



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di laurea**  
Scienze biologiche

***Nuove mutazioni in ZP1, ZP2 e ZP3 causano infertilità femminile a causa della anormale formazione della zona pellucida***

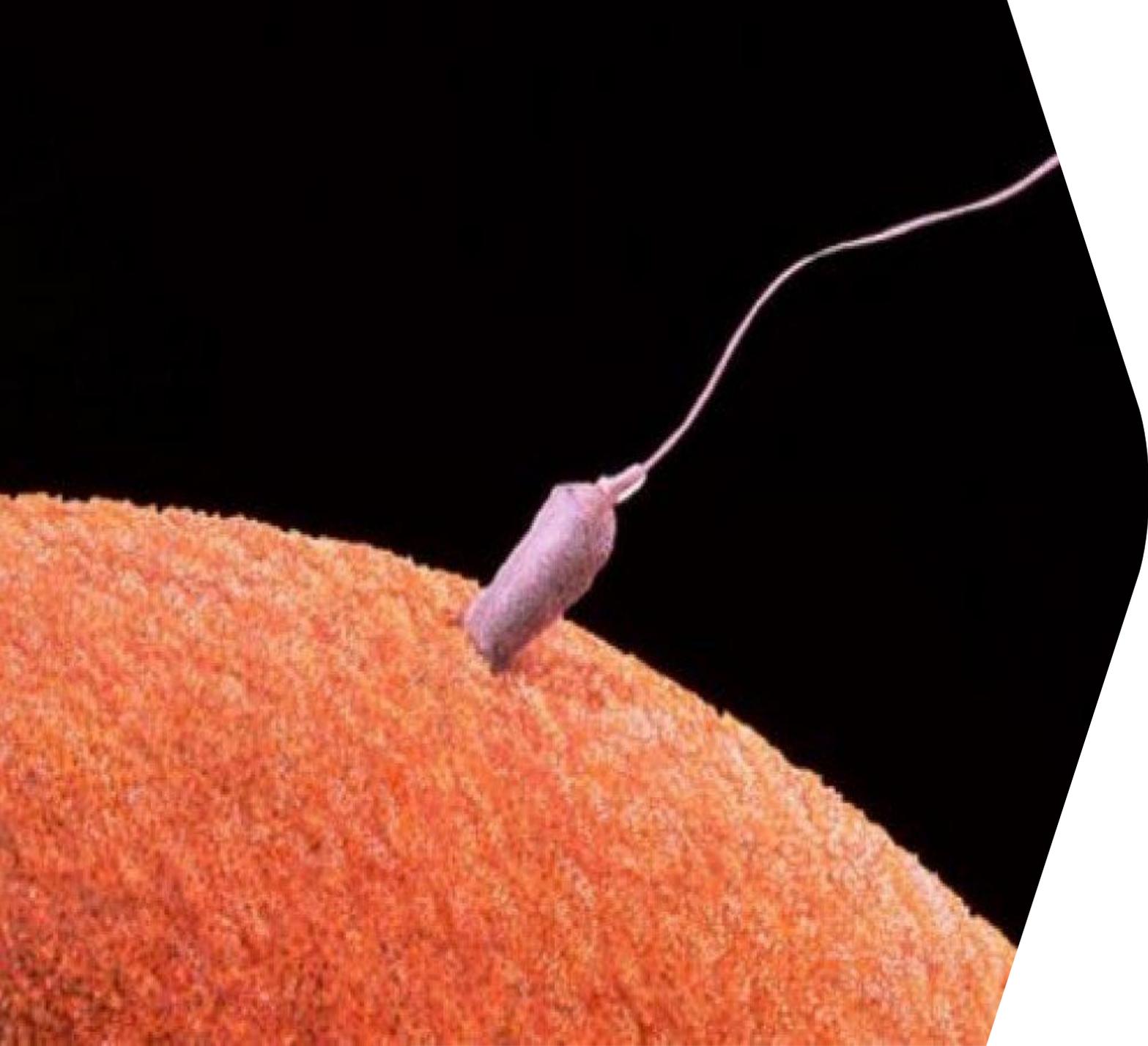
***Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation***

