

Modelli Embrionali: Mammiferi

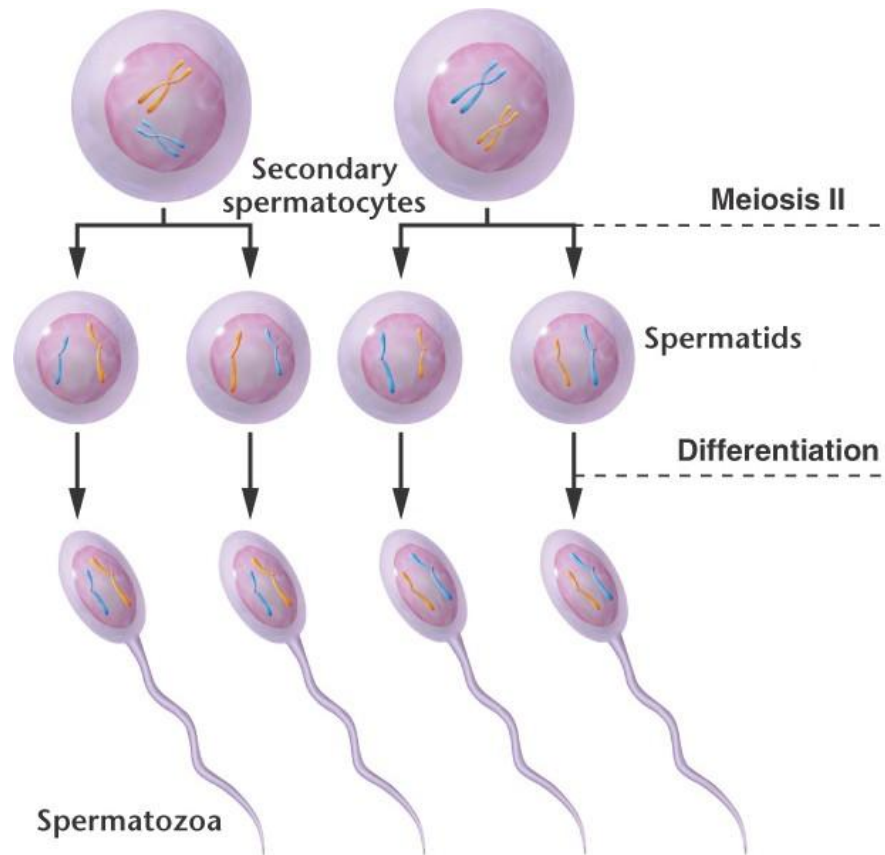
Segmentazione, attivazione del genoma embrionario,
rimodellamento della cromatina

Cellule germinali “immortali”

Gameti si preparano per l’immortalità” in modo opposto

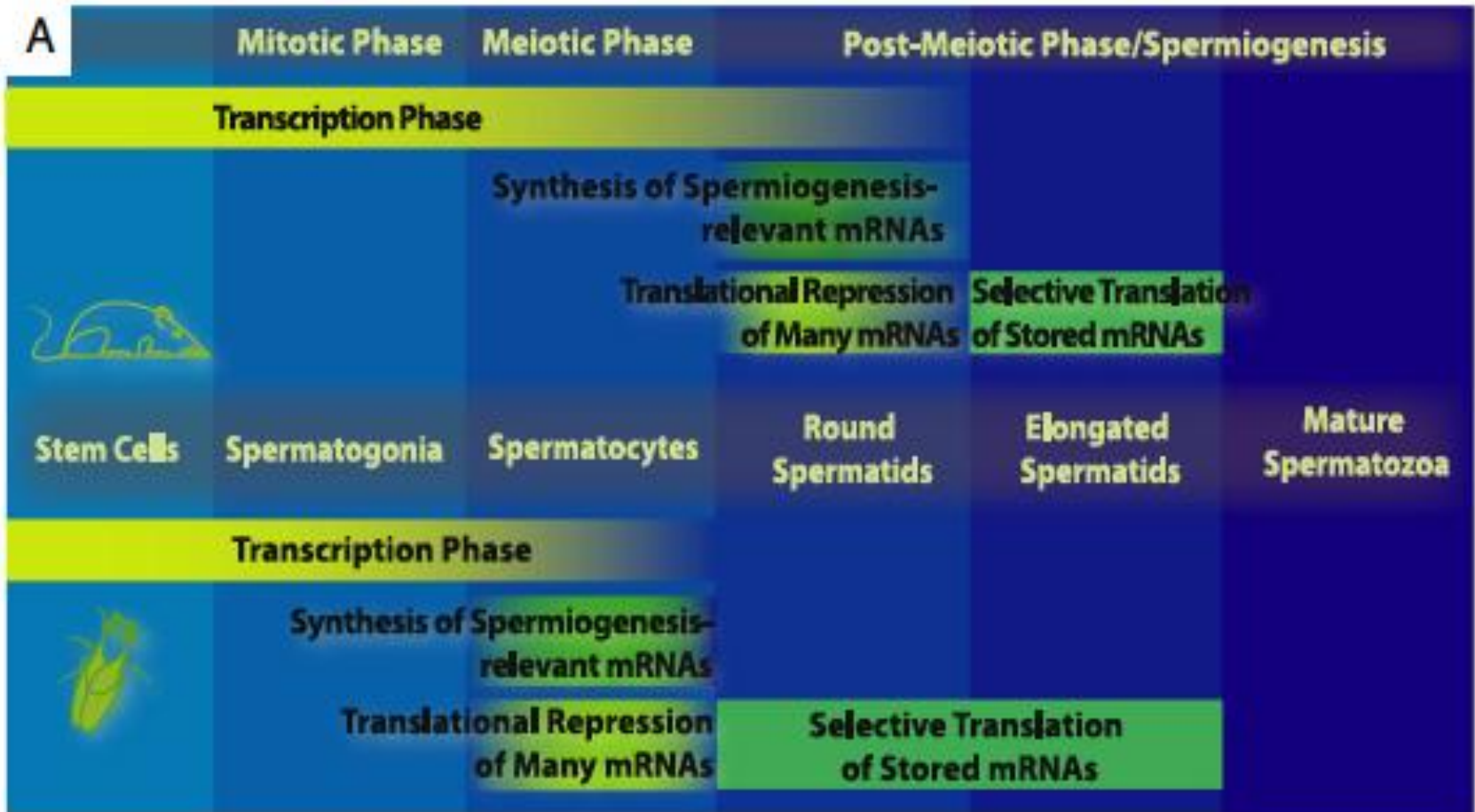


....in preparazione alla fecondazione:
rimodellamento cromatinico nello spermatozoo

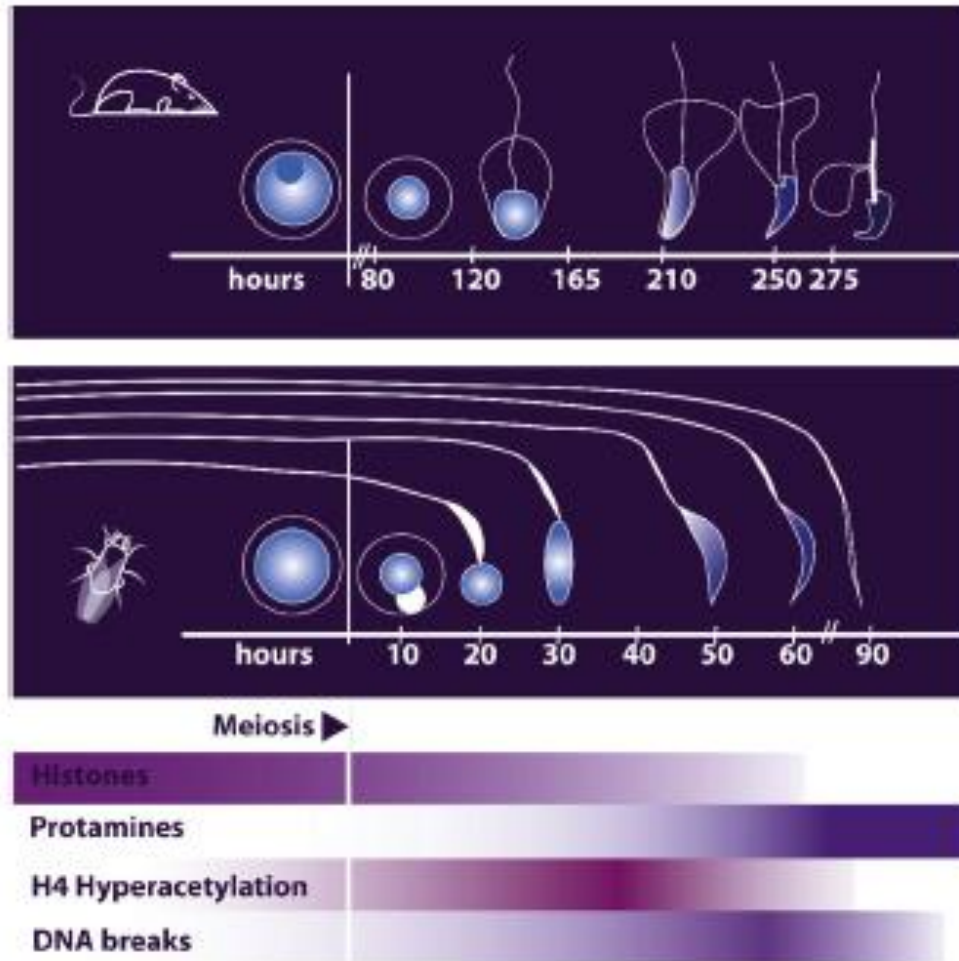


Il rimodellamento nucleare avviene in fate post meiotica, conservato dalla drosophila all'uomo

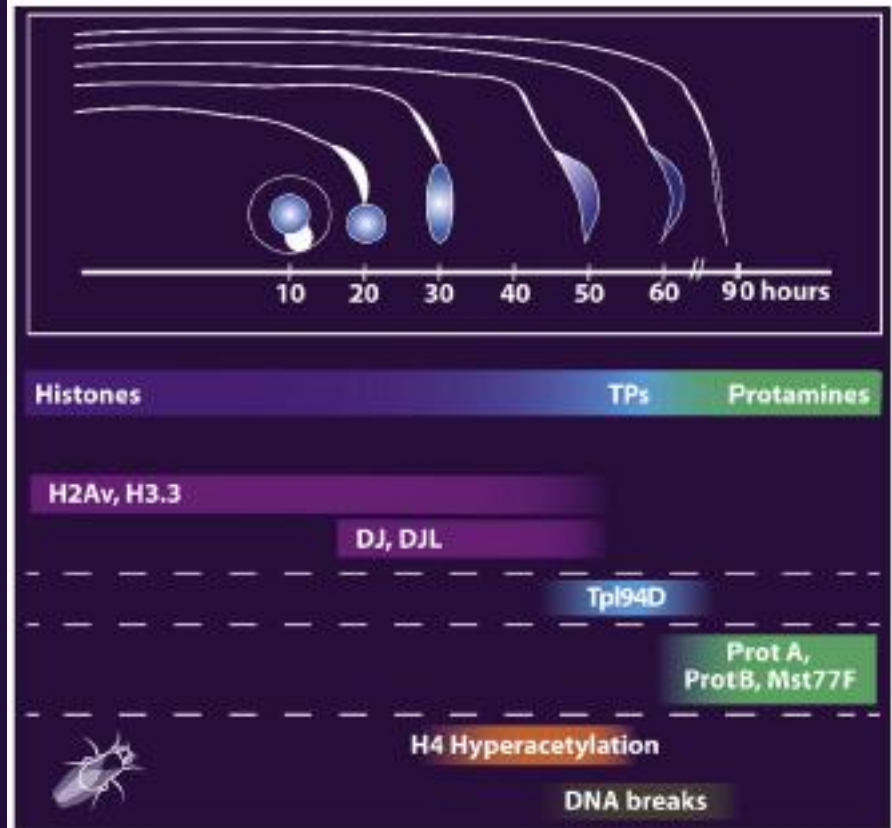
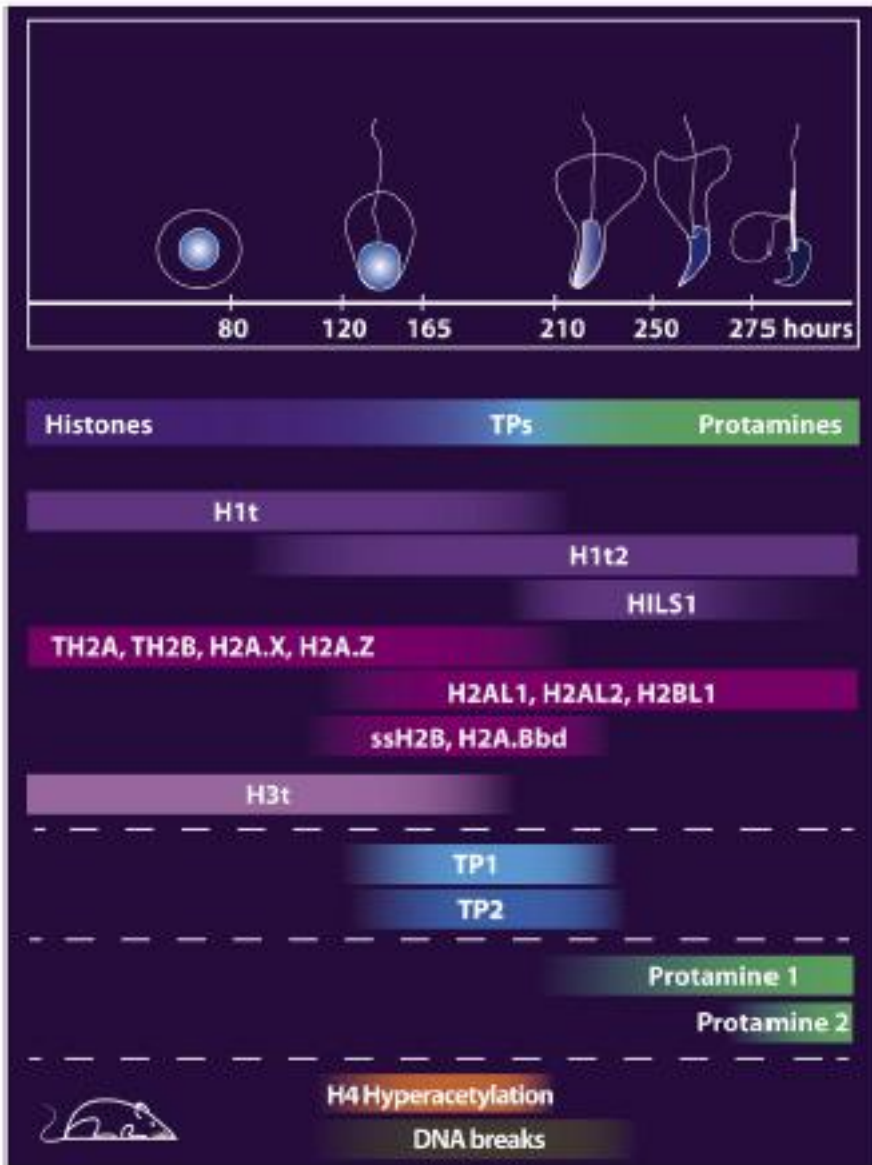
Prospetto riassuntivo delle principali tappe della spermiogenesi



