniche di crioconservazione: il congelamento lento e vitrificazione [112, 113].

Molti studi pubblicati hanno confrontato ovociti umani scongelati, sia dopo congelamento lento che dopo vitrificazione, con ovociti freschi e hanno analizzato il loro comportamento biologico (ad esempio, la sopravvivenza, fecondazione, prime fasi dello sviluppo embrionale), così come più specifiche caratteristiche strutturali (ad esempio, l'assemblaggio del fuso meiotico, allineamento dei cromosomi) [114-121].

Tuttavia, non ci sono dati pubblicati sul profilo molecolare di ovociti dopo crioconservazione. Per valutare gli effetti della vitrificazione sulla qualità biologica degli ovociti, abbiamo confrontato il profilo di espressione di 8 mRNA in singoli ovociti scongelati dopo vitrificazione con quelli di ovociti freschi.

Tra i trascritti analizzati 3 sono considerati geni *housekeeping* perché codificano proteine coinvolte nelle funzioni cellulari di base e sono espressi costantemente in tutte le cellule umane, [122] (hypoxanthine phosphoribosyltransferase [HPRT], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH], and peptidylprolyl isomerase A [cyclophilin A, CYCLOPHILIN]); gli altri 5 geni codificano proteine essenziali per lo sviluppo dell'ovocita e per specifiche funzioni (bone morphogenetic protein 15 [BMP15], growth differentiation factor 9 [GDF9], folliculogenesis-specific

basic helix-loop-helix [FIGLA], POU class 5 homeobox 1 [POU5f1-OCT4], and TATA box binding protein [TBP]–associated factor 4B [TAF4B]).

GDF9 e BMP15 (conosciuto anche come GDF9b) sono due fattori strettamente collegati alla crescita dell'ovocita. Sono membri della superfamiglia del transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), espressi negli ovociti durante la maggior parte della follicologenesi. Sia GDF9 che BMP15 sono coinvolti in specifiche funzioni delle cellule della granulosa e del cumulo (ad esempio, proliferazione, espansione del cumulo, apoptosi) [123, 124, 125].

FIGLA, OCT4, e TAF4B sono fattori di trascrizione preferenzialmente espressi nelle cellule germinali. FIGLA (factor in the germline), espresso esclusivamente nelle cellule germinali, è un fattore di trascrizione critico durante le fasi iniziali della follicologenesi. Esso regola la trascrizione dei geni codificanti le proteine della zona pellucida (ZP) attraverso un motivo E-box (CANNTG); in topi knockout per FIGLA, l'espressione di ZP1, ZP2, e ZP3 è assente [126, 127].

Oct4 è espresso ad alti livelli in ovociti maturi. Esso svolge un importante ruolo nello sviluppo embrionale, soprattutto durante i primi stadi dell'embriogenesi, ed è necessario per il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali [128, 129].

TAF4B, un fattore generale di trascrizione espresso ad alti livelli in ovociti maturi, sembra essere un importante fattore di regolazione nella gametogenesi femminile dei mammiferi [3, 89].

I trascritti scelti per la nostra analisi codificano proteine che sono essenziali per gli ovociti maturi, a causa del loro ruolo nella vitalità del gamete, nello sviluppo follicolare e dell'embrione: di conseguenza, essi rappresentano ottimi candidati molecolari di qualità ovocitaria [130].

## CONCLUSIONI

La conoscenza del trascrittoma dell'ovocita umano maturo rappresenta sicuramente un importante traguardo non soltanto nel campo della medicina della riproduzione ma anche in un contesto più ampio come ad esempio la medicina rigenerativa. Infatti, è noto che il citoplasma dell'ovocita è in grado di riprogrammare il genoma di una cellula somatica, e che a livello dell'ovocita sono abbondantemente espressi i geni codificanti fattori di staminalità come OCT4, SOX2, KIF4 e c-MYC [131].

Lo scopo del lavoro presentato nella mia tesi di dottorato è stato appunto di caratterizzare i trascritti codificanti proteine inserite in importanti circuiti biologici, come l'Apparato Generale di Trascrizione ed il Macchinario Apoptotico, nel gamete femminile umano.

La caratterizzazione molecolare di tali trascritti in differenti situazioni fisiologiche e non, ci ha permesso di individuare dei messaggeri da poter utilizzare come marcatori di qualità ovocitaria.