Tesi di Laurea di:  
Arianna Lilla

Docente Referente  
Chiar.mo Prof.  
Oliana Carnevali

**Sessione Estiva**

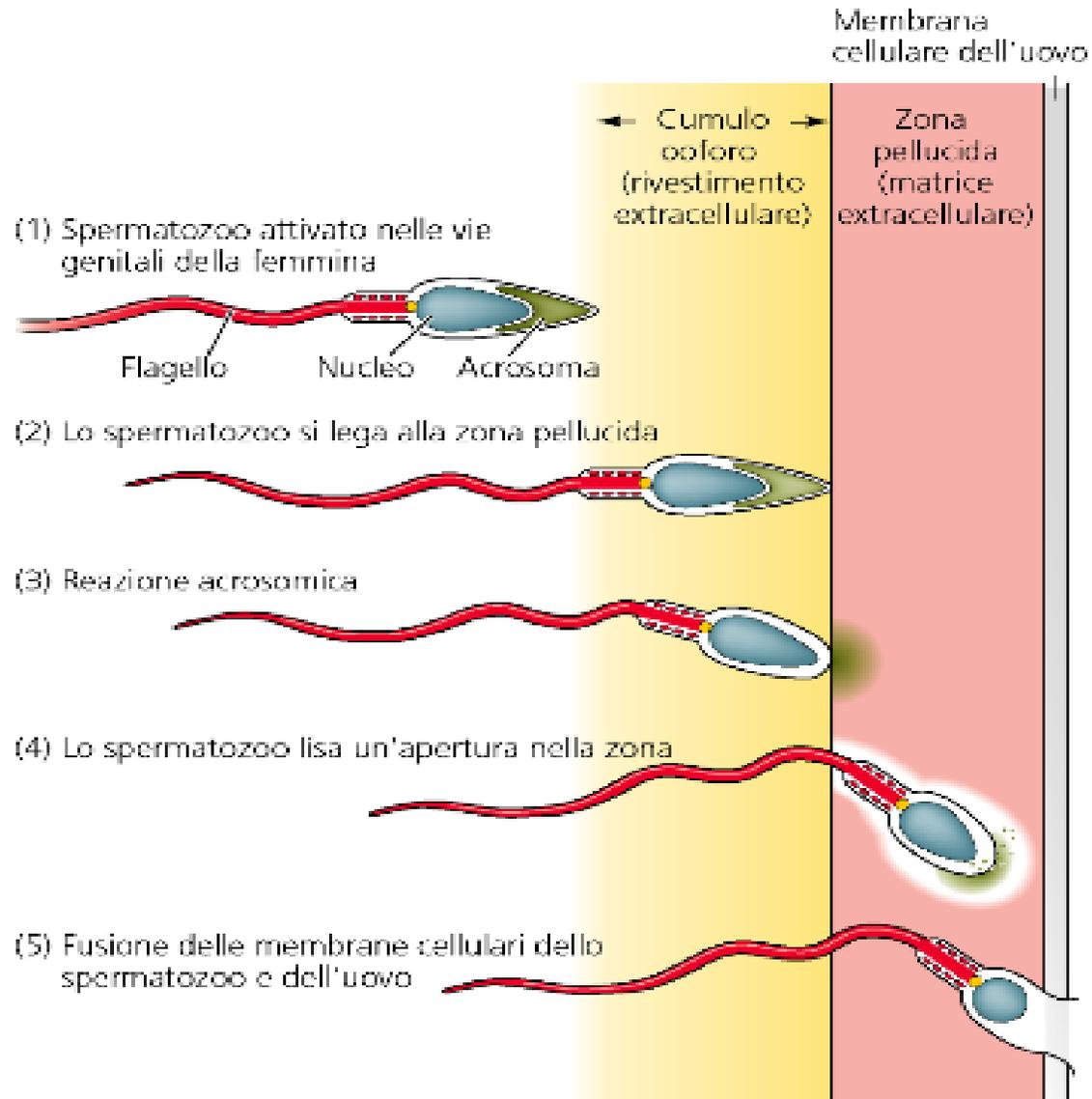
**Anno Accademico 2019/2020**



***Nuove mutazioni in ZP1,  
ZP2 e ZP3 causano  
infertilità femminile a  
causa della anormale  
formazione della zona  
pellucida.***

# FECONDAZIONE

*«Gli elementi che si uniscono sono le singole cellule, ciascuna in punto di morte, ma con la loro unione si forma un individuo ringiovanito, che costituisce un anello dell'eterno processo della vita»*  
(Lillie F.R., 1919)

