



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA in Biologia e Medicina della
Rigenerazione

INDIRIZZO: Endocrinologia Comparata

CICLO XX

Analisi *in vivo* dello sviluppo del pancreas di zebrafish

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

Supervisore: Ch.mo Prof. Marino Bortolussi

Correlatore: Dr.ssa Natascia Tiso

Dottoranda: Francesca Benato

31 gennaio 2008

RIASSUNTO

Il pancreas dei vertebrati ha derivazione endodermica ed è composto da un compartimento endocrino, costituito da cellule deputate alla secrezione di ormoni quali insulina, glucagone, somatostatina, polipeptide pancreatico e grelina nel flusso sanguigno e da una porzione esocrina che rilascia enzimi digestivi nel lume intestinale.

Una delle prime decisioni nel differenziamento delle cellule pancreatiche è la scelta tra destino endocrino ed esocrino. Il fattore di trascrizione *ptf1a* è uno dei geni essenziali per il differenziamento della porzione esocrina. Lo zebrafish negli ultimi anni è stato ampiamente impiegato come modello per studiare i geni implicati nella specificazione e nel differenziamento dell'endoderma e degli organi da esso derivanti. Lo studio è reso possibile dal fatto che i geni e i meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo embrionale sono altamente conservati tra questo piccolo ciprinide e i vertebrati superiori.

Nonostante i numerosi studi effettuati in questi ultimi anni, la conoscenza dei meccanismi molecolari che stanno alla base di sviluppo e differenziamento del pancreas di zebrafish è ancora incompleta e molti fattori coinvolti in questo processo sono ancora sconosciuti.

Durante questi tre anni di Dottorato la sottoscritta ha prodotto una linea transgenica di zebrafish in cui l'espressione della proteina fluorescente verde GFP è indotta nel pancreas esocrino sotto la guida di 5,5 chilobasi di regione regolatrice a monte del gene *ptf1a*. Tale lavoro ha fornito un nuovo "strumento" utile per indagare l'organogenesi pancreatico, nonché i meccanismi di regolazione del gene *ptf1a* stesso. La stessa regione regolatrice di *ptf1a* è stata clonata a monte della proteina fluorescente rossa DsRed con l'impiego del sistema di trasposizione Tol 2, che permette di aumentare la frequenza di integrazione del transgene di interesse nel genoma delle cellule germinali di zebrafish. Questa strategia permette di ottenere una linea transgenica da poter utilizzare in incroci con altre linee esprimenti la GFP sotto il controllo di differenti promotori. Allo scopo di individuare quale fosse la regione promotoriale minima di

ptf1a in grado di indurre l'espressione transiente della GFP nel pancreas, sono state anche clonate 2,6 chilobasi di promotore a monte della stessa proteina. In questo caso, tuttavia, si è ottenuta un'espressione ubiquitaria della proteina fluorescente verde. Sempre allo scopo di chiarire meglio la genetica dello sviluppo pancreatico, la sottoscritta ha preso parte ad un'analisi genetica su larga scala, che si è svolta presso l'Istituto Max Planck di Tuebingen (Germania), utilizzando larve di zebrafish ottenute da linee mutagenizzate con l'agente chimico etilnitrosourea (ENU). Durante questo periodo è stata valutata la presenza di difetti nell'espressione del marcatore *insulina*, rilevato mediante saggio di ibridazione *in situ*, analizzando più di 1200 famiglie di zebrafish. Uno dei mutanti identificati, in cui il marcatore *insulina* era assente, è stato caratterizzato e mappato, in collaborazione con il Prof. Dirk Meyer, rivelando una nuova mutazione a carico del gene *raldh2 (aldh1a2)*, responsabile del fenotipo già osservato nel mutante di zebrafish denominato *neckless*. Durante questo periodo di analisi genetiche era stato impiegato anche il marcatore degli astrociti *gfap*, che permetteva di rilevare difetti a carico dell'astroglia. Per due delle nove famiglie mutanti di zebrafish aventi difetti nell'espressione del marcatore *gfap* è stato determinato su quale cromosoma mappa la mutazione responsabile del fenotipo osservato.

ABSTRACT

The vertebrate pancreas is an endoderm-derived organ composed by an endocrine portion with cells secreting hormones, such as insulin, glucagon somatostatin, pancreatic polipeptide and ghrelin in the blood flow, and an exocrine one that releases digestive enzymes in the gut lumen.

One of the first decisions in the pancreatic differentiation is between endocrine and exocrine cell fates. The transcription factor *ptf1a* is an essential gene involved in the exocrine differentiation. In these years zebrafish has been widely employed as a model to study genes involved in endoderm and endoderm-derived organs specification and differentiation. This study is possible because genes and molecular mechanism implicated in embryonic development are highly conserved between this animal model and higher vertebrates. Despite several works done in the last years, the knowledge of molecular mechanisms underlying pancreatic development and differentiation in zebrafish is incomplete and many factors involved in this process are still unknown.

During these three years I produced a zebrafish transgenic line in which the GFP is directed in the exocrine pancreas by 5,5 kbp of *ptf1a* upstream regulatory region. This work gave us a new useful "tool" to clarify pancreatic organogenesis and to understand how *ptf1a* itself is regulated. The same *ptf1a* promotorial region was cloned upstream the *DsRed* gene with a new system called Tol2 that is able to increase the transgene integration rate in the zebrafish germinal cells genome. This strategy allowed us to obtain a transgenic zebrafish line that can be crossed to many transgenic lines where GFP is under the control of different tissue-specific promoters.

In order to determine what is the minimum *ptf1a* promoter region necessary to drive GFP expression in the zebrafish exocrine pancreas, 2,6 kbp of that region were also cloned. In this case I observed a ubiquitous GFP expression. With the aim to better clarify the genetics of pancreatic development in zebrafish I undertook a large-scale genetic screen, which took place at the Max Planck Institute in Tuebingen (Germany), using

zebrafish larvae obtained from lines mutagenized with the chemical ENU. During that period I screened for the presence of defects in the *insulin* expression, detected by *in situ* hybridization; more than 1200 families were analyzed. One of the mutants identified, in which insulin was absent, was characterized and mapped, in collaboration with Prof. Dirk Meyer. Candidate gene analysis detected a new mutation in the *raldh2 (ald1a2)* gene, causing a phenotype similar to the zebrafish mutant *neckless*. During that period, the astrocytes marker *gfap* was also used, to detect astroglial cell defects in the screened embryos. For two out of nine mutant families with defects in *gfap* expression I determined, in collaboration with Prof. Robert Geisler, the linkage group bearing the mutation responsible of the observed phenotype.

INDICE

INDICE	1
1. INTRODUZIONE	5
1.1 L'organismo modello zebrafish	5
1.2 La via di segnale TGF- β	6
1.3 La via di segnale Wnt	7
1.4 La via di segnale Delta/Notch	8
1.5 Il pancreas	10
1.6 Sviluppo del pancreas in zebrafish	11
1.6.1 Formazione dell'endoderma	11
1.6.2 Regionalizzazione antero-posteriore dell'endoderma	12
1.6.3 Morfogenesi del pancreas	14
1.6.4 Sonic hedgehog nella formazione del pancreas	17
1.6.5 Formazione del pancreas esocrino	17
1.7 Pff1a e la specificazione del destino del pancreas	18
1.8 Analisi di promotori utilizzando proteine fluorescenti	20
1.9 La Mutagenesi in zebrafish	21
1.9.1 Analisi genetiche su larga scala	21
1.9.2 Mutagenesi chimica	21
2. MATERIALI E METODI	25
2.1 Abbreviazioni	25
2.2 Soluzioni utilizzate	26
2.3 Mantenimento e manipolazione dello zebrafish	29
2.4 Linee di zebrafish utilizzate	30
2.5. Microiniezione	31
2.5.1 Raccolta ed iniezione delle uova	31
2.5.2 Preparazione delle soluzioni da microiniettare	32
2.6 Metodi istologici	33
2.6.1 Fissazione degli embrioni	33
2.6.2 Ibridazione <i>in situ</i>	34
2.6.2-1 ibridazione singola	34
2.7 Microscopia e acquisizione di immagini	36
2.8 Trattamenti con sostanze teratogene	37
2.9 Metodi di biologia molecolare	38
2.9.1 Vettori di clonaggio	38
2.9.2 Cloni BAC	39
2.9.3 Quantificazione di DNA ed RNA	39
2.9.4 Estrazione di DNA plasmidico	39
2.9.4.1 Estrazione di piccole quantità di DNA plasmidico	39
2.9.4.2 Estrazione di grandi quantità di DNA plasmidico o di cloni BAC	40
2.9.4.3 Eluizione di frammenti di DNA	40
2.9.5 Modificazioni degli acidi nucleici	40
2.9.5.1 Digestione di DNA plasmidico	40
2.9.5.2 Riempimento delle estremità sporgenti del DNA	40
2.9.5.3 Defosforilazione di frammenti di DNA	41
2.9.5.4 Ligasi dei frammenti di DNA	41

2.9.6 Trasformazione batterica	41
2.9.6.1 Trasformazione chimica di <i>E.coli</i>	41
2.9.7 Sequenziamento	42
2.9.8 Analisi delle sequenze di DNA	42
2.9.9 Sintesi di RNA messaggero	43
2.9.10 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	44
2.9.11 Sintesi della sonda antisense	44
2.9.12 Mutagenesi sito-specifica	46
2.10 Clonaggio del promotore di <i>ptf1a</i> di zebrafish	47
2.11 Creazione di costrutti transgenici con il sistema Tol2	49
2.11.1 clonaggio di 5,5 kpb di promotore di <i>ptf1a</i>	49
2.11.2 clonaggio di 2,6 kpb di promotore di <i>ptf1a</i>	50
3. RISULTATI	51
3.1 Creazione della linea transgenica <i>ptf1a(5,5):GFP</i>	51
3.1.1 Descrizione della linea transgenica <i>ptf1a(5,5):GFP</i>	54
3.1.2 Creazione della linea transgenica <i>ptf1a(5,5): DsRed</i> Con il sistema Tol2	58
3.1.3 Trattamenti con sostanze teratogene	60
3.2 Creazione della linea transgenica <i>ptf1a(2,6):GFP</i>	64
3.3 Identificazione e caratterizzazione del nuovo mutante di zebrafish OG062	65
3.3.1 Espressione dei marcatori pancreatici in OG062	66
3.3.2 Espressione di marcatori dei precursori pancreatici e dell' endoderma in OG062	67
3.3.3 Difetti morfologici di OG062	70
3.3.4 Mappatura di OG062	70
3.4 Identificazione di mutanti di zebrafish aventi difetti gliali	71
3.4.1 Determinazione del cromosoma su cui mappa la mutazione OJ022	73
3.4.2 Determinazione del cromosoma su cui mappa la mutazione NZ084	74
4. DISCUSSIONE	77
5. BIBLIOGRAFIA	83

1. INTRODUZIONE

1.1 L'organismo modello zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) si è affermato come organismo modello negli studi genetici e di biologia dello sviluppo dei vertebrati. Infatti, le sue piccole dimensioni (può raggiungere un massimo di 5-6 cm di lunghezza) ne consentono l'allevamento in spazi limitati. La facilità di accoppiamento e il grande numero di uova che una femmina può deporre (circa 100-200 per evento riproduttivo) permettono analisi genetiche su larga scala. Infine, a differenza di quanto accade ad esempio per i topi, la fecondazione è esterna e ciò consente l'analisi della progenie senza il sacrificio della madre e la conseguente morte della progenie. Queste caratteristiche permettono di osservare un unico embrione ai vari stadi di sviluppo e di poter riaccoppiare gli stessi individui. Un notevole vantaggio è rappresentato dall'assenza di un guscio calcareo che avvolga le uova e dalla loro trasparenza, dovuta al rivestimento esterno costituito dal corion. Queste caratteristiche le rendono adatte ad esperimenti di microiniezione finalizzati alla produzione di pesci transgenici, alla sovraespressione di mRNA o all'inibizione di geni con l'uso di morpholino (oligonucleotidi antisense modificati). L'embrione mantiene la trasparenza nel corso dello sviluppo e si accresce piuttosto velocemente. Pertanto, è possibile seguire lo sviluppo embrionale al microscopio ottico ed applicare tecniche di ibridazione *in situ*. L'introduzione dei morpholino, inoltre, ha compensato l'assenza di una tecnologia che permettesse, come il *knock-out* in topo, di effettuare studi di genetica funzionale.

Uno dei problemi fondamentali dell'embriologia è la comprensione dell'organogenesi di un individuo. A tale proposito sono stati condotti numerosi studi volti a comprendere quali siano i meccanismi induttivi e di controllo che portano alla formazione delle diverse linee cellulari che costituiscono un organo.

La maggior parte di questi studi sono stati effettuati utilizzando il topo come modello sperimentale, ed hanno portato alla scoperta di numerose molecole coinvolte nelle varie tappe dell'organogenesi. Dettagliate analisi di espressione ed inattivazione genica di fattori di trascrizione o componenti delle differenti vie di segnale hanno reso possibile la comprensione delle cascate molecolari coinvolte nel processo di formazione di un organismo complesso.

Un organo che è divenuto, negli ultimi decenni, oggetto di numerose indagini è il pancreas. Si tratta di un organo che presenta notevole interesse dal punto di vista medico, poiché è soggetto a gravi patologie di larga diffusione tra la popolazione umana; basti considerare che il solo diabete costituisce uno dei maggiori problemi di salute che affliggono il mondo occidentale. Lo zebrafish, negli ultimi anni, è stato ampiamente impiegato come modello per studiare i geni implicati nella specificazione e nel differenziamento dell'endoderma e degli organi da esso derivanti. Questo perché pur presentando notevole distanza evolutiva dall'uomo rispetto ad altri organismi modello, quali il topo, i geni e i meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo embrionale sono altamente conservati tra questo piccolo ciprinide e i vertebrati superiori.

1.2 La via di segnale TGF- β

La superfamiglia dei *Transforming Growth Factors* β (TGF- β) è composta dalle famiglie dei TGF- β , delle activine e inibine, dei GDF (*Growth/Differentiation Factors*), dei BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), dei Nodal, e altre proteine. Essa conta più di 40 membri, che regolano alcuni dei processi più importanti durante lo sviluppo di un organismo. Questi sono solitamente sintetizzati come pre-pro-proteine che subiscono processamento proteolitico, in seguito al quale viene liberata la porzione C-terminale matura. I peptidi maturi si legano a formare omodimeri o eterodimeri che ne rappresentano le forme biologicamente attive e vengono secrete dalle cellule. I recettori dei TGF- β possono essere di tipo I e di tipo II, presentano entrambi i tipi attività serina/treonina-chinasica e

sono coinvolti nella trasduzione del segnale che porta all'attivazione di fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia Smad ((Heldin et al., 1997). Il legame del ligando TGF- β al recettore di tipo II promuove il legame di quest'ultimo ad un recettore di tipo I. A questo punto il recettore di tipo II fosforila uno specifico residuo di serina o treonina del recettore di tipo I, attivandolo. Il recettore di tipo I così fosforilato è in grado di fosforilare substrati intracellulari specifici quali sono le proteine R-Smad (Smad2/3). Oltre alle proteine R-Smad, che sono quelle direttamente fosforilate dal recettore di tipo I, la famiglia Smad comprende altre due sottoclassi: le CO-Smad che si legano alle R-Smad attivate formando eterodimeri che traslocano nel nucleo dove regolano l'espressione di geni specifici, e le I-Smad (Smad inibitorie), che possono associarsi al recettore di tipo I ostacolando la fosforilazione delle R-Smad, oppure promuovere l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione dello stesso recettore reclutando altre proteine.

1.3 La via di segnale Wnt

L'attivazione della via di segnale Wnt richiede l'interazione tra una proteina secreta di tipo Wnt e una proteina recettoriale a sette passi transmembrana di tipo Frizzled (Fz). Combinazioni ligando-recettore di differenti Wnt e Fz possono trasdurre almeno tre differenti tipi di via di segnale intracellulare. La via di segnale Wnt "canonica" (Wnt/ β -catenina) porta ad un cambiamento nei livelli intracellulari di β -catenina che sembra essere coinvolto nella specificazione dei destini cellulari e nella proliferazione. L'attivazione della via di segnale Wnt può anche portare a variazioni della concentrazione intracellulare di calcio (via di segnale Wnt/ Ca^{2+}) o alla riorganizzazione dell'actina citoscheletrica (via di segnale Wnt/polarità tissutale) (Miller., 2002) (**Figura 1**). Il ruolo di queste vie di segnale Wnt "non canoniche" nell'organogenesi sono ancora sconosciuti. Studi effettuati in topo hanno dimostrato che al giorno 11 di sviluppo embrionale *Wnt5a* e *Fz-2*, componenti della via di segnale "non canonica", sono espressi nel mesenchima e nell'epitelio pancreatico, e al

giorno 17,5 sono coespressi con i marcatori insulina e glucagone (Heller et al., 2002)

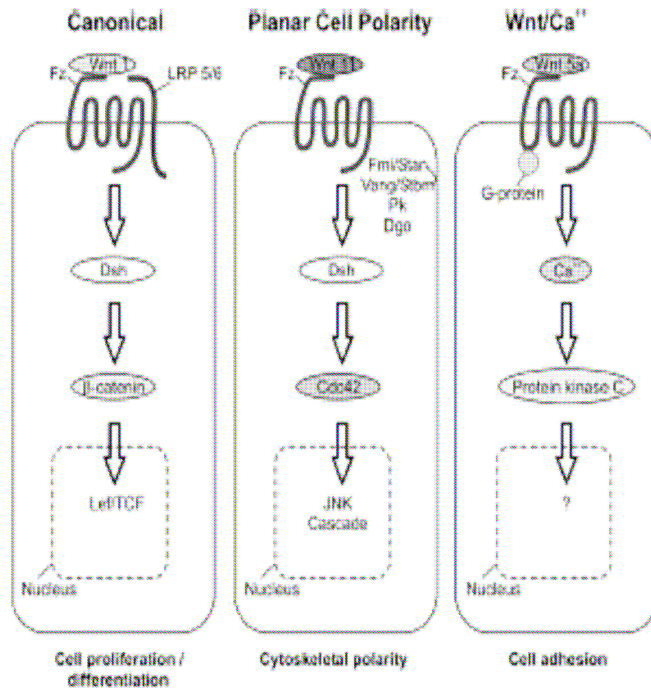


Figura 1: schema raffigurante le vie di segnale Wnt finora conosciute.

E' stato recentemente dimostrato, mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense morpholino effettuati in zebrafish e analisi istologiche in topi *knock-out Wnt5a^{-/-}*, che la via di segnale Wnt "non canonica" è importante per la migrazione delle cellule che esprimono insulina (Kim et al., 2005).

1.4 La via di segnale Delta/Notch

La proteina Notch è un recettore transmembrana che svolge un importante ruolo nella comunicazione poiché è una delle componenti chiave di una cascata di segnali conosciuta come la via di segnale Delta/Notch, esistente in tutte le specie animali finora studiate.

I principali componenti della via di segnale Notch, sono i seguenti: il recettore (tipo Notch) il ligando (tipo Delta/Jagged) e un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia CSL che agisce a valle di Notch (**Figura 2**).

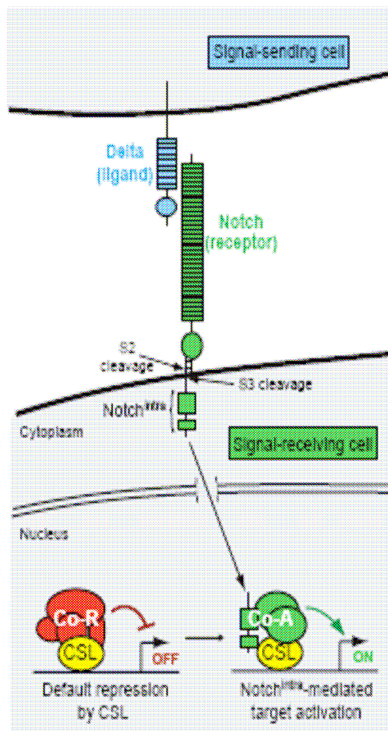


Figura 2. Rappresentazione schematica della via di segnale Delta/Notch. Si possono vedere i componenti principali rappresentati dal ligando (tipo Delta), il recettore (tipo Notch) e il fattore di trascrizione CSL. I rettangolini verdi rappresentano le ripetizioni EGF. L'attivazione di Notch da parte del ligando porta a due tagli proteolitici a livello dello stesso recettore. Il taglio S3 porta al rilascio della porzione intracellulare di Notch (Notch^{intra}) che trasloca nel nucleo dove lega il fattore di trascrizione CSL e va ad attivare l'espressione dei geni bersaglio di Notch (da Lai et al., 2004).

Il ligando Delta, prodotto dalla cellula che manda il segnale, interagisce con il recettore Notch della cellula vicina. Entrambi questi fattori sono proteine transmembrana e presentano nella loro porzione extracellulare specifiche ripetizioni EGF (*epidermal growth factor*), che mediano il contatto tra ligando e recettore (Rebay et al., 1991). L'attivazione del recettore induce due tagli proteolitici di Notch, S2 e S3. Il taglio S2 viene effettuato da metalloproteasi TACE che rimuovono la porzione extracellulare del recettore (Brou et al., 2000), rendendolo suscettibile all'azione di un complesso proteolitico (γ -secretasi) che effettua un altro taglio (S3) a livello del dominio transmembrana (De Strooper et al., 1999). Il taglio S3 libera la porzione intracellulare di Notch (Notch^{intra} o NotchIC), la quale trasloca nel nucleo, sostituisce il co-repressore legato al fattore CSL e, fungendo da co-attivatore, consente la trascrizione di geni specifici. La via di segnale Delta/Notch è importante per molti processi embrionali. Il suo ruolo più generale è quello di limitare l'adozione di un determinato destino, promuovendo il fenomeno noto come inibizione laterale. In altri casi, l'attivazione del segnale Notch promuove lo sviluppo di un certo tipo cellulare o di una regione del corpo, inducendo l'espressione di molecole

che promuovono attivamente determinati processi. Spesso il segnale Notch specifica un nuovo tipo cellulare mediando le interazioni al confine tra popolazioni diverse di cellule. Questa funzione di Notch viene spesso definita "induttiva", in contrasto con la sua attività più classica, "inibente". Che la via di segnale Notch giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale è dimostrato anche dal fatto che mutazioni che comportano inattivazione o iper-attivazione di questa via di segnale si traducano in gravi malattie nell'uomo. Un esempio è rappresentato dalla sindrome di Alagille, in cui una mutazione a carico del ligando Jagged1 interferisce nello sviluppo di diversi organi, quali il fegato, lo scheletro, il cuore, gli occhi ed anche il pancreas.

1.5 Il pancreas

Il pancreas maturo dei vertebrati è costituito dall'insieme di tre differenti tessuti: Le cellule degli acini addette alla produzione di enzimi digestivi, le cellule dei dotti che convogliano gli enzimi nel lume intestinale e le isole, sparse principalmente nella regione centrale dell'organo, che controllano l'omeostasi di glucosio. Ciascuna isola è comprensiva di numerosi tipi cellulari distinti: le cellule β che costituiscono la porzione più consistente (50-80% del totale, a seconda delle specie) e tendono a raggrupparsi al centro dell'isola. Le cellule α che producono glucagone e sono il secondo tipo cellulare più comune. I rimanenti tipi cellulari, che costituiscono una minoranza rispetto al numero totale di cellule, includono le cellule δ che producono somatostatina, le cellule PP che producono polipeptide pancreatico e le cellule ϵ , descritte recentemente, che producono grelina (Prado et al., 2004; Wierup et al., 2002).

In larve di *Danio rerio* al sesto giorno di sviluppo, il pancreas ha raggiunto un notevole sviluppo antero-posteriore, esso è localizzato sul lato destro del corpo, ed ha una forma allungata che si estende dal secondo al settimo somite. La sua caratteristica organizzazione morfologica è suddivisibile in tre regioni: testa, collo e coda in cui la larga porzione

anteriore (la testa) contiene il tessuto endocrino, organizzato in un unico corpo di Brockman, circondato da tessuto esocrino, mentre il collo e la coda, più sottili, sono costituiti principalmente da tessuto esocrino.

