



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
C.d.L. Scienze Biologiche

La demetilazione del DNA delle cellule germinali primordiali e lo sviluppo richiedono la sintesi translesione del DNA

Primordial germ cell DNA demethylation and development require DNA translesion synthesis

Tesi di laurea di:
Pigliapoco Arianna

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
Maradonna Francesca

Sessione estiva luglio 2026

Anno Accademico 2025/2026

Introduzione

- Si stima che nel mondo una persona su sei sia affetta da infertilità, patologia definita dall'OMS come «l'assenza di concepimento dopo 12-24 mesi di regolari rapporti sessuali mirati non protetti».
- Secondo l'Istituto Superiore della Sanità il dato in Italia si aggira attorno al 15% mentre nel mondo circa il 10-12%.
- I fattori coinvolti nei pathway di risposta ai danni al DNA (DDR) risultano indispensabili per la fertilità, mutazioni a loro carico sono associate all'incapacità di procreare.

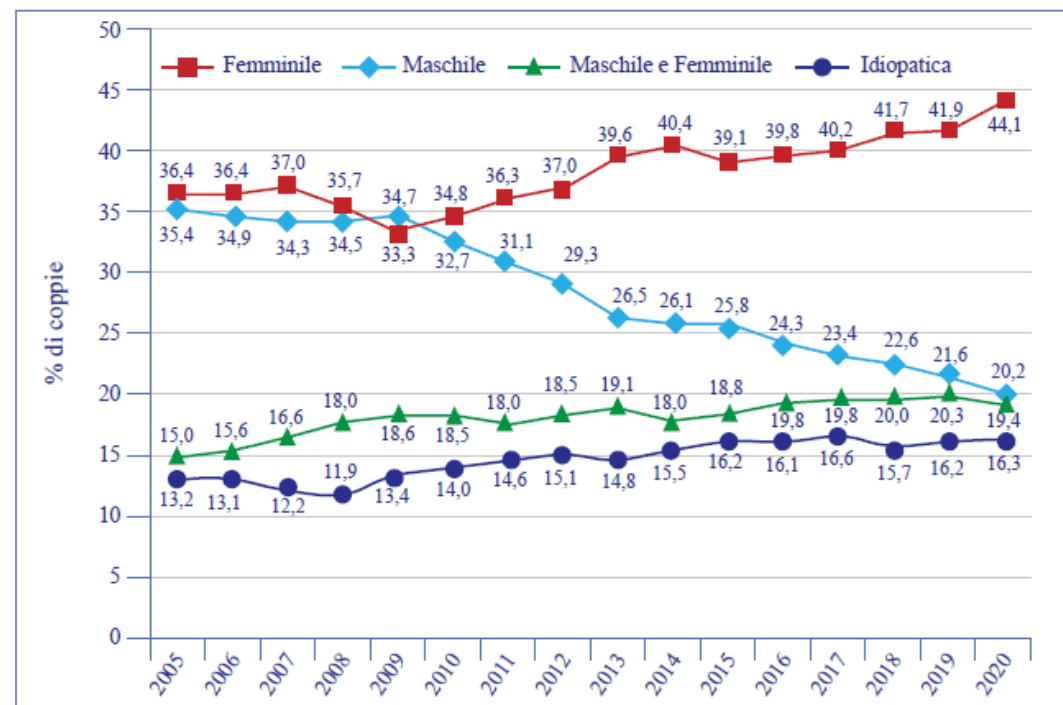
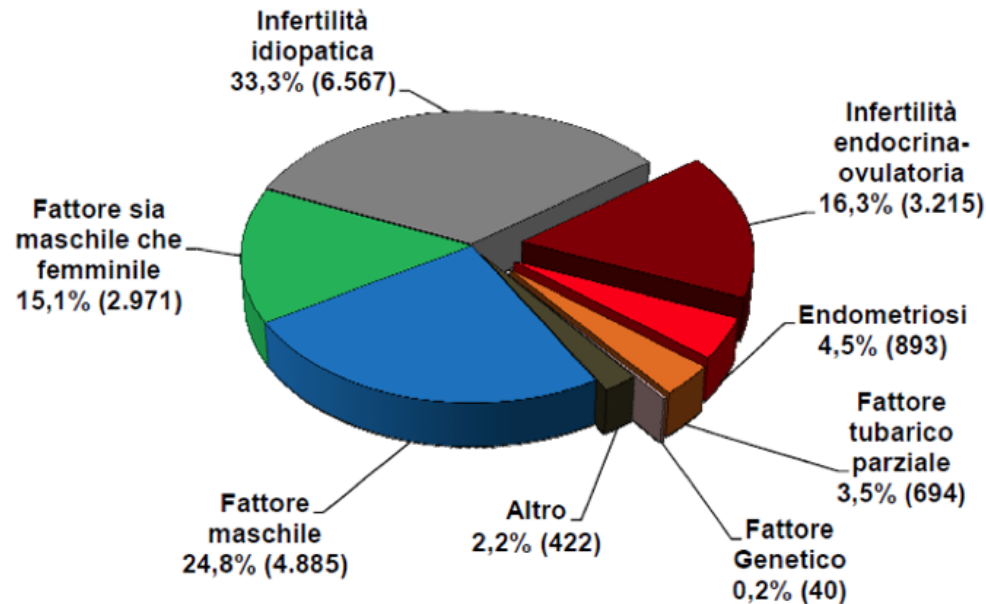