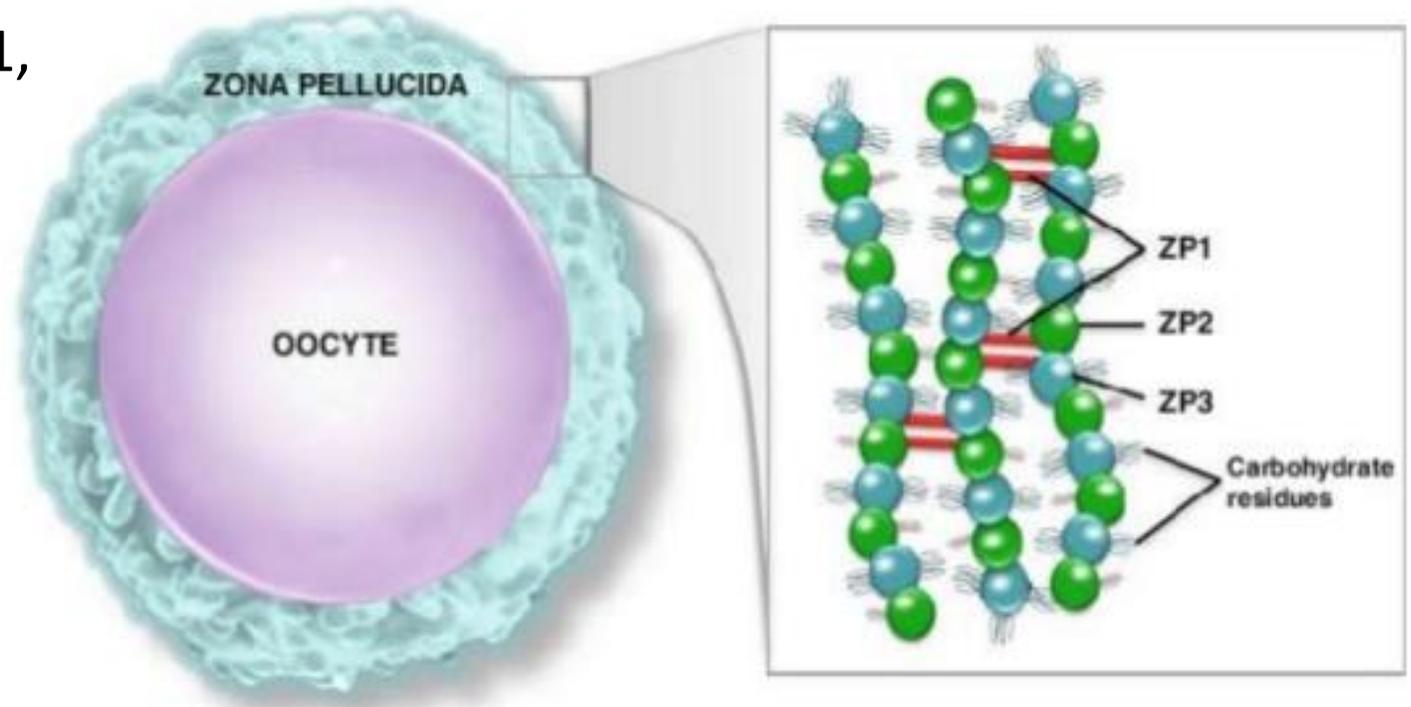


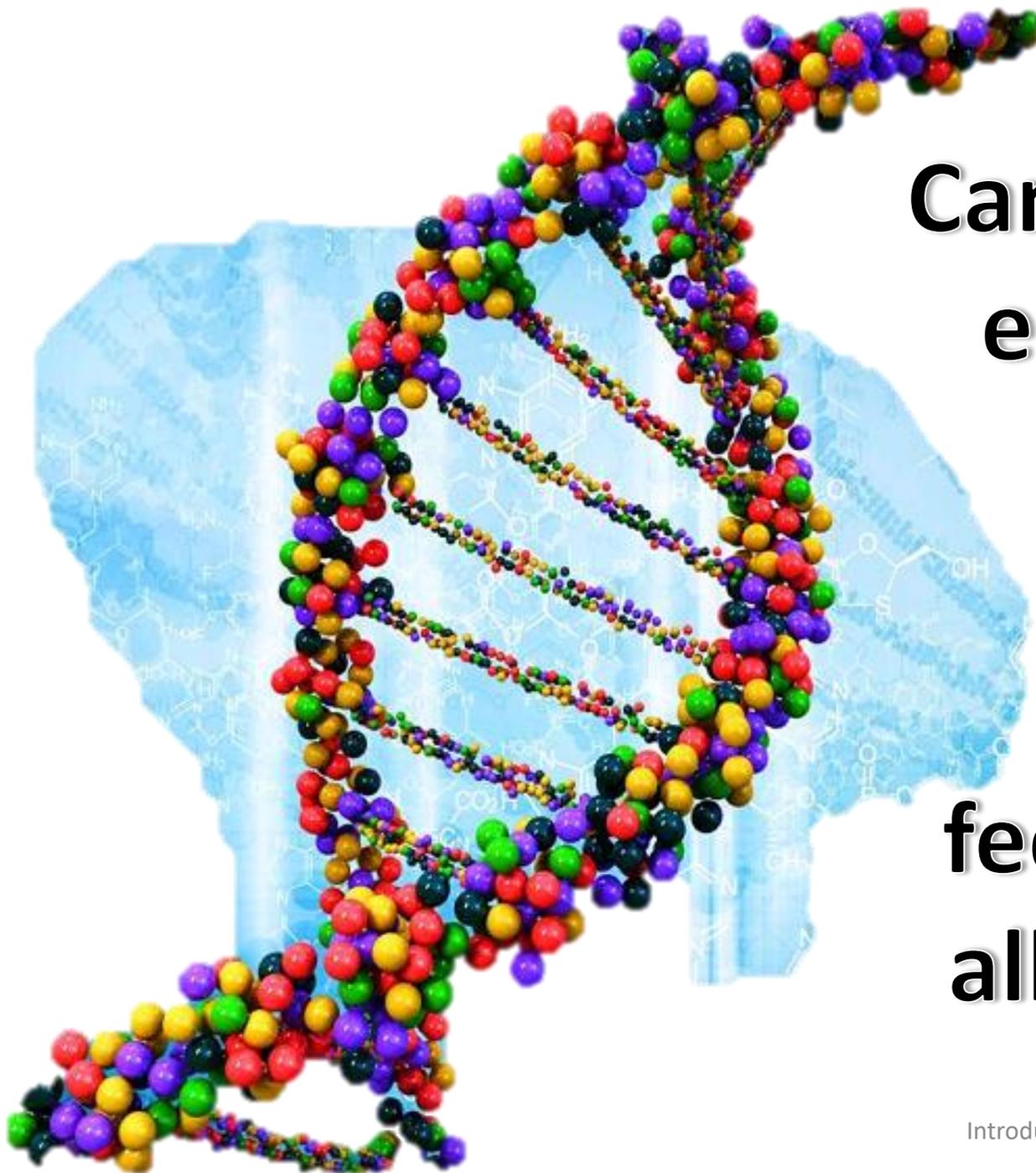
1. **Chemoattrazione** da parte di molecole solubili rilasciate dall'ovocita (resact)
2. **Attivazione** dello spermatozoo (speract)
3. **Reazione acrosomiale**: liberazione di enzimi litici
4. **Legame spermatozoo alla matrice extracellulare** (zona pellucida)
5. **Passaggio attraverso la matrice extracellulare**
6. **Fusione delle membrane cellulari**
7. **Attivazione ovocita**
8. **Anfimissi**: unione tra due pronuclei

**Spesso strato extracellulare che circonda la membrana plasmatica dell'ovocita.**

- Composto da glicoproteine (ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4)
- Lunghi filamenti di eterodimeri
- Svolge numerose funzioni durante la fecondazione
- FUNZIONE IMPORTANTE  
**ZP3**  
Si lega allo spermatozoo durante la prima adesione spermatozoo-uovo.