In particolare, l'analisi dei fattori generali di trascrizione ci ha permesso di individuare il TAF4B come importante marcatore. La nostra ipotesi è stata confermata da successivi lavori dove il TAF4B è stato proposto come uno dei candidati nell'invecchiamento riproduttivo femminile nel topo.

La valutazione del profilo di espressione dei geni del Macchinario Apoptotico ci ha permesso di individuare dei geni candidati per la riduzione di competenza

dell'ovocita durante l'invecchiamento riproduttivo. Infatti, abbiamo dimostrato che la via estrinseca dell'apoptosi è più facilmente inducibile in ovociti provenienti da donne anziane ed inoltre in questi ultimi sono poco espressi dei fattori di sopravvivenza in grado di bloccare l'attivazione di tale *pathway*. Particolarmente interessante è l'assenza nelle donne anziane del trascritto di TAp73. Se questo dato verrà confermato a livello proteico, considerando l'importante ruolo svolto dalla TAp73 nel controllo della formazione del fuso, spiegherebbe la riduzione della vitalità dell'embrione e l'aumento di aneuploidie che si riscontra nelle donne in avanzata età riproduttiva.

Infine, questi studi sono stati applicati a settori strettamente attinenti alla medicina della riproduzione e ci hanno permesso di confermare a livello molecolare che il protocollo di vitrificazione non altera la qualità ovocitaria.

## BIBLIOGRAFIA

**1** Steven Hahn. **Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery.** *Nature Structural & Molecular Biology*; 11 (2004).

**2** Michele Purrello, Cinzia Di Pietro, Alessandra Viola, Antonella Rapisarda, Sean Stevens, Mohamed Guermah, Yong Tao, Corrada Bonaiuto, Antonio Arcidiacono, Angelo Messina, Giovanni Sichel, Karl-Heinz Grzeschik and Robert Roeder. **Genomics and transcription analysis of human TFIID.** *Oncogene*; 16: 1633 -1638 (1998).

**3** C Di Pietro, M Vento, M Ragusa, D Barbagallo, MR Guglielmino, T Maniscalchi, LR Duro, L Tomasello, A Majorana, A De Palma, P Borzì, P Scollo, M Purrello. **Expression analysis of TFIID in single human oocytes: new potential molecular markers of oocyte quality.** *Reproductive BioMedicine Online* (2008); Vol 17. No 3. pp 338-349.

**4** Di Pietro C, Ragusa M, Barbagallo D, Duro LR, Guglielmino MR, Majorana A, Angelica R, Scalia M, Statello L, Salito L, Tomasello L, Pernagallo S, Valenti S, D' Agostino V, Triberio P, Tandurella I, Palumbo GA, La Cava P, Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Li Destri G, Lanzafame S, Di Raimondo F, Stefani S, Mishra B, Purrello M. **The apoptotic machinery as a biological complex system: analysis of its omics and evolution, identification of candidate genes for fourteen major types of cancer and experimental validation in CML and neuroblastoma.** *BMC Medical Genomics* 2009;2:20.

**5** Di Pietro C, Vento M, Guglielmino MR, Borzì P, Santonocito M, Ragusa M, Barbagallo D, Duro LR, Majorana A, De Palma A, Garofalo MR, Minutolo E, Scollo P, Purrello M. **Molecular profiling of human oocytes after vitrification strongly suggests that they are biologically comparable with freshly isolated gametes.** *Fertil Steril.* 2010;94(7):2804-7.

- 6 Benoit Coulombe, Ce' lia Jeronimo, Marie-France Langelier, Marilena Cojocar, and Dominique Bergeron. **Interaction Networks of the Molecular Machines That Decode, Replicate, and Maintain the Integrity of the Human Genome.** *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004 3:851–856.
- 7 Dagmar Wilhelm, Stephen Palmer, AND Peter Koopman. **Sex Determination and Gonadal development in Mammals.** *Physiol Rev* 2007; 87: 1–28; doi:10.1152/physrev.00009.2006
- 8 O Djahanbakhch, M Ezzati, A Zosmer. **Reproductive ageing in women.** *J Pathol* 2007; 211:219-231.
- 9 van den Hurk R, Zhao J. **Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.** *Theriogenology* 2005;63(6):1717–1751.
- 10 Baker TG. **A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963 Oct;158:417–433.
- 11 Baker TG. **Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female.** *Am J Obstet Gynecol* 1971;110(5):746–761.
- 12 Baker TG, Sum W. **Development of the ovary and oogenesis.** *Clin Obstet Gynaecol* 1976;3(1):3–26.
- 13 MCGee EA, Hsueh J.W. A. **Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles.** *Endocrine Reviews* 2000;21(2):200–214.
- 14 Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. **Germinal stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary.** *Nature* 2004;428:145–150.
- 15 Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, et al. **Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood.** *Cell* 2005;122:303–315.

