



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Biologia e Medicina della

Rigenerazione

INDIRIZZO: Endocrinologia Comparata

CICLO XX

LO ZEBRAFISH COME STRUMENTO PER LO STUDIO INTEGRATO DI SEGNALI ENDOCRINI E PARACRINI CHE REGOLANO LE PRIME FASI DELLO SVILUPPO TISSUTALE.

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. (Pierpaolo PARNIGOTTO)

Supervisore : Ch.mo Prof. (Francesco ARGENTON)

Correlatore: Dr.ssa Natascia TISO

Dottorando: Nicola Modena

31 gennaio 2008

INDICE

1. SOMMARIO	1
1. ABSTRACT	3
2. INTRODUZIONE	5
2.1 Il modello di studio: Zebrafish	5
2.2 Lo sviluppo del sistema nervoso centrale in Zebrafish	7
2.3 I fattoti di trascrizione bHLH	9
2.4 I geni <i>Olig</i>	10
2.4.1 <i>Olig1</i> e <i>Olig2</i>	11
2.4.2 <i>Olig3</i> e <i>Olig4</i>	12
2.5 Le vie di segnale	15
2.5.1 Hedgehog	17
2.5.2 Nodal	17
2.5.3 Notch	18
2.5.4 La via di segnale TGF- β e la regolazione dell'ematopoiesi in zebrafish	19
2.6 Analisi microarray del knock-down genico di <i>Olig4</i>	22
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 Abbreviazioni	25
3.2 Zebrafish: stabulazione e mantenimento	26
3.3 Soluzioni utilizzate	27
3.4 Sintesi delle sonde antisense	33
3.5 Ibridazione <i>in situ</i>	35
3.6 Ibridazione singola	35
3.7 Ibridazione doppia	38
3.8 Osservazine degli embrioni al microscopio	38
3.9 Creazione di linee transgeniche	39
3.10 Microiniezione	43
3.11 Gli oligo-Morpholino	45
3.12 Estrazione di DNA dal taglio della coda di zbrafish adulto	47
3.13 Estrazione di DNA da embrioni dopo <i>in situ</i>	48
3.14 Analisi con microarray	49
3.15 Mutanti di zebrafish per il gene <i>olig4</i>	50
3.16 Clonaggio del nuovo membro della famiglia <i>olig</i> : <i>olig3</i>	52
4. RISULTATI	53
4.1 Espressione dei geni <i>olig</i> nello zebrafish adulto	53
4.2 P rofilo di espressione di <i>olig1</i>	54
4.3 Profilo di espressione di <i>olig4</i>	56
4.4 Comparazione di <i>olig4</i> con altri marcatori	57
4.5 Analisi microarray del knock-down genico di <i>olig4</i>	65
4.6 Linea mutante per il gene <i>olig4</i>	73
4.7 Creazione di due linee transgeniche per i geni <i>olig4</i> e <i>olig1</i>	75

4.8	Profilo di espressione di <i>olig3</i>	77
4.9	Studio sul gene <i>moonshine mon</i>	79
5.	DISCUSSIONE	83
6.	BIBLIOGRAFIA	89

1. Sommario.

Lo studio eseguito in questo progetto di ricerca ha avuto come scopo quello di definire in che modo vengano specificati i diversi tipi cellulari durante lo sviluppo del tubo neurale nel pesce zebrafish (*Danio rerio*), un piccolo teleosteo della famiglia dei Ciprinidi utilizzato come organismo modello.