1.6 Sviluppo del pancreas in zebrafish

1.6.1 Formazione dell'endoderma

Studi effettuati in tutti i principali organismi modello per lo studio dei vertebrati hanno rivelato che sia il pancreas esocrino che quello endocrino hanno derivazione endodermica. In zebrafish, studi riguardanti i destini cellulari hanno dimostrato che l'endoderma deriva dalla metà dorsale del margine del blastoderma (Warga and Nusslein-Volhard, 1999; Warga and Stainier, 2002). L'endoderma viene indotto da molecole TGF- β che diffondono dallo strato di cellule sinciziali del tuorlo sottostanti e dal margine vegetale del blastoderma stesso (Stainier, 2002). La via di segnale Nodal induce endoderma e mesoderma in modo concentrazione-dipendente (Chen and Schier, 2001; Dougan et al., 2003). Ci sono poi evidenze sperimentali secondo cui la via di segnale Notch gioca un ruolo nella segregazione dell'endoderma dal mesoderma (Kikuchi et al., 2004). La via di segnale TGF- β dà il via ad una cascata di molti fattori di trascrizione e porta all'induzione del fattore di trascrizione *sox17*. La comprensione dei segnali che inducono lo sviluppo dell'endoderma in zebrafish si è avuta attraverso lo studio di linee mutanti. Molti mutanti di effettori della via di segnale Nodal *ndr1* e *2* (*cyclops* e *squint*), se omozigoti per entrambe le mutazioni mostrano completa assenza dell'endoderma (Dougan et al., 2003).

All'interno delle cellule i segnali Nodal sono mediati dalle proteine Smad2. In breve, dopo la fosforilazione da parte del recettore di Nodal Smad2 lega Smad4 e l'eterodimero trasloca nel nucleo (Dick et al., 2000) dove va ad attivare la trascrizione di geni bersaglio in associazione ad altri cofattori, di cui solo 2 sono noti: FoxH1/Fast1 e mixer (Pogoda et al., 2000; Sirotkin et al., 2000). Studi genetici hanno dimostrato che ci devono essere

fattori addizionali implicati all'inizio della cascata di trasduzione che porta alla formazione dell'endoderma (Kunwar et al., 2003). La via di segnale Nodal induce l'espressione di fattori di trascrizione che sembrano agire in parallelo durante la specificazione dell'endoderma. Questi fattori includono la proteina Mixer (codificata da *bonnie* e *clyde*, *bon*; Alexander and Stainier, 1999), Gata5 (*faust*, *fau*; Reiter et al 2001) e la proteina Mezzo (Poulain and Lepage 2002). Nella cascata di traduzione l'attivazione di questi tre geni è richiesta per l'espressione della proteina Sox32 (*casanova*, *cas*; Alexander and Stainier, 1999). Sox32 induce a sua volta l'espressione di *sox17*. Per l'induzione di *sox17* è necessario anche *Spg/ Pou5f1*. Gli effetti di *sox17* sullo sviluppo degli organi di derivazione endodermica rimane ancora sconosciuto. Similmente a quanto avviene per gli altri vertebrati, i geni della famiglia *foxa* sono espressi anche nell'endoderma di zebrafish durante la gastrulazione e l'organogenesi (*foxa/fkd4*, *foxa1/fkd7*, *foxa2/fkh1/axial/HNF3b*, e *foxa3/fkh2*; Odenthal and Nusslein-Volhard, 1998). E' stato dimostrato che anche *hhex* è coinvolto nel differenziamento di alcuni organi di derivazione endodermica, quali fegato, tiroide e pancreas (Rohr and Concha, 2000; Wallace et al., 2001; Wallace and Pack, 2003; Bort et al., 2004).

1.6.2 Regionalizzazione antero-posteriore dell'endoderma

L'endoderma dei vertebrati ha origine all'epitelio dell'apparato digerente e ad organi quali tiroide, timo, fegato e pancreas. Durante lo sviluppo dei vertebrati, questo foglietto embrionale, subisce una regionalizzazione in modo che gli organi da esso derivati trovino la giusta collocazione lungo l'asse antero-posteriore. La morfologia definitiva dell'intestino e degli organi ad esso associati è il prodotto di una divergenza di destini cellulari dei sottoinsiemi di progenitori dell'endoderma in risposta a segnali induttivi locali provenienti dall'adiacente mesoderma (Horb and Slack, 2001; Kumar et al., 2003; Wells and Melton., 2000). L'applicazione della proteina FGF4 (*fibroblast growth factor 4*) nell' endoderma anteriore del pollo induce l'espressione

di marcatori propri dell'endoderma posteriore (Wells and Melton, 2000). Kumar e colleghi (Kumar et al., 2003) si sono avvalsi di colture di espianti di pollo per dimostrare che i marcatori pancreatici sono indotti nell'endoderma anteriore dal mesoderma della piastra laterale della regione pancreatica. Gli stessi autori hanno anche dimostrato che sia l'activina che i BMP (*bone morphogenetic proteins*), che l'acido retinoico (AR) inducono l'espressione di marcatori pancreatici nell'endoderma anteriore, quando sono posti in coltura con il mesoderma anteriore (Kumar et al., 2003). Tiso e colleghi (2002), utilizzando zebrafish, hanno dimostrato che BMP regola negativamente *her5* influenzando dimensione e posizione degli organi di derivazione endotermica. L'AR è stato dimostrato essere necessario per lo sviluppo del pancreas. E' stato dimostrato che zebrafish e topi con difetti della sintesi di AR o alla funzionalità del suo recettore (RAR) sono privi dei tipi cellulari pancreatici (Martin et al., 2005; Molotkov et al., 2005; Stafford and Prince., 2002). Inoltre, il trattamento di embrioni di zebrafish con AR esogeno induce la produzione di cellule pancreatiche ectopiche nell'endoderma anteriore. La stessa cosa è emersa anche da studi su anfibi e uccelli, ad indicare che la necessità di AR nella specificazione del pancreas è probabilmente una caratteristica dello sviluppo di tutti i vertebrati (chen et al., 2004; Stafford et al., 2004). Studi di aumento- e perdita di funzione suggeriscono che L'AR gioca un ruolo nella specificazione della posizione del pancreas lungo l'asse antero-posteriore (AP) dell'intestino.

Il meccanismo di trasduzione del segnale dell'AR è ben conosciuto (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Il passaggio limitante nella biosintesi dell'AR è la conversione della retinaldeide in acido retinoico, catalizzata dall'enzima retinaldeide deidrogenasi (RALDH). Il segnale dell'AR viene tradotto da due tipi di recettori nucleari: i recettori dell'acido retinoico (RARs) e i recettori dei retinoidi (RXRs). RARs e RXRs si legano agli elementi di risposta all'acido retinoico (RAREs) e attivano o reprimono la trascrizione in base alla presenza o meno del ligando. L'espressione degli enzimi RALDH (RALDH1-3) definisce i tessuti che producono AR; lessenziale per l'embriogenesi dei vertebrati. La sintesi dell'acido retinoico dipende dalla funzione dell'enzima RALDH2 (Begemann et al., 2001; Grandel et al.,

2002; Niederreither et al., 1999). In tutti i vertebrati che sono stati esaminati, *Raldh2* è espresso nel mesoderma durante la gastrulazione, e durante la segmentazione si va a localizzare nel di mesoderma della piastra laterale e parassiale (Begemann et al., 2001; Berggren et al., 1999; Zhao et al., 1996). Similmente, l'espressione di RARs e RXRs definisce i tessuti in grado di rispondere all'AR; questi recettori esibiscono profili di espressione estesi e dinamici durante lo sviluppo (Begemann et al., 2001; Joore et al., 1994; Mollard et al., 2000; Sharpe, 1992). Studi di perdita di funzione hanno rivelato che l'AR è importante per lo sviluppo dei derivati di tutti i foglietti embrionali (esaminato da Ross et al., 2000). Negli embrioni *neckless (nls)*, mutanti per il principale enzima coinvolto nella sintesi dell'acido retinoico, RALDH2, non sono espressi né i marcatori dei precursori pancreatici, né quelli del fegato (Stafford and Prince, 2002). Recentemente Stafford e colleghi hanno dimostrato che per lo sviluppo delle cellule β dell'isola pancreatica di zebrafish è necessario l'AR prodotto nel mesoderma parassiale e che i precursori pancreatici ricevono il segnale dell'acido retinoico direttamente (Stafford et al., 2006).

1.6.3 Morfogenesi del pancreas

I primi progenitori pancreatici in zebrafish sono cellule che esprimono il fattore di trascrizione *pdx-1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*; Ohlsson et al., 1993; Milewski et al., 1998) e *hlxb9*, un gene che codifica per una proteina appartenente alla famiglia Mnx di fattori di trascrizione (Wendik et al., 2004). Questi appaiono simultaneamente allo stadio di 8 somiti, bilateralmente alla notocorda.

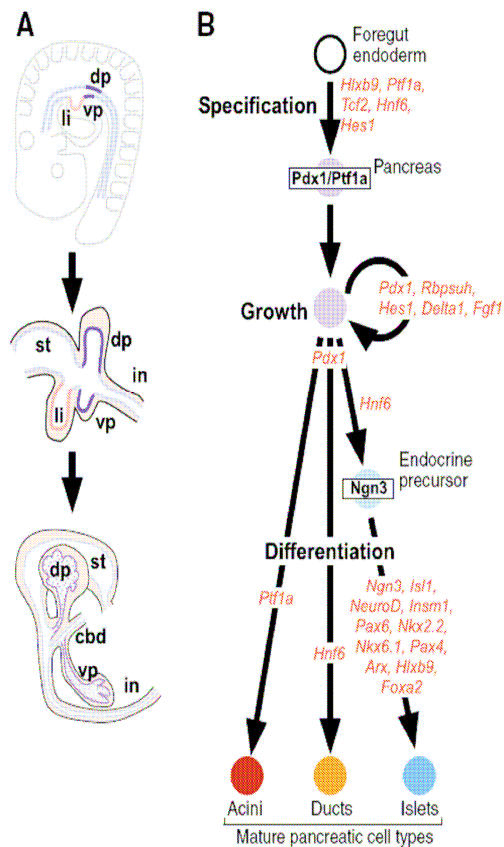


Figura 3: (A) Sviluppo embrionale del pancreas di topo. Gli abbozzi del pancreas dorsale e ventrale (dp e vp rispettivamente) compaiono allo stadio E8.5 da due strisce di endoderma intestinale (primo disegno dall'alto), collocate vicino al fegato in formazione (li). Allo stadio E10.5 (nel mezzo), gli abbozzi pancreatici emergono dal mesenchima circostante ed occupano la posizione tra lo stomaco (st) e l'intestino (in). La successiva rotazione dell'intestino, a partire dallo stadio E12.5 porta i due abbozzi ad essere in opposizione, anche se ciascuno dei due mantiene la sua originale connessione all'intestino e al dotto comune biliare (cbd). **(B)** schema riassuntivo indicante che tutti i tipi cellulari del pancreas maturo derivano da progenitori che esprimono *Pdx1* e/o *Ptf1a* e che un sottogruppo di questi progenitori iniziano ad esprimere *Ngn3* e differenziano in cellule delle isole. I geni elencati in rosso sono necessari in diversi aspetti dei passaggi indicati. (Murtaugh, 2007).

All'interno del dominio di espressione di *pdx1/hlx9* allo stadio di 12 somiti è rilevabile la presenza del primo marcatore endocrino, rappresentato dall'ormone insulina (Biemar et al., 2001) seguito da somatostatina (16 somiti) e glucagone (24 somiti). Allo stadio di 18 somiti le cellule endocrine iniziano ad organizzarsi in un abbozzo che emerge dall'endoderma circostante fino a staccarsi da esso. Un secondo abbozzo pancreatico si forma 32 ore dopo la fecondazione in posizione antero-ventrale rispetto al primo. Questa seconda struttura mantiene il contatto con l'endoderma e da origine alla porzione esocrina, al sistema di dotti pancreatici e ad alcune cellule endocrine. A 52 ore di sviluppo, in seguito ad una rotazione dell'intestino, i due abbozzi si fondono per dare origine ad un organo funzionale (**Figura 4**). Le caratteristiche istologiche del pancreas di zebrafish sono molto simili a quelle degli amnioti. Tuttavia, nei vertebrati superiori, diversamente da quanto accade in *Danio rerio* pancreas esocrino ed endocrino hanno origine da entrambi gli abbozzi e il primo ormone rilevato è il glucagone.

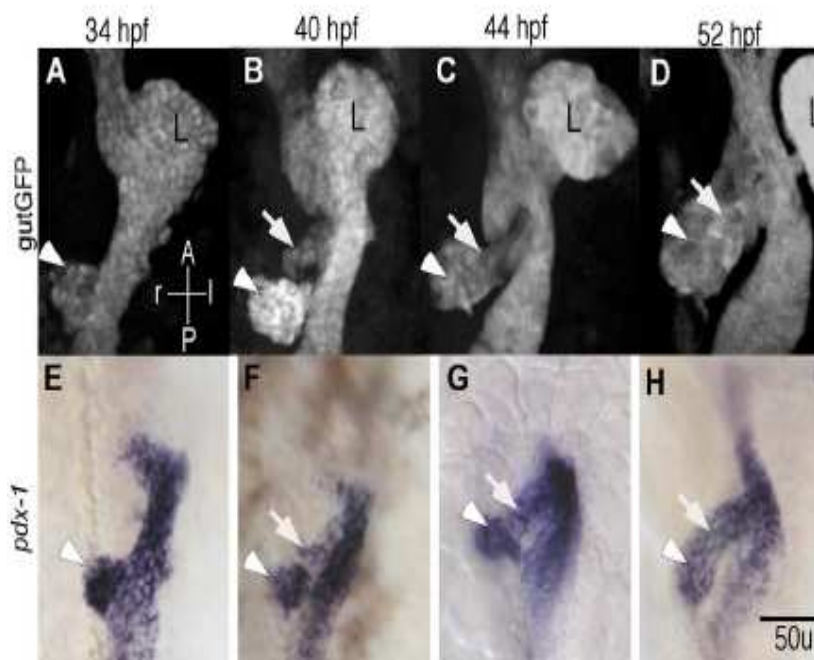


Figura 4: immagini che raffigurano la formazione degli abbozzi pancreatici di zebrafish e la loro fusione a formare un unico organo a 52 ore di sviluppo, in embrioni transgenici gut:GFP (A-D) e mediante ibridazione in situ con il marcatore *pdx1* (E-H). (Da Field et al., 2003)

È stato recentemente dimostrato che la via di segnale delta/jagged-notch è il principale meccanismo responsabile della scelta dei destini cellulari pancreatici (Zecchin et al., 2007). Studi con l'utilizzo del mutante *mind bomb*, in cui la via di segnale Delta-Notch è interrotta (il gene *mib* codifica per una ubiquitina ligasi che interagisce con il dominio intracellulare di Delta/Jagged e ne promuove l'ubiquitinazione e la conseguente internalizzazione,) hanno evidenziato un mancato equilibrio nel differenziamento delle cellule pancreatiche con una diminuzione dell'espressione di *glucagone* e un incremento dell'espressione di *insulina* (Itoh et al., 2003). Il meccanismo molecolare che porta alla specificazione dei diversi tipi cellulari coinvolge l'attivazione di una serie di fattori di trascrizione specifici per i diversi tipi cellulari (figura). Recentemente si è visto che, in embrioni di zebrafish, *fgf24* e *fgf10* hanno una funzione ridondante nel determinare la regionalizzazione del mesoderma della piastra laterale (LPM) e nella specificazione dell'abbozzo pancreatico ventrale. (Manfroid et al., 2007)

1.6.4 Sonic hedgehog nella formazione del pancreas

Oltre all'espressione di geni nell'endoderma, anche fattori provenienti dalla notocorda sembrano svolgere un ruolo nel processo di specificazione del pancreas. Sonic hedgehog (Shh) sembra essere un segnale importante durante la formazione del pancreas endocrino in diversi modelli vertebrati. Nei mammiferi, Shh risulta essere un regolatore negativo dello sviluppo pancreatico (Hebrok et al., 1998; Kim e Melton, 1998). In zebrafish, invece, benchè l'espressione di *shh* non sia rilevabile nell'endoderma durante la formazione del primordio pancreatico (allo stadio di 12 somiti; Roy et al., 2001), la mancanza del segnale Shh nei mutanti *smoothened (smu)* (in cui non avviene la trasduzione del segnale) comporta una drastica riduzione del pancreas endocrino, mentre la sovraespressione di *shh* induce un'espansione dello stesso (Dilorio et al., 2002; Roy et al., 2001). Ulteriori analisi hanno dimostrato che il segnale Shh è richiesto prima dello stadio di 6 somiti per il successivo differenziamento dell'endoderma in tessuto endocrino (Dilorio et al., 2002). Questi risultati hanno condotto alla formulazione di un modello in cui *shh* esercita la sua funzione durante la gastrulazione sulle cellule endodermiche che stanno effettuando l'involuzione (Dilorio et al., 2002).

1.6.5 Formazione del pancreas esocrino

L'analisi al microscopio confocale di embrioni transgenici che esprimono la *GFP (green fluorescence protein)* nelle cellule dell'endoderma ha recentemente fatto luce sulla morfogenesi degli organi endodermici (Field et al., 2003). In questo studio, il primo segno morfologico del pancreas in formazione è, a 24 hpf, un ispessimento sul lato dorsale dell'endoderma ancora monostratificato. Le cellule di questo primordio (l'abbozzo postero-dorsale) esprimono già i geni endocrini specifici. A 34 hpf, l'isola endocrina si presenta separata dall'endoderma e posizionata sul lato destro del tubo digerente. Nello stesso tempo, un altro abbozzo prende forma dal lato ventrale dell'intestino, in posizione anteriore rispetto all'isola. Fino al terzo giorno di sviluppo, questo secondo abbozzo antero-

ventrale si estende prima in direzione dell'isola endocrina, e poi intorno ad essa, ma senza mai separarsi dall'epitelio intestinale. L'ulteriore estensione in direzione dorsale porta poi alla definizione della caratteristica struttura testa-collo-coda del tessuto esocrino, suggerendo che l'abbozzo anteriore corrisponda ai precursori del pancreas esocrino (Field et al., 2003). Questa conclusione è stata recentemente supportata dall'analisi del fattore di trascrizione *Ptf1a* (*pancreas transcription factor 1a*, conosciuto anche come p48; Kawaguchi et al., 2002; Obata et al., 2001; Zecchin et al., 2004).

1.7 *Ptf1a* e la specificazione del destino del pancreas

Una delle prime decisioni nel differenziamento delle cellule pancreatiche consiste nella scelta tra destino esocrino ed endocrino. *Ptf1a* rappresenta uno dei geni fondamentali per il differenziamento del tessuto esocrino. Il gene *ptf1a* è stato individuato per la prima volta mediante un'analisi di *footprinting* dei promotori di enzimi digestivi in nuclei cellulari provenienti da colture di cellule pancreatiche esocrine (Cockell et al., 1989). Il gene è stato isolato e ne è stato caratterizzato il relativo prodotto, un fattore di trascrizione di 48 KDa (Krapp et al., 1996). Successivamente numerosi studi di inattivazione genica hanno evidenziato che in embrioni di topo *Ptf1a* -/- non si sviluppano le cellule degli acini (Krapp et al., 1998). Altri studi, condotti in topo, con l'impiego di mutazioni condizionali e marcatori vitali, hanno dimostrato che *ptf1a* svolge un ruolo fondamentale nella conversione di cellule progenitrici intestinali in progenitori pancreatici (Kawaguchi et al., 2002).

Lo zebrafish negli ultimi anni è stato ampiamente impiegato come modello per studiare i geni implicati nella specificazione e nel differenziamento dell'endoderma (Biemar et al., 2001; Kikuchi et al., 2001). Durante lo sviluppo embrionale di zebrafish le prime cellule pancreatiche evidenziabili sono endocrine ed appaiono 15 ore dopo la fecondazione nella parte dorsale dell'intestino in formazione (Argenton et al., 1999).

Utilizzando una linea transgenica di zebrafish che guida l'espressione della GFP nell'endoderma, Field e collaboratori (2003) hanno osservato che 32 ore dopo la fecondazione appare un secondo abbozzo pancreatico, in posizione antero-ventrale che darà origine al tessuto esocrino e a cellule endocrine tardive sparse. Successivamente i due abbozzi convergono a formare il pancreas.

Recentemente è stato isolato, caratterizzato e mappato il gene *ptf1a* di zebrafish e ne è stata dettagliatamente analizzata l'espressione durante gli stadi precoci di sviluppo dell'organismo in questione (Zecchin et al., 2004; Lin et al., 2004; Esni et al., 2004). Da queste ricerche è emerso che l'espressione di *ptf1a* è inizialmente rilevabile a 32 hpf, dopo la formazione dell'isola endocrina e prima della formazione dell'abbozzo antero-ventrale, ed è localizzata anteriormente all'isola, in una regione che fa parte del dominio di espressione anteriore di *pdx-1*. Nelle successive ore di sviluppo, il dominio di espressione di *ptf1a* si espande e migra posteriormente, nella stessa maniera descritta per l'abbozzo antero-ventrale negli embrioni transgenici gut:GFP.

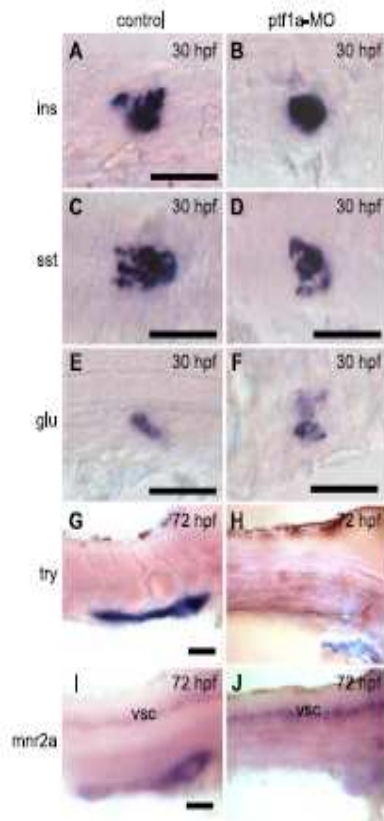


Figura 5: ibridazioni *in situ* con marcatori pancreatici endocrini (*ins*, *sst*, *glu*) ed esocrini (*try*, *mnr2a*) su embrioni di zebrafish di controllo e iniettati con morfolino per il gene *ptf1a*. Il knock down genico di *ptf1a* mantiene inalterata l'espressione dei marcatori pancreatici endocrini (B, D, F); mentre scompare l'espressione dei marcatori esocrini (H e J). Questi dati dimostrano come in zebrafish *ptf1a* sia necessario per lo sviluppo del pancreas esocrino, ma non di quello endocrino. (da Zecchin et al., 2004)

Il "knockdown" di *ptf1a* indotto dal "morpholino" comporta la perdita del tessuto esocrino, come dimostra l'assenza di espressione di *tripsina*, mentre i marcatori endocrini continuano ad essere normalmente espressi (**Figura 5**; Zecchin et al., 2004). Questi risultati dimostrano che il pancreas esocrino origina dall'abbozzo antero-ventrale, e che *ptf1a* è necessario per il suo sviluppo.

1.8 Analisi di promotori utilizzando proteine fluorescenti

L'embrione di zebrafish è trasparente, quindi offre la possibilità di marcare qualsiasi struttura con l'impiego di tecniche *in vivo*. Utilizzando marcatori tradotti dalle cellule, fluorescenti, non tossici, l'emissione dei quali può essere vista irradiando direttamente un embrione vivo sotto ad un microscopio a fluorescenza. Osservare l'andamento della fluorescenza in uno stesso embrione significa poter seguire un processo dinamico legato al marcatore fluorescente, cosa che non è possibile fare con tecniche di immunostochimica che utilizzano marcatori su preparati fissati. Con l'impiego di promotori legati alla proteina GFP (Green Fluorescent Protein: Chalfie et al., 2004) si sono potuti visualizzare singoli neuroni (Park et al., 2000) nonché l'intestino (Field et al., 2003) in pesci transgenici.

