

Dottorato di Ricerca in:

**“RIPRODUZIONE, PRODUZIONE E BENESSERE ANIMALE”
XXI ciclo**

Sede:

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Coordinatore:

PROF. SALVATORE NAITANA

**ANALISI DELL'ESPRESSIONE
GENICA: VALUTAZIONE DELLA
QUALITÀ DELL'OOCITA E
DELL'EMBRIONE PRE-IMPIANTO DI
OVINO SVILUPPATO IN VITRO.**

Docente Guida:

PROF. SERGIO LEDDA

Università degli Studi di Sassari

Tesi di Dottorato del:

DOTT. STEFANO FOIS

INDICE

- INTRODUZIONE.....	1
- Fattori che influenzano lo sviluppo embrionale.....	3
- <i>L'oocita</i>	3
- Acquisizione della competenza allo sviluppo.....	3
- Qualità intrinseca dell'oocita.....	6
- Sede di fertilizzazione.....	8
- Cinetica delle prime divisioni embrionali.....	9
- <i>L'embrione</i>	10
- Condizioni colturali post-fertilizzazione.....	10
- Criteri per la valutazione della qualità dell'oocita.....	13
- Influenza dei fattori citoplasmatici e nucleari sulla transizione materno embrionale.....	16
- Maternal Effect Genes(MEG) e attivazione del genoma embrionale.....	16
- Fattori genetici materni, loro degradazione e controllo sui primi stadi dello sviluppo embrionale.....	18
- Regolazione dell'attività trascrizionale mediante modificazioni epigenetiche del genoma embrionale.....	25
- Azione dei MicroRNA sulla degradazione dell'RNA materno e sull'iniziale sviluppo embrionale.....	28
- Qualità dell'oocita prepubere e differenze con l'adulto.....	32
- SCOPO.....	34
- MATERIALI E METODI.....	34
- Produzione in vitro di embrioni.....	34
- Recupero e maturazione in vitro degli oociti.....	36
- Fertilizzazione in vitro.....	37
- Attivazione partenogenetica.....	38
- Coltura in vitro.....	39

- Valutazione della cinetica di sviluppo embrionale	
- Analisi molecolare	40
- Isolamento degli RNA messaggeri.....	40
- Quantificazione relativa dei trascritti tramite Real Time PCR.....	44
- Analisi Statistica.....	49
- Protocollo sperimentale	50
- <u>Esperimento 1</u> : espressione dei geni ZAR1, MATER, BMP15 e GDF9 in oociti immaturi e maturati in vitro di ovino adulto e prepubere.....	50
- <u>Esperimento 2</u> : espressione di un pannello di geni in oociti immaturi di ovino adulto e prepubere.....	50
- <u>Esperimento 3</u> : espressione dei geni ZAR1, MATER, BMP15 e GDF9 durante lo sviluppo pre-impianto in vitro nell'ovino.....	50
- <u>Esperimento 4</u> : espressione di un pannello di geni in blastocisti di ovino adulto e prepubere.....	51
- <u>Esperimento 5</u> : espressione di un pannello di geni in blastocisti di ovino prepubere prodotte in vitro e in vivo.....	51
- <u>Esperimento 6</u> : espressione di un pannello di geni in blastocisti prodotte tramite fecondazione in vitro e attivazione partenogenetica....	52
- RISULTATI	53
- Maturazione in vitro	53
- Sviluppo embrionale	54
- Cinetica delle prime divisioni embrionali.....	54
- Cinetica di sviluppo allo stadio di blastocisti.....	56
- Analisi molecolare	58
- <u>Esperimento 1</u>	58
- <u>Esperimento 2</u>	60
- <u>Esperimento 3</u>	62
- <u>Esperimento 4</u>	65
- <u>Esperimento 5</u>	68
- <u>Esperimento 6</u>	70
- DISCUSSIONE	73
- CONCLUSIONI	97

- BIBLIOGRAFIA.....102

INTRODUZIONE

L'utilizzo delle tecnologie riproduttive ed in particolare la produzione di embrioni in vitro ha consentito, negli ultimi anni, di ampliare il patrimonio genetico di diverse specie animali e, in medicina umana, di sviluppare nuovi approcci terapeutici per la cura dell'infertilità.

Tuttavia, l'analisi retrospettiva dei risultati evidenzia che, ancora oggi, le potenzialità di sviluppo degli embrioni prodotti a partire da oociti maturati e fertilizzati in vitro sono alquanto limitate se paragonate a quelle fisiologiche. Infatti, se scorriamo i dati forniti dai laboratori che si occupano di riproduzione assistita, osserviamo che all'interno di un batch di oociti recuperati dall'ovaio di diverse specie domestiche più del 90%, dopo una fase di maturazione in vitro, riattiverà il processo meiotico e raggiungerà la metafase II; più del 70% sarà con successo fertilizzato in vitro con la formazione dei due pronuclei; ma, dopo un periodo di coltura, circa metà di questi arriverà allo stadio di blastocisti e soltanto pochi individui saranno prodotti in seguito al trasferimento su riceventi.

Gli elementi critici in grado di interferire sulla produzione in vitro di embrioni sono stati in parte identificati. Infatti se da un lato, numerose ricerche dimostrano come le condizioni colturali possono notevolmente influenzare le potenzialità di sviluppo dello zigote fino allo stadio di blastocisti, altre evidenze sottolineano che la qualità intrinseca dell'oocita è un fattore chiave nel determinare la percentuale di sviluppo embrionale. Diverse esperienze (Rizos et al., 2002b; Rizos et al. 2002c; Rizos et al. 2003) relative alla comparazione di oociti maturati e fertilizzati in vitro e coltivati in vivo o in vitro hanno dimostrato che le condizioni colturali post-fertilizzazione sono maggiormente responsabili nel determinare la qualità della blastocisti, valutata in termini di resistenza alla crioconservazione (Rizos et al. 2002c; Rizos et al. 2003), e dalla quantità di trascritti (Rizos et al. 2002b; 2003), mentre l'origine dell'oocita è il principale fattore che influenza l'efficienza nella

produzione in vitro di embrioni dal punto di vista quantitativo. L'eterogenicità del materiale germinale, l'uso di gameti provenienti da soggetti che non hanno raggiunto la maturità sessuale o da follicoli antrali ad iniziale stadio di accrescimento porta spesso alla produzione di oociti maturi con ridotta potenzialità di sviluppo.

A più livelli si può, pertanto, interferire sull'assetto della cellula uovo incidendo negativamente sulla sua capacità di promuovere lo sviluppo embrionale che, solo se adeguato, può condizionare il mantenimento della gravidanza, coordinare lo sviluppo fetale ed evitare l'insorgere di forme patologiche alla nascita.

FATTORI CHE INFLUENZANO LO SVILUPPO EMBRIONALE

L'OOCITA

Acquisizione della competenza allo sviluppo

Lo sviluppo dell'ocita e del follicolo, nei mammiferi, inizia durante la vita fetale. Le cellule germinali primordiali che daranno origine agli oociti, migrano in quelle che saranno le future gonadi, sottostanno ad un intenso ritmo di replicazione, seguito da un periodo di sintesi di RNA e proteine che trasformano la cellula primordiale in ovogonio e quindi in oocita primario. A questo stadio il nucleo è ancora diploide e, per diventare aploide e costituire un gamete funzionale, deve andare incontro alla meiosi. Gli oociti entrano nella profase della prima divisione meiotica, costituita da diverse fasi transitorie: preleptotene, leptotene, zigotene, pachitene ed infine diplotene, fase in cui si ha un arresto della divisione. Giunti a questo stadio, gli oociti vengono circondati da un singolo strato di 4-8 cellule della pre-granulosa e da una lamina basale intatta, formando il follicolo primordiale "a riposo".

I follicoli primordiali, primari e secondari appaiono nell'ovario fetale al giorno 75, 100 e 120 nella pecora (McNatty et al, 1995). Si pensa che la crescita avvenga in maniera centrifuga partendo dal centro dell'ovario (Byskov et al, 1977). L'attivazione del follicolo primordiale è caratterizzata dalla proliferazione e dalla trasformazione delle piatte cellule della granulosa in cellule cuboidali (Fair et al, 1997). Si pensa che i fattori che stimolano la proliferazione delle cellule della granulosa promuovano l'attivazione del follicolo primordiale.

Gli oociti inclusi nel follicolo primordiale costituiscono una riserva definita di oociti, che rimane in tale fase di riposo sino a che non saranno stimolati a crescere (Erickson, 1966). Solamente con la pubertà, infatti, il follicolo è capace di rispondere agli stimoli ormonali riprendendo la meiosi e rilasciando un oocita capace di essere fecondato.

Alla nascita dell'individuo, quindi, gli oociti di mammifero sono fermi nella profase della prima divisione meiotica (Wassarman e Albertini, 1994), e devono riprendere e completare la meiosi e la maturazione perché la fertilizzazione possa avvenire con successo. L'acquisizione di tale competenza meiotica avviene progressivamente durante la crescita dell'oocita e del follicolo, ed è associata ad una serie di cambiamenti molecolari (Sorensen e Wassarman, 1976; Motlik et al, 1984; Pavlok et al, 1992; Lonergan et al, 1994; Eppig 1996; De Smedt et al, 1995).

La fase finale di maturazione del follicolo è innescata da un aumento del livello ematico dell'ormone luteinizzante (LH), che provoca, durante le successive 24 ore, la progressione dell'oocita dalla profase della prima divisione meiotica alla metafase della seconda (Dieleman et al, 2002). Convenzionalmente, la maturazione dell'oocita si divide in citoplasmica e nucleare: quella citoplasmica si riferisce al processo che prepara l'oocita per l'attivazione, la formazione del pronucleo e lo sviluppo preimpianto, mentre la maturazione nucleare si riferisce all'abilità dell'oocita di progredire con la meiosi. Gli eventi principali che si susseguono a livello nucleare sono la rottura della vescicola germinale, detta GVBD (Germinal Vesicle BreakDown), la condensazione dei cromosomi, la progressione sino alla metafase I (MI), l'estrusione del primo globulo polare e l'arresto alla seconda metafase (MII). Le modificazioni all'interno del citoplasma consistono nell'aumento dell'accumulo di lipidi, la riduzione dell'estensione dell'apparato del Golgi, il riarrangiamento dei mitocondri e l'allineamento dei granuli corticali lungo la membrana plasmatica dell'oocita (De Loos et al, 1991; Hyttel et al, 1986, Hyttel et al, 1997, Kruip et al, 1983). Si osservano anche cambiamenti nell'attività di due enzimi che regolano il ciclo cellulare: il MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) e l'MPF (Maturation-Promoting Factor), lo sviluppo di meccanismi di rilascio di Ca^{2+} e, viene acquisita la capacità di decondensare la cromatina dello spermatozoo dopo la fertilizzazione (Usui e Yanagamachi, 1976; Hyttel et al, 1986; Bornslaeger et al, 1988; Fujiwara et al, 1993). Inoltre si ha l'apparizione di numerosi ribosomi, in particolare vicino ai cromosomi (Hyttel et al, 1997, Kruip et al, 1983).

La maturazione del nucleo e quella dell'ooplasma avvengono in modo sincrono, ed il mancato completamento di tali processi compromette la competenza allo sviluppo degli oociti, dato che forniscono al gamete gli strumenti e le riserve necessari per affrontare la fertilizzazione e il successivo sviluppo embrionale e fetale.

La maggior parte delle biotecnologie in vitro applicate alla riproduzione comincia dalla manipolazione dell'oocita. Quando il complesso cumulo-oocita (COC) è rimosso dall'ambiente follicolare ed è coltivato in vitro, il nucleo, bloccato alla profase della prima divisione, riprende spontaneamente la meiosi (Pincus and Enzmann, 1935), indicando che fattori presenti nel follicolo immaturo sono responsabili del mantenimento dell'oocita nella fase di arresto. Tale ipotesi è stata rafforzata dall'evidenza che le cellule follicolari possono inibire la ripresa meiotica durante la coltura. All'interno del follicolo, l'oocita è collegato fisicamente e metabolicamente alle circostanti cellule follicolari tramite giunzioni gap, che permettono il diretto trasferimento di messaggeri dalle cellule somatiche del follicolo all'oocita (Anderson e Alberini, 1976). Quando un COC viene rimosso meccanicamente dal suo follicolo, le giunzioni funzionali tra il COC e il follicolo si rompono, isolando l'oocita dall'influenza delle cellule della granulosa. Diversi studi hanno dimostrato che il contatto tra le cellule della granulosa e quelle del cumulo ooforo permette il mantenimento dell'arresto meiotico in vitro degli oociti di bovino (Carbonneau and Sirard, 1994; De Loos et al, 1994; Richard and Sirard 1996 a e b; Van Tol et al, 1996) e di suino (Motlik et al, 1991).

Qualità intrinseca dell'oocita

La maggiore competenza di sviluppo dell'oocita maturato in vivo rispetto a quello maturato in vitro è stata ampiamente descritta in diverse specie animali (van de Leemput et al, 1999; Rizos et al, 2002). Infatti, oltre a dare origine a percentuali di maturazione, fertilizzazione e produzione embrionale minori, gli oociti maturati in vitro spesso generano individui con problemi di salute.

Una differente competenza degli oociti è stata anche riportata in relazione alle dimensioni follicolari (Pavlok et al. 1992; Lonergan et al. 1994). Modificazioni delle condizioni di maturazione in vitro solo in parte riescono ad incrementare lo sviluppo embrionale in vitro. Alcuni Autori hanno indotto un arresto meiotico reversibile dell'oocita per differenti periodi nel tentativo di aumentare la loro competenza allo sviluppo embrionale (Kubelka et al. 2000; Lonergan et al. 2000a; Sirard 2001). Altre esperienze riportano come modificazioni del microambiente follicolare prima del recupero dell'oocita mediante stimolazione ormonale e l'intervallo di tempo tra il recupero delle ovaie e l'aspirazione degli oociti possano influenzare significativamente lo sviluppo embrionale. Tali risultati nel complesso sostengono fortemente l'evidenza dell'importanza dell'origine dell'oocita e della sua qualità nel determinare l'efficienza finale dello sviluppo embrionale.

Com'è noto le riserve di mRNAs e proteine accumulati durante la crescita dell'oocita contribuiscono alla regolazione delle prime fasi dell'embriogenesi fino al momento dell'attivazione del genoma embrionario (Memili and First, 1999). La competenza allo sviluppo degli oociti può quindi essere considerata una funzione della presenza o dell'abbondanza di specifici mRNA, dato che le prime fasi dell'embriogenesi sono regolate da RNA e proteine presenti nell'oocita (Bachvarova, 1985). Anche la morfologia associata con maggiore competenza alla meiosi e allo sviluppo potrebbe essere correlata con una maggiore abbondanza di determinati RNA messaggeri (De Sousa et al, 1998). Inoltre, dato che l'attivazione del genoma embrionario è mediata da proteine di origine materna (Schultz, 1993), la presenza e abbondanza di alcuni trascritti nell'oocita potrebbe influenzare tale evento e, al tempo stesso, la sintesi di mRNA dopo l'attivazione del genoma embrionario.

Molteplici evidenze riferiscono come le condizioni colturali possono alterare i livelli di trascritti dell'embrione, mentre minori risultati sono riportati riguardo l'influenza dell'ambiente follicolare e delle condizioni di maturazione in vitro sulla quantità di trascritti dell'oocita. Alcune esperienze (Lonergan et al. 2003) hanno comparato la quantità relativa di differenti geni in oociti maturati in

vivo ed in vitro sottolineando profonde differenze. Tuttavia con l'eccezione di geni associati con la follicologenesi, come il CSF-1, la connessina 37 e GDF-9, le conoscenze su quali mRNA conferiscano competenza allo sviluppo agli oociti sono ancora limitate (Lonergan et al, 2003b).

Sede di fertilizzazione

Ulteriori risultati che supportano la relazione tra qualità intrinseca dell'oocita e competenza allo sviluppo derivano da esperimenti mirati alla comparazione delle percentuali di sviluppo embrionale di zigoti prodotti in vivo e successivamente coltivati in vitro e zigoti prodotti mediante maturazione e fertilizzazione in vitro (Rizos et al. 2002c , McCaffrey et al. 1991). Tali prove hanno dimostrato come non siano presenti significative differenze nello sviluppo embrionale dopo coltura in vivo o in vitro di zigoti prodotti mediante maturazione e fertilizzazione in vitro. Al contrario gli zigoti prodotti in vivo mostrano un maggior sviluppo fino allo stadio di blastocisti, confermando la migliore competenza di sviluppo embrionale. Le differenti condizioni di maturazione dell'oocita in vivo rispetto a quello in vitro sicuramente hanno inciso sullo sviluppo embrionale. Tuttavia alcune evidenze supportano l'ipotesi che, oltre alle condizioni di maturazione, anche la sede di fertilizzazione (in vivo vs in vitro) potrebbe assumere un ruolo importante nel determinare la competenza allo sviluppo embrionale. E' stato, infatti, dimostrato che un più elevato numero di oociti maturati in vivo sviluppa fino allo stadio di blastocisti dopo fertilizzazione in vivo rispetto alla fertilizzazione in vitro seppure nelle medesime condizioni colturali (Rizos et al. 2002c).

Cinetica delle prime divisioni embrionali

Un diretta correlazione tra il tempo della prima divisione dopo fertilizzazione in vitro e la competenza allo sviluppo embrionale è stata osservata in numerose specie animali (Dinnyes et al. 1999; Lonergan et al. 1999).

E' stato descritto che il tempo in cui si verifica la prima divisione embrionale è relazionabile allo stato di poliadenilazione dei trascritti di importanti geni coinvolti nello sviluppo embrionale

(Brevini-Gandolfi et al. 2002) e che esiste una differenza nell'espressione genica tra gli embrioni che si dividono precocemente rispetto a quelli più tardivi (Lonergan et al. 2000b; Fair et al. 2002).

I fattori coinvolti nel controllo del tempo della prima divisione embrionale non sono ancora pienamente conosciuti. Sebbene le condizioni colturali possono influenzare la cinetica della prima divisione, sicuramente i principali fattori che regolano tale parametro sono inerenti all'oocita (Lonergan et al. 1999; Lonergan et al. 2000b; Brevini-Gandolfi et al. 2002 e allo spermatozoo (Eid and Parrish 1995; Comizzoli et al. 2000; Ward et al. 2001).

Nel topo è stato identificato un gene (Ped) responsabile del controllo delle percentuali delle prime divisioni embrionali e la successiva sopravvivenza dell'embrione (Warner et al. 1998).

L'EMBRIONE

Condizioni colturali post-fertilizzazione

Numerose sperimentazioni indirizzate alla comparazione degli embrioni prodotti in vitro ed in vivo indicano profonde differenze dal punto di vista qualitativo. Infatti, rispetto agli embrioni ottenuti in vivo, le blastocisti prodotte mediante maturazione, fertilizzazione e coltura in vitro appaiono morfologicamente più scure in relazione al più elevato contenuto lipidico (Pollard and Leibo 1994), possiedono una zona pellucida più fragile (Duby et al. 1997), differenze ultrastrutturali (Crosier et al. 2000; Crosier et al. 2001; Fair et al. 2001; Crosier et al. 2002; Rizos et al. 2002a) e metaboliche (Khurana and Niemann 2000; Thompson 2000) e una più elevata incidenza di anomalie cromosomiche (Viuff et al. 1999; Slimane et al. 2000).

La coltura in vivo di zigoti bovini prodotti in vitro determina un incremento della qualità delle blastocisti (Galli and Lazzari 1996; Enright et al. 2000; Rizos et al. 2002c), mentre la coltura in vitro di zigoti prodotti in vivo influenza negativamente la qualità embrionale (Rizos et al. 2002c). Tali risultati sostengono fortemente l'importanza delle condizioni colturali post fertilizzazione sulla qualità delle blastocisti.

A conferma di tale relazione le sperimentazioni di Knijn et al. (2002) finalizzate alla comparazione dell'espressione genica tra embrioni bovini derivati da oociti maturati in vivo ed in vitro non hanno riferito significative differenze nella quantità di specifici trascritti delle blastocisti.

In ultima analisi, nonostante la differente competenza allo sviluppo embrionale degli oociti maturati in vivo ed in vitro, la qualità delle blastocisti prodotte nelle stesse condizioni colturali non risulta modificata.

Le condizioni colturali post-fertilizzazione determinano dei drammatici cambiamenti nei patterns di espressione genica e importanti implicazioni sullo sviluppo degli embrioni ottenuti. Le

modificazioni si riscontrano non solo confrontando blastocisti prodotte in vivo ed in vitro, ma anche comparando gli embrioni ottenuti con l'uso di differenti mezzi culturali (Eckert and Niemann 1998; Wrenzycki et al. 1999, Doherty et al. 2000; Wrenzycki et al. 2000; Lee et al. 2001; Lequarre et al. 2001, Minami et al. 2001; Wrenzycki et al. 2001, Rief et al. 2002; Rizos et al. 2002b; Rizos et al. 2003). In un lavoro condotto da Rizos et al. (2002b) sono stati esaminati 6 geni implicati nell'apoptosi cellulare, negli stress ossidativi, nelle gap junction, e nella formazione e differenziazione delle blastocisti derivate da coltura post-fertilizzazione in vivo od in vitro. I risultati hanno mostrato che differenti condizioni colturali possono indurre alterazioni nei pattern di espressione genica. Alcuni geni risultano maggiormente espressi negli embrioni ottenuti in vitro, come il gene preapoptotico BAX, altri invece presentano una ridotta espressione come il gene Cx43.

Diversi lavori hanno evidenziato come la presenza di siero nel mezzo di coltura determini dei cambiamenti a livello dell'espressione genica negli embrioni (Rizos et al. 2003). Tali alterazioni si riflettono sulla capacità di sviluppo in vitro e sono associate con una minor resistenza alla crioconservazione, una minor percentuale di gravidanze e nascita di soggetti con anomalo peso e dimensione.

L'esistenza di queste anomalie dimostra che la manipolazione dei medium di coltura determina delle modificazioni fetali, placentali e peri- e post-natali negli animali da reddito (Mc Evoy et al. 1998; Sinclair et al. 1999; 2000; van Wagtenonk-de Leeuw et al. 2000; Bertolini et al. 2002; Crosier et al. 2002). Embrioni sviluppati in vitro o in mezzi di coltura contenenti siero presentano un aumento del numero cellulare al 7° giorno, una maggior grandezza della blastocisti al 12° giorno e un aumento di trascritti per alcuni geni, quali HSP70, Cu/Zn-SOD, Glut-4, bFGF e IGFI-R.. Osservazioni compiute da Negrini (1997) hanno mostrato che la coltura in vitro per i primi due giorni con siero non influenza in modo significativo l'espressione genica, a condizione che il successivo sviluppo si svolga in vivo. Lavori più recenti compiuti da Lonergan et al. hanno invece

riportato differenze relative ad alcuni geni analizzati, quali BAX, SOX, Cx43 già a livello di prima divisione embrionale in vitro.

CRITERI PER LA VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DELL'OOCITA

Molteplici sono i criteri di selezione che i diversi ricercatori hanno cercato di identificare per caratterizzare la qualità dell'oocita in modo da incrementare la sua competenza di sviluppo embrionale (Tabella 1).

Criteri di selezione basati sulla morfologia delle cellule del cumulo che circondano l'oocita, del globulo polare e del fuso meiotico, le dimensioni dell'oocita, le caratteristiche del citoplasma sono tutti parametri che in parte contribuiscono alla selezione della componente di oociti più idonea alla maturazione in vitro dopo il loro prelievo dalle ovaie.

Un ulteriore approccio per la determinazione della qualità dell'oocita include la valutazione di ulteriori parametri intrinseci ed estrinseci del gamete femminile.

La valutazione dell'attività e la distribuzione dei mitocondri nell'oocita può fornire un valido marker di selezione. Diversi lavori hanno, infatti, messo in evidenza come un'alterata distribuzione o stato funzionale dei mitocondri, possa essere relazionabile con una deficiente maturazione citoplasmatica (Bavister and Squirrell 2000; Sun et al. 2001).

Nell'ambito degli indicatori estrinseci impiegati come markers di qualità la quantificazione delle concentrazioni nel liquido follicolare di due fattori di crescita quali l'Insulin Growth Factor I (IGFI) e il transforming growth factor β (TGF β) è stata proposta come marker di selezione degli oociti (Kawano et al. 1997; Jimena et al. 1992; Artini et al. 1994, Oosterhuis et al. 1998).