Oggetto dello studio sono stati i geni *Olig*, essenziali per la formazione e il corretto sviluppo di vari tipi cellulari del SNC, quali interneuroni, motoneuroni, oligodendrociti e astrociti, e di una struttura unica nei vertebrati, le creste neurali. Negli amnioti sono noti tre membri *Olig*, mentre in pesci ed anfibi sono stati identificati quattro membri: *olig1*, *olig2*, *olig3* ed *olig4*. In questo studio inoltre, è stata fatta un'analisi microarray per identificare i bersagli molecolari controllati dal fattore trascrizionale *olig4*. Sono così emersi una serie di geni legati all'inattivazione di questo fattore di trascrizione che ci hanno offerto una visione più ampia di quella che potrebbe essere la via regolativa nello sviluppo del SNC e la funzione di *olig4* nel limitare lo sviluppo delle creste neurali. L'utilizzo di un mutante genetico per *olig4* sta ora confermando i risultati precedentemente osservati durante l'analisi microarray; la conferma su alcuni dei geni più interessanti e' giunta da esperimenti di ibridazione *in situ*. E' stato inoltre clonato un altro membro della famiglia *olig* in zebrafish, nominato *olig3* in base a comparazione filogenetica (Bronchain et al., 2007). Dall'analisi del membro *olig3* tramite ibridazione *in situ* è emerso che la somma dei profili d'espressione dei geni *olig3* ed *olig4*, (le sequenze dei quali presentano significativa similarità) ricapitola il profilo d'espressione del gene *Olig3* in topo (ove il membro *Olig4* non è stato tuttora individuato). In seguito al clonaggio di questo nuovo membro, ne è stato esaminato il profilo d'espressione in relazione agli altri membri della famiglia genica e ad alcuni marcatori del tubo neurale. Una volta chiariti i rapporti spaziali di espressione fra i quattro membri della famiglia *olig*, si è potuta effettuare un'analisi basata su trattamenti con inibitori specifici per alcune vie di **segnale paracrino** implicate nello sviluppo del SNC di zebrafish. Tale analisi ha potuto chiarire la regolazione dei diversi membri della famiglia *olig* da parte dei **gradienti morfogenetici** che regolano le prime fasi dello sviluppo.

Un'altra serie di risultati riguarda un lavoro svolto sul gene *moonshine* (*mon*) di zebrafish, che codifica per la proteina Trim33, responsabile dell'ematopoiesi nell'adulto. Il prodotto del gene *mon* in zebrafish è in relazione con vari co-attivatori e co-repressori appartenenti alla via di segnale del **TGF-beta**.

Nel corso di questa ricerca è stato trattato il mutante genetico *moonshine* (allele *tg234*) con una sostanza chimica inibitrice del segnale **TGF-beta** in grado di fenocopiare *in vivo* il mutante genetico per questa importante via di sviluppo. In seguito a tale trattamento, è stato ottenuto un recupero dell'espressione di *gata1* nei precursori delle cellule ematopoietiche di zebrafish, come verificato da esperimenti di ibridazione *in situ*. Questo risultato ha permesso di capire come il gene *mon* sia coinvolto a monte della **via TGF-beta** nel processo emopoietico di zebrafish.

1. Abstract.

Studies performed in this research are aimed to define how different cell types are specified during neural development of the model organism zebrafish (*Danio rerio*), a little teleost fish of Cyprinid family.

Investigations involved the analysis of *Olig* genes, a family of transcriptional factors important for development and determination of different cell types of CNS (Central Nervous System), such as interneurons, motoneurons, oligodendrocytes, astrocytes, and neural crest cells, a structure that is unique of vertebrates.

Phylogenetic comparisons (Bronchain et al., 2007) identified three *Olig* members in amniotes, while in fishes and amphibians four members were isolated: *olig1*, *olig2*, *olig3* and *olig4*.

Moreover, this project dealt with a microarray analysis to identify molecular targets controlled by the transcriptional factor *olig4*. So, this led to the identification of a group of genes related to the inactivation of this transcriptional factor that offered a wide image on possible regulatory patterns involved in CNS development, and on possible *olig4* function in limiting neural crest development. The availability of an *olig4* genetic mutant is now confirming results already observed during microarray analysis and further evidences are coming from *in situ* hybridization staining using a group of target genes.

An additional member of the *olig* family has been cloned in zebrafish and it has been named *olig3* on the basis of phylogenetic comparisons (Bronchain et al., 2007). In zebrafish, *olig3 in situ* hybridization staining analysis revealed that expression patterns of *olig3* and *olig4* (which sequences show a high level of similarity), together correspond to the expression pattern of murine *Olig3* (an homologue of *olig4* in mouse has not yet been identified).

In this study, the zebrafish *olig3* gene has been cloned and its expression pattern compared with that of some neural tube markers and other members of the *olig* family, to elucidate inter-reciprocal position of expression domains.

Analysis have been performed based on treatments with specific inhibitors of some paracrine signaling pathways involved in zebrafish CNS development. This

analysis allowed focusing on regulatory pathways of *olig* family members controlled by morphogenetic gradients during early embryonic development.