Tempistica del passaggio dalla organizzazione istonica A quella protaminica

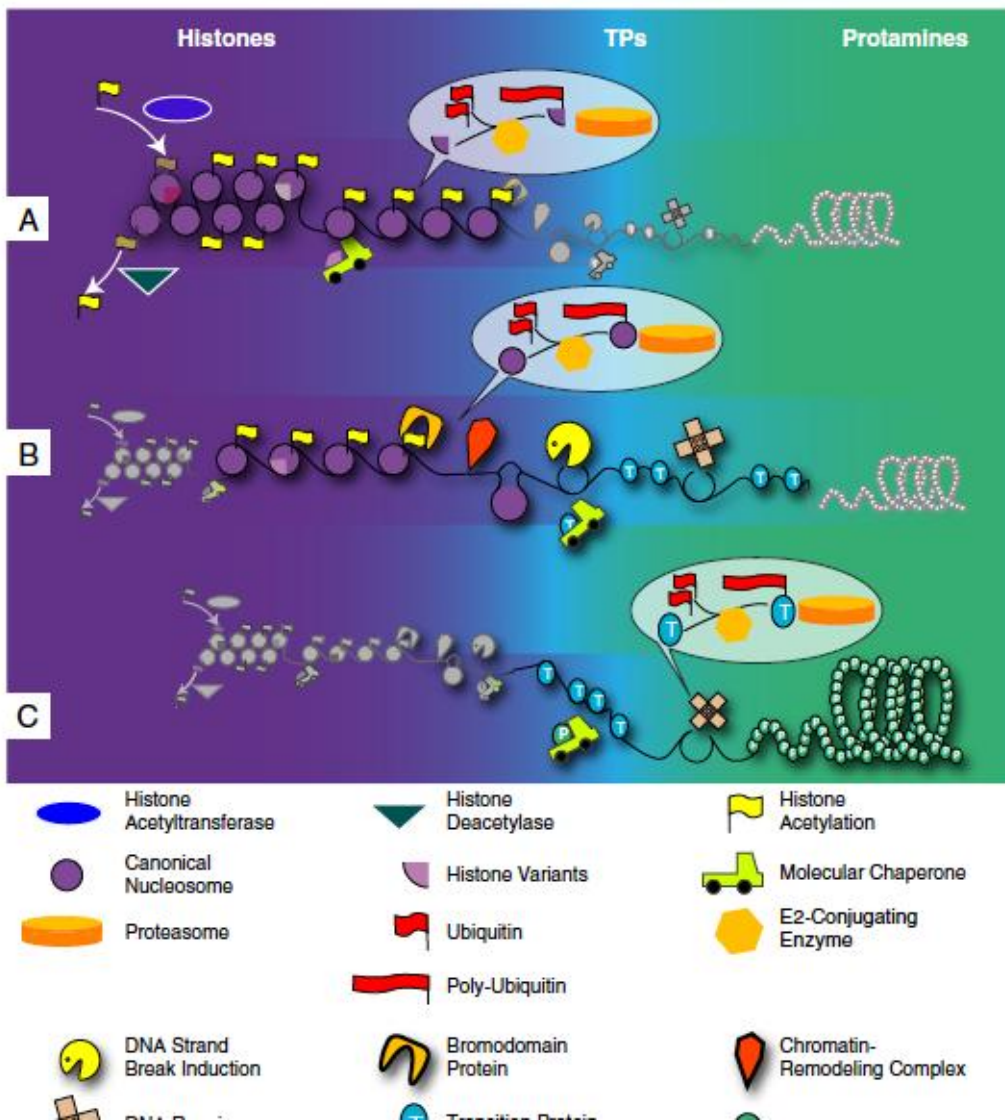


Assemblaggio di varianti istoniche fondamentale per il rimodellamento nucleare!



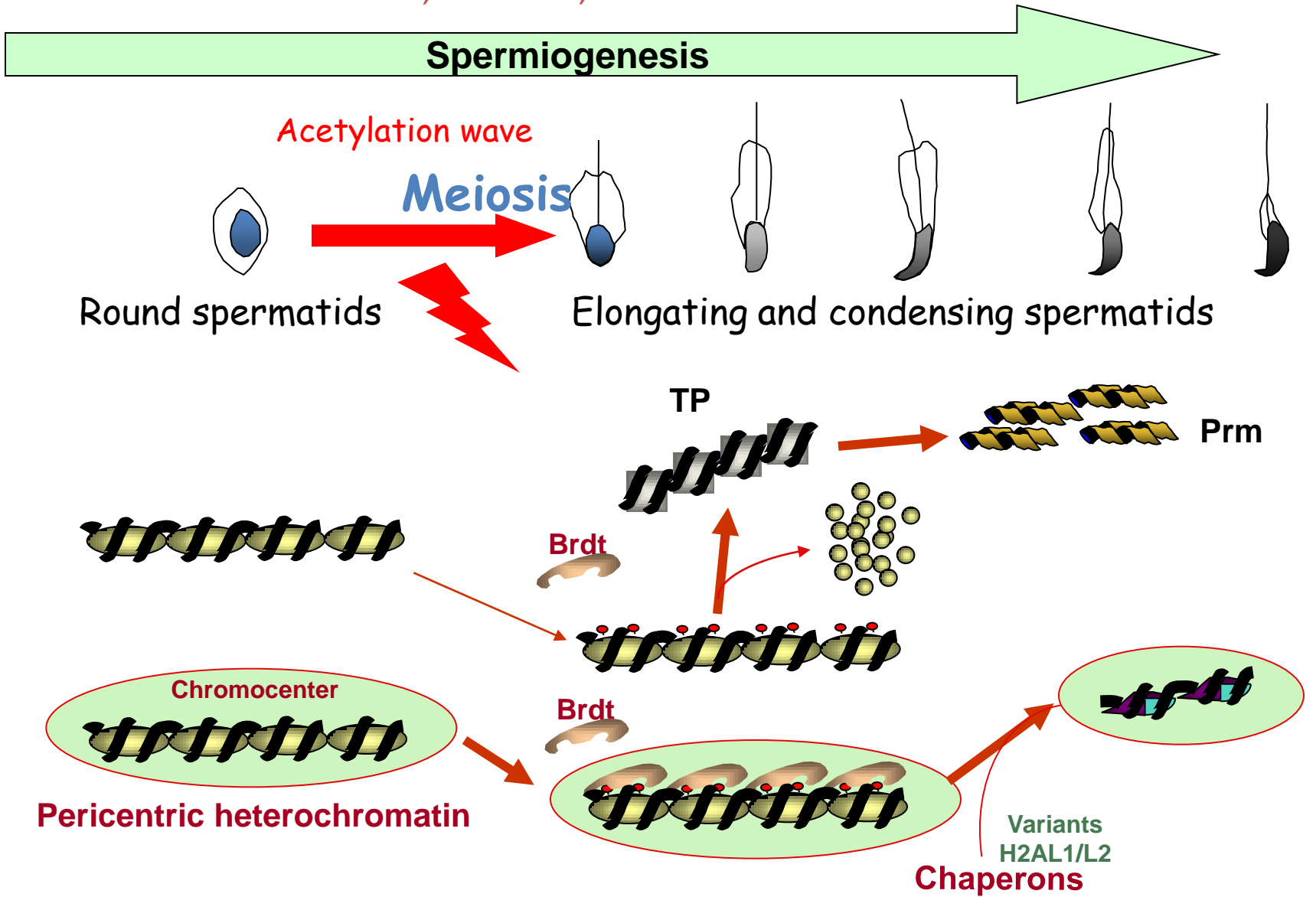
Prospetto riassuntivo

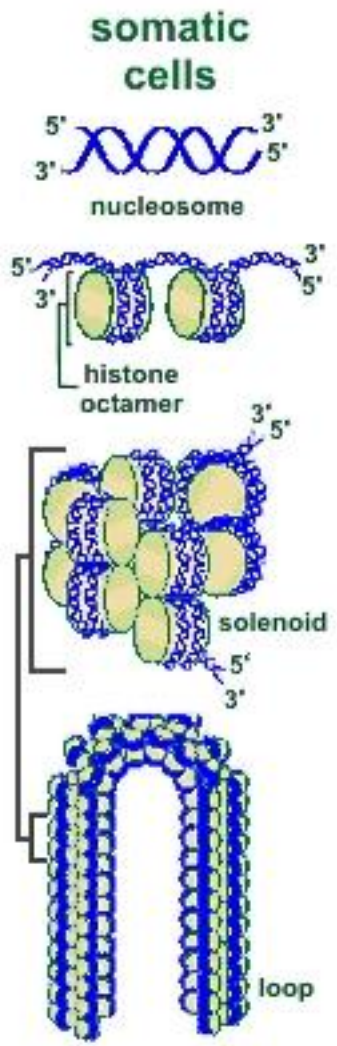
C. Rathke et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* xxx (2013) xxx-xxx



Slide courtesy of Dr. Shaadi Khocbin
CNRS, Grenoble, France

Spermatozoa





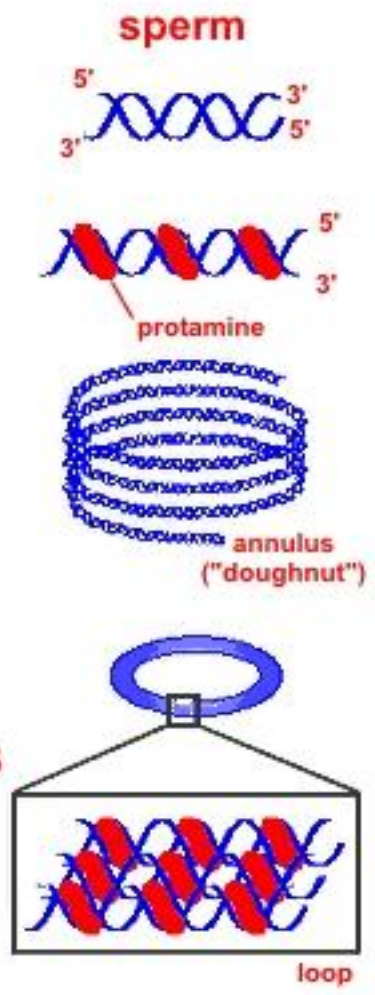
histones



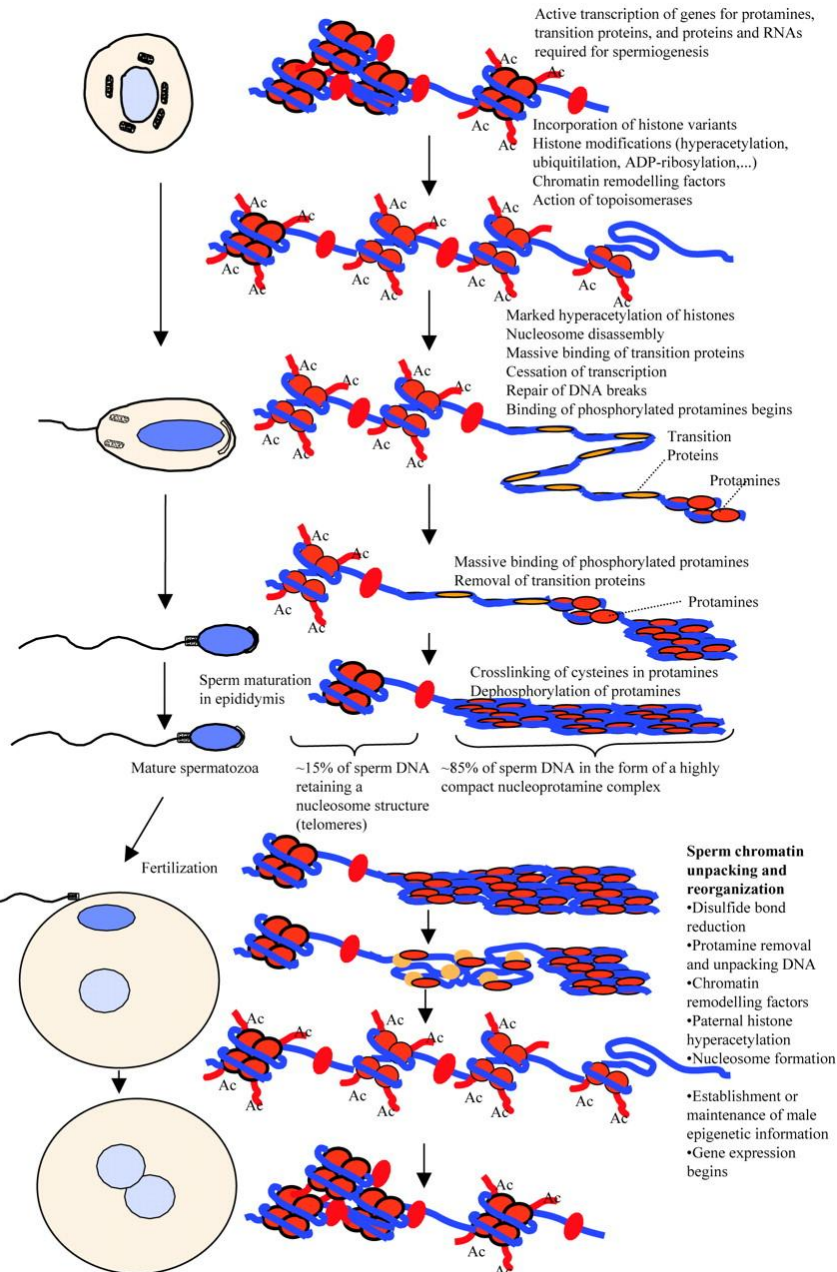
transition protein 2



protamines



Tappe della spermatogenesi



Trascrizione mRNA per:
Varianti istoniche, transition proteins,
e protamin2

Assemblaggio varianti istoniche
(destabilizzano il nucleosoma)

Acetilazione varianti istoniche –
Ulteriore destabilizzazione nucleosoma

Cessa la trascrizione

Incorporazione proteine di transizione

Sostituzione delle proteine di
transizione con protamina

1-10% del genoma mantiene organizzazione
Nucleosomica (loci imprintati, centrosoma
E geni di rilevanza per l'embrione)
uomo e topo

Protamine: caratteristiche e funzioni

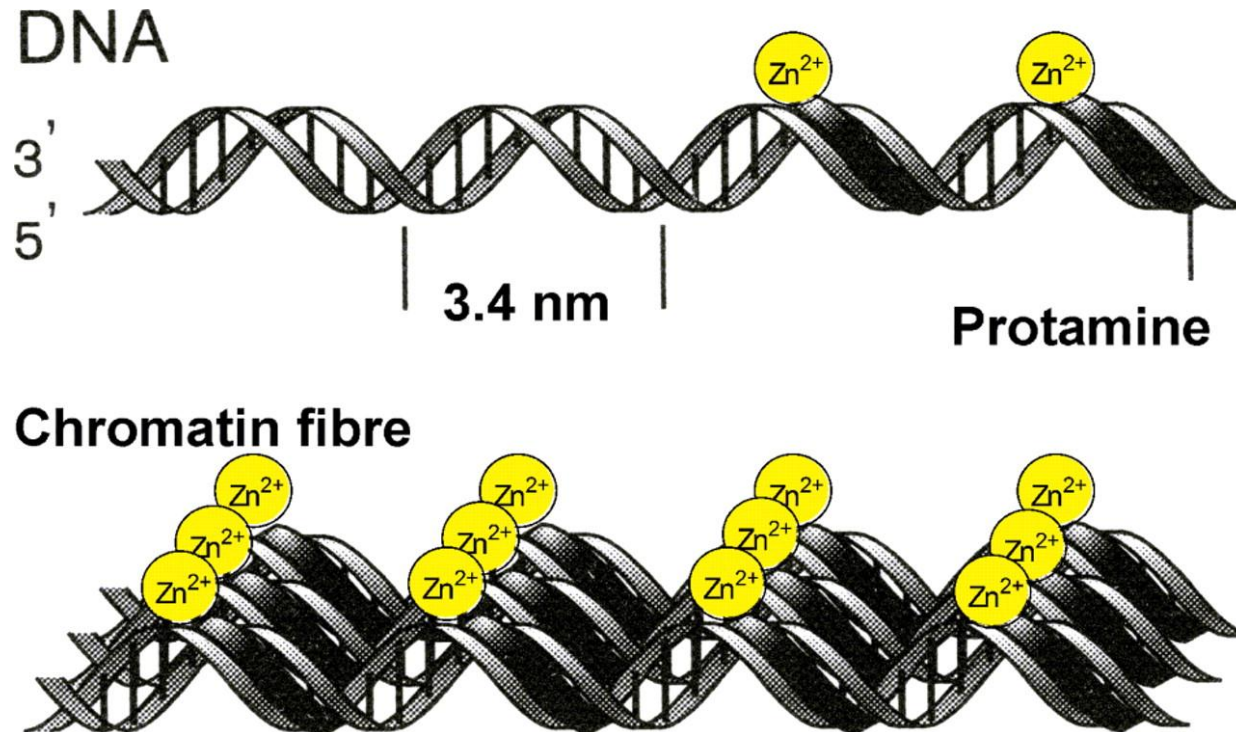
Proteine piccole, ricche di arginina, basiche con grande affinità per il DNA