## ZONA PELLUCIDA





**Cambiamenti strutturali  
e funzionali nella zona  
pellucida possono  
influenzare il  
processo di  
fecondazione e portare  
alla sterilità femminile.**

# NUOVO STUDIO

Publicato sul «Journal of Human Genetics» nel 2019

## CASO CLINICO

7 pazienti donne appartenenti a 6 famiglie non correlate hanno ricevuto diagnosi di infertilità primaria

Normali riserve ovariche, cicli mestruali regolari, nessuna anomalia su ormoni sessuali e esami relativi alla sterilità

Trattamenti eseguiti: fecondazione assistita per 1-3 cicli

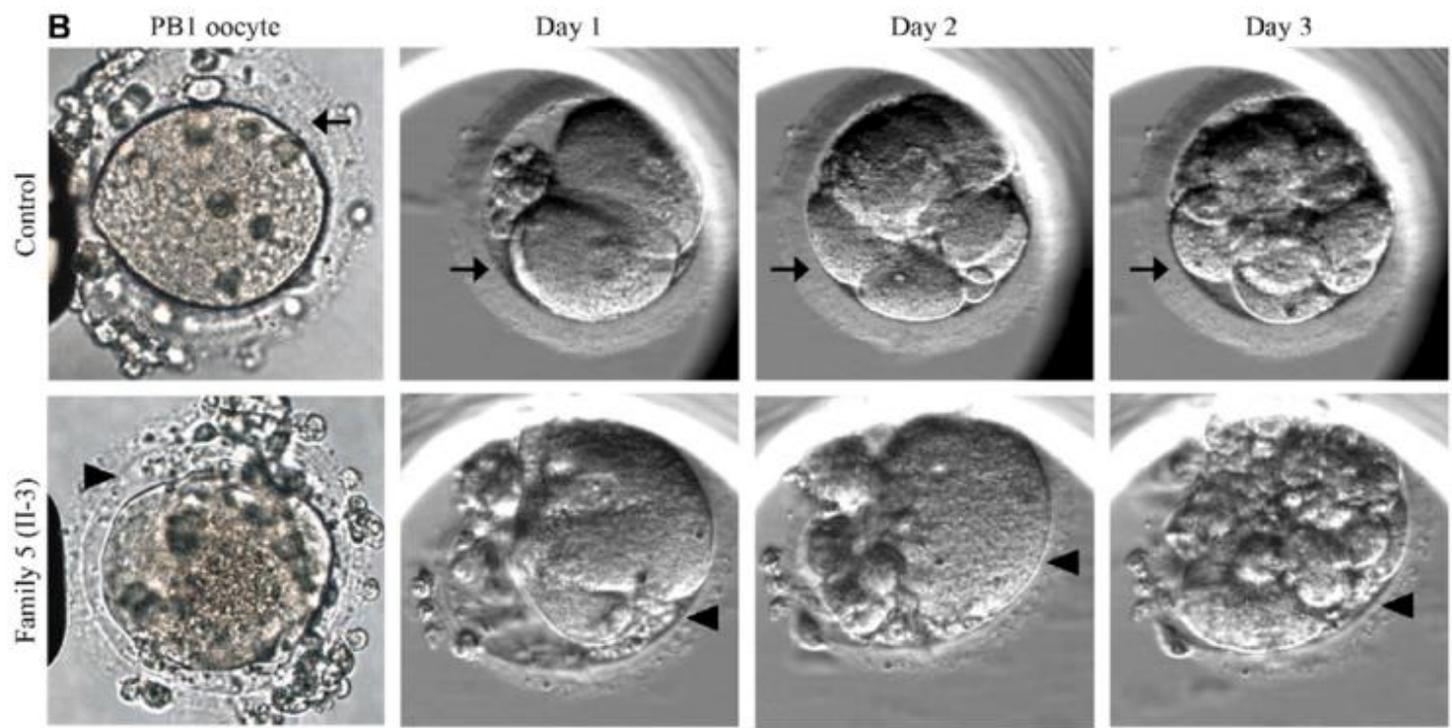
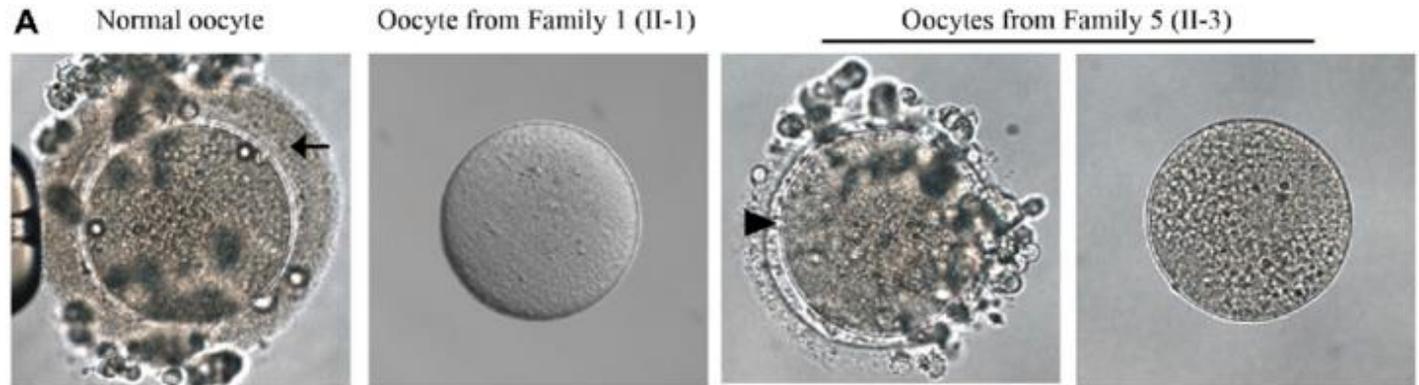
Risultati ottenuti: nessuna gravidanza