Furthermore, this research project involved a study on zebrafish *moonshine* (*mon*) gene. This gene codifies for Trimm33, a protein implicated in adult hematopoiesis. Zebrafish *mon* gene product is related to different co-activators and co-repressors of the TGF- β signaling pathway.

In this study, genetic *moonshine* mutants (*mon*^{tg234}) were treated with an artificial inhibitor of TGF- β signaling pathway that allows reproducing *in vivo* the phenotype of genetic mutants for this important signaling pathway. The effect obtained after the treatment showed in zebrafish a restored expression of haematopoietic precursor markers such as *gata1* and this was confirmed through *in situ* hybridization staining. Results added insight on *mon* involvement upstream TGF- β signals in zebrafish haematopoietic pathway.

2. Introduzione.

2.1 Il modello di studio: Zebrafish.

Zebrafish, *Danio rerio*, è un piccolo pesce tropicale (lungo circa 3-5 cm) appartenente alla famiglia dei Ciprinidi, originario del fiume Gange, nella regione del nord-est dell'India (Fig. 2.1).

Questo organismo, dalla scoperta delle sue peculiari caratteristiche biologiche, si è rivelato estremamente adeguato come modello in numerosi studi di genetica e biologia molecolare dello sviluppo dei vertebrati (Grunwald e Eisen, 2002). Le ridotte dimensioni e le esigenze alimentari di questo piccolo teleosteo lo rendono molto più versatile rispetto al topo, permettendo il mantenimento di molti individui in spazi ristretti. Inoltre, la facilità di accoppiamento in laboratorio e la grande quantità di uova che una femmina può deporre (circa 100-200 ad ogni evento riproduttivo) facilitano la conduzione di analisi genetiche su larga scala. La fecondazione esterna e la completa trasparenza dell'uovo avvolto dal corion consentono, infatti, di osservare tutti gli stadi dello sviluppo embrionale e di seguire, mediante opportuni marcatori, i diversi destini cellulari o di monitorare ad ogni stadio l'espressione di specifici geni. Inoltre lo sviluppo embrionale è rapido e dopo 24 ore dall'evento di fecondazione si possono osservare formate tutte le principali caratteristiche del piano corporeo di un vertebrato.



Figura 2.1: Esempari adulti di *Danio rerio*

I vantaggi che zebrafish offre comprendono la possibilità di manipolare facilmente le uova e gli embrioni, consentendo esperimenti di trapianto, di ablazione cellulare oltre che di microiniezione di acidi nucleici, tecnica, quest'ultima, mediante la quale ad esempio, si può ottenere il silenziamento genico tramite l'iniezione di oligo antisense.

La trasparenza dell'embrione, che può anche essere mantenuta artificialmente tramite aggiunta di fenil-tiourea (PTU), inibitore della sintesi di melanina, nell'acqua di coltura degli embrioni, agevola l'analisi di linee transgeniche stabili in cui il messaggero di proteine fluorescenti (quali le proteine fluorescenti verde GFP o rossa RFP) può essere espresso sotto il controllo del promotore di un gene d'interesse.

Inoltre, l'importanza di zebrafish come organismo riguarda la possibilità di identificare nuovi geni attraverso l'utilizzo della mutagenesi chimica. In questo modo, sono state identificate e descritte (Walker e Streisinger, 1983; Kimmel, 1993; Driever et al., 1996) centinaia di mutazioni che hanno fornito modelli per la comprensione dei principali meccanismi dello sviluppo, inclusi quelli che stabiliscono la forma dell'embrione, quelli che definiscono l'organizzazione di distinte regioni del cervello e quelli che permettono la stabilizzazione di determinati circuiti neurali. E' stato possibile indagare anche la relazione tra cambiamenti nel singolo gene e adattamenti strutturali che avvengono durante il corso dell'evoluzione, così come i tipi di cambiamenti nella funzione dei geni che accompagnano l'evoluzione di famiglie multigeniche. Molti geni scoperti in questa specie sono evolutivamente conservati e possiedono omologhi nei mammiferi, incluso l'uomo. La profonda similarità molecolare dei meccanismi dello sviluppo si accompagna ad una elevata percentuale di sintenia (ossia conservazione della posizione dei geni nei cromosomi) recentemente riscontrata tra mammiferi e *Danio rerio* (nell'ordine del 70-80%).