Anche il dosaggio delle concentrazioni di alcuni ormoni steroidei come l'estradiolo, il progesterone, la prolattina può fornire utili indicazioni sulla qualità intrinseca della cellula germinale femminile (Chiu et al. 2002, Wunder et al. 2005b, Wise et al 1987; Wiswedel et al. 1988).

Recentemente alcuni ricercatori hanno indicato come ulteriori parametri selettivi la determinazione del livello di stress ossidativo dell'oocita mediante quantificazione del 8-hydroxy-2deoxyguanosine (8-OHdG) nelle cellule della granulosa, dei livelli di ossido nitrico e ROS nel liquido follicolare (Seine et al. 2002; Lee et al. 2004).

Una valida alternativa per valutare la qualità del gamete femminile potrebbe consistere nell'analisi dei patterns di espressione genica degli oociti e degli embrioni durante le varie tappe di sviluppo embrionale.

L'analisi dell'espressione genica, sia qualitativa che quantitativa, è quindi una parte importante degli strumenti che danno una visione di ampio spettro sulla qualità degli oociti e degli embrioni. Sono state introdotte con successo diverse strategie per studiare aspetti qualitativi e quantitativi della trascrizione. Tra i metodi applicati, la Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) semiquantitativa è l'approccio usato più frequentemente per analizzare l'abbondanza relativa dei trascritti di campioni quantitativamente ridotti, come gli oociti e gli embrioni ai primi stadi (Wrenzicky et al, 1998). Per la determinazione dell'abbondanza relativa si effettua il confronto quantitativo tra trascritti di diverse classi di campioni per rilevare eventuali differenze.

Tabella 1. Sintesi dei potenziali indicatori della qualità dell'ocita.

BCB, Brylliant cresyl blu; CL, corpo luteo; COC, complesso cumulo-ocita; DF, follicolo dominante; FF, fluido follicolare; G6PDH, glucosio-6-fosfato deidrogenasi; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, IGF-binding protein; LH, ormone luteinizzante; 8-OHdG, 8-idrossi-2'-deossiguanosina; TGF- β , transforming growth factor- β ; ROS, specie reattive all'ossigeno.

Classificazione	Parametri	Referenze
Indicatori morfologici		
COC	Compattezza e spessore del cumulo; trasparenza dell'ooplasma	Blondin and Sirard 1995; Warriach and Chohan 2004; Nagano <i>et al.</i> 2006
Ooplasma	Granularità; colorazione; inclusioni; clustering degli organelli	Serhal <i>et al.</i> 1997; Balaban <i>et al.</i> 1998; Kahraman <i>et al.</i> 2000
Globulo polare	Forma (rotunda o ovoidale); dimensioni; superficie (liscia o meno);	Ebner <i>et al.</i> 2000; Ciotti <i>et al.</i> 2004
Zona pellucida	Spessore e organizzazione	Gabrielsen <i>et al.</i> 2001
Spazio perivitellino	Dimensioni; Presenza o assenza di particelle	De Sutter <i>et al.</i> 1996; Hassan-Ali <i>et al.</i> 1998
Fuso meiotico	Presenza, localizzazione e lunghezza	Wang <i>et al.</i> 2001a, 2001b; Moon <i>et al.</i> 2003; Rienzi <i>et al.</i> 2003
Follicolo/Ovaio	Dimesioni follicolari; esistenza del CL con un DF o una cisti.	Pavlok <i>et al.</i> 1992; Varisenga <i>et al.</i> 1998; Vassena <i>et al.</i> 2003
Indicatori molecolari/cellulari		
Mitochondri	Distribuzione mitocondriale, ATP e livelli di mtDNA	Stojkovic <i>et al.</i> 2001; Au <i>et al.</i> 2005; Santos <i>et al.</i> 2006
G6PDH	Attività della G6PDH (BCB+ o BCB-)	Pujol <i>et al.</i> 2004; Alm <i>et al.</i> 2005
Calcio	Passaggio di calcio attraverso la membrane plasmatica nell'ocita immaturo Riserve di calcio nell'ocita maturo	Boni <i>et al.</i> 2002
PDE3	Attività intracellulare della fosfodiesterasi 3	Nogueira <i>et al.</i> 2005, 2006
GSH	Livelli intracellulari del glutathionel	De Matos <i>et al.</i> 2002; Wang and Day 2002
Apoptosi	Apoptosi nelle cellule della granulosa o del cumulo. Rapporto tra Bcl-2 e Bax.	Piquette <i>et al.</i> 1994; Lee <i>et al.</i> 2001; Yang and Rajamahendran 2002
IGF e IGFBP	Concentrazione di IGF-1 e IGFBP-1 nel FF; rapporto IGF-1/IGFBP-1 nel siero o nel FF; profilo di espressione di molecole IGFBPs a basso peso molecolare (IGFBP4 and IGFBP5) nel FF	Artini <i>et al.</i> 1994; Kawano <i>et al.</i> 1997; Oosterhuis <i>et al.</i> 1998; Fried <i>et al.</i> 2003; Nicholas <i>et al.</i> 2005
Super famiglia TGF- β	Livelli di inibina nel FF; Livelli di activina A nel FF; livelli basali dell'ormone anti-Mülleriano nel siero.	Lau <i>et al.</i> 1999; Chang <i>et al.</i> 2002; Ebner <i>et al.</i> 2006; Wen <i>et al.</i> 2006
Steroidi	Rapporto di estradiolo/testosterone (o estradiolo/progesterone) nel FF; livelli di estradiolo, LH, progesterone o prolattina nel FF.	Lindner <i>et al.</i> 1998; Xia and younglai 2000; Toner 2003; Ruiz Anguas <i>et al.</i> 2005; Wunder <i>et al.</i> 2005b
Stress ossidativo	Quantità di 8-OHdG nelle cellule della granulosa; livelli di ossido nitrico, perossidi lipidici, capacità antiossidante totale e ROS nel FF.	Seino <i>et al.</i> 2002; Bedaiwy <i>et al.</i> 2004; Lee <i>et al.</i> 2004; Pasqualotto <i>et al.</i> 2004
Leptina	Livelli di leptina nel FF o nel siero	Mantzoros <i>et al.</i> 2000; Wunder <i>et al.</i> 2005 a
Profili di espressione genica	Espressione della acido ialuronico-sintetasi 2, della ciclo-ossigenasi 2 e di Gremlin 1 nelle cellule del cumulo; abbondanza relative della penetraxina 3 nel cumulo.	Mckenzie <i>et al.</i> 2004; Zhang <i>et al.</i> 2005

INFLUENZA DEI FATTORI CITOPLASMATICI E NUCLEARI SULLA TRANSIZIONE MATERNO EMBRIONALE

Maternal Effect Genes(MEG) e attivazione del genoma embrionale

Come è noto il gamete femminile è un tipo di cellula unica nel suo genere. Infatti, in modo del tutto esclusivo è in grado di arrestarsi in una determinata fase del ciclo cellulare (stadio di diplotene della prima divisione meiotica). Tale arresto meiotico verosimilmente fa sì che a livello cellulare vi sia la sintesi ed accumulo di numerose classi di RNAm e proteine. L'accumulo di queste molecole e la loro regolazione temporale risulta fondamentale nel promuovere e guidare in modo preciso e sequenziale le prime divisioni embrionali (Bettegowda and Smith 2007)

Queste prime divisioni, è stato dimostrato, sono sotto il completo controllo materno e solo successivamente, in tempi diversi nelle diverse specie, il genoma embrionale diventa trascrizionalmente attivo per regolare le fasi replicative successive. Studi con Uridina Triziata hanno mostrato come nella specie bovina e verosimilmente in quell'ovina l'attivazione del genoma embrionale avvenga allo stadio di 8-16 cellule (Misirlioglu *et al.* 2006; Latham, K. E., and Schultz, R. M. 2001).

Questo passaggio è particolarmente delicato e frequentemente embrioni coltivati in vitro arrestano il loro sviluppo allo stadio di 8-16 cellule.

La corretta transizione delle fasi di sviluppo embrionale dal controllo materno a quello embrionale sono la conseguenza di numerose modificazioni biochimico-molecolari che innescano numerosi e specifici segnali. Purtroppo a tutto oggi tali segnali sono stati solo parzialmente identificati e si conosce limitatamente la loro funzione.

Il primo evento descritto da diversi autori è la sequenziale degradazione degli RNAm accumulati durante le fasi di accrescimento della cellula uovo. Alcuni di questi geni sono stati identificati ed è stato dimostrato il loro coinvolgimento nella regolazione delle prime fasi embrionali (Maternal effect genes - MEG).

In questi ultimi anni ulteriori indagini evidenziano come le fasi embrionali preimpianto siano regolate non soltanto da passaggi trasduzionali e neotrascrizionali ma anche da modificazioni epigenetiche, quali metilazioni del Dna e acetilazioni istoniche che agirebbero sui livelli di espressione di geni durante queste prime fasi replicative (regolazione epigenetica dell'attività trascrizionale (Dean, et al. 2003).

Recentemente inoltre è stato evidenziato come l'attività traduzione degli RNAm sia in parte controllata da nuove classi di RNA non codificanti denominata microRNA. Tali componenti sembrano giocare un ruolo ugualmente rilevante nella regolazione mitotica embrionale.

Fattori genetici materni, loro degradazione e controllo sui primi stadi dello sviluppo embrionale.

La fase di accrescimento dell'ooocita, come già precedentemente riportato, è caratterizzata da un intenso accumulo di fattori materni che risultano fondamentali per la regolazione delle prime fasi dello sviluppo embrionale. Tra questi rivestono un ruolo importante diverse classi di RNAm (Maternal effect genes) che sono stoccate in modo stabile durante la follicologenesi per essere utilizzate sequenzialmente nelle successive fasi replicative per la sintesi di numerose proteine. L'individuazione di questi geni ed il loro coinvolgimento nello sviluppo embrionale è stato oggetto di recenti indagini e la loro determinazione e funzione potrà contribuire a svelare i meccanismi biochimico molecolari coinvolti in queste fasi dell'embriogenesi.

Recentemente nella specie murina, alcuni di questi geni coinvolti nella regolazione della meiosi e nelle fasi embriogenetiche, sono stati individuati e ne è stato in parte studiato l'aspetto funzionale: tra questi Mater, ZAR-1, Nucleoplasmina-2 (NPN2), Stella, Hsf 1, HRGA, Basomuclina. La presenza di questi geni la si ha sia nell'ooocita che nelle embrione nelle prime fasi replicative.

Maternal antigen that embryo requires (Mater) è stato identificato come fattore materno capace di influenzare lo sviluppo embrionale inizialmente nel topo. Topi ai quali è stata abolita a

funzionalità del gene risultano sterili. Si è osservato che in questi soggetti non vi è un'alterazione della follicologenesi e dell'ovulazione ma specificatamente una riduzione dello sviluppo embrionale nelle sue prime fasi. Gli embrioni, infatti, non vanno oltre la prima replicazione mitotica e si arrestano allo stadio di due cellule. Ulteriori evidenze mediante prove di incorporazione di bromdeossouridina hanno dimostrato come topi con deficit di espressione di Mater presentano un'alterazione dell'attivazione genomica ma non un totale arresto trascrizionale. Infatti, in questi soggetti si è osservata una riduzione al 60% di sintesi di transcription-requiring complex (TRC) rispetto ad embrioni controllo.

L'espressione di Mater è stata osservata anche in altre specie evidenziando come l'attività di regolazione dell'embriogenesi dei primi eventi replicativi sia un carattere altamente conservato. Mater è stato identificato in oociti umani (Tong et al. 2002) ed in embrioni ed oociti di bovino (Pennetier et al. 2006): In questa ultima specie si è osservato come Mater nell'oocita incrementi in modo significativo durante la follicologenesi mentre tende a diminuire durante la maturazione meiotica e lo sviluppo embrionale preimpianto. I livelli di Mater, infatti, allo stadio di blastocisti non sono più rilevabili (Tong et 2000, Pennetier et al 2006). In questa specie l'aspetto funzionale di questo andamento e l'attiva presenza della sua proteina non sono stati ancora chiariti. Non vengono riportati a oggi studi e ricerche che svelino la presenza e la funzione di Mater nella specie ovina

Zygote arrest 1 (Zar-1) è ugualmente un maternal effect gene necessario per iniziale embriogenesi nel topo. Anche per questo gene topi nei quali si è proceduto all'abolizione della funzione mediante esperimenti di knockout mostrano difficoltà nello sviluppo embrionale con forme di arresto ai primissimi stadi (Wu et al. 2003). Meno del 20% di topi privati dell'attività di Zar 1 sviluppano allo stadio di 2 cellule e la sintesi di TRC è ridotta dell'85%. Tali dati fanno ritenere che Zar 1 sia implicato nella regolazione dell'attivazione del genoma embrionale.

Anche Zar 1 è stato identificato in altre specie tra i quali gli anfibi, pesci, l'uomo, il bovino ed il maiale (Brevini et al. 2004 Pennetier et al. 2004; Uzbekova et al. 2006) Non si conosce tuttavia il

significato funzionale del gene in queste specie. Non vengono riportati a oggi studi e ricerche che svelino la presenza e la funzione di ZAR 1 nella specie ovina

GDF9 e BMP15 (conosciuto anche come GDF9B) appartengono alla superfamiglia del Transforming Growth Factor (TGF) e sono coinvolti nella regolazione della follicologenesi e maturazione della cellula uovo nei roditori, nella pecora e nell'uomo. (Elvin et al. 2000; Chang et al. 2002; McNatty et al. 2003; DiPasquale et al. 2004; Shimizu et al. 2004). Sia BMP15 sia GDF9 sono maggiormente espressi negli oociti e agiscono modulando l'attività di comunicazione azione sinciziale con le cellule della granulosa e favorendo la creta il comparto somatico e l'oocita durante la follicologenesi (Galloway et al. 2000; Shimasaki et al. 2004). Sono state descritte diverse mutazioni di BMP15 and GDF9 con risposte fenotipiche differenti. Infatti, in alcuni casi la presenza di queste mutazioni in eterozigoti determina una stimolazione della crescita follicolare con un aumento del tasso di ovulazione mentre in omozigosi porta nei più dei casi a forme di sterilità. Attualmente sono state descritte cinque differenti mutazioni di BMP15 e 1 di GDF9 (McNatty et al. 2006).

Nonostante siano stati compiuti numerose ricerche sull'attività di questi geni durante la follicologenesi non sono ad oggi presenti informazioni sui livelli di espressione in embrioni preimpianto. Studi nel bovino (Donnison and Pfeffer 2004) e nel suino (Lee et al. 2008) evidenziano come, analogamente a quanto riportato per altri maternal effect genes, i livelli di GDF9 tendono a diminuire progressivamente ed in modo significativo durante la maturazione dell'oocita. Riduzioni dei livelli di GDF 9 sono inoltre osservabili nello stadio 4 –8 cellule e nella transizione 16 cellule -morula.

Non è presente una neo attività trascrizionale di GDF 9 coincidente con l'attivazione del genoma embrionale La persistenza di espressione genica del GDF9 e quindi la conseguente degradazione del RNAm varia nelle diverse specie. Mentre, infatti, nel bovino e nel topo, subito dopo la fecondazione, si assiste ad una rapida diminuzione di GDF 9 nel suino i livelli di espressione del gene sembrano persistere per un numero maggiore di cicli cellulari ed in alcuni casi la presenza di

GDF 9 è rilevabile in modo chiaro in tutti gli stadi divisionali preimpianto ed anche in quelli fetali. (Zeng and Schultz 2003; Hamatani et al. 2004; Alizadeh et al. 2005.)

L'insieme di queste ricerche comparative nelle diverse specie evidenzia come GDF9 contrariamente a quanto osservato per ZAR1 e Mater presenta un pattern espressivo diverso verosimilmente dovuto a momenti diversi di attivazione del genoma embrionale nelle varie specie.

Non sono attualmente disponibili molte informazioni relative all'espressione di BMP15 durante lo sviluppo dell'embrione preimpianto. Studi nel bovino evidenziano come BMP15 sia ben espresso durante la progressione meiotica (dallo stadio di GV e M II) e sino allo stadio 8-16 cellule. Mentre in stadi successivi di morula e blastocisti è scarsamente rilevabile (Pennetier et al. 2004). Nel topo BMP15 presenta livelli di espressione che tendono a ridursi progressivamente durante le prime fasi replicative (Zeng and Schultz 2003). Tuttavia nel bovino, differenzialmente da quanto osservato per gli altri maternal effect genes analizzati, il decremento dell'espressività di BMP15, è scarsamente rilevabile durante la maturazione meiotica. (Donnison and Pfeffer 2004) Questo pattern espressivo potrebbe indicare un maggiore coinvolgimento del gene durante le fasi successive dello sviluppo embrionale preimpianto.

Ci sono evidenze che anche la **nucleoplasmina 2 (NPN2)** si comporti come maternal effect gene nel topo. In *Xenopus* la NPN2 agisce promovendo al decondensazione dello spermatozoo subito dopo la fecondazione. Topi knockout per NPN2 evidenziano un minore grado di fertilità, un più basso numero di nati e diverse anomalie. Anche per questo gene le maggiori alterazioni funzionali sono rilevabili nelle prime repliche mentre la maturazione meiotica e la fertilizzazione non appaiono significativamente alterate (Burns *et al.* 2003). Infatti si assiste in topi knockout ad una normale decondensazione dello spermatozoo accompagnata però da alterazioni cromatiniche. La sintesi di TRC è ridotta del 70% suggerendo che l'alterazione cromatinica sia la causa maggiormente condizionante il proseguo dello sviluppo embrionale.

Il gene **Stella** è stato osservato come sia ugualmente implicato nel favorire e regolare la corretta transizione tra il controllo materno e l'attivazione del genoma embrionale. Il gene Stella è stato

identificato nelle cellule germinali primordiali, in oociti ed embrioni preimpianto. Topi privati dell'attività del gene mostrano un minore fertilità con uno sviluppo embrionale sino allo stadio di 2 cellule ridotto del 50% e del 88% allo stadio di blastocisti(Payer *et al.* 2003)..

Heat shock factor 1 (Hsf 1) è un gene che si attiva in presenza di stress di vario tipo per esempio si assiste ad un aumento dei livelli di espressione negli oociti e negli embrioni a seguito di modificazione colturali. E' stata comunque osservata una implicazione nella transizione materno embrionale nel topo. Topo privati della attività di Hsf1 mostrano una riduzione della fertilità con arresti nelle divisioni cellulari(Christians *et al.* 2000)

Nel topo la proteina **RAD6**, un enzima coniugato con l'ubiquitina e regolatore chiave della riparazione del DNA durante le fasi replicative, è necessaria per la prime repliche embrionali. Anche per questo gene l'abolizione della funzione non ha effetti sulla follicologenesi, sulla ovulazione e fertilizzazione ma compromette essenzialmente la replicazione sino allo stadio di 2 cellule(Roest *et al.* 2004)

Recentemente è stato evidenziato che la **Basomucina** agisca come maternal effect gene nel topo.(Ma et 2006). Basomucina è una proteina zinc finger contenente un fattore trascrizionale. Negli oociti di topo è co-localizzata con la RNA polimerasi I nel nucleolo e con il promotore trascrizionale della RNA polimerasi II nel nucleoplasma. L'RNAm e la proteina sono ben presenti nell'oocita e nelle prime divisioni mentre sono poco presenti negli stadi successivi. Esperimenti di interferenza del RNAm nel topo hanno determinato riduzioni significative della fertilità. Contrariamente ha quanto riportato per gli altri maternal effect genes la riduzione funzionale della Basomucina incide significativamente sulla follicologenesi e sulla ovulazione. Non sembra invece che siano presenti alterazioni sulle fasi replicative embrionali prima dell'attivazione del genoma embrionale in quanto non si è osservata una significativa riduzione del TRC rispetto a gruppi controllo.

Regolazione dell'attività trascrizionale mediante modificazioni epigenetiche del genoma embrionale.

Le modificazioni epigenetiche quali metilazione e acetilazione del DNA giocano un ruolo importante nel rimodellamento cromatinico e nella regolazione dell'espressione genica dell'oocita. I cambiamenti maggiormente rilevanti si hanno dopo la fertilizzazione con intensi fenomeni di metilazione e demetilazione e con riorganizzazione cromatinica.

Prima della fertilizzazione il genoma materno e paterno sono trascrizionalmente silenti perché intensamente metilati. Poche ore dopo la fertilizzazione il pronucleo paterno subisce una perdita di metilazione del DNA riferita come “demetilazione attiva”. Alcune sequenze tuttavia, per la presenza di specifici retrotrasposoni risultano refrattarie ai processi di demetilazione mantenendo l'assetto originale metilato (imprinting genes). La perdita di DNA paterno metilato è stata rilevata in diverse specie come ratto, maiale, bovino e uomo e questi cambiamenti sembrano incidere in modo rilevante sulla regolare attività embriogonica nelle prime fasi (Dean *et al.* 2003; Santos and Dean 2004; Morgan *et al.* 2005)

Un'altra modificazione importante delle funzionali del DNA embrionale è rappresentata dai fenomeni di acetilazione istonica. <nel topo sia lo spermatozoo maturo che l'oocita in metafase II mostrano livelli bassissimi di iperacetilazione dell'Istone 4 (Adenot *et al.* 1997. Subito dopo la fertilizzazione vi è una associazione di istone 4 iperacetilato con la cromatina spermatica ma non con la cromatina materna. Tale maggiore acetilazione si ha anche nella fase G1 durante la formazione del pronucleo mentre nelle fasi S si riscontrano valori equivalenti in entrambi i pronuclei. Il significato di questa acuta demetilazione e acetilazione istonica non è noto, ma si ipotizza possa avere un ruolo determinante nella attività trascrizionale del pronucleo paterno. Studi con bromodeossiridina hanno, infatti, evidenziato una attività trascrizionale nel pronucleo paterno sia 4 – 5 volte maggiore rispetto a quello materno (Aoki *et al.* 2003).

Fattori presenti nell'oocita capaci di agire sul rimodellamento cromatinico sembrano cruciali per una corretta transizione materno-embrionale e per l'attivazione del genoma embrionale.

Tra questi azioni specifiche sono state riportate da parte del SWI/SNF, del Brhma-related gene (Brg1). Topi knockout per il Brg 1 presentano ridotta fertilità con arresto embrionale allo stadio 2-4 cellule (Bultman *et al.* 2006). In questi soggetti si evidenzia una minore attività trascrizionale e una riduzione dei livelli di dimetil H3K4, mentre non sembra modificarsi il livello di acetilazione degli istoni 3 e 4.

Il Transcription Intermediary Factor 1 alfa (TIF 1 alfa) è un altro fattore implicato nella modulazione dell'attività trascrizionale nel topo (Torres-Padilla and Zernicka-Goetz 2006). L'azione di TIF 1 alfa è stata inizialmente riportata come legato a recettori nucleari e a proteine coinvolte nel rimodellamento cromatinico. Negli oociti la proteina TIF 1 è stata osservata nella vescicola germinale. Dopo la fertilizzazione la proteina TIF 1 si localizza nei due pronuclei concentrandosi in regioni specifiche nucleolari. Studi con incorporazione di bromodeossiuridina hanno evidenziato come TIF 1 si localizzi nella sequenza dell'iniziale DNA neotrascritto suggerendo pertanto un'attività di controllo di questa funzione.

La proteina TIF 1 è necessaria per l'iniziale sviluppo embrionale e la sua ablazione mediante RNA interferenziale o mediante l'iniezione di anticorpi determinano di fatto un arresto embrionale ai primissimi stadi (2-4 cellule).

Azione dei MicroRNA sulla degradazione dell'RNA materno e sull'iniziale sviluppo

embrionale.

Come già accennato nei paragrafi precedenti la degradazione degli RNAm, stoccati durante le fasi dell'accrescimento della cellula uovo, rappresentano un requisito fondamentale per favorire una normale embriogenesi. Tale evento è un fenomeno altamente conservato ed è pertanto riscontrabile in modo filogeneticamente esteso sia in specie inferiori quali *Xenopus* che nei mammiferi.