- 16 Bukovsky A, Svetikova M, Caudle MR. **Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries.** *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3(1):17.
- 17 Gougeon A. **Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses.** *Endocr Rev* 1996;17:121–155.
- 18 Fauser BC, Van Heusden AM. **Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences.** *Endocr Rev* 1997;18:71–106.
- 19 Byscov A.G., Faddy M.J., Lemmen J.G., Andersen C.Y. **Eggs forever?.** *Differentiation* 2005;73(9-10):438-446.
- 20 J.S. Baum, J.P. Gorge, K. McCall. **Programmed cell death in the germline.** *Review Semin Cell Dev Biol* 2005;16:245-259.
- 21 Eppig J.J., Schultz R.M., O'Brien M., Chesnel F. **Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes.** *Dev. Biol.* 1994;164:1–9.
- 22 Lonergan P, Monaghan P., Rizos D., Boland M.P., Gordon I. **Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro.** *Mol. Reprod. Dev.* 1994;37:48–53.
- 23 Blondin P., Sirard M.A. **Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes.** *Mol. Reprod. Dev.* 1995;41:54–62.
- 24 Hagemann L.J. **Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles.** *Theriogenology* 1999;51:449–459.
- 25 Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. **Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence.** *Developmental Biology* 2006;296:514-521.

- 26 M.C. Carbone, C. Tatone, S. Delle Monache, R. Marci, D. Caserta, R. Colonna and F. Amicarelli. **Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes.** *Mol Hum Reprod* 2003;9(11):639-643.
- 27 DF. Albertini, SL. Barret. **Oocyte-somatic cell communication.** *Reprod Suppl* 2003;61:49-54.
- 28 R.B. Gilchrist, L.J. Ritter, D.T. Armstrong. **Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals.** *Animal Reproduction Science* 2004;82-83:431-446.
- 29 Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E., Paul, D.L. **Female infertility in mice lacking connexin 37.** *Nature* 1997;385:525-529.
- 30 R.Buccione, A.C. Schroeder, J.J. Eppig. **Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis.** *Biol Reprod* 1990;43:543-547.
- 31 Christine X. Yeo, Robert B. Gilchrist and Michelle Lane. **Disruption of Bi-Directional Oocyte-Cumulus Paracrine Signaling During In Vitro Maturation Reduces Subsequent Mouse Oocyte Developmental Competence.** *Biol Reprod.* 2009;80(5):1072-80.
- 32 R.G. Gosden. **Oogenesis as a foundation for embryogenesis.** *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:149-153.
- 33 Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. **Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.** *Nature* 1996;383:531-535.
- 34 Albertini DF. **Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation.** *Mutat Res/Genet Toxicol* 1992;296:57-68.

- 35 Albertini DF, Sanfins A and Combelles CM. **Origins and manifestations of oocyte maturation competencies.** *Reprod Biomed Online* 2003;6:410–15.
- 36 Plancha C, Sanfins A and Rodrigues P et al. **Cell polarity during folliculogenesis and oogenesis.** *Reprod Biomed Online* . 2005;10:478–84.
- 37 Darry L.Russell and Rebecca L.Robker. **Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex.** *Human Reproduction Update* 2007;13(3):289–312
- 38 Patricia A. Hunt and Terry J. Hassold. **Human female meiosis: what makes a good egg go bad?** *Trends in Genetics*. 2008 Jan;24(2).
- 39 Scott F, Gilbert. *Biologia dello sviluppo. Zanichelli. Terza edizione italiana.* Giugno 2005.
- 40 Howard W. Jones, and James P. Toner. **The Infertile Couple.** *N Engl J Med* 1993; 329:1710-1715.
- 41 McLachlan RI, Yazdani A, Kovacs G, Howlett D. **Management of the infertile couple.** *Aust Fam Physician*. 2005 Mar;34(3):111-3, 115-7.
- 42 Hamamah S. **Oocyte and embryo quality: is their morphology a good criterion?** *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005;34(7 Pt 2):5S38–5S41
- 43 Toshio Hamatani, Geppino Falco, Mark G. Carter, Hidenori Akutsu, Carole A. Stagg, Alexei A. Sharov, Dawood B. Dudekula, Vincent VanBuren and Minoru S.H. Ko. **Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes.** *Human Molecular Genetics* 2004;13(19):2263–2278.
- 44 Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicarelli F. **Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells.** *Mol Hum Reprod* 2006;12(11):655-660

