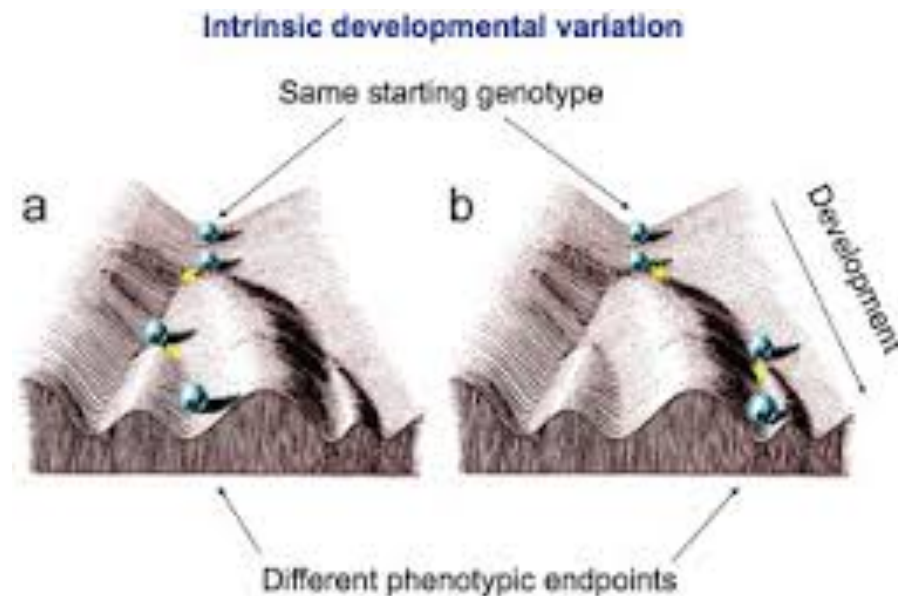
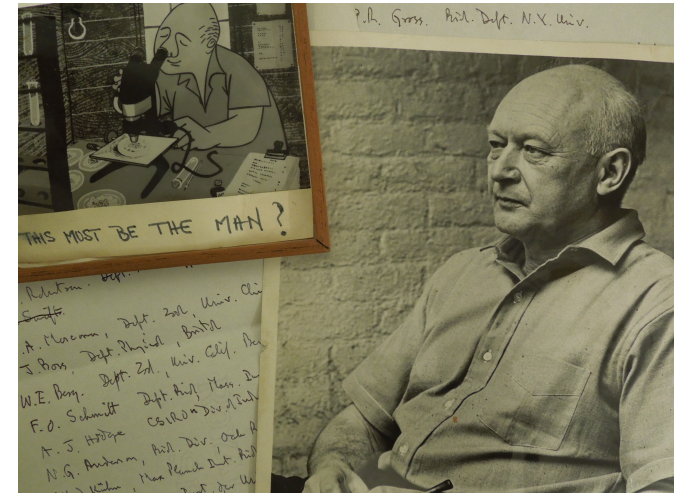


L'epigenetica nello sviluppo embrionale

ORIGINE del termine

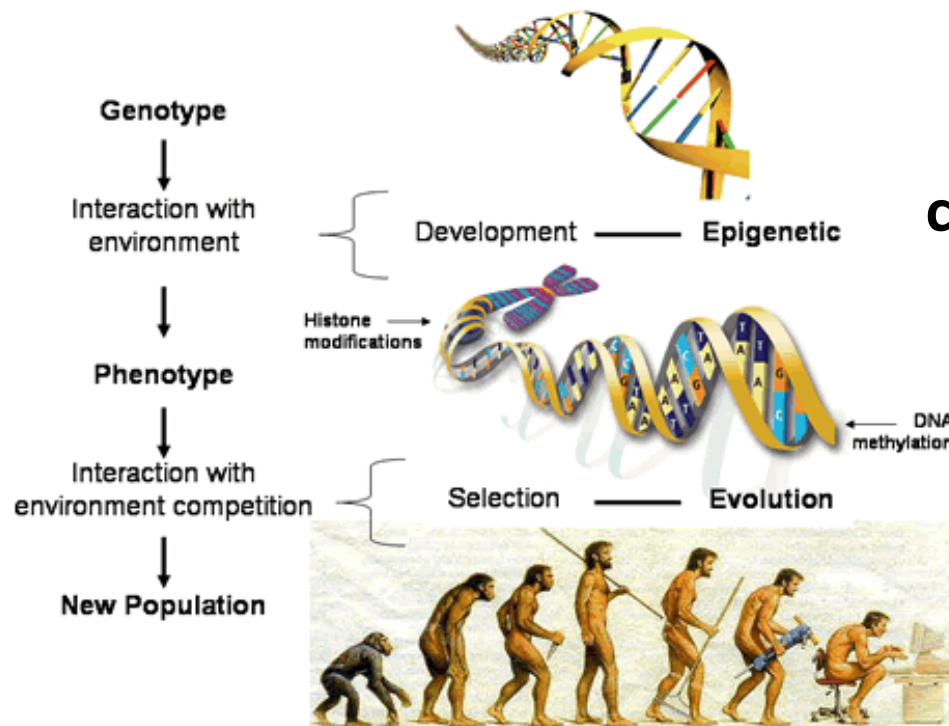
Il termine **Epigenetica** è stato coniato da Waddington per definire lo studio dei *“causal mechanisms by which the genes of the genotype bring about phenotypic effects.”* Waddington (1942)



Il corso dello sviluppo di un organismo è determinato tramite l'interazione di geni con altri geni e con l'ambiente esterno

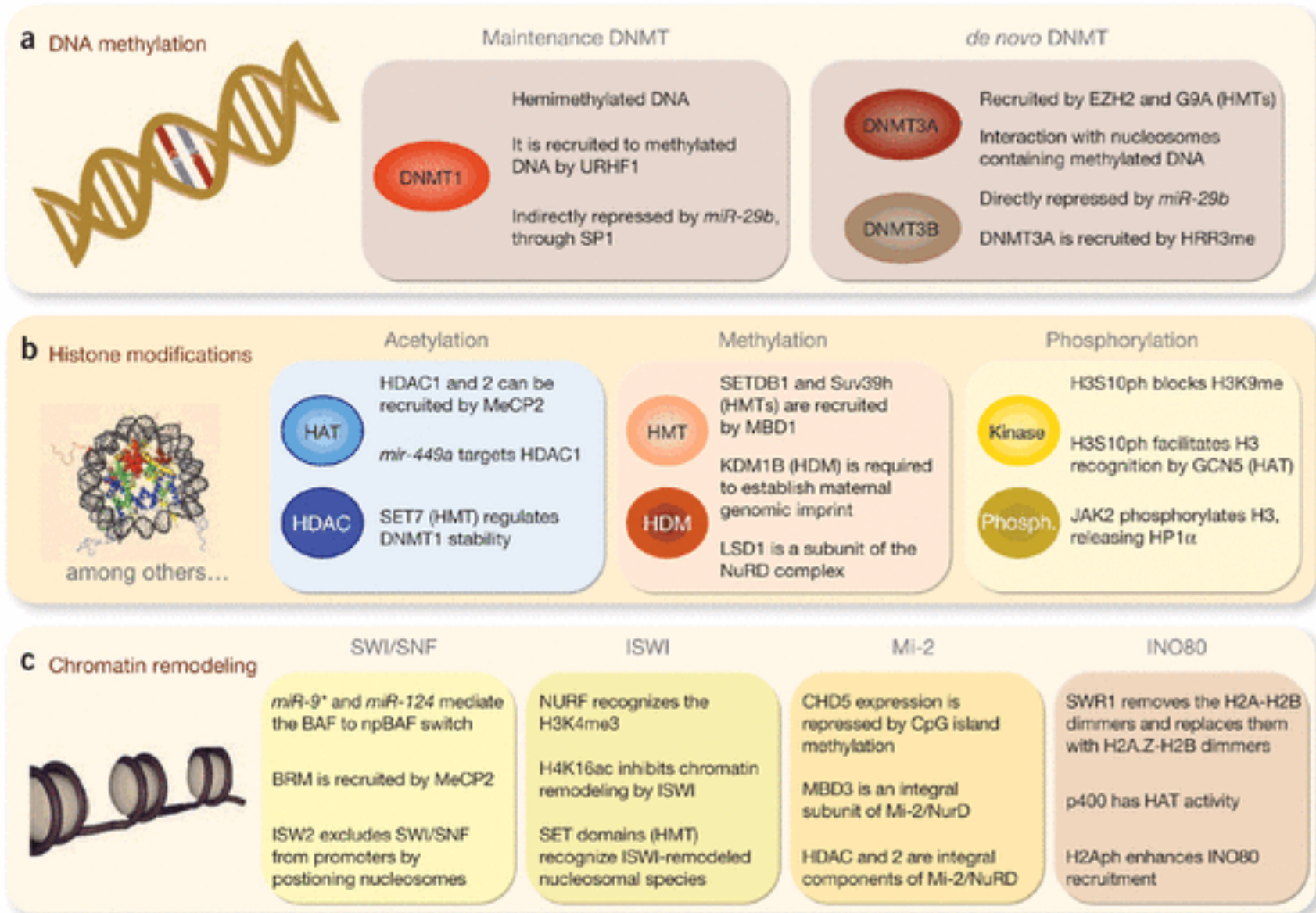
EVOLUZIONE del concetto

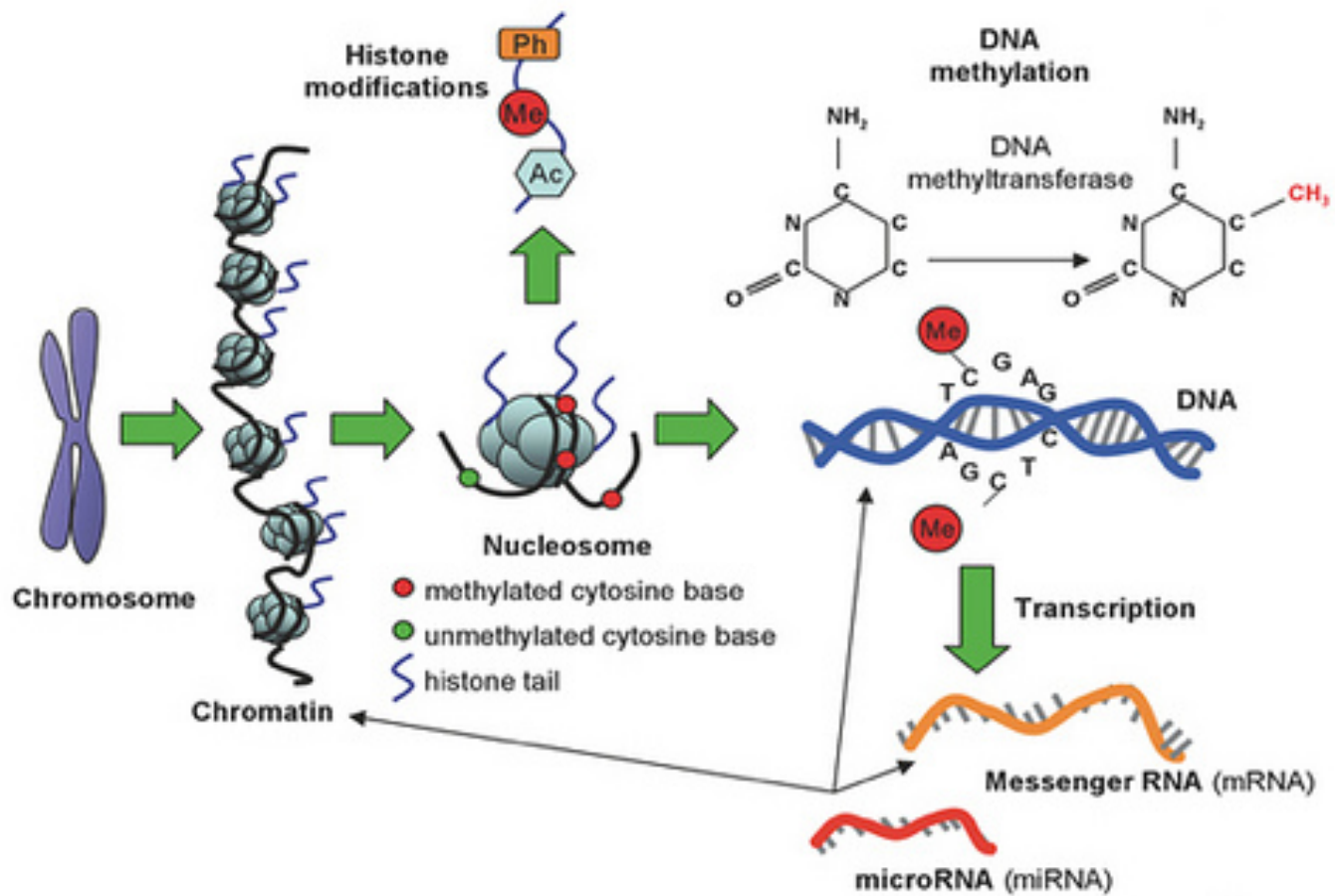
“the study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence” (Riggs et al. 1996)