L'insorgere di questo fenomeno si ha durante la ripresa della meiosi e il passaggio dallo stadio di vescicola germinale allo stadio di M II evidenzia una significativa riduzione di RNA messaggeri. In coincidenza con l'attivazione del genoma embrionale circa il 90% degli RNAm di origine materna risultano degradati. La persistenza di questi RNAm risulta infatti deleteria per lo sviluppo embrionale come dimostrato mediante l'iniezione di c-mos mRNA in oociti ed embrioni preimpianto nel topo. In questo esperimento si è osservato una riduzione dello sviluppo replicativo con arresto embrionale ai primissimi stadi (Bachvarova *et al.* 1985; Paynton *et al.* 1988; Schultz 1993).

I meccanismi che regolano questa degradazione da parte dei miRNA sono poco noti.

Studi su zebrafish e sul topo hanno mostrato come i microRNA possano svolgere la funzione di regolatori del turnover dei trascritti materni. In oociti ed embrioni di zebrafish, miRNA appartenenti alla famiglia miR-430 sono chiaramente implicati nella regolazione della degradazione dell'RNAm.

Il loro spegnimento provoca ritardo nello sviluppo e difetti morfogenetici.

I microRNA sono sequenze non codificanti di RNAs che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Bartel 2004).

Drosha nel nucleo e Dicer sono due molecole presenti nel citoplasma che agirebbero nel modificare i precursori a lunga catena del miRNA per formare sequenze attive di 22 nucleotidi (Plasterk 2006).

Queste sequenze assemblano complessi proteici chiamati miRISC contenenti particelle ribonucleoproteiche che legandosi a regioni complementari di specifici RNAm agiscono inibendo la sintesi proteica o stimolando la loro degradazione. Diverse famiglie di miRNA sono state

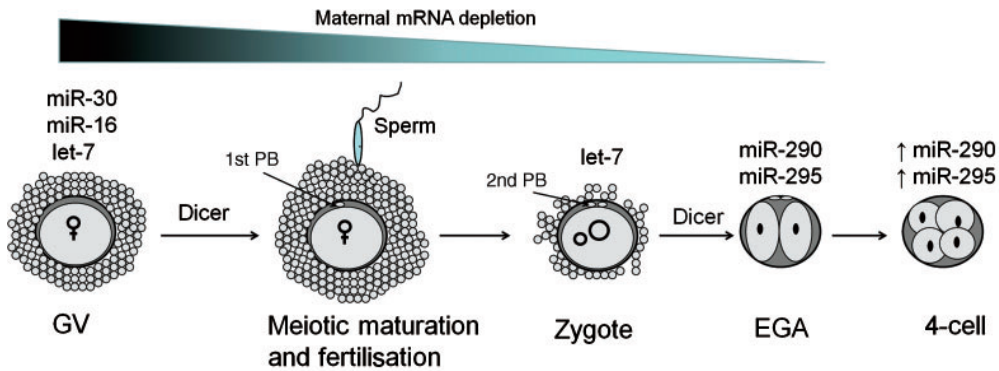
identificate in oociti di topo per quanto una chiara funzione sulla degradazione del RNAm non è stata del tutto dimostrata. Recentemente tuttavia è stata identificata una azione diretta di Dicer sul turnover del RNAm dell'oocita. Dicer è presente in abbondanza allo stadio di GV e tende a ridursi durante la meiosi e iniziale sviluppo embrionale Murchison *et al.* 2007; Tang *et al.* 2007.

Esperimenti di abolizione della funzione di Dicer dimostrano il suo coinvolgimento nella meiosi e nello sviluppo embrionale. Si sono osservate alterazioni del fuso meiotico e mitotico, cattivo allineamento dei cromosomi e mancata estrusione del globulo polare. Analisi differenziali mediante microarray tra oociti provenienti da soggetti knockout per Dicer e controlli hanno evidenziato profonde differenze nello sviluppo preimpianto.

L'azione dei miRNA è ugualmente rilevante nelle prime divisioni embrionali. Mediante analisi con RealTime PCR è stato possibile identificare differenti famiglie di miRNA presenti durante lo sviluppo dell'embrione preimpianto. La loro diminuzione tuttavia è contestuale con la riduzione delle classi di RNAm di origine materna a significare il loro pieno coinvolgimento con il turnover del RNA. Nel topo si è osservata dopo lo stadio di 4 cellule un incremento transitorio di miRNA dovuto a eventi neotrascrizionali e pertanto conseguenti all'attivazione del genoma embrionale(Tang

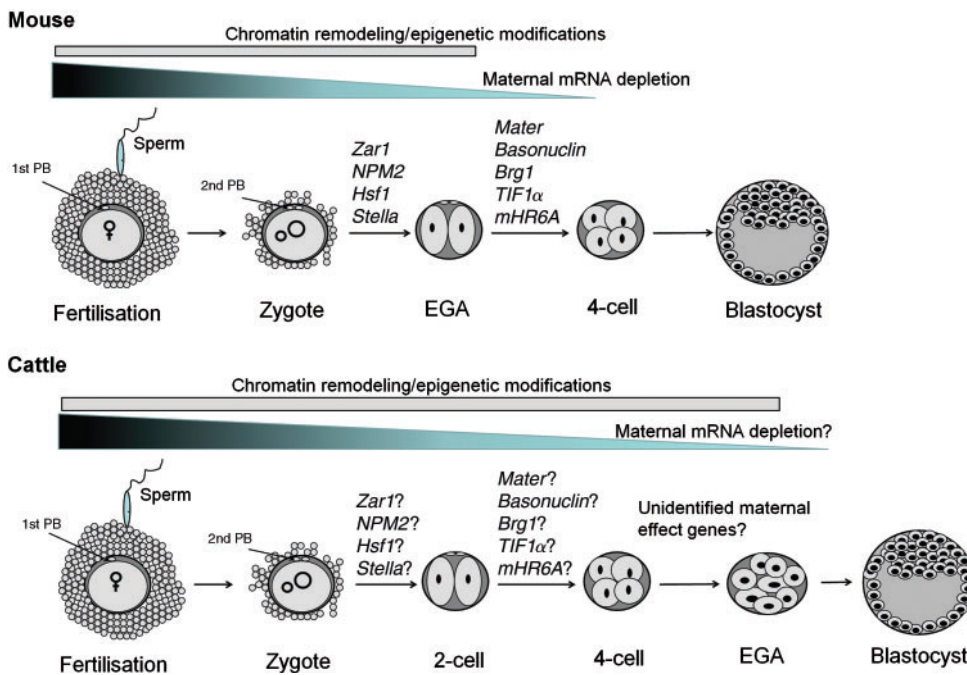
et al. 2007). Il significato di questa neosintesi non è stato al momento chiarito. L'azione dei miRNA è stata maggiormente chiarita in specie inferiori come in oociti ed embrioni di zebrafish. In questi infatti miRNA appartenenti alla famiglia miR-430 sono chiaramente implicati nella regolazione della degradazione dell'RNAm. Il loro spegnimento provoca ritardo nello sviluppo e difetti morfogenetici (Giraldez *et al.* 2006).

Fig.1



Regolazione degli mRNA materni durante la transizione materno-fetale nel topo.

MicroRNA appartenenti alle famiglie miR-30, miR-16 e let-7 sono presenti negli oociti di topo. Il fattore Dicer (enzima essenziale per il processamento dei miRNA), espresso dall’oocita, è cruciale per il completamento della meiosi I e per l’estrusione del primo globulo polare (PB). La mancanza di Dicer negli zigoti impedisce lo sviluppo sino allo stadio a due cellule. Negli zigoti, miRNA appartenenti alla famiglia let-7 costituiscono la maggior parte dei miRNA materni. L’attivazione del genoma embrionario (EGA) dà inizio alla sintesi dei miRNA, producendo una elevata presenza di miR-290 e miR-295 negli embrioni a quattro cellule.



Regolazione della transizione materno-fetale nel topo e nel bovino.

Maternal Effect Genes Zar1, Mater, NPM2, Basonuclin, Hsf1, Brg1, TIF1α, Stella e mHR6A sono essenziali per la normale progressione della transizione materno-fetale nel topo. Modificazioni covalenti e non-covalenti della cromatina durante la transizione materno-fetale sono critici per il controllo dell’espressione genica dell’embrione. La degradazione di più del 90% degli mRNA materni accompagna tale transizione, che è regolata dal procedere dello sviluppo e critica per una normale progressione della prima embriogenesi. In contrasto con le conoscenze sul topo, poche informazioni sono note sulla regolazione di questo periodo chiave durante il primo sviluppo embrionale nel bovino. PB: globulo polare; EGA: attivazione del genoma embrionario

QUALITÀ DELL’OOCITA PREPUBERE E DIFFERENZE CON L’ADULTO

Le strategie per il rapido miglioramento genetico delle specie di maggior interesse zootecnico suggeriscono la possibilità di impiego di animali prepuberi come fonte di oociti da destinare a programmi di produzione in vitro di embrioni, al fine di ridurre gli intervalli generazionali e di accelerare i test di progenie.

Tuttavia, numerose ricerche, hanno evidenziato che l'oocita di soggetti prepuberi, mostra una ridotta potenzialità di sviluppo embrionale.

Inoltre, dopo embryo transfer, si assiste ad una minore sopravvivenza rispetto a quanto osservato per gli embrioni sviluppati da oociti di soggetti adulti. In letteratura è documentato l'utilizzo nelle tecnologie riproduttive in vitro di oociti recuperati da animali prepuberi (O'Brien et al, 1996; Ledda et al, 1997; Ptak et al, 1999; Kochar et al, 2002). In vitro, gli oociti recuperati da bovini e ovini prepubere progrediscono attraverso la meiosi, sino alla MII, a velocità simili a quelle degli oociti di animali adulti e, dopo la fertilizzazione, sono in grado di portare avanti gli eventi della prima embriogenesi (Revel et al, 1995; O'Brien et al, 1996). Tuttavia è ancora bassa la percentuale di embrioni che raggiungono lo stadio di blastocisti se comparata con quella ottenuta nell'adulto, a causa dell'alto tasso di riassorbimenti embrionali e malformazioni fetali osservate dopo il trasferimento di embrioni di prepubere coltivati in vitro (Ptak al 1999; O'Brien et al. 1996, Seda et al 1999 a. b). Tale limitazione è sicuramente relazionabile a differenze strutturali e funzionali dell'oocita degli animali prepuberi rispetto a quello di animali adulti

Evidenze in tal senso sottolineano un' irregolare accoppiamento dell'oocita di soggetti prepuberi con le cellule somatiche, una difettosa capacità maturativa del citoplasma come evidenziato dalla presenza di anomalie a carico delle componenti citoscheletriche, sintesi proteica e fattori di regolazione, metabolismo cellulare che si riflette sullo scarso sviluppo embrionale dopo fertilizzazione in vitro. (Ledda et al. 2001; O'Brien et al. 1996; 1997b).

Sono state descritte, inoltre, differenze sui tempi di maturazione e sviluppo embrionale (O'Brien et al. 1996; Ledda et al. 1997; Leoni et al. 2006b; Ptak et al. 1999). Recenti studi (Ptak et al. 2006)

hanno altresì suggerito come accanto ad una incompleta maturazione citoplasmatica sia presente anche una immaturità nucleare responsabile di un inferiore stoccaggio mRNA nel citoplasma ed una percentuale più bassa di DNA metilato rispetto agli adulti. La minor metilazione potrebbe coinvolgere alcuni importanti geni imprintati con conseguenti alterazioni della sintesi proteica e anomalie delle fasi di sviluppo e impianto dell'embrione. embrionale.

SCOPO

La presente sperimentazione ha l'obiettivo di contribuire ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che guidano e regolano lo sviluppo embrionale preimpianto. Per tale scopo la ricerca è stata finalizzata all'analisi dell'espressione genica durante la fasi di maturazione in vitro dell'oocita e di sviluppo degli embrioni fino allo stadio di blastocisti utilizzando come modello di studio la specie ovina. Per analizzare gli oociti e gli embrioni sono stato selezionato pannelli di geni, scelti in base al loro coinvolgimento funzionale nell'acquisizione della competenza dell'oocita e nello sviluppo dell'embrione pre-impianto. Nell'ambito di tali indagini è stata effettuata una comparazione tra oociti di ovino prepubere e adulto per evidenziare eventuali differenze a livello di espressione genica tra due classi di oociti, che presentano diversa competenza allo sviluppo.

La sperimentazione si è articolata differenti fasi sperimentali.

-Nella prima fase sono state compiute indagini molecolari sugli oociti e sulla capacità di maturazione meiotica mediante l'analisi dell'espressione di 4 Maternal Effect Genes (ZAR1, MATER, GDF9 e BMP15) in oociti immaturi e allo stadio di metafase seconda di ovini adulti e prepuberi. Inoltre è stato effettuato un esame comparativo tra il quadro di espressione genica 7 geni coinvolti nelle prime regolazioni funzionali in oociti immaturi di pecora e agnella.

- La seconda fase della ricerca ha voluto monitorare l'attività replicativa delle prime fasi di sviluppo embrionale post fertilizzazione fino al momento dell'attivazione del genoma embrionale (fase di transizione materno-embrionale) attraverso la quantificazione dei 4 Maternal Effect Genes durante le varie tappe di sviluppo embrionale preimpianto di oociti di pecora e di agnella.

- Nella terza fase del lavoro è stata effettuata una valutazione comparativa tra le blastocisti prodotte in vitro di agnella e di pecora mediante l'analisi dei pattern di espressione genica dei 7 geni analizzati nella prima fase sperimentale e altri 8 geni.

- La quarta fase sperimentale è stata finalizzata alla determinazione delle possibili modificazioni dei pattern di espressione genica in relazione alle condizioni colturali dell'embrione. Pertanto

l'espressione genica relativa ad un pannello di geni è stata analizzata in blastocisti di agnella sviluppate totalmente in vitro o in parte in vivo.

- Nell'ultima fase della ricerca è stato messo a confronto il quadro di espressione di diversi geni in blastocisti di pecora sviluppate in vitro dopo fertilizzazione (biparentali) e blastocisti prodotte dopo attivazione partenogenetica (monoparentali) per escludere la fase della fertilizzazione e valutare l'espressione genica in assenza di fenomeni d'imprinting.

Nel complesso l'insieme di tali sperimentazioni potrà fornire utili indicazioni per la costituzione di un sistema di valutazione della qualità dell'oocita e dell'embrione, per mettere in evidenza possibili alterazioni indotte dai sistemi colturali e potrà quindi apportare importanti informazioni per migliorare l'efficienza dei protocolli in vitro per la produzione di embrioni.

MATERIALI E METODI

PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI

RECUPERO E MATURAZIONE IN VITRO DEGLI OOCITI

Gli oociti sono stati prelevati dalle ovaie di pecore adulte e agnelle di 30-40 gg di età e 6-12 kg regolarmente macellate presso i mattatoi locali.

Le ovaie sono state divise sagittalmente mediante una microlama e si è proceduto, tramite osservazione al microscopio stereo, all'apertura dei follicoli con il rilascio dei complessi cumulo-oocita in medium TCM-199 supplementato con Hapes e PVA 0.1%. Al termine della raccolta gli oociti venivano lavati per tre volte in TCM 199, per eliminare il più possibile le tracce del liquido follicolare e residui di materiale cellulare. La maturazione in vitro è stata effettuata in TCM 199 + 10% di FCS + LH/FSH (0.1 UI/ml), cisteamina (100 μ M). Gruppi di 30-40 oociti sono stati coltivati in 1 ml di medium in piastre Four-wells ricoperte da uno strato di olio minerale a 38,5° C con ambiente di massima umidità, con il 5% di CO₂ in aria atmosferica per 24 ore.

FERTILIZZAZIONE IN VITRO

Per la fertilizzazione è stato utilizzato seme di ariete congelato in pellets. Dopo scongelamento in bagno d'acqua a 38,5°C per 30", il materiale seminale è stato processato secondo la tecnica del swim-up per la separazione della frazione più mobile e vitale di spermatozoi. Per la fertilizzazione è stato impiegato il Synthetic Oviductal Fluid (SOF; Tervit e coll., 1972) supplementato con il 2% di siero di pecora in estro. Questo medium è stato preparato nel nostro laboratorio, utilizzando acqua deionizzata prodotta da un sistema MillyQ (Millipore) e portando la soluzione finale ad una osmolarità di 285 mOsm/Kg e ad un pH di 7,3. Per la fertilizzazione, 400 µl di medium contenente gli spermatozoi sono stati posti in un pozzetto di una piastra Nunc e il sistema ricoperto con olio minerale per evitare l'evaporazione e la conseguente variazione di osmolarità. Gli oociti sono stati denudati meccanicamente tramite il passaggio in una pipetta di vetro con calibro leggermente superiore al diametro dell'oocita in modo da lasciare intatto lo strato di cellule della corona radiata. Gli oociti denudati sono stati lavati in medium di fertilizzazione per 3 volte e coincubati con gli spermatozoi (20-30 oociti per pozzetto) per 24 ore a 38.5°C in condizioni di massima umidità e in atmosfera di azoto contenente il 5% di O₂ e il 5% di CO₂.

ATTIVAZIONE PARTENOGENETICA

Gruppi di oociti maturati in vitro sono stati attivati partenogeneticamente con Ionomicina e 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP). Per tale scopo gli oociti sono stati posti in medium di dissezione contenente Ionomicina (5 μ M/5 min.) e successivamente incubati per tre ore in TCM 199 + 10% FSC contenente 6-DMAP (2 μ M) in condizioni standard di umidità e temperatura. Al termine dell'incubazione, gli embrioni sono stati lavati tre volte e coltivati in vitro in TCM 199 + 10% FCS + FSH ed LH (0.1UI/ml), cisteamina (100 μ M) per 24 h. Si è proceduto poi alla cultura in vitro nelle stesse condizioni degli embrioni prodotti in vitro per IVF.

COLTURA IN VITRO

Dopo 22 ore di coltura gli zigoti sono stati trasferiti in un pozzetto di una piastra Nunc contenente SOF supplementato con 4 mg/ml di BSA e aminoacidi essenziali e non essenziali (AA) a concentrazione oviduttale. La coltura embrionale è stata effettuata a 38,5°C in condizioni controllate al 5% di O₂, 5% di CO₂ e massima umidità per 8 giorni.

VALUTAZIONE DELLA CINETICA DI SVILUPPO EMBRIONALE

A 22, 26, 30 ore post fertilizzazione o post attivazione è stata valutata la percentuale di embrioni di pecora e di agnella divisi.

Durante lo sviluppo embrionale si è proceduto allo stoccaggio degli embrioni allo stadio di 2, 4, 8, 16, morula e blastocisti in Eppendorf da 1,5 ml in 2 µl di H₂O trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) e immersi in azoto liquido. Le provette sono state immediatamente conservate a -80°C sino al momento dell'analisi molecolare.

ANALISI MOLECOLARE

Isolamento degli RNA messaggeri

Gli RNA messaggeri (mRNA) sono stati isolati con il kit Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dynal A.S. Oslo, Norway). La purificazione dell'mRNA avviene grazie all'appaiamento tra i nucleotidi del poliA presente all'estremità 3' di ogni mRNA e gli oligo dT legati covalentemente alla superficie delle microsfere magnetiche Dynabeads. Mentre il DNA e l'RNA di altro genere sono eliminati con il resto del campione durante i lavaggi, gli mRNA legati alle microsfere magnetiche sono trattiene grazie ad un separatore magnetico (Magnetic Particle Concentrator, Dynal MPC®).

Soluzioni utilizzate:

- Dynabeads Oligo(dT)₂₅
 - 1 ml è fornito come sospensione di 5 mg di sferette magnetiche per ml di PBS (3,3×10⁸ microsfere per ml), contenenti 0,05% Tween-20 e 0,02 % NaN₃.
 - PBS (Phosphate-Buffered Saline) pH 7,4:

- 138 mM NaCl
- 4 mM NaH₂PO₄
- 6 mM Na₂HPO₄ (pH7)

- Lysis/Binding Buffer:
 - 100 mM Tris-HCl pH 7,5
 - 500 mM LiCl
 - 10 mM EDTA
 - 1% LiDS
 - 5 mM DTT

- Washing Buffer A
 - 10 mM Tris HCl pH 7,5
 - 0,15 M LiCl
 - 1 mM EDTA
 - 0,1% LiDS

- Washing Buffer B
 - 10 mM Tris HCl pH 7,5
 - 0,15 M LiCl
 - 1 mM EDTA

Protocollo di estrazione:

Ad ogni provetta contenente il campione da analizzare (oociti o embrioni, singoli od in pool di otto-dieci), precedentemente conservata a -80°C, sono stati aggiunti 50 µl di Lysis buffer.

Dopo incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti, sono stati aggiunti 10 µl di Dynabeads, precedentemente condizionate con lysis/binding buffer. I campioni sono stati incubati a 25°C, in agitazione, per 5 minuti ed in seguito posti nel separatore magnetico per 2 minuti.

Il sovrantante è stato rimosso e i poli(A)⁺RNA sono stati lavati una volta con 60 µl di Washing Buffer A e 3 volte con 60 µl di Washing Buffer B.

I poli(A)⁺RNA sono stati infine eluiti dalle sfere magnetiche tramite incubazione in 11µl di acqua trattata con DEPC per 2 minuti a 65°C.

Le aliquote di mRNA sono state immediatamente utilizzate per la trascrizione inversa.

Sintesi del DNA complementare (cDNA)

Il DNA complementare all'mRNA è stato sintetizzato tramite una reazione di trascrizione inversa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR). La reazione è stata effettuata in un volume finale di 20 µl, contenente TrisHCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 5 mM, dNTPs 1 mM, Random Hexamer Primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2,5 µM, 20 U di RNase OUTTM (Invitrogen Carlsbad, CA,) e 100 U di SuperScriptTM III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA).

I campioni sono stati tenuti a 25°C per 10 minuti, poi a 42°C per 1 ora, ed infine a 70°C per 15 minuti per inattivare la reazione.

Come controlli negativi sono stati utilizzati un campione costituito dalla miscela di reazione per la sintesi di cDNA e non contenente l'mRNA, ed un campione costituito dalla miscela di reazione, contenente l'mRNA, ma non l'enzima trascrittasi inversa.

Quantificazione relativa dei trascritti tramite Real Time PCR

Real Time PCR

La quantificazione degli mRNA di tutti i geni analizzati nelle due classi di embrioni è stata effettuata tramite Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

La reazione è stata effettuata in uno strumento BioRad iCycler™ (Bio-Rad, USA), in 25 µl di miscela di reazione contenente 12,5 µl 2x Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,025 nM Fluorescein Reference Standard (Molecular Probes – Invitrogen Detection Technologies, Leiden, The Netherlands), 200 nM di ogni primer e una quantità di cDNA equivalente a 0.5 – 1 embrione.

I primers utilizzati sono rappresentati nella tabella X. Sono stati disegnati sulla sequenza nucleotidica ovina, se presente in letteratura, oppure sulla sequenza del bovino.

Il protocollo di PCR è costituito da due fasi di incubazione (50°C per 5 minuti and 95°C per 2 minuti) seguiti da 40 cicli di amplificazione [15 secondi a 95°C, 30 secondi alla temperatura di annealing (specifica per ogni gene; vedi tabella X) e 30 secondi a 72°C], il programma per la curva di dissociazione (melting curve program: 65°C – 95°C, con misurazioni della fluorescenza ogni 10 secondi) ed una fase finale di raffreddamento a 4°C.

Nel corso dei cicli di amplificazione, la fluorescenza è stata misurata durante la fase di estensione a 72°C. La curva di dissociazione è stata generata per verificare la specificità del prodotto di amplificazione.

Per ridurre al minimo le variazioni dovute alle procedure sperimentali, l'analisi di tutti i campioni sono state effettuate contemporaneamente ed utilizzando una miscela di reazione comune, contenente tutti i reagenti a parte i campioni di cDNA.

Le dimensioni dei frammenti amplificati sono state ulteriormente verificate tramite visualizzazione su gel di agarosio. Una miscela costituita da un'aliquota di 10 µl dell'amplificato e 2,5 µl di *loading buffer* (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilene cianolo, 40% (w/v) saccarosio in acqua) è stata

caricata in un gel di agarosio al 2% in TBE 0,5 X (Tris base 0,89 M, acido borico 0,89 M, Na₂EDTA 20 mM) con Etidio Bromuro 0,002 M.