La GFP è una proteina di 238 amminoacidi, isolata dall'idra *Aequorea victoria*, in grado di fluorescere senza substrati o cofattori aggiuntivi. Presenta il picco di massima eccitazione quando viene irradiata con luce di $\lambda=489$ nm ed emette una luce verde di $\lambda=509$ nm. Il gene che codifica per questa proteina presenta grande utilità come *reporter* poiché permette di rivelare ed analizzare al microscopio a fluorescenza l'espressione della GFP dovuta al promotore ad essa coniugato.

Sono presenti in commercio anche molte GFP, create mediante mutagenesi sito-diretta per differenti spettri di emissione, tra cui BFP (Blue Fluorescent Protein, Clontech), CFP (Cyan Fluorescent Protein), e la YFP (Yellow Fluorescent Protein). Tutte queste proteine fluorescenti vengono tradotte poche ore dopo la produzione del trascritto perciò possono

monitorare l'attivazione di un determinato promotore in modo dinamico. Esiste una GFP mutata che tetramerizza, la RFP o DsRed (Red Fluorescent Protein, Clontech), con un massimo di eccitazione a $\lambda=558$ nm ed una emissione di luce rossa di $\lambda=583$ nm, in cui la fluorescenza appare ad una distanza di tempo tale da presentare utilità più per marcare cellule differenziate e che per studiare processi dinamici.

1.9 La Mutagenesi in zebrafish

1.9.1 Analisi genetiche su larga scala

La possibilità di effettuare analisi genetiche su larga scala è un'importante caratteristica dell'organismo modello *Danio rerio*. Se confrontato con gli altri organismi modello per lo studio dei vertebrati (topo, pollo, rana), il tempo di generazione dello zebrafish è simile (2-4 mesi), ma la sua progenie molto numerosa facilita le analisi fenotipiche e genetiche, poiché si può raccogliere con relativa facilità un numero di individui sufficienti per effettuare saggi di analisi e per mappare la mutazione.

Per lo zebrafish sono stati messi a punto differenti protocolli di mutagenesi. I mutageni impiegati includono ENU, radiazioni (in particolare raggi γ), così come protocolli di mutagenesi inserzionale con l'impiego di virus o di elementi trasponibili.

1.9.2 Mutagenesi chimica

La mutagenesi effettuata con l'impiego di agenti chimici si è dimostrata uno degli approcci di maggior successo per elucidare la funzione di determinati geni e il controllo genetico di processi biologici, particolarmente quelli riguardanti lo sviluppo embrionale. Una delle sostanze maggiormente utilizzate per l'induzione di mutazioni è l'agente chimico N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) (Grunwald and Streisinger, 1992; Sonica-Krezel et al., 1994). L'ENU è un potente mutageno, che viene

utilizzato per indurre mutazioni in molteplici organismi. Nel topo, per esempio, l'ENU è in grado di indurre il maggior numero di mutazioni nelle cellule germinali rispetto agli altri agenti mutageni esaminati e anche per lo zebrafish l'ENU è divenuto il mutagene d'elezione per tutti gli *screening* genetici su larga scala che hanno avuto luogo finora.

L'ENU è un agente alchilante sintetico che induce mutazioni puntiformi trasferendo il suo gruppo etilico ai radicali ossigeno o azoto delle singole basi che compongono il DNA.

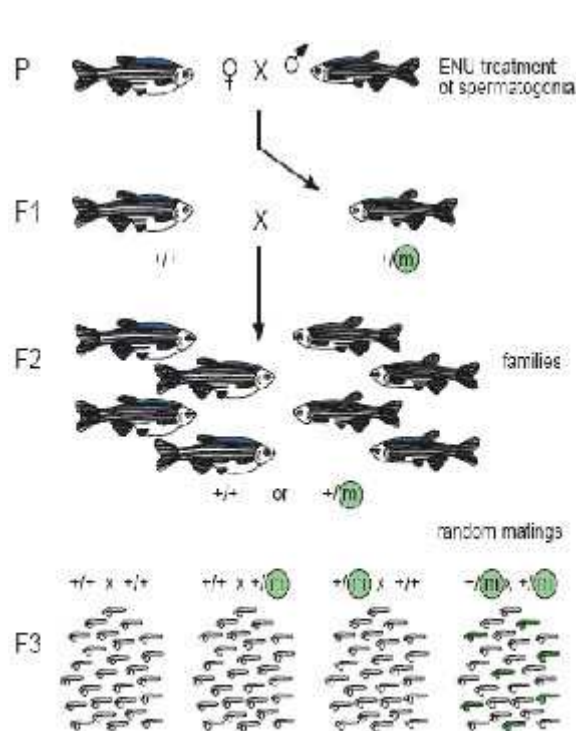


Figura 6 .illustrazione della mutagenesi e schema degli incroci. Pesci maschi vengono mutagenizzati con ENU ed accoppiati con femmine di tipo selvatico. I pesci della generazione F1 sono eterozigoti per la mutazione individuale (indicata con "m" nell'immagine). Ciascun pesce della generazione F1 viene poi accoppiato con un individuo di tipo selvatico. La progenie ottenuta da ciascuno di questi incroci rappresenta una famiglia F2. Le famiglie F2 constano per circa il 50% di individui eterozigoti per una particolare mutazione (+/m); il rimanente 50% è rappresentato da pesci portatori di due alleli di tipo selvatico per quel locus genico (+/+).

Incroci casuali a coppie singole tra gli zebrafish di generazione F2 danno origine alla generazione F3. Questa è la prima generazione in cui una mutazione recessiva appare in omozigosi e perciò si può osservare il fenotipo mutato (la maggioranza delle mutazioni indotte con ENU sono recessive). Per quanto concerne il locus mutato si possono distinguere 4 casi: accoppiamento di due individui F2 omozigoti (+/+ X +/+), una femmina genotipicamente selvatica può essere incrociata con un maschio F2 eterozigote (+/+ X +/m), una femmina F2 eterozigote può essere accoppiata con un maschio genotipicamente selvatico (+/m X +/+), infine possono essere accoppiati due individui F2 eterozigoti (+/m X +/m). Nel caso di mutazioni di tipo recessivo soltanto dall'ultimo esempio di incrocio fatto si ottiene una progenie F3 con fenotipo mutato (con circa il 25% degli individui omozigoti recessivi). (Figura da Haffter, et al., 1996)

Durante questo periodo di dottorato la sottoscritta ed altri due colleghi del laboratorio abbiamo partecipato ad un'analisi genetica su larga scala, che si è svolta presso il Max Planck Institute di Tuebingen (Germania), utilizzando larve di zebrafish dopo mutagenesi con ENU

(etilnitrosourea). Il lavoro è stato effettuato, come parte del consorzio dell'Unione Europea, al fine di identificare nuovi mutanti. In particolare, il nostro scopo era identificare difetti alle cellule gliali e nella formazione dell'isola pancreatica.

Il saggio utilizzato è stata l'ibridazione *in situ* fatta su larve *in toto* di 3 giorni utilizzando la sonda antisenso ad RNA per il gene *gfap* (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, gene marcatore per gli astrociti) per valutare difetti alle cellule gliali. Il sistema nervoso dei vertebrati è infatti costituito da neuroni e cellule gliali. Quest'ultime hanno molteplici funzioni tra cui circondare i neuroni, mantenerli separati uno dall'altro, fornire loro ossigeno e nutrienti e inoltre distruggere e rimuovere i resti di neuroni morti. Oligodendrociti ed astrociti del sistema nervoso centrale di zebrafish hanno molto in comune con quelli dei mammiferi, ma mentre gli oligodendrociti sono stati ampiamente studiati negli ultimi anni, si conosce molto poco su come gli astrociti vengono specificati durante lo sviluppo embrionale. La sonda astrogliale *gfap* è stata pertanto usata in combinazione con la sonda *insulina* (prime 9 settimane di analisi) e *glucagone* (ultimo periodo) al fine di monitorare, in contemporanea, la presenza di difetti a carico dell'astroglia e del pancreas. Le mutazioni identificate e caratterizzate durante il periodo di analisi rientrano nell'oggetto di questa tesi di dottorato.

2.MATERIALI E METODI

2.1 Abbreviazioni

AP: fosfatasi alcalina (alkaline phosphatase).

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-fosfato.

bHLH: basic helix-loop-helix.

BSA: albumina di siero bovino.

DAPT: N-[N- (3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

DEAB: 4-diethylaminobenzaldehyde

DEPC: dietilpirocarbonato.

dpf: giorni dopo la fecondazione.

DIG: digossigenina.

DsRed: proteina rossa fluorescente (*discosoma red*).

DTT: ditioneitrato.

EDTA: acido etilen-diammino-tetracetico.

FLUO: fluoresceina.

GFP: proteina verde fluorescente (green fluorescent protein).

HM: miscela di ibridazione (hybridization mix).

hpf: ore dopo la fecondazione (hours post fertilization).

HTH: elica-giro-elica (Helix-Turn-Helix).

kpb: chilobasi.

LB: terreno Luria-Bertani Medium.

MO: morphante, o morpholino.

NBT:4-nitro-blu-cloro-tetrazolio.

NTP: ribonucleotidi trifosfato.

O/N: tutta la notte (overnight).

pb: paia di basi.

PBS: tampone fosfato salino (phosphate buffered saline).

PBT: tampone fosfato con aggiunta di tween-20 0,1%(phosphate buffered tween).

PFA: paraformaldeide.

SSC: saline standard citrate.

TE: Tris-EDTA.

TAE: Tris-Acido acetico-EDTA.

UV: raggi ultravioletti.

WT: selvatico (Wild Type).

ZFR: Ringer's Solution

2.2 Soluzioni utilizzate

SOLUZIONI PER L'IBRIDAZIONE IN SITU

HIBRIDIZATION MIX (HM):

60% formammide

460 μ l Acido citrico(1M) pH 6 per 100 ml

5X SSC

0,1% Tween 20

50 mg/ml eparina

500 mg/ml tRNA.

HIBRIDIZATION MIX PER LAVAGGI:

HM senza tRNA ed eparina

PFA

4% PFA in 1X PBS

PBS(1X):

150 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄

PBT:

1X PBS

0,1% Tween20

ANTICORPI ANTI DIGOSSIGENINA E ANTI FLUORESCINA:

gli anticorpi forniti dalla Roche vengono diluiti 1:1000 in PBT/Sheep serum/BSA e preadsorbiti in presenza di embrioni spezzettati. Si usano 50

embrioni per ogni ml di anticorpo. Trascorse 2 ore a temperatura ambiente, si diluisce ulteriormente la soluzione a 1:3000 e si aggiunge NaN_3 1X per la conservazione.

NBT/BCIP staining buffer:

100 mM Tris-HCl pH 9,5

50 mM MgCl_2

100 mM NaCl

0,1% Tween

NBT/BCIP staining solution:

50 mg/ml NBT

50 mg/ml BCIP

In staining buffer

FAST RED staining buffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,2

0,1% Tween

FAST RED staining solution:

Sciogliere 1 tavoletta di FAST RED (Roche) ogni 2 ml di staining buffer.

Filtrare la soluzione finale.

SSC (20X):

3 M NaCl

0,3 M Citrato sodico

STRIPPING SOLUTION

100 mM Glicina-HCl pH 2,2

0,1% Tween

SOLUZIONI PER LA MICROINIEZIONE

DANIEAU (1X):

58 mM NaCl

0,7 mM KCl
0,4 mM MgSO₄
0,6 mM Ca(NO₃)₂
5 mM HEPES pH7,6

FISH WATER(50X):
25 g instant ocean
39,5 CaSO₄
5 g NaHCO₃
in 5L di acqua deionizzata.

PTU(1X):
10% PBS
0,003% 1-fenil-2-tiourea

SOLUZIONI PER LA SINTESI DI mRNA E SONDE

TERRENO LB (1L):
10 g triptone
5 g estratto di lievito
10 g NaCl
acqua deionizzata.

ACQUA DEPC:
1 ml di DEPC per 1L di acqua deionizzata.
Lasciar agire O/N e autoclavare.

AMPICILLINA (1000X)
50 mg/ml in etanolo 70%

KANAMICINA (1000X)
25 mg/ml in acqua milli-Q

CLORAMFENICOLO (1000X)
25 mg/ml in etanolo 70%

SOLUZIONI PER MICROSCOPIA CONFOCALE

TRICAINA(etil m-amminobenzoato) 25x
0,4% tricaina
20 mM Tris (pH 9)
portare pH a 7,2

AGAROSIO LOW MELTING
1 % agarosio *low melting* (Sigma Aldrich) in ZFR

ZFR
116 mM NaCl
2.9 mM KCl
1.8 mM CaCl₂
5 mM HEPES, pH 7.2

FISSATIVO PER EMBRIONI FLUORESCENTI:
1% PFA
0,15 mM CaCl₂
4% saccarosio

2.3 Mantenimento e manipolazione di zebrafish

L'allevamento di zebrafish viene effettuato in laboratorio, in acquari da 5 l contenenti ciascuno una popolazione di circa venti individui. Gli acquari sono raccolti in una decina di armadi, ciascuno dei quali ne raggruppa circa una quarantina.

Riserve d'acqua, proveniente da un impianto ad osmosi, sono a disposizione giornalmente per il ricambio in ciascun armadio. I valori

ottimali di durezza e pH per questo ciprinide sono mantenuti stabili sciogliendo in vasche da 150 l le seguenti quantità di sali:

1. 12 g CaSO_4
2. 1,5 g NaHCO_3
3. 7,5 g instant ocean.

L'acqua viene mantenuta ad una temperatura di 28°C, il suo pH deve essere mantenuto attorno alla neutralità, non deve essere presente cloro e i nitrati non devono superare il valore di 30 mg/l.

L'alimentazione di questi ciprinidi è stata divisa in 3 razioni giornaliere: una di cibo secco a scaglie in scatola e due naupli di artemie saline (*Artemia cysts*, INVE).

Queste ultime sono acquistate come cisti e vengono fatte schiudere in laboratorio con un semplice apparato costituito da un cono in pvc da 15l, un areatore e una lampadina. Dopo circa 48 ore si possono raccogliere i naupli che, dopo essere filtrati sono pronti per l'uso.

Le larve di zebrafish crescono per i primi 5 gg in FISH WATER, in piastre Petri da 20 ml, mantenute all'interno di un incubatore a 28°C. A 6gg le larvette vengono trasferite in vaschette da 1l ed iniziano ad essere alimentate con cibo in polvere finissima (Novo Tom, JBL) e colture di parameci. Successivamente sono trasferite negli armadi in acquari da 5l. L'acqua viene fornita goccia a goccia per il primo mese di vita.

Gli zebrafish hanno un fotoperiodo ottimale di 13 ore di luce e 11 ore di buio, ottenuto utilizzando un timer per l'erogazione della luce artificiale. L'alba e il tramonto artificiali sono fissati, per nostra comodità, rispettivamente alle 9 e alle 22. I pesci destinati alla riproduzione sono incrociati la sera, un'ora dopo l'ultimo pasto, secondo le indicazioni dello "Zebrafish Book" (Westerfield, 1995). La mattina, con le prime luci dell'alba, i maschi cominciano il corteggiamento della femmina, inseguendola e nuotandole a fianco per poter fecondare le uova appena emesse. Le uova rilasciate vengono depositate sul fondo della vaschetta attraversando una griglia a rete ricoperta da biglie. Questi accorgimenti sono necessari poiché altrimenti gli adulti si ciberebbero delle loro stesse uova, per compensare le perdite energetiche dovute al corteggiamento

e alla produzione di spermatozoi e uova. In natura questo non accade perché la corrente tende ad allontanare le uova appena fecondate.

2.4 Linee di zebrafish utilizzate

Per la realizzazione di questa tesi sono state utilizzate quattro diverse linee WT di zebrafish. La maggior parte degli esperimenti sono stati condotti con l'impiego delle linee "Giotto" e "Umbria", provenienti da un negozio di animali locale. I due ceppi WIK e TUE, provenienti dall'istituto Max Planck di Tuebingen (Germania) sono stati utilizzati per il mantenimento delle linee mutanti.

Si è ricorso anche all'utilizzo delle linee transgeniche *pax6:GFP* (Fornita dal prof. B. Peers), *ins:DsRed* (fornita dal prof. W. Driever) e *nkx2.2:GFP* (Pauls et al., 2007) presenti nei nostri acquari.

2.5 Microiniezione

2.5.1 Raccolta ed iniezione delle uova

Le uova raccolte dalla vasca dei pesci in accoppiamento sono lavate e analizzate al microscopio per verificarne qualità e stadio di sviluppo. Una volta verificato che le uova siano fecondate e allo stadio di 1-2 cellule, vengono allineate a ridosso del lato lungo di un vetrino portaoggetti inserito nel coperchio di una capsula Petri. A causa della tensione superficiale, le uova fecondate rimangono sufficientemente stabili per poterle iniettare.

La microiniezione è effettuata utilizzando un microiniettore controllato a pedale, un micromanipolatore Leitz e, per monitorare la procedura, uno stereomicroscopio (Wild) con ingrandimento 32X.

Utilizzando un puntale (Eppendorf) molto sottile montato su una pipetta (Gilson), si prelevano 1,5-2 μ l di soluzione da iniettare (che deve essere mantenuta in ghiaccio), e li si trasferisce in un ago da microiniezione. Gli aghi da microiniezione derivano da capillari di vetro da 1 mm di diametro che vengono tirati a caldo in un "puller". Quest'ultimo possiede dei

parametri regolabili a seconda delle esigenze, per realizzare aghi più o meno sottili. L'ago caricato viene infine inserito nell'apposito supporto del micromanipolatore. Con il minimo ingrandimento dello stereomicroscopio si procede alla messa a fuoco dell'ago la cui punta, sigillata dal calore, viene rotta con una pinzetta per consentire alla soluzione contenuta di uscire al momento della microiniezione. Utilizzando le opportune manopole del micromanipolatore l'ago viene avvicinato il più possibile alle uova addossate al vetrino. E' necessario accertarsi che la soluzione da iniettare fuoriesca quando il pedale del microiniettore viene premuto. L'uscita del liquido dall'ago è evidenziata dalla colorazione rossa conferita dal rosso fenolo. L'ago trapassa facilmente il corion e viene quindi inserito nel tuorlo dell'uovo fecondato, in vicinanza dei blastomeri. A questo punto la soluzione viene fatta fuoriuscire premendo il pedale del microiniettore, che esercita una pressione regolabile a seconda delle esigenze. Questa operazione deve venire eseguita in maniera molto rapida, facendo entrare ed uscire l'ago molto velocemente, in modo da provocare un trauma il più possibile limitato all'uovo fecondato. Se la microiniezione è stata effettuata correttamente si osserva una piccola area rossa rotondeggiante che rimane compatta all'interno del vitello. Se quest'area ha una dimensione corrispondente all'incirca ad 1/8 del volume totale dell'uovo, significa che è stata iniettata la giusta quantità di soluzione.

Al termine della procedura il vetrino viene rimosso e in ogni capsula Petri viene versata fish water. Le uova vengono poi incubate a 28°C fino al raggiungimento dello stadio di sviluppo desiderato.

2.5.2 Preparazione delle soluzioni da microiniettare

Quando il DNA è stato microiniettato allo scopo di controllare l'espressione transiente di un gene "reporter", è stato utilizzato l'intero plasmide (costituito da transgene e vettore), così come ottenuto da midi- o minipreparazione.

In questi casi la soluzione microiniettata è la seguente (Meng et al., 1997):

40 ng/μl DNA
5 mM Tris pH 8,0
0,5 mM EDTA pH 8,0
1 mM KCl
0,5% Rosso Fenolo

Al fine di creare pesci transgenici, il costrutto comprendente il promotore di interesse, la sequenza codificante la proteina fluorescente *GFP* e il poliA di SV40 sono stati escissi dal plasmide ed iniettati in forma linearizzata assemblando la seguente reazione:

50 ng/μl costrutto
5 mM Tris pH 8,0
0,5 mM EDTA pH 8,0
1 mM KCl
0.5% rosso fenolo.

Per ottenere linee di pesci transgenici con il sistema *TOL2* la soluzione microiniettata aveva la seguente composizione (Kawakami et al., 2004):

25 ng/μl DNA plasmidico non linearizzato
15-25 ng/μl mRNA TP
5 mM Tris pH 8,0
0,5 mM EDTA pH 8,0
1 mM KCl
0,5% rosso fenolo.

2.6 Metodi istologici

2.6.1 Fissazione degli embrioni

Dalle piastre Petri, in cui vengono raccolti e fatti crescere fino allo stadio di sviluppo desiderato, gli embrioni vengono trasferiti in provette

(Eppendorf) da 2 ml nelle quali si sostituisce la PFA all'acqua. Il tempo della fissazione varia in base alla temperatura alla quale viene condotta: 2 ore a temperatura ambiente oppure O/N a 4°C. Nel corso degli esperimenti è comunque risultato che la struttura dell'embrione viene meglio mantenuta da tempi prolungati di fissazione a 4°C.

Terminata la fissazione, gli embrioni sono trasferiti nuovamente in piastre Petri e lavati ripetutamente con PBS. Utilizzando un microscopio da dissezione e due piccoli aghi, gli embrioni vengono inoltre privati del corion e trasferiti in una provetta. Il PBS è sostituito con una soluzione di metanolo assoluto, mediante lavaggi intermedi a concentrazioni crescenti di metanolo, che provoca la disidratazione dei tessuti. Gli embrioni così trattati possono essere conservati per lunghi periodi a -20°C.

2.6.2 Ibridazione *in situ*

Il saggio dell'ibridazione *in situ* su embrioni *in toto* permette di analizzare l'espressione di un determinato gene, nello spazio e nel tempo, usando sonde antisenso di acido ribonucleico sequenza-specifiche, marcate non radioattivamente. La procedura è effettuata utilizzando tutti gli accorgimenti necessari per evitare la contaminazione da RNAsi.

2.6.2.1 Ibridazione singola

PRIMO GIORNO DI IBRIDAZIONE:

1. Reidratazione. Gli embrioni fissati, privi del corion e conservati in metanolo a -20°C, vengono trasferiti in una provetta pulita da 2 ml e reidratati con soluzioni a concentrazione crescente di PBS e decrescente di metanolo.

2. Digestione con proteinasi K. Vengono aggiunti ad 1 ml di PBT 10 µg di proteinasi K per digerire parzialmente le strutture proteiche e creare così dei fori attraverso i quali possa diffondere la sonda. Il tempo di incubazione dipende dallo stadio degli embrioni usati:

- 1 ora per embrioni a 3gg;
- 30 minuti per embrioni a 48 hpf;

- 20 minuti per embrioni a 30 hpf;
- 15 minuti per embrioni a 24 hpf.

Subito dopo è necessario il fissaggio in PFA al 4% per almeno 20 minuti.

3. Preibridazione. Preibridare gli embrioni con 300-400 µl di soluzione HM per 2-5 ore alla temperatura di 65°C.

4. Ibridazione. Rimuovere la soluzione precedente e ripristinare 200 µl di HM contenente 100-200 ng della sonda desiderata. Incubare a 65°C O/N. La presenza di eparina e di tRNA nella miscela di ibridazione assicura che la sonda non si leghi a bersagli aspecifici.

SECONDO GIORNO DI IBRIDAZIONE:

1. Lavaggi. Utilizzando soluzioni preriscaldate alla temperatura di ibridazione, si deve effettuare una serie di lavaggi in modo da rimuovere tutta la sonda non legata al bersaglio specifico. Si effettuano i seguenti lavaggi:

- 75% di HM (priva di tRNA ed eparina), 25% SSC 2X per 15 minuti
- 50% di HM, 50% SSC 2X per 15 minuti
- 35% di HM; 75% SSC 2X per 15 minuti
- SSC 2X per 15 minuti
- SSC 0,2X per 15 minuti.

2. Preincubazione. Attraverso una serie di passaggi a concentrazione crescente di PBT e decrescente di SSC 0,2X si riporta la soluzione al 100% di PBT. Si sostituisce il PBT con una soluzione di PBT/sheep serum/BSA e si lasciano gli embrioni per almeno 2 ore a temperatura ambiente in questa miscela.