Evolute dall'istone H1

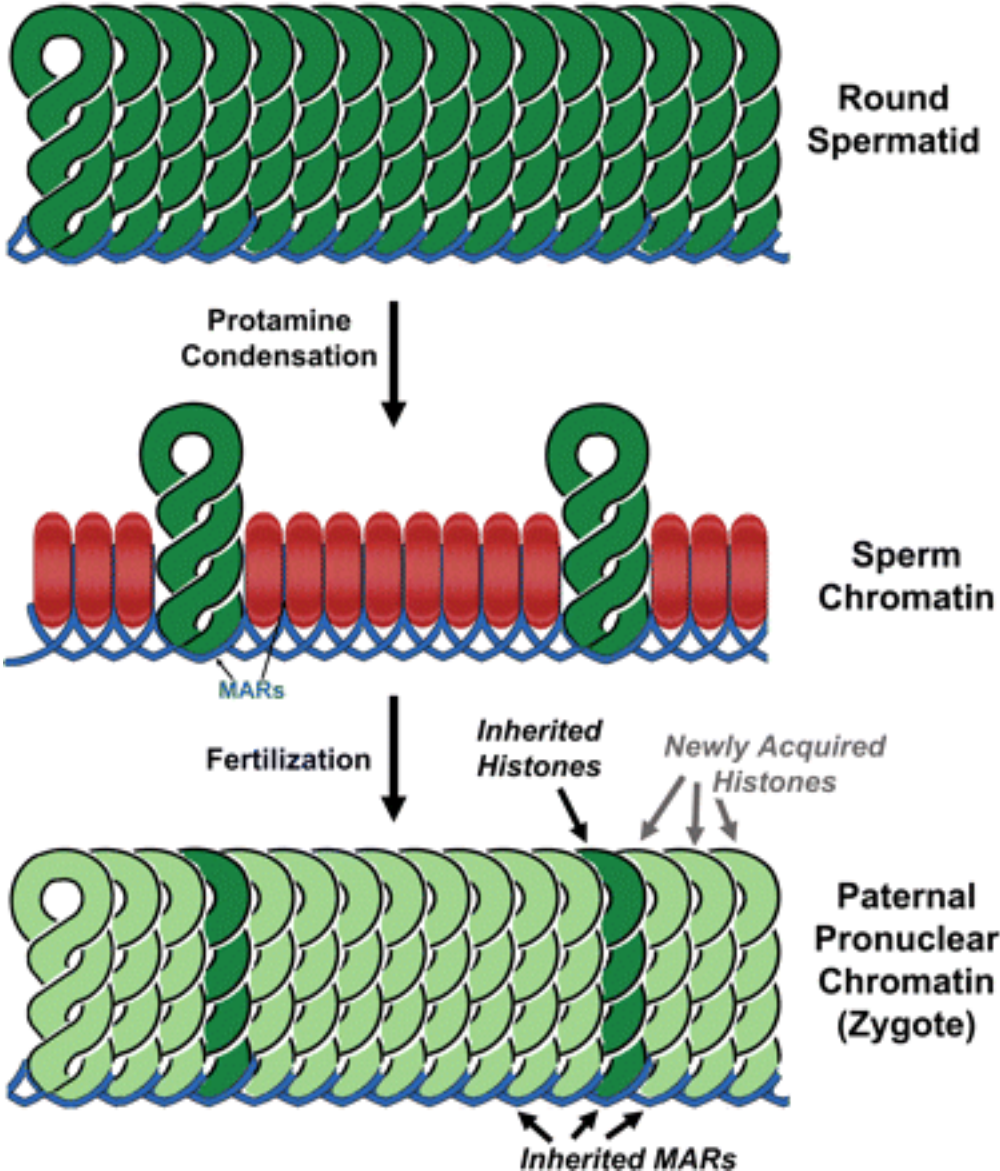
Protamina 1 e 2 in topo e uomo, protamina 1 in tutti gli altri

Compattano e rendono resistente a danno fisico il DNA

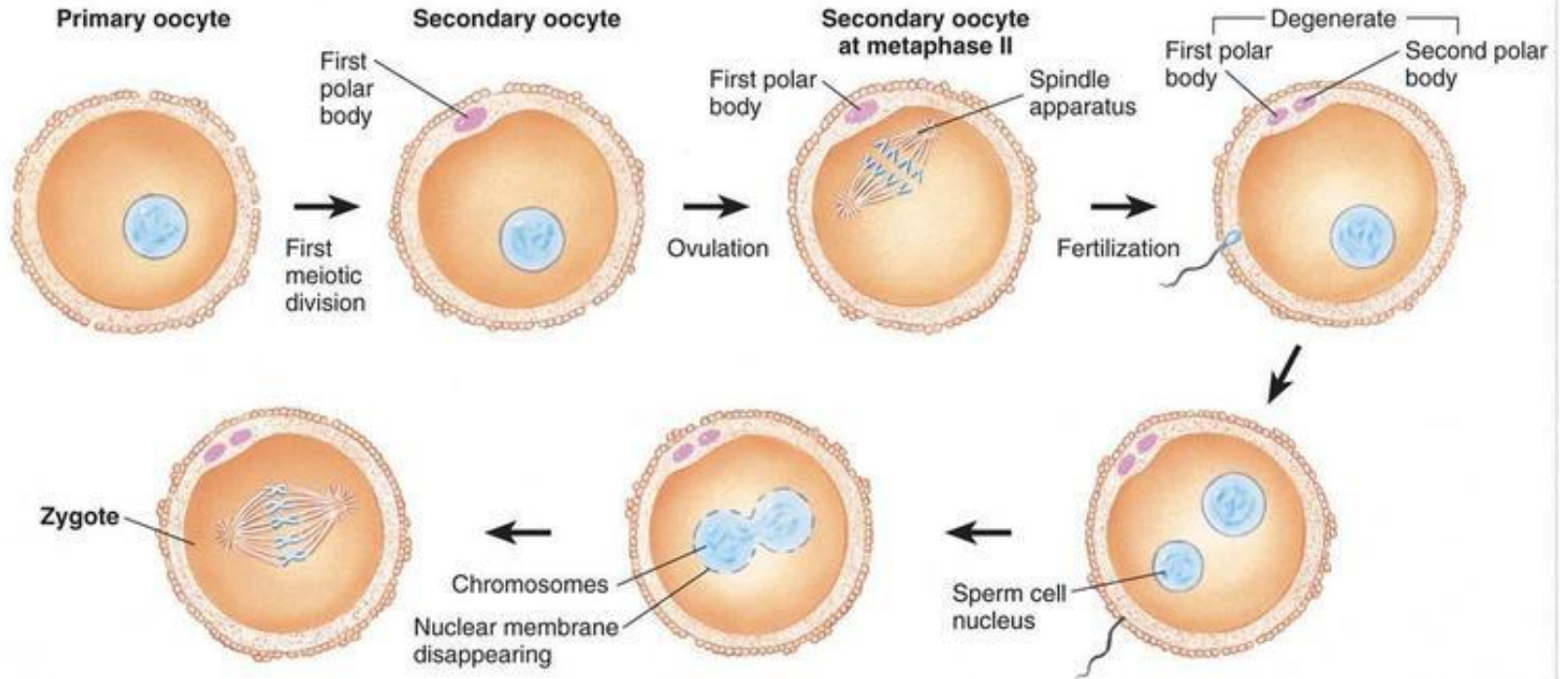
Alterata espressione di protamina/e legata a sterilità



Rappresentazione schematica transizione istone - protamina - istone



Fertilizzazione e rimodellamento nucleare



Principali eventi occorrenti alla fertilizzazione: reminder

Fusione spermatozoo/oocita blocca la polispermia

Fusione spermatozoo oocita “attiva” quest’ultimo – attivazione indotta da PLC ζ (IP3)
– **differenze tra specie** (uomo e topo seguono la regola, ruminanti no)
conseguenti oscillazioni di Ca $^{++}$ - **differenze tra specie**

Distruzione selettiva di coda e mitocondri dello spermatozoo
(solo il centriolo prossimale rimane)

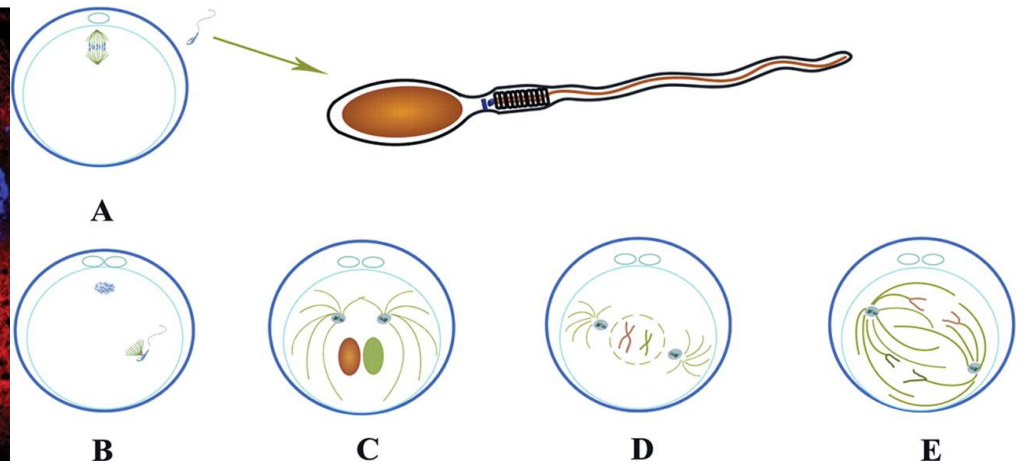
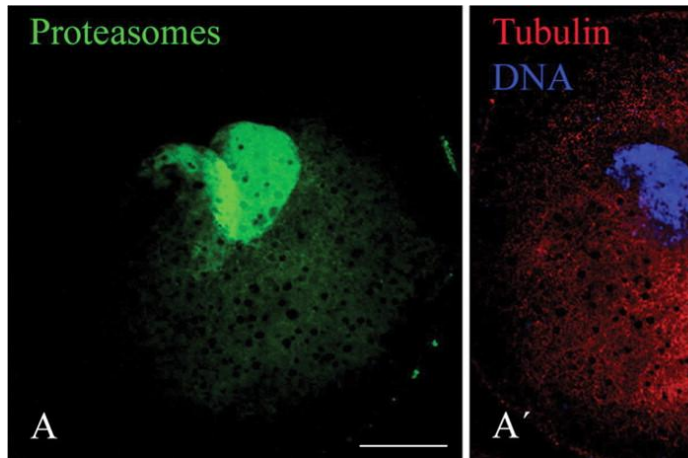
Rimodellamento della cromatina dello spermatozoo

Degradazione cicline, assemblaggio membrane pronucleari, e inizio fase S

Completamento della fase S, dis-assemblaggio membrane pronucleari e prima mitosi
Del nuovo organismo

Rimodellamento della cromatina dello spermatozoo

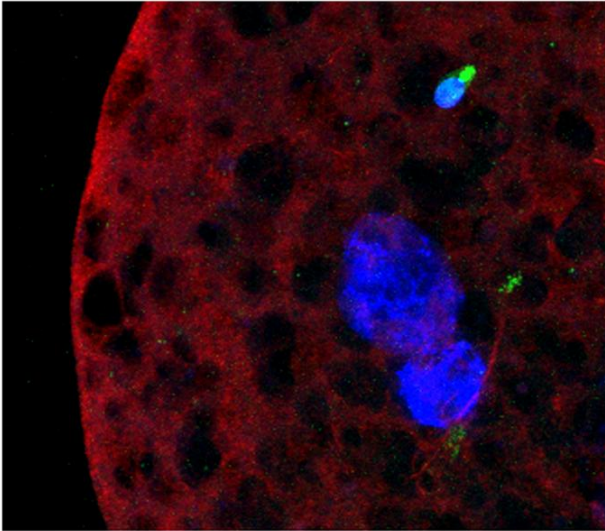
Rimodellamento della cromatina dello spermatozoo



Degradazione selettiva spermatozoo

Centriolo prossimale controlla tutte future meiosi
Del nuovo individuo -non più divisioni asimetriche!

Rimodellamento nucleo spermatozoo dovuto a:



Glutazione: riduce gruppi SH stabilizzanti
Legame protamine/DNA

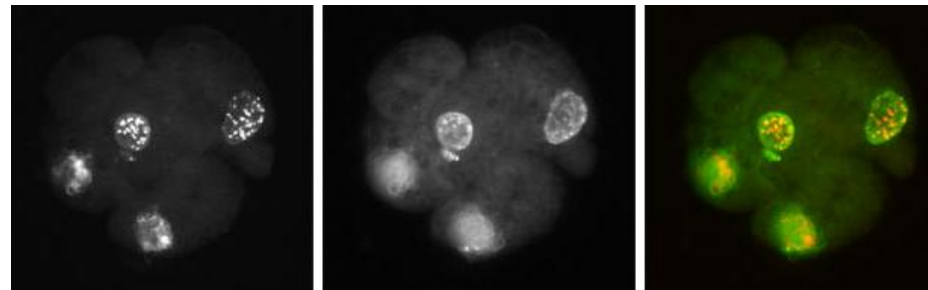
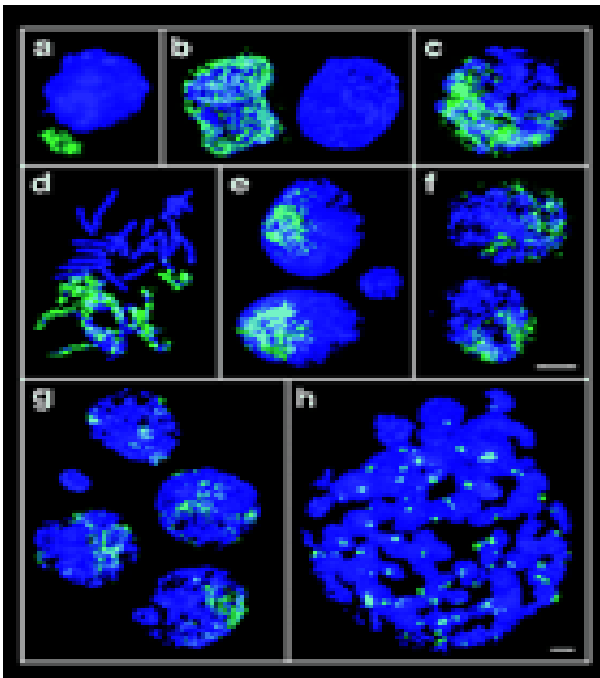
Nucleoplasmina (proteina nucleare oocita)
rimuove la protamina

Assemblaggio nucleosomi su varianti istoniche
Materne (variant H3.3)

Asimmetria tra pronucleo maschile e femminile
Istone H4 ac K18 solo su quello maschile

Segregazione cromosomi parentali durante
le prime divisioni

Struttura cromatinica dell'embrione "aperta"



I pronuclei sono visibili solo in alcune specie

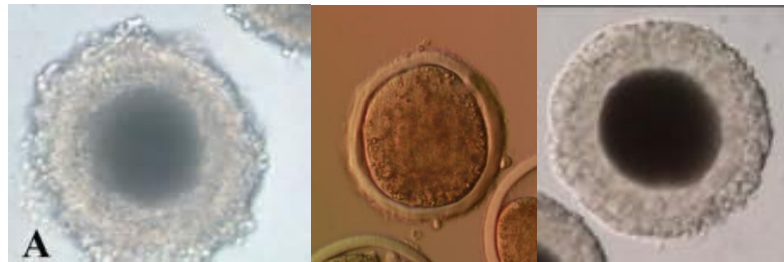


Uomo

topo

coniglio

Visualizzazione diretta

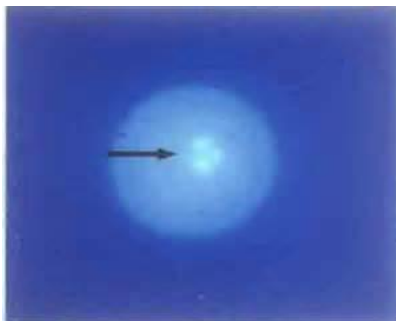


Cane

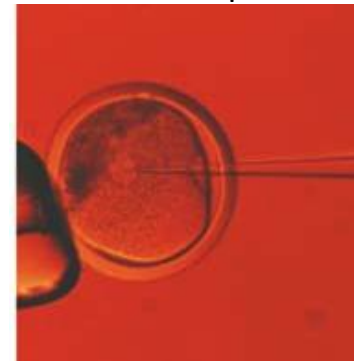
ruminanti

gatto

Visualizzazione con coloranti vitali
(Hoechst 33342)