Il gel è stato sottoposto a corsa elettroforetica in una camera orizzontale contenente TBE 0,5 X ad una potenza costante di 80 W. Il prodotto di reazione è stato visualizzato esponendo il gel su un transilluminatore a raggi UV. Le dimensioni approssimative dell'amplificato sono state stimate confrontando la banda amplificata con le bande a dimensione nota del marcatore di peso molecolare pUC18 DpnI digest (10 µl alla concentrazione di 20 µg/ml).

Sequenziamento dei prodotti di PCR

Abbiamo determinato la sequenza nucleotidica dei frammenti analizzati tramite Real Time PCR per essere sicuri che corrispondessero effettivamente ai geni desiderati. Per il sequenziamento automatico è stato utilizzato un sequenziatore automatico Applied Biosystems, Model 3130 xl Genetic Analyzer (Foster City, CA 94404 U.S.A.) e il Kit BigDye® Terminator Cycle sequencing Kit v3.1 che prevede la preparazione di 20 µl della seguente miscela:

- 2 µl di Buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 0,01% gelatin)
- 4 µl del mix dNTPs/ddNTPs e Taq polimerasi;
- 3,2 pmoli di primer;
- 8 µl di DNA purificato (equivalenti a 10-40 µg).

La reazione di sequenza è stata sottoposta ad una fase di denaturazione a 96°C per 3 minuti, seguita da 30 cicli costituiti da 30" a 96°C, 15" a 50°C e 4' a 72°C.

Per ogni frammento di gene analizzato, la reazione di sequenza è stata effettuata con i due diversi primers fiancheggianti il frammento: Forward e Reverse. In questo modo la polimerizzazione è stata compiuta nelle due direzioni possibili, e le sequenze risultanti sovrapposte come ulteriore controllo dell'accuratezza del procedimento. Al termine della reazione di sequenza, ciascun campione è stato

purificato mediante gel-filtrazione, utilizzando colonnine contenenti Sephadex (Centri Sep Spin Columns, Applied Biosystem, cod.401762). Il passaggio di purificazione serve ad eliminare i ddNTPs non utilizzati per la polimerizzazione, per evitare che interferiscano con la lettura dei frammenti da parte dello strumento.

Prima di essere sottoposti ad elettroforesi, i campioni purificati sono stati miscelati con formammide (in rapporto 1:2) e denaturati per 4' a 95°C. L'elevata temperatura e la presenza di formammide promuovono la linearizzazione dei frammenti ed impediscono il formarsi di strutture secondarie che interferirebbero con la migrazione elettroforetica.

Le sequenze così ottenute sono state confrontate con quelle disponibili nel database pubblico Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Quantificazione relativa dell'espressione genica

La quantificazione relativa dell'espressione dei geni specifici è stata effettuata sulla base del metodo 2-ddCt di Livak e Schmittgen (2001). L'analisi è stata effettuata normalizzando l'espressione dei geni in esame con i livelli di espressione del controllo interno β -actina (Robert et al, 2002; Cui et al, 2006).

Per ogni campione, il numero di Ct del gene di controllo (β -actina) è stato sottratto dal numero di Ct del gene in esame (ottenendo un Δ Ct). In seguito, al numero medio di Ct di un gruppo è stato attribuito il valore zero e quello del secondo gruppo è stato espresso come la "differenza in Ct" rispetto al primo (ottenendo un $\Delta\Delta$ Ct; Figura X).

Gene	GenBank accession	Sequenza	Temp.	bps	Esp.
β-actina	NM_0010097	5' ttctgggatggtatgctcctg 3' 5' ggtgatctcctctgcatcc 3'	60°C	162	1, 2, 3, 4, 5, 6
AQP3	AF123316	5' ggggtgccattgtctctcc 3' 5' caacttcacattctctctcgtc 3'	60°C	119	4, 5, 6
BAX	AF163774	5' aacatggagctgcagaggat 3'	58°C	219	4, 6
BMP15	AF236078S2	5' gggttctacgactccgcttc 3' 5' ggttactttcaggcccatcat 3'	59°C	273	1, 2
Ciclina b	L26548	5' cagtgtatgacaggaatgc 3' 5' cgtagtccagcatagttagt 3'	56°C	134	3, 4, 6
E-CAD	NM_0010027	5' tggactgtgatgggatcgt 3' 5' acccttctcctccgaacaag 3'	58°C	155	3, 4, 5, 6
GAPDH	AF030943	5' gaagactgtggatggccctcc 3'	60°C	93	3, 4, 6
GDF9	AF078545	5' cagacgccacctctacaaca 3' 5' caggaaagggaaaagaatgg	58°C	198	1, 2
H2A.Z	NM_0010092	5' ctaccgcagaggactctg 3' 5' ctggtggtggtgctcattcc 3'	56°C	152	3, 4, 6
HSP90	AB072369	5' tggagatcaaccctgacca 3' 5' ctctcgttgaggatccc 3'	56°C	143	4, 6
IFN-τ	DQ149979	5' ctctgcaactgactccaaca 3' 5' cgctgtatcccttctcttcg 3'	58°C	160	4, 6
IGF2	NM_0010093	5' accctccagttgtctgtgg 3' 5' caagccgagagggatgtgt	60°C	169	4, 5, 6
IGF2R	AF353513	5' cactactcagtgaggagac 3' 5' atcaagaccagcgggtccta	60°C	137	4, 5, 6
MATER	AY721594	5' cagcctccaggagttctttg 3' 5' gacagcctaggagggtttcc 3'	59°C	212	1, 2
NaKATPa	X02813	5' gctgacttggtcatctgcaa 3' 5' cattccagggcagtaggaaa 3'	58°C	129	3, 4, 5, 6
NANOG	DQ069776	5' gatctgctattcaggacag 3' 5' ctcaagtctccagcaaatgca 3'	56°C	203	4, 5, 6
OCT4	NM_174580	5' gaggagtcccaggacatcaa 3'	56°C	204	4, 5, 6
P34^{Cdc2}	NM_174016	5' tgaactgaccaggaggata 3'	56°C	100	3, 4, 6
PAP	X63436	5' gaactgccagctttatcca 3' 5' ttgtgggatgctggtgtaa 3'	57°C	203	3, 4
ZAR1	XM_591835	5' cactgcaaggactgcaatc 3'	60°C	137	1, 2

Tabella 2. Informazioni sui primers utilizzati per l'analisi tramite Real Time PCR. La colonna "Temp." indica la temperatura di annealing utilizzata nel programma di amplificazione. La colonna "bps" indica le dimensioni, in base pairs (paia di basi) dei segmenti di DNA amplificati. La colonna "Esp" indica in quale esperimento il gene è stato analizzato

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati con il programma MINITAB Release 12.1. Le differenze nelle percentuali di maturazione e sviluppo embrionale sono state valutate con il χ^2 test. Le differenze in espressione genica sono state valutate con ANOVA. Valori di $P \leq 0,05$ sono stati considerati significativi.

Sei diversi esperimenti sono stati effettuati utilizzando le procedure di produzione di embrioni *in vitro* e i protocolli per le analisi molecolari sopra descritti.

Esperimento 1

L'abbondanza relativa dei trascritti di quattro Maternal Effect Genes (ZAR1, MATER, GDF9 e BMP15) è stata analizzata in oociti immaturi (GV) e maturi (MII) di pecora e di agnella. Sono stati analizzati 30 oociti singoli per ogni classe presa in esame.

Esperimento 2

L'espressione di un pannello di geni è stata comparata tra oociti immaturi di pecora e agnella. I geni presi in esame sono l'istone H2A.Z, la GAPDH, la Ciclina b1, la P34^{cdc2}, la NaKATPase, la PoliA Polimerasi e la E-Caderina. Sono stati analizzati 30 oociti singoli per ogni classe presa in esame e sono stati eseguiti tre replicati dell'esperimento.

Esperimento 3

Sono stati determinati semi-quantitativamente i patterns di espressione dei quattro Maternal Effect Genes (ZAR1, MATER, GDF9, BMP15) e del gene β -actina durante lo sviluppo pre-impianto *in vitro* di embrioni di pecora. Il gene β -actina è stato analizzato come esempio di gene la cui trascrizione si avvia con l'attivazione del genoma embrionario.

Le fasi dello sviluppo considerato sono state l'oocita immaturo (GV), l'oocita in MII, l'embrione a 2 (2C), a 4 (4C), a 8 (8C) e a 16 cellule (16C), la morula e la blastocisti. Per ogni fase del ciclo di sviluppo preso in esame sono stati analizzati 10 campioni singoli. Per ogni gene e per ciascun stadio di sviluppo considerati sono stati eseguiti tre replicati.

Esperimento 4

L'espressione di un pannello di geni è stata comparata i blastocisti prodotte *in vitro* da oociti di pecora e di agnella. I geni presi in esame sono: Aquaporina 3 (AQP3), BAX, Ciclina B1, E-Caderina (E-Cad), GAPDH, Heat Shock Protein 90b (HAP90b), IGF2, IGF2R, Interferone tau (IFN tau), istone H2A.Z, NaKATPase, Nanog, Oct4, P34^{cdc2}, PoliA Polimerasi (PAP).

L'analisi è stata effettuata su 4 pool di 8-10 embrioni per classe e sono stati eseguiti tre replicati dell'esperimento.

Esperimento 5

L'espressione genica relativa ad un pannello di geni è stata analizzata semi-quantitativamente in:

1. blastocisti prodotte completamente *in vitro* a partire da oociti di prepubere (gruppo “in vitro”)
2. blastocisti prodotte da oociti di prepubere maturati e fertilizzati *in vitro*, trasferiti allo stadio di 2 cellule in pecore riceventi in precedenza sincronizzate e recuperati tramite flushing dopo sei giorni (gruppo “in vivo”).

I geni Aquaporina 3 (AQP3), E-Caderina (E-Cad), IGF2, IGF2R, NaKATPasi, NANOG e OCT4 sono stati analizzati in 3 pool di 8-10 embrioni per ogni classe e sono stati eseguiti tre replicati dell'esperimento.

Esperimento 6

L'analisi dell'espressione di un pannello di geni (Aquaporina 3, BAX, Ciclina B1, E-Caderina, GAPDH, Heat Shock Protein 90b, IGF2, IGF2R, Interferone tau, istone H2A.Z, NaKATPase, Nanog, Oct4 e P34^{cdc2}) è stata effettuata in blastocisti di pecora ottenuti per fecondazione e coltura *in vitro* o per attivazione partenogenetica.

L'analisi è stata effettuata su 3 pool di 8-10 embrioni per classe e sono stati eseguiti tre replicati dell'esperimento.

RISULTATI

MATURAZIONE IN VITRO

Nella Tab.3 sono riportate le percentuali di progressione meiotica degli oociti di pecora ed agnella dopo maturazione in vitro. Le percentuali di oociti di adulto e prepubere che hanno raggiunto lo stadio di metafase II (92.2%vs 88%.) non sono risultate significativamente differenti dopo 24 di coltura in vitro. Anche i valori di arresto durante la progressione meiotica allo stadio di GV, GVBD, MI sono risultati simili nei due gruppi analizzati.

	n° oociti	Progressione meiotica (%)				
		GV	GVBD	MI	MII	Deg.
Adulto	631	18 (2.8%)	13 (2.1%)	7 (1.1%)	582 (92.2%) ^a	11 (1.7%)
Prepubere	710	33 (4.6%)	28 (3.9%)	8 (1.1%)	625 (88.%) ^a	16 (2.3%)

Tab 3. Progressione meiotica di oociti di pecora adulta e prepubere dopo maturazione in vitro.

(GV: vescicola germinale; GVBD: rottura della vescicola germinale; MI: metafase I; MII: metafase II; Deg.: degenerati)

SVILUPPO EMBRIONALE:

Cinetica delle prime divisioni embrionali

L'analisi dei dati relativi alla Tab. 4 rileva simili percentuali di divisioni embrionali totali dopo fertilizzazione in vitro di oociti di adulto (86%) e prepubere (81.4%) e dopo attivazione partenogenetica degli oociti di pecora (81.7%).

Differenze significativamente differenti sono state però riscontrate dalla comparazione dei tempi della prima divisione embrionale nei tre gruppi analizzati.

Infatti dopo 22 ore di coltura gli oociti di agnella fertilizzati in vitro hanno mostrato percentuali di divisione embrionale (18.7%) significativamente ($P < 0.01$) più basse rispetto al gruppo di oociti di adulta fertilizzati in vitro (46.7%) o attivati partenogeneticamente (41.2%). Dopo 26 ore di coltura i valori di divisione sono risultati sovrapponibili nei tre gruppi (adulto part: 33.8%; adulto IVF 32.7%; prepubere IVF: 33.6%) mentre dopo 30 ore è stato registrato un numero maggiore di divisione ($p < 0.01$) negli oociti di agnella fertilizzati in vitro (47.5%) rispetto agli oociti di pecora fertilizzati in vitro (20.6%) o attivati partenogeneticamente (25%).

n° embrioni divisi a differenti tempi post fertilizzazione					
(%)					
	n. oociti IVF	22 ore	26 ore	30 ore	Divisi totali
Adulto Part.	582	196 (41.2%) ^a	161 (33.8%) ^a	119 (25%) ^a	476 (81.7%) ^a
Adulto IVF	715	286 (46.7%) ^a	200 (32.7%) ^a	126 (20.6%) ^a	612 (86%) ^a
Prepubere IVF	625	96 (18.9%) ^b	171 (33.6%) ^a	242 (47.5%) ^b	509 (81.4%) ^a

Tab. 4. Percentuali di divisioni embrionali a 22, 26 e 30 ore post-fertilizzazione o dopo attivazione partenogenetica di oociti di pecora e di agnella.
(IVF: fertilizzazione in vitro; Part: Attivazione partenogenetica ; a vs b, P< 0.01; X² test)

SVILUPPO EMBRIONALE:

Cinetica di sviluppo allo stadio di blastocisti

Nella Tab. 5 sono riassunti i risultati relativi allo sviluppo embrionale in vitro fino allo stadio di blastocisti degli oociti di pecora e di agnella dopo 6, 7 e 8 giorni di coltura. Le percentuali di blastocisti totali sono risultate significativamente inferiori dopo fertilizzazione in vitro degli oociti di agnella (34.4%) rispetto agli oociti di adulto fertilizzati in vitro (71.6%) o attivati partenogeneticamente (65.5%).

Dalla comparazione dei tempi di sviluppo embrionale allo stadio di blastocisti emergono, dopo 6 giorni di coltura in vitro, valori significativamente inferiori negli oociti di agnella fertilizzati in vitro (8.7%) rispetto a quelli di adulto fertilizzati in vitro (31%) o attivati partenogeneticamente (33%). Dopo 7 giorni di coltura le percentuali di blastocisti sono risultate sovrapponibili nei tre gruppi (adulto part: 51.9%; adulto IVF 52.5%; prepubere IVF: 52.6%) mentre dopo 8 giorni è stato registrato un numero maggiore di blastocisti ($p < 0.01$) negli oociti di agnella fertilizzati in vitro (38.7%) rispetto agli oociti di pecora fertilizzati in vitro (18.7%) o attivati partenogeneticamente (19.5%).

sviluppo embrionale allo stadio di blastocisti a differenti tempi di coltura (%)					
	n°embrioni	6 giorno	7 giorno	8 giorno	blastocisti totali
Adulto	476	103	162	61	312
Part		(33%) ^a	(51.9%) ^a	(19.5%) ^a	(65.5%) ^a
Adulto	612	136	230	82	438
IVF		(31%) ^a	(52.5%) ^a	(18.7%) ^a	(71.6%) ^a
Prepubere	503	15	91	67	173
IVF		(8.7%) ^b	(52.6%) ^a	(38.7%) ^b	(34.4%) ^b

Tab. 5. Sviluppo embrionale in vitro allo stadio di blastocisti dopo 6°, 7° e 8° di coltura di oociti di pecora e agnella fertilizzati in vitro o attivati partenogeneticamente.
(a vs b, P< 0.01; X² test)

ANALISI MOLECOLARE

ESPERIMENTO 1

Espressione dei geni ZAR1, MATER, BMP15 e GDF9 in oociti immaturi e maturati in vitro di ovino adulto e prepubere.

Dall'analisi dei dati relativi ai 4 maternal effect genes considerati allo stadio di GV ed MII in oociti di ovino adulto e prepubere, si evince che non sono presenti differenze significative tra le classi prese in esame. I valori di espressione di ZAR1, MATER, GDF9 e BMP15 sono più alti negli oociti immaturi rispetto agli MII, ma in entrambi gli stadi non sono presenti differenze significative nell'espressione genica fra gli adulti e i prepuberi (Fig. 2).

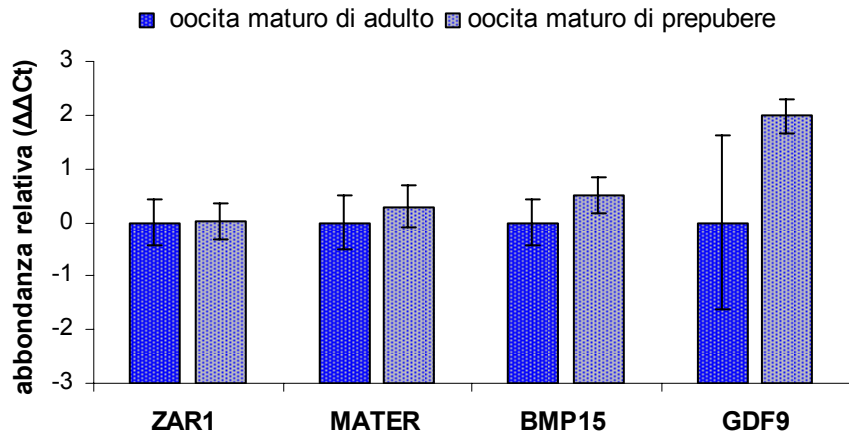
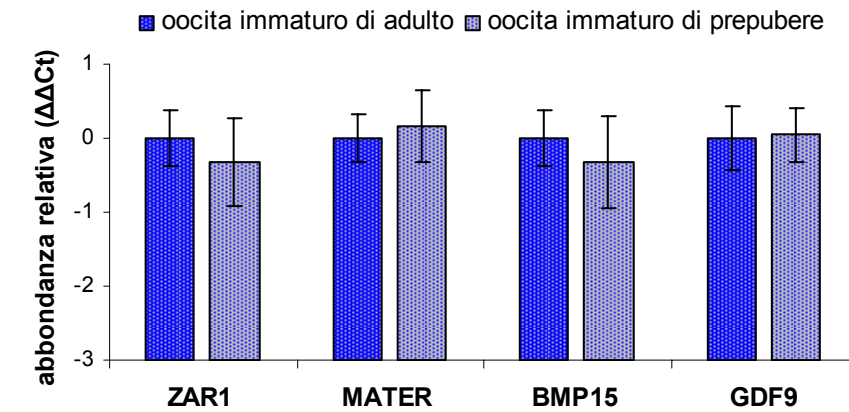


Figura 2. Espressione dei geni Zar1, MATER, BMP15 e GDF9 in oociti immaturi e maturati in vitro di ovino adulto e prepubere.

ESPERIMENTO 2

Espressione di un pannello di geni in oociti immaturi di ovino adulto e prepubere.

L'analisi semi-quantitativa dell'espressione di un pannello di geni in oociti immaturi di pecora e di agnella ha messo in evidenza una carenza di trascritti dei geni P34^{cdc2}, NaKATPasi, Poli A Polimerasi e E-Caderina negli oociti di prepubere, mentre nessuna differenza tra le due classi è stata riscontrata per i geni Ciclina B1, istone H2A.Z e GAPDH (Fig. 3).

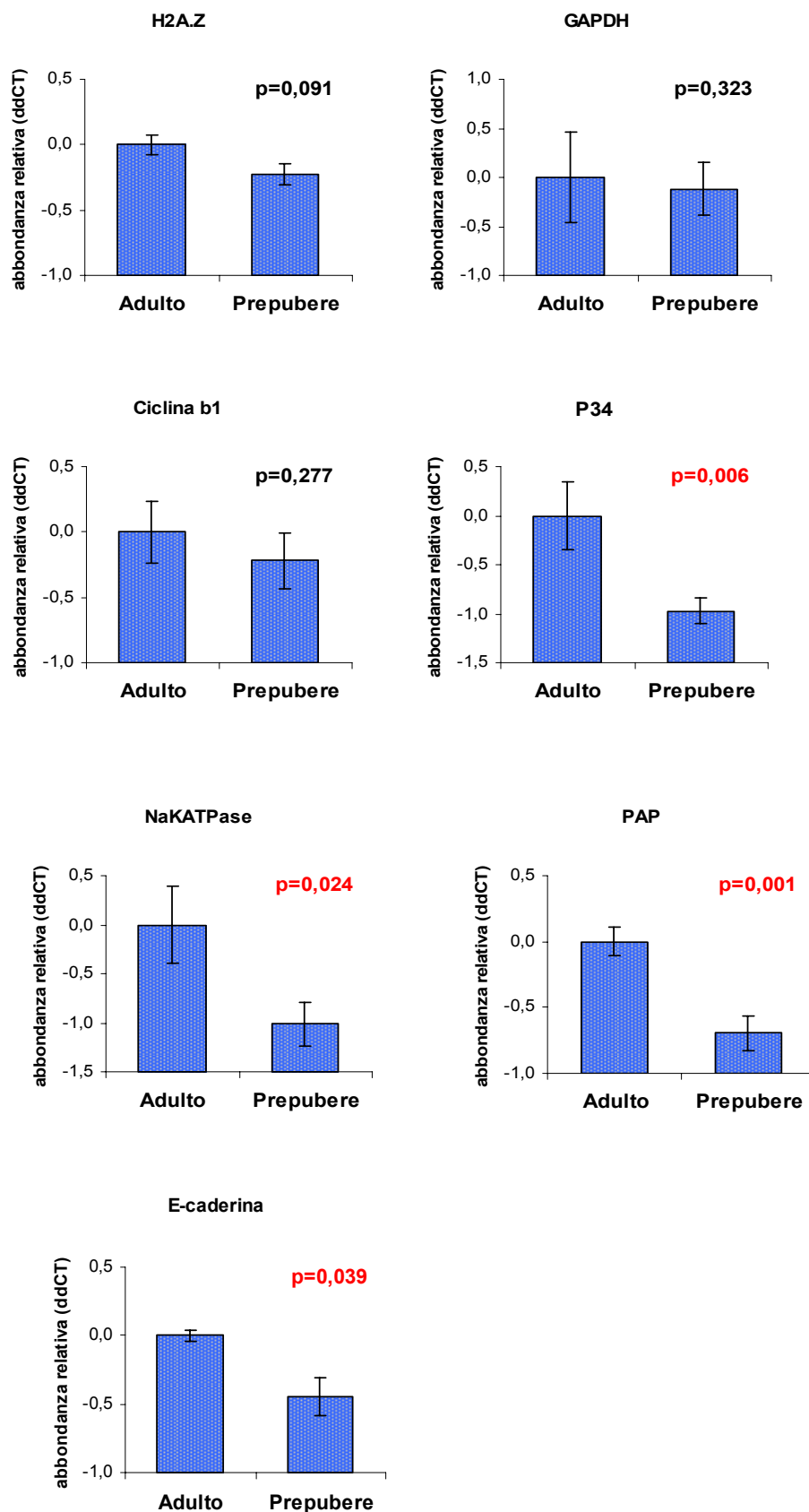


Figura 3: Espressione di un pannello di geni in oociti immaturi di ovino adulto e prepubere.

ESPERIMENTO 3

Espressione dei geni ZAR1, MATER, BMP15 e GDF9 durante lo sviluppo pre-impianto in vitro nell'ovino.

La quantificazione relativa dei trascritti di ZAR1, MATER, GDF9 e BMP15 durante lo sviluppo pre-impianto in vitro indica che nessuno di questi permane stabile e ubiquitario durante le otto fasi prese in esame [oocita immaturo (GV), maturo (MII), 2, 4, 8, 16 cellule, Morula e Blastocisti]. Tutti i geni risultano maggiormente espressi negli oociti immaturi, ma mostrano livelli diversi durante le successive fasi di sviluppo, dimostrando patterns di espressione caratteristici per ogni gene. Nessun trascritto mostra un significativo incremento dell'espressione dovuto alla ripresa della trascrizione con l'attivazione del genoma embrionario. Fa eccezione il gene codificante la β -actina, che è stato infatti analizzato per fornire l'esempio di un gene la cui espressione riprende con l'attivazione del genoma dell'embrione.