## CARATTERISTICHE INDIVIDUI COLPITI

	Fam 1	Fam 2	Fam 3	Fam 4	Fam 5 (II-2)	Fam 5 (II-3)	Fam 6
Anni	30	30	28	33	34	33	29
Durata infertilità	4	6	NA	6	6	10	6
Genitori	consanguinei		consanguinei		consanguinei	consanguinei	
Cicli IVF	2	3	1	3	4	3	3
Ciclo 1							
numero follicoli aspirati	NA	20	24	8	NA	NA	NA
numero follicoli recuperati	0	0	0	5 ZFO	NA	3 ZFO e 2 ZTO	6 ZFO
Ciclo 2							
numero follicoli aspirati	24	40		10	NA	NA	NA
numero follicoli recuperati	1 ZFO	0		6 ZFO	NA	4 ZFO e 3 ZTO	2 ZFO
Ciclo 3							
numero follicoli aspirati		20		6	NA	16	7
numero follicoli recuperati		3 ZFO		2 ZFO	NA	4 ZFO e 1 ZTO	0

IVF fecondazione in vitro, NA non disponibile, ZFO ovociti privi di ZP, ZTO ovociti con ZP sottile



**CARATTERISTICHE**  
**FENOTIPICHE**  
**OVCITI**

# IDENTIFICAZIONE MUTAZIONI in ZP1, ZP2 e ZP3

## SEQUENZIAMENTO INTERO ESOMA

- Lettura sequenze codificanti i geni
- Allineamento con sequenza di riferimento umana
- Annotazione varianti di sequenza in base a

### CRITERI DI FILTRAGGIO:

1. Varianti situate in regioni esoniche o di splicing
2. Varianti con frequenza allelica < 1%
3. Geni espressi in tutte le fasi di sviluppo



Identificazione variante candidata responsabile del fenotipo

## *FAMIGLIA 1*

Selezionate con priorità VARIANTI OMOZIGOTI  
essendo i genitori consanguinei



Identificazione mutazione:  
*MUTAZIONE MISSENSO OMOZIGOTICA c.1708G > A*  
*(p.Val570Met) nell'esone 11 di ZP1*