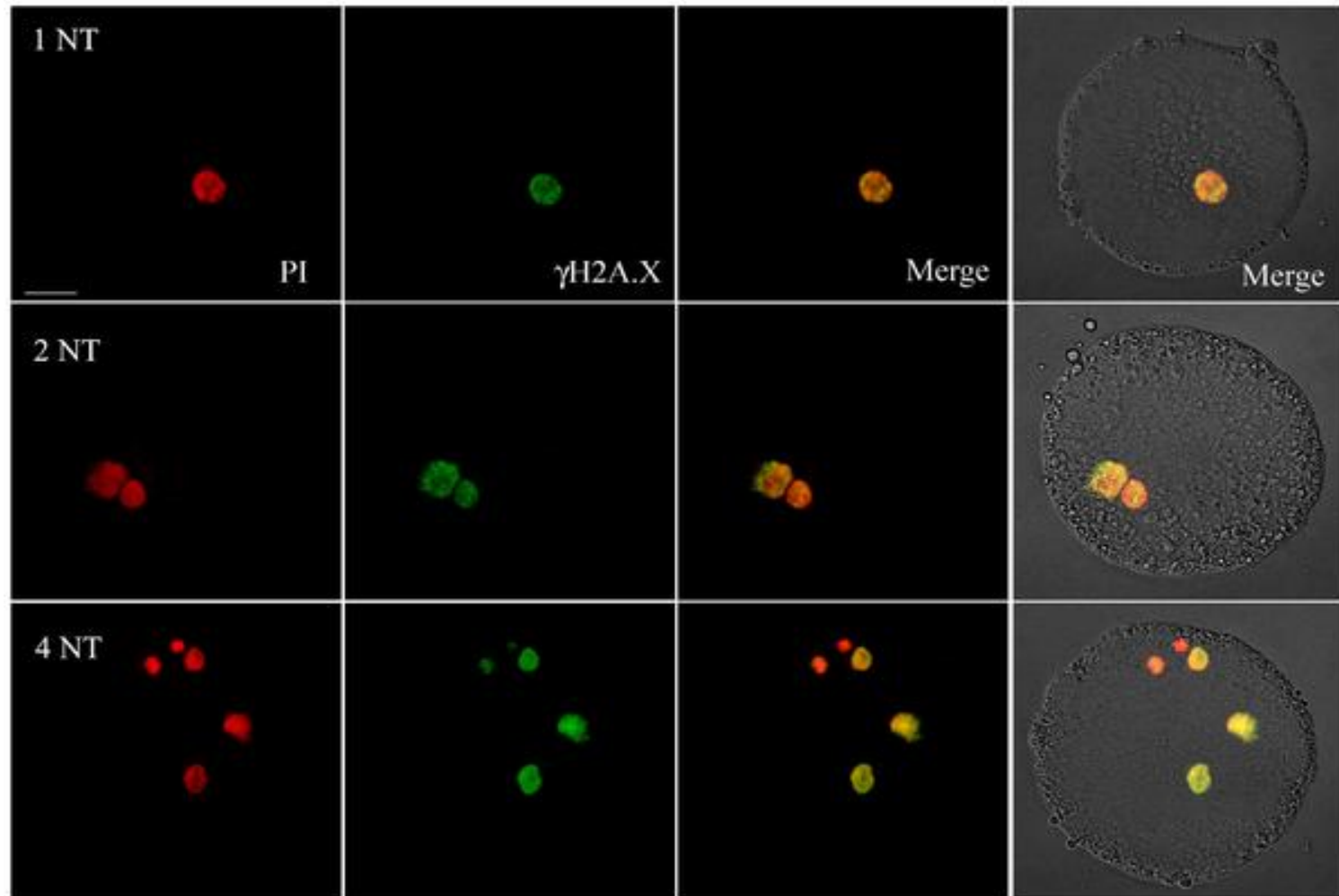


Visualizzazione con centrifugazione
15000 rpm



Grande capacità di DNA repair posseduta dall'occita!

Figure 5. γ H2AX immunostaining in pronuclei of oocytes injected with up to four nuclei from freeze-dried lymphocytes.



Iuso D, Czernik M, Di Egidio F, Sampino S, et al. (2013) Genomic Stability of Lyophilized Sheep Somatic Cells before and after Nuclear Transfer. PLoS ONE 8(1): e51317. doi:10.1371/journal.pone.0051317

<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0051317>

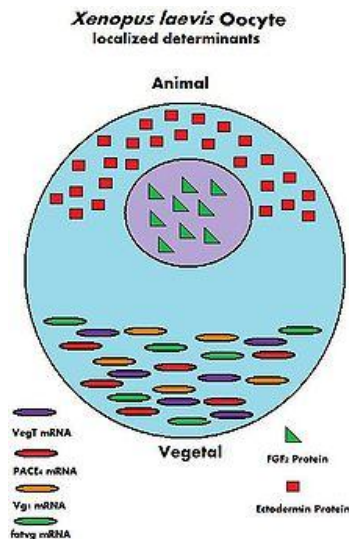
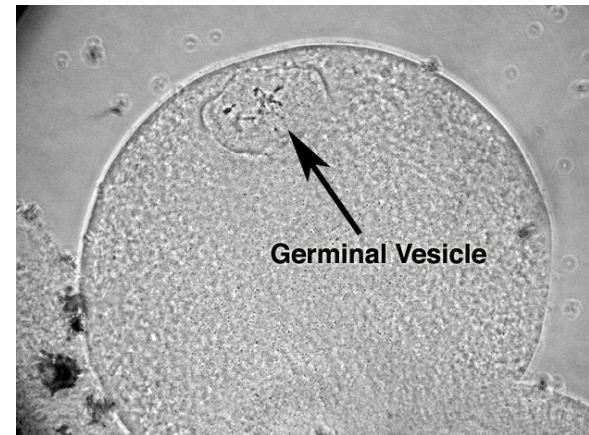
Prime segmentazioni embrionali sostenuta da traslazione di mRNA Accumulati durante maturazione oocita

Controllo trascrizionale nell'oocita

Intensa attività di trascrizione durante maturazione oocita

Alcuni mRNA traslati immediatamente (house-keeping genes)

Maggior parte mRNA stoccati nel citoplasma
Associati al citoscheletro (actina) e ancorati
Alla cortex (gradients)



Controllo traslazionale nell'oocita

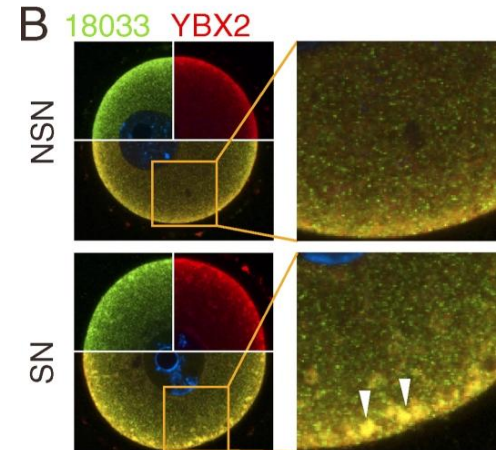
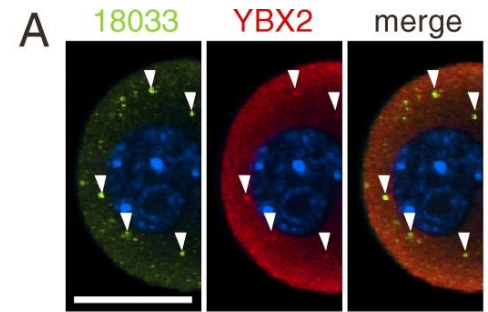
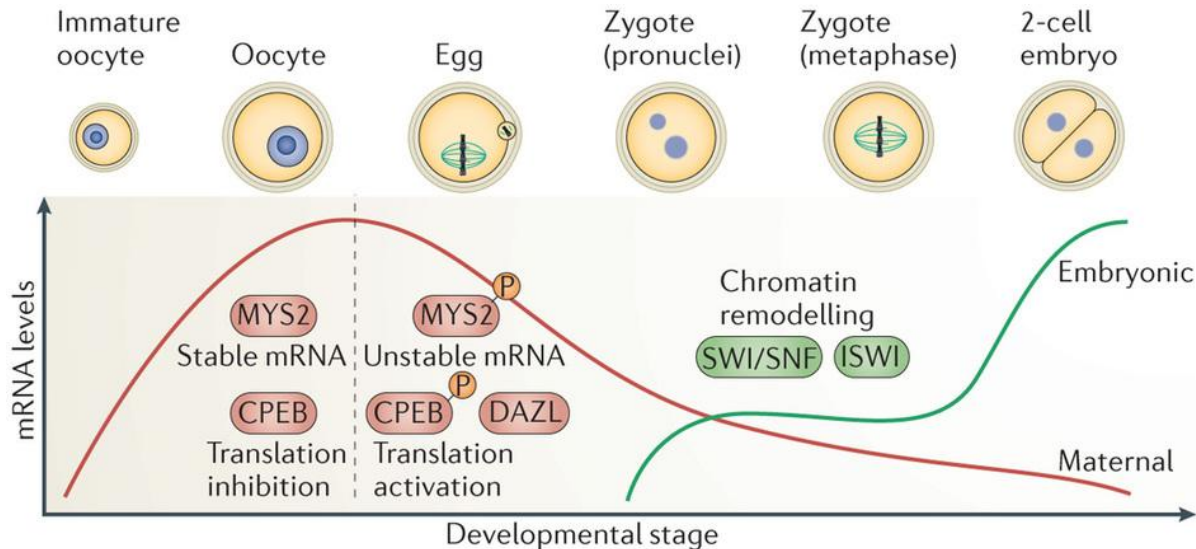
Stabilizzazione mRNA dovuta a polyA

In posizione 3' (cytoplasmic polyadenylation elements - CPEs)

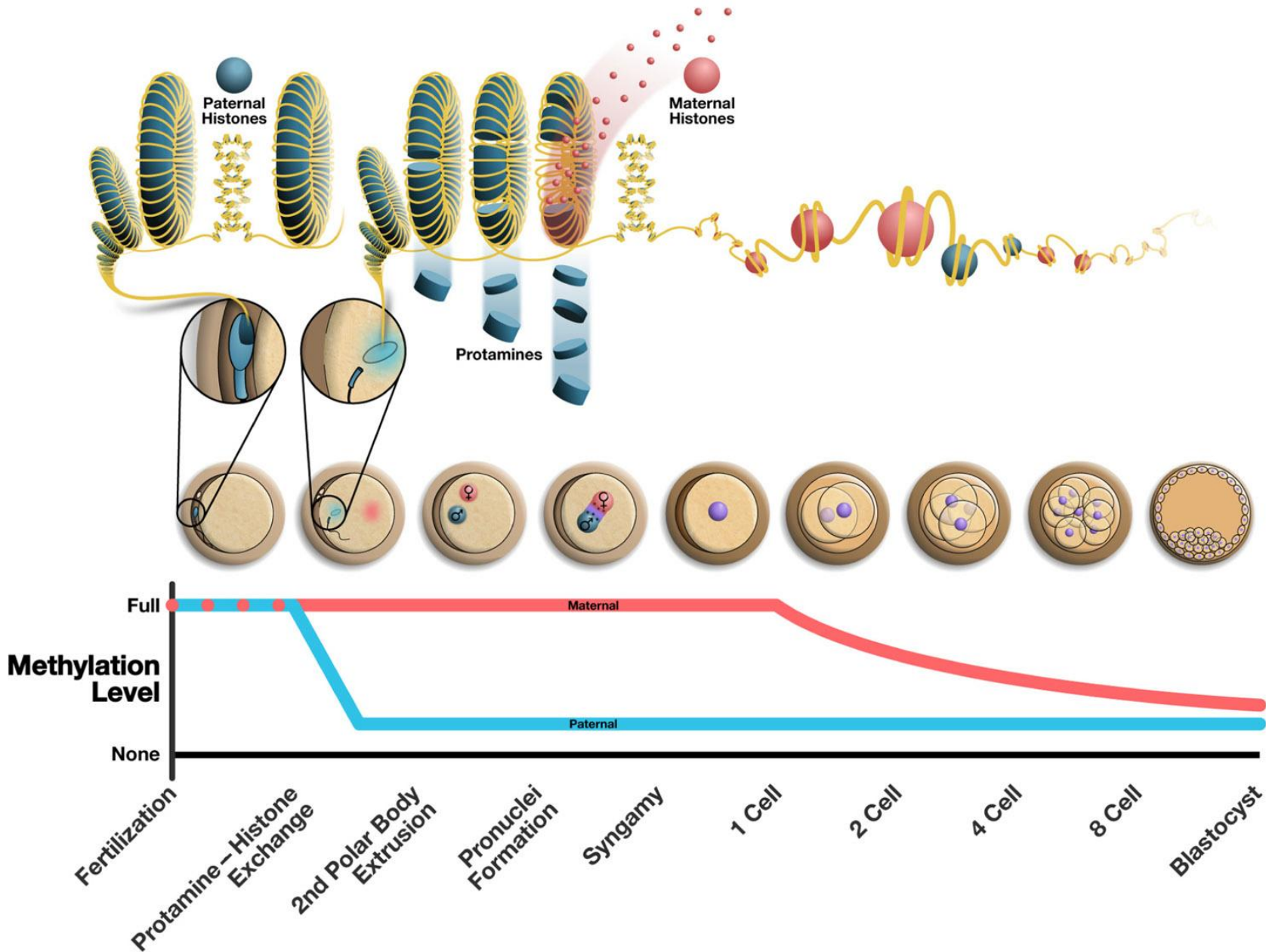
CPE reclutano la proteina CPE-binding protein (CPEB),
A questo complesso si ancora "Maskin"

Associazione del complesso CPEB – Maskin ai granuli P

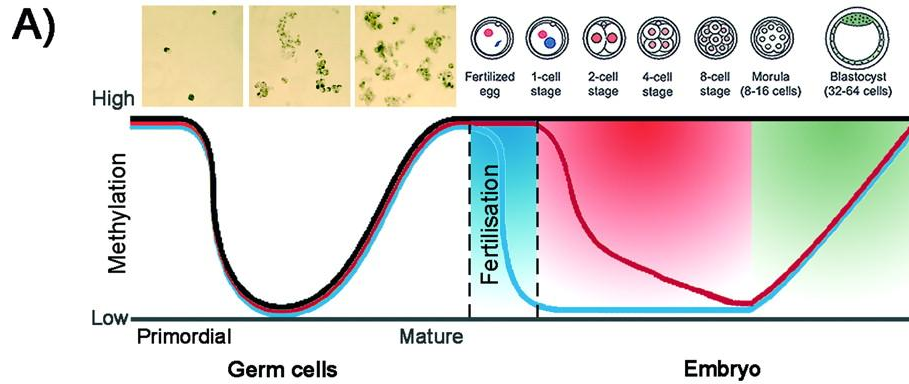
Fosforilazione CPEB e reclutamento RNA-binding DAZL
Riattiva translazione dopo la fertilizzazione



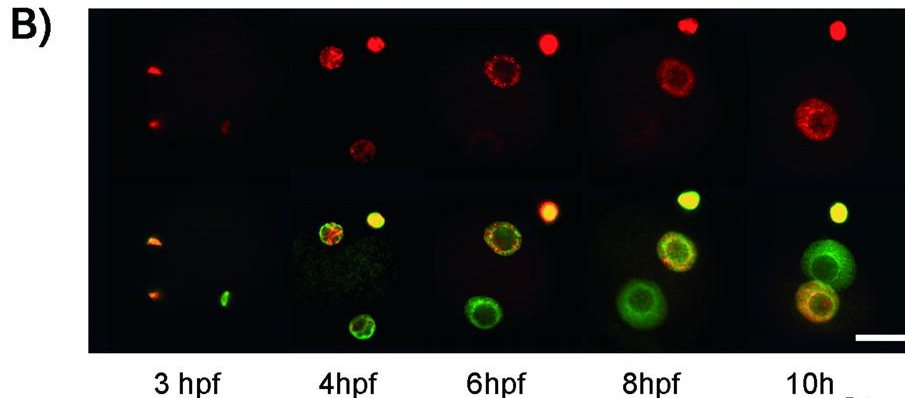
Prospetto generale rimodellamento e metilazione globale durante embriogenesi