3. Incubazione. In base a come la sonda è marcata, l'anticorpo preadsorbito utilizzato può riconoscere la digossigenina o la fluoresceina. L'anticorpo è coniugato alla fosfatasi alcalina, un enzima con proprietà cromogene se messo a contatto con il substrato appropriato. La reazione anticorpale è condotta in agitazione O/N alla temperatura di 4°C in circa 300-400 µl di soluzione.

TERZO GIORNO DI IBRIDAZIONE:

1. Lavaggi. Gli embrioni vengono sottoposti ad una serie di lavaggi in PBT per rimuovere tutto l'anticorpo che non si è legato in maniera specifica alla sonda (6 lavaggi da 15 minuti a temperatura ambiente).
2. Pre-colorazione. Per preparare gli embrioni all'ambiente adeguato prima di fornire il substrato per la fosfatasi alcalina, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 5 minuti utilizzando lo staining buffer specifico per il substrato utilizzato per la colorazione.
3. Colorazione. Gli embrioni trasferiti in un vetrino da orologio sono stati incubati al buio nella soluzione di colorazione. Il substrato utilizzato è l'NBT-BCIP che, nella reazione con la fosfatasi alcalina, forma un precipitato di colore blu. Per monitorare la reazione colorimetrica è necessario osservare gli embrioni al microscopio da dissezione ogni 10-15 minuti. Se la colorazione è lenta, è possibile farla procedere più velocemente ad una temperatura di 33°C in stufa, ma questa procedura aumenta il rumore di fondo e quindi è da valutarne l'effetto prima di procedere. Gli embrioni possono, inoltre, essere conservati per una notte a 4°C, temperatura alla quale la reazione procede molto lentamente. Una volta raggiunto il livello di colorazione desiderato, gli embrioni vengono lavati in PBT e poi fissati.
4. Fissaggio. Gli embrioni vengono fissati O/N con PFA al 4% a 4°C.

2.7 Microscopia ed acquisizione delle immagini

Per acquisire le immagini dopo ibridazione *in situ* gli embrioni fissati sono stati adagiati su vetrini portaoggetti e immersi in glicerolo 80% / PBS ed è stata utilizzata una fotocamera digitale *Leica DC500*, montata su un microscopio *Leica DMR*, dotato di ottica *Nomarski*. Le immagini sono poi state processate con il programma *Adobe Photoshop CS*.

Gli embrioni fluorescenti sono stati fotografati *in vivo*. Tali embrioni sono stati decorati manualmente, anestetizzati con tricaina e posti su vetrini portaoggetto a depressione immersi in metilcellulosa al 3%. Queste immagini sono state acquisite usando un microscopio a fluorescenza *Leica MZFL III*.

Per la microscopia confocale gli embrioni vivi sono stati montati in agarosio low melting all'1,2% diluito in ZFR e posti su un vetrino a depressione quando si dovevano acquisire immagini, oppure posti, ed opportunamente orientati su una capsula petri piccola, incollata ad una di diametro maggiore, incorporati in agarosio low melting e coperti con una soluzione composta da ZFR, PTU e tricaina per le scansioni nel tempo. Per l'acquisizione delle immagini confocali è stato utilizzato un microscopio *Nikon Eclipse E600* equipaggiato con il *Biorad Laser Scanning System Radiance 2000* che opera con il software *Biorad Lasersharp 2000*. Le immagini confocali sono state processate e convertite in formato JPEG utilizzando il programma *ImageJ* ed *Adobe Photoshop CS*. Per mantenere stabile il fuoco per un lungo periodo, quando si sono effettuate scansioni nel tempo, è stato utilizzato un obiettivo Nikon 40x ad immersione ad acqua.

2.8 Trattamenti con sostanze teratogene

DAPT

Il DAPT in polvere (Sigma ®) viene sciolto in DMSO per preparare una soluzione madre 10 mM. Gli Embrioni allo stadio di interesse vengono trattati con DAPT diluito alla concentrazione 100 µM in fish water (gli embrioni di controllo vengono posti in fish water contenente la stessa concentrazione di DMSO).

Acido Retinoico

L'acido retinoico in polvere (Sigma®) viene disciolto in DMSO per preparare la soluzione madre 100 µM. Gli embrioni dello stadio desiderato vengono immersi in acido retinoico diluito in fish water fino alla concentrazione finale 0,1 µM e posti in incubatore a 28.5° C O/N, isolati dalla luce. Il giorno successivo vengono sciacquati più volte in fish water pulita contenente PTU ed allevati fino allo stadio di interesse. I controlli vengono trattati con la medesima concentrazione di DMSO.

DEAB

Il DEAB in polvere (Sigma®) viene disciolto in DMSO per preparare la soluzione madre 100 μ M. Gli embrioni dello stadio desiderato vengono immersi in DEAB diluito in fish water fino alla concentrazione finale 10 μ M e posti in incubatore a 28.5° C O/N, isolati dalla luce. Anche in questo caso i controlli vengono trattati con la medesima concentrazione di DMSO.

SU5402

Come per il DAPT anche questa sostanza viene acquistata in polvere e sciolta in DMSO. Il trattamento va effettuato al buio ponendo gli embrioni in fish water contenente SU5402 in concentrazione 50 μ M. Anche in questo caso per gli embrioni di controllo si utilizza il DMSO.

SB431542

Anche con questa sostanza si procede analogamente a quanto si fa con SU5402. gli embrioni in questo caso vengono privati del corion e trattati con una soluzione contenente SB431542 in concentrazione 100 μ M.

Litio Cloruro (LiCl)

Il LiCl viene sciolto in fish water per ottenere una soluzione avente concentrazione 0,3 M. Gli embrioni di controllo vengono posti in fish water priva di LiCl.

2.9 Metodi di Biologia Molecolare

2.9.1 Vettori di clonaggio

Nel corso di questo lavoro di tesi i costrutti per la creazione di linee transgeniche sono stati realizzati nel vettore pG1 (Gilmour et al., 2002, fornito dal Prof. Meyer dell'Università di Innsbruck, costruito da Chi-Ben Chien e Darren Gilmour) contenente la mmGFP5, e nel vettore pT2AL200R150G (Fornito dal Prof. Koichi Kawakami) quando si è utilizzata la tecnica *Tol2*. Per i subclonaggi si è utilizzato il vettore pCRII-TOPO (Invitrogen).

2.9.2 Cloni BAC

Per la creazione delle linee transgeniche oggetto di questa tesi, la sequenza regolatrice a monte del gene *ptf1a* di zebrafish è stata isolata dal clone BAC (cromosoma artificiale batterico) CHORI-211 (numero di accesso AL845362). Questo clone BAC è stato generato utilizzando il vettore pTARBAC2.1 e ordinato presso la " Deutsches Ressourcenzentrum fur Genomforschung " (RZPD). il numero di libreria di questo clone è 736. Questo clone può essere espanso utilizzando le usuali cellule batteriche ospiti come ad esempio *E. coli DH10B*.

2.9.3 Quantificazione di DNA ed RNA

La quantificazione di DNA ed RNA è stata fatta su gel di agarosio addizionati con Etidio Bromuro, comparando l'intensità della fluorescenza delle bande di DNA o RNA con quella del marcatore di peso molecolare con quantità standard di DNA (*1 kb DNA ladder*, Promega). Le intensità delle bande sono state valutate a occhio oppure determinate informaticamente con il software *Molecular Analyst* (Biorad).

2.9.4 Estrazione di DNA plasmidico

2.9.4.1 Estrazione di piccole quantità di DNA plasmidico

Per l'estrazione di DNA plasmidico in piccole quantità sono stati utilizzati i kit commerciali *Wizard plus SV minipreps DNA purification system* (Promega) e *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research), seguendo i protocolli forniti dalle aziende produttrici. Con questa procedura si ottiene DNA utilizzabile per molte applicazioni, tra cui anche per il sequenziamento. Per l'utilizzo di questi protocolli si è partiti da 5 ml di coltura batterica liquida.

2.9.4.2 Estrazione di grandi quantità di DNA plasmidico o di cloni Bac

Per ottenere quantità dell'ordine dei 100 µg di DNA plasmidico oppure per l'estrazione dei cloni BAC (presenti in singola copia nelle cellule batteriche) è stato utilizzato il kit commerciale Jet Star 2.0, *Plasmid Midi Prep Kit* (Genomed). In questo caso si è partiti da 50 ml di coltura batterica liquida posta a crescere a 37° O/N con aggiunta dell'anticorpo appropriato. Anche in questo caso è stato seguito il protocollo fornito dal produttore. Per incrementare la resa di DNA del clone BAC la soluzione 5 fornita dal kit è stata sostituita con una versione modificata avente pH 4 e cloruro di sodio 850 mM.

2.9.4.3 Eluizione di frammenti di DNA

L'isolamento di bande di DNA da gel di agarosio dopo corsa elettroforetica è stato fatto utilizzando i kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), e *DNA Clean & Concentrator™-5* (Zymo Research) e seguendo i protocolli forniti dalle ditte.

2.9.5 Modificazione degli acidi nucleici

2.9.5.1 Digestioni di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico o del clone BAC è stato digerito utilizzando endonucleasi di restrizioni delle aziende Promega e Biolabs, seguendo i protocolli forniti.

2.9.5.2 Riempimento delle estremità sporgenti del DNA

In alcuni casi per poter procedere con la reazione di ligasi si è dovuto rendere "piatte" estremità di DNA che dopo la digestione enzimatica risultavano "appiccicose". Per fare ciò è stata utilizzato l'enzima Klenow, quando l'estremità sporgente era la 5' o la polimerasi T4 se si trattava della 3'. In entrambi i casi è stato seguito il protocollo fornito. Per la polimerasi T4 si è utilizzato come tampone il *buffer C* fornito con alcuni enzimi di restrizione della ditta Promega.

2.9.5.3 Defosforilazione di frammenti di DNA

Per evitare che durante la reazione di ligasi le estremità "piatte" del plasmide si rilegassero tra loro escludendo l'insero si è reso necessario rimuovere i gruppi fosfato dall'estremità 3'. Per fare questo si è utilizzata una fosfatasi alcalina (Promega) con il relativo tampone e la reazione è stata assemblata seguendo il protocollo del produttore.

2.9.5.4 Ligasi dei frammenti di DNA

La ligasi dei frammenti di DNA è stata fatta secondo i protocolli standard (Sambrook et al., 1989). Quando vettore ed inserto avevano estremità appiccicose complementari sono stati posti nella miscela di reazione in rapporto molare 1:3. Se entrambi i frammenti possedevano estremità "piatte" il rapporto molare è stato modificato fino a 1:10. Solitamente sono stati posti nel volume di reazione 100 ng di vettore.

La miscela di reazione è stata assemblata come segue:

x µl vettore plasmidico

x µl inserto

0,5 µl T4 DNA ligasi (3U/µl)

1 µl T4 ligasi buffer 10x

x µl H₂O milli-Q(fino a 10 µl)

la miscela di reazione va incubata a 16°C O/N

2.9.6 Trasformazione batterica

2.9.6.1 Trasformazione chimica in *E. coli*

La trasformazione chimica in *E. coli* è stata fatta utilizzando aliquote di cellule *E. coli* chemiocompetenti TOP10 (Invitrogen) conservati a -80°C e si procede secondo i passaggi che seguono:

- aggiungere all' aliquota di batteri 2 µl del prodotto di legazione;
- incubare in ghiaccio per 30 minuti;
- sottoporre le cellule a shock termico a 42°C per 30 secondi;
- trasferire immediatamente la provetta in ghiaccio;

- aggiungere 250 µl di terreno SOC (conservato a 4°C e portato a temperatura ambiente prima dell'uso);
- incubare la provetta a 37°C in agitazione per un'ora.

Le cellule vengono poi pastrate a diverse diluizioni su terreno solido contenente l'opportuno antibiotico e vengono poste a crescere a 37°C O/N. Alcune delle colonie cresciute su terreno solido vengono espanse tramite inoculo in 5 ml di terreno LB liquido contenente l'antibiotico richiesto, che viene fatto crescere, in agitazione, a 37°C O/N. Dalla coltura liquida viene estratto il DNA plasmidico, come descritto in precedenza. La presenza dell'insero di interesse viene controllata tramite opportune digestioni enzimatiche del DNA plasmidico estratto e mediante sequenziamento .

2.9.7 Sequenziamento

I campioni di DNA sono stati sequenziati presso il *Servizio di sequenziamento di DNA del BMR*. Prima del sequenziamento il DNA è stato preparato seguendo le indicazioni fornite presso il seguente sito internet: <http://bmr.cribi.unipd.it> .

2.9.8 Analisi delle sequenze di DNA

Le sequenze determinate dal servizio di sequenziamento sono state visualizzate utilizzando il programma *Chromas*. Per identificare sequenze simili in uno dei database di DNA che si trovano in internet le sequenze ottenute sono state "bastate" contro le sequenze presenti in "GenBank" utilizzando il programma di Blast presente al National Centre of Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) o contro le sequenze del database EMBL presso l'EBI (www.ebi.ac.uk). La sequenza regolatrice a monte del gene *ptf1a* è stata analizzata con l'utilizzo del programma Gene2promoter reperibile al sito www.genomatix.de.

2.9.9 Sintesi di RNA messaggero

Per la trascrizione del messaggero è stata seguita la procedura del kit "mMESSAGE mMACHINE" (Ambion), che prevede i seguenti passaggi: Se prendiamo in considerazione la sintesi del messaggero della trasposasi clonata nel plasmide pCS-TP, una volta linearizzati 5 µg del plasmide in questione con l'opportuno enzima di restrizione (Not I), si assembla la reazione in 20 µl, come segue:

PCS-TP linearizzato 1 µg

NTP/CAP 1 X

Buffer (sali e DTT) 1 X

SP6 mix 2 µl

acqua DEPC fino a volume

- incubare per 2 ore a 37°C
- aggiungere alla provetta 1 µl di DNasi priva di RNasi, mescolare e incubare 15 minuti a 37°C. In questo modo viene degradato lo stampo di DNA.
- fermare la reazione e precipitare l'RNA aggiungendo 10 µl di LiCl 4N
- mescolare e incubare la reazione a -20°C per almeno 30 minuti
- centrifugare per 15 minuti a 14000 g a 4°C
- rimuovere il surnatante e lavare il pellet con etanolo 70%
- centrifugare per 15 minuti a 14000 g a 4°C
- rimuovere il surnatante, asciugare sotto cappa e risospendere in 20 µl di acqua DEPC.

Infine, per controllare che la sintesi dell'mRNA fosse avvenuta correttamente e che il messaggero non fosse stato degradato, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio. Lo stesso gel è servito anche per la quantificazione del trascritto.

2.9.10 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Tutte le PCR di questo lavoro sono state effettuate con termociclatori "iCicler" (BioRad), con piastra da 96 pozzetti, e MJ Research "Mini Cicler" con piastra da 16 pozzetti. I reagenti (Promega) utilizzati per la PCR, di volume totale 10 μ l, sono i seguenti:

- 1x MgCl₂ (stock 10x: 25mM)
- 1x buffer
- 0.2 mM dNTPs
- 1 μ M primer 1
- 1 μ M primer 2
- 10-20 ng/ μ l DNA stampo
- Portare a volume con H₂O milli-Q sterile

Il programma del termociclatore varia a seconda dei primer utilizzati e della lunghezza del frammento da amplificare. Programma di amplificazione:

- 1) 94°C per 2 min. circa (denaturazione iniziale)
- 2) 94°C per 30 sec. circa (denaturazione per ogni ciclo)
- 3) X°C per 45 sec. (appaiamento)
- 4) 72°C per X sec. (polimerizzazione)

I passaggi da 2 a 4 vengono ripetuti 33 volte

- 5) 72°C per 10 min. (estensione finale)

Successivamente i prodotti di PCR sono stati utilizzati per reazioni di ligasi.

2.9.11 Sintesi della sonda antisense

Il protocollo di sintesi degli RNA antisense, da utilizzare come sonde, differisce di poco da quello descritto per la trascrizione dei messaggeri. In questo caso, trattandosi di un antisense, la RNA polimerasi usata è quella che trascrive a partire dal 3' del cDNA. Di conseguenza l'enzima di trascrizione scelto per la linearizzazione riconosce una sequenza a monte dell'inserito. In questo modo si ottiene un frammento di acido ribonucleico complementare, in grado di ibridarsi all'mRNA bersaglio.

Nella **Tabella 1** sono descritti i geni per i quali abbiamo sintetizzato la sonda antisense, i relativi plasmidi, gli enzimi di restrizione e la polimerasi utilizzati.

GENE	PLASMIDE	ENZIMA	POLIMERASI
<i>ptf1a</i>	pCRII-TOPO	<i>Xho I</i>	Sp6
<i>ins</i>	pCR2.1	<i>Hind III</i>	T7
<i>glu</i>	pCR Blunt	<i>Hind III</i>	T7
<i>pdx1</i>	pCR2.1	<i>Hind III</i>	T7
<i>sst</i>	pCR Blunt	<i>Hind III</i>	T7
<i>hlxb9</i>	pBS K	<i>BamHI</i>	T7
<i>foxa1</i>	<i>pSPORT1</i>	<i>Sal I</i>	Sp6
<i>sox17</i>		<i>Eco RI</i>	T7
<i>gfap</i>		<i>Bam HI</i>	T3
<i>islet1</i>	pBS KS	<i>Bam HI</i>	T7
<i>islet2</i>	pBS K	<i>Not I</i>	T7
<i>GFP</i>	pG1	<i>HindIII</i>	T7

Tabella 1: rappresentazione schematica dei geni dei quali è stata sintetizzata la sonda antisense, dei plasmidi in cui sono clonati e di enzimi di restrizione e RNA polimerasi impiegati nella sintesi.

La reazione di sintesi della sonda è la seguente:

plasmide linearizzato 1 ug

NTP RNA (digossigenati 1 X o fluoresceinati)

T7,SP6 o T3 polimerasi 20 unità

Buffer 1 X

RNAsin 35 unità

Acqua DEPC fino a volume.

La miscela è incubata per 2 ore a 37°C.

Si procede quindi con i seguenti passaggi:

- aggiungere 2 µl di Dnasi, per digerire il DNA, ed incubare per 15 minuti a 37°C

- precipitare unendo alla miscela:

1 µl EDTA 0,5 M pH 8

2,5 µl LiCl 4N

75 µl etanolo 100%

- lasciare a -80°C O/N.
- centrifugare per 20 minuti a 14000 g a 4°C
- scartare il surnatante e aggiungere etanolo 70%
- centrifugare per 15 minuti a 14000 g a 4°C
- rimuovere l'etanolo e lasciar asciugare sotto cappa

Il precipitato viene quindi risospeso in 20 µl di acqua DEPC e 20 µl di formammide e controllato su gel di agarosio.

2.9.12 Mutagenesi sito-specifica

Questa procedura permette (inserendo o eliminando nucleotidi) di ottenere specifiche mutazioni di interesse. E' stato seguito il protocollo del *Kit Quick Change XL Site-Directed mutagenesis* (Stratagene), che prevede le seguenti tappe:

- reazione di polimerizzazione con l'utilizzo di oligonucleotidi per la mutagenesi, progettati mediante programma bioinformatico (Primer3); ne sono state sintetizzate due coppie (*forward* e *reverse*, **Tabella 2**), per apportare le opportune mutazioni nei siti di interesse durante due cicli successivi di mutagenesi.

OLIGONUCLEOTIDI UTILIZZATI	I° CICLO DI MUTAGENESI	II° CICLO DI MUTAGENESI
FORWARD	5'- GCA CAA AAA ATC CCG GGA CAC TGT G -3'	5'-GTC GGA TCC CGG GGG ATC CAC AGC C - 3'
REVERSE	5'- CAC AGT GTC CCG GGA TTT TTT GTG C - 3'	5'-GGC TGT GGA TCC CCC GGG ATC CGA C - 3'

Tabella 2: in questa tabella sono elencati gli oligonucleotidi che sono stati sintetizzati ed impiegati nei due cicli successivi di mutagenesi sito-specifica.

REAZIONE DI POLIMERIZZAZIONE :

- 5 ul di Buffer (10x)
- x ul (10-20-50 ng) DNA Templato
- x ul (125ng) di primer forward
- x ul (125ng) di primer reverse
- 1 ul di dNTP mix
- 3 ul di QuikSolution
- H₂O milliQ fino a volume

Aggiungere 1 µl di PfuUltra HF DNA polimerasi.

CONDIZIONI PER LA POLIMERIZZAZIONE

I STEP	1 ciclo	95°C	3'
II STEP	30 cicli	95°C	1'
		55°C	1'
		68°C	25'
III STEP	1 ciclo	68°C	7'

Il prodotto di polimerizzazione viene digerito con l'enzima *Dpn I* per eliminare il plasmide non mutato (parentale)

Per il trattamento enzimatico si aggiunge a ciascun prodotto di polimerizzazione

1 µl dell'enzima *Dpn I* (10U/µl) fornito dal Kit.

I prodotti della digestione vengono usati per trasformare i batteri TOP 10 chemiocompetenti.

2.10 Clonaggio del promotore di *pff1a* di zebrafish

Analizzando il profilo di restrizione del clone BAC di zebrafish, comprendente parte del DNA genomico del cromosoma 2 (numero di accesso AL845362), ho visto che operando una restrizione con la coppia di enzimi di restrizione *HindIII* ed *EcoRV* avrei ottenuto una sequenza di 5,7

kpb contenente la regione promotoriale di interesse e le prime 195 pb di porzione codificante *ptf1a*.

E' stata perciò utilizzata questa coppia di enzimi per tagliare la porzione di DNA di interesse ed operare un clonaggio direzionato nel vettore plasmidico pG1, precedentemente tagliato con gli enzimi *HindIII* e *SmaI*, a monte del messaggero codificante la GFP (green fluorescent protein). Alcuni cloni positivi sono stati fatti sequenziare e analizzando le sequenze nucleotidiche ottenute si è visto che l' ATG di *ptf1a* non era in frame con quello della proteina fluorescente. Si correva perciò il rischio che, una volta microiniettato questo costrutto in embrioni di zebrafish non venisse espressa la GFP sotto la guida del promotore in questione. Per ovviare a questo inconveniente sono stati fatti due cicli consecutivi di mutagenesi sito specifica, utilizzando due opportuni oligonucleotidi sintetici che introducessero due siti di restrizione per l'enzima *SmaI*, situati rispettivamente a livello dell' ATG di *ptf1a* e subito a monte del codone di inizio traduzione della GFP, per fare in modo che il primo ATG vicino al promotore fosse proprio quello della proteina fluorescente. A causa della probabile presenza di superavvolgimenti del DNA nella regione promotoriale compresa tra -3,0 e -5,0 kpb che ostacolavano l'azione delle polimerasi, prima di operare le mutagenesi sito specifiche si è reso necessario subclonare la cassetta comprendente una porzione di promotore di 2,6 kpb , il messaggero della GFP e il sito di poli A di SV40, ottenuta mediante restrizione con gli enzimi *Spe I* e *Not I*, nel vettore pCRII-TOPO (invitrogen) tagliato con le stesse endonucleasi. Il costrutto così ottenuto è stato mutagenizzato, utilizzando gli oligonucleotidi opportunamente sintetizzati (**Tabella 2**) che introducessero nucleotidi in modo da ottenere i siti di taglio desiderati, è stato reinserto in pG1, tagliato con gli enzimi *Spe I* e *Not I*. In questo modo si è ottenuto un costrutto da impiegare, circolarizzato per microiniezioni transienti e digerito con *Hind III* e *Not I* per quelle transgeniche.

2.11 Creazione di costrutti transgenici con il sistema Tol2

2.11.1 Clonaggio di 5,5 kpb di promotore di *ptf1a*

Per aumentare la frequenza di integrazione del transgene di interesse nel genoma di cellule della linea germinale di zebrafish, la sottoscritta si è avvalsa del sistema TOL2 (Kawakami et al., 2004) illustrato in **Figura 7**. L'obiettivo era creare una linea transgenica stabile di zebrafish in cui il promotore di *ptf1a* guidasse l'espressione della proteina fluorescente rossa *DsRed* nel pancreas esocrino.