Figura 2 - Distribuzione temporale delle cause di infertilità tra i pazienti che hanno effettuato cicli di procreazione medicalmente assistita a fresco (2005-2020).

Dati Registro Nazionale Procreazione Medicalmente Assistita, Istituto Superiore di Sanità

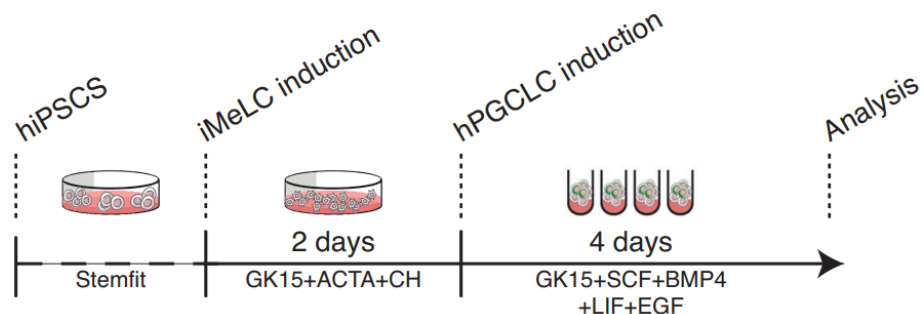
Scopo del lavoro



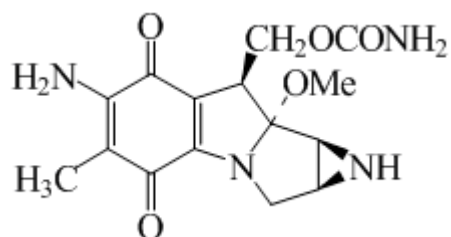
- Una fra tutte, è la via di sintesi translesione del DNA (TLS) che permette agli errori durante la replicazione di essere oltrepassati.
- La perdita di funzione di REV1, componente centrale di TLS, compromette il corretto sviluppo delle cellule germinali primordiali e di conseguenza la fertilità.

L'obiettivo principale di questo studio è indagare il ruolo della **sintesi translesione del DNA (TLS)** nello sviluppo delle cellule germinali primordiali e nella fertilità.

