



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI
E
UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA
E
PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – sotto - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

Relazione Attività periodo Gennaio- Giugno 2007

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Gabriella Di Rocco

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:

Università degli studi “G. D’Annunzio” di Chieti

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

Prof. Liborio Stuppia, Professore straordinario di genetica medica

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

Sei mesi

L'attività di ricerca svolta nel corso dei mesi di aprile-giugno 2007 nell'ambito del progetto POR dal titolo "Definizione dei principali meccanismi molecolari e funzionali coinvolti nel processo di maturazione del gamete femminile" è stata incentrata soprattutto sulla definizione delle metodiche da utilizzare nel corso delle indagini successive.

Sono stati condotti in parallelo sia esperimenti volti a studiare i cambiamenti epigenetici in oociti isolati da follicoli pre-antrali, early-antral e antrali, sia esperimenti di analisi dell'espressione genica globale di oociti in diverse fasi nucleari.

Per quanto riguarda lo studio dei cambiamenti epigenetici che avvengono nella cellula uovo durante le fasi di accrescimento, è stato utilizzato come modello animale l'ovino, nello specifico agnelle prepuberi di età compresa tra i 3 e i 6 mesi. I diversi pool di oociti impiegati sono stati ottenuti da follicoli a diverso stadio di follicologenesi (follicoli pre-antrali, early-antral ed antrali), a loro volta isolati da ovaie fornite da diversi mattatoi della provincia di Chieti.

Le prove iniziali di estrazione del DNA genomico sono state effettuate su pool di 300 oociti per ciascuna categoria. Prove successive e adattamenti del protocollo hanno permesso di lavorare infine su pool più piccoli di 50 e 10 cellule.

Dopo estrazione, il DNA genomico totale è stato modificato con sodio-metabisolfito in modo da convertire le citosine non metilate in uracile e quindi poter distinguere i siti metilati delle sequenze studiate. Poiché sono state impiegate quantità limitanti di DNA, per riuscire a visualizzare i prodotti di interesse mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio si sono rese necessarie due reazioni di PCR consecutive (nested PCR). Le coppie di primers usate nelle reazioni di PCR sono state disegnate nelle regioni DMR (differently methylated regions) dei seguenti geni sottoposti ad imprinting: IGF2R, H19, BEGAIN, DIO3 e DLK1, secondo i criteri riportati in letteratura e/o utilizzando l'apposito programma Methprimer. Il disegno dei primers si è basato sull'utilizzo delle sequenze genomiche ovine depositate in banca dati (AY182033, AJ566210, AY509925, AY656759, AF354168). Infine, i prodotti di PCR sono stati clonati e sequenziati.

Per i geni BEGAIN, DIO3 e DLK1 gli esperimenti sono ancora in corso; per quanto riguarda i geni IGF2R e H19 è stata già effettuata l'analisi del loro livello di metilazione nei diversi stadi di sviluppo follicolare.

Per l'IGF2R è stato valutato il livello di metilazione di 17 isole CpG localizzate nell'introne 2 del gene: negli oociti isolati da follicoli pre-antrali il grado di metilazione è risultato essere dell'89%; negli oociti isolati da follicoli early-antral del 92%; negli oociti isolati da follicoli antrali del 94%.

Per quanto riguarda il gene H19, soggetto ad imprinting paterno, è stato valutato il livello di metilazione di 19 isole CpG localizzate nella regione 5' del gene: la metilazione è risultata assente nella maggior parte dei cloni in tutti gli stadi follicolari.

Il gene H19 è stato analizzato come controllo, in modo da identificare eventuali contaminazioni da cellule somatiche.

Per quanto riguarda l'indagine dei profili di espressione genica globale dell'ocita sono sorti diversi problemi tecnici dovuti allo scarso quantitativo di mRNA ottenibile. Come materiale di partenza sono stati utilizzati oociti suini isolati da follicoli di medio diametro (3-5 mm) prelevati da ovaie fornite da un mattatoio teramano. Le prove di estrazione sono state condotte su pools di 50 e 10 cellule utilizzando due diversi kit di estrazione ("Sv Total RNA Isolation System", Promega; "Pico Pure RNA Isolation Kit", Arcturus).

In seguito ad estrazione l'RNA totale è stato sottoposto a due cicli di amplificazione utilizzando il kit "Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit", Ambion.

L'amplificazione dell'RNA ha consentito di ottenere quantità di RNA sufficienti per l'allestimento di reazioni di ibridazione su microarray a partire da piccole quantità di campione.

Lo studio proseguirà effettuando un esperimento di ibridazione dei nostri campioni suini su piattaforme non-Affymetrix contenenti oligonucleotidi umani, dal momento che non sono disponibili in commercio microarray specifici per la specie suina.