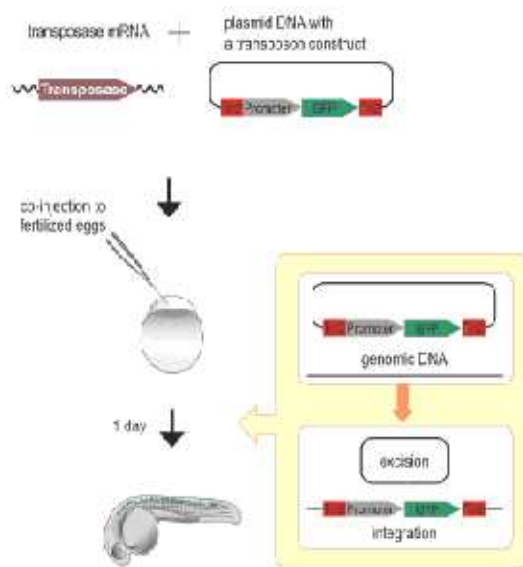


Figura 7: rappresentazione schematica della procedura utilizzata per la produzione di transgenici con il sistema Tol2 (Kawakami 2007)

Per realizzare ciò il plasmide pT2AL200R150G è stato tagliato con gli enzimi *Xho I* e *Bgl II*. Il promotore di *ptf1a* è stato exciso dal vettore pG1 mediante digestione con *Sma I*, seguita da un taglio parziale con *Sal I* e isolamento da gel di agarosio della sola banda da 5,6 kpb. Il messaggero codificante la proteina fluorescente rossa è stato tagliato dal plasmide pCR II-TOPO con le endonucleasi *Eco RV* e *Bam HI*. Il poliA di SV40 è stato amplificato da pG1 utilizzando il seguente oligonucleotide *forward*: 5'-

CGCGGATCCGTAATAATCAGCCATAACCACATT e il seguente reverse: 5'-GGAAGATCTGCGCCACAACACTAGAATGC per introdurre, rispettivamente i siti di restrizione per gli enzimi *Bam HI* e *Bgl II*.

I quattro frammenti ottenuti sono stati assemblati in una reazione di ligasi multipla. Un clone positivo ottenuto dopo la trasformazione in seguito alla ligasi, e verificato mediante restrizioni mirate e sequenziamento, è stato microiniettato, con il messaggero della trasposasi (sintetizzato a partire dal plasmide pCS-TP come descritto precedentemente) in uova fecondate di zebrafish allo stadio di 1-2 cellule.

2.11.2 Clonaggio di 2,6 kpb di promotore di *ptf1a*

2,6 kb di promotore di *ptf1a* sono state isolate dal plasmide pCR II-TOPO utilizzando l'enzima di restrizione *Bam HI*. Anche il plasmide pT2AL200R150G è stato tagliato con *Bam HI*, defosforilato e tagliato nuovamente con *Xho I* e *Sal I* per eliminare la sequenza promotoriale che si trovava nel plasmide che ci è stato fornito. Il plasmide pT2AL200R150G così ottenuto è stato assemblato con le 2,6 kpb di promotore nella reazione di ligasi. Uno dei cloni positivi ottenuti dopo la successiva trasformazione batterica è stato iniettato con il messaggero per la trasposasi in uova fecondate di zebrafish allo stadio di 1-2 cellule al fine di creare una linea transgenica stabile.

3. RISULTATI

3.1 Creazione della linea transgenica *ptf1a(5,5):GFP*

Nel laboratorio in cui ho svolto questo lavoro di Dottorato è stata analizzata, utilizzando il programma bioinformatico *Gene2promoter* (reperibile al sito www.genomatix.de), la regione regolatrice a monte dell'ATG del gene *ptf1a* di zebrafish, per valutare quante chilobasi di promotore fosse opportuno utilizzare per la produzione di una linea transgenica in cui la GFP fosse espressa nel pancreas esocrino.

Possibili elementi importanti a questo fine sono stati rilevati nella porzione di regione promotoriale compresa tra -3700 e -5000 paia di basi; in questa regione è stata infatti riscontrata la presenza di siti di legame per fattori di trascrizione come *hes*, *hnf1* e *nkx* (**Figura 8**), che potrebbero essere importanti per guidare l'espressione tessuto-specifica di *ptf1a* nel pancreas esocrino.

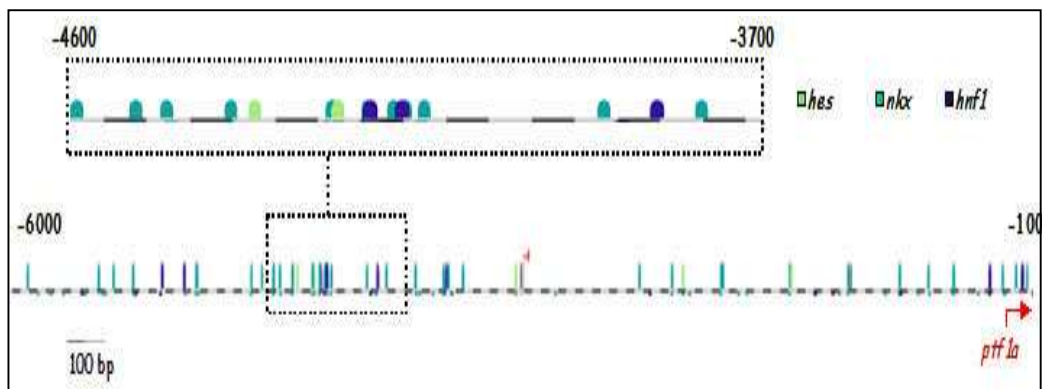


Figura 8.: lo schema che illustra l'analisi di 6000 paia di basi della regione regolatrice a monte del gene *ptf1a* di zebrafish. Si può notare che la porzione di tale regione compresa tra -3700 e -4600 paia di basi presenta elevata densità di putativi siti di riconoscimento di fattori di trascrizione pancreatici che potrebbero essere importanti per l'espressione tessuto-specifica di *ptf1a* nel pancreas esocrino. La freccia in basso a destra indica la regione codificante per *ptf1a*.

Inoltre, a -3067 e a -3604 paia di basi sono presenti elementi che rappresentano la stessa sequenza consenso riconosciuta da *ptf1a* nella

regione promotoriale dei geni dei quali regola l'espressione (*tripsina*, *elastasi*, *carbossipeptidasi*, ecc.) (**Figura 9**).

C	G			
Mammalian consensus for PTF		CA	CTG.....TTTCCCA	
		G		T
Zebrafish trypsin promoter elements:	I	CtCCTG	gattatactcTTTCCCTA (-791)	
	II	CAGCTGa	ttat TTTCCCAT (-1338)	
		* ****	*****	
Zebrafish Ptfla promoter elements:	I	CAAGTG	gtgtg ATTCCCAC (-3067)	
	II	CATGTG	ttgct ATTCCCAT (-3604)	
		** ***	*****	
Ptfla consensus:		CANSTG	(N) ₅₋₁₁	WTTCCCAN

Figura 9: I geni tripsina e *ptfla* di zebrafish hanno due putativi siti consenso per *ptfla* nella regione regolatrice a monte (Zecchin et al., 2004)

Considerando i risultati di queste analisi la sottoscritta ha deciso di clonare una regione di promotore di *ptfla* di almeno 5 Kpb.

Studiando il profilo di restrizione della sequenza della regione promotoriale presa in considerazione si è visto che tagliando il clone BAC contenente il DNA genomico della porzione di cromosoma 2 di zebrafish, in cui mappa *ptfla*, con le endonucleasi *Hind III* ed *EcoR V*, si otteneva un frammento di 5,7 Kpb comprendente 5,5 Kpb di regione promotoriale e 195 paia di basi di porzione codificante *ptfla*. (**Figura 10**)

Il frammento così ottenuto è stato legato in modo direzionato tra i siti *Hind III* e *Sma I* del vettore di clonaggio pG1, in modo da essere inserito subito a monte della sequenza codificante la GFP. Analizzando la sequenza del costruito così ottenuto è emerso che l'ATG di *ptfla*, incluso nella sequenza clonata in pG1, non era in frame con quello della sequenza codificante la proteina fluorescente verde.

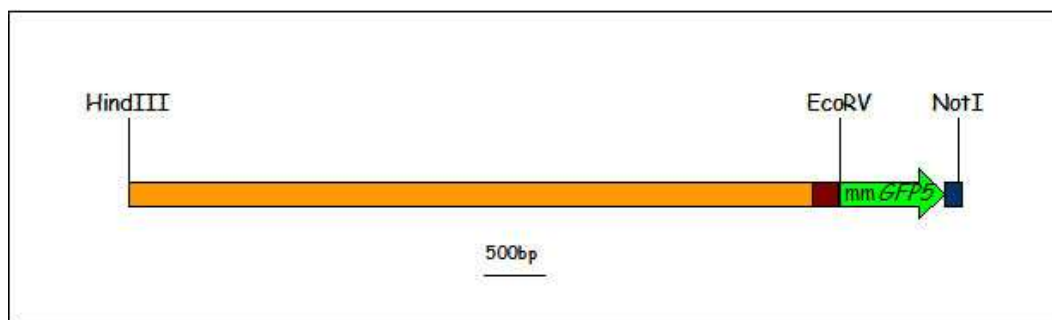


Figura 10: rappresentazione schematica del costrutto ottenuto dal vettore pG1 e microiniettato in uova fecondate di zebrafish per ottenere la linea transgenica. In arancio è rappresentata la regione promotoriale di *ptf1a*, in rosso la porzione codificante di *ptf1a* eliminata in seguito a mutagenesi sito-specifica; in verde è rappresentato il messaggero della proteina fluorescente verde e in blu la coda di poliA del virus SV40.

Per evitare la possibilità che, dopo la microiniezione del costrutto ottenuto la GFP non venisse espressa sotto la guida del promotore utilizzato, sono stati eseguiti due cicli consecutivi di mutagenesi sito-specifica, per introdurre due siti unici di restrizione che permettessero di eliminare la porzione codificante *ptf1a*, di potenziale ostacolo all'espressione della GFP, in modo che il primo ATG più vicino alla sequenza regolatrice fosse proprio quello della proteina fluorescente verde.

Per ogni ciclo di mutagenesi è stata impiegata una delle due coppie di oligonucleotidi sintetizzati (*forward* e *reverse*, **vedi materiali e metodi**), per introdurre due siti di restrizione per l'enzima *Sma I*, uno situato a livello dell'ATG di *ptf1a* e uno subito a monte del codone di inizio traduzione della GFP. Dopo aver valutato la bontà del costrutto mutagenizzato, la sottoscritta ha effettuato le microiniezioni del costrutto col transgene. Trenta degli embrioni microiniettati con il costrutto creato hanno raggiunto l'età riproduttiva. A questo punto i pesci adulti sono stati incrociati ciascuno con un pesce appartenente al ceppo selvatico umbria. Dall'analisi al microscopio a fluorescenza della progenie ottenuta dall'incrocio è stato identificato un fondatore transgenico. Le larve che sono risultate fluorescenti sono state isolate e cresciute, e costituiscono la generazione F1 della linea transgenica *ptf1a(5,5):GFP*.

3.1.1 Descrizione della linea transgenica *ptf1a(5,5):GFP*

Gli embrioni appartenenti alla generazione F1 della linea transgenica *ptf1a(5,5):GFP* sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza nel corso dello sviluppo. In questi embrioni la GFP è stata inizialmente rilevata a metà somitogenesi nella parte dorsale del tubo neurale a livello del romboencefalo (**Figura 11**). Nelle successive ore di sviluppo il dominio di espressione della proteina fluorescente verde si fa via via più ampio pur rimanendo circoscritto alla regione del romboencefalo. Verso le 36 ore di sviluppo si inizia ad osservare la GFP ventralmente, leggermente spostata sul lato sinistro dell'embrione. A 48 ore di sviluppo la GFP è visibile ventralmente, in posizione mediana leggermente spostata verso destra. Nel sistema nervoso centrale è possibile osservare la proteina fluorescente verde a livello di retina, di giunzione tra mesencefalo e romboencefalo, in corrispondenza del primordio del cervelletto e in due domini paralleli di cellule che decorrono dorsalmente lungo il romboencefalo. Dalle 72 ore di sviluppo la GFP è evidente ventralmente sul lato destro dell'embrione dove assume la forma di una clava con una sorta di cavità in posizione antero-laterale, nel sito in cui si colloca l'isola endocrina, mentre si fa sempre più debole la sua espressione nel sistema nervoso centrale.

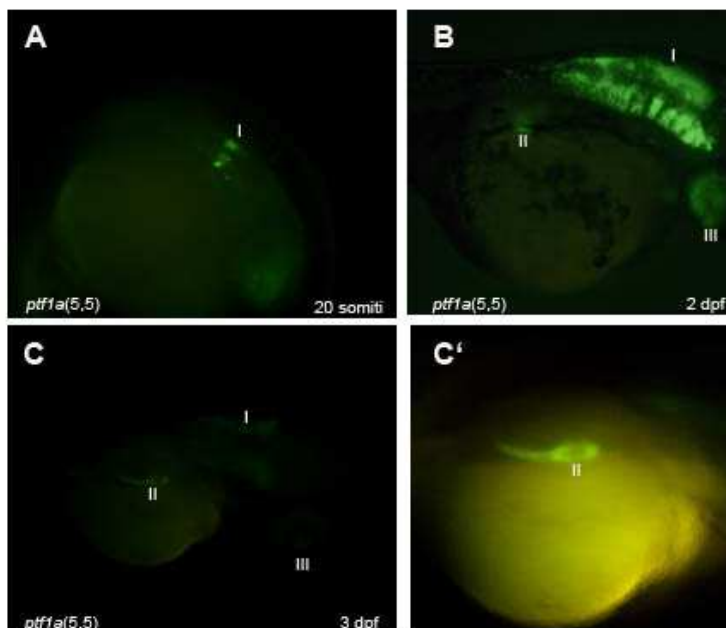


Figura 11: immagini acquisite al microscopio a fluorescenza raffiguranti una larva transgenica *ptf1a:GFP* a 20 somiti (A); 2 giorni (B); 3 giorni (C, C'). I sta ad indicare l'espressione della GFP nel romboencefalo, II indica il pancreas esocrino, III la retina. Come si può vedere dalla figura, a 72 ore di sviluppo la fluorescenza è localizzata sul lato destro dell'embrione

Dopo l'accurata osservazione delle larve transgeniche è apparso evidente che il profilo di espressione della GFP rispecchia fedelmente quello descritto da Zecchin e colleghi (Zecchin et al., 2004) per il gene *ptf1a* in embrioni di zebrafish di tipo selvatico, rilevato mediante ibridazione *in situ*. Questo dato è stato confermato anche eseguendo ibridazioni *in situ* utilizzando la sonda *ptf1a*, su embrioni di tipo selvatico, e la sonda GFP su embrioni e larve transgeniche, verificando poi che i profili di espressione ottenuti nei due casi fossero comparabili (**Figura 12**).

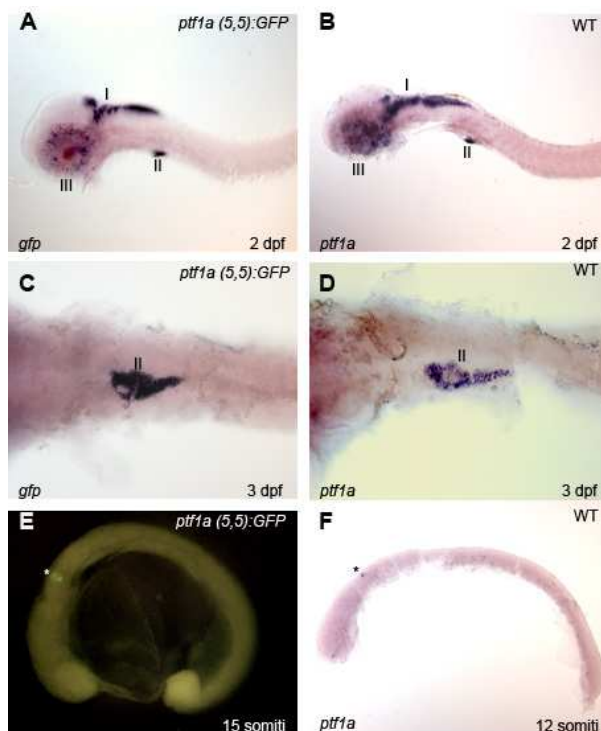


Figura 12: Foto raffiguranti larve di zebrafish WT ibridate con la sonda *ptf1a* e larve *ptf1a:GFP* ibridate con la sonda GFP. Il profilo di espressione della GFP nelle larve transgeniche rispecchia quello di *ptf1a*. L'espressione di *ptf1a* inizia ad essere rilevata nel romboencefalo (indicata con l'asterisco in F) allo stadio di 12 somiti, mentre la GFP negli embrioni transgenici appare a 15 somiti (indicata con l'asterisco in E).

Questi risultati indicano che nelle 5,5 chilobasi di promotore scelte sono presenti gli *enhancer* tessuto specifici necessari per guidare l'espressione della proteina fluorescente utilizzata nel pancreas esocrino, oltre che nel sistema nervoso centrale.

Osservando al microscopio confocale le stesse larve *ptf1a(5,5):GFP*, si è potuta vedere dettagliatamente la caratteristica forma allungata che il pancreas esocrino assume a partire dai tre giorni di sviluppo. Nella foto (**Figura 13**) si può facilmente distinguere, in una larva transgenica di zebrafish di cinque giorni, la testa del pancreas (**A**) in cui è presente la cavità corrispondente all'isola endocrina, e la coda del pancreas (**B**) dove sono evidenti zone in cui non viene espressa la **GFP**,

presumibilmente corrispondenti allo spazio occupato dal dotto intrapancreatico.

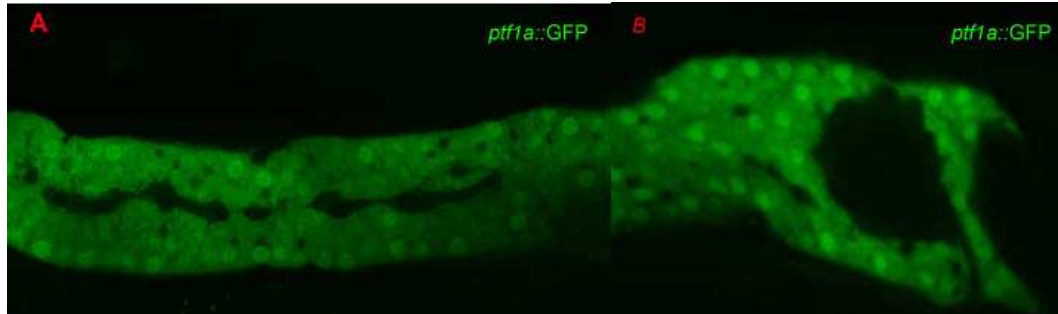


Figura 13: Immagine acquisita al microscopio confocale raffigurante il corpo e la coda del pancreas esocrino (A), e la testa (B). Nel corpo si può notare che l'espressione della GFP non è rilevabile nello spazio occupato dal dotto intrapancreatico. Nella testa la GFP non è espressa nella cavità in cui si colloca l'isola endocrina.

Zebrafish transgenici *ptf1a(5,5):GFP* sono stati incrociati con pesci appartenenti ad un'altra linea transgenica (forniti dal Prof. W. Driever dell'Università di Friburgo ed allevati in laboratorio) in cui l'espressione della proteina fluorescente rossa (*DsRed*) è diretta dal promotore dell'insulina nell'isola endocrina. Gli embrioni ottenuti dall'incrocio sono stati cresciuti fino a 40 ore. A questo punto, quelli che presentavano doppia fluorescenza sono stati sottoposti a scansioni temporali al microscopio confocale. E' stato fatto ciò per monitorare *in vivo* lo sviluppo esocrino ed endocrino e i rapporti reciproci tra i due compartimenti. Come si può vedere in figura, l'abbozzo pancreatico esocrino a 40 ore di sviluppo (0') si trova vicino e parzialmente sovrapposto a quello endocrino, e lo avvolge completamente verso le 52 ore di sviluppo (**Figura 14**).

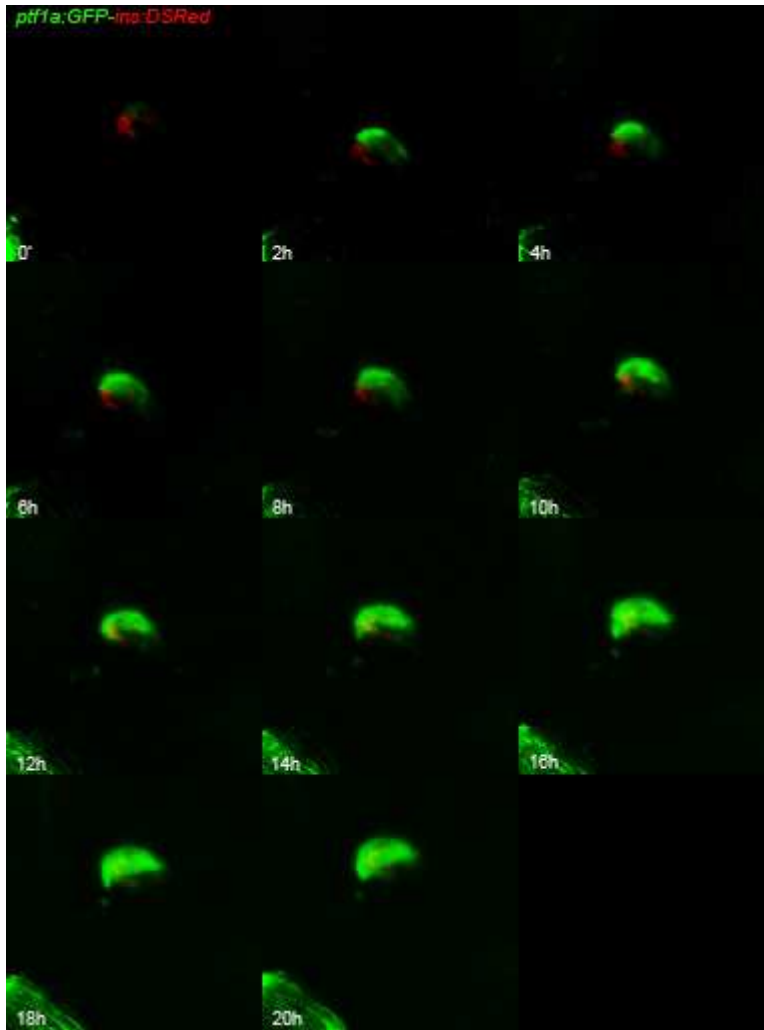


Figura 14: analisi al microscopio confocale dello sviluppo del pancreas esocrino ed endocrino nel periodo di tempo dalle 40 alle 60 ore di sviluppo. Per questa scansione temporale è stato utilizzato un pesce ottenuto dall'incrocio tra un transgenico appartenente alla linea *ptf1a:GFP* ed un *ins:DsRed*. Si può notare come durante questo intervallo temporale l'abbozzo pancreatico esocrino si avvicini sempre più a quello endocrino fino ad avvolgerlo completamente verso le 52 ore di sviluppo. Field et al., nel 2003 hanno osservato le medesime dinamiche utilizzando la linea transgenica *gut:GFP*.

Effettuando un'ulteriore scansione temporale, a partire dalle 55 ore di sviluppo embrionale, la sottoscritta ha osservato *in vivo* come la porzione pancreatico esocrina, dopo aver avvolto l'isola endocrina, si allunghi posteriormente fino ad assumere la forma a clava che la contraddistingue a partire dai tre giorni di sviluppo (**Figura 15**).