- 45 Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T, Crisponi L, Garcia JE, Ko M, Pilia G, Sforza C, Schlessinger D, Forabosco A. **Aging of oocyte, ovary, and human reproduction.** *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1034:117–131.
- 46 Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. **Female reproductive ageing: current knowledge and future trends.** *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:58–65.
- 47 Jonathan L. Tilly. **Apoptosis and ovarian function.** *Reviews of Reproduction* 1996;1:162–172.
- 48 Nai-Kang Kuan BS; Edward Passaro, Jr, MD. **Apoptosis: Programmed Cell Death.** *Arch. Surg.* 1998;133:773-775.
- 49 Raffaella Depalo, Luigi Nappi, Giuseppe Loverro, Stefano Bettocchi, Maria Lucia Caruso, Anna Maria Valentini and Luigi Selvaggi. **Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles.** *Human Reproduction* 2003;18(12):2678-2682.
- 50 Green DR, Evan GI. **A matter of life and death.** *Cancer Cell* 2002;1(1):19-30.
- 51 Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. **Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.** *Ann Hematol* 2005;84(10):627-39.
- 52 Zhaoyu Jin Wafik S. El-Deiry. **Overview of Cell Death Signaling Pathways.** *Cancer Biology & Therapy* 2005;4(2):139-163.
- 53 Delphine Haouzi and Samir Hamamah. **Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF).** *Curr Med Chem.* 2009 ; 16(15): 1905–1916.
- 54 Siegel RM. **Caspases at the crossroads of immune-cell life and death.** *Nat Rev Immunol* 2006;6(4):308-17.

- 55** Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. **Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
- 56** Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. **Cell death: the significance of apoptosis.** *Int Rev Cytol* 68: 251–306 (1980)
- 57** Flemming W. **Über die bildung von richtungsfiguren in saugethiereiern beim untergang graaf'scher follikel.** *Arch Anat Entwgesch* 1885;221–224.
- 58** Giehl K. M. **Trophic dependencies of rodent corticospinal neurons.** *Rev. Neurosci.* 2001;12:79–94.
- 59** Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, Martimbeau S, Donahoe PK, Tilly JL. **Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse.** *Endocrinology* 1999;140:941–949.
- 60** Pepling M. E. & Spradling A. C. **Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles.** *Dev. Biol.* 2001;234:339–351.
- 61** Jonathan L. Tilly. **Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive.** *Molecular Cell Biology* 2001;2:838-848.
- 62** Technau U, Miller MA, Bridge D, Steele RE. **Arrested apoptosis of nurse cells during Hydra oogenesis and embryogenesis.** *Dev. Biol.* 2003;260:191–206.
- 63** Pepling ME, Spradling AC. **Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts.** *Development* 1998;125:3323–8.

**64** Pepling ME, Spradling AC. **Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles.** *Dev. Biol.* 2001;234:339–51.

**65** Darwin C. **The Evolution of the Species.** Appleton, New York, 1860.

**66** Di Pietro C, Ragusa M, Barbagallo D, Duro L R, Guglielmino M R, Majorana A, Giunta V, Rapisarda A, Tricarichi E, Miceli M, Grillo A, Banelli B, Laganà A, Forte S, Bosco C, Giugno R, Pulvirenti A, Ferro A, Grzeschik K H, Di Cataldo A, Tonini G P, Romani M, Purrello M. **Involvement of GTA protein NC2 $\beta$  in Neuroblastoma pathogenesis suggests that it physiologically participates in the regulation of cell proliferation.** *Molecular Cancer*, 2008, 1:7-52.

**67** Gert Jan C. Veenstra and Alan P. Wolffe. **Gene-selective developmental roles of general transcription factors.** *Review Trend in Biochemical Sciences* (2001)

**68** Andreas Hochheimer and Robert Tjian. **Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression.** *Genes & Development*; 17:1309–1320 (2003).

**69** Baumann M, Pontiller J, Ernst W. **Structure and Basal Transcription Complex of RNA Polymerase II Core Promoters in the Mammalian Genome: An Overview.** *Mol Biotechnol.* 2010 Jul;45(3):241-7.