I livelli di mRNA del gene ZAR1 registrano tre significativi decrementi durante lo sviluppo embrionale, rispettivamente nel passaggio fra il GV e l'MII, fra le 4 e le 8 cellule e fra le 8 e le 16 cellule, dove il suo livello raggiunge i valori minimi.

Dopo una significativa riduzione durante la maturazione dell'oocita, il livello di mRNA di MATER permane stabile fino a 8 cellule, quando si registra un rapido e significativo decremento, dopo il quale la presenza trascritto è difficilmente rilevabile.

L'espressione di GDF9 subisce un decremento significativo durante la maturazione dell'oocita, al passaggio fra 4 e 8 cellule e fra 16 cellule e morula. Diversamente dagli altri geni analizzati, i trascritti di questo gene sono presenti anche nella fase di morula.

BMP15 è l'unico maternal effect gene analizzato i cui livelli di mRNA non diminuiscono durante la maturazione dell'oocita. La quantità dei suoi trascritti rimane costante durante le fasi precoci di sviluppo embrionale, fino ad un significativo decremento allo stadio di 8 cellule, oltre il quale l'mRNA non è quasi più rilevabile.

I trascritti del gene di controllo β -actina presentano un decremento durante la maturazione e in corrispondenza del passaggio da 4 a 8 cellule. La sua trascrizione riprende con l'attivazione del genoma embrionario, dopo il quale si osservano significativi incrementi sia allo stadio di morula che di blastocisti (Fig. 4).

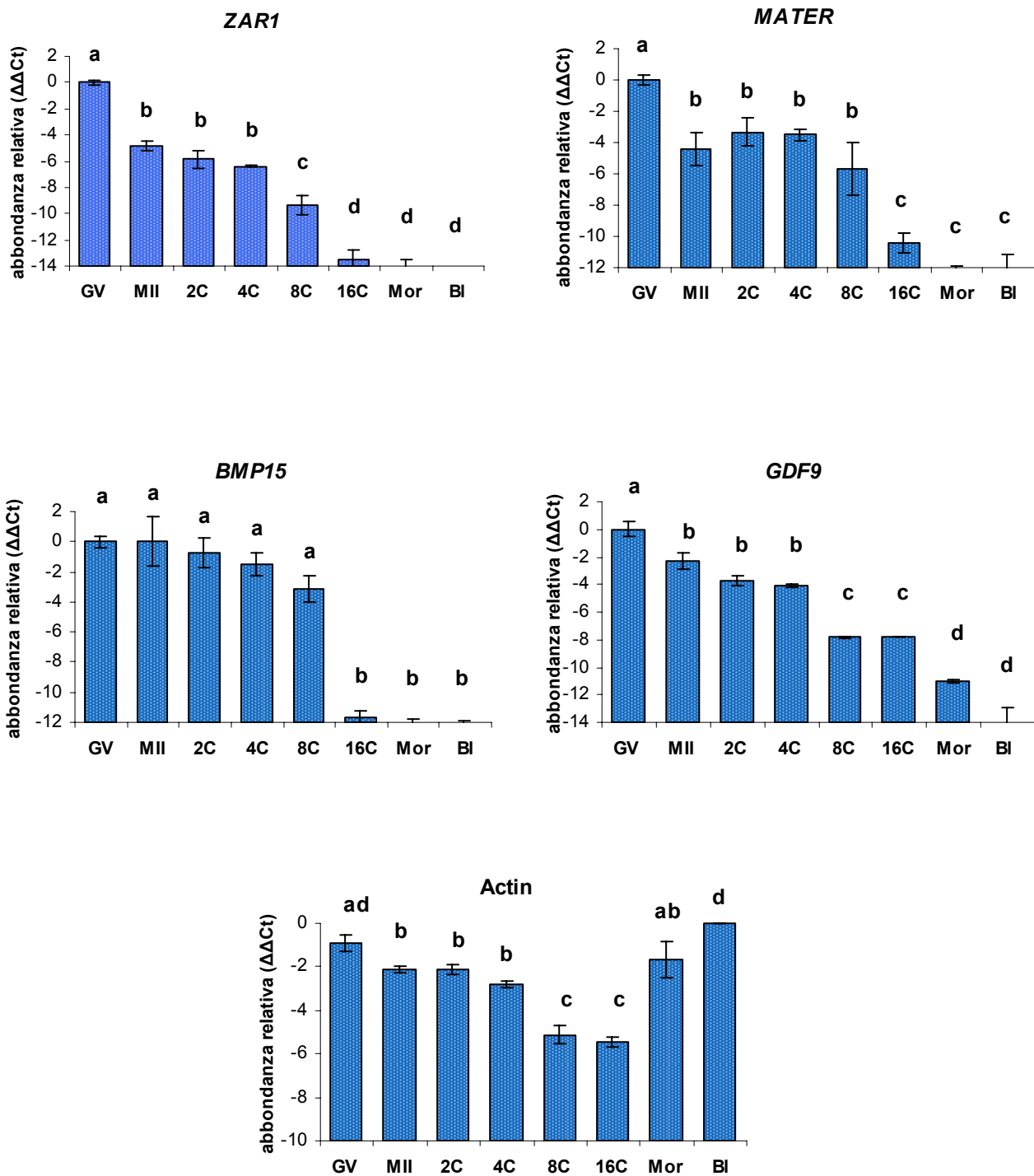
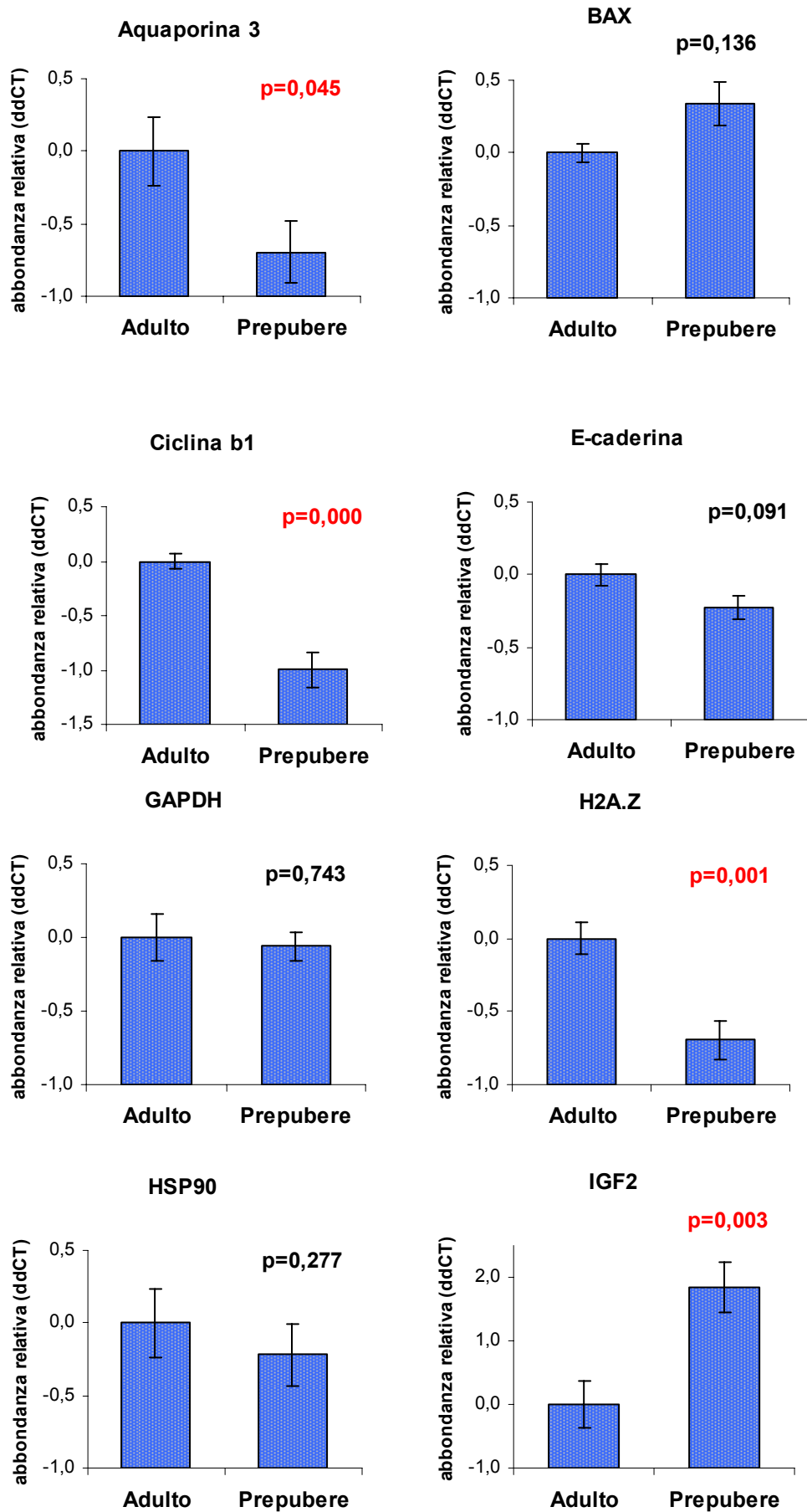


Figura 4. Espressione dei geni Zar1, MATER, BMP15, GDF9 e Actina durante lo sviluppo pre-impianto in vitro nell'ovino (GV: oocita immaturo, MII: oocita maturo, 2C: embrione a 2 cellule, 4C: embrione a 4 cellule, 8C: embrione a 8 cellule, 16C: embrione a 16 cellule, Mor: morula e BI: blastocisti)

ESPERIMENTO 4

Espressione di un pannello di geni in blastocisti di ovino adulto e prepubere.

L'analisi dell'espressione genica in blastocisti di ovino adulto e di prepubere prodotte in vitro ha evidenziato, (Fig. 5) una maggiore abbondanza dei trascritti dei geni Aquaporina 3, Cyclina B, H2A.Z, Nanog, Oct4 e P34^{cdc2} negli embrioni di adulto rispetto a quelli di prepubere, mentre i trascritti di IFN tau e IGF2 sono risultati significativamente più abbondanti negli embrioni di agnello rispetto a quelli di pecora. Non sono state rilevate differenze significative per gli altri geni analizzati (BAX, E-Caderina, GAPDH, HSP90, IGF2R, NaKATPasi e PAP).



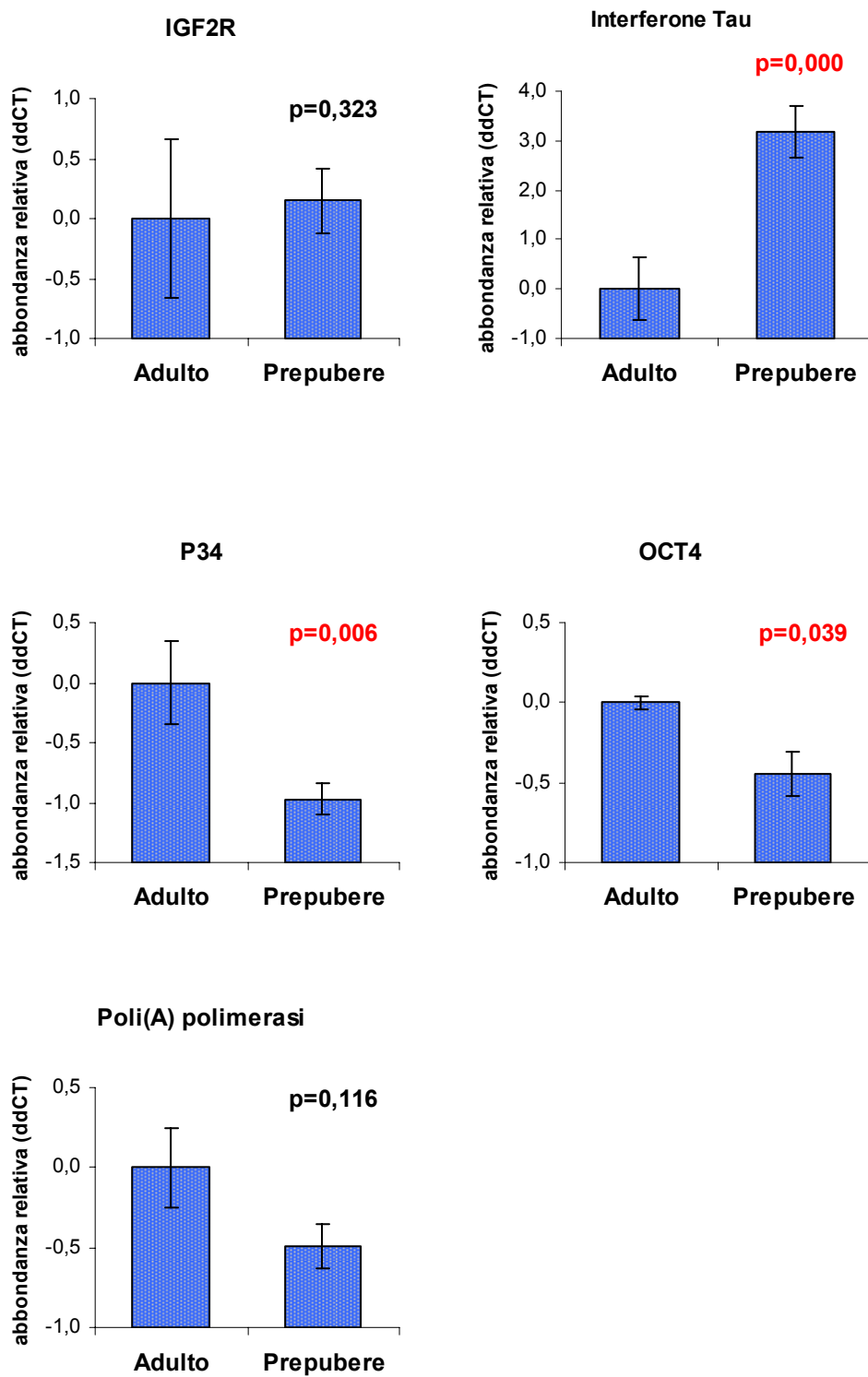


Figura 5. Espressione di un pannello di geni in blastocisti di ovino adulto e prepubere.

ESPERIMENTO 5

Espressione di un pannello di geni in blastocisti di prepubere prodotte in vitro e in vivo.

L'analisi dell'espressione genica negli embrioni sviluppati in vivo ed in vitro di ovino prepubere ha dimostrato un'abbondanza significativamente maggiore dei trascritti dei geni NaKATPasi, IGF2R e Nanog degli embrioni prodotti in vitro rispetto a quelli in vivo, mentre non sono state rilevate differenze per i geni OCT4, Aquaporina 3, E-caderina e IGF2 nei due gruppi di embrioni analizzati (Fig.6)

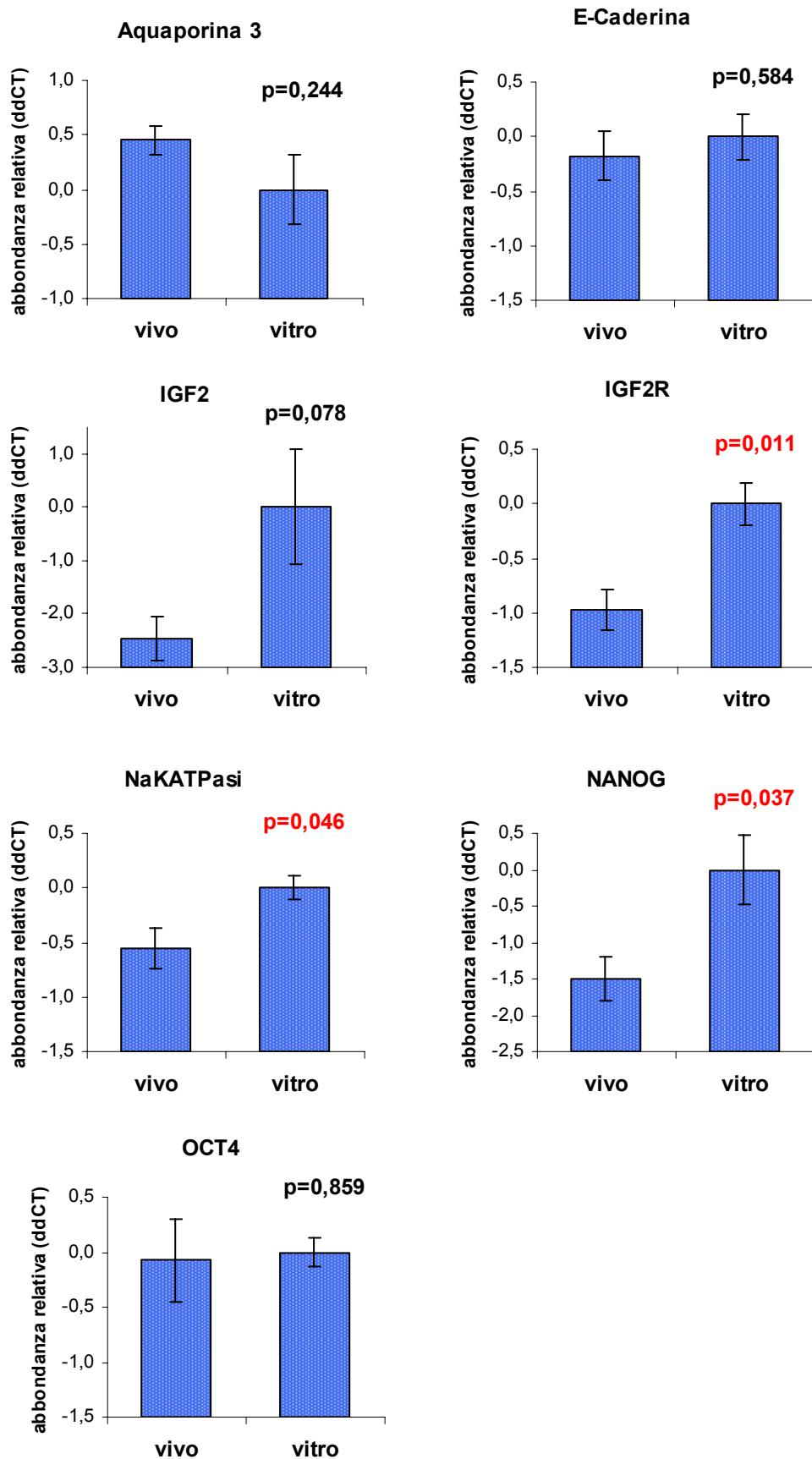


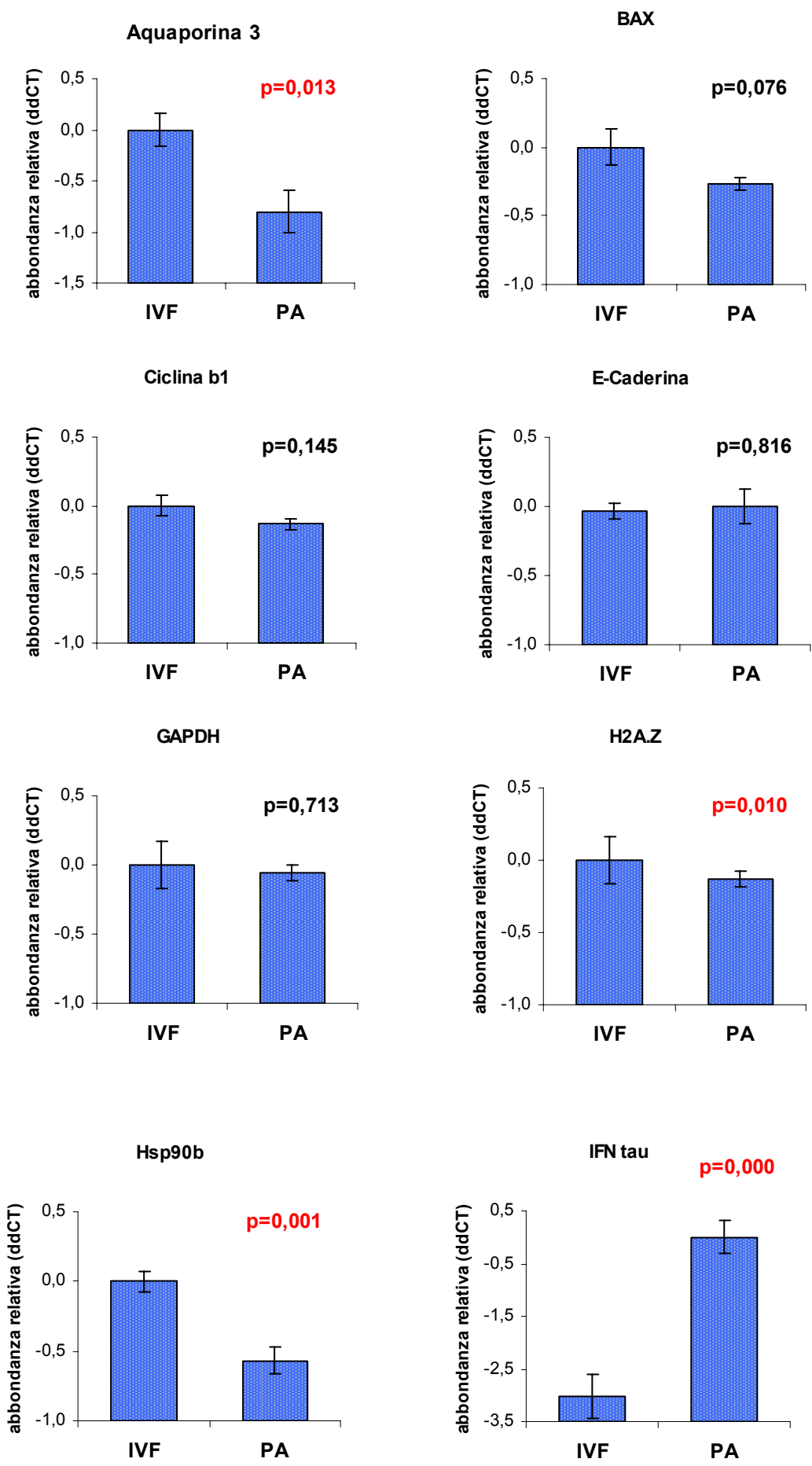
Figura 6. Espressione di un pannello di geni in blastocisti di prepubere prodotte in vitro e in vivo.

ESPERIMENTO 6

Espressione di un pannello di geni in blastocisti prodotte tramite fertilizzazione in vitro e attivazione partenogenetica.

Sono stati determinati i livelli di espressione di un pannello di geni in blastocisti di ovino adulto ottenute tramite fecondazione in vitro (IVF) o attivazione partenogenetica (PA).

L'analisi ha messo in evidenza differenze significative per alcuni dei geni analizzati: i trascritti di IGF2, IFN tau e P34^{Cdc2} sono maggiormente presenti negli embrioni partenogenetici rispetto a quelli IVF, mentre Aquaporina 3, H2A.Z, HSP90b, NaKATPasi e Oct-4 sono maggiormente espressi nelle blastocisti IVF rispetto a quelle partenogenetiche. Non sono state osservate differenze sostanziali nei trascritti per gli altri geni analizzati (Fig.7).