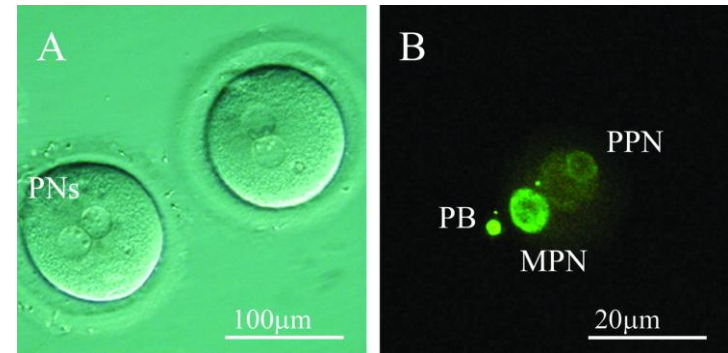
Metilazione globale durante o sviluppo embrionale



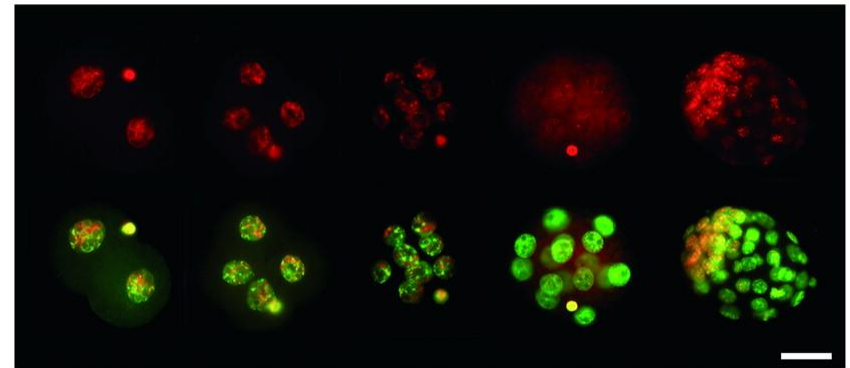
Demetilazione attiva a carico del pronucleo maschile (azione delle TET3 idrossilase e base excision) – differenze tra specie



Demetilazione passiva durante le prime Segmentazioni
Mancanza di de novo DNMTs



C)



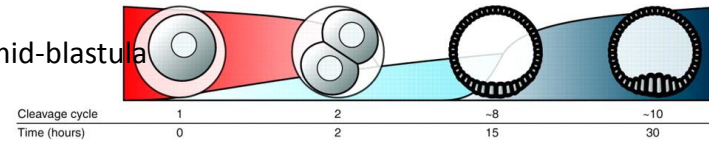
Aumento metilazione genomica dallo stadio di blastocisti!!!!

Attivazione del genoma embrionario

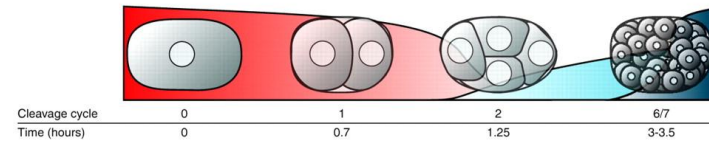
Trattamento di embrioni con α -amanitina (blocca RNA polimerasi)
Blocca lo sviluppo embrionale (1970)

maternal-to-zygotic transition' (MZT) and 'mid-blastula transition' (MBT).

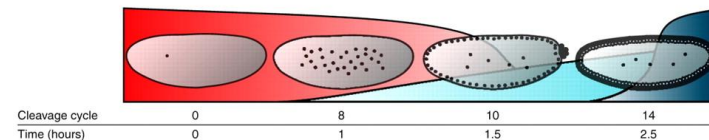
Sea urchin (*S. purpuratus*)



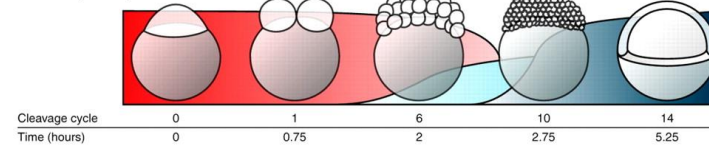
Nematode (*C. elegans*)



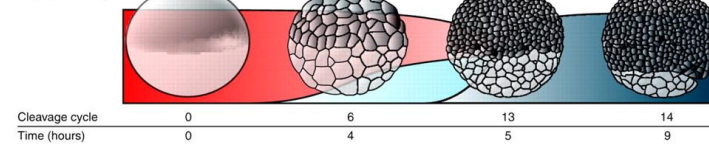
Fruit fly (*D. melanogaster*)



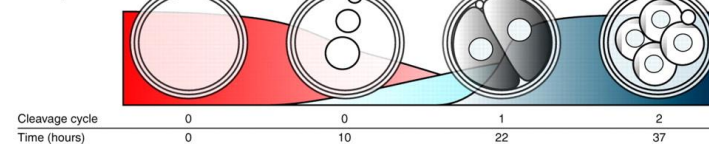
Zebrafish (*D. rerio*)



Frog (*X. laevis*)

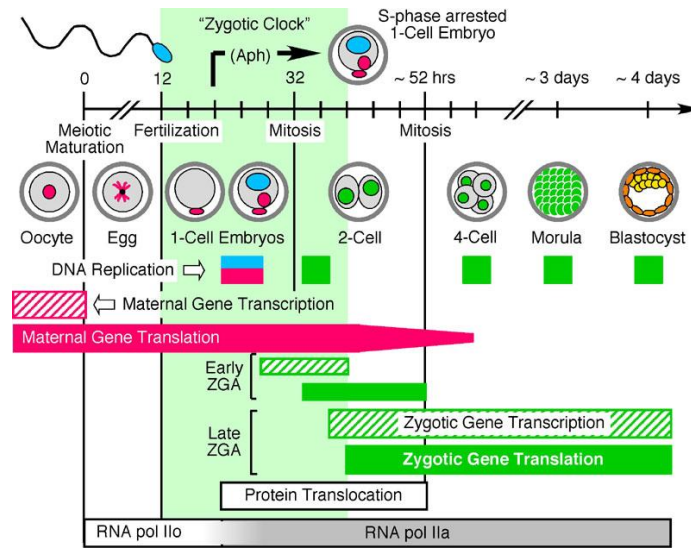


Mouse (*M. musculus*)



Attivazione del genoma embrionario

Differenze tra specie



4 cellule embrione umano

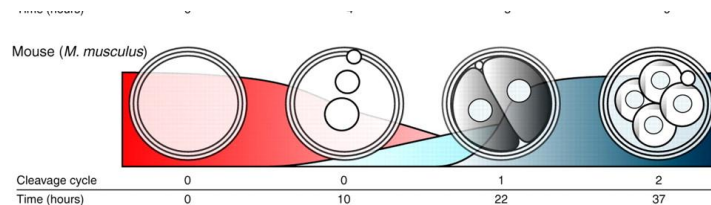


8-16 cellule embrioni di bovino-pecora, capra, maiale



Attivazione del genoma embrionario

Meccanismi



Trascrizione genome embrionario possibile grazie a struttura “aperta” della cromatina

Inattivazione (knowdown) del complesso di rimodellamento SWI/SNF blocca attivazione genoma

Rapporto volume nucleo/citoplasma (polispemic embryo activate earlier)

Diluizione repressori di trascrizione

Maternal clock -

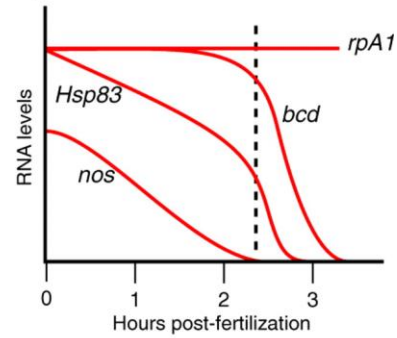
microRNA?

Regolazione cromatinica: geni implicati in *D. Melanogaster* (anche topo)

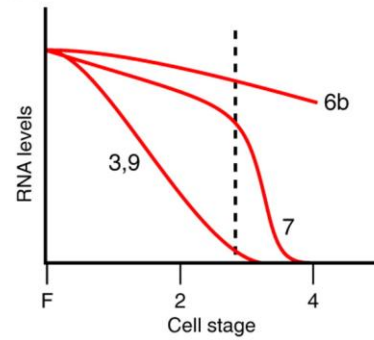
Bicoid Stability Factor (BSF) e Zelda (ZLD;), a zinc-finger transcription factor,

Attivazione del genoma embrionario: degradazione rapida RNA materni

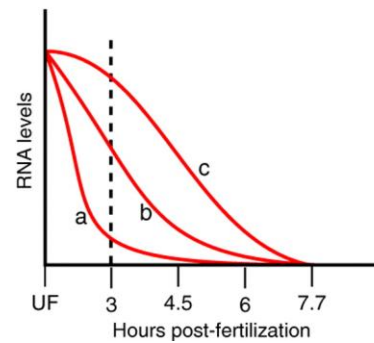
A Fruit fly

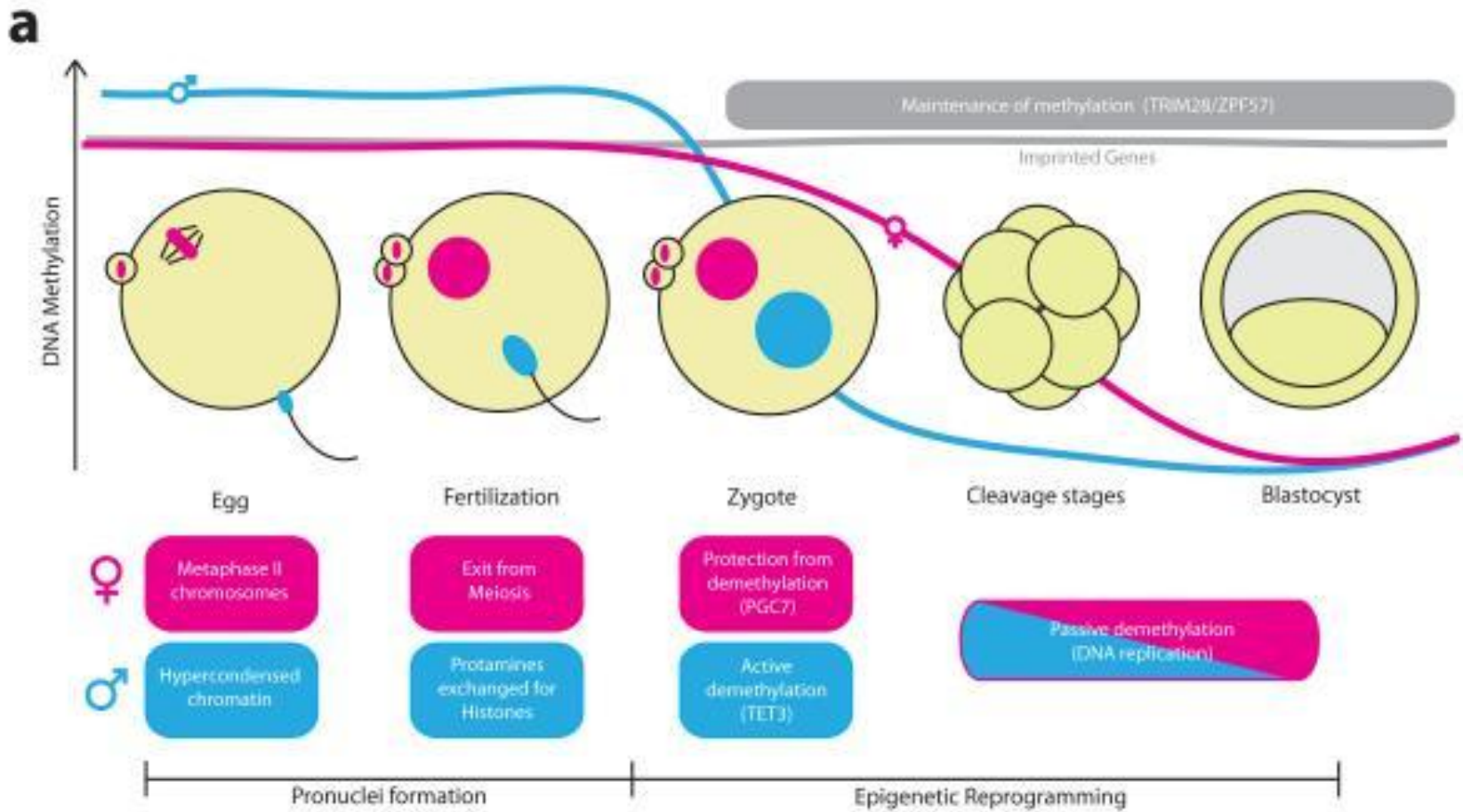


B Mouse



C Zebrafish





Divisioni embrionali, compattazione e blastulazione

Divisioni embrionali

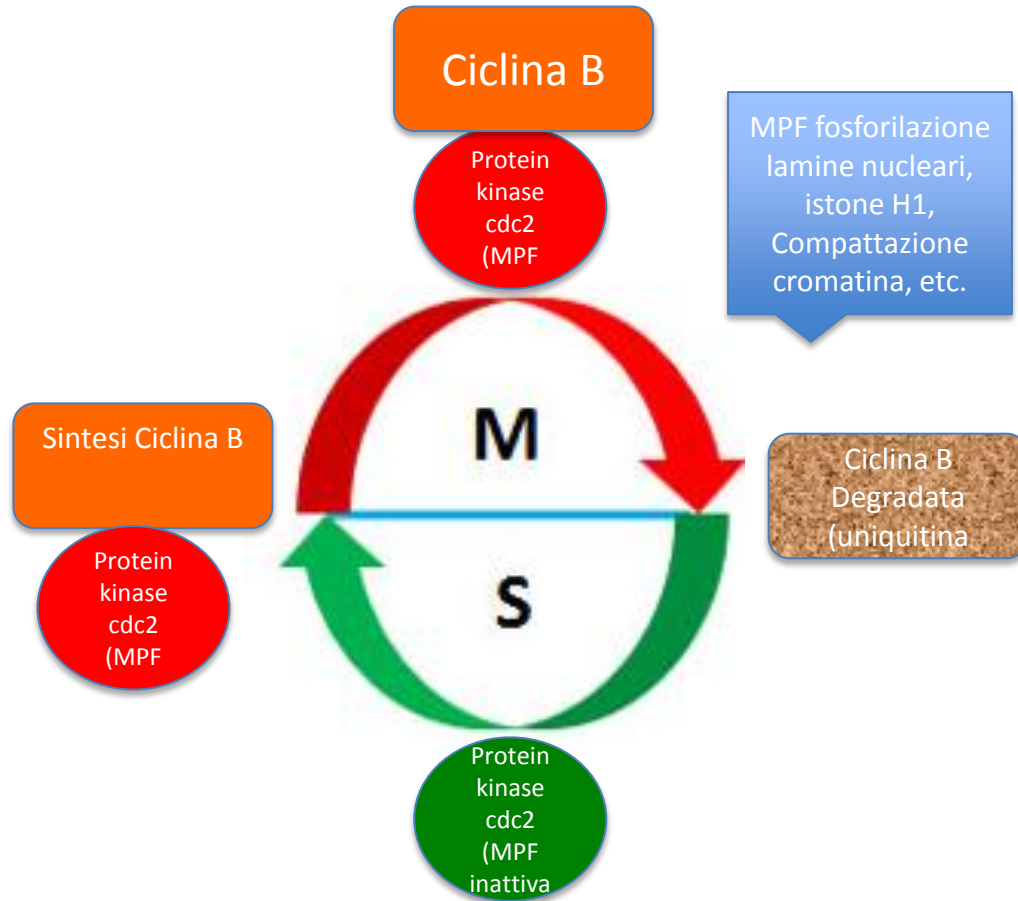
Prime divisione dello zigote “riduzionali”



Divisioni “simmetriche”, non come in meiosi!