2.2 Lo sviluppo del sistema nervoso centrale di zebrafish.

In zebrafish, il sistema nervoso centrale (SNC) si origina a partire dalla piastra neurale, un epitelio di derivazione ectodermica che si forma sul lato dorsale dell'embrione a circa sei ore dalla fecondazione. La piastra neurale è costituita da ectoderma neurale che darà origine al tubo neurale vero e proprio, fiancheggiato da entrambi i lati da ectoderma non-neurale, che darà origine all'epidermide (Fig. 2.2). Al confine tra l'ectoderma neurale e il foglietto epidermico si trovano le cellule delle creste neurali, dalle quali avranno origine diversi tessuti e tipi cellulari tra cui il sistema nervoso periferico, le cartilagini craniofacciali, i melanociti. In queste regioni della piastra neurale, l'espressione differenziale di importanti segnali di sviluppo specifica le caratteristiche e i destini specifici di queste stesse regioni e dei territori adiacenti.

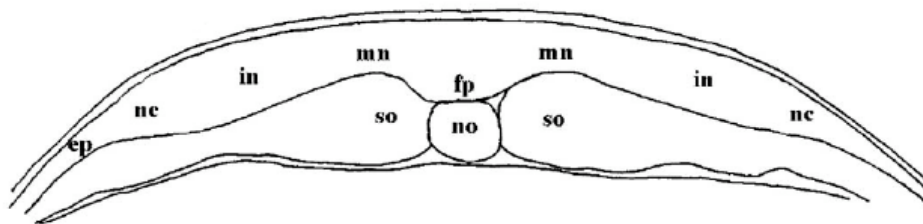


Figura 2.2: sezione trasversale a livello del tronco della piastra neurale di un embrione di zebrafish. Ep: epidermide; nc: creste neurali; in: interneuroni; mn: motoneuroni; fp: floor plate (lamina del pavimento); no: notocorda; so: somiti. (Lewis e Eisen, 2003).

Proseguendo nello sviluppo, durante la fase di neurulazione, la piastra neurale va incontro a movimenti di convergenza che portano alla formazione del tubo neurale il quale, successivamente, darà origine anteriormente al cervello e posteriormente al midollo spinale (Fig. 2.3). Questa convergenza porterà quindi le porzioni laterali della piastra neurale a diventare le regioni dorsali del SNC, mentre le porzioni mediali formeranno il SNC ventrale.

In senso antero-posteriore, il tubo neurale è fiancheggiato dai somiti, strutture metameriche derivate dal mesoderma parassiale dalle quali si originano i muscoli;

il mesoderma assiale dà invece origine alla notocorda, che decorre ventralmente al tubo neurale fino all'estremità della coda.

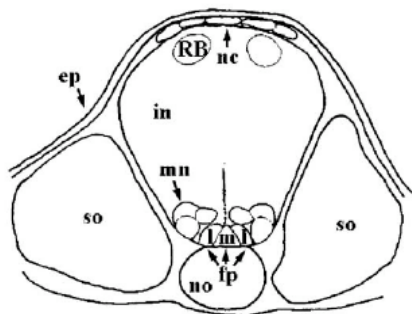


Figura 2.3: sezione trasversale della regione del tronco di un embrione di zebrafish dopo la neurulazione. Ep: epidermide; nc: creste neurali; in: interneuroni; mn: motoneuroni; fp: floor plate (lamina del pavimento), laterale (l) e mediana (m); no: notocorda; so: somiti; RB: cellule di Rohon-Beard. (Lewis and Eisen, 2003).

Le successive fasi dello sviluppo del sistema nervoso di zebrafish riguardano la determinazione dei destini cellulari delle diverse regioni.

Il midollo spinale viene regionalizzato lungo l'asse dorso-ventrale in domini che generano diversi tipi cellulari: ventralmente si vengono a formare i motoneuroni mentre, più dorsalmente, si sviluppano gli interneuroni.

Dalle cellule delle creste neurali, che rimangono dorsali al confine con l'ectoderma dell'epidermide si originano due tipi di neuroni: le cellule di Rohon-Beard (RB, neuroni sensitivi primari dell'embrione e della larva precoce) che, successivamente, migrano nel midollo spinale dorsale. Il secondo tipo di cellule neuronali che si originano dalle creste neurali sono i gangli delle radici dorsali, che migrano ventralmente senza attraversare il tubo neurale.