Modificazioni reversibili ed ereditabili della funzione genica che avvengono senza cambiamenti nella sequenza del DNA

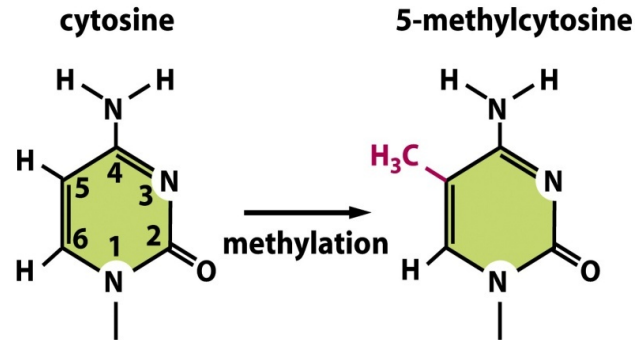
Modificazioni epigenetiche





Queste modificazioni fanno sì che diminuisca il grado di accessibilità del DNA per i fattori di trascrizione alterando l'attività di tale gene.

REGOLAZIONE DEI MARCHI DI METILAZIONE

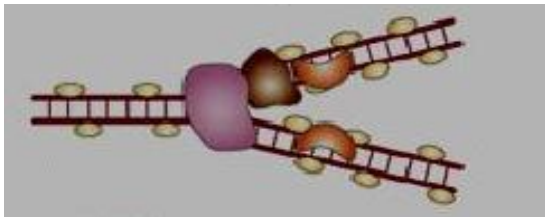


LA METILAZIONE interessa le citosine in posizione 5, delle sequenze dinucleotidiche CG localizzate principalmente in prossimità dei siti di inizio della trascrizione, costituendo regioni dette **isole CpG**

TESSUTO-SPECIFICO

CELLULE SOMATICHE

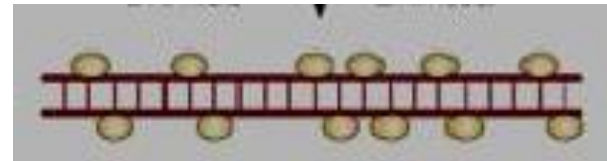
si trasmette stabilmente per mitosi
Metiltrasferasi di mantenimento
(Dnmt1)



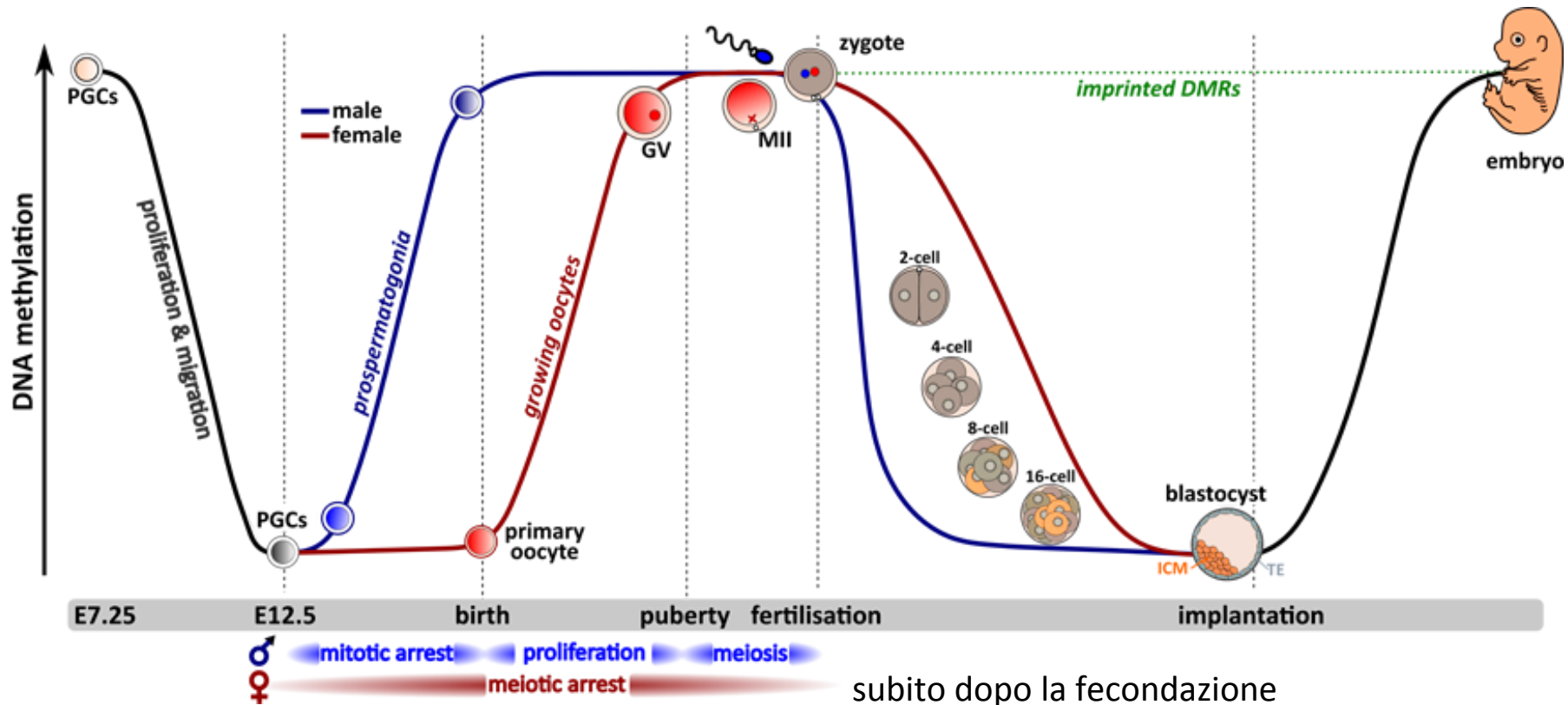
SVILUPPO-SPECIFICO

GAMETI

si instaura ex novo dopo meiosi
Metiltrasferasi de novo
(Dnmt3a Dnmt3b Dnmt3L)

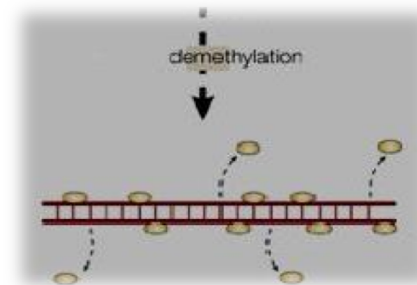


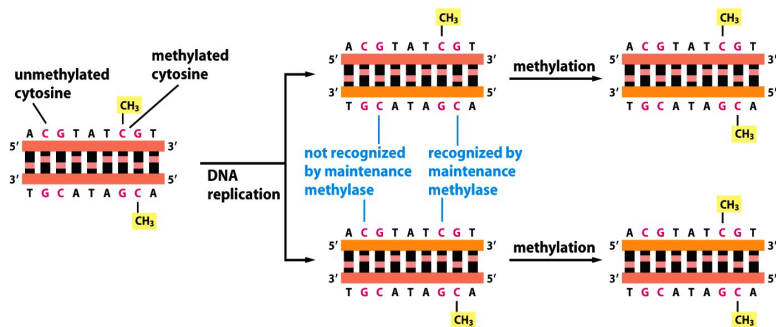
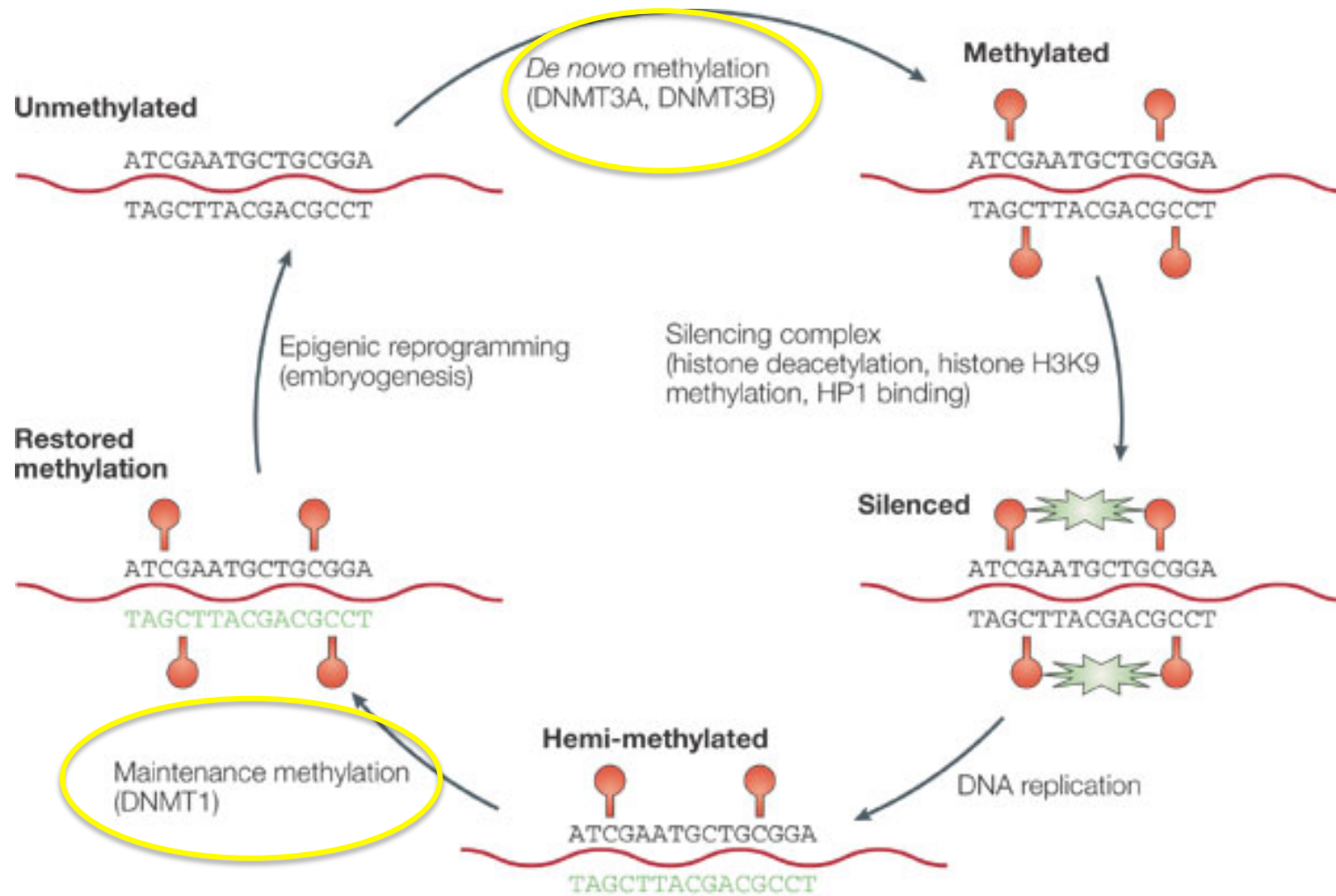
LA DINAMICA della METILAZIONE del DNA



durante la gametogenesi la metilazione viene cancellata e ripristinata successivamente in base al sesso del soggetto
(METILTRASFERASI DE NOVO)

subito dopo la fecondazione l'intero genoma subisce un'onda di demetilazione
(DEMILASI)