Divisioni embrionali

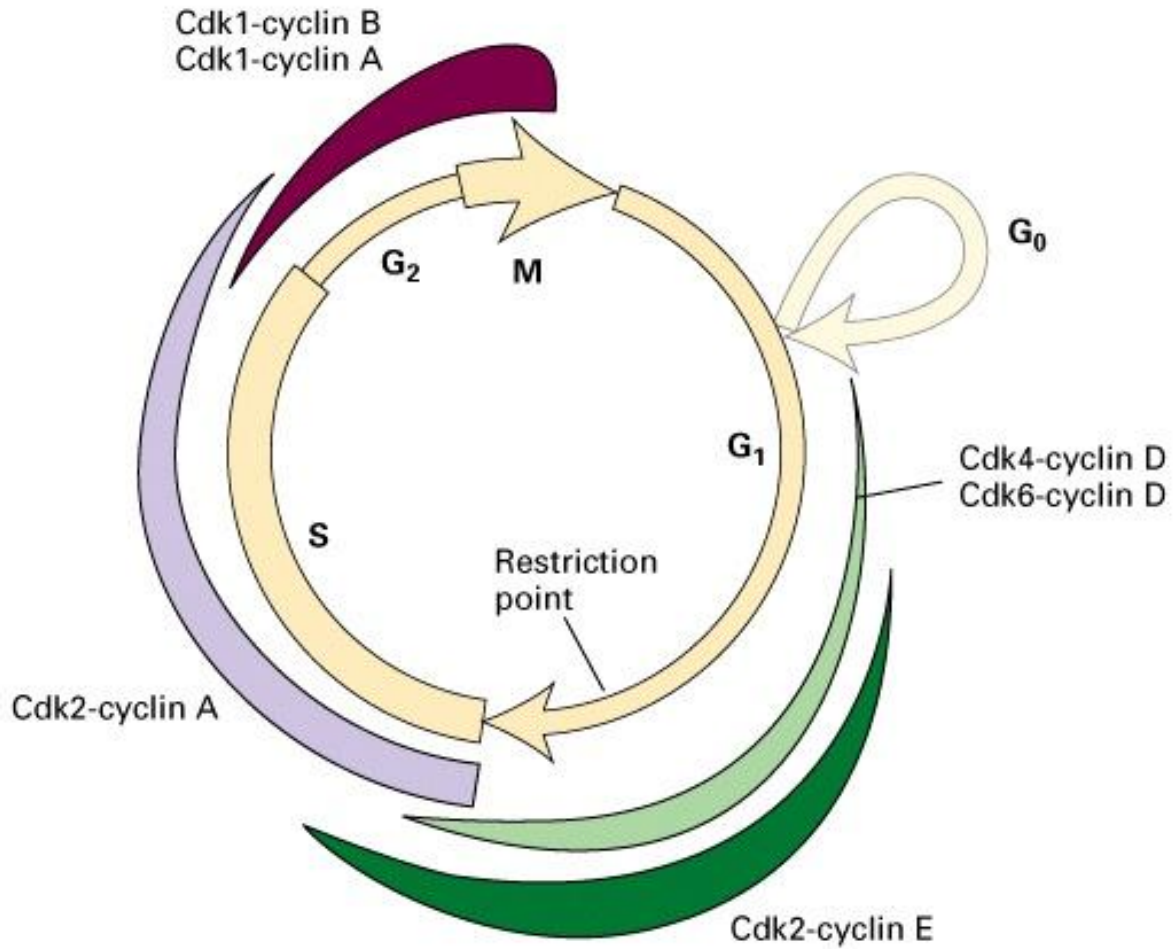
Dinamica del ciclo cellulare embrionale blastomeri



MPF= Maturation Promoting Factor

Dinamica del ciclo cellulare embrionale

Cellule allo stadio di blastocisti





2-cell



4-cell



5-cell



6-cell

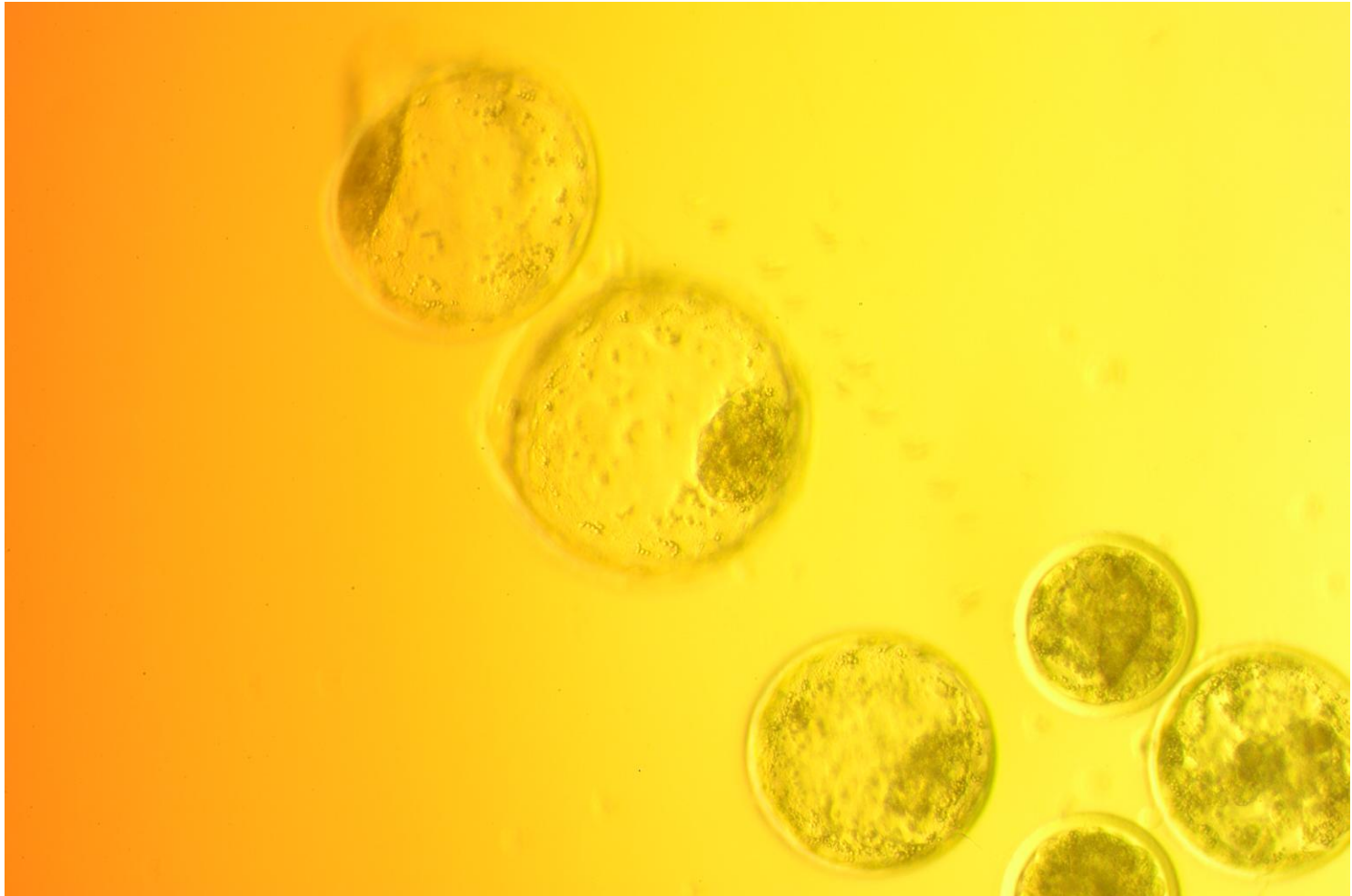


8-cell

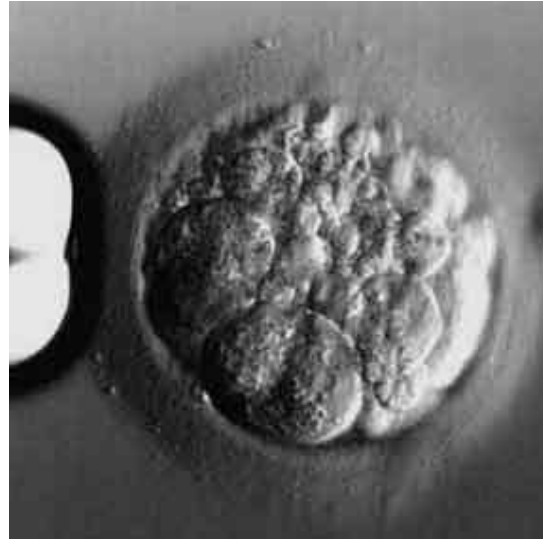
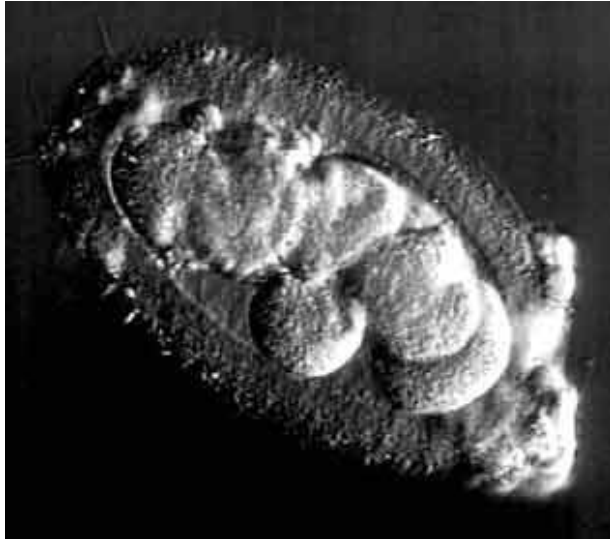


10-cell

Stadio di blastocisti più facile da valutare



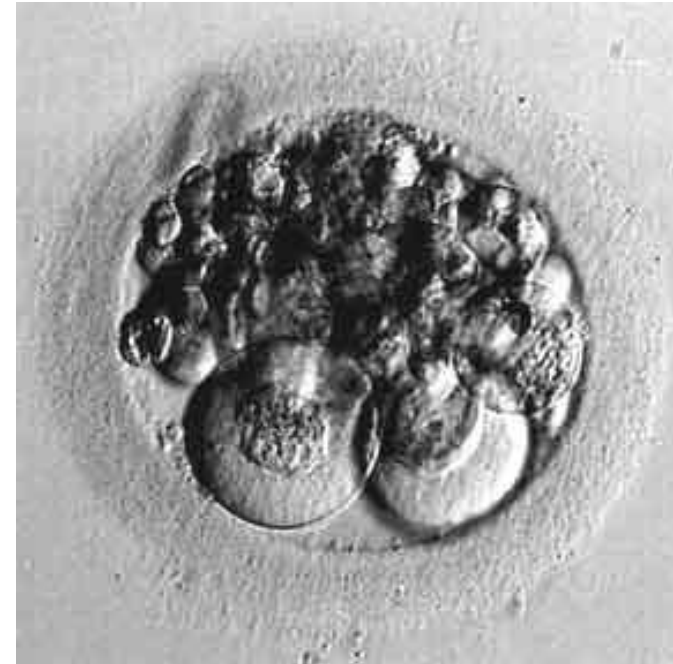
Anomalie della segmentazione embrionale



Frammentazione embrionale
“moderata”



Frammentazione embrionale
“grave”



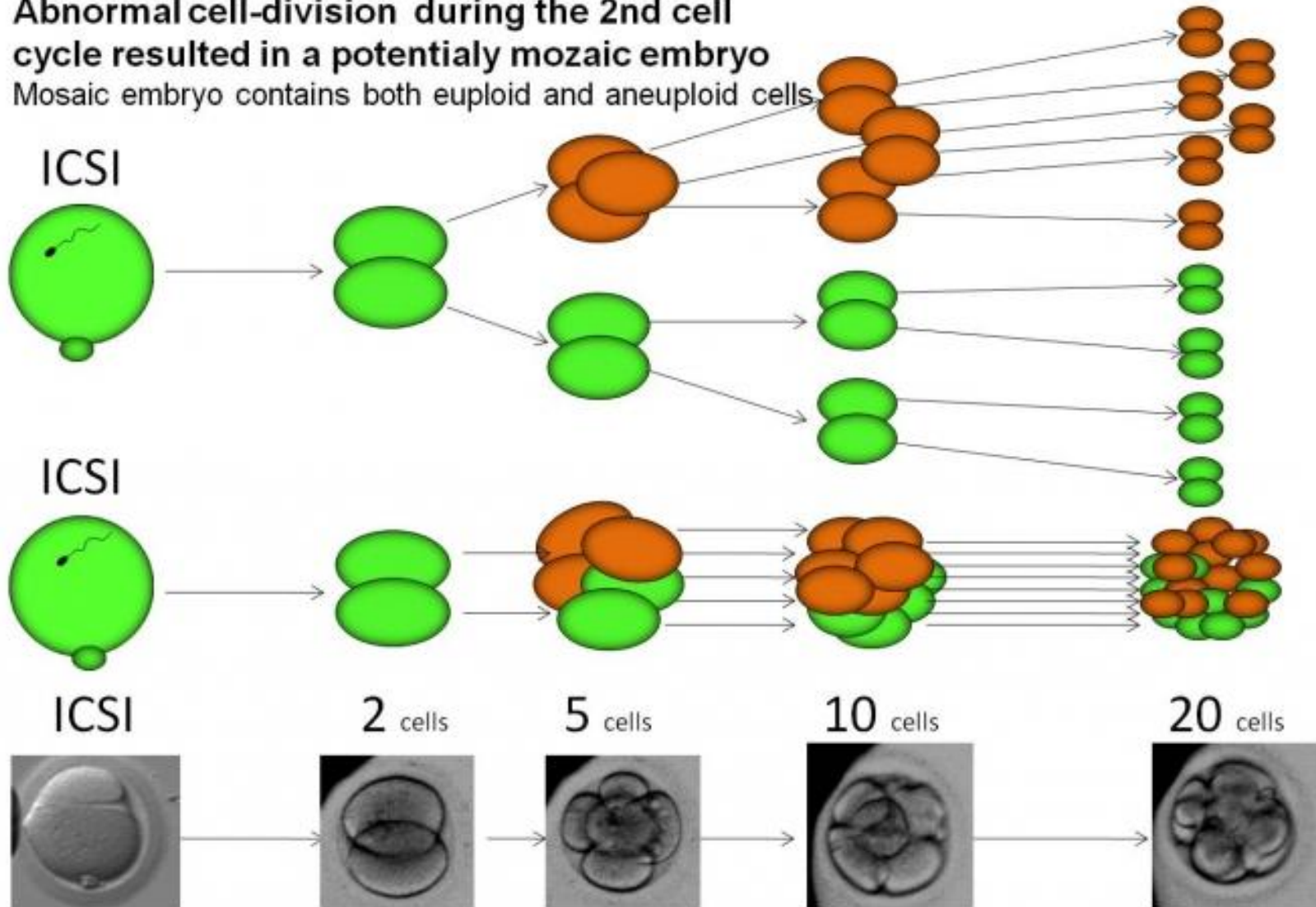
Cause:

- 1) Mancata organizzazione di uno o più pronuclei
- 2) Cattiva qualità oocita
- 3) Disaccoppiamento ciclo cellulare-polimerizzazione actina corticale

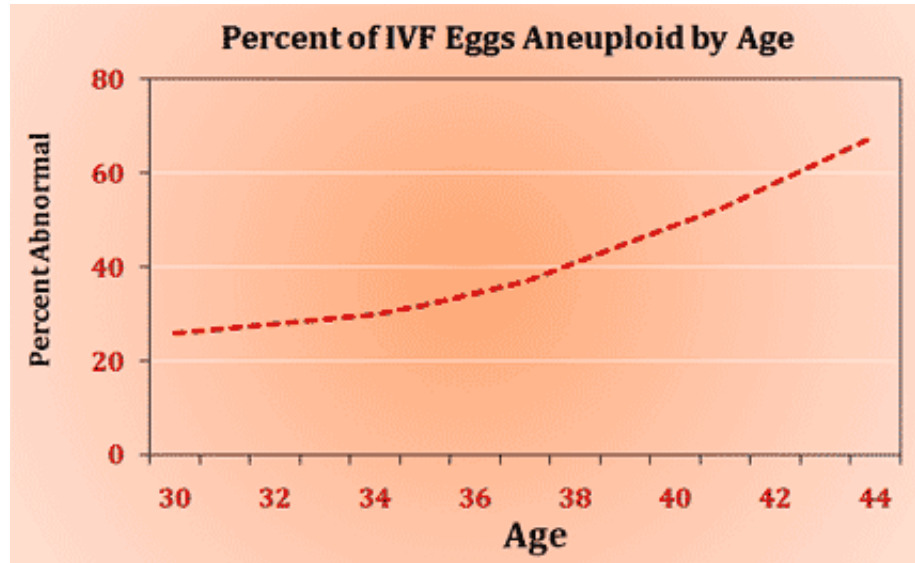
Aneuploida e mixo-ploidia frequenti in embrioni pre-impianto

Abnormal cell-division during the 2nd cell cycle resulted in a potentially mosaic embryo

Mosaic embryo contains both euploid and aneuploid cells



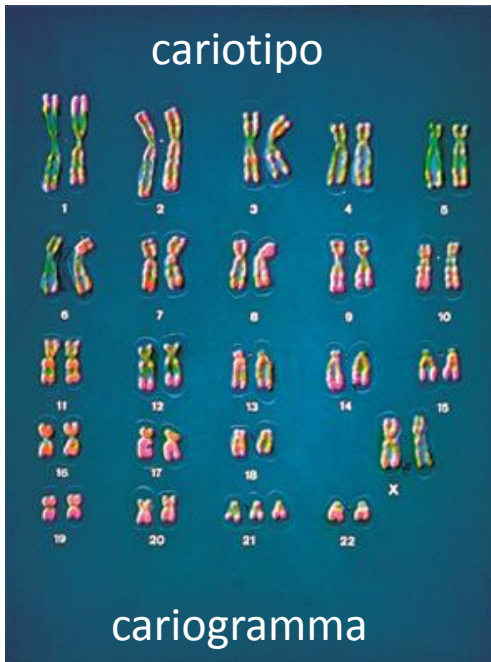
Aneuploidia/mixoploidia problema o norma?