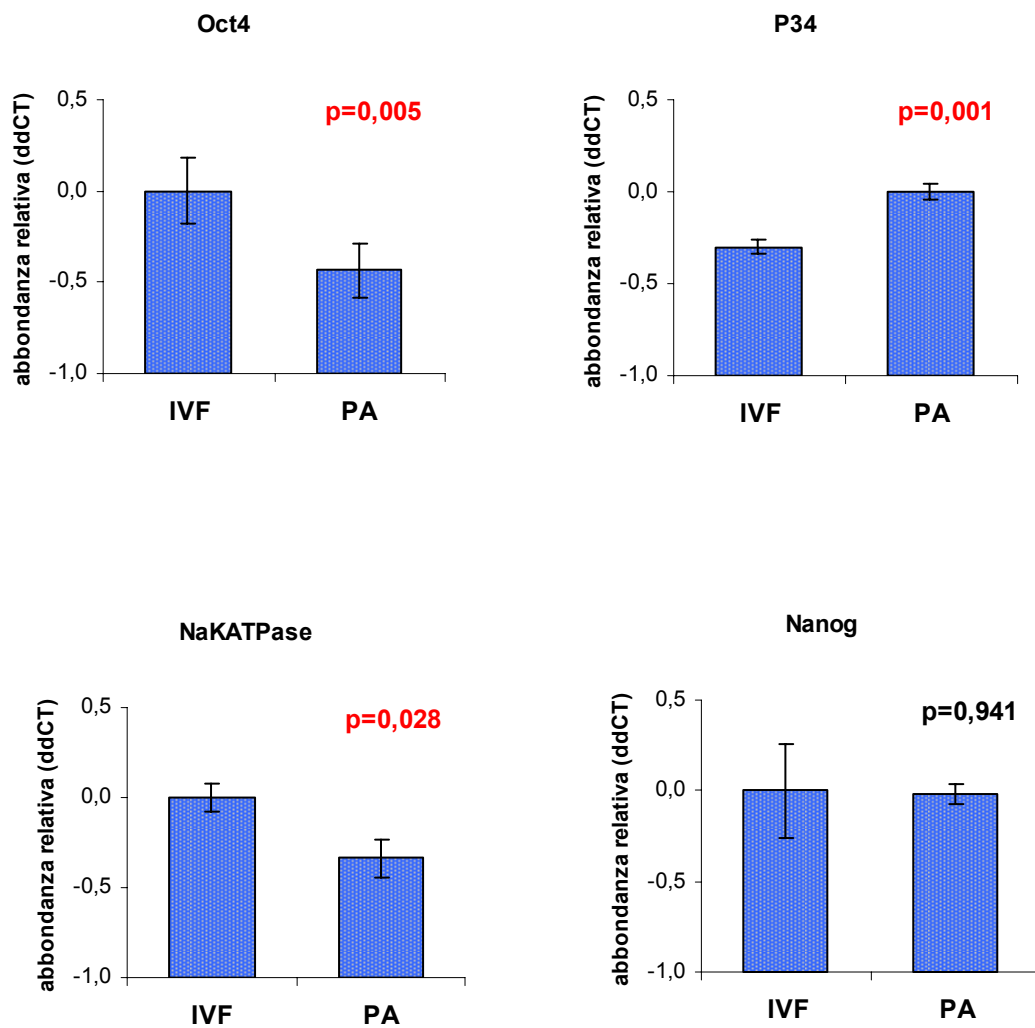


Figura 7. Espressione di un pannello di geni in blastocisti prodotte tramite fertilizzazione in vitro (IVF) e attivazione partenogenetica (PA)

DISCUSSIONE

Come riportato negli scopi di questo nostro lavoro sperimentale il nostro intento è stato principalmente quello di meglio analizzare la qualità dell'ocita e dell'embrione nella specie ovina impiegando metodologie di biologia molecolare. L'individuazione di nuovi e misurabili criteri di qualità rappresentano di fatto un requisito essenziale per assicurare un'applicazione efficace delle pratiche di produzione embrionale in vivo ed in vitro. Le attuali metodologie di valutazione, infatti, come ben documentato da numerose ricerche precedenti, considerano maggiormente indicatori morfologici, mentre solo più recentemente si stanno utilizzando specifici markers molecolari. Nell'ocita, attualmente, i criteri maggiormente impiegati si basano sulla: valutazione della morfologia del complesso cumulo-ocita, sulla presenza di un numero consistente di strati di cellule del cumulo, sull'aspetto del citoplasma, sulla morfologia del fuso meiotico e sulle caratteristiche del globulo polare. Anche per quanto riguarda l'embrione le valutazioni sono principalmente di tipo morfologico e molto spesso si considerano come criterio di un buon sviluppo le performance in vitro degli embrioni in coltura registrando le percentuali di divisione embrionale e tempi di divisione; le percentuali e tempi di sviluppo allo stadio di blastocisti, la formazione ed espansione della cavità blastocelica, il numero cellulare, il rapporto fra le cellule l'Inner Cell Mass (ICM) e le cellule del trofoblasto. Con l'ausilio della biologia molecolare, è possibile associare alle osservazioni morfologiche, sempre valide in quanto non invasive, l'analisi semi-quantitativa e quantitative dei trascritti di mRNA stoccati all'interno del citoplasma degli oociti e degli embrioni e utilizzare questi come indicatori delle attività biochimico molecolari prevalenti per esprimere la potenziale vitalità del germoplasma.

Sulla base di queste considerazioni, il nostro lavoro ha avuto come obiettivo principale quello di analizzare i profili di espressione genica, in oociti ed embrioni di ovino e tentare di correlare questi livelli di espressione con la capacità di sviluppo in vitro. Le prove sperimentali hanno previsto

l'impiego di materiale germinale proveniente da animali adulti e prepuberi per verificare la piena capacità di sviluppo in un modello caratterizzato da alto (high quality) e basso (low quality) potenziale di sviluppo. Si è valutato anche l'effetto esercitato dalla presenza di diverse condizioni culturali e la capacità allo sviluppo in assenza di fertilizzazione mediante la genesi di embrioni monoparentali (partenogenesi).

Le differenze di competenza allo sviluppo tra oociti provenienti da soggetti prepuberi ed adulti (tabella 4), non sono riscontrabili nei primi eventi riproduttivi. Gli oociti di prepubere infatti, una volta rimossi dal follicolo, sono in grado di riprendere e completare la meiosi in percentuali e tempi sovrapponibili a quelli degli adulti (O'Brien et al. 1996, Ledda et al. 1997) mentre differenze significative, verosimilmente dovute ad una parziale immaturità citoplasmatica e nucleare, si evidenziano in fasi successive dello sviluppo preimpianto con un ritardo nella cinetica replicativa, e soprattutto un minor numero totale di blastocisti. (Tab. 5).

Il primo ciclo mitotico dell'oocita fecondato presenta nel prepubere un ritardo di circa 2 h rispetto agli oociti di adulta, con un massimo di divisioni intorno alla 30 h post-fertilizzazione. Nell'adulto la percentuale più alta di prima segmentazione si ha, come mostrato in Tabella (n. 4), alla 22 h post-fertilizzazione.

La ridotta velocità replicativa non è stata evidenziata da alcuni autori (Kochhar et al. 2002) mentre è stata confermata da altri (Ptak et al. 1999). Il tempo della prima divisione viene utilizzato in umana come parametro non invasivo per valutare la qualità e lo sviluppo potenziale degli embrioni (Lechniak D. et al. 2007) e gli zigoti che si dividono prima hanno maggiori chances di sviluppare a blastocisti.

La minore competenza dell'oocita di prepubere è verosimilmente dovuta a differenti limitazioni morfo-funzionali come: diametro inferiore, disaccoppiamento fra le cellule del cumulo e l'oocita stesso, minor presenza di fibre trans zonali, inferiore utilizzazione degli amino acidi, metabolismo inferiore ed una ridotta sintesi proteica (O'Brien et al. 1996; Ledda et al. 1996; 1997), ma potrebbe anche essere ascrivibile a difetti trasduzionali e trascrizionali. Infatti il ritardo nello sviluppo

rilevabile nelle prime fasi replicative permane anche nelle fasi di sviluppo successive (stadio di morula/blastocisti). Si osserva infatti, nell'agnella (Tab. n. 5) un rallentamento nello sviluppo embrionale di circa 24h, con una maggiore produzione di blastocisti fra il giorno 7 e 8 (53.4%; 38.6%) mentre per quanto riguarda l'adulto lo sviluppo a questo stadio si ha fra il 6 e 7 giorno (33%, 51%). In accordo in parte con le nostre conclusioni, Majerus et al (2000) ha osservato, un sostanziale ritardo nella formazione e compattazione della morula del prepubere, ritardo però che non si evidenzia allo stadio di blastocisti.

Le insufficienti e talvolta contraddittorie informazioni morfologiche ci hanno indotto a svolgere le successive indagini di carattere molecolare. Lo scopo è stato quella di verificare da una parte se la minor efficienza del gamete prepubere fosse correlata ad un differente quadro di espressione genica e dall'altra identificare un pannello di geni rappresentativo da utilizzare per valutazione della qualità degli oociti e degli embrioni. Tali informazioni potranno essere utili per migliorare l'efficienza delle biotecnologie riproduttive in vitro.

Per meglio comprendere i risultati che sono emersi dalla ricerca nel suo complesso e dare un senso lineare alle indagini sperimentali la discussione verrà affrontata per singolo esperimento.

Esperimento 1

Come dettagliatamente riportato nei paragrafi introduttivi ed in particolare in quello relativo alla presenza di fattori trascrizionali accumulati durante l'accrescimento della cellula uovo l'intento del primo esperimento è stato quello di verificare comparativamente i livelli di 4 Maternal Effect Genes (MEGs), ZAR1, MATER, GDF9 e BMP15, in oociti di ovino prepubere ed adulto, prima e dopo la maturazione meiotica (stadio GV ed M II). Il coinvolgimento dei MEGs durante la maturazione meiotica è stata ben documentata nel topo (Dean 2002; Rajkovic e Matzuk 2002; Dade et al. 2004) e solo marginalmente in altre specie animali. I MEGs rivestono un'importanza particolare nelle prime divisioni embrionali (Dean 2002) e vengono differenzialmente espressi fino all'attivazione del genoma embrionario.

La partecipazione dei MEGs nella regolazione nella maturazione meiotica e nelle prime fasi embriogenetiche è chiaramente evidenziata dagli esperimenti di knock-out nel topo. Topi nei quali è stata abolita la funzione genica dei MEGs presentano evidenti alterazioni della fertilizzazione e blocco più o meno precoce della segmentazione dell'embrione. L'attività regolatrice di questi fattori di origine materna è presente in momenti diversi dall'iniziale follicologenesi allo sviluppo preimpianto. Nel caso di MATER infatti, gene di origine materna caratterizzato per la prima volta nel topo (Tong e Nelson 1999; Tong et al. 2000), si è osservato come sia indispensabile nello sviluppo embrionale ai primi stadi e non tanto nella regolazione della progressione meiotica. I topi privati di MATER evidenziano un blocco delle segmentazioni dopo il primo ciclo mentre, gli eventi precedenti le divisioni embrionali quali maturazione, ovulazione e fertilizzazione non vengono compromessi. La presenza di MATER, con pattern espressivi abbastanza simili a quelli evidenziati nel topo è stata dimostrata anche nel bovino (Pennetier et al. 2006) e nell'uomo (Tong et al. 2002).

ZAR-1 è un altro maternal gene indispensabile nella regolazione del normale sviluppo embrionale. Topi con una mutazione di questo gene sono infertili e gli embrioni che non esprimono ZAR-1 mostrano un blocco allo stadio di zigote con una inibizione marcata alla singamia (Wu et al. 2003a). La presenza di questo gene è stata riportata anche in oociti ed embrioni di maiale e bovino (Brevini et al. 2004; Pennetier et al. 2004; Uzbekova et al. 2006).

GDF9 e BMP15 sono dei geni appartenenti alla super-famiglia del transforming growth factor- β . Sono dimostrati essere dei regolatori essenziali della maturazione dell'oocita e della follicologenesi nei roditori, nelle pecore, e nella specie umana (Elvin et al 2000; Chang et al. 2002; McNatty et al. 2003; Di Pasquale et al. 2004; Shimizu et al. 2004). Entrambe le proteine sono maggiormente espresse negli oociti, secrete dalle cellule del cumulo ooforo (McNatty et al. 2005) e sono coinvolte nella regolazione di molti dei principali eventi essenziali della follicologenesi (Galloway et al. 2000; Shimasaki et al. 2004). Mutazioni nell'espressione di entrambi i geni hanno portato ad un

incremento del tasso di ovulazione negli individui eterozigoti mentre, in condizioni di omozigosi inducono forme di sterilità (Hanrahan JP et al.2004).

Per quanto attiene la specie ovina, come già riportato in precedenza, non sono presenti informazioni in letteratura. I nostri risultati, comparando i livelli di espressione genica di questi maternal genes, negli oociti in GV ed in MII di adulta e prepubere non ha messo in evidenza delle differenze significative fra le due classi di oociti analizzate. Gli mRNA sono maggiormente espressi negli oociti immaturi mentre tendono ad essere meno espressi in quelli maturi. L'assenza di differenze significative, fra la classe di prepubere ed adulto, dimostra come i deficit dell'oocita prepubere non siano ascrivibili alla funzione di questi geni, ma probabilmente, sono dovuti ad altri fattori coinvolti nella regolazione della progressione meiotica. È inoltre probabile che lo stoccaggio dei trascritti di questi Maternal Effect Genes avvengano già nelle prime fasi della follicologenesi, come dimostrato dalla presenza di ZAR1 (Wu et al. 2003a) e GDF9 e BMP15 nell'oocita primario (McNatty et al. 2006). Inoltre è possibile che i deficit riscontrati nell'oocita prepubere coinvolgano, non solo la trascrizione dei filamenti di DNA complementare, ma alterino gli eventi post-trascrizionali delle stesse. L'assenza di livelli di espressione nelle due classi di oociti è confermata da indagini svolte nella specie bovina dove non sono state rilevate differenze significative tra oociti maturati in vivo ed in vitro.

Va inoltre considerato che la presenza di livelli simili di mRNA fra prepubere ed adulto, non sia sufficiente per indicare la piena competenza dell'oocita. Non sempre vi è infatti corrispondenza tra i livelli di mRNA e quantitativi proteici. Studi di genomica funzionale che analizzino la reale presenza delle proteine omologhe fornirebbe un'informazione più precise capacità reali di sviluppo dell'oocita prepubere.

Nonostante le funzioni esatte di questi MEGs non siano completamente chiarite, l'indagine condotta nelle due classi di oociti ci ha permesso di caratterizzare, per la prima volta, ZAR1 e MATER come Maternal Effect Genes presenti anche nell'ovino. Il loro coinvolgimento nella progressione meiotica in vitro risulta simile a quello osservato nelle altre specie di interesse veterinario

Esperimento 2

Mentre non sono rilevabili differenze significative nelle fasi di maturazione dell'ooocita da adulto e prepubere relativamente agli maternal effect genes il quadro di espressione genica risulta essere abbastanza differente per altri geni coinvolti nelle prime regolazioni funzionali.

Gli esperimenti di confronto tra le due classi di oociti immaturi e sono stati effettuati in due fasi consequenziali. Nella prima prova abbiamo selezionato un pannello di 7 geni legati alle prima fasi di sviluppo, ed abbiamo eseguito la quantificazione degli RNAm presenti. I geni che abbiamo analizzato sono tra i trascritti già impiegati da altri autori come indicatori della qualità degli oociti e degli embrioni poiché coinvolti in vari meccanismi di sviluppo dell'ooocita e dell'embrione pre-impianto (Wrenzycky et al. 1999, 2001, Knijn et al., 2002; Rizos et al. 2002; 2004; Morton et al. 2007). In dettaglio, sono stati analizzati: E-Caderina, importante nella compattazione e cavitazione, H2A.Z, funzioni costitutive delle cellule, GAPDH, gene legato al metabolismo del gamete, Cyclina b1 e P34, sub-unità catalitiche dell'MPF, complesso kinasico che regola il ciclo cellulare delle cellule, NaKATPase, proteina di membrana indispensabile per regolare i flussi di ioni e controllare il volume cellulare.

L'analisi dell'espressione genica ha messo in evidenza una maggiore abbondanza di PAP, E-Caderina, NaKATPase e P34 in oociti di pecora adulta rispetto al prepubere mentre nessuna differenza statisticamente significativa è stata notata per i geni Cyclina b1, GAPDH e H2A.Z.

Il gene P34, sintetizza una proteina costituente una sub-unità del Maturation Promiting Factor (MPF; Gautier et al. 1990), complesso proteico ad attività chinasi regolatore universale del ciclo cellulare. Il P34 rappresenta la subunità catalitica del complesso, mentre la ciclina-b1, rappresenta la sub-unità regolatrice. La loro azione si esplica nella regolazione sia delle varie fasi del ciclo mitotico che di quelle meiotiche.

L'attività dell'MPF negli oociti di mammifero è stata ben caratterizzata in diverse specie. L'azione più evidente nella sua forma attiva è la capacità di indurre rapidamente la condensazione della cromatina. Tale capacità viene raggiunta nelle fasi finali dell'accrescimento per cui l'abilità

dell'ooocita di riprendere la meiosi è associata all'attività del complesso dell'MPF, la cui attivazione è sottoposta a controlli specie-specifici (Yamashita et al, 2000). Nel topo, perché si raggiungano sufficienti livelli di MPF tali da indurre la ripresa e progressione della meiosi è necessaria la sintesi di p34^{cdc2} (Chesnel and Eppig, 1995; de Vantéry et al, 1996; de Vantéry et al, 1997; Kanatsu-Shinohara et al, 2000). Quindi è l'assenza di uno dei due componenti del complesso proteico che mantiene l'ooocita in arresto meiotico. Nella capra (Dedieu et al, 1998; Christmann et al, 1994) e nel suino (Kanatsu-Shinohara et al, 2000; Naito et al, 1995) tale sintesi non sembra essenziale e entrambe le sub-unità sono presenti in oociti competenti. E' verosimile che l'azione di ulteriori proteine ad attività chinasi o modificazioni delle stesse siano necessarie per regolare l'attivazione dell'MPF. Nel caso del bovino pare ci sia una regolazione unica rispetto agli altri mammiferi, in quanto la ripresa della meiosi è regolata dalla traduzione dell'mRNA della ciclina-b (Robert et al, 2002). Tali autori hanno infatti osservato negli oociti in GV la costante presenza della proteina p34^{cdc2} ma non della ciclina-b, presente solo come mRNA, la cui traduzione provoca l'attivazione dell'MPF. Tali osservazioni sono in accordo con i precedenti risultati di Lévesque e Sirard (1996), che mostrano come gli oociti di bovino non siano in grado di riprendere la meiosi in presenza di cicloesimide, un inibitore della sintesi proteica (traduzione), ma che tale inibizione può essere superata con la microiniezione di ciclina-b esogena.

Analizzando i livelli di espressione delle due subunità costitutive il complesso MPF la p34^{cdc2} e la ciclina-b, abbiamo riscontrato nelle due classi di oociti la presenza di entrambi gli mRNA, ma con una differenza significativa nella quantità di p34^{cdc2}, che risulta minore negli oociti di prepubere. Viceversa i livelli di ciclina B non risultano differenti.

Nostri studi precedenti hanno messo in evidenza (Ledda et al, 2001) come, durante i vari stadi della meiosi, l'attività dell'MPF in oociti di pecora adulta e di prepubere, è paragonabile fino alla MI. A questo stadio il complesso proteico viene degradato, per proteolisi ubiquitina-dipendente di uno dei suoi componenti, e la conseguente diminuzione dell'attività chinasi del complesso favorisce la progressione allo stadio successivo di anafase. La successiva sintesi proteica ne ricompone le

riserve e dopo attivazione del complesso permette la condensazione cromatinica e la progressione allo stadio di MII. Le nostre indagini hanno mostrato come proprio in questo stadio si registra un'attività è minore negli oociti di prepubere rispetto alla controparte adulta. Tali avvenimenti, alla luce dei risultati da noi ottenuti, potrebbero essere spiegati dalla presenza di una quantità sufficiente di enzima nelle due classi di oociti in GV, che viene utilizzato sino allo stadio di MI. Dopo la degradazione proteolitica e la successiva ricostituzione a partire da mRNA stoccati, è possibile che negli oociti di prepubere ci sia una quantità insufficiente di trascritti di p34^{cdc2} che limita quantitativamente la sintesi dell'enzima causando l'osservata inferiore attività negli oociti di prepubere.

La sintesi delle due sub-unità in tempi diversi della maturazione dell'oocita suggerisce che, nella specie ovina, la regolazione dell'enzima può dipendere dalla traduzione del p34^{cdc2}, in maniera simile a come avviene nel topo.

In accordo con l'ipotesi di una minore competenza meiotica degli oociti di prepubere causata da un generale insufficiente accumulo di trascritti, abbiamo rilevato carenza di mRNA di proteine la cui funzione è coinvolta in molteplici meccanismi, importanti per tutte le fasi supportate dagli mRNA di origine materna.

Le variazioni di questi pattern potrebbero rappresentare un'utile chiave di lettura per giustificare la qualità inferiore del prepubere rispetto all'adulto. Una migliore conoscenza del modello di espressione genica, durante la fase di sviluppo pre-impianto, sarebbe auspicabile e potrebbe apportare nuove conoscenze che permettano di ottimizzare i sistemi di cultura e produzione in vitro di embrioni.

Esperimento 3

Come già evidenziato in altri paragrafi i MEGs sono coinvolti nelle fasi che precedono l'attività neotrascrizionale dell'embrione, cioè prima dell'attivazione del genoma embrionale. Tale attivazione nella specie ovina avviene allo stadio embrionale di 8-16 cellule. Per questa ragione abbiamo inteso valutare la presenza e l'andamento dinamico dell'espressione di MATER, ZAR 1,

GDF 9 e BMP15 in tutte le fasi dello sviluppo preimpianto. Poiché nell'esperimento precedente non sono state osservate differenze significative tra gli oociti provenienti da animali prepuberi e da adulti in questa prova non sono stati considerati gli embrioni di prepubere e l'andamento è stato valutato solo negli embrioni di adulto. Abbiamo considerato gli stadi di oocita immaturo (GV), maturo (MII), a 2 cellule (2C), 4 cellule (4C), 8 cellule (8C), 16 cellule (16C), Morula e Blastocisti. I risultati hanno mostrato un pattern espressivo abbastanza simile nei MEGs. Tutti i trascritti risultano più abbondanti negli oociti immaturi rispetto a quelli allo stadio di MII degradando progressivamente nelle fasi successive alla fertilizzazione. Anche nell'embrione della specie ovina, similmente a quanto evidenziato nel topo, nel bovino e nel maiale, MATER, ZAR1, BMP15 e GDF9 non si osserva nessuna trascrizione dopo l'attivazione del genoma embrionale. Per questa ragione riteniamo possano essere classificati come geni di sola origine materna.

Una più attenta valutazione dell'andamento dei singoli MEGs evidenzia come ZAR1 possa essere uno dei geni di origine materna (maternal effect gene) maggiormente coinvolto nella fase di transizione dal controllo materno a quello fetale. Nelle nostre prove abbiamo osservato tre fasi significative di riduzione dell'espressione durante lo sviluppo in vitro, e livelli appena rilevabili dopo l'attivazione del genoma. Due dei tre decrementi significativi nell'espressione di ZAR1 coincidono esattamente con due importanti eventi dello sviluppo pre-impianto, ovvero la maturazione dell'oocita e la transazione dal controllo materno a quello embrionale (fase tra 8-16). E' verosimile che il decremento dei trascritti di mRNA di ZAR1 siano da collegare ad una loro traduzione nelle proteine codificanti e, il fatto che ciò coincida con queste due importanti fasi, evidenzia l'importanza funzionale di questo gene durante la maturazione meiotica e l'attivazione del genoma embrionale. Il profilo temporale di espressione del gene ZAR1 nella specie ovina è del tutto simile a quella descritta in altre specie: decremento della quantità dei trascritti durante le prime fasi di sviluppo embrionale, con un calo repentino in concomitanza con la transazione materno-fetale. Tale profilo è stato già registrato nel topo (Wu et al. 2003a) e maiale (Uzbekova et al. 2006), ma risulta differente rispetto a quello che è stato riscontrato nel bovino. Pennetier et al.

(2004) hanno confermato nei loro lavori una riduzione nell'espressione di ZAR1 durante la prime fasi di sviluppo dell'embrione, con una mancanza di eventi trascrizionali dopo l'attivazione del genoma. Tuttavia, Brevini et al.(2004) hanno osservato invece la presenza di frammenti di mRNA relativi a ZAR1 della grandezza di 126bp fino allo stadio di blastocisti. Non è da escludere come recentemente pubblicato sempre da Brevini e coll. che ZAR 1 sia presente in diverse isoforme di cui una , sotto l'aspetto funzionale, appartenente ai MEGs ed altre coinvolte in regolazioni differenti. La distribuzione tissutale di ZAR 1 non sembra infatti relegate al solo ovaio ma il gene è stato identificato anche in altri distretti tissutali.