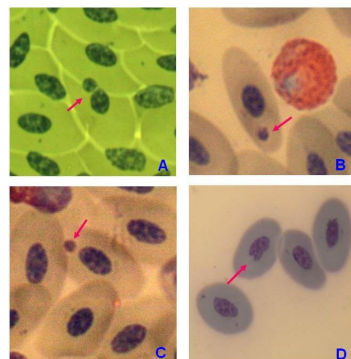
Materiali e Metodi



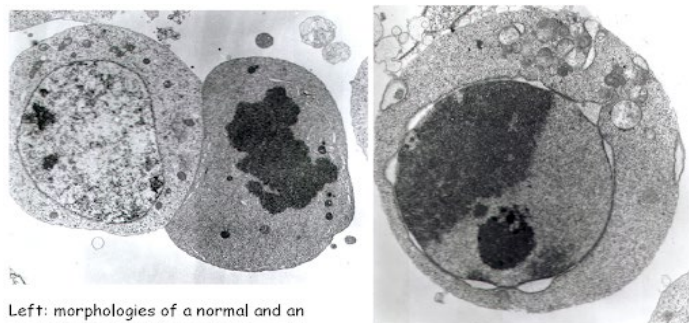
Mitomicina C (MMC):



Test del micronucleo:



PGC in coltura:



Left: morphologies of a normal and an apoptotic PGC. Right: morphologies of apoptotic PGCs in culture.

Fondamentali per lo studio:

- **hiPSC** : cellule staminali pluripotenti indotte umane
- **hPGCLC**: cellule hiPGC-like
- **iMeLCs**: “Incipient mesoderm-like cells” stadio intermedio tra le hiPSC e le hPGCLC
- **BTAG hiPSC**

Tecniche utilizzate:

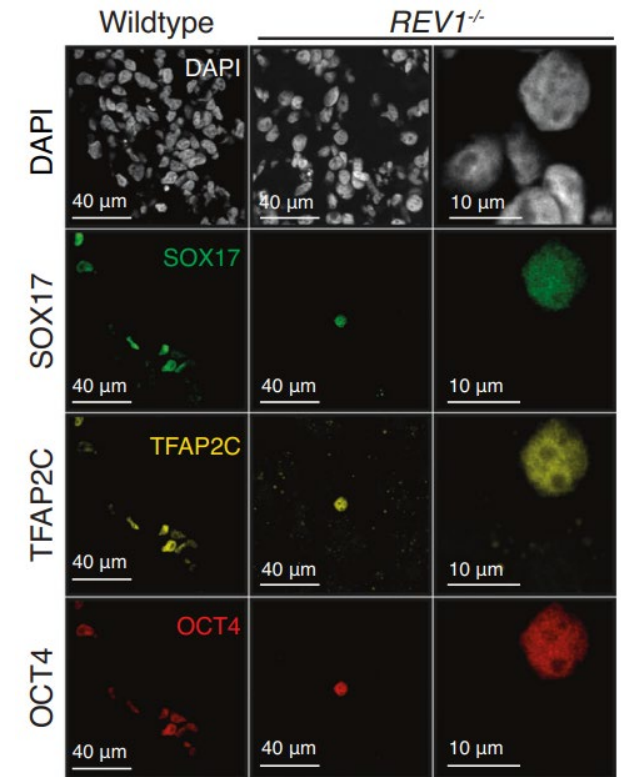
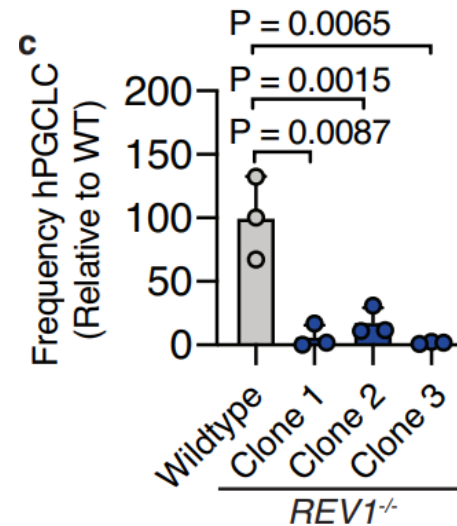
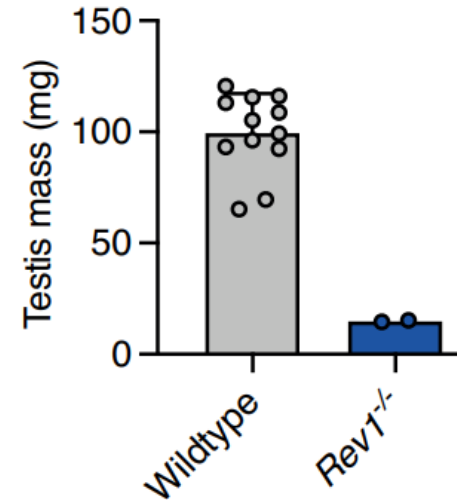
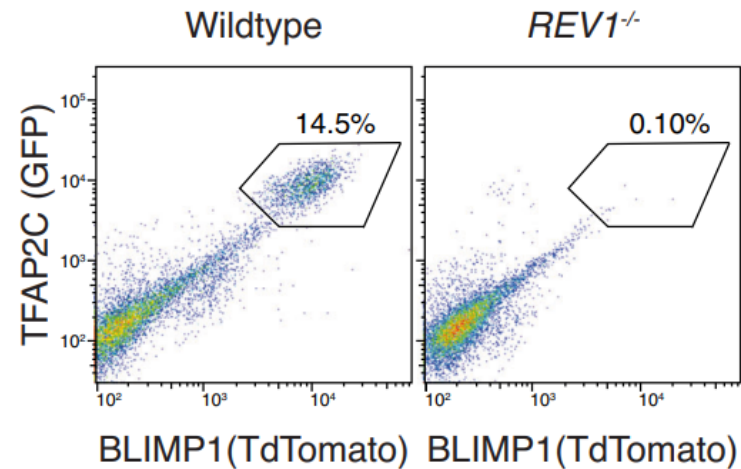
- Trattamento con Mitomicina C (MMC)
- Citometria a flusso
- Immunocolorazione
- Immunoistochimica (ICC)
- Immunofluorescenza (IF)
- Sequenziamento con Bisolfito