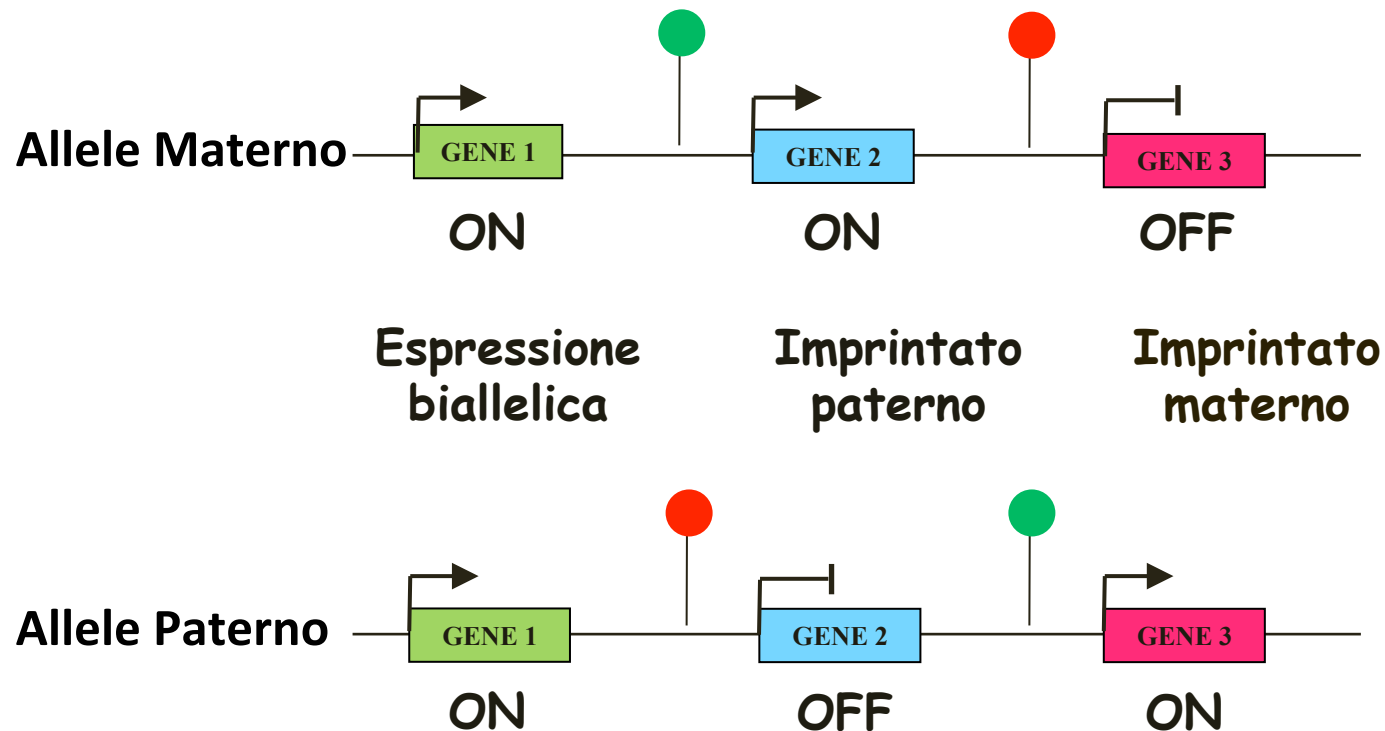
PROCESSI governati dall'Epigenetica

- Espressione genica
- Differenziazione cellulare ed embriogenesi
- Inattivazione cromosoma X
- **Imprinting genomico**
- Soppressione della mobilità degli elementi trasponibili e retrovirali
- Cancro

IMPRINTING GENOMICO

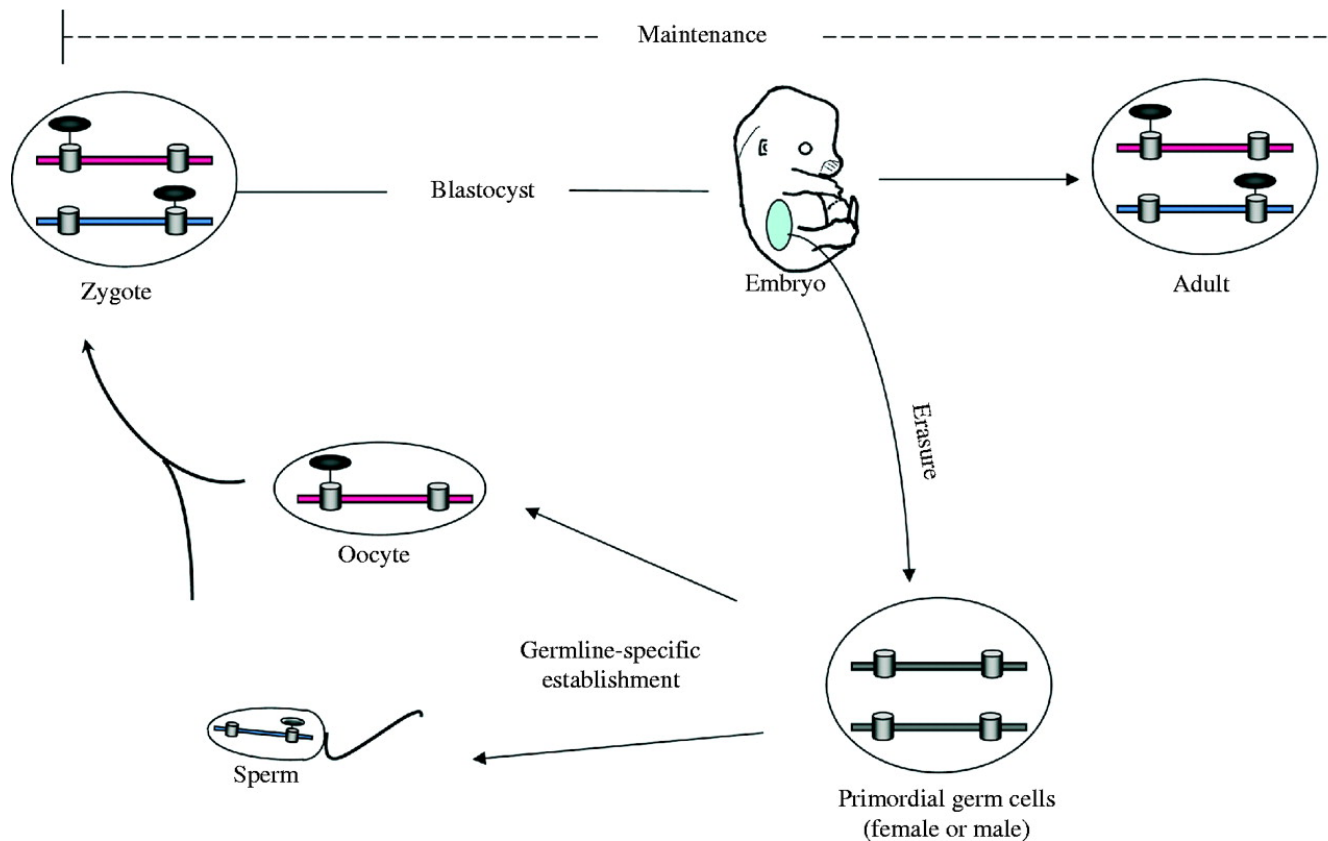
Processo di modificazione epigenetica che porta all'espressione monoallelica di un gruppo di geni a seconda della loro origine parentale.

Un gene **imprantato** viene silenziato su uno dei 2 alleli attraverso la metilazione del DNA principalmente a carico delle cosiddette "imprinting control regions" (ICRs).



L'imprinting in 3 STEP

- 1) I marchi di imprinting si stabiliscono al livello dei gameti, a seconda del sesso dell'individuo
- 2) I marchi vengono mantenuti durante l'embriogenesi e durante tutta la vita dell'individuo
- 3) I marchi di imprinting vengono totalmente cancellati nelle cellule germinali primordiali



Prove dell'esistenza dell'imprinting nell'UOMO

- ◆ **Esistono due patologie umane paragonabili agli zigoti partenogenetici e androgenetici:**

-**teratomi**, 2n cromosomi forniti SOLO dalla madre

-**mole idatiforme**, 2n cromosomi forniti SOLO dal padre

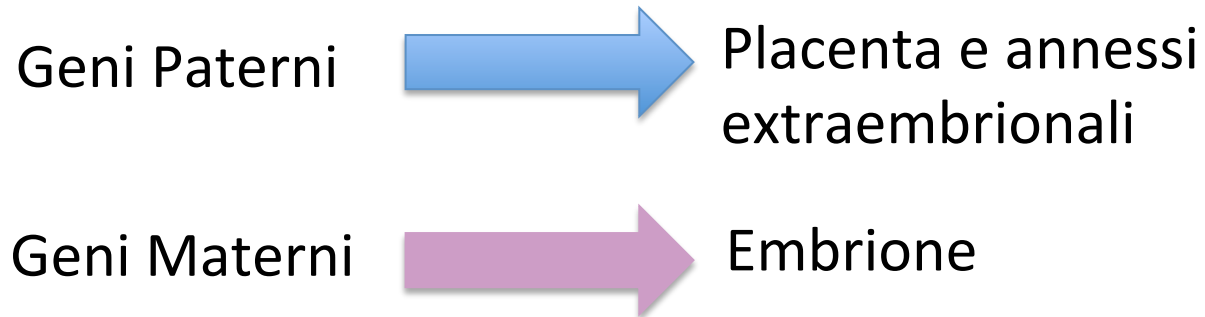
- ◆ **I triploidi (3n)**

sono tutti abortivi ma.....

fenotipo dei **$2n^P1n^M$** (un' iperplasia delle strutture extraembrionarie e assenza dell' embrione) è diverso da quello dei **$2n^M1n^P$** (strutture extraembrionarie quasi assenti e embrione normale)

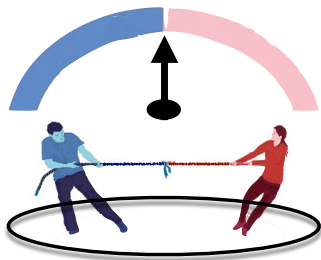
- ◆ Le disomie cromosomiche uniparentali (**UPD**: entrambi i cromosomi di una coppia forniti dallo stesso genitore) hanno effetti fenotipici diversi dettati dal sesso del genitore che ha fornito la coppia di cromosomi