Convalidata con sequenziamento Sanger  
in altri membri della stessa famiglia

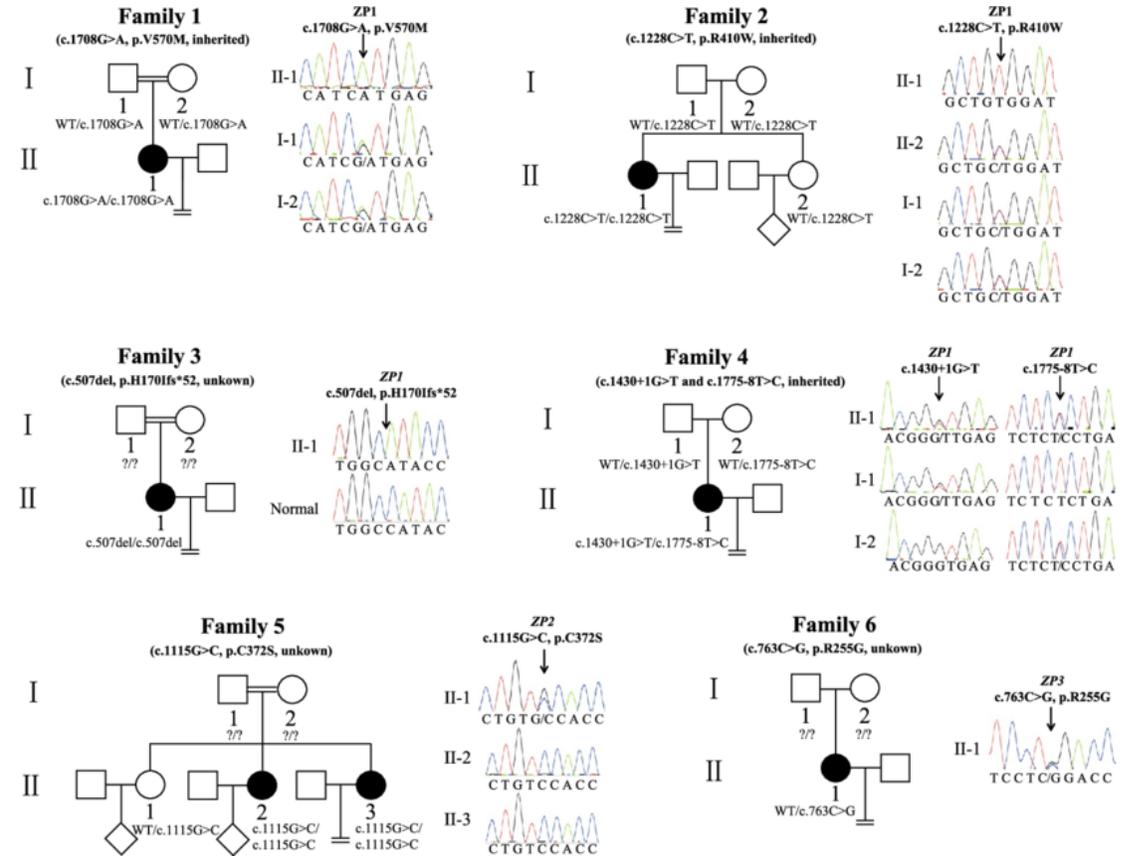
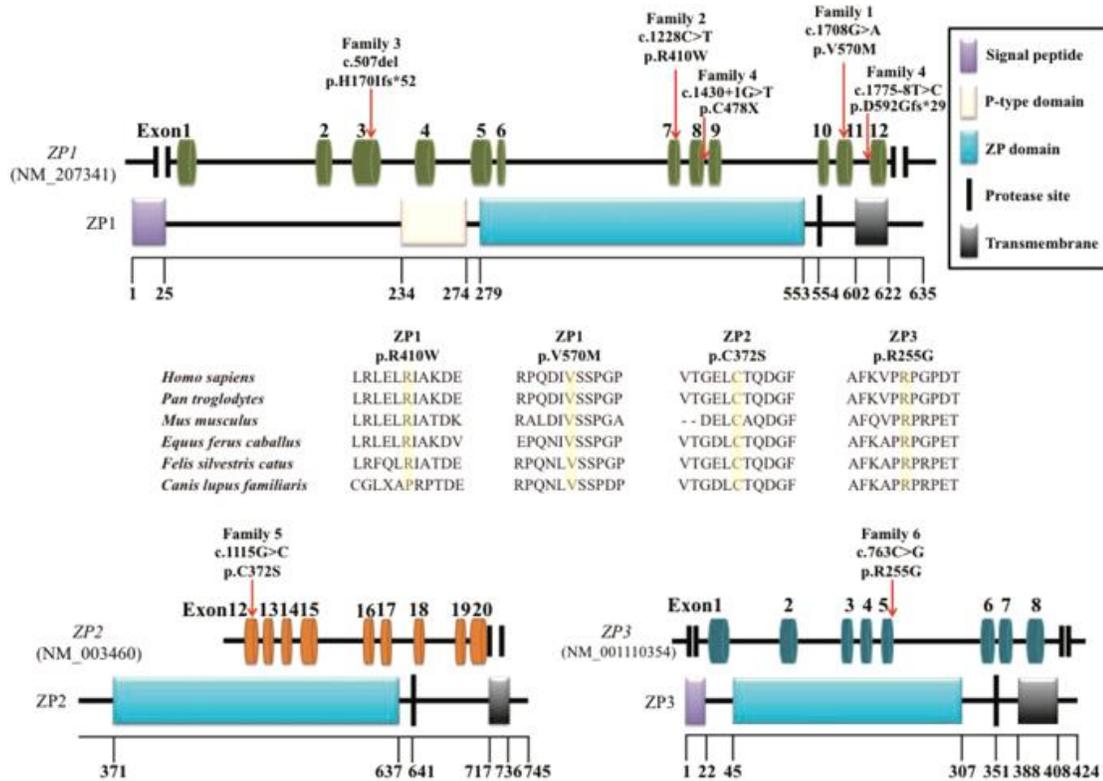


Entrambi i genitori avevano mutazione ZP1  
eterozigotica  
MODELLO DI EREDITARIETA' RECESSIVA

Mediante sequenziamento sono state identificate diverse mutazioni:

Gene mutato	Probandi nelle famiglie	Posizione genomica	Cambio cDNA	Cambio proteine	Tipo mutazione	genotipo
ZP1	Famiglia 1	Cromosoma 11	c.1708G> A	p.Val570Met	Missenso	Omozigote
	Famiglia 2	Cromosoma 11	c.1228C> T	p.Arg410Trp	Missenso	Omozigote
	Famiglia 3	Cromosoma 11	c.507delC	p.His170Ilefs*52	Delezione frameshift	Omozigote
	Famiglia 4	Cromosoma 11	c.1430+1G> T	p.Cys478X	Splicing	Eterozigote composto
		Cromosoma 11	c.1775-8T> C	p.Asp592G-lyfs*29	Splicing	
ZP2	Famiglia 5	Cromosoma 16	c.1115G> C	p.Cys372Ser	Missenso	Omozigote
ZP3	Famiglia 6	Cromosoma 7	c.763C> G	p.Arg255Gly	Missenso	Eterozigote