**70** Ferenc Muller and Laszlo` Tora. **The multicoloured world of promoter recognition complexes.** *New EMBO Member's Review*; 23, 2–8 (2004).

**71** C Di Pietro, M Vento, M Ragusa, D Barbagallo, MR Guglielmino, T Maniscalchi, LR Duro, L Tomasello, P Borzì, P Scollo and M Purrello. **TAF4B is a molecular marker of oocyte quality.** In: *14th World Congress on In Vitro Fertilization & 3rd World Congress on In Vitro Maturation.* 81-85. Ed Lin Tan, Gomel, Gosden, Tulandi, Medimond S.r.l. - Monduzzi Editore International Proceedings Division, Bologna, Italy (2007).

**72** El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y. **Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stage of maturation.** *Mol Hum Reprod* 1999;8:720-725.

**73** C Di Pietro, M Ragusa, L R Duro, M R Guglielmino, D Barbagallo, A Carnemolla, A Laganà, P Buffa, R Angelica, A Rinaldi, M S Calafato, I Milicia, C Caserta, R Giugno, A Pulvirenti, V Giunta, A Rapisarda, V Di Pietro, A Grillo, A Messina, A Ferro, K H Grzeschik, M Purrello. **Genomics, Evolution and Expression of TBPL2, a Member of the TBP Family.** *DNA Cell Biol* 2007 Jun; 26(6): 369-385.

**74** Di Pietro C, Piro S, Tabbì G et al.. **Cellular and molecular effects of protons: apoptosis induction and potential implications for cancer therapy.** *Apoptosis* 2006;11, 57–66.

**75** S. Rozen, E. Skaletsky. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, 2000; pp 365-386.

**76** Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** *Methods* 2001;25:402–824, 25.

**77** Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. **Computing topological parameters of biological networks.** *Bioinformatics* 2008, 24(2):282-284.

**78** Pointud JC, Mengus G, Brancorsini S et al. 2003 **The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation.** *Journal of Cell Science* 116, 1847–1858.

- 79** Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, Sassone-Corsi P 2004 **Testis-specific transcription mechanisms promoting male cell germ differentiation.** *Reproduction* 128, 5–12.
- 80** Bell B, Scheer E, Tora L 2001 **Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function.** *Molecular Cell* 8, 591–600.
- 81** Wang PJ, Page DC **Functional substitution for TAF(II)250 by a retroposed homolog that is expressed in human spermatogenesis.** *Human Molecular Genetics* 2002; 11, 2341–2346.
- 82** Pangas SA, Rajkovic A. **Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters.** *Hum Reprod Update* 2006;12:65–76.
- 83** Veenstra GJ, Weeks DL, Wolffe AP **Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in Xenopus.** *Science* 2000; 290, 2312–2315.
- 84** Davidson I **The genetics of TBP and TBP-related factors.** *Trends in Biochemical Sciences* 2003;28, 391–398.
- 85** Dubrovskaya V, Mattei MG, Tora L **Localization of the gene (TAF2D) encoding the 100-kDa subunit(hTAFII100) of the human TFIID complex to chromosome 10 band q24-q25.2.** *Genomics* 1996;36, 556–557.
- 86** Tanese N, Saluja D, Vassallo MF *et al.* **Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996;93, 13611–13616.
- 87** Walker AK, Blackwell TK. **A broad but restricted requirement for TAF-5 (human TAFII100) for embryonic transcription in Caenorhabditis elegans.** *Journal of Biological Chemistry* 2003;278, 6181–6186.

- 88** Dikstein R, Zhou S, Tjian R. **Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130.** *Cell* 1996;87, 137–146.
- 89** Freiman RN, Albright SR, Zheng S *et al.* **Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development.** *Science* 2001;293, 2084–2087.
- 90** Falender AE, Shimada M, Lo YK, Richards JS **TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function.** *Developmental Biology* 2005;288, 405–419.
- 91** Lovasco LA, Seymour KA, Zafra K, O'Brien CW, Schorl C, Freiman RN. **Accelerated ovarian aging in the absence of the transcription regulator TAF4B in mice.** *Biol Reprod* 2010;82:23–34.
- 92** Geles KG, Freiman RN, Liu WL *et al.* **Cell-type-selective induction of c-jun by TAF4b directs ovarian-specific transcription networks.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2006;103, 2594–2599.
- 93** Voronina E, Lovasco LA, Gyuris A *et al.* **Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIID subunit TAF4b.** *Developmental Biology* 2007;303, 715–726.
- 94** Jacobi UG, Akkers RC, Pierson ES *et al.* **TBP paralogs accommodate metazoan- and vertebrate-specific developmental gene regulation.** *EMBO Journal* 2007;26, 3900–3909.
- 95** Bartfai RC, Balduf T, Hilton Y *et al.* **TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish.** *Current Biology* 2004;14, 593–598.
- 96** Jallow Z, Jacobi UG, Weeks DL *et al.* **Specialized and redundant roles of TBP and a vertebrate-specific TBP paralog in embryonic gene regulation in Xenopus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2004;101, 13525–13530.