Anche per MATER come ZAR 1 abbiamo descritto per la prima volta la presenza del gene nella pecora con una percentuale di omologia del 93% con il bovino, del 65% con l'uomo e del 12% nel topo. Il profilo di espressione genica è simile a quella che abbiamo osservato per ZAR1, con una significativa riduzione dei trascritti durante la maturazione degli oociti e nelle fase compresa fra 8 e 16 cellule. Questo gene appare pertanto coinvolto anche nell'ovino nelle prime fasi embrionali e nella transizione materno embrionale. In realtà, la precisa funzione di MATER deve essere ancora chiarita, ma il suo ruolo nell'attivazione del genoma appare chiaro in considerazione del fatto che, gli embrioni di topo non sono capaci di progredire oltre lo stadio di 2-4 cellule se privati di questo specifico gene (Tong et al. 2000). Nel topo la quantità dei trascritti di mRNA decresce durante la maturazione degli oociti e, MATER risulta non presente nella fase di sviluppo pre-impianto (Tong et al. 2004). Nel bovino la presenza dei trascritti di tale gene sono rilevabili dallo stadio di GV fino allo stadio di 5-8 cellule (Penetier et al. 2004). Un significativo decremento degli mRNA è stato osservato durante le prime fasi di sviluppo embrionale fino alla fase di morula. Da questo stadio i trascritti di MATER non sono più evidenziabili (Penetier et al. 2006). Questo pattern di espressione è in accordo con quello che noi abbiamo riscontrato nell'ovino, ad eccezione del calo significativo registrato allo stadio di 2-4 cellule. Questa discrepanza può essere dovuta a delle differenze specie-specifiche fra le due specie, ad un differente metodo di rilevamento utilizzato nei due studi. Tuttavia, il decremento di MATER durante la maturazione ed al momento

dell'attivazione del genoma embrionario osservato, conferma l'ipotesi che esso rivesta un ruolo primario nel regolare questi due eventi cruciali per lo sviluppo dell'embrione.

GDF9 e BMP15 sono dei geni che fanno parte della super-famiglia del transforming growth factor- β . Sono dimostrati essere dei regolatori essenziali della maturazione dell'oocita nei roditori, pecore, e nell'uomo (Elvin et al 2000; Chang et al. 2002; McNatty et al. 2003; Di Pasquale et al. 2004; Shimizu et al. 2004). Entrambe le proteine sono maggiormente espresse negli oociti e secrete dalle cellule del cumulo ooforo (McNatty et al. 2005), sono coinvolte nella regolazione di molti dei principali eventi essenziali per la follicologenesi (Galloway et al. 2000; Shimasaki et al. 2004). La loro funzione nella regolazione della follicologenesi è ulteriormente dimostrata dalle conseguenze che alcune mutazioni naturali in questi due geni causano negli ovini. Infatti quando presenti in eterozigoti, incrementano il tasso di ovulazione mentre determinano sterilità negli individui omozigoti (Hanrahan, 2004).

Numerose sono le informazioni di cui si dispone relativamente al coinvolgimento di GDF9 e BMP15 nell'ovino, mentre sono totalmente assenti le informazioni durante le fasi pre-impianto. Nel nostro studio abbiamo osservato un significativo decremento dei livelli di trascrizione del GDF9 durante la maturazione degli oociti, in accordo con le osservazioni effettuate sul bovino (Donnison e Pfeffer 2004) suino (Lee et al. 2008). Le due maggiori riduzioni, dei livelli di trascrizione del GDF9, sono evidenti tra 4 e 8 cellule e durante la transizione fra lo stadio di 16 cellule e blastocisti. Nelle fasi embriogenetiche successive, pur evidenziando una riduzione, i livelli di espressione permangono apprezzabili sino allo stadio di morula. La presenza di mRNA di GDF9 tuttavia non è associata ad una attività di trascrizione dopo l'attivazione del genoma embrionario ma sembra il risultato di una più lenta degradazione dell'RNAm rispetto a quanto osservato per gli altri MEGs.. Probabilmente gli RNAm vengono impiegati in queste fasi per assicurare una continua sintesi di proteine con un'emivita ridotta, indispensabili per lo sviluppo successivo. Le indagini in altre specie evidenziano risultati alquanto differenti. Nel bovino GDF9 è ben presente in oociti immaturi, prelevati dai follicoli pre-antrali e in embrioni prodotti in vitro, fino alla fase di 5/8

cellule, mentre non si rileva la presenza del gene in stadi successivi (Sendai et al. 2001; Donnison e Pfeffee 2004; Pennetier et al. 2004). Nel maiale il gene GDF9 è presente in tutte le fasi di sviluppo embrionale fino al feto (Lee et al. 2008). La specie-specificità di GDF9 risulta maggiormente marcata rispetto a quanto osservato per ZAR 1 e MATER i cui modelli di espressione risultano simili in tutte le fasi pre-impianto nelle diverse specie. Poiché funzionalmente GDF 9 sembra maggiormente coinvolto nella follicologenesi ed in particolare nell'accoppiamento funzionale tra oocita e cellule del cumulo il significato funzionale della sua presenza in quasi tutte le fasi di sviluppo embrionale pre-impianto non è chiara e rimane da definire. L'allestimento di esperimenti di abolizione della funzione mediante introduzione di sequenze interferenti (siRNA) potrebbe indicare più precisamente l'azione della proteina

Non esistono tutt'ora molte informazioni relative all'espressione di BMP15 durante le fasi pre-impianto dell'embrione. Sembra comunque che i livelli di espressione siano presenti per un numero maggiore di cicli rispetto agli altri MEGS analizzati. Nel bovino, BMP 15 è presente in oociti in GV e in quelli in MII maturati in vitro, nell'embrione fino allo stadio di 2/5 cellule ed in tracce allo stadio di morula (Pennetier et al. 2004). Nel topo la sua presenza è stata confermata a partire dallo stadio di GV, con una progressiva diminuzione della quantità dei trascritti fino allo stadio di 8 cellule, oltre il quale non è più riscontrabile (Zeng e Schultz 2003). I nostri dati nella pecora, mostrano una presenza pressoché stabile del gene fino allo stadio di 8 cellule ed una diminuzione rapida che porta ad non essere rilevabile nelle successive fasi di sviluppo. Contrariamente a quanto rilevato per gli altri MEGs, nell'ovino il BMP15 è il solo gene analizzato che non subisce una significativa riduzione durante il processo maturativo dell'oocita. Simili osservazioni sono state fatte nel bovino in precedenti osservazioni (Donnison e Pfeffer 2004).

Questo differente comportamento suggerisce una maggiore partecipazione del gene BMP15 nella transazione materno-fetale piuttosto che nella regolazione del processo di maturazione degli oociti.

Esperimento 4

In questa prova sperimentale si è voluto ampliare il numero di geni da analizzare allo stadio di blastocisti comparando i livelli di espressione nell'adulto e nel prepubere. Ciò è stato possibile grazie al miglioramento delle tecniche di estrazione e amplificazione del DNA. L'intenzione anche in questo caso è stata quella di valutare i livelli di espressione durante la fase di sviluppo pre-impianto. I 15 geni comprendevano i sette analizzati in precedenza, più AQP3, BAX, OCT4, IFN tau, HSP90b, IGF2, IGFR2 e Nanog. L'analisi di questi nuovi geni può permettere di meglio capire le differenze di competenza allo sviluppo evidenziate nelle prove di coltura in vitro. Le prove comparative hanno evidenziato una maggiore abbondanza di Aquaporina 3, Ciclina b, Istone H2A.Z, Oct-4, P34 e Nanog negli embrioni di pecora adulta rispetto a quelli derivati da oociti di prepubere. Al contrario, i trascritti per i geni IFN tau, IGF2 e IGFR2 si sono rivelati maggiormente espressi nell'agnella rispetto all'adulto. Infine nessuna differenza è stata osservata per i rimanenti RNAm analizzati.

L'aquaporina-3 (AQP-3) è una proteina canale per il passaggio dell'acqua, ed in misura minore, di piccoli soluti neutri, quali il glicerolo e l'urea. È parte di una famiglia costituita da una decina di piccole proteine transmembrana. I livelli di espressione sono particolarmente elevati allo stadio di blastocisti e nel topo che nel bovino è stato descritto che intervenga nel regolare la permeabilità di membrana. Queste evidenze lasciano supporre la medesima azione anche negli embrioni di ovino. I maggiori o minori livelli di espressione possono determinare un'alterata formazione della cavità blastocelica e riflettersi negativamente sulla qualità della blastocisti. Verosimilmente l'inferiore espressione dei trascritti di RNAm riscontrati nelle blastocisti di prepubere rispetto all'adulto potrebbe spiegare le differenze in termini di velocità di formazione della cavità blastocelica e nella grandezza stessa evidenziate nelle colture in vitro di blastocisti di prepuberi.

Una variazione significativa nei livelli di espressione è stata evidenziata anche per il gene H2A.Z, che risulta meno espresso negli embrioni di prepubere.

Gli istoni sono proteine nucleari responsabili della formazione del nucleosoma delle fibre cromosomali delle cellule eucariote. I nucleosomi consistono in 146 bps di DNA avvolti intorno ad

un ottamero istonico composto da 4 paia di istoni, uno per ogni tipo (H2a, H2B, H3 ed H4). Le fibre cromatiniche sono ulteriormente compattate tramite l'interazione dell'istone H1 con il DNA tra i nucleosomi, per formare strutture cromatiniche di ordine superiore. Il gene H2A.Z codifica per un membro della super famiglia H2A che è replicazione-dipendente ed è distinto dagli altri membri della famiglia. Essendo stato dimostrato che questo particolare istone è necessario per lo sviluppo embrionario e che il suo mancato funzionamento è letale per l'embrione, la minor espressione da noi riportata nel prepubere potrebbe essere correlata alla sua minor competenza.

Nanog è un gene che codifica per un fattore di trascrizione presente nelle cellule staminali pluripotenti così come Oct 4 e Sox. La presenza di attività di questi fattori di trascrizione è impiegata come marker per valutare il grado di pluripotenza cellulare. Gli stessi fattori sono anche presenti in diversi tumori maligni.

Oct-4 è un fattore di trascrizione nucleare appartenente alla famiglia del POU, ed è implicato nella regolazione ed espressione di un gran numero di geni legati allo sviluppo. La sua presenza è indispensabile per il mantenimento della pluripotenza cellulare. Oct-4 viene espresso durante la follicologenesi, è presente durante la fertilizzazione, nell'embrione a 2-4 cellule e, la sua trascrizione da parte dell'embrione si ha dopo la transizione dal controllo materno a quello embrionale.

È stato dimostrato come la mancanza del gene Oct-4 alteri lo sviluppo embrionale a causa della precoce differenziazione delle cellule che dovrebbero generare l'Inner Cell Mass dell'embrione.

Il mantenimento della pluripotenza è orchestrato dall'azione di un folto gruppo di trascritti, fra i quali i più importanti regolatori sono proprio Nanog, Oct-4 e Sox. Bassi o alti livelli di espressione e il loro grado di correlazione possono incidere significativamente sul grado di differenziazione cellulare degli embrioni. Un basso livello di questi mNRA potrebbe riflettere un basso potenziale di sviluppo. L'analisi dei nostri dati mostra una significativa differenza quantitativa per i geni Nanog e Oct-4 fra gli embrioni adulti e quelli prepuberi che, in parte potrebbe giustificare l'inferiore qualità dell'embrione di ovino prepubere.

IFN- τ : La comparazione della quantità di trascritti per questo gene mostra una differenza significativa fra gli embrioni di adulto e prepubere.

La regolazione della secrezione dell'IFN- τ è complessa e non ancora completamente chiara (Spencer and Bazer 2002). La produzione da parte degli embrioni inizia, a livelli molto bassi, allo stadio di blastocisti, e aumenta drammaticamente quando inizia la fase di allungamento dell'embrione. Il momento in cui inizia l'allungamento dell'embrione, che corrisponde al picco di produzione dell'interferone, è variabile tra individui, ma è correlato alla concentrazione di progesterone nella madre. Il picco di produzione dell'interferone- τ avviene prima che s'innescino i meccanismi per la luteolisi che deve essere bloccata per poter mantenere la gravidanza.

Alcuni fattori di crescita e citochine sono coinvolte nel controllo della secrezione dell'IFN- τ . E' stato infatti osservato, ad esempio, che le concentrazioni di IGF1, IGF2 e Interleuchina-3 sono positivamente correlati alla secrezione dell'IFN- τ . Queste osservazioni sono in accordo con i risultati della presente tesi che evidenziano nelle blastocisti di prepubere livelli significativamente più elevanti sia di IFN- τ che di IGF2.

E' stato dimostrato che la trascrizione dell'IFN- τ è repressa dalla presenza di Oct-4, un fattore di trascrizione caratteristico delle cellule pluripotenti. Altri Autori hanno suggerito un modello in cui la diminuzione di Oct-4, che accompagna la costituzione del trofoectoderma, promuove l'espressione di IFN- τ . Sulle basi di tale teoria, la quantità significativamente minore di Oct-4 osservata nelle blastocisti di prepubere potrebbe indirettamente causare la maggiore sintesi di IFN- τ .

Alcuni autori hanno proposto di utilizzare la quantità di IFN- τ come indicatore della qualità embrionale. Al contrario, mettendo in correlazione la cinetica di formazione delle blastocisti *in vitro* e la produzione dell'interferone, altri autori hanno suggerito una relazione negativa tra una precoce produzione di IFN- τ e la qualità della blastocisti. I nostri risultati sono in accordo con l'ipotesi di Kubish e collaboratori, in quanto evidenziano una sintesi di IFN- τ significativamente maggiore in embrioni di qualità inferiore.

Esperimento 5

La qualità dell'embrione prodotto in vitro, come già ampiamente riportato, e come dimostrato dai risultati di questo lavoro, è condizionato da diversi fattori. Il grado di competenza della cellula uovo e la capacità di progressione meiotica sono senza dubbio momenti che condizionano profondamente le tappe di sviluppo successive.

Di non meno importanza sono le condizioni colturali che subito dopo la fecondazione vengono imposte all'embrione e che senza dubbio richiedono un adattamento a situazioni sub fisiologiche. L'allestimento di condizioni colturali diverse sembra avere un impatto significativo sulla capacità replicativa dell'embrione e conseguentemente condizionare le percentuali di sviluppo embrionale in vitro e la vitalità dopo trasferimento in animali riceventi. Studi di biologia molecolare hanno anche mostrato come la formulazione di sistemi di sviluppo in vitro differenti si rifletta positivamente o negativamente sui livelli di espressione genica. Per quanto ci si sforzi di simulare quanto avviene nell'ambiente oviduttale e uterino si è ancora piuttosto lontani dalle condizioni ottimali allo sviluppo presenti nell'apparato riproduttore.

In questa nostra prova abbiamo preliminarmente iniziato a valutare le eventuali differenze dovute all'allestimento di sistemi colturali differenti su geni coinvolti nella competenza allo sviluppo. La prova è stata effettuata con embrioni derivanti da animali prepuberi poiché in questi sono più evidenti le condizioni colturali subottimali che portano ad un inferiore sviluppo da parte dei sistemi in vitro e maggiori percentuali di mortalità embrionale e aborti.

I risultati della comparazione evidenziano una maggiore espressione dei geni *Nanog*, *Pompa Sodio Potassio* e *IGF1* negli embrioni coltivati in vitro rispetto a quelli coltivati in vivo, mentre per gli altri geni non sono rilevabili differenze statisticamente significative. Il significato funzionale di queste variazioni deve essere chiarito ampliando maggiormente il gruppo sperimentale e aumentando il numero di geni da analizzare. In alcuni casi infatti abbiamo già riscontrato come il livello delle espressioni di alcuni geni sia legato alla maggiore e minore espressività di altri. Per

cui la perturbazione di un panel specifico potrebbe provocare di riflesso la sovra o ridotta regolazione neotrascrizionale di altri.

Appare comunque interessante nella nostra prova aver riscontrato la presenza di livelli superiori di espressione genica di IGF α negli embrioni di prepubere, che ricordiamo essere un gene imprantato, in quanto potrebbe indicare un assetto non regolare dell'imprinting genomico e determinare la minore capacità di progressione allo sviluppo di embrioni di prepuberi dopo trasferimento in riceventi (Ptak et al. 2007).

Esperimento 6

Questa prova sperimentale è stata effettuata per valutare l'andamento espressivo di geni importanti per lo sviluppo in situazioni di normale fertilizzazione in vitro e a seguito di attivazione citoplasmatica.

La creazione di embrioni monoparentali, in questo caso partenogenetici, può fornire indicazioni particolarmente interessanti. In primo luogo può indicare il grado di partecipazione maschile nell'attivazione ed espressione genica nelle fasi preimpianto: essere modello utile per la valutazione delle relazioni geniche tra i geni di origine paterna e materna (imprinting genomico); verificare l'effettiva competenza allo sviluppo della cellula uovo; evidenziare ancor meglio la funzione dei geni di origine materna che risultano espressi in forma biallelica.

Non bisogna inoltre trascurare l'importanza che va assumendo la derivazione di cellule staminali da embrioni partenogenetici. Queste infatti, mancando la fecondazione, permettono di superare i problemi etici imposti dall'uso di cellule embrionali derivanti da evento fecondativo. Diversi studi mostrano come le cellule staminali derivanti da blastocisti partenogenetiche possano essere impiegate con successo in terapie rigenerative tissutali. Altri studi evidenziano invece come non siano equivalenti alle cellule embrionali derivanti da embrioni biparentali, evidenziando in particolare difetti nell'imprinting genomico e problemi di ploidia.

I dati della nostra ricerca evidenziano come i livelli di espressione genica tra le blastocisti IVF e Partenogenetiche differiscano per diversi geni. Abbiamo infatti riscontrato livelli più alti negli

embrioni IVF per i geni acquaporina, heat shock protein e oct 4 mentre risultano statisticamente inferiori i geni H2 interferone tau, IGF2 e p34. Anche in questo caso l'analisi di un panel più ampio di geni potrà meglio far comprendere il significato funzionale della differente espressione genica.

Appaiono tuttavia interessanti i risultati di alcuni geni che confermano quanto osservato in altre specie. Interferone tau ad esempio è stato riscontrato come maggiormente espresso anche in embrioni partenogenetici di suino dove pare risponda ad una attività trascrizionale biallelica. L'espressività elevata di interferone tau, che ricordiamo sintetizza proteine per il riconoscimento della gravidanza, è confermata anche dai buoni risultati di gravidanza (75% circa) ottenuti dopo trasferimento di blastocisti partenogenetiche di ovino in animali riceventi (Fois osservazioni personali). I maggiori livelli di espressione di acquaporina negli embrioni biparentali potrebbero spiegare la maggiore e più rapida espansione blastocelica osservabile tra embrioni e partenogenetici mentre l'espressione maggiore di heat shock protein indicherebbe la maggiore capacità degli embrioni IVF di rispondere agli stress colturali.

Il riscontro di più elevati livelli di IGF2 negli embrioni partenogenetici, gene improntato di origine materna, sono facilmente spiegabili in quanto abbiamo creato blastocisti partenogenetiche diploidi contenenti biallelicamente il gene IGF2.

CONCLUSIONI

Lo sviluppo embrionale preimpianto, pur essendo un fenomeno fortemente dinamico, e pertanto soggetto a evidenti modificazioni, può essere diviso in tre fasi critiche (check points).

La prima di queste fasi comprende il raggiungimento della piena competenza dell'ovocita e si manifesta nella capacità di riprendere e completare la meiosi (qualità dell'ovocita).

La seconda fase critica corrisponde alla attività replicativa nelle prime fasi dopo la fecondazione sino al momento dell'attivazione del genoma embrionale (fase di transizione materno-embrionale).

La terza fase corrisponde al raggiungimento dello stadio di blastocisti dove iniziano in primi eventi differenziali con la costituzione dei precursori per gli annessi placentari (trofoblasto) e del soma (nodo embrionario).

Appare evidente che un percorso ottimale dello sviluppo in vitro non potrà prescindere dalla ottimizzazione di tutte le tre fasi e lo sforzo che numerosi ricercatori stanno compiendo è quello di capire, valutare e simulare in vitro nel modo maggiormente fisiologico questi eventi riproduttivi.

La nostra indagine, che ha impiegato come modello di studio la specie ovina, si è indirizzata in tutte le tre fasi sopracitate.

Ovviamente il lavoro svolto non ha la pretesa di essere esaustivo, vista la complessità dei fenomeni, ma vuole contribuire parzialmente ad incrementare la conoscenza degli attori di questi eventi riproduttivi.

Le indagini sugli oociti e sulla capacità di maturazione meiotica, mediante lo studio di un pannello di geni, hanno mostrato come tendenzialmente la preparazione della cellula uovo ad affrontare le prime tappe della meiosi sembra avvenire nella specie ovina nelle prime fasi della follicologenesi e verosimilmente questo si verifica prima del finale accrescimento della cellula uovo. Gli esperimenti di comparazione tra gli oociti di animali prepuberi e quelli di adulto non hanno infatti evidenziato quelle marcate differenze che ipoteticamente ci si aspettava. Ricordiamo che gli oociti di prepubere

presentano un volume inferiore (segno di un non completo accrescimento), provengono da follicoli di piccole dimensioni (1-2 mm), evidenziano un attività di sintesi minore. Questi parametri sembrano condizionare profondamente la competenza meiotica in altre specie mentre non appaiono inficiare significativamente questo fenomeno nella specie ovina.

Fanno eccezione alcuni geni e di questi indichiamo in particolare la p34 codificante per una sub unità proteica del complesso MPF. I livelli del complesso MPF potrebbero essere raggiunti nelle fasi finali dell'accrescimento dell'oozita nell'ovino ed essere un vero fattore discriminante la competenza allo sviluppo. I dati della velocità replicativa sembrano confermare questa osservazione. Gli embrioni di prepubere mostrano infatti una velocità replicativa inferiore a quella dei soggetti adulti. Poiché gli effetti dovuti alla presenza di minore p34 risultano evidenti solo dopo fertilizzazione non si può escludere che minore quantità di mRNA nell'oozita immaturo porti ad una utilizzazione maggiore per la ripresa e pregressione della meiosi ed una minore disponibilità per la regolazione delle prime repliche embrionali.

La seconda fase è ugualmente importante per lo sviluppo embrionale. L'attivazione del genoma embrionale o meglio ancora la transizione dal controllo embrionale materno a quello embrionale (attivazione del genoma embrionale) ha rappresentato e rappresenta tutt'oggi oggetto di studio da parte di numerosi gruppi di ricerca. E' in questa fase infatti che molto spesso l'embrione arresta il proprio sviluppo in vitro.

Le nostre indagini hanno voluto monitorare questo passaggio attraverso la quantificazioni di geni, i "maternal effect genes" coinvolti nel guidare queste prima fasi dell'embriogenesi. La presenza e l'andamento di questi geni nella specie ovina risultava sconosciuto e in nostri esperimenti per la prima volta ne hanno riportato la presenza durante lo sviluppo preimpianto. I pattern espressivi sono in parte sovrapponibili a quanto osservato in specie di laboratorio ed in animali di interesse zootecnico pur evidenziando differenze specie specifiche. Accanto a queste prime descrizioni sarà fondamentale accompagnare dettagli funzionali che potranno eseguirsi con indagini sull'andamento e localizzazione delle rispettive proteine o sull'abolizione funzionale mediante iniezione di

sequenze di interferenza. Evidenziamo inoltre che i MEGs sono stati utili per indicare e in parte confermare con precisione la fine del controllo materno e l'inizio dell'attività trascrizionale embrionale che in questa specie avviene allo stadio di 8-16 cellule.

Questo passaggio non sembra essere particolarmente critico nella specie ovina come indicato dai risultati dello sviluppo embrionale a questo stadio tra prepuberi e adulti che appaiono non staticamente differenti.

Viceversa le maggiori differenze tra le due classi si riscontrano nella terza fase "lo stadio di blastocisti. I dati di sviluppo, sensibilmente inferiori nei prepuberi, si accompagnano a differenze significative nei livelli di espressione di vari geni analizzati. Analisi di singoli andamenti evidenzia in alcuni casi una minore espressione come per geni legati alla pluripotenza, alla formazione della cavità blastocelica e alla regolazione di altri aspetti funzionali ed in altri ad sovraespressione. In alcuni casi può essere relativamente facile estrapolare un aspetto funzionale in altri casi sono richieste ulteriori sperimentazioni che chiariscono in modo più preciso il fenomeno.