I geni *imprintati* svolgono un ruolo chiave durante lo **sviluppo** embrionale e fetale



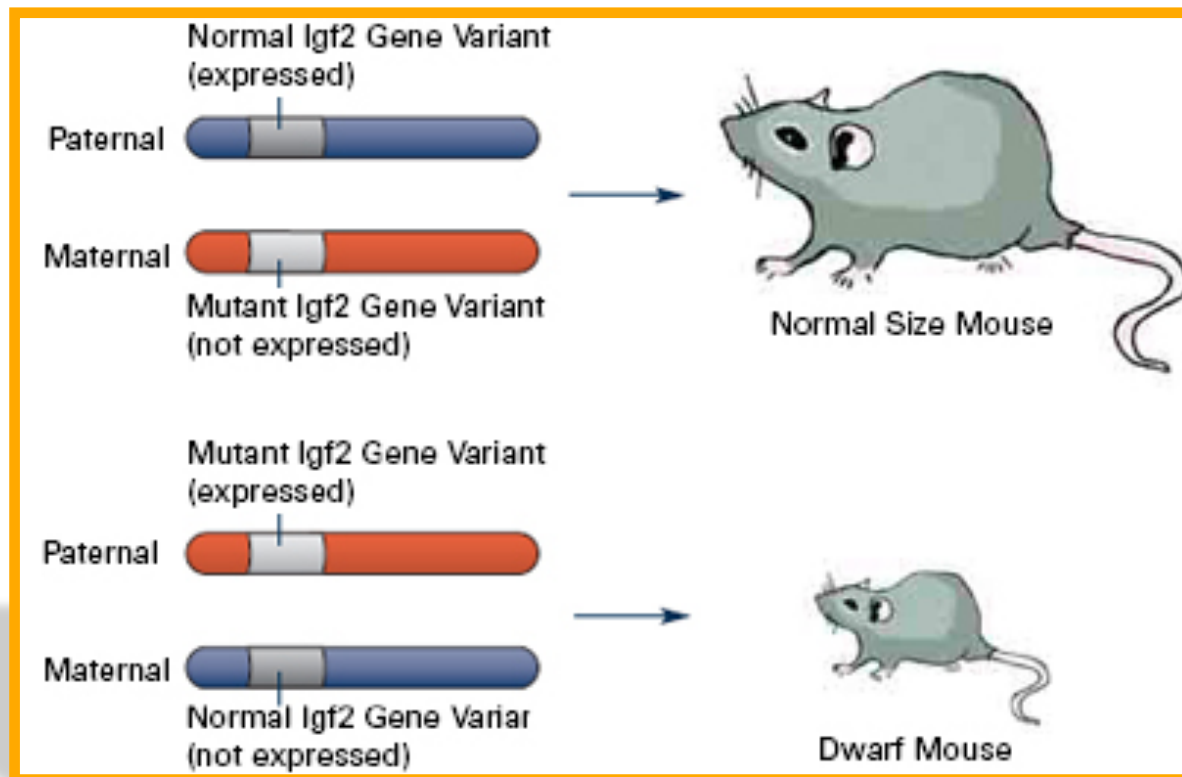
REGOLAZIONE

Imprinting Genomico
"Teoria del conflitto parentale"



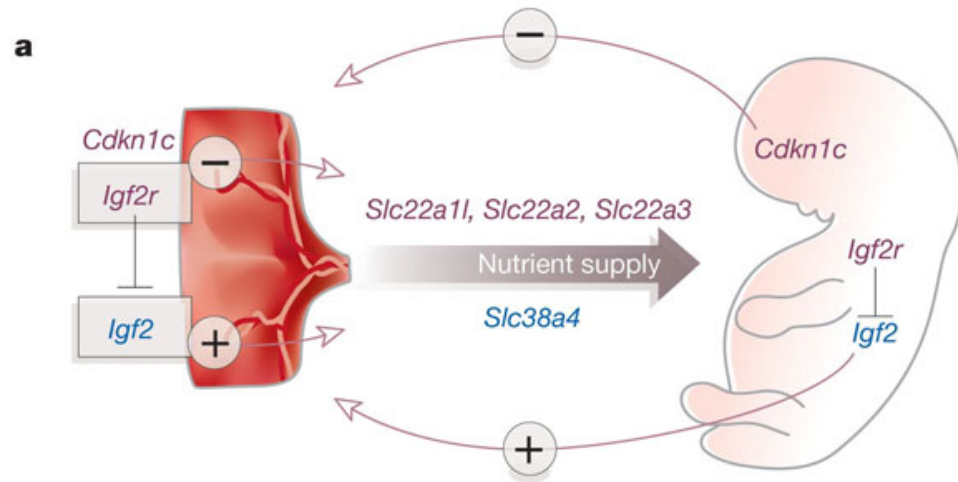
Il contributo di entrambi i genomi è indispensabile per il corretto Sviluppo Embrionale

Il gene **IGF-2** è un gene improntato materno che svolge un ruolo importante durante lo sviluppo fetale.
Soltanto la copia paterna di Igf-2 è trascritta ed ha importanza per il fenotipo.

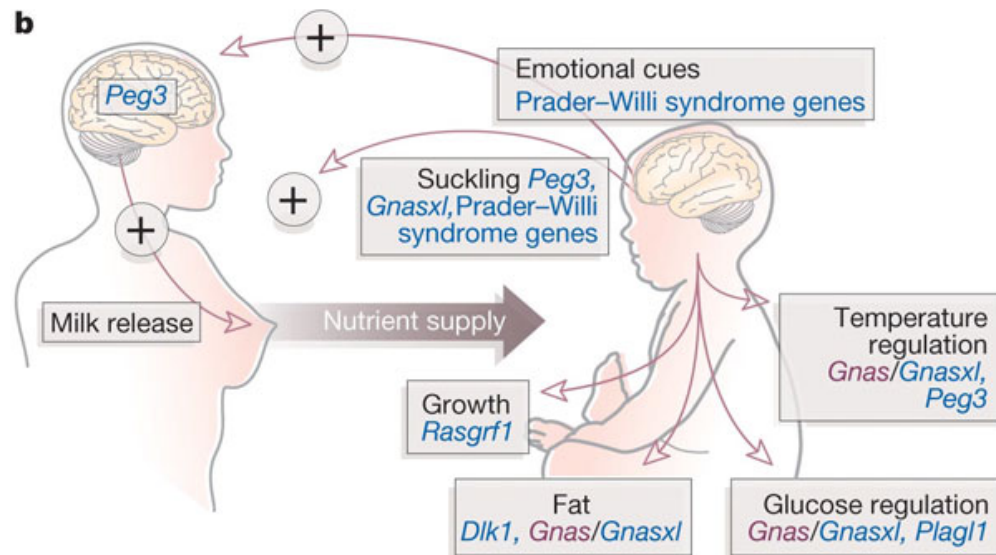


Topi mutanti per la copia paterna hanno alla nascita metà delle dimensioni di un topo normale.
Topi mutanti per la copia materna sono normali

L'imprinting è coinvolto in varie fasi della vita di un individuo.....



Influenza lo **sviluppo** del feto e della placenta regolando lo scambio di nutrienti fra la madre e il feto



Influenza il **comportamento post-natale** Della madre e del neonato (allattamento, cure materne)

c
New evidence: "The imprinted brain theory"



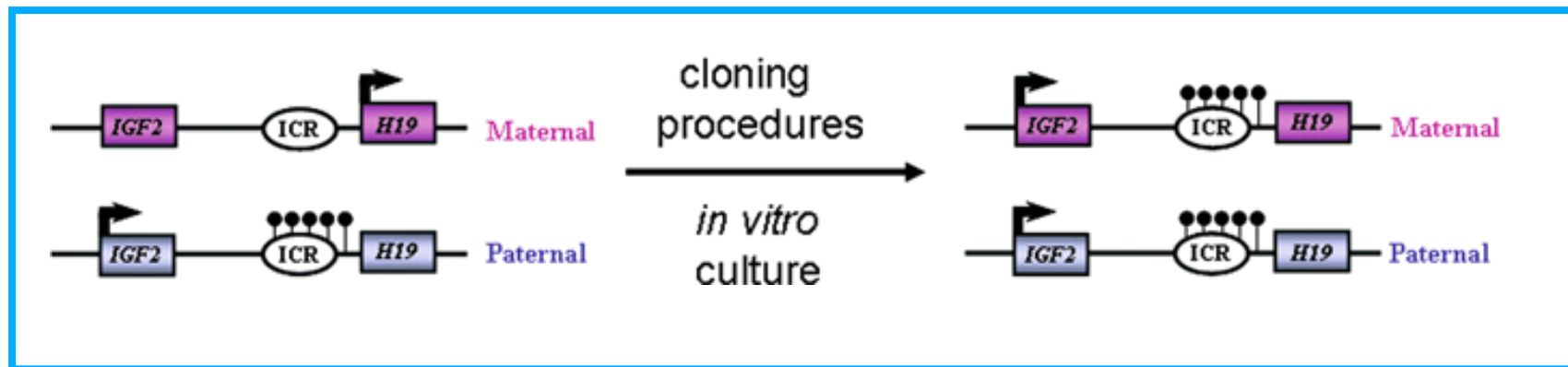
Influenza il **comportamento** di un individuo **adulto**

COLTURA IN VITRO E MANIPOLAZIONE EMBRIONALE



ANOMALIE NELLO SVILIPPO FETALE E PLACENTARE

□ DIFETTI EPIGENETICI

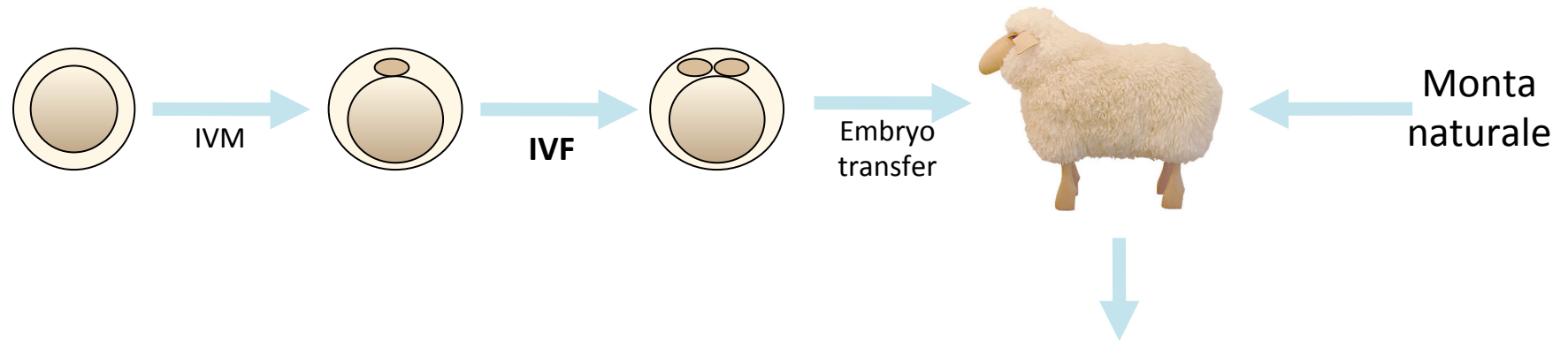


Se lo stato di metilazione delle ICRs non viene stabilmente mantenuto durante lo sviluppo si possono generare disturbi legati alla crescita come la sindrome di Beckwith-Wiedemann syndrome