- 97** Xiao L, Kim M, DeJong J. **Developmental and cell type-specific regulation of core promoter transcription factors in germ cells of frogs and mice.** *Gene Expression Patterns* 2006;6, 409–419.
- 98** Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X *et al.* **Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex.** *Cell* 1998;94, 35–44.
- 99** Hiller MA, Lin TY, Wood C, Fuller MT **Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog.** *Genes Development* 2001;15, 1021–1030.
- 100** Frontini M, Soutoglou E, Argentini M *et al.* **TAF9b (formerly TAF9L) is a bona fide TAF that has unique and overlapping roles with TAF9.** *Molecular and Cellular Biology* 2005;25, 4638–4649.
- 101** Bermudez MG, Wells D, Malter H *et al.* **Expression profiles of individual human oocytes using microarray technology.** *Reproductive BioMedicine Online* 2004;8, 325–337.
- 102** Edwards RG **Transcriptome and the analysis of mouse embryo, stem cells and tissue stem cells.** *Reproductive BioMedicine Online* 2004;8, 358–359.
- 103** Kocabas AM, Crosby J, Ross PJ *et al.* **The transcriptome of human oocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2006;103, 14027–14032.
- 104** Qizhong Song, Yongping Kuang, Vishva M.Dixit and Claudius Vincenz. **Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1.** *The EMBO Journal* 1999;18(1):167–178.
- 105** Yoon SJ, Kim EY, Kim YS, Lee HS, Kim KH, Bae J, Lee KA. **Role of Bcl2-like 10 (Bcl2l10) in Regulating Mouse Oocyte Maturation.** *Biol Reprod.* 2009 May 13.

- 106** Yannis Guillemin & Philippe Lalle & Germain Gillet & Jean-François Guerin & Samir Hamamah & Abdel Aouacheria. **Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10.** *J Mol Med* 2009;87:923–940
- 107** Wenwei Hu. **The Role of p53 Gene Family in Reproduction.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;00:a001073.
- 108** Richard Tomasini, Tak W. Mak and Gerry Melino. **The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer.** *Trends in Cell Biology* 2008;18(5):244–252.
- 109** R. Tomasini, K. Tsuchihara, C. Tsuda, SK. Lau, M. Wilhelm, A. Ruffini, MS. Tsao, JL. Iovanna, A. Jurisicova, G. Melino, TW. Mak. **Tap73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(3):797-802.
- 110** NM. Steuerwald, MG. Bermudez, D. Wells, S. Munne, J.Cohen. **Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes.** *Reprod Biomed Online* 2007;14(6):700-8.
- 111** Grifo JA, Noyes N. **Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients.** *Fertil Steril* 2009.
- 112** Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I *et al.* **Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis.** *Fertil Steril* 2008;90:186–193.
- 113** Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL *et al.* **Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification.** *Fertil Steril* 2009;92:1306-1311.

- 114** Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P, Cong L. **Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification.** *Reprod Biomed Online* 2009;19:369-373.
- 115** Wennerholm UB, Soderstrom-Anttila V, Bergh C, Aittomaki K, Hazekamp J, Nygren KG *et al.* **Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data.** *Hum Reprod* 2009;24:2158-2172.
- 116** Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Elsner CW, Mitchell-Leef D *et al.* **Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking.** *Fertil Steril* 2009;92:520-526.
- 117** Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI, Nagy ZP. **Human oocyte vitrification: in-vivo and in-vitro maturation outcomes.** *Reprod Biomed Online* 2008;17:684-688.
- 118** Cobo A, Vajta G, Remohí J. **Vitrification of human mature oocytes in clinical practice.** *Reprod Biomed Online.* 2009;19:4385.
- 119** Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. **Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method.** *Fertil Steril* 2008;89:1657-1664.
- 120** Kuwayama M. **Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method.** *Theriogenology* 2007;67:73-80.
- 121** Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. **Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes.** *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-308.
- 122** Zhu J, He F, Hu S, Yu J. **On the nature of human housekeeping genes.** *Trends Genet* 2008;24:481-484.