# Posizione e conservazione dei residui mutati in ZP1, ZP2 e ZP3

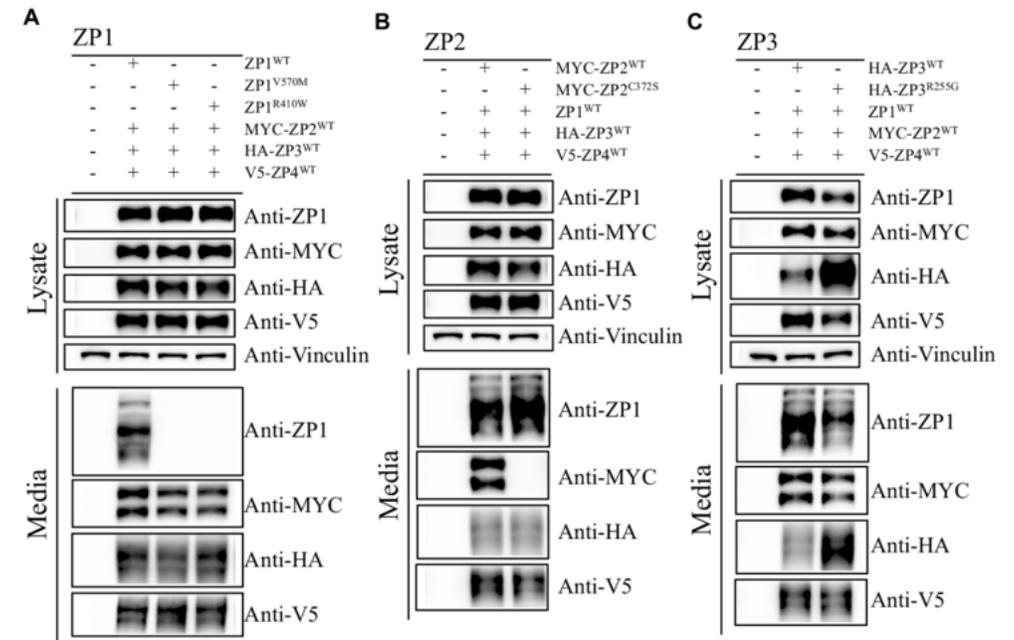


- Il sequenziamento Sanger:
- Famiglie 1, 2, 3, 4, 5  
Modello ereditario recessivo
  - Famiglia 6  
Modello ereditario dominante

# EFFETTI MUTAZIONI

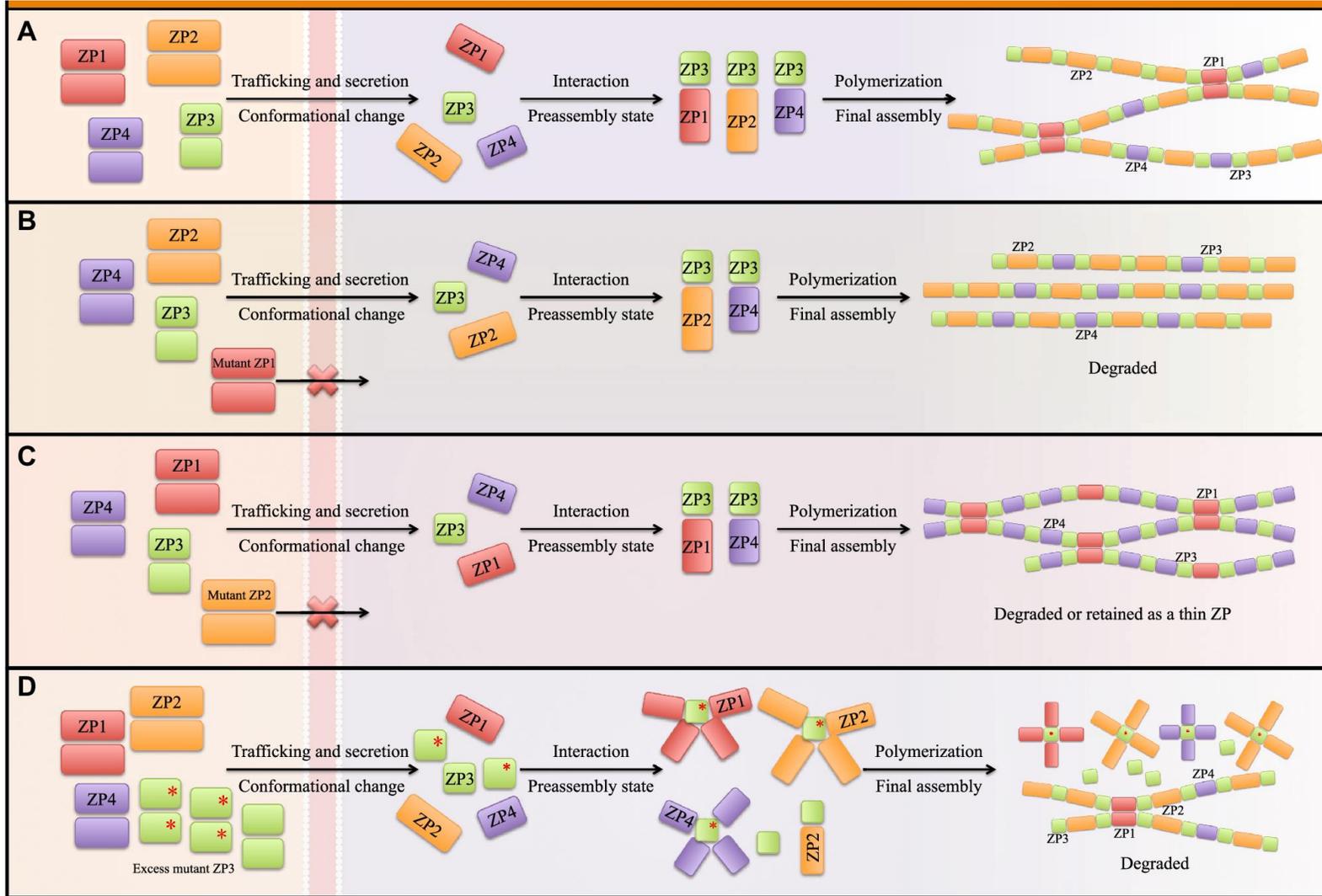
## Effetti delle mutazioni missenso in vitro sull'espressione e funzione delle proteine