Il lavoro svolto si è occupato, anche se in fase del tutto preliminare, di determinare quanto i livelli di espressione di alcuni geni siano frutto di condizioni colturali subottimali. Il modello d'indagine utilizzato è stato quello degli embrioni derivati da oociti di prepuberi che sono stati sviluppati totalmente in vitro o in parte in vivo. Gli embrioni di prepuberi sembrano più sensibili alle condizioni colturali ed in questi si registrano le maggiori diminuzioni di competenza allo sviluppo. Gli esperimenti, che dovranno necessariamente essere completati ed estesi, hanno tuttavia indicato come le condizioni di coltura incidano significativamente sui livelli di espressione genica. Infatti il confronto tra le blastocisti sviluppate completamente in vitro e quelle in parte sviluppate in vivo ha mostrato pattern alquanto diversi. Queste informazioni mostrano chiaramente che le condizioni colturali, pur garantendo lo sviluppo allo stadio di blastocisti, non supportano probabilmente l'embriogenesi in modo corretto. Prove di trasferimento potranno meglio indicare quanto i diversi livelli di espressività siano legati a vitalità embrionale post trasferimento.

Nell'ultima fase sperimentale si è voluto confrontare l'andamento di diversi geni in blastocisti biparentali (IVF) e monoparentali (Partenogenetiche) per escludere la fase della fertilizzazione e soprattutto verificare l'espressione di alcuni geni in assenza di fenomeni d'imprinting. E'interessante rilevare come le percentuali di divisioni embrionali e soprattutto di sviluppo embrionale siano pressochè sovrapponibili mentre nelle due classi mentre i livelli di espressione per diversi geni differiscano in modo marcato. Queste differenze non sembrano ascrivibili al numero cellulare, che comunque si è riscontrato sempre inferiore nella blastocisti partenogenetiche, ma verosimilmente sono legate ad una regolazione genica diversa. I nostri dati nel modello ovino possono essere utili per valutare la potenziale utilizzazione delle blastocisti monoparentali per ottenere cellule staminali embrionali. E' stata infatti più volte riportata questa possibilità che maggiormente risponderrebbe ad considerazioni ed esigenze etiche nella specie umana. Tuttavia le nostre osservazioni fanno rilevare come non vi sia una forte equivalenza nelle due classi di blastocisti. Poiché le nostre prime analisi sono state fatte su blastocisti intere stiamo predisponendo indagini volte a meglio caratterizzare il pattern espressivo delle due componenti che costituiscono la blastocisti differenziando la componente del trofoblasto rispetto a quella del nodo embrionale da cui di fatto si generano le linee staminali

BIBLIOGRAFIA

- **Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J. P., and Thompson, E. M.** (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124, 4615–4625.
- **Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F.** (2005). Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* Nov 72(3), 281-90.
- **Anderson E and Alberini DF.** (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *Journal of Cell Biology.* 63, 680-686.
- **Aoki, F., Hara, K. T., and Schultz, R. M.** (2003). Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 270–274.
- **Artini P.G., Battaglia C.d., Ambrogio G., Barreca A., Droghino F., Volpe A., and Genazzani A.R.** (1994). Relationship between human unfertilized oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum. Reprod.* 9, 902-906.
- **Bachvarova R, Moy K.** (1985). Autoradiographic studies on the distribution of labelled maternal RNA in early mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 233, 397-403.
- **Bachvarova R.** (1985). Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev. Biol.* (N Y 1985) 1, 453-524.
- **Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- **Bertolini M., Mason JB., Beam SW., Carneiro GF., Sween ML., Kominek DJ., Moyer AL., Famula TR., Sainz RD., Anderson GB.** (2002). Morphology and morphometry of in

vivo and in vitro produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with birth weights. *Theriogenology*. 58, 973-994.

- **Bornslaeger EA, Mattei PM, Schultz RM.** (1988) Protein phosphorylation in meiotically competent and incompetent mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1, 19–25.
- **Brevini, T.A., Cillo, F., Colleoni, S., Lazzari, G., Galli, C. and Gandolfi, F.** (2004). Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocytes, and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 69, 375-380.
- **Brevini T.A. L., and F. Gandolfi.** (2001). The maternal legaci to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55: 1255-1276.
- **Burns, K. H., Viveiros, M. M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F. J., Frail, D. E., Eppig, J. J., and Matzuk, M. M.** (2003). Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 300, 633–636.
- **Bultman, S. J., Gebuhr, T. C., Pan, H., Svoboda, P., Schultz, R. M., and Magnuson, T.** (2006). Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev.* 20, 1744–1754.
- **Byskov AG, Skakkebeek NE, Stefanger G, Peters H.** (1977). Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J. Anat.* 123(1), 77-86.
- **Carbonneau G. and Sirard M. A.** (1994). Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocytes when cultured inside or outside hemisections. *J. Reprod. Dev.* 40, 125-132.
- **Chang H., Brown C.W. and Matzuk M.M.** (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr. Rev.* 23, 787-823.
- **Chesnel F, Eppig JJ.** (1995) Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev.* Apr;40(4):503-8.

- **Chiu T.T, Rogers M.S., Law E.L., Briton-Jones C.M., Cheung L.P., and Haines C.J.** (2002). Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF:relationship with oocytes quality. *Hum. Reprod.* 17,1591-1596.
- **Christians, E., Davis, A. A., Thomas, S. D., and Benjamin, I. J.** (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 407, 693–694.
- **Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y, Renard JP.** (2000). Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 62, 1677–1684
- **Crosier AE., Farin PW, Dykstra MJ., Alexander JE., Farin CE.** (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.* 62, 1459-1465.
- **Crosier AE., Farin PW, Dykstra MJ., Alexander JE., Farin CE.** (2001). Ultrastructural morphometry of bovine blastocisti produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.* 64, 1375-1385.
- **Crosier AE., Farin CE., Rodriguez KF., Blondin P., Alexander JE., Farin PW.** (2002). Development of skeletal muscle and expression of candidate genes in bovine fetuses from embryos produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.* 67, 401-408.
- **Dean,W., Santos, F., and Reik,W.** (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin.Cell Dev. Biol.* 14, 93–100.
- **Dean, J.** (2002). Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *Journal of Reproductive Immunology* 53, 171-180.
- **Dedieu T, Gall L, Hue I, Ledan E, Crozet N, Ruffini S, Sevellec C.** (1998). p34cdc2 expression and meiotic competence in growing goat oocytes. *Mol Reprod Dev.*;50(3):251-62.

- **De Loos F., Kastrop P., van Maurik P., van Beneden ThH, Kruip ThAM,** (1991). Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocytes complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 255-259.
- **De Loos F. A., Zeinstra E. and Bevers M. M.** (1994). Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 162-165.
- **De Smedt V., Crozet N., Gall L.** (1995). Morphological and functional change accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.* 269, 128–131.
- **De Sousa P.A., Caveney A., Westhusin M.E., Watson A.J.** (1998). Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology* 49, 115-128.
- **De Sousa PA, Westhusin ME, Watson AJ.** (1998). Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 119-130.
- **de Vantèry C, Gavin AC, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S.** (1996). An accumulation of p34^{cdc2} at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol.*;15,174(2):335-344.
- **de Vantery C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S.** (1997). Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Dev Biol.*;187(1):43-54.
- **Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X.** (1999) Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 53, 318–324
- **Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL.** (2002). Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002, 57: 5-20.

- **Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P. and Persani, L.** (2004). Hypergonadotropic Ovarian Failure Associated with an Inherited Mutation of Human Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP15) Gene. *American Journal of Human Genetics* 75, 106-111.
- **Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM.** (2000). Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 62(6), 1526-35.
- **Donnison, M. and Pfeffer, P.L.** (2004). Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. *Biol. Reprod.* 71, 1813-1821.
- **Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM.** (1996). Prepubertal calves as oocytes donors: promises and problems. *Theriogenology* . 45, 121–130.
- **Duby RT, Hill JL, O'Callaghan D, Overstrom EW, Boland MP.** (1997). Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* 47, 332 (abstract).
- **Eckert J., and Niemann H.** (1998). mRNA expression of leukaemia factors(LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor- β in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol. Hum. Reprod.*4, 957-965.
- **Elvin, J.A., Yan, C. and Matzuk, M.M.** (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 159, 1-5.
- **Eid LN, Parrish JJ,** (1995). Duration of G2-phase and onset of M-phase during the first cell cycle of the bovine embryo is dependent on bull in vivo fertility. *Theriogenology* 205, (abstract).

- **Enright B.P., Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Ward F.A., Yang X., Boland M.P.** (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. 54, 659–673.
- **Eppig JJ.** (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 483–489.
- **Erickson BH.** (1966). Development and senescence of the postnatal bovin ovary. *J. Anim. Sci.* 25(3), 800-5.
- **Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cattel D., Hyttel P., Ward FA., Boland MP.** (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of embryos production on blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 186-195.
- **Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M.** (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat. Embryol. (Berl)*. 195, 327-36.
- **Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H, Miyazki S.** (1993). Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 1993; 156:69–79.
- **Galli C. and Lazzari G.** (1996). Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 371-379.
- **Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H. and Ritvos, O.** (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*. 25, 279-283.
- **Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J., and Schier, A. F.** (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312,75–79.

- **Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM** (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70:900-909
- **Hyttel F., Fair T., Callesen H., Greve T.** (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation. *Theriogenology* 47, 23-32.
- **Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T.** (1986). Ultrastructure of in-vitro maturation in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78:615–625.
- **Jimena P., Castilla J.A., Peran F., Molina R., Ramirez J.P., Acebal M., Vergara F., and Herruzo A.** (1992). Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 96, 641-647.
- **Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS.** (2000). Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol Reprod*;63:1610-1616.
- **Kawano Y., Narahara H., Matsui N., Nasu K., Miyamura K., and Miyakawa I.** (1997). Insulin-like growth factor-binding protein-I in human follicular fluid: a merker for oocyte maturation. *Gynecol. Obstet. Invest.* 44, 145-148.
- **Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJM, M. Vos, D. Herrmann PLA, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ.** (2002). Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction.* 124, 365–375.
- **Kochhar HP., Wu B., Morris LH., Buckrell BC., Pollard JW., Basrur PK., Kng WA.** (2002). Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 19-25.

- **Kuran M., McEvoy TG., Young LE., Broadbent PJ., Robinson JJ., Sinclair KD.** (2000). Ovine fetal development following different periods of in vitro culture. *Theriogenology*. 53, 275(abstract).
- **Latham, K. E., and Schultz, R. M.** (2001). Embryonic genome activation. *Front. Biosci.* 6, D748–D759.
- **Ledda S., Bogliolo L., Leoni G., Naitana S.** (2001). Cell coupling and maturation-promoting factor activity in vitro-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol. Reprod.* 65:247-252.
- **Ledda, S., Bogliolo, L., Calvia, P., Leoni, G., Naitana, S.** (1997). Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J. Reprod. Fert.* 109, 73-78.
- **Lee k-F., Chow JFC., Xu J-S., Chan STH., Ip SM., Yeung WSB.** (2001). A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biol. Reprod.* 64, 910-917.
- **Lee, G.S., Kim, H.S., Hwang, W.S. and Hyun, S.H.** (2008). Characterization of porcine growth differentiation factor-9 and its expression in oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 707-714
- **van de Leemput EE, Vos PLAM, Zeinstra EC, Bevers MM, der Weijden GC, Dieleman SJ,** (1999). Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superiovaluated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 52, 335–349.
- **Leoni GG, Succu S, Berlinguer F, Rosati I, Bebbere D, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S.** (2006b). Delay on the vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *An. Reprod. Sci.* 92, 373-383.

- **Leoni GG, Bebbere D, Succu S, Berlinguer F, Mossa F., Galioto M., Bogliolo L, Ledda S, Naitana S.** (2006a). Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 249-257.
- **Lequarre A.S., Feugang J.M., Malohomme O., Donnay I., Massip A., Dessy F., and Van Langendonck A.** (2001). Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 45-53.
- **Lévesque JT and Sirard MA.** (1996). Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod.*;55(6):1427-36.
- **Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, de la Fuente JD, Boland M.** (2000). Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57, 146-152.
- **Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I.** (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48–53.
- **Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** (2003b). Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod. Biomed. Online.* 7(6), 657-63.
- **Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** (2003a). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 259-267.
- **Ma, J., Zeng, F., Schultz, R. M., and Tseng, H.** (2006). Basonuclin: a novel mammalian maternal-effect gene. *Development* 133, 2053–2062.
- **McEvoy TG., Sinclair KD., Broadbent PJ., Goodhand KL., Robinson JJ.** (1998). Post-natal growth and development of Simmental calves derived from in vivo or in vitro embryos. *Reprod. Fertile. Dev.* 10, 459-464.

- **McEvoy TG., Robinson JJ. Sinclair KD.** (2001). Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction*. 122, 507-518.
- **McNatty, K.P., Lawrence, S., Groome, N.P., Meerasahib, M.F., Hudson, N.L., Whiting, L., Heath, D.A. and Juengel, J.L.** (2006). Meat and Livestock Association Plenary Lecture 2005. Oocyte signalling molecules and their effects on reproduction in ruminants. *Reprod. Fert. Dev.* 18, 403-412.
- **McNatty, K.P., Juengel, J.L., Wilson, T., Galloway, S.M., Davis, G.H., Hudson, N.L., Moeller, C.L., Cranfield, M., Reader, K.L., Laitinen, M.P., Groome, N.P., Sawyer, H.R. and Ritvos, O.** (2003). Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reproduction Supplements*. 61, 339-351.
- **Memli E. First NL.** (2000): Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8, 87–96
- **Minami N., Sasaki K., Aizawa A., Miyamoto M., Imai H.** (2001). Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments. *Biol. Reprod.* 64, 30-35.
- **Misirlioglu, M., Page, G. P., Sagirkaya, H., Kaya, A., Parrish, J. J., First, N. L., and Memili, E.** (2006). Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103.
- **Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W.** (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 14, R47–R58.
- **Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WM, Rath D, Evans G, Lucas-Hahn A, Niemann H, Wrenzycki C.** (2007). Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev.* Epub ahead of print.

- **Motlik J, Crozet N, Fulka J.** (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 72, 323–328.
- **Motlik J, Nagai T, Kikuchi K.** (1991). Resumption of meiosis in pig oocytes cultured with cumulus and parietal granulosa cells. *Journal of Experimental Zoology* 1991;259:386-391.
- **Murchison, E. P., Stein, P., Xuan, Z., Pan, H., Zhang, M. Q., Schultz, R. M., and Hannon, G. J.** (2007). Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev.* 21, 682–693.
- **Naito K, Hawkins C, Yamashita M, Nagahama Y, Aoki F, Kohmoto K, Toyoda Y, Moor RM.** (1995). Association of p34cdc2 and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Dev Biol*;168:627-634.
- **Negrin Pereira N., McEvoy TG., Staines ME., King ME., Broadbent PJ., Mackie K., Ranilla M., Robinson JJ.** (1997). Effect of exposure to two different culture systems on the development and metabolism of in vivo derived sheep zygotes. *Theriogenology.* 47, 377(abstract).
- **O'Brien J.K., Catt S.L., Ireland K.A., Maxwell W.M.C., Evans G.** (1997b). In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology.* 47, 1433-1453.
- **O'Brien JK, Dwarto D, Ryan JP, Maxwell WMC, Evans G.** (1996). Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod, Fertil, Dev.* 8, 1029–1037.
- **Oosterhuis G. J., Vermes I., Lambalk C. B., Michgelsen H. W. And Schoemaker J.** (1998). Insuline-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum. Reprod.* 13, 285-289.

- **Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H.** (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 63–67.
- **Payer, B., Saitou, M., Barton, S. C., Thresher, R., Dixon, J. P., Zahn, D., Colledge, W. H., Carlton, M. B., Nakano, T., and Surani, M. A.** (2003). Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr. Biol.* 13, 2110–2117.
- **Paynton, B. V., Rempel, R., and Bachvarova, R.** (1988). Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev. Biol.* 129, 304–314.
- **Pennetier, S., Perreau, C., Uzbekova, S., Th  lie, A., Delaleu, B., Mermillod, P. and Dalbi  s-Tran, R.** (2006). MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC. Dev. Biol.* 6, 26.
- **Pennetier S, Uzbekova S, Perreau C, Papillier P, Mermillod P, Dalbi  s-Tran R.** (2004). Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* Oct; 71(4), 1359-66.
- **Pincus G and Enzmann EV.** (1935). The comparative behaviour of mammalian eggs in vitro and in vivo. I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine* 1935;62:665-675.
- **Pollard JW, Leibo SP.** (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41, 101–106
- **Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P.** (1999). Offspring from onemonth-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.* 61, 1568–1574.

- **Richard FJ and Sirard MA** (1996 b) Effects of follicular cells on oocyte maturation II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*;54:22-28.
- **Richard FJ and Sirard MA.** (1996a). Effects of follicular cells on oocyte maturation . Effects of follicular hemisections of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*. 54, 16-21.
- **Rief S., Sinowatz F., Stojkovic M., Einspainer R., Wolf E., Prella K.** (2002). Effect of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryo produced in vitro. *Reproduction*. 124, 543-556.
- **Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** (2002c). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 234-248.
- **Rizos D., Fair T., Papadopulos S., Boland M., Lonergan P.** (2002a). Developmental, qualitative and ultrastructural difference between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 320-367.
- **Rizos D., Lonergan P. Boland M.P., Arroyo-Garcia R., Pintado B., la Fuente J., Gutierrez-Adan de A.** (2002b). Analisis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implication for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* 66, 589-595.
- **Rizos D., Gutierrez-Adan de A., Perez-Garnaldo S., de la Fuente J., Boland M.P., Lonergan P.** (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68, 236-243.
- **Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D, Sirard MA,** (2002) Quantification of cyclin B1 and p34(cdc2) in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biol Reprod* 67, 1456–1464

- **Roest, H. P., Baarends, W. M., deWit, J., van Klaveren, J.W., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., van Cappellen, W. A., Hoeijmakers, J. H., and Grootegoed, J.A.** (2004). The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5485–5495.
- **Santos, F., and Dean, W.** (2004). Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction.* 127, 643–651.
- **Seino T., Saito H., Kaneko T., Takahashi T., Kawachiya S. And Kurachi H.** (2002). Eight-hydroxy-2-deoxyguanosine in granulosa cell is correlated with the quality of the oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril.* 77, 1184-1190.
- **Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F. and Erickson, G.F.** (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 25, 72-101.
- **Shimizu, T., Miyahayashi, Y., Yokoo, M., Hoshino, Y., Sasada, H. and Sato, E.** (2004). Molecular cloning of porcine growth differentiation factor 9 (GDF-9) cDNA and its role in early folliculogenesis Direct ovarian injection of GDF-9 gene fragments promotes early folliculogenesis. *Reproduction.* 128, 537–543.
- **Schultz, R. M.** (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15, 531–538.
- **Sinclair KD., McEvoy TG., Maxfield EK., Maltin CA., Young LE., Wilmut I., Broadbent PJ., Robinson JJ.** (1999). Aberrant fetal growth and development after in vitro cultured of sheep zygotes. *J. Reprod. Fertil.* 116, 177-186.
- **Sinclair KD., Young LE., Wilmut I., McEvoy TG.** (2000). In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lesson from mice and warning to men. *Hum. Reprod.* 15(suppl. 5), 68-86.

- **Slimane W., Heyman Y., Renard J-P.** (2000). Assessing chromosomal abnormalities by FISH analysis in 2-cell bovine embryos derived from in vitro and in vivo fertilization. *Theriogenology*. 53, 432 (abstract).
- **Sorensen RA, Wassarman PM.** (1976). Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 50, 531–536.
- **Sun Q. Y., Wu . ., Li L., Park K. W., Cabot R., Cheong H. T., Day B. N., Prather R. S. and Schatten H.** (2001). Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryos development in vitro. *Reproduction*. 122, 155-163.
- **Tang, F., Kaneda, M., O’Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S. C., Sun, Y. A., Lee, C., Tarakhovsky, A., Lao, K., and Surani, M. A.** (2007). Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev.* 21, 644–648.
- **Thompson JG.** (2000) In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim Reprod Sci* 60–61, 263–275.
- **Tong, Z.B., Gold, L., Pfeifer, K.E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C.A., Dean, J. and Nelson, L.M.** (2000). Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature. Genetics.* 26, 267-268.
- **Tong, Z.B., Bondy, C.A., Zhou, J. and Nelson, L.M.** (2002). A human homologue of mouse Mater, a maternal effect gene essential for early embryonic development. *Human. Reproduction* 17, 903-911.
- **Torres-Padilla, M. E., and Zernicka-Goetz, M.** (2006). Role of TIF1alpha as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote. *J. Cell Biol.* 174, 329–338.
- **Usui N, Yanagamachi R.** (1976). Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastruct Res.* 657, 289–308.

- **Uzbekova, S., Roy-Sabau, M., Dalbiès-Tran, R., Perreau, C., Papillier, P., Mompарт, F., Thelie, A., Pannetier, S., Cognie, J., Cadoret, V., Royere, D., Monget, P. and Mermillod, P.** (2006). Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human evidence of different transcript variants in male and female germ cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4, 12.
- **Van Tol HTA, van Eijk MJt, Mummery CL, van den Hurk R, Bevers MM.** (1996). Influence of FSH and hCG on resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 218-224.
- **van Wagendonk-de Leeuw A.M., Mullaart E., de Roos APW., Merton JS., den Daas JHG., Kemp B., Ruigh L.** (2000). Effects of different reproduction techniques; AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*. 53, 575-597.
- **Viuff D., Rickors L., Offenberg H., Hyttel P., Avery B., Greve T., Olsaker I., Williams JL., Callesen H., Thomsen PD.** (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixploid. *Biol. Reprod.* 60, 1273-1278.
- **Viuff D, Hendriksen PJM, Vos PLAM, Dieleman SJ, Bibby BM, Greve T, Hyttel P, Thomsen PD.** (2001) Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2-5 after ovulation. *Biol Reprod* 65, 204–208.
- **Ward FA, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland MP, Lonergan P.** (2001). Paternal influence on the time of the first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev* 60, 47–55.
- **Warner CM, McElhinny AS, Wu L, Cieluch C, Ke X, Cao W, Tang C, Exley GE.** (1998) Role of the Ped gene and apoptosis genes in control of preimplantation development. *J Assist Reprod Genet* 15, 331–337.
- **Wassarman PM, Albertini DF.** (1994). The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill J (eds.). *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd ed. New York: Raven Press, 79–122.

- **Wise T., Suss U. And Maurer R. R.** (1987). The relationships of oocyte quality and follicular fluid prolactin and progesterone in superovulated heifer heifers with and without norgestomet implants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 219, 697-701.
- **Wiswedel K.** (1988). Granulosa cell metabolism and the assessment of oocyte quality in IVF. *Human. Reprod.* 2, 589-591.
- **Wrenzycki C., Herrmann D., Keskinetepe L., Martins A., JR., Sirisathien S., Brackett B. and Niemann H.** (2001a). Effects of basic culture and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. *Hum. Reproduction.* 16, 893–901.
- **Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath JW., Niemann H.** (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 8–18.
- **Wrenzycki C., Wells D., Herrmann D., Miller A., Oliver J., Tervit R., Niemann H.** (2001b). Nuclear Transfer Protocol Affects Messenger RNA Expression Patterns in Cloned Bovine Blastocysts. *Biol. Reprod.* 65,309-317.
- **Wrenzycki C., Herrmann D., Korsawe K., Haderler K-G., Niemann H.** (2000). Relative abundance of specific mRNAs in bovine embryos produced in vivo or in vitro employing two different culture systems. *Theriogenology.* 53, 415 (abstract).
- **Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bay Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM.** (2003a). Zygote arrest 1 (Zar 1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat. Genet.* 33: 187-191.
- **Wunder D.M., Kretschmer R., and Bersinger N.A** (2005a). Concentration of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. *Hum. Reprod.* 20, 1266-1271.
- **Wunder D.M., Muller M.D., Birkhause M.H., and Bersinger N.A.** (2005b). Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocytes quality in patients with and without endometriosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 22, 257-264.

- **Yamashita M, Mita K, Yoshida N, Kondo T.** (2000). Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species-specific aspects. *Prog Cell Cycle Res*;4:115-129.
- **Zeng, F. and Schultz, R.M.** (2003). Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biology of Reproduction* 68, 31–39.