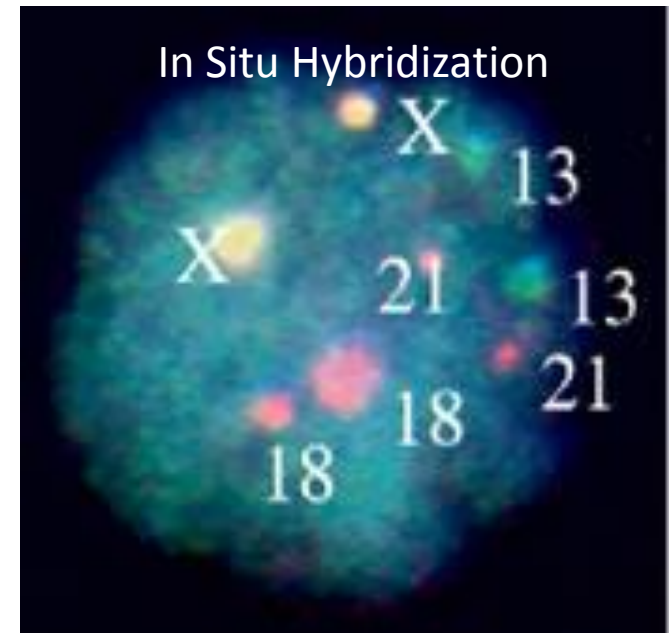
Cause:
Anomalie spindle assembly
Check points

Come si determina?

Biopsia (anche PB) o cellule fatali in sangue materno...comment on th



Ultima frontiera:
Seguenza genoma da
Singole cellule



Aneuploida/mixoploidia problema o norma?

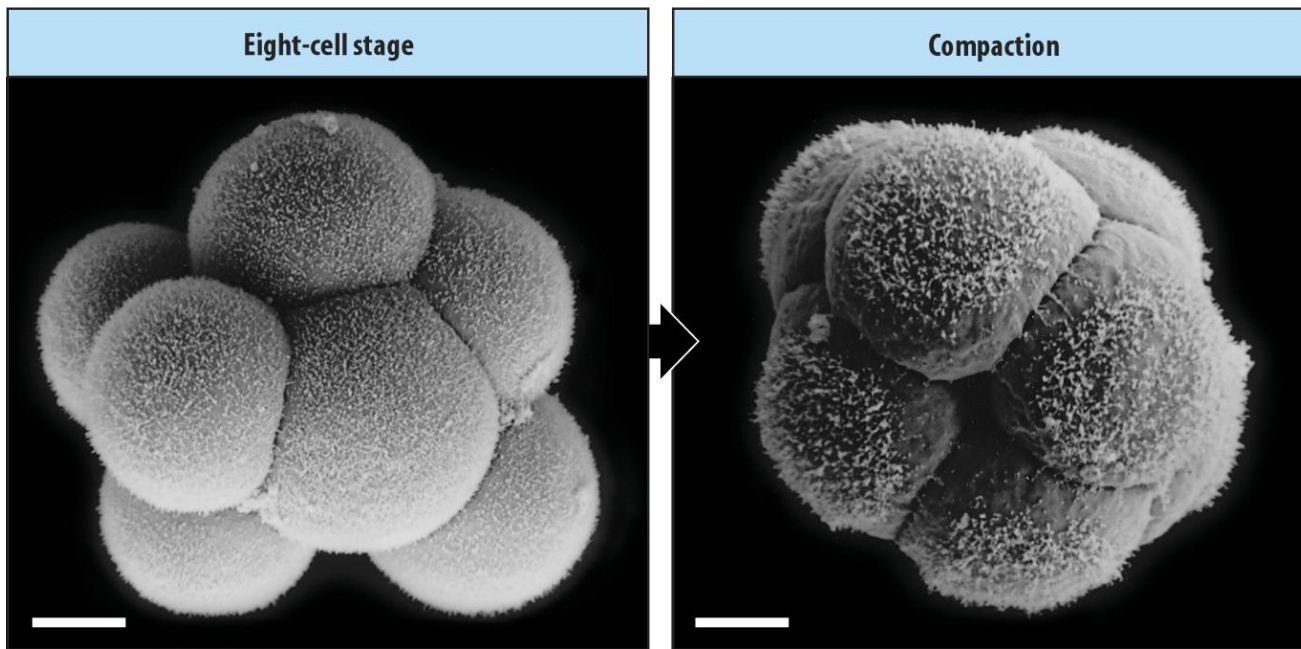
Chromosome instability is common in **human** cleavage-stage embryos.

Vanneste E, **Nat Med**. 2009 May;15(5):577-83.



Compattazione embrionale

Propedeutica alla blastulazione – primo evento differenziativo embrionale



Dovuta a:

Polarizzazione blastomeri

-Espressione e assemblaggio di tight and adherens junctions-
TJ proteins (occludine e claudine ZO-1, ZO-2 and ZO-3)

Espressione e assemblaggio di E-caderine

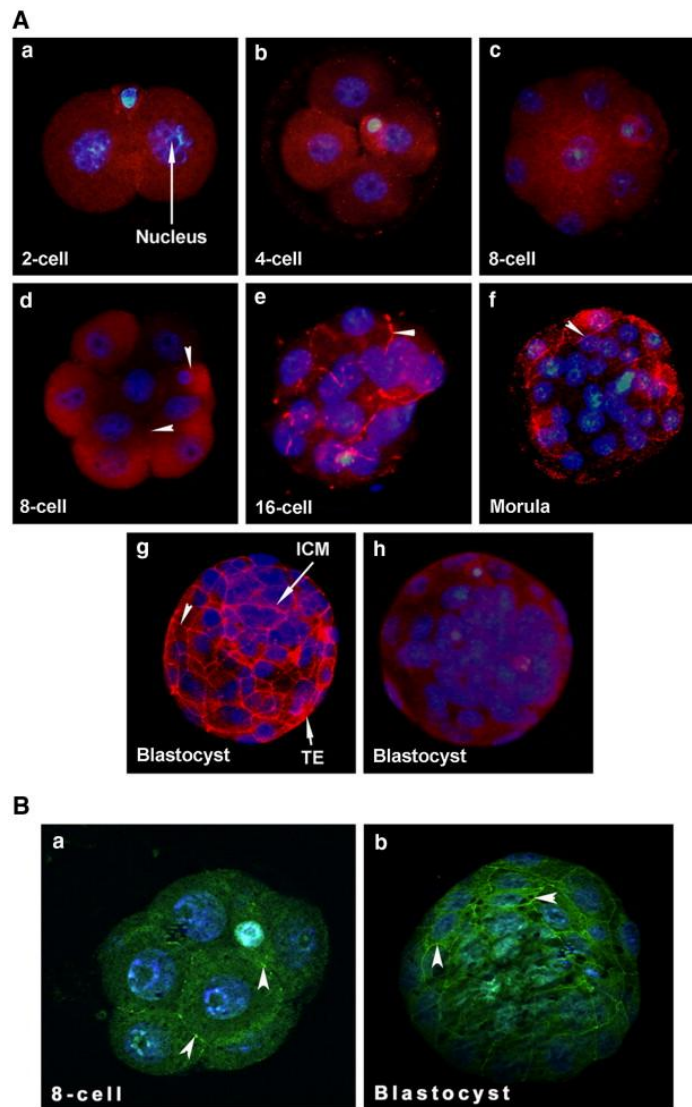


Fig. 1 ZO-1 protein expression is stage-specific in developing mouse embryos freshly collected from the reproductive tracts during preimplantation period of pregnancy. All images (40 \times) are representative of at least three experiments. A) The localization o...

Hehai Wang , Tianbing Ding , Naoko Brown , Yasutoshi Yamamoto , Lawrence S. Prince , Jeff Reese , B.C. Paria

Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse

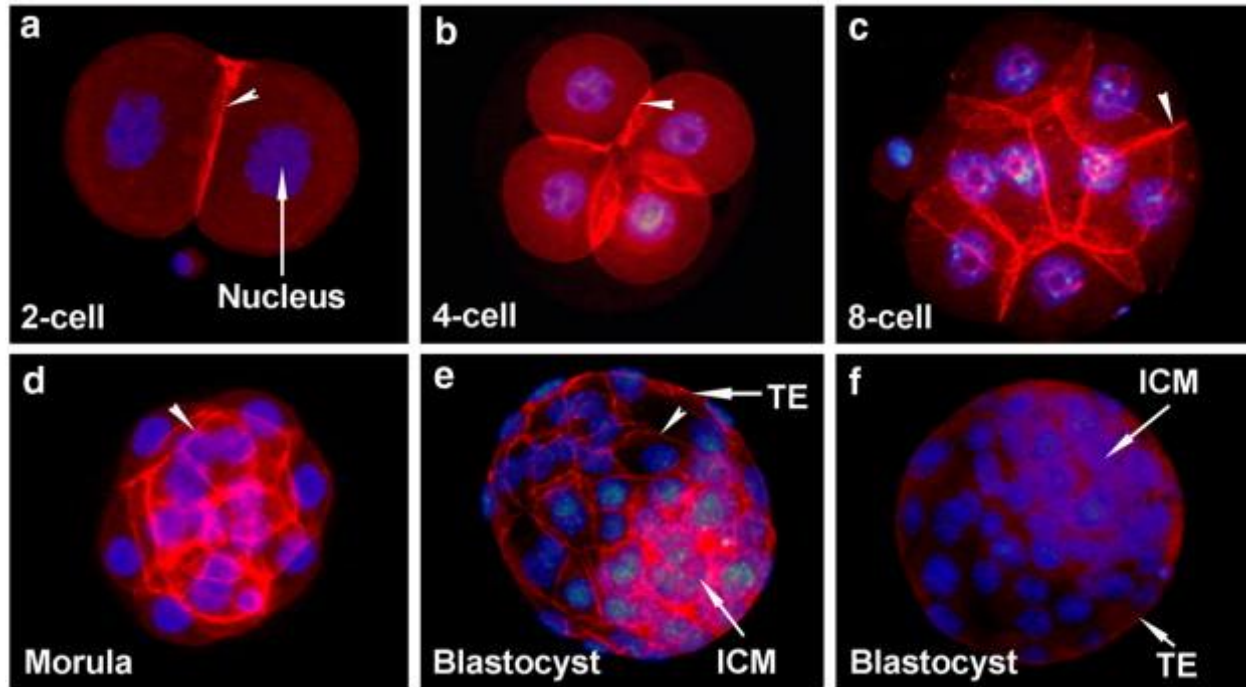


Fig. 2 E-cadherin is localized at cell–cell contact sites in all developing stages of mouse embryos freshly collected from the reproductive tracts during preimplantation period of pregnancy. Membranous localization of this protein (TRITC-labeling) is indic...

Hehai Wang , Tianbing Ding , Naoko Brown , Yasutoshi Yamamoto , Lawrence S. Prince , Jeff Reese , B.C. Paria

Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse

Developmental Biology, Volume 318, Issue 1, 2008, 112 - 125

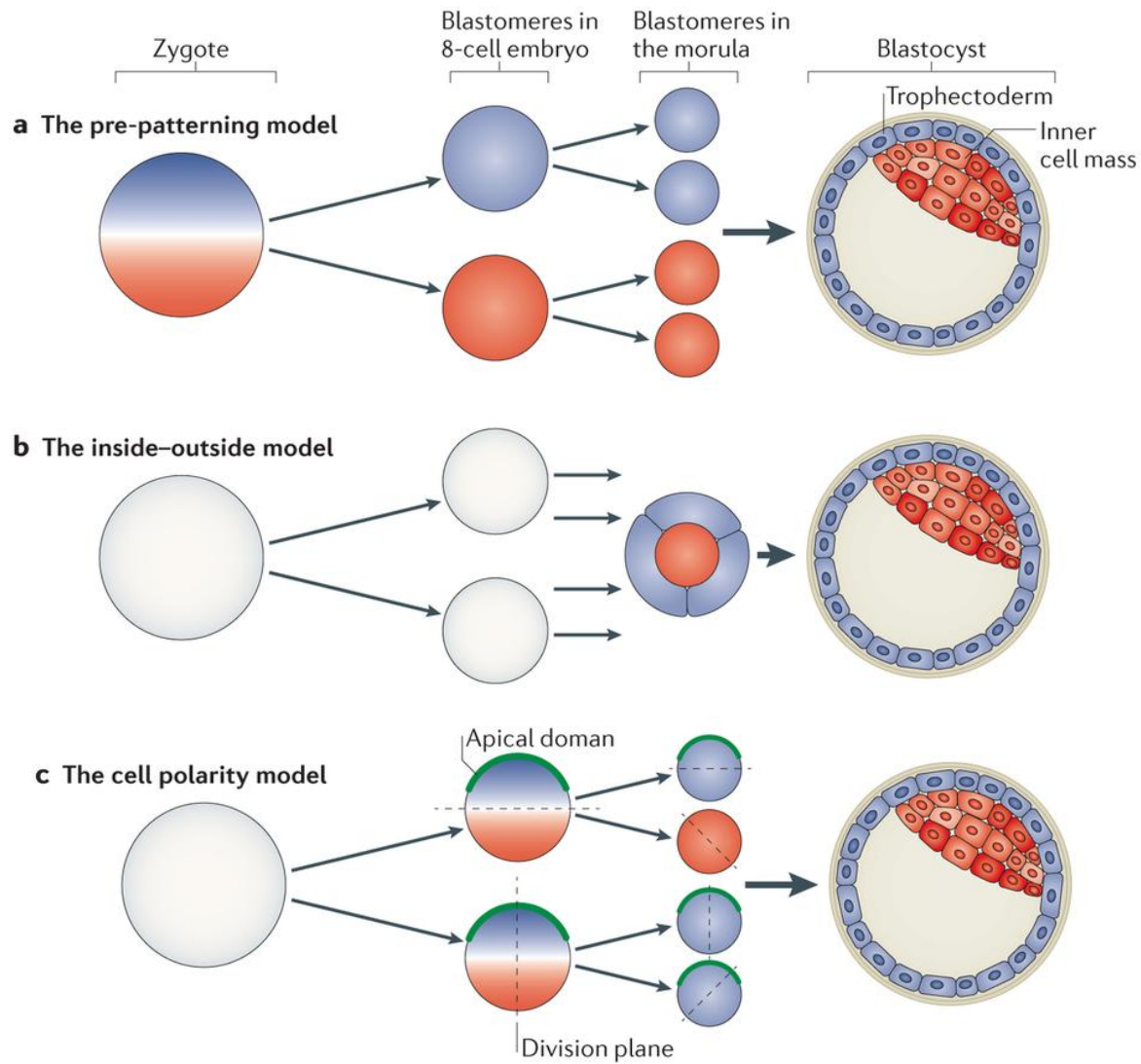
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.008>

Kyoko Iwata, et al., *Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics.