La regionalizzazione dei diversi tipi cellulari è controllata principalmente da due tipi di segnali: Bone Morphogenetic Protein (BMP) ed Hedgehog (Hh). Un gradiente di fattori dalla lamina del tetto e dalla lamina del pavimento genera zone di competenza nelle quali verranno espressi altri fattori necessari per stabilire diversi destini cellulari (Fig. 2.4). Successivamente entrano in azione componenti della via di segnale Delta/Notch, che agiscono attraverso un meccanismo ad azione locale di determinazione del destino, definito "inibizione laterale".

La via di segnale Delta/Notch è mediata da fattori di trascrizione di tipo basic helix-loop-helix (bHLH), tra i quali sono inclusi membri delle sottofamiglie *Neurogenin* ed *Olig*.

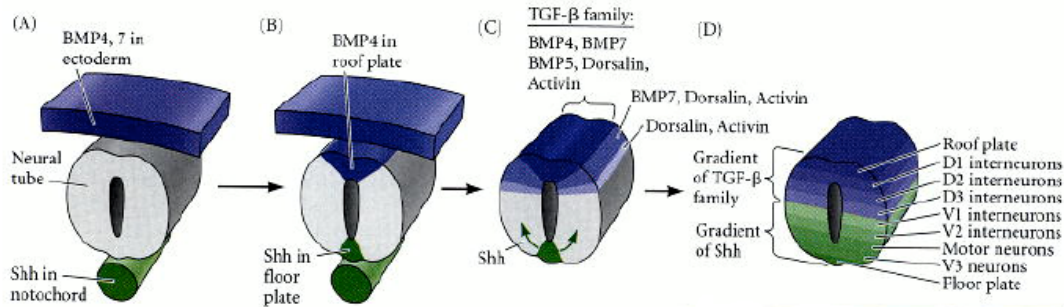


Figura 2.4: specificazione dorso-ventrale (DV) del tubo neurale. Il tetto del tubo neurale è esposto a diversi segnali BMP espressi nell'epidermide, mentre il pavimento è esposto a Sonic Hedgehog espresso nella notocorda. Dalle lamine del tetto e del pavimento si generano gradienti di fattori che determinano a cascata l'espressione di altri fattori; si originano in questo modo dei domini che determineranno le identità dei vari tipi di neuroni. (Gilbert, *Developmental Biology*, 7th edition).

2.3 I fattori di trascrizione bHLH

L'attenzione maggiore di questo lavoro di ricerca è rivolta alla famiglia dei geni *Olig*, che codificano per fattori di trascrizione importanti nella specificazione degli oligodendrociti e di altri tipi cellulari neurali.

Gli oligodendrociti nel sistema nervoso centrale (SNC), come le cellule di Schwann nel periferico (SNP), sono cellule gliali mielinanti altamente specializzate (Bunge, 1968). La mielinizzazione è un processo che richiede l'espressione coordinata di specifiche proteine regolatrici e strutturali, tra cui i fattori di trascrizione codificati dai componenti della famiglia genica *Olig*

Un fattore di trascrizione è, per definizione, una proteina specifica richiesta per l'inizio della trascrizione, ma che non entra a far parte del complesso delle RNA polimerasi. Una degli aspetti più importanti è la presenza di regioni in grado di riconoscere una specifica sequenza di DNA del gene bersaglio della regolazione, regioni cioè di complementarità con quelle della doppia elica, anche se ci sono fattori trascrizionali che possono regolare la trascrizione senza legare il DNA. Nella struttura delle proteine che sono fattori di trascrizione si identificano, infatti, motivi strutturali responsabili del legame con il DNA. Questi motivi sono piuttosto brevi e comprendono solo una piccola parte della struttura della proteina

e, in genere, sono altamente conservati in proteine che svolgono funzione simile o che appartengono alla stessa famiglia.

I membri della famiglia genica *Olig* codificano per proteine caratterizzate da un particolare motivo HLH (Helix-Loop-Helix). Le regioni HLH risultano formate da un tratto di 40-50 aminoacidi contenente due α eliche di lunghezza diversa separate da una regione di collegamento (loop) di lunghezza variabile. Le regioni ad elica sono lunghe 15-16 aminoacidi e in ciascuna di esse vi sono vari residui aminoacidici conservati (Fig. 2.5).