Analisi ed esaminazioni:

- ❖ Formazione dei corpi embrioidi (EBs)
- ❖ Esaminazione della proliferazione
- ❖ Esame dell'emocromo
- ❖ Analisi degli ormoni del siero
- ❖ Analisi ematopoietica
- ❖ Test del “micronucleo”

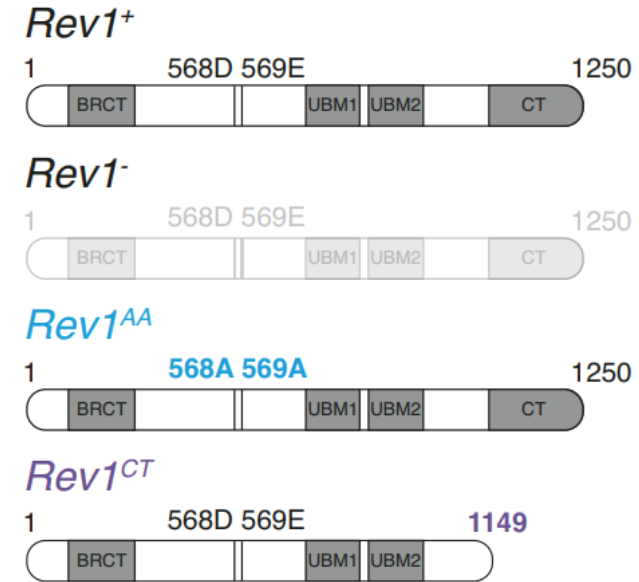
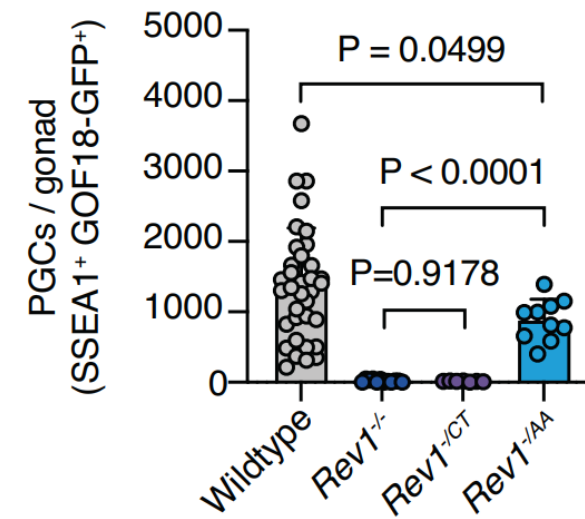
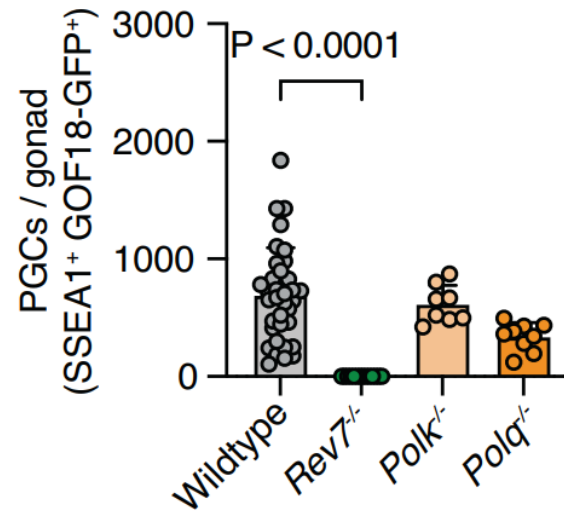
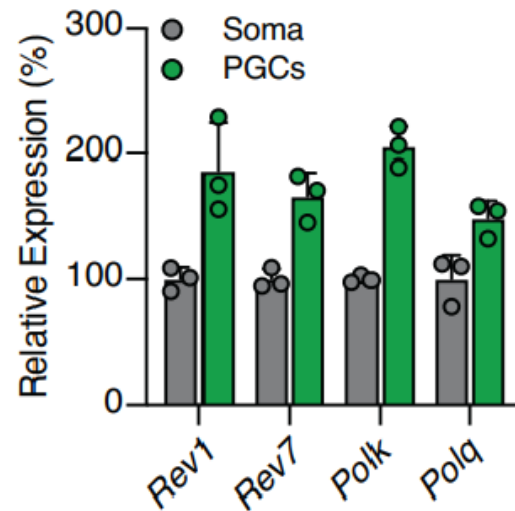