Perdita dell'imprinting
(LOI, *loss of imprinting*): livello di proteina
raddoppiato rispetto al normale

Perdita dell'espressione:
Proteina assente

DISEGNO SPERIMENTALE

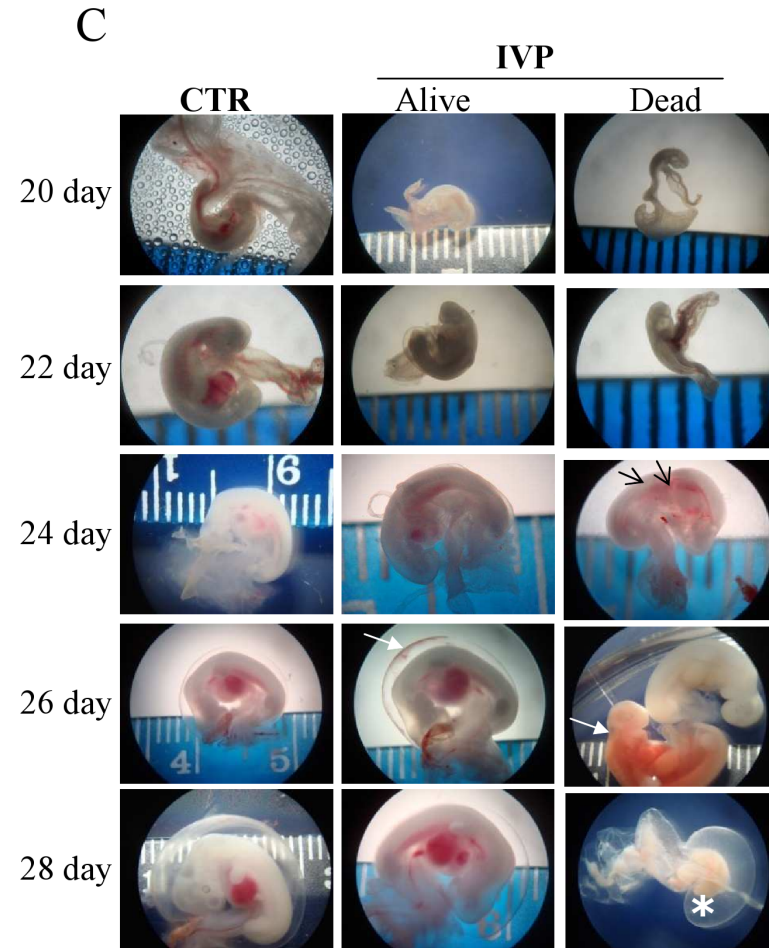
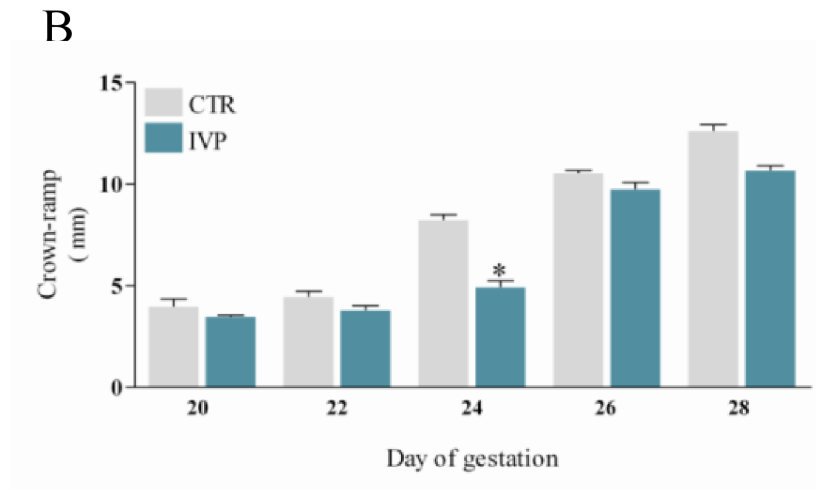
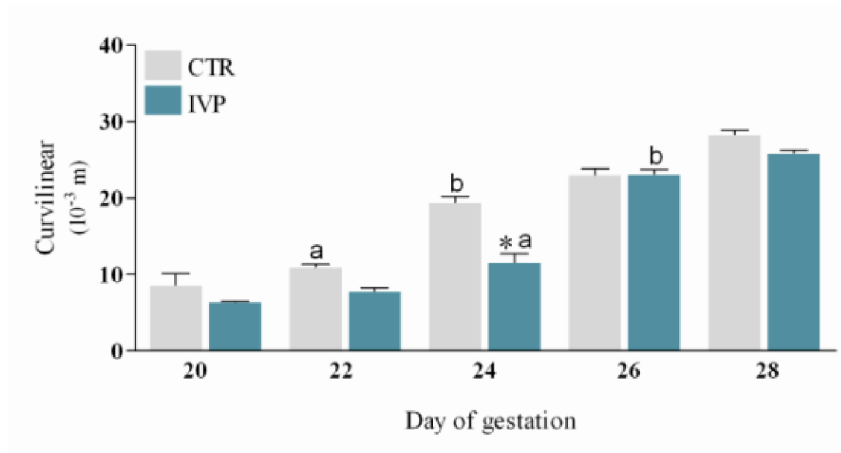


SCOPO DEL LAVORO:

Valutare la presenza di eventuali difetti epigenetici
nello sviluppo di
embrioni di pecora prodotti in vitro

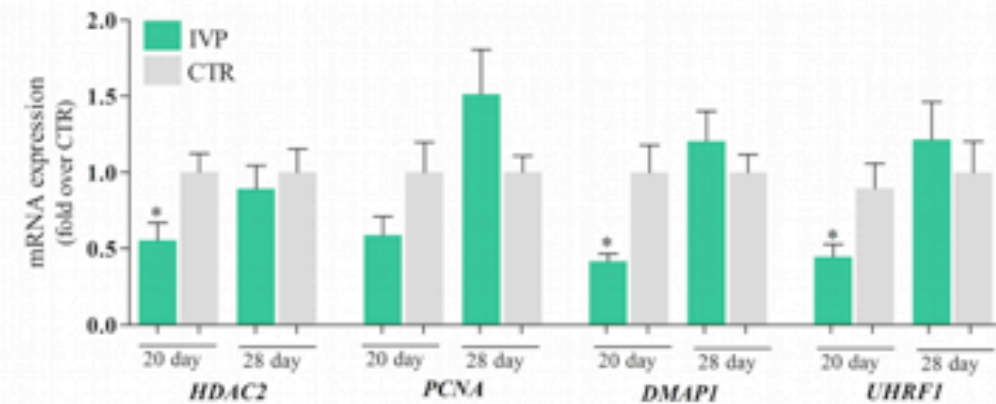
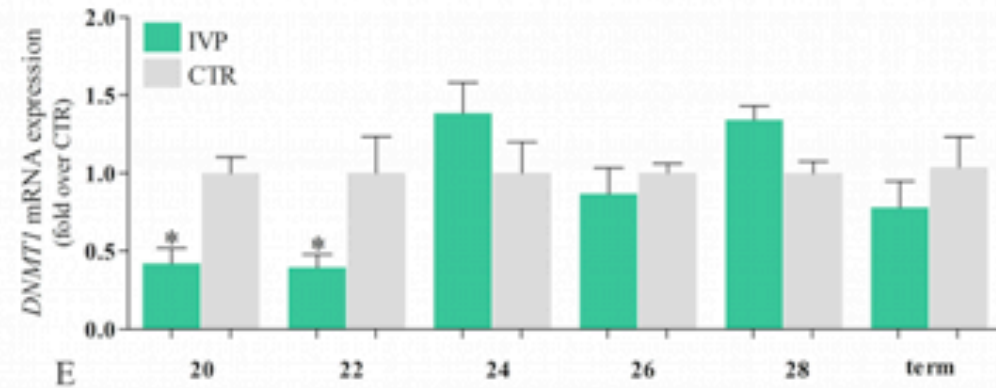
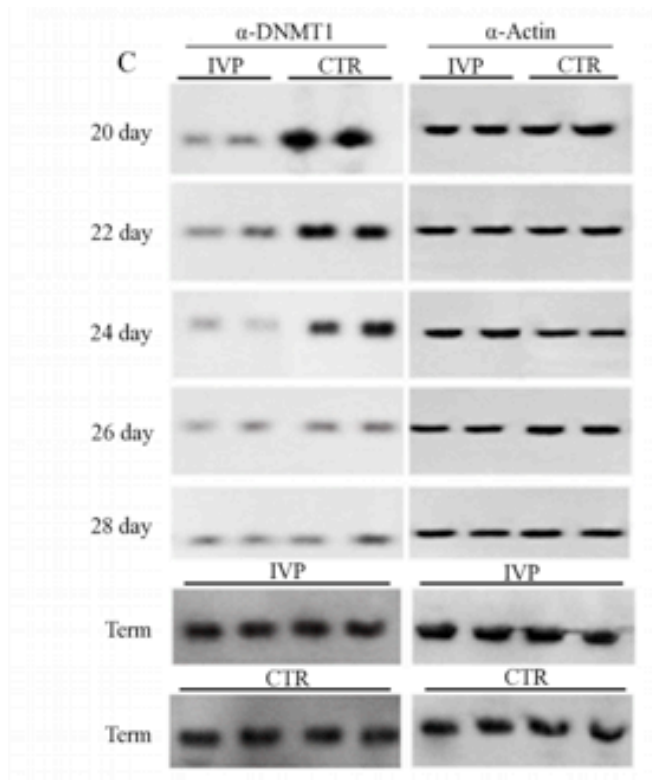
**Raccolta: (20-28 giorni)
Feti e Placente**

Feti IVP: RIDOTTA CRESCITA FETALE



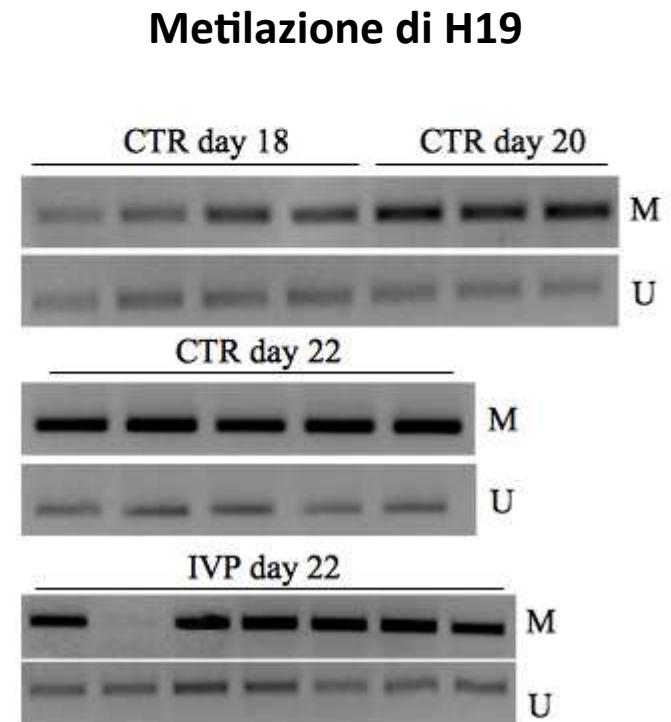
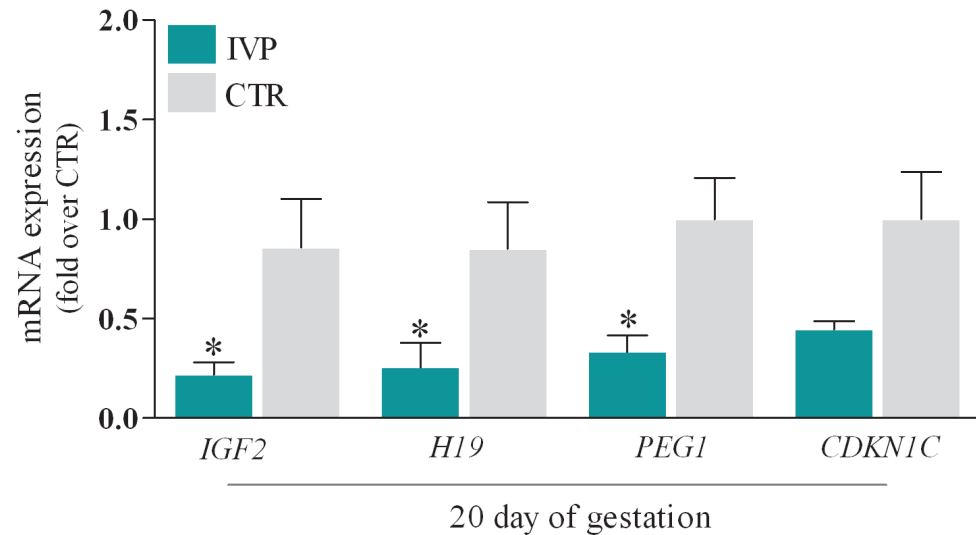
Placente ottenute da feti IVP:

DIFETTI NELLA REGOLAZIONE DEL MECCANISMO DI MANTENIMENTO DELLA METILAZIONE (DNMT1 e suoi cofattori)



Placentate ottenute da feti IVP:

DIFETTI NELLA REGOLAZIONE GENI IMPRINTATI (Difetti di **espressione** e di **metilazione**)



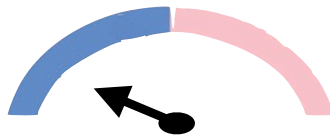
human
reproduction

(Ptak et al; 2013)

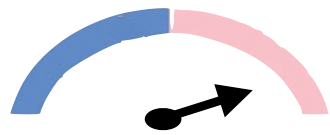
Embrioni Monoparentali

MODELLO DI STUDIO

Embrioni Monoparentali



Androgenoti



Partenogenoti

Sviluppo: periodo peri-impianto

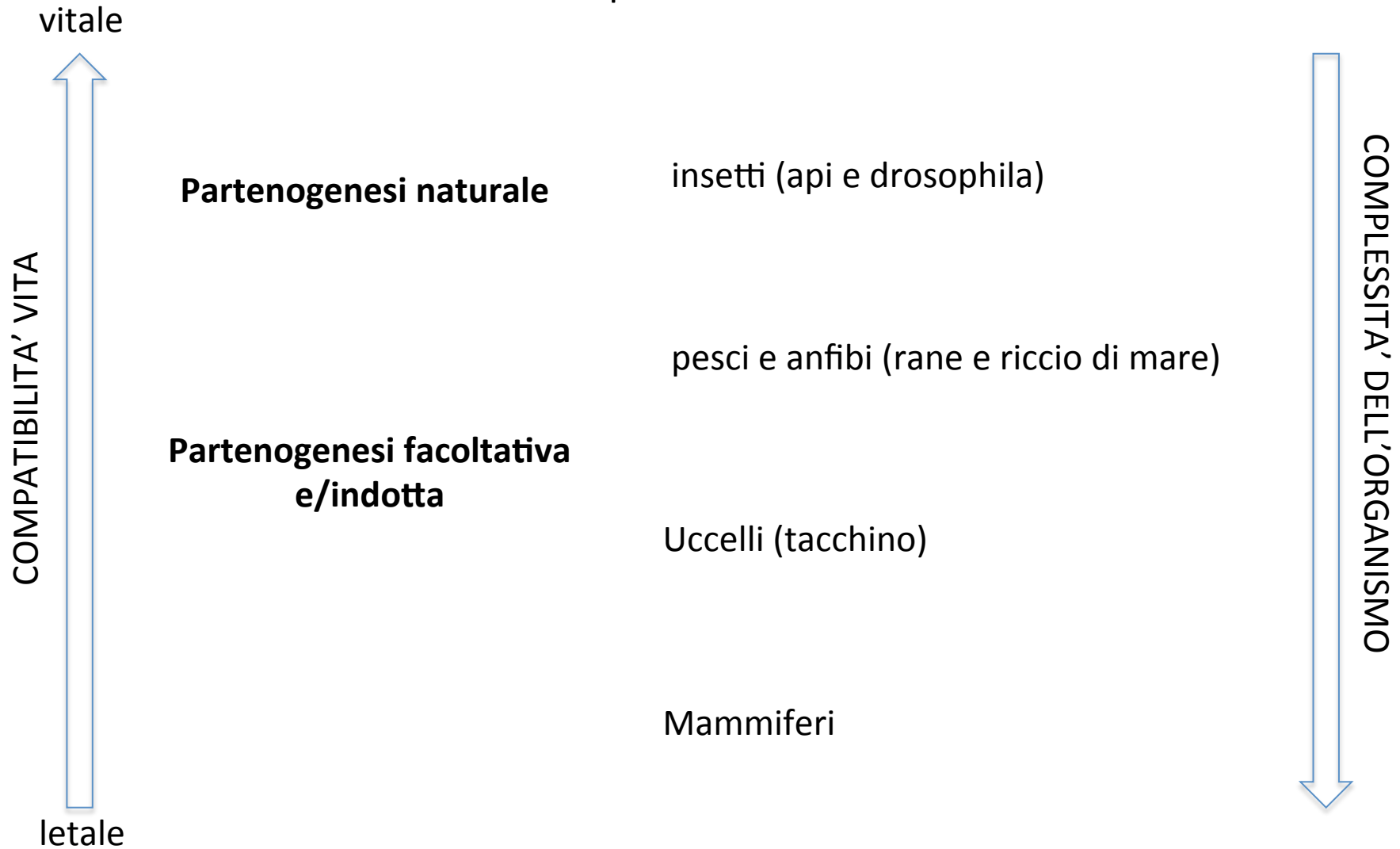
Embrioni (2n) composti interamente da genoma paterno.

- traslocazione pronucleare
- enucleazione oociti/ivf

Embrioni (2n) composti interamente da genoma materno.

- traslocazione pronucleare (GINOGINOTE)
- attivazione chimica (PARTENOGENOTE, spz-free)

Parthenogenesis: the production of an embryo from a female gamete without any contribution from a male gamete, with or without the eventual development into an adult.....



L'attivazione **partenogenetica** si può avere in seguito a:

- Stress meccanico
- Agenti chimici come Etanolo, Stronzio e Ca^{2+} ionofori)
 - Depolarizzazione elettrica della membrana



Aumento della **concentrazione intracellulare del Ca^{2+}** in modo analogo allo spermatozoo

PESCI

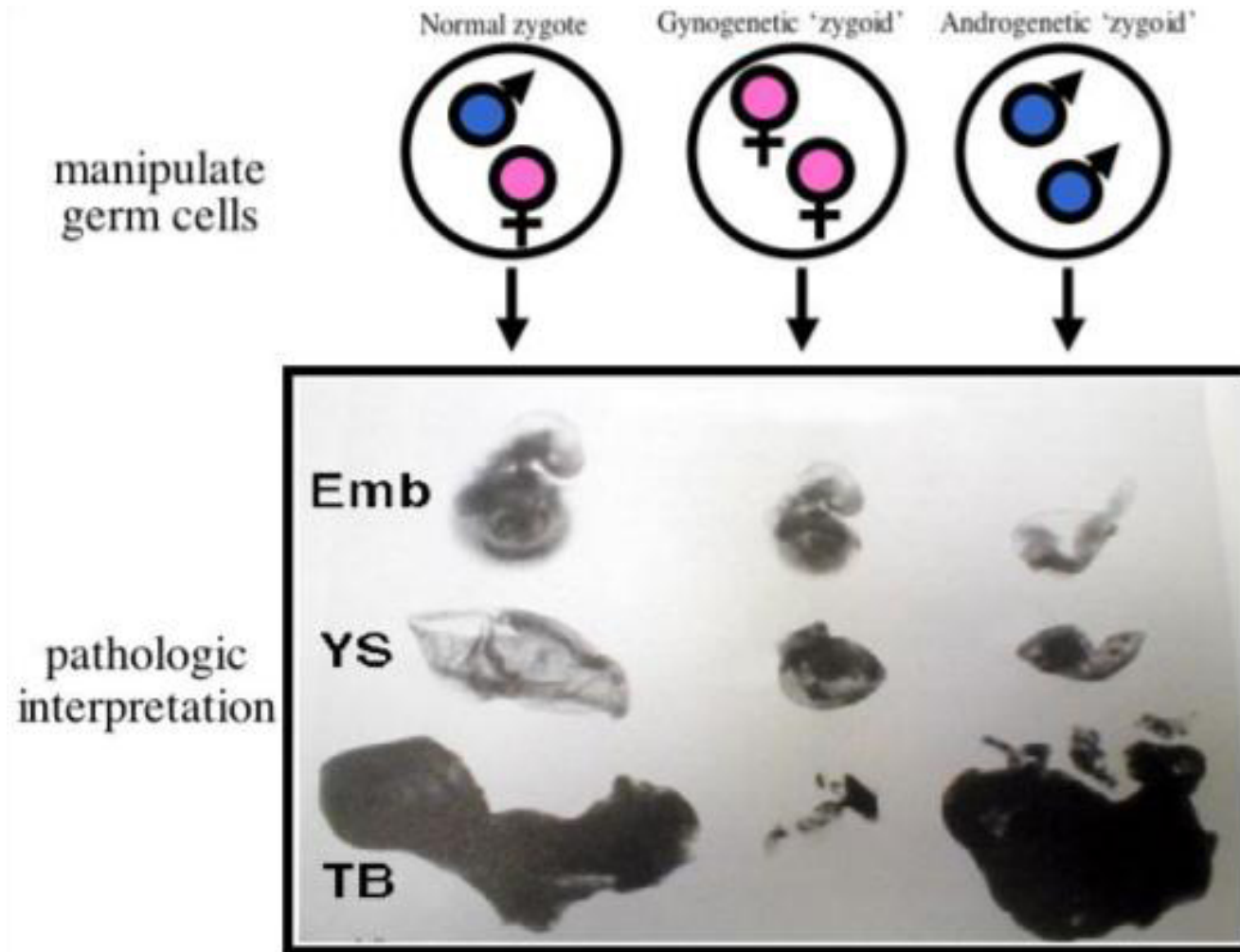
Il ripristino della diploidia negli zigoti $1n$ può avvenire spontaneamente o essere indotta da trattamenti chimici, termici o per compressione

ANFIBI

l'attivazione della partenogenesi si ha semplicemente con una azione meccanica sull'oocita