- Cellule CHO, coltivate in DMEM, sono state trasfettate tramite TRASFEZIONE TRANSIENTE con i plasmidi FLAG-ZP1, MYC-ZP2, HA-ZP3 e V5-ZP4
- Dopo 48h sono state raccolte le proteine secrete attraverso lavaggio con PBS e incubate per 30 min a 4°C con tampone di lisi RIPA e cocktail inibitore delle proteasi dell'1%
- Le proteine sono poi state identificate mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici grazie al WESTERN BLOTTING



È emerso che:

Alcune proteine mutate non sono secrete nel terreno di coltura cellulare a causa di possibili ostruzioni secretorie che determinano il mancato assemblaggio della ZP



ZONA PELLUCIDA  
NORMALE E  
MUTATA

# INFERTILITA'



Dott. Alberto Vaiarelli

«Problema rilevante della nostra società»: investe il 15/20% della società

Cause possono essere attribuibili all'uomo (30%), alla donna (30%) o ad entrambi i partner

Legata a fattori ambientali (età), anatomici, genetici (alterazioni del cariotipo o dei geni)

Esperti ritengono che le cause di infertilità in circa il 20-30% non sono state ancora scoperte, ma si pensa che abbiamo una radice genetica che non è stata ancora ben compresa.

# RIASSUNTO

La fecondazione è un processo in cui il gamete maschile e quello femminile si fondono formando una nuova cellula, lo zigote, da cui si svilupperà il nuovo individuo. Fondamentale per questo processo risulta essere la zona pellucida, spesso strato extracellulare che circonda l'ovocita. Numerosi studi hanno dimostrato che mutazioni a livello di questo strato possono influenzare il processo di fecondazione, tanto da portare alla sterilità.

Nel 2019 è stato pubblicato un nuovo studio che ha visto come oggetto d'interesse 7 pazienti con infertilità primaria, pur avendo normali riserve ovariche e nessuna anomalia su esami relativi alla sterilità.

Mediante sequenziamento dell'intero esoma e sequenziamento Sanger, sono state identificate diverse nuove mutazioni in ZP1, ZP2 e ZP3. Inoltre studi in cellule ovariche di criceto cinese hanno mostrato che queste mutazioni potrebbero influenzare l'espressione e la funzione delle corrispondenti proteine, fornendo una spiegazione meccanicistica per i fenotipi. L'infertilità è un problema rilevante nella nostra società e riguarda sia l'uomo che la donna.

Si deve principalmente a fattori ambientali, anatomici o genetici.

Tuttavia in circa il 20-30% dei casi non sono state ancora scoperte le cause, in quanto questi pazienti mostravano normali riserve ovariche, utero e tube di Falloppio normalmente funzionanti. Per tale motivo gli esperti ritengono che quasi tutte le patologie che possono causare infertilità siano dovute da una predisposizione genetica.

Per il futuro, i ricercatori sperano di identificare e capire gli schemi e le combinazioni genetiche in tutti gli individui che convivono con l'infertilità. Solo allora, gli specialisti potranno migliorare la diagnosi e la cura di ciascuna di queste patologie.

Tuttavia, c'è ancora molta strada da fare!

# BIBLIOGRAFIA

- Abou-Haila A, Bendahmane M, Tulsiani DR (2014) Significato delle glicoproteine della zona pellucida dell'uovo nell'interazione e fecondazione spermatozoo. *Minerva Ginecol* 66: 409–419
- Andreuccetti P., Carnevali O., Dini L., Falugi C., Filosa S., Kalthoff K., Viscuso R., *Biologia dello sviluppo*, Milano, McGraw-Hill, 2010
- Gupta SK (2015) Ruolo delle glicoproteine della zona pellucida durante la fecondazione nell'uomo. *J Reprod Immunol* 108: 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.08.006>
- Lefievre L et al (2004) Nell'uomo sono espresse quattro glicoproteine della zona pellucida. *Hum Reprod* 19: 1580–1586. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh301>
- Vaiarelli A., Infertilità di coppia: un problema rilevante della nostra società, in “Messina Medica 2.0”, 5 Gennaio 2020



*Grazie  
per  
l'attenzione!*

**FINE**