Risultati

- REV1 è necessario per lo sviluppo delle PGC perché le linee cellulari REV1^{-/-} hanno ridotta capacità di induzione delle hPGCLC.
- Ciononostante, l'esigua quantità di PGC prodotta è comunque in grado di esprimere i markers di staminalità quali SOX17, TFAP2C, OCT4.



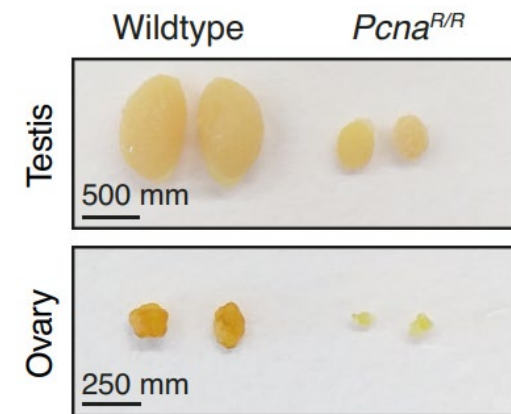
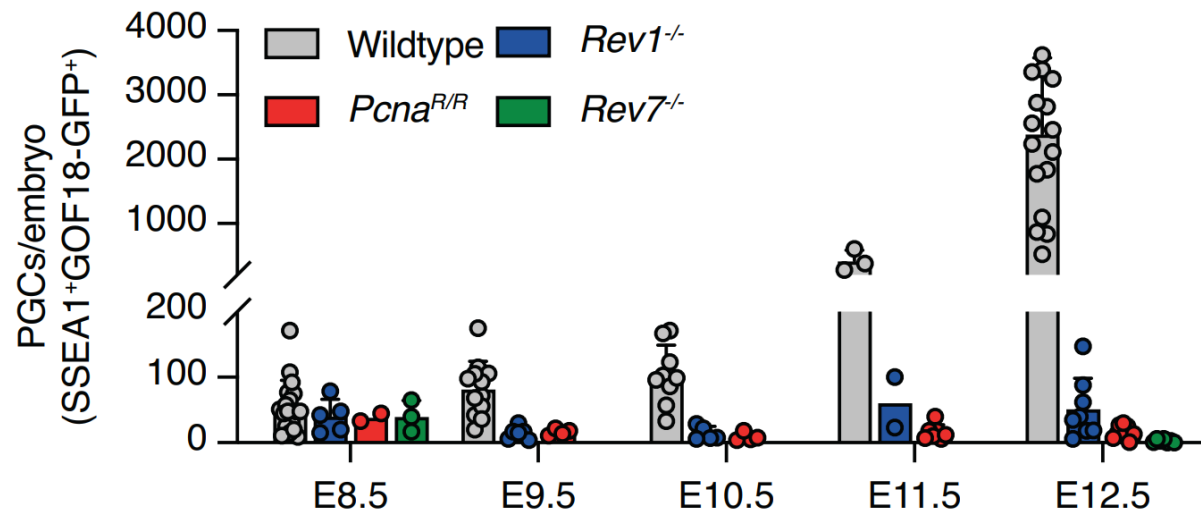
Risultati