- 123** McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. **Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9.** *Mol Endocrinol* 1995;9:131-136.
- 124** Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E et al. **A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis.** *Mech Dev* 1998;78:135-140.
- 125** Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. **Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality.** *Hum Reprod Update* 2008;14:159-177.
- 126** Soyol SM, Amleh A, Dean J. **FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation.** *Development* 2000;127:4645-4654.
- 127** Sun QY, Liu K, Kikuchi K. **Oocyte-specific knockout: a novel in vivo approach for studying gene functions during folliculogenesis, oocyte maturation, fertilization, and embryogenesis.** *Biol Reprod* 2008;79:1014-1020.
- 128** Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M et al. **Oct4 is required for primordial germ cell survival.** *EMBO Rep* 2004;5:1078-1083.
- 129** Zuccotti M, Merico V, Redi CA, Bellazzi R, Adjaye J, Garagna S. **Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte.** *Reprod Biomed Online* 2009;19:57-62.
- 130** Pangas SA, Rajkovic A. **Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters.** *Human Reproduction Update* 2006;12:65–76.
- 131** Holm Zaehres and Hans R. Schöler. **Induction of Pluripotency: From Mouse to Human.** *Cell* 2007;131.

## RINGRAZIAMENTI

Eccomi giunta alla fine di questi anni di studio, che hanno rappresentato per me un motivo di crescita intellettuale e nello stesso tempo mi hanno dato la possibilità di conoscere persone importanti, che in un modo o nell'altro, mi hanno aiutato a portare a termine questo lavoro e alle quali vanno i miei ringraziamenti.

Desidero ringraziare anzitutto il mio *tutor* la Prof.ssa Cinzia Di Pietro per la fiducia mostratami, per aver coordinato e seguito attentamente il mio lavoro e per la particolare dedizione che ha sempre avuto nei miei riguardi. La sua professionalità e la sua dolcezza hanno reso questi anni costruttivi e indimenticabili.

Un ringraziamento altrettanto speciale va al Prof. Michele Purrello, coordinatore del dottorato, per avermi permesso di fare parte del suo gruppo e per avermi coinvolta in diverse attività del laboratorio, per i consigli e al tempo stesso per gli apprezzamenti per quanto realizzato.

Desidero inoltre ringraziare tutto lo *staff* del Servizio di Procreazione Medicalmente Assistita dell'Azienda Ospedaliera Cannizzaro di Catania, la Dott. ssa Marilena Vento, il Dott. Placido Borzì, il coordinatore del gruppo Prof. Scollo, per l'appoggio dimostratomi in tutti questi anni e per avermi fornito tutto il materiale indispensabile alla mia ricerca.

Un ringraziamento va al Dott. Marco Ragusa per aver messo a mia disposizione tutta la sua esperienza e per aver avuto la pazienza di spiegarmi sempre i perché delle cose.

Un sentitissimo ringraziamento va alle “*GRAZIE*” con cui ho condiviso questa meravigliosa esperienza.

Desidero inoltre ringraziare il Dott. Davide Barbagallo, i cari colleghi dottorandi (Rosario, Manuela, Loredana, Luisa, Mariangela, Marco) e tutti i ragazzi del laboratorio. Rivolgo un particolare e sincero ringraziamento alla mia collega di avventure Manuela, per la grande amicizia dimostratami.

Grazie alla mia famiglia, mamma, Serena, Roberto, zia Maria, la mia cara nonnina, i miei suoceri, Francesco e Daniela, affezionatissimi sostenitori, che hanno creduto in me e che mi hanno appoggiato nei momenti di maggiore difficoltà.

La più profonda gratitudine va ad *ENZO*, oggi mio marito, che da sempre ha creduto in me sostenendomi nei momenti peggiori con la sua pazienza ed i suoi sorrisi.

Infine un pensiero speciale va all’ *ANGELO CUSTODE* che veglia su di me, permettendomi di superare i momenti di crisi e di sconforto e consentendomi ancora una volta di raggiungere un traguardo importante come questo.