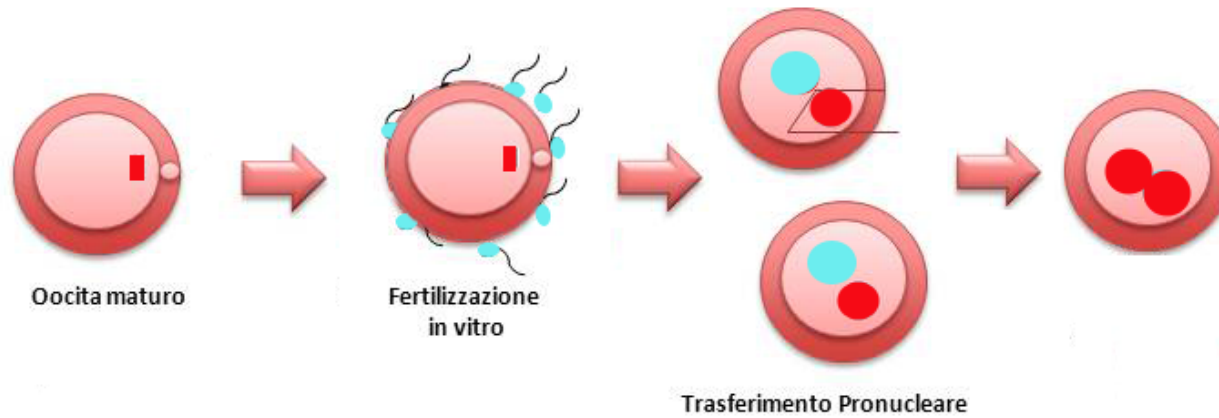
Il genoma materno e paterno NON sono equivalenti



Surani, McGrath and Solter, 1984-1987

PROTOCOLLO PRODUZIONE PARTENOGENETICI

TRASFERIMENTO PRONUCLEARE:

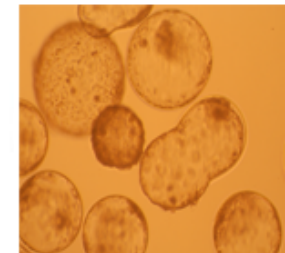


ATTIVAZIONE :

5 μ M ionomycin

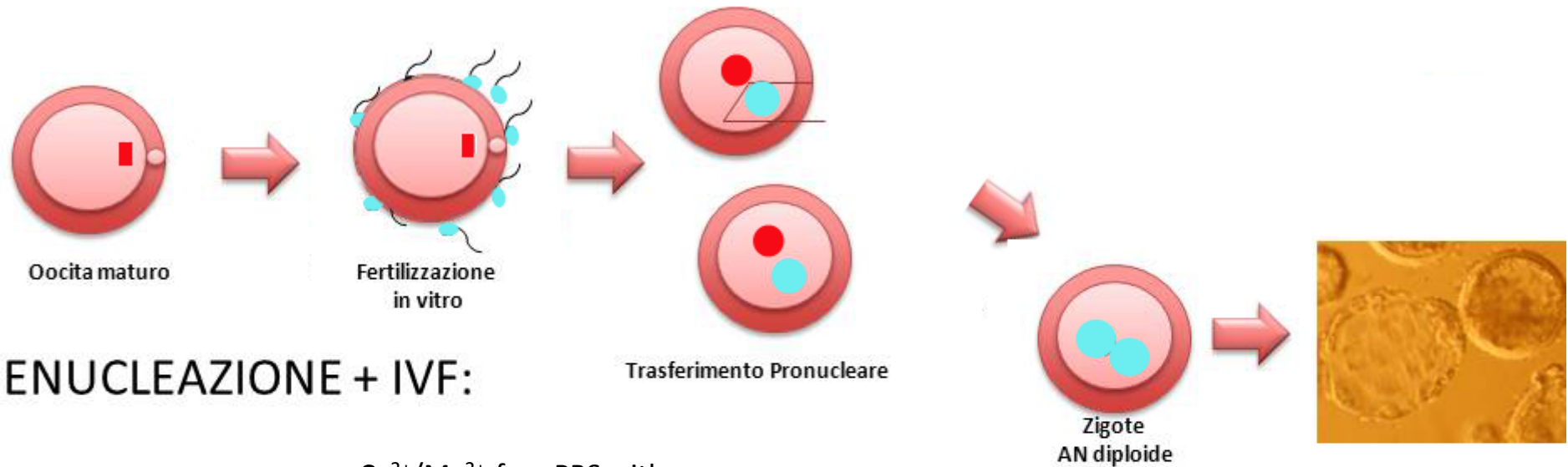


CHEMICAL
ACTIVATION



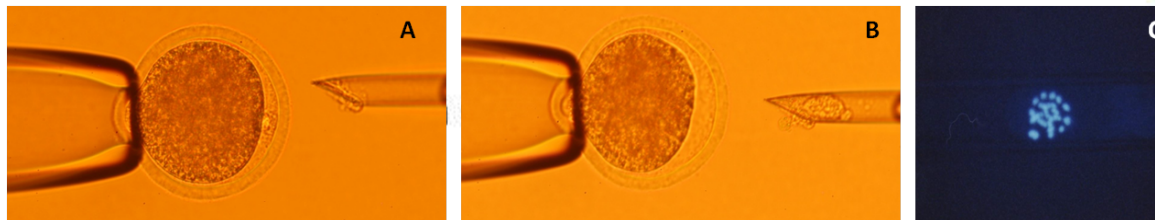
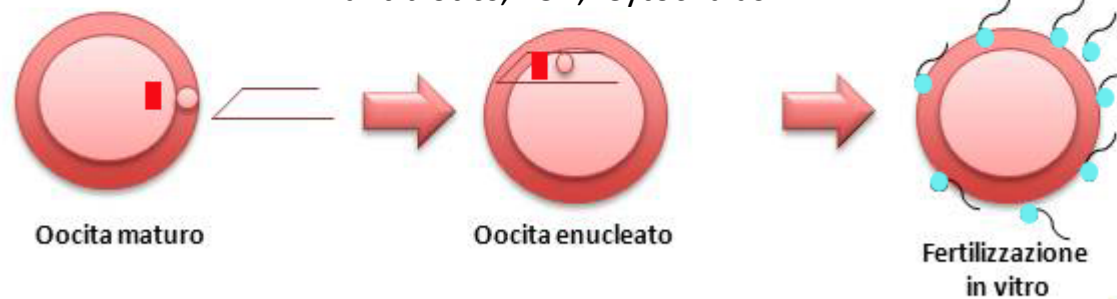
PROTOCOLLO PRODUZIONE ANDROGENOTI

TRASFERIMENTO PRONUCLEARE:



ENUCLEAZIONE + IVF:

Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS with antibiotics, BSA, Cytochalasin B



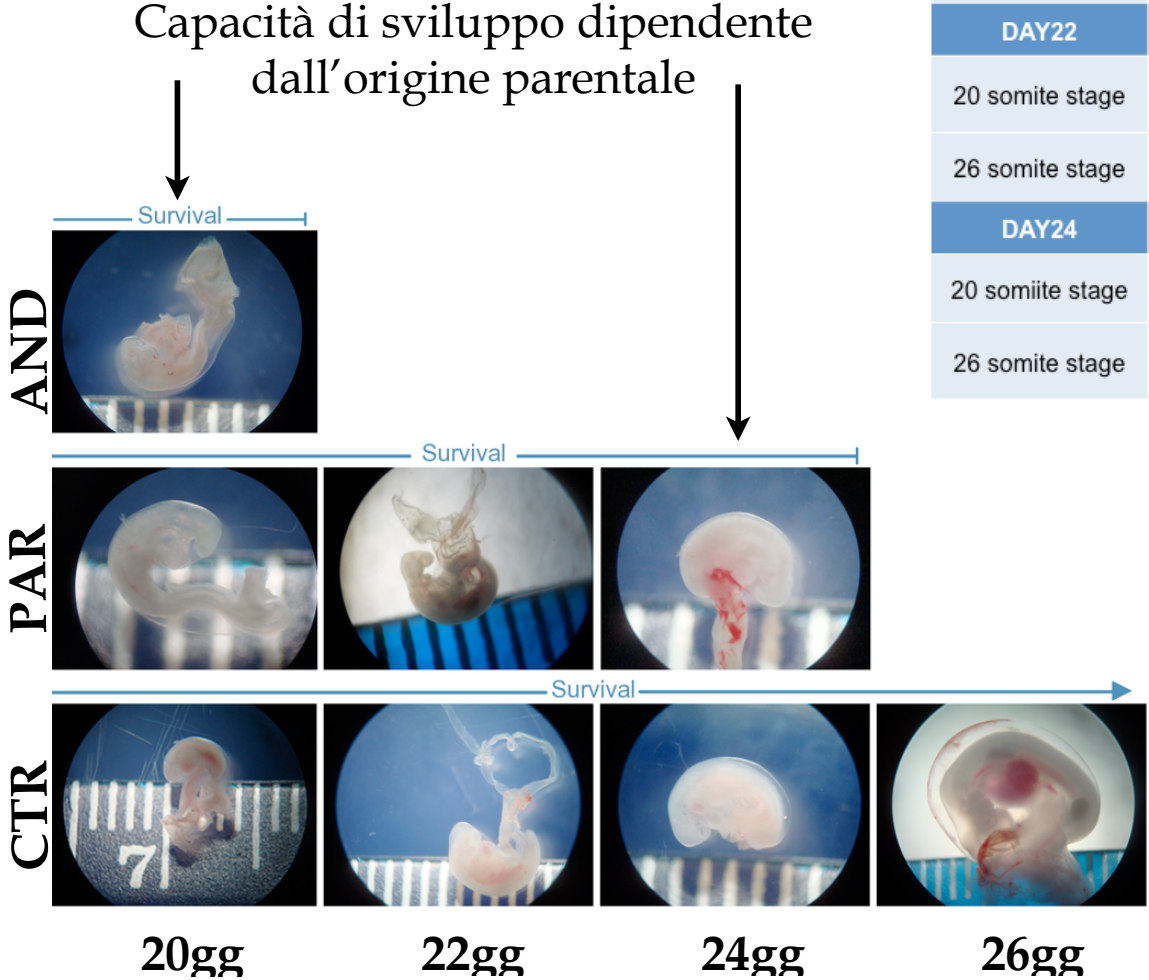
(Zacchini et al., 2012)

DISEGNO SPERIMENTALE



Determinare il ruolo dei 2 genomi parentali nei meccanismi di morte cellulare durante lo sviluppo di placente monoparentali

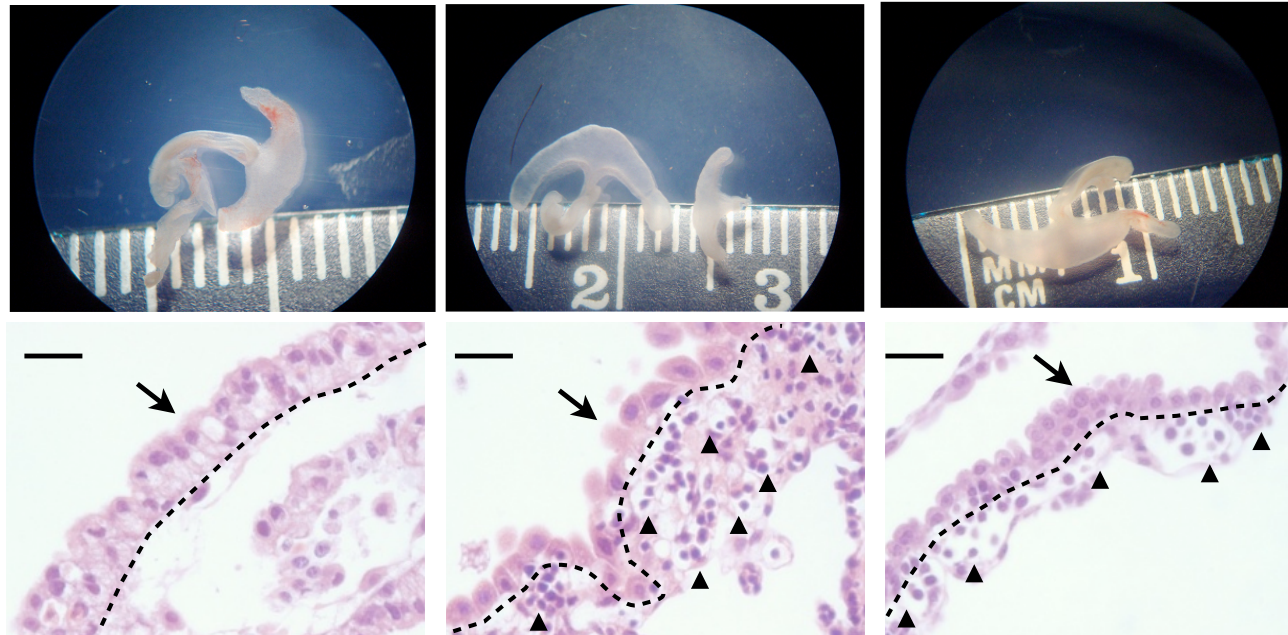
RISULTATI: Sviluppo precoce di feti monoparentali di pecora