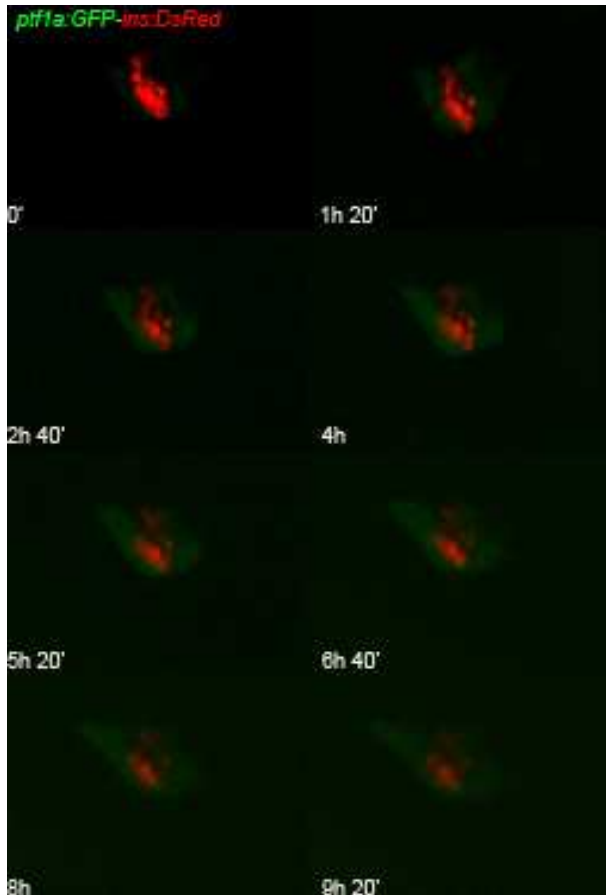


Figura 15: Scansione temporale al microscopio confocale del doppio transgenico *pff1a:GFP-ins:DsRed*, nell'intervallo di tempo dalle 55 alle 65 ore di sviluppo circa. La larva è in posizione laterale. La porzione anteriore è a destra. In figura si può vedere come nel tempo il pancreas esocrino, che ha già avvolto l'isola endocrina, si allunghi posteriormente fino ad assumere la forma affusolata che caratterizza il pancreas a partire dai 3 giorni di sviluppo di zebrafish.

3.1.2 Creazione della linea transgenica *pff1a(5,5):DsRed* con il sistema Tol2.

Le stesse 5500 chilobasi di regione regolatrice a monte del gene *pff1a*, utilizzate per la produzione della linea transgenica *pff1a:GFP*, sono state utilizzate per la produzione di una linea transgenica di zebrafish in cui il promotore di *pff1a* guidasse l'espressione della proteina fluorescente rossa DsRed, anziché della GFP. Per la creazione di questo transgenico la sottoscritta si è avvalsa del sistema Tol2 ideato da Kawakami e colleghi.(2004). La porzione di promotore di interesse è stata escissa dal vettore di clonaggio pG1 e introdotta nel vettore di tipo Tol2 pT2AL200R150G, dove la porzione codificante la proteina fluorescente verde è stata sostituita con quella codificante la proteina fluorescente rossa. Il plasmide utilizzato per il clonaggio presenta due elementi Tol 2 non autonomi, fiancheggianti il sito di inserimento del promotore. Il plasmide assemblato con il promotore di interesse è stato iniettato in uova

fecondate di zebrafish allo stadio di una cellula, unitamente al messaggero codificante il gene per una trasposasi pienamente funzionale in grado di riconoscere i due elementi fiancheggianti la sequenza promotoriale di interesse (**paragrafo 2.11**) di interesse e di catalizzare la trasposizione della cassetta contenente il promotore del gene di interesse nel genoma di zebrafish. Questo sistema permette una maggiore frequenza di integrazione del transgene di interesse nel genoma delle cellule della linea germinale di zebrafish. con il metodo impiegato precedentemente si aveva una frequenza di integrazione pari al 5% circa. Gli embrioni microiniettati sono stati fatti crescere e una volta raggiunta l'età riproduttiva ne è stata analizzata al microscopio a fluorescenza la progenie. In questo modo tra 10 pesci adulti analizzati è stato identificato un fondatore transgenico in cui la proteina fluorescente rossa presentava lo stesso profilo di espressione osservato nei transgenici *ptf1a(5,5):GFP* (**Figura 16 A-A'**). L'unica differenza risiede nel fatto che la proteina fluorescente rossa non è evidenziabile in somitogenesi, ma inizia ad essere visibile a partire dalle 24 ore di sviluppo .

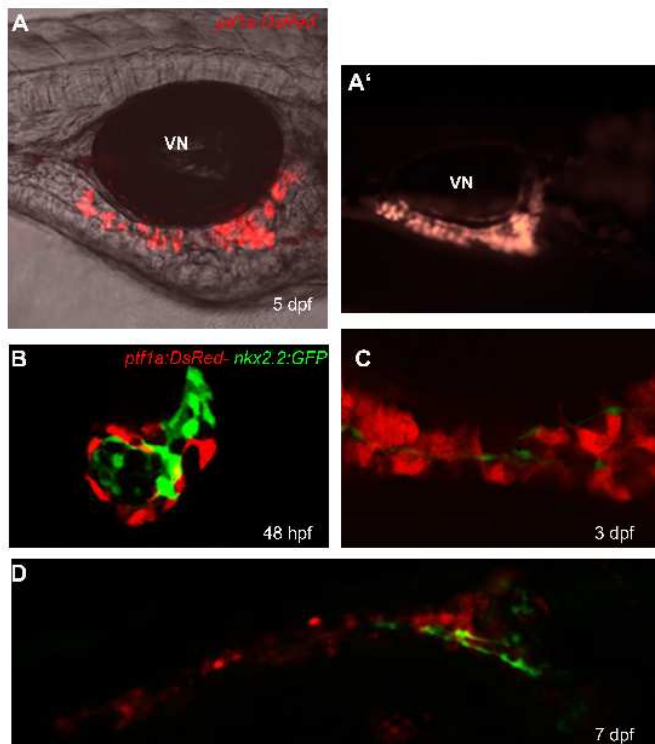


Figura 16: immagini al microscopio confocale (A) e a fluorescenza (A'), che mostrano una larva transgenica *ptf1a:DsRed* a 5 giorni di sviluppo. In B, C e D è raffigurato il pancreas del doppio transgenico *ptf1a:DsRed-nkx2.2:GFP*. Il dotto intrapancreatico, che esprime la GFP guidata dal promotore di *nkx2.2*, non colocalizza con le cellule *ptf1a*-positive che esprimono la proteina fluorescente rossa. In tutte le immagini le larve sono in posizione laterale con la testa a destra.

Il transgenico *ptf1a*:DsRed è stato incrociato con pesci della linea transgenica *nkx2.2*:GFP, precedentemente creata nel nostro laboratorio da Stefan Pauls (Pauls et al., 2007), in cui la GFP è espressa nel sistema nervoso centrale e nel dotto intrapancreatico, guidata da 3500 paia di basi di regione regolatrice a monte di *nkx2.2*. La progenie avente la doppia fluorescenza ha permesso di valutare, sia in larve fissate che *in vivo*, mediante scansioni temporali al microscopio confocale, il rapporto tra le cellule che esprimono *ptf1a* e quelle costituenti il dotto intrapancreatico. La sottoscritta ha potuto così osservare come il dotto si allunga tra le cellule *ptf1a*-positive senza colocalizzare con esse (**Figura 16 A-D** e **Figura 17**).

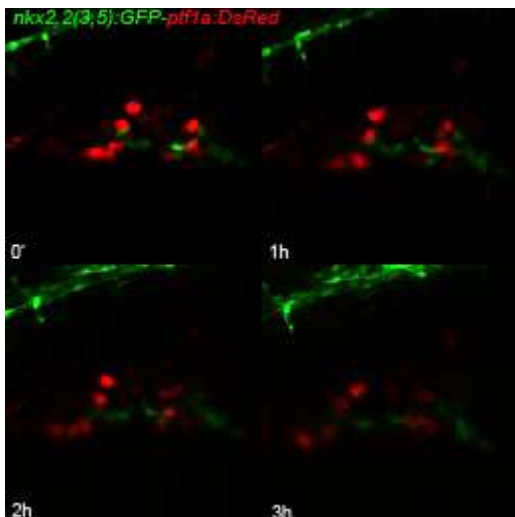


Figura 17: scansione temporale al microscopio confocale del doppio transgenico *ptf1a*:DsRed-*nkx2.2*:GFP, che documenta lo sviluppo del dotto pancreatico (*nkx2.2*:GFP in verde) nel dominio di espressione di *ptf1a* a partire dalle 60 ore di sviluppo (*ptf1a*:DsRed in rosso). La larva è posta lateralmente con la testa a destra.

3.1.3 Trattamenti con sostanze teratogene

Embrioni transgenici *ptf1a*:DsRed e *ptf1a*:GFP sono stati sottoposti a trattamenti con specifiche sostanze chimiche che fungono da inibitori di alcune delle vie di segnale che cooperano per il corretto sviluppo di un organismo. In questo modo si è potuto da un lato valutare se le linee transgeniche prodotte rispondono a determinate sostanze esattamente come è documentato in letteratura e se quindi costituiscono un valido modello per studiare l'organogenesi pancreatica; dall'altro testare l'effetto di sostanze chimiche per cui non è ancora stata verificata l'azione sull'organogenesi pancreatica esocrina. In primo luogo embrioni

transgenici *ptf1a* sono stati trattati con il DAPT che inibisce l'attività della γ -secretasi, necessaria per la produzione del dominio intracellulare di Notch, bloccando in questo modo la via di segnale Delta–Notch (Geling et al., 2002). Applicando DAPT a 24 ore di sviluppo e andando ad osservare il pancreas esocrino a quattro giorni si è potuta osservare una netta diminuzione di sviluppo nei trattati rispetto ai controlli (**Figura 18**); in accordo con i dati di letteratura.

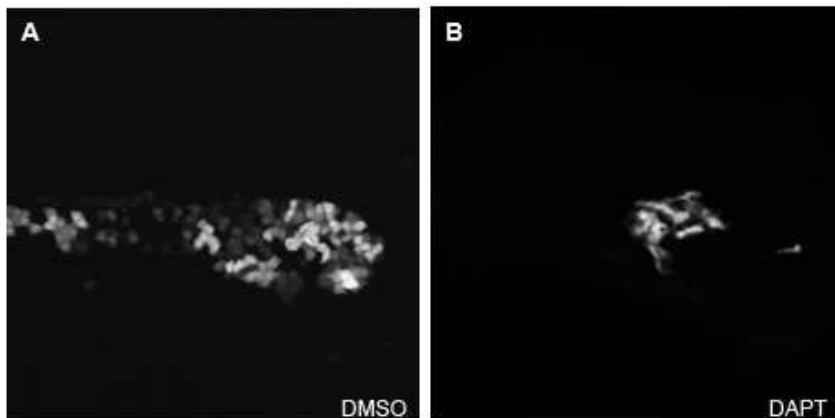


Figura 18: immagine al microscopio confocale raffigurante il pancreas esocrino di larve *ptf1a*:DsRed trattate con DAPT (a destra) e i rispettivi controlli trattati con la medesima concentrazione di DMSO (a sinistra). Nella foto di destra si può notare che il pancreas esocrino è notevolmente ridotto rispetto a quanto si osserva nei controlli.

Embrioni *ptf1a*:DsRed sono stati trattati con SU5402 a partire dalle 30 ore di sviluppo e a quattro giorni di sviluppo non presentavano alcuna fluorescenza nel pancreas esocrino (**Figura 19**).

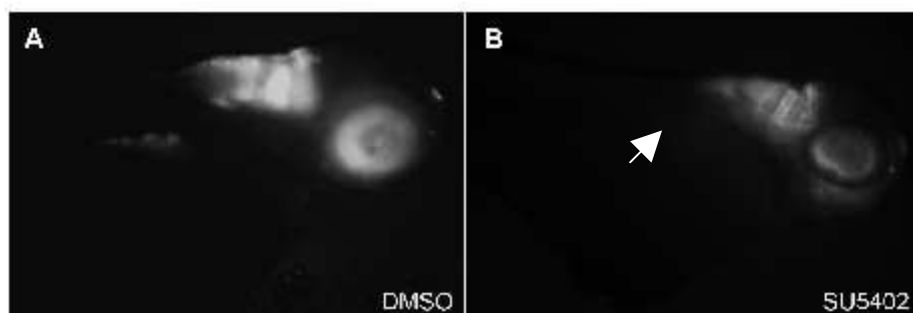


Figura 19: immagine al microscopio a fluorescenza raffigurante larve *ptf1a*:DsRed trattate con SU5402 (A) e i rispettivi controlli trattati con la medesima concentrazione di DMSO (B). la freccia indica la posizione in cui si dovrebbe vedere il pancreas esocrino, assente negli embrioni trattati.

Larve transgeniche sono state poi trattate con Li^+ , agonista della via di segnale Wnt/ β -catenina e antagonista della via Wnt/ Ca^{2+} non canonica, a partire dalle 30 ore di sviluppo. Andando a fissare e ad osservare queste larve a 3 giorni di sviluppo si è potuto notare che nei trattati la porzione pancreatica esocrina presenta una differente organizzazione spaziale rispetto a quanto si osserva nei controlli (trattati con il solo DMSO) e che normalmente si riscontra nelle larve non trattate (**Figura 20**).

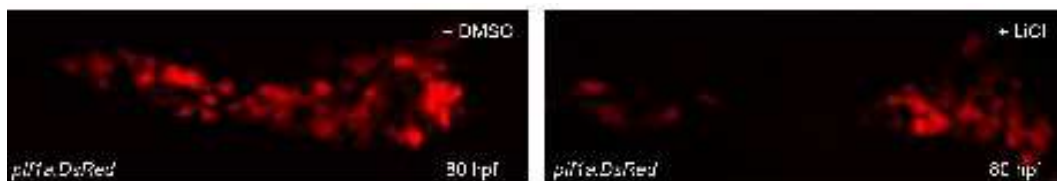


Figura 20: immagine al microscopio confocale raffigurante il pancreas esocrino di larve *ptf1a:DsRed* trattate con litio cloruro 0,3 M (a destra) e i rispettivi controlli (a sinistra). Nella foto di destra si può notare come la struttura del pancreas esocrino appaia disorganizzata rispetto a quanto si osserva nei controlli.

Il risultato ottenuto suggerisce che il trattamento con questa sostanza chimica, agendo sulla via di segnale Wnt, provochi negli embrioni problemi di migrazione delle cellule degli acini.

Sono stati fatti anche trattamenti con Acido Retinoico e con DEAB, l'inibitore competitivo delle retinaldeide deidrogenasi (*Raldh*), enzimi chiave della biosintesi dell'acido retinoico stesso (Begemann et al., 2001). L'applicazione di DEAB a 30 ore di sviluppo non ha però gli effetti drastici (**Figura 21 C-D**) provocati dalla mutazione nello stesso enzima osservati nei mutanti *neckless* e nella mutazione OG062 (**paragrafo 3.3**) da noi identificata. Infatti, le larve trattate a quattro giorni di sviluppo presentavano solo una lieve diminuzione del pancreas esocrino rispetto ai controlli. Un'aggiunta di acido retinoico esogeno a larve di 30 ore di sviluppo provoca una minore estensione in senso antero-posteriore del pancreas esocrino rispetto ai controlli (**A e B di Figura 21**)

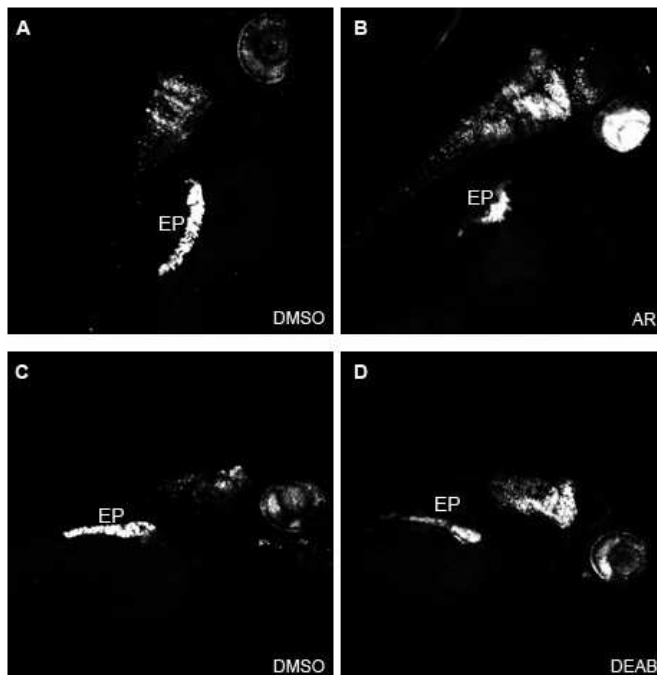


Figura 21: immagini al microscopio confocale di larve di quattro giorni *pfl1a:DsRed* trattate con acido retinoico (B), e rispettivi controlli (A); larve trattate con DEAB (D) e rispettivi controlli. Il lato anteriore è a destra. EP= pancreas esocrico.

Zebrafish transgenici trattati dalle 30 ore di sviluppo con la sostanza chimica SB431542, antagonista dei recettori di tipo I delle activine (membri della superfamiglia TGF- β) (Harrison et al., 2005) ed osservati a quattro giorni, presentavano un pancreas esocrico di estensione ridotta e posto più anteriormente rispetto ai controlli. Tuttavia, appariva conservata la classica organizzazione morfologica testa-corpo-coda (**Figura 22**).

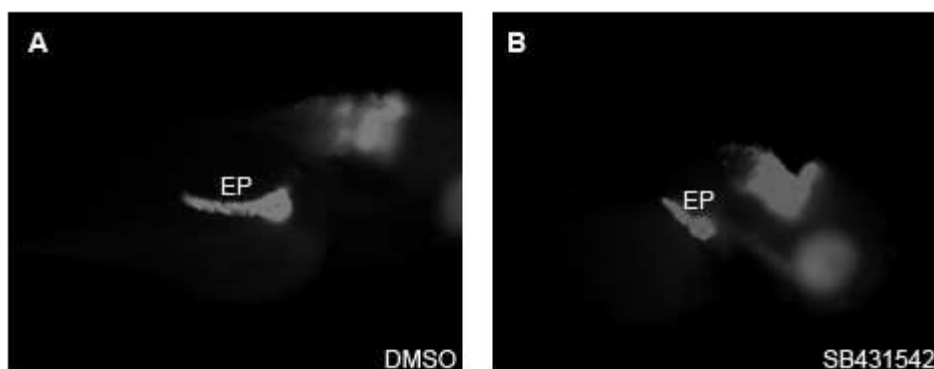


Figura 22: immagini al microscopio a fluorescenza di larve di zebrafish di quattro giorni trattati con SB a partire dalle 30 ore di sviluppo(B) e rispettivi controlli trattati con DMSO(A). Nei trattati con SB l'estensione del pancreas appare ridotta e spostata anteriormente rispetto ai controlli, pur mantenendo la stessa organizzazione morfologica testa-corpo-coda.

3.2 Creazione della linea transgenica

ptf1a(2,6):GFP

Una volta verificato che 5,5 chilobasi di promotore comprendevano tutti gli elementi necessari per guidare l'espressione di proteine reporter nei siti in cui è espresso il gene *ptf1a*, la sottoscritta ha voluto indagare quale fosse la porzione promotoriale minima in grado di indurre una proteina fluorescente nell'abbozzo del pancreas esocrino. Poiché era stato osservato che in embrioni morfanti per il gene *ptf1a* si poteva osservare un'espressione transiente dello stesso gene a 36 ore di sviluppo, che scompariva a stadi di sviluppo successivi (Zecchin et al., 2004) è stata avanzata l'ipotesi che l'espressione di *ptf1a* venisse inizialmente indotta e che poi fosse la stessa proteina codificata da *ptf1a* ad autostimolare la produzione del messaggero, legandosi alle sequenze consenso presenti a -3067 e a -3604 nella regione regolatrice a monte. Durante questo lavoro sono state perciò clonate, sempre utilizzando il sistema Tol 2, 2,6 kilobasi di regione promotoriale a monte della sequenza codificante *ptf1a*. Per 12 delle larve microiniettate con il costrutto prodotto è stata analizzata al microscopio a fluorescenza la progenie, identificando così un fondatore transgenico che però presentava un'espressione ubiquitaria della proteina fluorescente verde. la sottoscritta non è riuscita a documentare alcuna espressione della GFP a livello dell'abbozzo pancreatico antero-ventrale.

3.3 Identificazione e caratterizzazione del nuovo mutante di zebrafish OG062

In questa sezione di risultati viene descritto come è stato caratterizzato un mutante di zebrafish identificato durante il periodo di analisi su larga scala cui ha preso parte la sottoscritta, ed altri due colleghi del laboratorio, presso l'Istituto Max Planck di Tuebingen (Germania).

A Tuebingen avevamo a disposizione larve di zebrafish, appartenenti alla generazione F3, i cui capostipiti erano maschi trattati con il mutagene chimico etilnitrosourea (ENU). Queste larve venivano sottoposte settimanalmente a saggi di ibridazione *in situ in toto* ed analizzate dopo la colorazione. Lo scopo era identificare difetti al pancreas endocrino mediante l'impiego di sonde ad RNA antisenso per rilevare il messaggero dell' *insulina*. Tra le varie famiglie di zebrafish sottoposte ad analisi, è stata identificata la famiglia OG062 in cui un quarto delle larve appartenenti alla generazione F3 presentavano completa assenza del marcatore *insulina* (**Figura 23**). Dopo aver incrociato nuovamente la coppia di pesci portatori di questo difetto, in modo da riconfermare il dato ottenuto, i pesci portatori della mutazione sono stati incrociati con altri di tipo selvatico appartenenti al ceppo TUE, (lo stesso in cui è stata effettuata la mutagenesi) allo scopo di mantenere questa linea di pesci, e al ceppo WIK (polimorfico rispetto al ceppo in cui è stata fatta la mutagenesi) per raccogliere embrioni da utilizzare per la mappatura della mutazione.

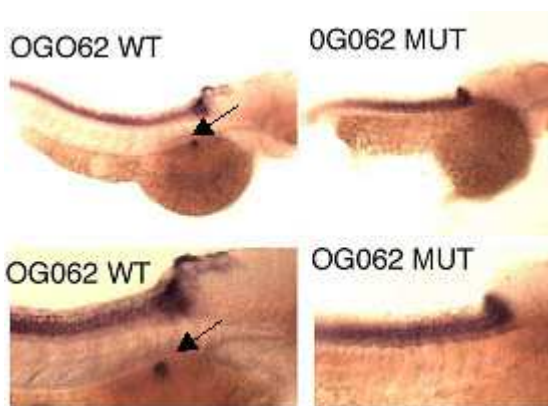


Figura 23: Immagini di larve di zebrafish di 3 giorni, acquisite dopo ibridazioni *in situ* con il marcatore *gfap* per gli astrociti (che in questo caso funge da indicatore) e il marcatore *insulina* per l'isola pancreaticca. Sulla sinistra è raffigurata, a differenti ingrandimenti, una larva con fenotipo selvatico, in cui il marcatore *insulina* è indicato dalla freccia nera; sulla destra è raffigurato un embrione con fenotipo mutato in cui il messaggero per l'*insulina* è completamente assente

L'assenza del marcatore insulina potrebbe essere causata da difetti in geni o vie di segnale che intervengono a differenti livelli di sviluppo di zebrafish. Si potrebbe trattare di un problema a monte rispetto alla formazione del pancreas e riguardare la specificazione dell'endoderma in cui sono coinvolte la via di segnale *nodal* e i geni *foxa*, *mixer*, *gata5*, *sox32*, *sox17* etc.; di una difettiva regionalizzazione antero-posteriore dell'endoderma a cui concorrono le vie di segnale dell'acido retinoico, BMP ed FGF e geni quali *hex*, *hox*, *pdx1*. Potrebbe essere anche un problema riguardante la formazione dei precursori endocrini, e quindi la via di segnale *Sonic Hedgehog* e *Notch* e i geni *pdx1*, *hb9*, *neuroD*, *sox4*. Si può anche trattare di un difetto nel differenziamento endocrino e quindi nella via di segnale *Notch* o in geni come *pdx1*, *hb9*, *insm1*, *nkx2.2*, *pax6*, *islet1*. Per valutare a quale livello di sviluppo si può collocare il difetto responsabile del fenotipo di OG062 sono stati effettuati saggi di ibridazione *in situ* con buona parte dei marcatori citati sopra.