Published 9 March 2014



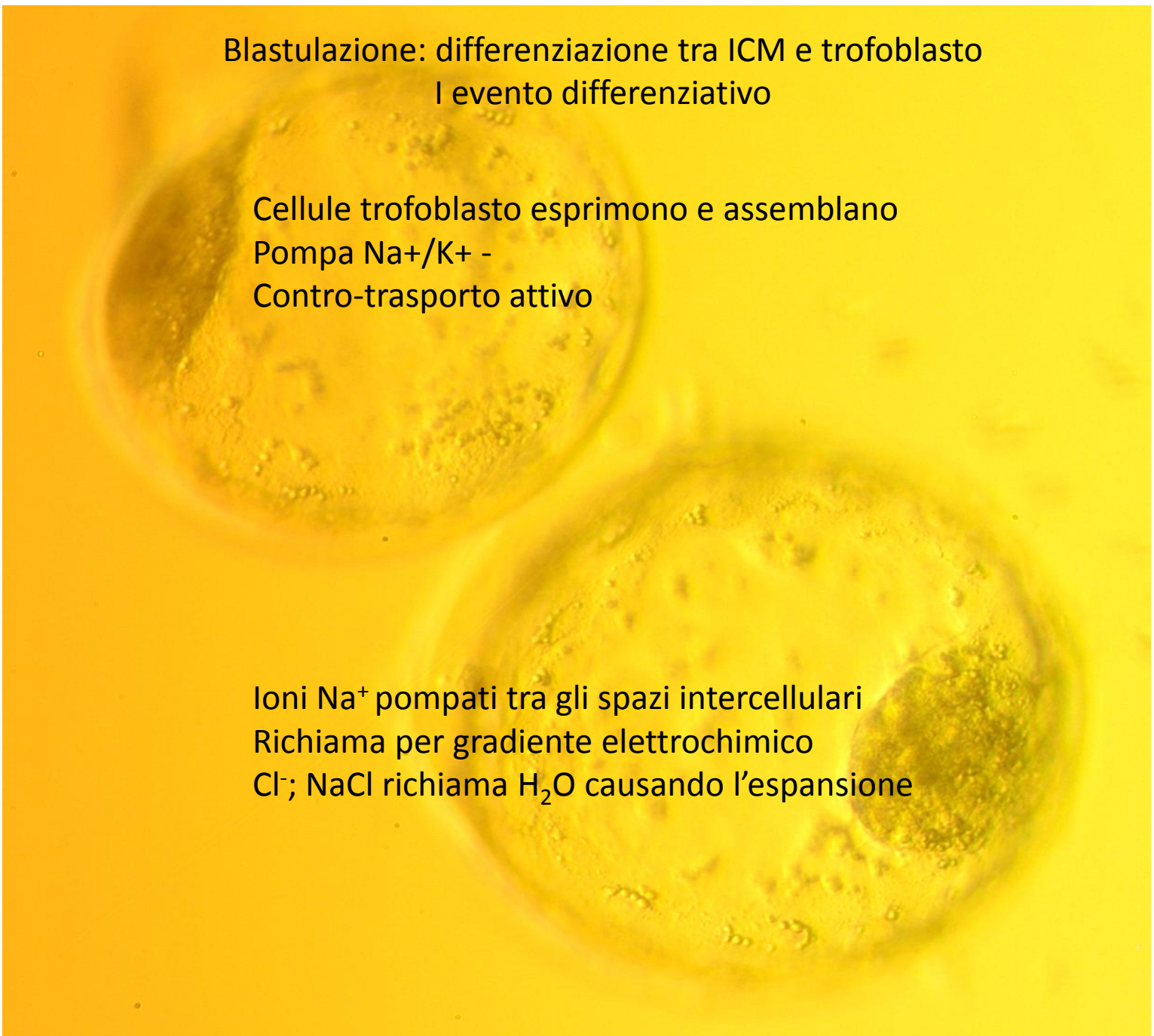
Modelli proposti per la differenziazione tra ICM e trofoblasto



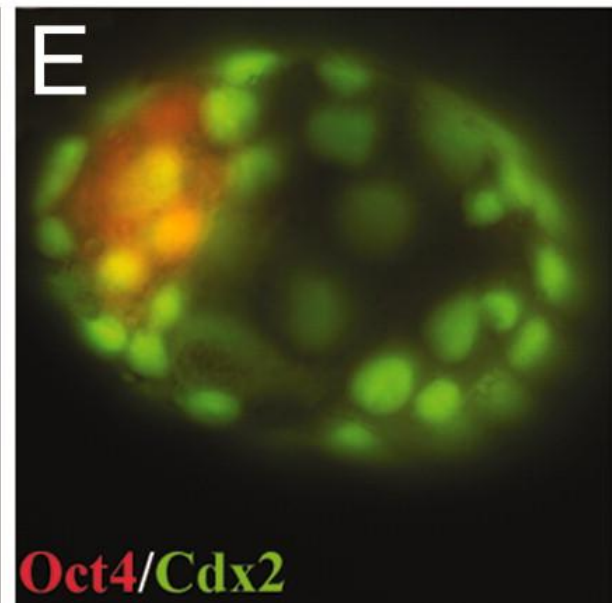
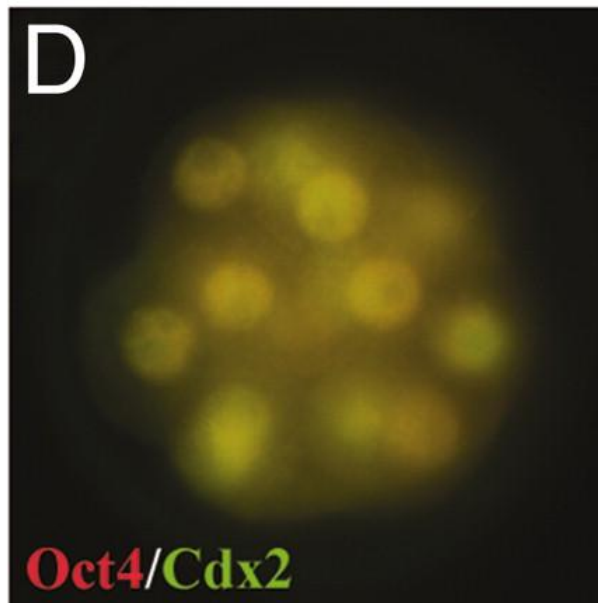
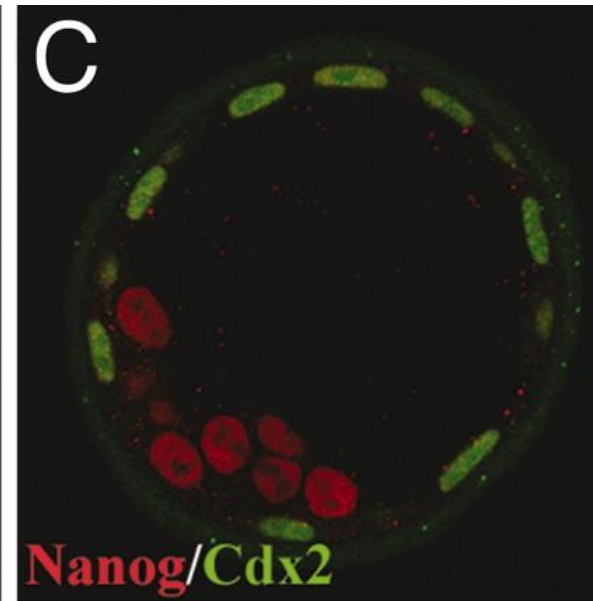
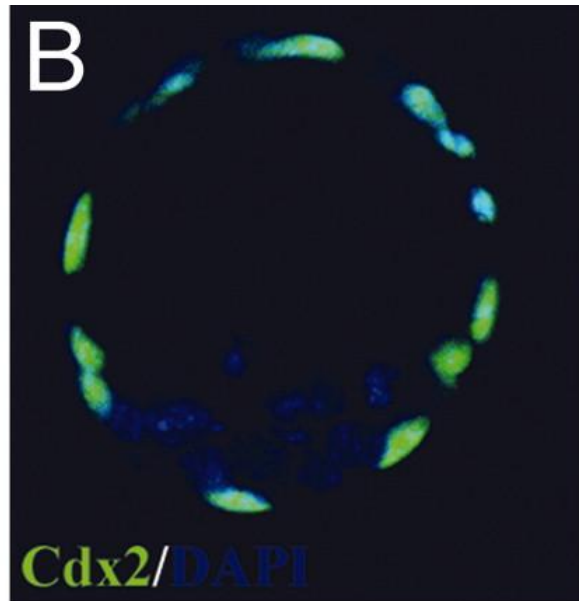
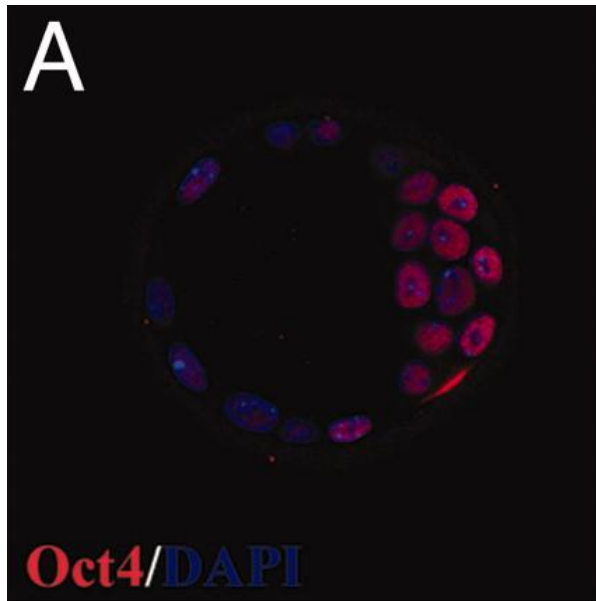
Blastulazione: differenziazione tra ICM e trofoblasto
I evento differenziativo

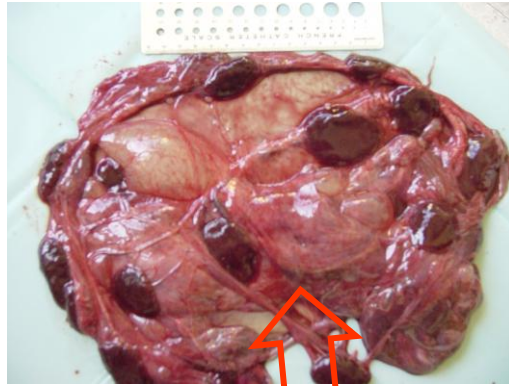
Cellule trofoblasto esprimono e assemblano
Pompa Na^+/K^+ -
Contro-trasporto attivo

Ioni Na^+ pompato tra gli spazi intercellulari
Richiamo per gradiente elettrochimico
 Cl^- ; NaCl richiama H_2O causando l'espansione



Regolazione genica della differenziazione in ICM e trofoblasto





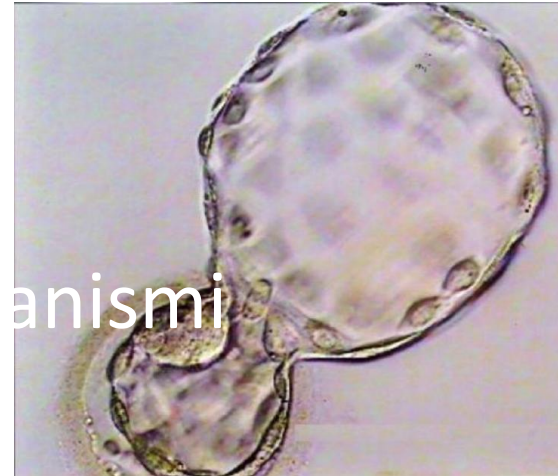
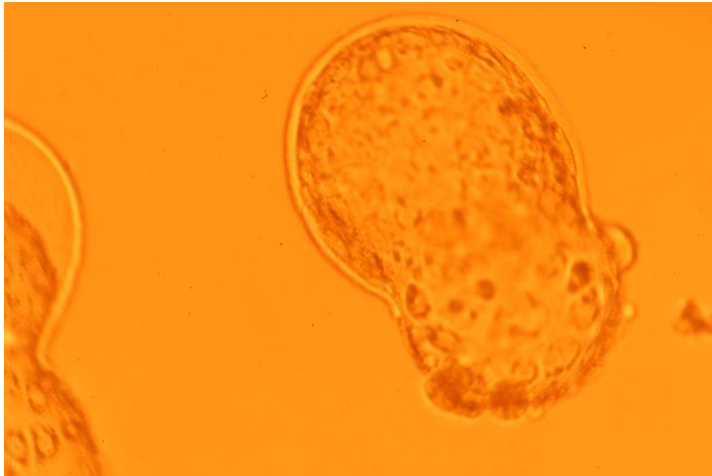
Trofoblasto dà origine
alla placenta
Cellule MULTIPOTENTI



ICM = Inner Cell Mass, o
Bottone embrionario
dà origine al feto
Cellule PRLURIPOTENTI



Schiusa dell'embrione



Schiusa preceduta da attive contrazioni della blastocisti!

Fattori embrionali – proteasi, catepsine,
Aumento di pressione del blastocele

Fattori uterini – LIF (Leukemia Inhibitory Factor);
heparin binding-epidermal growth factor

Fattori ormonali - prostaglandine,
estradiol-17beta legante recettori-alpha
Necrosis Factor kappaB

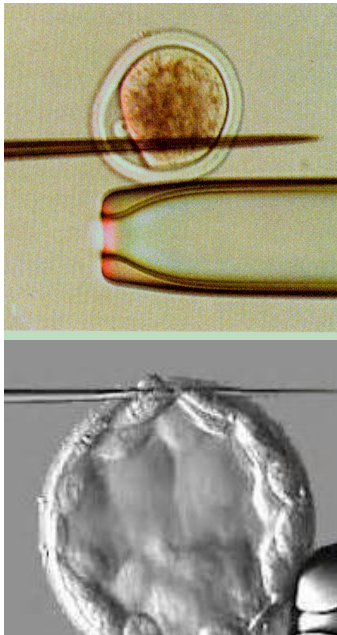
Anomalie della schiusa

Coltura in vitro determina “Zona Hardening”
-prematura liberazione granuli corticali -

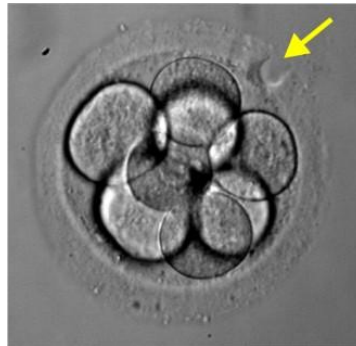
“Zona Hardening” può alterare il processo di schiusa
E quindi mancato impianto

Soluzione: Assisted Hatching

Ago di vetro - classico



Laser-assisted hatching



<http://www.bing.com/videos/search?q=assisted+hatching%2c+acid+tyrode%2c+movie&FORM=HDRSC3#view=detail&mid=FB8512FE3C63DB42732AFB8512FE3C63DB42732A>

Acid tyrode (pH 2.0)



<http://www.bing.com/videos/search?q=assisted+hatching%2c+acid+tyrode%2c+movie&FORM=HDRSC3#view=detail&mid=D43CEB5C5ED03D99F1EED43CEB5C5ED03D99F1EE>