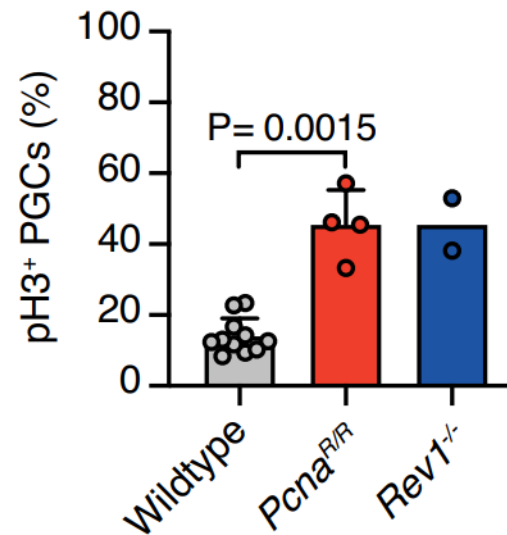
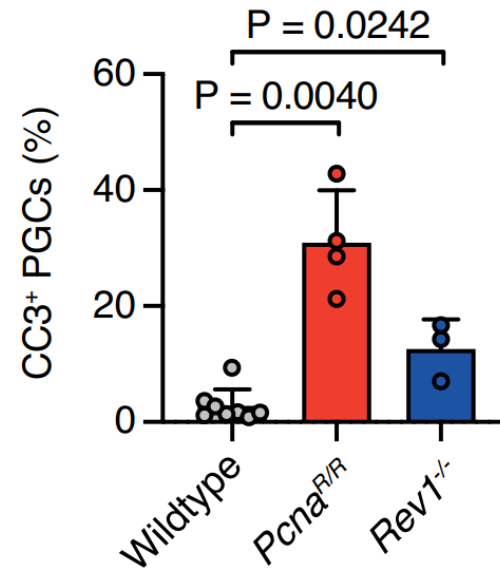
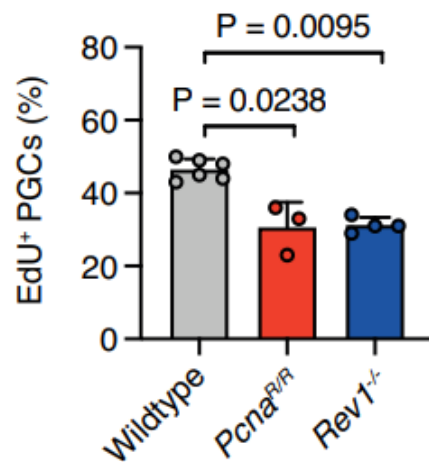
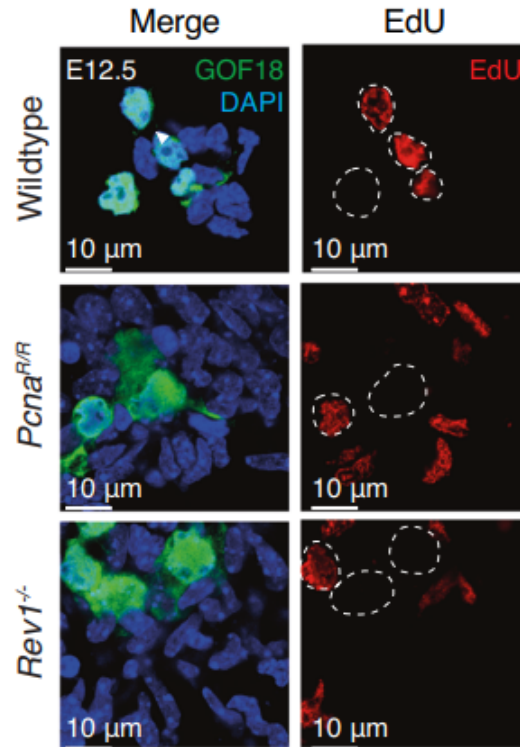
- REV1 è un fattore necessario per superare i blocchi della replicazione e, in particolare, il suo dominio C-terminale risulta essere cruciale nel TLS pathway poiché agisce mediando l'interazione con la subunità Polζ di REV7.
- Le analisi dimostrano che è l'interazione fisica tra le due subunità ad essere richiesta nelle PGC.