3.3.1 Espressione dei marcatori pancreatici in OG062

Embrioni e larve OG062 omozigoti per la mutazione e i loro fratelli con fenotipo selvatico sono stati fissati a diversi stadi di sviluppo e utilizzati per saggi di ibridazione *in situ* che permettessero di caratterizzare opportunamente il mutante in questione. La mutazione nella famiglia OG062 era stata identificata su larve di 4 giorni e poiché il messaggero codificante per l'*insulina* è rilevabile dallo stadio di 12 somiti, la sottoscritta ha verificato se il marcatore in questione fosse assente anche durante la somitogenesi. Inoltre, la sottoscritta è andata a valutare se nel mutante OG062 mancassero anche altri marcatori del pancreas endocrino, nonché quelli dell'esocrino. Le ibridazioni *in situ* fatte con i marcatori dell'isola pancreatica *glucagone (glu)* e *somatostatina (sst)* e con il marcatore del pancreas esocrino *ptf1a* hanno mostrato che le larve omozigoti per la mutazione OG062 sono prive di tutti questi marcatori (**Figura 24**).

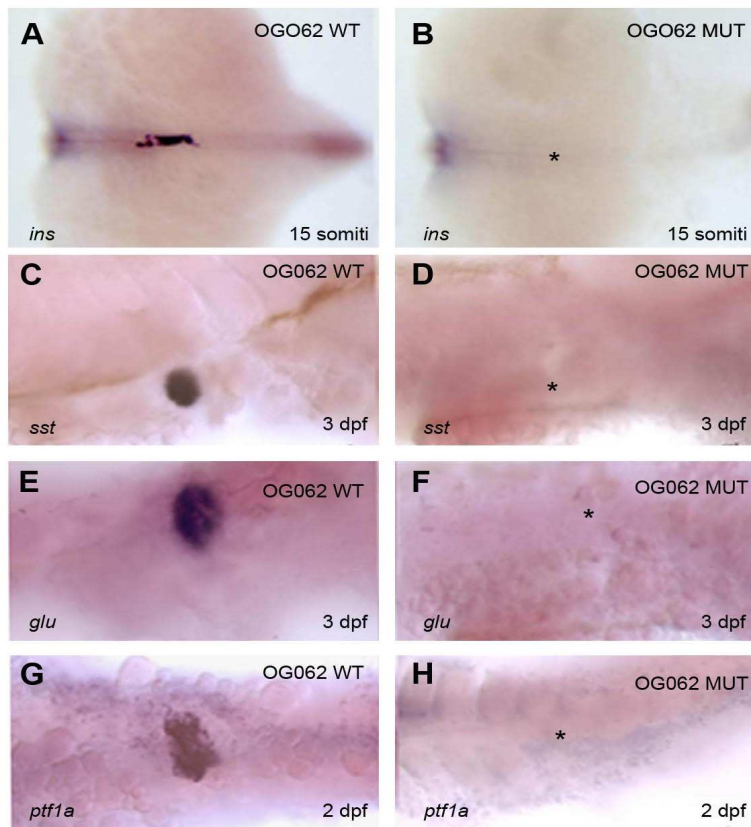


Figura 24: Immagini di ibridazioni *in situ* su zebrafish di 15 somiti (A-B), 2 giorni (G-H) e 3 giorni (C-F) con i marcatori pancreatici insulina (*ins*), somatostatina (*sst*), glucagone (*glu*) e *ptf1a*. Si può notare come negli embrioni omozigoti per la mutazione OG062 non sia stato rilevato nessuno di questi marcatori (B-D-F-H). Gli asterischi indicano la zona in cui dovrebbe essere presente il marcatore preso in considerazione.

3.3.2 Espressione di marcatori dei precursori pancreatici e dell' endoderma in OG062

Una volta visto che OG062 era privo dei marcatori pancreatici endocrini ed esocrini, si è andati a valutare se nel mutante in questione erano espressi marcatori per i precursori pancreatici. Sono state perciò fatte ibridazioni *in situ* impiegando sonde a RNA antisenso per analizzare l'espressione di geni come *pdx1*, *prox1*, quest'ultimo espresso anche nel fegato, e di un marcatore pan-endodermico quale *foxA1*. I risultati di questi esperimenti hanno evidenziato che *pdx1*, allo stadio preso in considerazione, anzichè marcare ambedue gli abbozzi pancreatici, sparisce quasi completamente negli embrioni mutanti. Per quanto riguarda *prox1*, in OG062 non viene rilevata alcuna espressione né a livello pancreatico né a livello del fegato (**Figura 25**). Il marcatore endodermico *foxA1* è espresso anche negli embrioni omozigoti per la mutazione, ma in questi ultimi presenta un profilo di espressione differente,

disorganizzato rispetto a quello normalmente osservato negli embrioni di tipo selvatico.

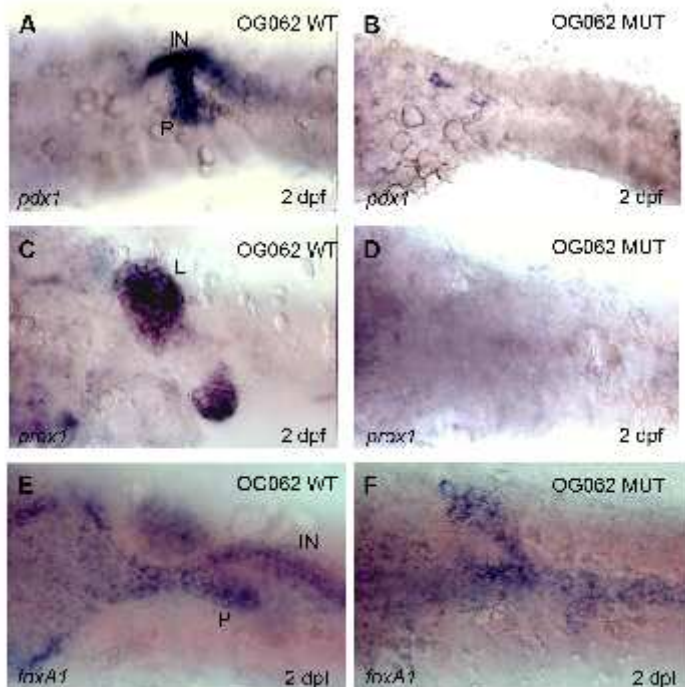


Figura 25: Immagini di ibridazioni *in situ* di larve OG062 con fenotipo selvatico e mutanti con il marcatore dei precursori pancreatici *pdx1*, il marcatore del fegato *prox 1* e *foxA1* che marca l'endoderma. Negli embrioni mutanti sono assenti gli abbozzi pancreatici (in B è assente la porzione pancreatico indicata con P in A). IN=intestino. In OG062 è assente anche il fegato (D, indicato con L in C). l'ibridazione con la sonda *foxA1* ha evidenziato che nei mutanti è assente la porzione pancreatico, ma sono presenti l'intestino (IN) e la porzione anteriore dell'endoderma. Tutte le larve sono in posizione ventrale e la porzione anteriore è a sinistra.

Ulteriori saggi di ibridazione *in situ* sono stati fatti utilizzando il marcatore *islet 1* (pancreas endocrino, neuroni sensitivi, motoneuroni RoP e MiP, interneuroni d3) ed il marcatore *hlxb9(hb9)* espresso nel midollo spinale oltre che nell'abbozzo pancreatico. Per entrambi questi geni è stata osservata una totale assenza di espressione nel dominio pancreatico in tutti gli embrioni omozigoti per la mutazione, mentre il profilo di espressione a livello del sistema nervoso permane pressoché inalterato (Figura 26).

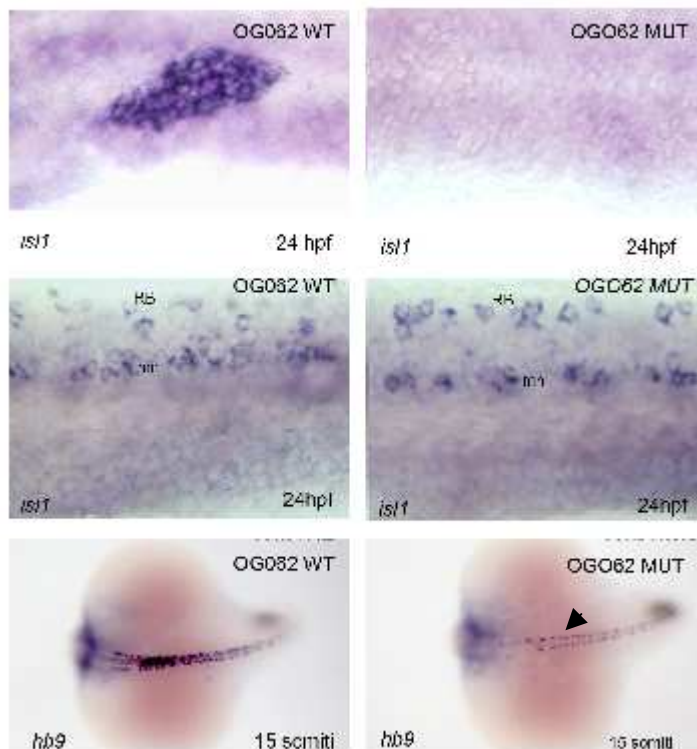


Figura 26: Immagini di ibridazioni *in situ* di larve OG062 con fenotipo selvatico e mutanti con il marcatore *islet1* e *hlxb9* (*hb9*). L'abbozzo pancreatico presente in A è assente nell'embrione mutante (B). Nei motoneuroni (mn) e nei neuroni sensoriali (RB) *islet1* è normalmente espresso in selvatici e mutanti. Anche *hlxb9* è espresso nei motoneuroni, ma non nell'abbozzo pancreatico endocrino (la punta della freccia indica la posizione in cui sarebbe dovuto essere l'abbozzo pancreatico). In A-B gli embrioni sono posti centralmente, in C-D lateralmente e in E-F dorsalmente. La porzione anteriore è sempre a sinistra.

La sottoscritta ha poi valutato il profilo di espressione del marcatore dei precursori endodermici *sox 17* per vedere se la mutazione responsabile del fenotipo osservato negli embrioni OG062 perturbasse la specificazione dell'endoderma. Per questo gene si è osservato un identico profilo di espressione in embrioni con fenotipo selvatico ed omozigoti per la mutazione. Questo risultato indica che la mutazione in questione riguarda geni o vie di segnale che agiscono a valle della specificazione dell'endoderma.

3.3.3 Difetti morfologici di OG062

Gli embrioni OG062 omozigoti per la mutazione sono indistinguibili dai fratelli eterozigoti o selvatici fino a 32 hpf, dopo questo stadio di sviluppo iniziano a presentare difetti morfologici facilmente osservabili quali riduzione della distanza tra vescicola otica e primo somite (**Figura 27**), edema pericardico e assenza di pinne pettorali; la circolazione sanguigna appare rallentata. Le larve omozigoti per questa mutazione sono immobili e muoiono al quinto giorno di sviluppo.

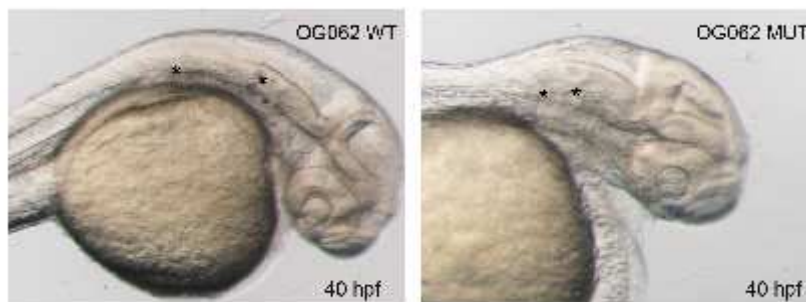


Figura 27: Larve di zebrafish di 40hpf omozigoti per la mutazione (a destra) e fratello con fenotipo selvatico (a sinistra). Si può vedere come nell'embrione mutante la distanza tra vescicola otica e primo somite (rappresentata dallo spazio tra i due asterischi) sia notevolmente ridotta.

3.3.4 Mappatura di OG062

In collaborazione con il Prof. Dirk Meyer dell'Università di Innsbruck è stata mappata la mutazione OG062. I pesci ottenuti dall'incrocio OG062 (pesce eterozigote per l'allele mutato) x WIK sono stati cresciuti e incrociati tra loro. I pesci portatori della mutazione, che segrega come carattere mendeliano autosomico recessivo, come tutte le altre identificate durante l'analisi, così identificati sono stati accoppiati frequentemente al fine di ottenere grandi quantità di embrioni con fenotipo mutato e selvatico da utilizzare per la mappatura. Da questi embrioni è stato estratto il DNA genomico da utilizzare per SSLP-PCR. Queste analisi hanno rivelato la presenza di linkage con la mutazione per i marcatori Z1206, Z4706 e Z13880. L'analisi effettuata su 21 embrioni singoli ha confermato che la mutazione in questione mappa sul cromosoma 7. Le PCR da singolo embrione hanno rivelato che la mutazione responsabile

del fenotipo osservato in OG062 si trova tra il marcatore Z4706 (marcatore prossimale, che si trova a 37,5 cM dall'estremità superiore) e il marcatore Z13880 (marcatore distale posto a 83,7 cM).

Per verificare se anche la mutazione OG062 fosse a carico del gene *raldh2*, come avviene per il mutante *neckless* (*nls*¹²⁶, Begemann *et al.*, 2001) è stato fatto un incrocio di complementazione tra i due mutanti. Il risultato di tale incrocio sono stati 75 embrioni di cui 18 mostravano il tipico fenotipo *neckless* con assenza delle pinne pettorali, regione pericardica allargata e ridotta distanza tra vescicola otica e primo somite. Questo risultato ha suggerito che la mutazione OG062 rappresentasse un nuovo allele di *neckless*.

Per valutare dove si trovasse la mutazione responsabile del fenotipo osservato in OG062 nella regione di DNA codificante per l'enzima *raldh2*, è stato isolato l'mRNA proveniente da embrioni OG062 con fenotipo mutato e normale, e retrotrascritto a cDNA. Utilizzando opportuni oligonucleotidi è stata amplificata la regione codificante l'enzima Raldh2 (1556 pb). Il sequenziamento della porzione 5' ha rivelato che nel mutante c'era una delezione dell'esone 2. Un'ulteriore amplificazione e sequenziamento da DNA genomico dell'esone 2 ha rivelato la presenza di una mutazione puntiforme a livello nella porzione 3' del sito di splicing. Questa mutazione causa uno splicing difettivo che induce la formazione di una proteina tronca.

3.4 Identificazione di mutanti di zebrafish aventi difetti gliali

Durante il periodo trascorso presso l'Istituto di ricerca Max Planck di Tuebingen sono state identificate alcune famiglie di zebrafish aventi difetti gliali, rilevati mediante ibridazione *in situ* con il marcatore astrocitario *gfap*. Sono state inizialmente identificate 17 famiglie di zebrafish, mutagenizzate con ENU nelle quali l'espressione del marcatore utilizzato presentava anomalie quali:

- Diminuzione

- Aumento
- Disorganizzazione o espressione in sede ectopica

Attualmente sono presenti nei nostri acquari 9 delle famiglie inizialmente identificate. Le rimanenti sono state eliminate poiché la mutazione non è stata riconfermata mediante incroci tra individui della generazione F3.

Famiglia	Difetto osservato	Pesci allevati negli acquari
NVO29	<i>gfap</i> ridotta	Femmina fondatrice, 2 portatori(1WIK,1TUE), incroci WIK e TUE
NZ170	<i>gfap</i> ridotta	Femmina fondatrice, incroci WIK
QC019	<i>gfap</i> ridotta	2 portatori TUE, 1 portatore WIK, incroci WIK e TUE
PQ100	<i>gfap</i> aumentata	Maschio fondatore, incroci WIK e TUE
QN102	<i>gfap</i> aumentata	Incroci WIK e TUE
NZ164	<i>gfap</i> aumentata	Femmina fondatrice incroci WIK e TUE
NS066	<i>gfap</i> aumentata	Femmina fondatrice, 1 portatore WIK, incroci TUE
OJ022	<i>gfap</i> disorganizzata	2 portatori WIK, incroci WIK e TUE
NZ084	<i>gfap</i> ridotta	4 femmine portatrici WIK, incroci WIK

Tabella 3: In questa tabella sono elencate le famiglie di zebrafish mutanti identificate durante il periodo di analisi effettuato presso l'istituto Max Planck di Tuebingen che sono attualmente allevate nel nostro laboratorio. Le linee con mutazioni non ancora riconfermate sono in rosso. In giallo sono evidenziate le famiglie per le quali la mappatura è in corso.

Per le famiglie NZ170, PQ100 e QN102 la mutazione deve ancora essere confermata nella generazione successiva di incroci; per poterlo fare è necessario incrociare un maggior numero di individui F3.

Per le famiglie NV029 e QC019 (con diminuzione del marcatore *gfap*) e NZ164 e NS066 (con aumento di *gfap*) la mutazione è stata confermata nella generazione successiva di incroci e una volta raccolti gli embrioni necessari sarà possibile procedere alla determinazione del cromosoma su cui mappano le rispettive mutazioni.

Per le famiglie OJ022 e NZ084 la mutazione è stata inizialmente riconfermata nella generazione F3 di incroci con pesci dei ceppi WIK e TUE. Ed è attualmente in fase di mappatura. Gli eterozigoti identificati sono stati accoppiati a intervalli di una settimana, per ottenere un numero di embrioni mutanti sufficiente ad effettuare una mappatura preliminare (assegnazione cromosomica) della mutazione in esame.

3.4.1 Determinazione del cromosoma su cui mappa la mutazione OJ022

Gli embrioni appartenenti alla famiglia OJ022 analizzati dopo ibridazione *in situ* con il marcatore *gfap* a tre giorni di sviluppo hanno mostrato un'espressione del marcatore aumentata a nella testa e diminuita nel midollo spinale (**Figura 28**). Gli stessi embrioni mostravano una normale espressione dell'insulina, l'altro marcatore impiegato in questa analisi. La progenie dei pesci eterozigoti ottenuti dall'incrocio OJ022 X WIK è stata raccolta e gli embrioni sono stati fatti crescere fino a tre giorni di sviluppo. Raggiunto questo stadio sono stati fissati quelli che presentavano fenotipo alterato (circa ¼ del totale), e che costituivano gli individui omozigoti per la mutazione, separatamente da quelli con fenotipo selvatico. Questa separazione può essere fatta facilmente poiché gli individui omozigoti per questa mutazione a tre giorni di sviluppo mostrano alterazioni morfologiche evidenti, tra cui dimensioni corporee fortemente ridotte e coda arricciata verso il basso; anche la circolazione sanguigna appare seriamente compromessa.

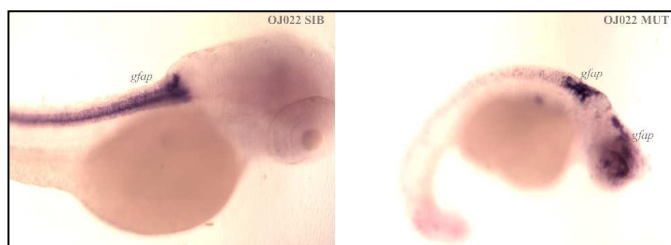


Figura 28: l'embrione mutante OJ022 (a destra) mostra dimensioni del corpo e della testa molto ridotte rispetto al fratello con fenotipo selvatico, e coda arricciata ventralmente. Nella larva mutante il marcatore *gfap* presenta un'espressione disorganizzata rispetto al controllo.

50 embrioni mutanti e 50 fratelli con fenotipo selvatico sono stati inviati a Tuebingen, presso il laboratorio del Prof. Robert Geisler, dove è stata effettuata una prima mappatura, mediante SSLP-PCR, che ha dato informazioni riguardanti il cromosoma su cui mappa la mutazione responsabile del fenotipo osservato in OJ022. Tale mutazione riguarda il cromosoma 8, mappa a 61.2 cM dalla sua estremità superiore ed è in linkage con i marcatori z25335 (61.2 +/- 0.0 cM, assenza di ricombinazione con questo marcatore), z3083 (56.3 cM +/- 1.0 cM) and z21115 (62.3 +/- 2.1 cM).

3.4.2 Determinazione del cromosoma su cui mappa la mutazione NZ084

Il mutante NZ084 è stato identificato perché presentava una ridotta espressione del marcatore astrogliale *gfap* (**Figura 29**). Anche in questo caso, come per OJ022, il marcatore pancreatico insulina era normalmente espresso nelle larve con fenotipo mutato. Anche per questo mutante è stata identificata una coppia di portatori che è stata accoppiata sistematicamente per raccogliere embrioni ai fini della mappatura. Le larve omozigoti per la mutazione riscontrata in NZ084 sono riconoscibili dai fratelli eterozigoti o selvatici perché presentano un corpo leggermente accorciato e dimensioni della testa ridotte; queste larve presentano normale motilità e muoiono a 7 giorni di sviluppo.

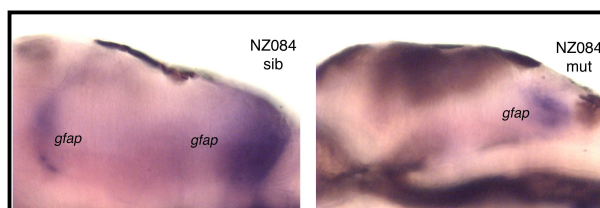


Figura 29: Immagine raffigurante l'espressione del marcatore *gfap* nella testa di un embrione mutante appartenente alla famiglia NZ084 (a destra) e del fratello con fenotipo selvatico (a sinistra). Nel mutante l'espressione della *gfap* appare notevolmente ridotta rispetto al controllo.

Anche in questo caso la sottoscritta ha mandato al Prof. Geisler 50 embrioni con fenotipo selvatico ed altrettanti omozigoti per la mutazione in questione. Dalle analisi dei dati ottenuti dalle PCR con i marcatori SSLP per i 25 cromosomi di zebrafish è emerso che tale mutazione mappa 85.7 cM dall'estremità superiore del cromosoma 4, in linkage con i marcatori z984 (75.8 +/- 9.9 cM dall'estremità superiore), z21636 (42.6 cM +/- 36.7 cM dall'estremità superiore) and z6503 (60.1 +/- 23.5 cM dall'estremità superiore). Non è stato identificato alcun marcatore "sud" per tale mutazione, pertanto è necessario approfondire l'analisi utilizzando un maggior numero di embrioni mutanti.

4. DISCUSSIONE

Durante questo periodo di Dottorato il mio primo obiettivo è stato quello di produrre un modello che permettesse di studiare *in vivo* lo sviluppo del pancreas esocrino di zebrafish. Poiché *ptf1a* è il primo marcatore dell'abbozzo pancreatico esocrino, si è scelto di studiarne la regione promotoriale per poterne clonare, a monte di una proteina fluorescente, una porzione sufficiente a guidare l'espressione della stessa nel pancreas esocrino. La GFP è la proteina solitamente impiegata nella produzione di linee transgeniche (Amsterdam et al., 1995; Higashijima et al., 2000; Gilmour et al., 2002), ma ne sono presenti molte altre utilizzabili a questo scopo. In questo lavoro sono state realizzate due linee transgeniche stabili di zebrafish: una in cui la proteina GFP è espressa sotto il controllo del promotore di *ptf1a*, e un'altra in cui lo stesso promotore è posto a monte della proteina fluorescente rossa, in modo da poter effettuare incroci con altre linee transgeniche esprimenti indifferentemente la GFP oppure la DsRed.