Le proteine *Olig*, in particolare, possiedono dei motivi detti basicHLH (bHLH) in quanto contenenti una regione, adiacente al motivo HLH, caratterizzata da aminoacidi che le conferiscono proprietà basiche tali da consentire il legame con il DNA (che ha invece proprietà acide).

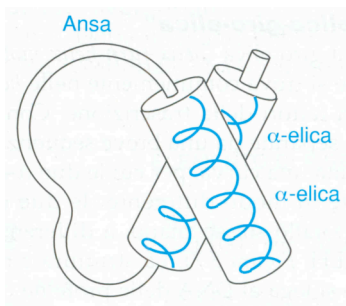


Figura 2.5 Rappresentazione tridimensionale di un fattore HLH.

2.4. I geni *Olig*.

I geni *Olig* codificano per fattori di trascrizione bHLH implicati nella determinazione di svariati sottotipi cellulari nel sistema nervoso centrale dei vertebrati. In particolare, promuovono la formazione e il corretto sviluppo di oligodendrociti, astrociti, motoneuroni e interneuroni, inoltre, essi delimitano i confini tra la piastra neurale e una struttura unica nei vertebrati, le creste neurali.

Negli amnioti la famiglia multigenica *Olig* comprende tre membri, mentre in pesci ed anfibi ne sono stati identificati quattro: *Olig1*, *Olig2*, *Olig3*, *Olig4* (Bronchain et al., 2007).

2.4.1 *olig1* e *olig2*

I geni *Olig1* e *Olig2* sono stati descritti per la prima volta nel topo come fattori di trascrizione di tipo bHLH che promuovono l'oligodendrogenesi e che permangono espressi anche negli oligodendrociti maturi (Lu et al., 2000; Zhou et al., 2000). *Olig1* e *Olig2* presentano un profilo d'espressione simile tra loro negli oligodendrociti del cervello adulto (Lu et al., 2000), in cui marcano il corpo calloso, la regione dell'ippocampo e il cervelletto; nell'embrione sono invece espressi in una regione del tubo neurale ventrale che comprende i precursori degli oligodendrociti, precedendo temporalmente altri marcatori caratteristici di questo tipo cellulare. (Lu et al. 2000; Zhou et al., 2000).

Esperimenti dimostrano che topi knock-out per il gene *Olig1* mostrano ipomielinazione e un ritardo nello sviluppo degli oligodendrociti. Recentemente è stato anche suggerito che *Olig1* possa giocare un ruolo importante nella riparazione di lesioni demielinizzanti del SNC (Arnett et al., 2004). Il gene *Olig2* è coinvolto nella specificazione dei motoneuroni e degli oligodendrociti (Lu et al., 2002; Takebayashi et al., 2002; Zhou e Anderson, 2002), che originano dalla stessa regione del tubo neurale ventrale.

Topi knock-out per il gene *Olig2* mancano interamente del dominio dei precursori degli oligodendrociti nel tubo neurale ma presentano qualche gruppo di precursori nel cervello (che continuano ad esprimere *Olig1*). Questi animali sono inoltre totalmente privi di motoneuroni somatici nel romboencefalo e di motoneuroni somatici e viscerali nella regione toracico-lombare del midollo spinale.

In zebrafish *olig1* è importante nella specificazione degli oligodendrociti e viene considerato un marcatore precoce per gli stessi oligodendrociti in via di differenziamento, in quanto viene espresso già allo stadio di 48 ore (48hpf) (Goris et al 2006). Allo stesso modo, in zebrafish, *olig2* è necessario per lo sviluppo di oligodendrociti e motoneuroni (Park et al., 2002) e viene espresso nella parte ventrale del tubo neurale, dove si originano motoneuroni e oligodendrociti. Embrioni knock-down ottenuti mediante iniezione di oligo morfolino antisenso di *olig2* risultano essere privi di entrambi i suddetti tipi cellulari, mentre la sovraespressione del gene produce come effetto la formazione di motoneuroni ed oligodendrociti in eccesso.

Studi effettuati hanno evidenziato che in zebrafish, come in tutti i vertebrati, l'espressione dei geni *olig1* e *olig2* è regolata dalla via di segnale di Sonic Hedgehog (Lu et al., 2000; Park et al., 2002).

2.4.2 I geni *Olig3* e *Olig4*

olig3 e *olig4* (quest'ultimo precedentemente nominato *olig3* in Filippi et al., 2005) sono i due più recenti membri identificati della famiglia *Olig*.