DAY20	N° of AND (%)	N° of PAR (%)	N° of CTR (%)
14 somite stage	12 (43%)	8 (36%)	11 (38%)
20 somite stage	16 (57%)	14 (64%)	18 (62%)
DAY22			
20 somite stage	-	12 (100%)	2 (13%)
26 somite stage	-	-	14 (87%)
DAY24			
20 somiite stage	-	9 (100%)	-
26 somite stage	-	-	11 (100%)

Ritardo dello sviluppo fetale in embrioni PAR

RISULTATI: Sviluppo Placentare (20gg)



AND

PAR

CTR

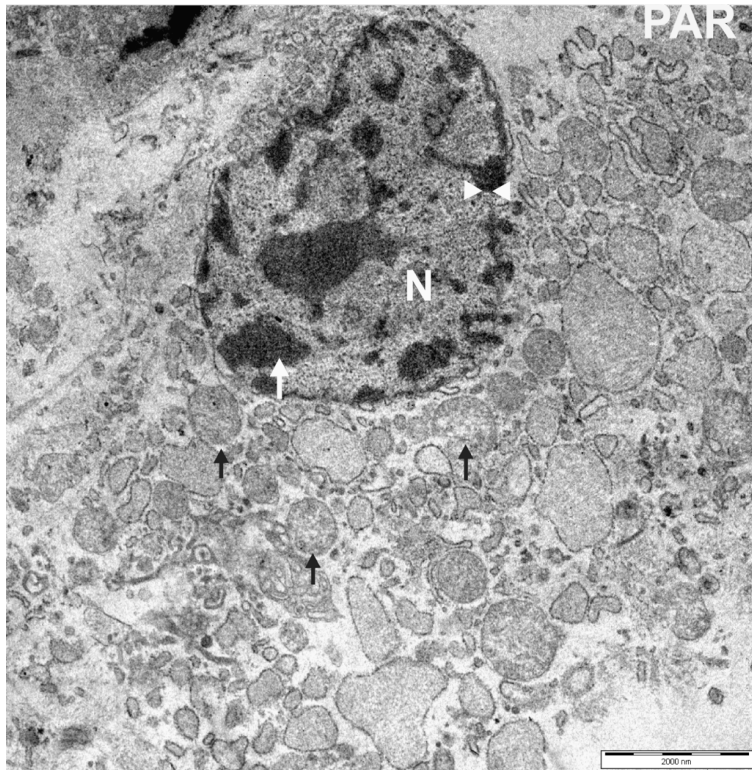
anomalie nella
morfologia del
trofoblasto

Assenza vasi

compromessa
comunicazione
materno-fetale

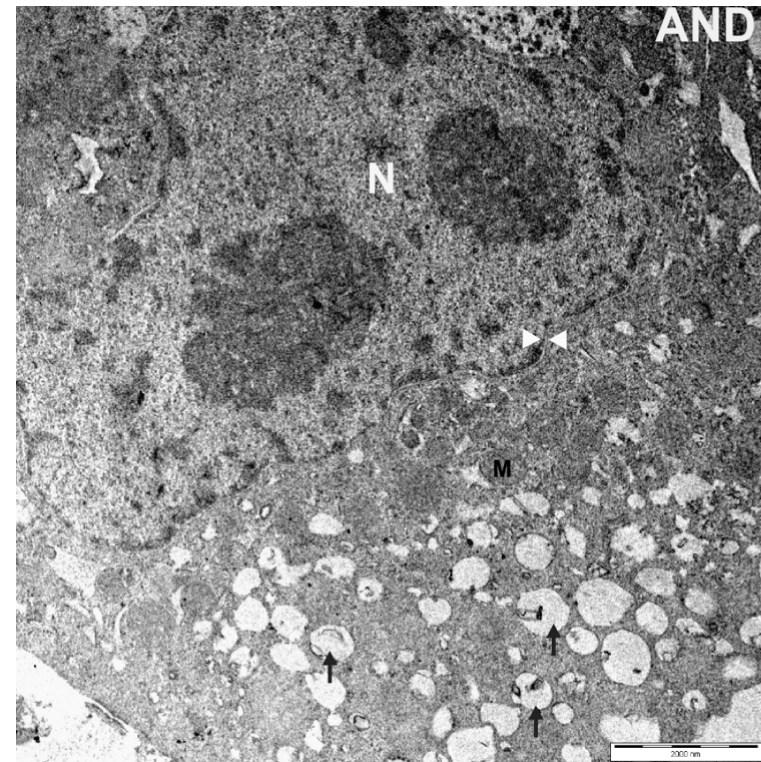
Meccanismi di MORTE CELLULARE

APOPTOSI

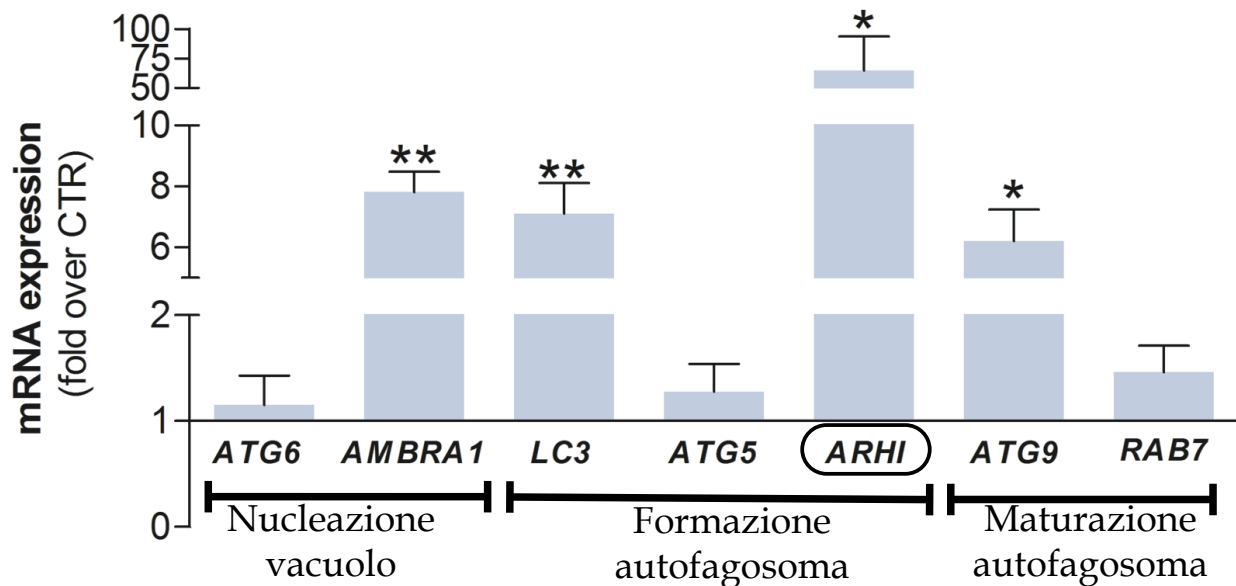


PARTENOGENOTI

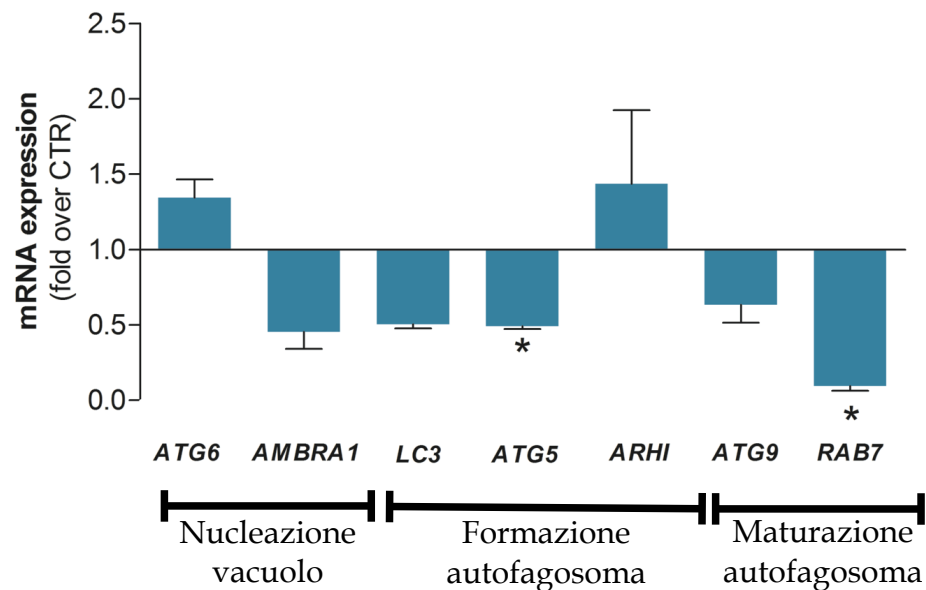
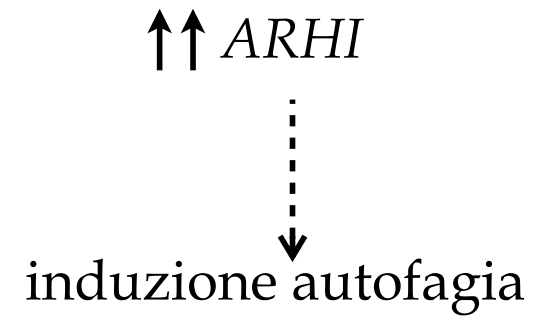
AUTOFAGIA



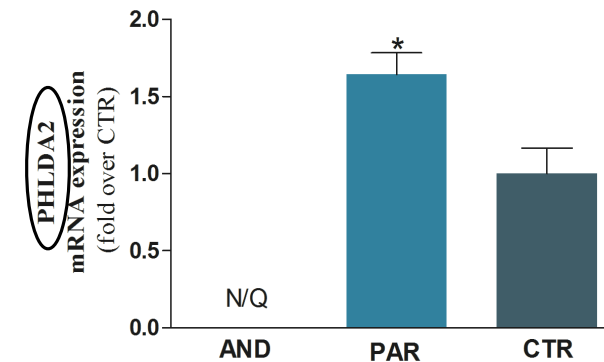
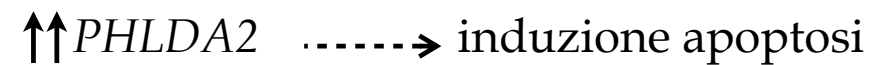
ADROGENOTI



ANDROGENOTI



PARTENOGENOTI



CONCLUSIONE

L'imprinting parentale influenza i meccanismi di morte e sopravvivenza cellulare durante lo sviluppo della placenta



(Ptak et al. 2014)