Risultati

- La mancanza di modifiche post-trascrizionali del PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) compromette la maturazione delle gonadi che risultano più piccole e inefficienti.
- Tuttavia, mutazioni a carico del PCNA non implicano danni all'omeostasi dei tessuti somatici.





Risultati

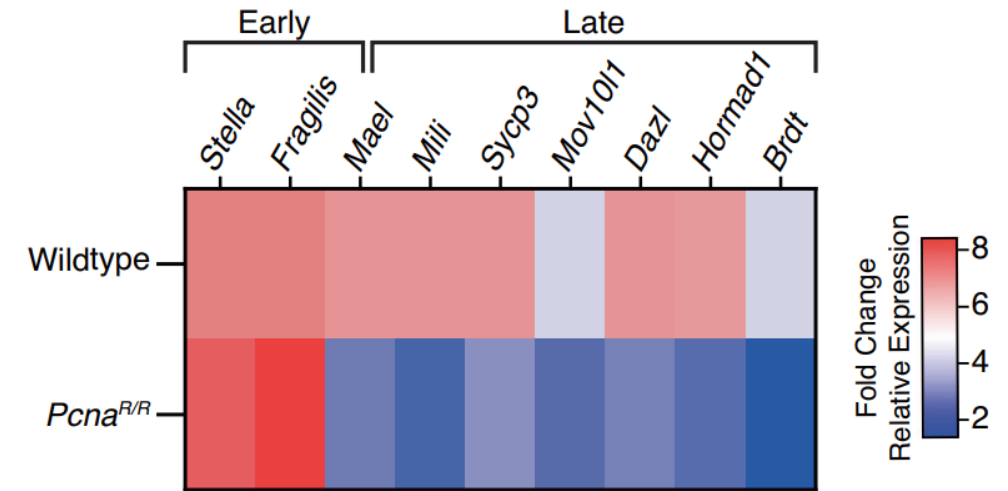
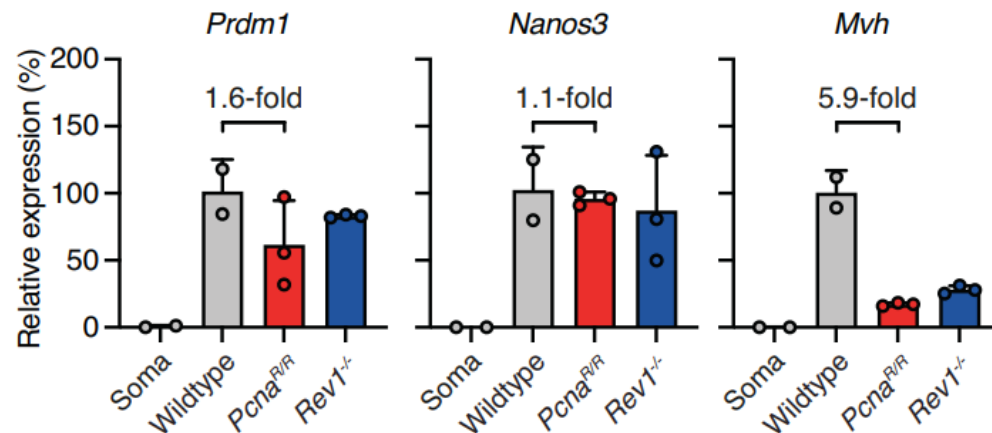
Le PGC dei mutanti *Pcna^{R/R}* e *REV1^{-/-}*:

- accumulano danni al DNA
- sono meno proliferative
- si bloccano in fase G2/M
- sono più soggette ad apoptosi

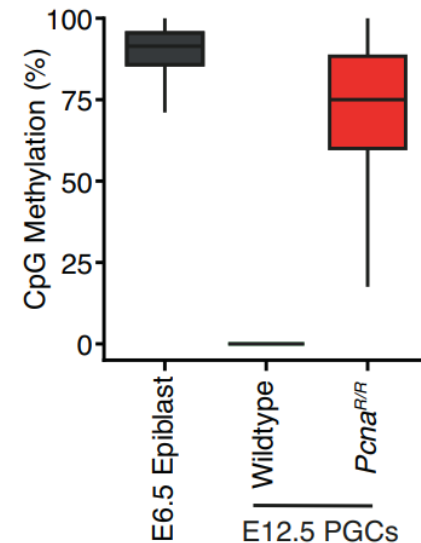
Questi dati dimostrano che in assenza del TLS pathway si accumulano danni al DNA.

Risultati

- La perdita dei meccanismi TLS previene la demetilazione del DNA nelle PGC dei mutanti che pertanto risultano incapaci di esprimere i marker degli stadi avanzati di sviluppo.
- I dati rivelano che i mutanti ad uno stadio avanzato di accrescimento (E12.5) sono in realtà paragonabili alle cellule dell'epiblasto selvatico (E6.5) sia a livello trascrizionale che nel metiloma.



Global CpG Methylation



Discussione

La sintesi translesione del DNA (TLS) è un meccanismo altamente conservato per lo sviluppo delle cellule germinali primordiali e per la fertilità nei mammiferi, dal momento che in sua assenza si riscontra:

1. Blocco dello sviluppo e instabilità genomica
2. Fallimento della riprogrammazione epigenetica
3. Implicazioni per l'infertilità umana
4. Necessità specifica per la linea germinale

Conclusione

- Il lavoro dimostra che il TLS pathway non agisce solamente nel tollerare i danni al DNA ma è un prerequisito fondamentale affinché avvenga la corretta riprogrammazione epigenetica, la proliferazione della linea germinale e il raggiungimento delle dimensioni gonadiche standard.
- Oltretutto, è importante sottolineare come, dallo studio effettuato, non siano emerse criticità proliferative/funzionali a livello somatico permettendo dunque di affermare che anomalie a carico della via di sintesi translesionale del DNA sono unicamente circoscritte al distretto germinale.

Bibliografia:

Immagini tratte da:

- Primordial germ cell DNA demethylation and development require DNA translesion synthesis
- ISS-Istituto Superiore di Sanità <https://www.iss.it/infertilit%C3%A0-e-pma>
- OMS- Organizzazione Mondiale della Sanità
- Wikipedia-https://en.wikipedia.org/wiki/Micronucleus_test
- http://biomedicinaeprevenzione.uniroma2.it/laboratory-primordial-cell-germ-study_en.html
- <https://dabitonto.com/rubriche/vincere-l-infertilita-conoscendo-le-cause/>
- <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/m7949?srsId=AfmBOopsK5FA6IN7XirIk87NML2SzMcYqNNHSdZnNi5iuvOmpLDsInI4>

Informazioni tratte da:

- Primordial germ cell DNA demethylation and development require DNA translesion synthesis
- ISS-Istituto Superiore di Sanità
- OMS- Organizzazione Mondiale della Sanità