Una volta creato il modello, questo è stato utilizzato per fare delle scansioni al microscopio confocale che permettessero di monitorare *in vivo* come si sviluppa il pancreas nel corso del tempo. A tale scopo pesci transgenici *ptf1a:GFP* sono stati incrociati con zebrafish appartenenti alla linea transgenica *ins:DsRed*. Questo ha reso possibile documentare *in vivo* come le cellule che esprimono la proteina fluorescente verde sotto la direzione del promotore di *ptf1a* migrano verso destra, partendo dal lato sinistro dell'embrione dove inizialmente si forma l'abbozzo antero-ventrale (Zecchin et al., 2004), fino ad incorporare l'isola. Inoltre, si è osservato come avviene nel tempo l'allungamento in senso antero-posteriore del pancreas esocrino. Era già stato dimostrato mediante ibridazione *in situ* e colorazione immunostochimica (Zecchin et al., 2004; Biemar et al., 2001) che l'isola endocrina è collocata nella testa del pancreas. Field e collaboratori (2003), utilizzando la linea transgenica *gut:GFP*, avevano documentato *in vivo* la formazione degli abbozzi pancreatici dall'epitelio intestinale e il loro convergere a formare un'unica struttura verso le 52 ore di sviluppo. Era inoltre noto anche che il pancreas esocrino di zebrafish, al

terzo giorno di sviluppo, assume una forma a clava allungata e l'isola endocrina è collocata nella testa (Biemar et al., 2001; Lin et al., 2004), nella porzione più anteriore del pancreas esocrino, ma non era ancora stato seguito questo processo nel tempo con l'utilizzo di un doppio transgenico che permettesse di confermarlo direttamente *in vivo*. Osservando al microscopio confocale doppi transgenici *ptf1a:DsRed- nkx2.2:GFP* è stato possibile verificare che a 48 ore di sviluppo sono facilmente visibili le prime cellule *nkx2.2* positive presso il dominio di espressione di *ptf1a*. Questo risultato è in accordo con quanto osservato da Pauls (Pauls et al., 2007) mediante ibridazione *in situ* e scansioni temporali al microscopio confocale. In seguito, procedendo nello sviluppo, si può vedere che le cellule *nkx2.2* positive iniziano ad allungarsi posteriormente assumendo la forma di un dotto. La sottoscritta ha potuto osservare che il dotto intrapancreatico decorre tra le cellule degli acini esocrini senza colocalizzare con esse. Questo fenomeno è ben evidente nei doppi transgenici a 5-7 giorni di sviluppo.

Le linee transgeniche prodotte in questo lavoro sono state impiegate in trattamenti con sostanze teratogene che agiscono come inibitori di importanti vie di segnale che cooperano nello sviluppo di un organismo. Gli effetti dell'inibizione di alcune vie di segnale sullo sviluppo del pancreas esocrino di zebrafish sono già state studiate e pubblicate. In questo lavoro di tesi ho inizialmente trattato gli embrioni fluorescenti di zebrafish con alcune sostanze il cui effetto era già noto; questi esperimenti sono stati condotti per avere conferme di quanto già dimostrato, ed avere quindi la sicurezza di possedere un buon modello per lo studio del pancreas esocrino. E' stato fatto un primo trattamento con DAPT, l'inibitore della γ -secretasi (Gelig et al., 2002) che, impedendo il rilascio delle porzione intracellulare di Notch ne impedisce la traslocazione nel nucleo per andare a modulare l'espressione dei geni bersaglio, in questo modo è possibile bloccare la via di segnale delta-jagged/notch allo stadio di sviluppo desiderato. Applicando il DAPT a 24 ore di sviluppo, ossia quando si è già formato l'abbozzo pancreatico postero-dorsale, ma non sono ancora comparse le prime cellule *ptf1a*-positive, e andando poi ad osservare il pancreas delle larve trattate a quattro giorni di sviluppo, si

può vedere come il pancreas esocrino sia molto ridotto rispetto a ciò che si osserva nei controlli. Questo risultato conferma i dati di letteratura, ricavati dai risultati di saggi di ibridazione *in situ* negli embrioni trattati con DAPT e negli embrioni *mind bomb (mib)* (Yee et al., 2005; Zecchin et al., 2007), mutanti genetici per la via di segnale *delta/notch*.

utilizzando la sostanza chimica SU5402, che va ad inibire l'attività dei recettori FGF (Mohammadi et al., 1997) si è osservato che applicando questo inibitore a 30 ore di sviluppo e andando ad osservare le larve trattate a quattro giorni di sviluppo, queste presentano fluorescenza assente o altamente ridotta a livello nel pancreas esocrino. Questo risultato è in sintonia con lo studio di Manfroid e collaboratori (2007) secondo cui, trattando larve di zebrafish con SU5402 nell'intervallo 24-29 ore di sviluppo, l'espressione di *ptf1a* è assente; facendo invece lo stesso trattamento nell'intervallo 32-36 ore, quando l'abbozzo pancreatico antero-ventrale è già stato specificato, l'espressione di *ptf1a* a tre giorni di sviluppo è presente, ma notevolmente ridotta e circoscritta alla porzione anteriore. Embrioni *ptf1a:GFP* e *ptf1a:DsRed* sono stati poi sottoposti a trattamenti con acido retinoico (AR) e con il DEAB, che ne inibisce la sintesi. Nei mutanti *neckless (nls)* (Begemann et al., 2001), e OG062 (descritto in questa tesi) l'inibizione della biosintesi dell'acido retinoico provoca l'assenza del pancreas sia esocrino che endocrino. I transgenici prodotti in questa tesi hanno presentato un pancreas esocrino di dimensioni ridotte dopo trattamento con acido retinoico esogeno a trenta ore di sviluppo; l'inibizione della sua sintesi, mediante trattamento con DEAB, subito prima della formazione dell'abbozzo pancreatico antero-ventrale non ha invece prodotto effetti molto significativi. Il risultato ottenuto dalla sottoscritta è in accordo con quanto hanno dimostrato Shen e collaboratori (2005), secondo i quali l'applicazione di acido retinoico esogeno ad abbozzi pancreatici di topo in coltura inibisce il differenziamento e la ramificazione degli acini esocrini. Gli scarsi effetti prodotti dal trattamento con DEAB sono probabilmente dovuti al fatto che la presenza di acido retinoico può essere necessaria ai fini dello sviluppo pancreatico a stadi embrionali più precoci rispetto a quello preso in considerazione in questa tesi.

Embrioni di zebrafish di 30 ore di sviluppo sono stati trattati con litio cloruro e osservati a 3 giorni di sviluppo. Questi presentano un pancreas esocrino che perde la sua forma allungata per sdoppiarsi in senso antero-posteriore. Questa sostanza è un noto agonista della via di segnale Wnt canonica (Clement-Lacroix et al., 2005), ed inibitore della via non canonica. E' stato recentemente dimostrato che il *knock down* di geni codificanti per componenti della via di segnale Wnt non canonica, quali *wnt5* ed *fz-2*, mediante utilizzo degli oligonucleotidi morpholino (Kim et al., 2005), provoca un difetto alla migrazione cellulare di cellule insulina-positive. Si potrebbe avanzare l'ipotesi che il litio cloruro, applicato subito prima del differenziamento pancreatico esocrino, causi difetti nella migrazione delle cellule che costituiscono il pancreas esocrino. Alla luce di questo risultato sarebbe interessante trattare larve transgeniche *ins:GFP* con questo stesso agente chimico, ad uno stadio di sviluppo precoce, cioè prima che abbia luogo la specificazione dei tipi cellulari endocrini, in modo da vedere se anche in questo caso il trattamento porta ad uno sdoppiamento dell'isola; oppure effettuare lo stesso trattamento su un doppio transgenico *ptf1a:GFP-ins:DsRed* per poter vedere, contemporaneamente, come vengono compromessi entrambi i compartimenti.

In base a quanto era stato osservato da Zecchin e colleghi (2004) secondo cui in embrioni morfanti per *ptf1a* il messaggero dello stesso è rilevabile, mediante ibridazione *in situ* a 36 ore di sviluppo, ma risulta assente in stadi successivi. Questo induce a pensare che sia lo stesso prodotto proteico di *ptf1a* a stimolare la produzione del proprio messaggero, legandosi alle sequenze consenso rilevate a -3.067 e a -3604 paia di basi a monte del suo ATG. Per verificare questa ipotesi la sottoscritta aveva provato a clonare, a monte della *GFP*, un frammento di regione promotoriale che non comprendesse le sequenze consenso, in modo da poter dimostrare che l'espressione della proteina fluorescente verde viene diretta nel pancreas in una finestra temporale limitata corrispondente al momento in cui *ptf1a* viene inizialmente espresso. La porzione promotoriale utilizzata non si è rivelata sufficiente per ottenere il risultato desiderato; la sottoscritta ha di fatto ottenuto larve transgeniche

con fluorescenza verde ubiquitaria in cui non era distinguibile il pancreas. Una prospettiva futura per la dimostrazione dell'ipotesi fatta potrebbe essere quella di percorrere una strada alternativa operando cicli di mutagenesi sito specifica volti ad eliminare in modo mirato e circoscritto le sequenze consenso sopra citate dalla regione promotoriale di *ptf1a* di 5500 paia di basi precedentemente clonata, andando poi a verificare l'andamento della fluorescenza in embrioni microiniettati.

Durante questo lavoro di tesi la sottoscritta si è occupata di identificare e mantenere famiglie mutanti di zebrafish aventi difetti pancreatici o gliali. Dei difetti identificati il più interessante è stato senza dubbio l'assenza di espressione di insulina rilevata in embrioni appartenenti alla famiglia OG062. Le analisi di mappatura hanno rivelato che la mutazione OG062 interessa il gene *raldh2*, similmente al mutante noto *nlsⁱ²⁶* (*neckless*, Begemann et al., 2001). In *nlsⁱ²⁶* c'è una mutazione missenso della glicina in arginina in posizione 204 collocata in un *loop* della proteina. Diversamente, in OG062 è presente una transizione da T ad A nel sito di *splicing* in posizione 3' dell'esone 2. Questo porta ad una perdita dell'esone 2 causata da slittamento del modulo di lettura all'interno del trascritto. La mutazione identificata in OG062 provoca un fenotipo indistinguibile rispetto a quello osservato in *neckless*. La caratterizzazione fatta mediante ibridazione *in situ* risulta una conferma di quanto dimostrato da Stafford e Prince per gli embrioni *neckless* (2002). Alla luce di questo risultato si rafforza l'ipotesi che ci siano loci genici più suscettibili a mutazioni rispetto ad altri. Infatti, anche per altri geni, e *vhnf1* (un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo di pancreas, fegato e reni di zebrafish, Song et al 2007) è un esempio significativo, sono stati identificati mutanti in più progetti di *screening* condotti su larga scala.

5. BIBLIOGRAFIA

Alexander, J, and Stainier, D.Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol.* 9(20):1147-57.

Amsterdam, A, Lin, S, Hopkins, N. (1995). The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol.* 171(1):123-9.

Argenton, F, Zecchin, E, Bortolussi, M. (1999). Early appearance of pancreatic hormone-expressing cells in the zebrafish embryo. *Mech Dev.* 87(1-2):217-21.

Bastien, J, Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 328:1-16.

Begemann G, Schilling TF, Rauch GJ, Geisler R, Ingham PW. (2001). The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for *raldh2* in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development.* 128(16):3081-94.

Berggren, K, McCaffery, P, Dräger, U, Forehand, C.J. (1999). Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, RALDH-2. *Dev Biol.* 210(2):288-304.

Biemar, F, Argenton, F, Schmidtke, R, Epperlein, S, Peers, B, Driever, W. (2001). Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol.* 230(2):189-203.

Bort, R, Martinez-Barbera, J.P., Beddington, R.S., Zaret, K.S. (2004). Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development.* 131(4):797-806.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5: 207-16.

Chalfie, M, Tu, Y, Euskirchen, G, Ward, W.W, Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263(5148):802-5.

Chen, Y, and Schier, A.F., (2001). The zebrafish Nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature.* 411(6837): 607-10.

Chen, Y, Pan, F.C., Brandes, N, Afelik, S, Sölter, M, Pieler, T. (2004). Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes

endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in *Xenopus*. *Dev Biol.* 271(1):144-60.

Clément-Lacroix, P, Ai, M, Morvan, F, Roman-Roman, S, Vayssière, B, Belleville C, Estrera K, Warman ML, Baron R, Rawadi G. (2005). Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(48):17406-11.

Cockell, M, Stevenson, B.J., Strubin, M, Hagenbüchle, O, Wellauer, P.K. (1989). Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with a transcriptional activator of genes expressed in the acinar pancreas. *Mol Cell Biol.* 9(6):2464-76.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saffig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., et al. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398: 518-22.

Dick, A, Mayr, T, Bauer, H, Meier, A, Hammerschmidt, M. (2000). Cloning and characterization of zebrafish smad2, smad3 and smad4. *Gene.* 246(1-2):69-80.

Dilorio, P.J., Moss, J.B., Sbrogna, J.L., Karlstrom, R.O., Moss L.G. (2002). Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. *Dev Biol.* 1;244(1):75-84

Dougan, S.T., Warga R.M., Kane D.A., Schier, A.F., Talbot, W.S. (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development.* 130(9):1837-51.

Esní, F, Ghosh, B, Biankin, A.V., Lin, J.W., Albert, M.A., Yu, X., MacDonald, R.J., Civin, C.I., Real, F.X., Pack, M.A., Ball, D.W., Leach, S.D. (2004). Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas. *Development.* 131(17):4213-24.

Field, H.A, Dong, P.D., Beis, D, Stainier, D.Y. (2003). Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev Biol.* 261(1):197-208.

Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., Haass, C. (2002). A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* 3, 688-94.

Grandel, H, Lun, K, Rauch, G.J., Rhinn, M, Piotrowski, T, Houart, C, Sordino, P, Küchler, A.M., Schulte-Merker, S, Geisler, R, Holder, N, Wilson, S.W., Brand, M, (2002). Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development.* 129(12):2851-65.

Grunwald, D.J., Streisinger, G. (1992). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet Res.* 59(2):103-16.

Haffter, P, Granato, M, Brand, M, Mullins, M.C., Hammerschmidt, M, Kane, D.A., Odenthal, J, van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M, Vogelsang, E, Beuchle, D, Schach, U, Fabian, C, Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development.* 123:1-36.

Harrison, C. A., Gray, P.C.,Vale, W.W., Robertson, D. M. (2005). Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrin Metab.* 16(2): 73-8

Hebrok, M, Kim, S.K., Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* 12(11):1705-13.

Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997). TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-71.

Heller RS, Dichmann DS, Jensen J, Miller C, Wong G, Madsen OD, Serup P. (2002). Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev Dyn.* 225(3):260-70.

Higashijima, S, Hotta, Y, Okamoto, H. (2000) Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *J Neurosci.* 20(1):206-18.

Horb, M.E., Slack, J.M. (2001). Endoderm specification and differentiation in *Xenopus* embryos. *Dev Biol.* 15;236(2):330-43

Itoh, Y, Kawamata, Y, Harada, M, Kobayashi, M, Fujii, R, Fukusumi, S, Ogi, K, Hosoya, M, Tanaka, Y, Uejima, H, Tanaka, H, Maruyama, M, Satoh, R, Okubo, S, Kizawa, H, Komatsu, H, Matsumura, F, Noguchi, Y, Shinohara, T, Hinuma, S, Fujisawa, Y, Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 422(6928):173-6.

Joore, J, van der Lans, G.B., Lanser, P.H., Vervaart, J.M., Zivkovic, D,Speksnijder, J.E., Kruijer,W. (1994). Effects of retinoic acid on the expression of retinoic acid receptors during zebrafish embryogenesis. *Mech Dev.* 46(2):137-50.

Kawaguchi, Y, Cooper, B, Gannon, M, Ray, M, MacDonald, R.J, Wright, C.V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet.* 32(1):128-34.

Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 8 Suppl 1:S7.

Kawakami, K, Takeda, H, Kawakami, N, Kobayashi, M, Matsuda, N, Mishina, M. (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell.* 7(1):133-44.

Kikuchi, Y, Verkade, H, Reiter, J.F., Kim, C.H., Chitnis, A.B., Kuroiwa, A, Stainier, D.Y. (2004). Notch signaling can regulate endoderm formation in zebrafish. *Dev Dyn.* 229(4):756-62.9

Kim, H.J, Schleiffarth, J.R, Jessurun, J, Sumanas, S, Petryk, A, Lin, S, Ekker, S.C. (2005). Wnt5 signaling in vertebrate pancreas development. *BMC Biol.* 24 (3):23.

Kim, S.K., Melton, D.A. (1998). Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(22):13036-41.

Krapp, A, Knöfler, M, Frutiger, S, Hughes, G.J., Hagenbüchle, O, Wellauer, P.K. (1996). The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J.* 15(16):4317-29.

Krapp, A, Knöfler, M, Ledermann, B, Bürki, K, Berney, C, Zoerkler, N, Hagenbüchle, O, Wellauer, P.K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* 12(23):3752-63

Kumar, M, Jordan, N, Melton, D, Grapin-Botton, A. (2003). Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol.* 259(1):109-22.

Kunwar, P.S., Zimmerman, S, Bennett, J.T., Chen, Y, Whitman, M, Schier, A.F. (2003). Mixer/Bon and FoxH1/Sur have overlapping and divergent roles in Nodal signaling and mesendoderm induction. *Development.* 130(23):5589-99.

Lai, E.C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-73.

Lin JW, Biankin AV, Horb ME, Ghosh B, Prasad NB, Yee NS, Pack MA, Leach SD. (2004). Differential requirement for ptf1a in endocrine and exocrine lineages of developing zebrafish pancreas. *Dev Biol.* 270(2):474-86.

Manfroid, I, Delporte, F, Baudhuin, A, Motte, P, Neumann, C.J, Voz, M.L, Martial, J.A, Peers, B. (2007). Reciprocal endoderm-mesoderm interactions mediated by fgf24 and fgf10 govern pancreas development. *Development*. 134(22):4011-21.

Martin, P.J., Lardeux, V, Lefebvre, P. (2005). The proliferating cell nuclear antigen regulates retinoic acid receptor transcriptional activity through direct protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res.* 33(13):4311-21.

Meng, A, Tang, H, Ong, B.A., Farrell, M.J., Lin, S. (1997). Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(12):6267-72.

Milewski, W.M., Duguay, S.J., Chan, S.J., Steiner, D.F. (1998). Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish. *Endocrinology*. 139(3):1440-9.

Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3.

Mohammadi, M, McMahon, G, Sun, L, Tang, C, Hirth, P, Yeh, B.K., Hubbard, S.R., Schlessinger, J. (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science*. 276(5314):955-60.

Mollard R, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M. (2000). Stage-dependent responses of the developing lung to retinoic acid signaling. *Int J Dev Biol.* 44(5):457-62.

Molotkov, A, Molotkova, N, Duester, G. (2005). Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn.* 232(4):950-7.

Murtaugh, L.C. (2007). Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development*. 134(3):427-38. Review.

Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet.* 21(4):444-8.

Obata, J, Yano, M, Mimura, H, Goto, T, Nakayama, R, Mibu, Y, Oka, C, Kawaichi, M. (2001). p48 subunit of mouse PTF1 binds to RBP-Jkappa/CBF-1, the intracellular mediator of Notch signalling, and is expressed in the neural tube of early stage embryos. *Genes Cells.* 6(4):345-60.

Odenthal, J, Nüsslein-Volhard, C. (1998). fork head domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol.* 208(5):245-58.

Ohlsson, H, Karlsson, K, Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* 12(11):4251-9.

Park, H.C., Kim, C.H., Bae, Y.K., Yeo, S.Y., Kim, S.H., Hong, S.K., Shin, J., Yoo, K.W., Hibi, M., Hirano, T., Miki, N., Chitnis, A.B., Huh, T.L. (2000). Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):279-93.

Pauls, S., Zecchin, E., Tiso, N., Bortolussi, M., Argenton, F. (2007). Function and regulation of zebrafish *nkx2.2a* during development of pancreatic islet and ducts. *Dev Biol.* 304(2):875-90.

Pogoda, H.M., Solnica-Krezel, L., Driever, W., Meyer, D. (2000). The zebrafish forkhead transcription factor FoxH1/Fast1 is a modulator of nodal signaling required for organizer formation. *Curr Biol.* 10(17):1041-9

Poulain, M., Lepage, T. (2002). Mezzo, a paired-like homeobox protein is an immediate target of Nodal signalling and regulates endoderm specification in zebrafish. *Development.* 129(21):4901-14.

Prado, C.L., Pugh-Bernard, A.E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(9):2924-9.

Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67: 687-99.

Reiter JF, Kikuchi Y, Stainier DY. (2001). Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation. *Development.* 128(1):125-35.

Rohr, K.B., Concha, M.L. (2000) Expression of *nk2.1a* during early development of the thyroid gland in zebrafish. (2000) *Mech Dev.* 95(1-2):267-70.

Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 80(3):1021-54. Review.

Roy, S., Qiao, T., Wolff, C., Ingham, P.W. (2001). Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr Biol.* 11(17):1358-63.

Scarpe, C.R. (1992). Two isoforms of retinoic acid receptor alpha expressed during *Xenopus* development respond to retinoic acid. *Mech Dev.* 39(1-2):81-93.

Shen, C.N., Marguerie, A., Chien, C.Y., Dickson, C., Slack, J.M., Tosh, D. (2007). All-trans retinoic acid suppresses exocrine differentiation and branching morphogenesis in the embryonic pancreas. *Differentiation.* 75(1):62-74.

- Sirotkin, H.I., Gates, M.A., Kelly, P.D., Schier, A.F., Talbot, W.S.** (2000). Fast1 is required for the development of dorsal axial structures in zebrafish. *Curr Biol.*10(17):1051-4.
- Solnica-Krezel, L, Schier, A.F., Driever, W.** (1994). Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics.* 136(4):1401-20.
- Song, J, Kim, H.J., Gong, Z, Liu, N.A., Lin, S.** (2007).Vhnf1 acts downstream of Bmp, Fgf, and RA signals to regulate endocrine beta cell development in zebrafish. *Dev Biol.* 303(2):561-75.
- Stafford, D, Hornbruch, A, Mueller, P.R., Prince, V.E.** (2004). A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Dev Genes Evol.* 214(9):432-41.
- Stafford, D, Prince, V.E.** (2002). Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Curr Biol.* 12(14):1215-20.
- Stafford, D, White, R.J., Kinkel, M.D., Linville, A, Schilling, T.F., Prince, V.E.** (2006). Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells. *Development.* 133(5):949-56.
- Stainier, D.Y.** (2002). A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev.* 16(8):893-907. Review.
- Tiso, N, Filippi, A, Pauls, S, Bortolussi, M, Argenton, F.** (2002).BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mech Dev.* 118(1-2):29-37.
- Wallace, K.N., Pack, M.** (2003). Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev Biol.* 255(1):12-29.
- Wallace, K.N., Yusuff, S, Sonntag, J.M., Chin, A.J., Pack, M.** (2001). Zebrafish hhex regulates liver development and digestive organ chirality.*Genesis.* 30(3):141-3.
- Warga, R.M., Nüsslein-Volhard, C.** (1999). Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development* 126: 827-38.
- Warga, R.M.,and Stainier, D.Y.** (2002). The guts of endoderm formation. *Results Probl Cell Differ.* 40:28-47. Review.
- Wells, J.M., and Melton D.A.** (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development.* 127(8): 1563-72.
- Wendik, B, Maier, E, Meyer, D.** (2004). Zebrafish mnx genes in endocrine and exocrine pancreas formation. *Dev Biol.* 268(2):372-83.

Westerfield, M. (1995). The Zebrafish Book-A guide for laboratory use of the zebrafish, *University of Oregon Press*, Eugene, OR.

Wierup, N, Svensson, H, Mulder, H, Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept.* 107(1-3):63-9.

Yee, N.S., Lorent, K, Pack, M. (2005). Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol.* 284(1):84-101.

Zecchin, E, Filippi, A, Biemar, F, Tiso, N, Pauls, S, Ellertsdottir, E, Gnügge, L, Bortolussi, M, Driever, W, Argenton, F. (2007). Distinct delta and jagged genes control sequential segregation of pancreatic cell types from precursor pools in zebrafish. *Dev Biol.* 301(1):192-204.

Zecchin, E, Mavropoulos, A, Devos, N, Filippi, A, Tiso, N, Meyer, D, Peers, B, Bortolussi, M, Argenton, F. (2004). Evolutionary conserved role of ptf1a in the specification of exocrine pancreatic fates. *Dev Biol.* 268(1):174-84.

Zhao, D, McCaffery, P, Ivins, K.J., Neve, R.L., Hogan, P., Chin, W.W., Dräger, U.C. (1996). Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 240(1):15-22.