Olig3 in topo è inizialmente espresso (a partire dallo stadio E9.5) in un'ampia regione dorsale del tubo neurale (in cui è presente il dominio dei precursori degli interneuroni) e co-localizza con marcatori precoci dei tre tipi di interneuroni di classe A (Müller et al., 2005). Temporalmente, il trascritto è evidente nella regione più dorsale del tubo neurale negli stadi più precoci (E9.5-E10.5); col procedere dello sviluppo il trascritto marca tre diverse aree nella regione ventrale, fino a rimanere circoscritto in alcuni gruppi di cellule nella parte ventromediale (E15.5). Allo stadio E14.4 *Olig3* marca anche le cellule gliali del setto mediano dorsale (Ding et al., 2005).

Nel topo sono presenti interneuroni di classe A (dI1, dI2, dI3) e di classe B (dI4, dI5, dI6) disposti in senso dorsoventrale. I marcatori dei precursori e delle cellule post-mitotiche sono indicati in figura 2.6.

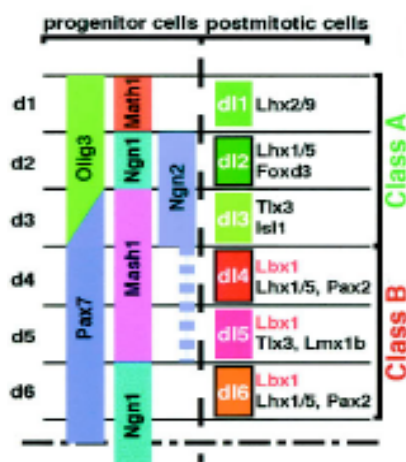


Figura 2.6: rappresentazione schematica dei domini di espressione dei marcatori dei vari sottotipi di interneuroni nei precursori e nei neuroni post-mitotici (Müller et al., 2005).

Topi knock-out per il gene *Olig3* presentano una riduzione dei neuroni dI1 ed una totale assenza di neuroni dI2 e dI3 (Müller et al., 2005).

Olig3 si è visto agisce in modo simile anche nello sviluppo dell'embrione di pollo (Müller et al., 2005).

In zebrafish *olig4* è importante nello stabilire i confini tra la piastra neurale laterale e le creste neurali ed è necessario per lo sviluppo dei tipi cellulari neurali che derivano dal neuroepitelio dorsale, quali interneuroni ed astrociti (Filippi et al., 2005).

L'espressione di *olig4* è rilevabile, a partire dallo stadio denominato di scudo embrionale (shield, 6 hpf), in una striscia di cellule ectodermiche circondanti l'embrione, e in due sottili domini dorsali, in territori presuntivi dell'encefalo e del tubo neurale (Woo e Fraser, 1995). Successivamente, allo stadio di abbozzo caudale (tail bud, 9hpf), marca due domini bilaterali localizzati nella piastra neurale laterale presuntiva, e un gruppo di cellule lungo la linea mediana dell'asse corporeo. Durante gli stadi precoci della somitogenesi, *olig4* è espresso medialmente rispetto a marcatori dell'ectoderma non neurale (es.: *dlx3*) ed è delimitato anteriormente dall'espressione di *krox20* nel rombomero 5; il suo dominio di espressione si sovrappone parzialmente a quello di *neurogenin1* (*ngn1*), che è coinvolto nel differenziamento di particolari interneuroni, motoneuroni e neuroni sensitivi (figura 2.7).

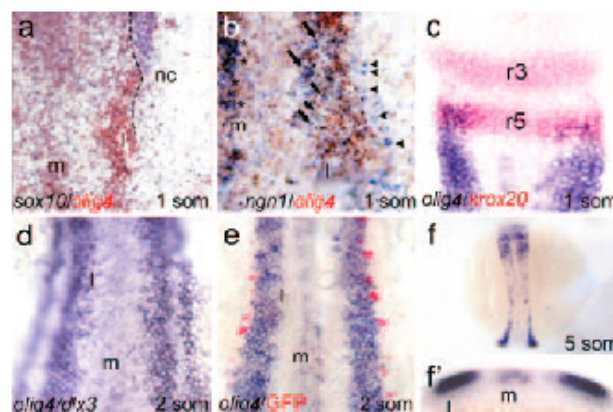


Figura 2.7: profilo di espressione di *olig4* in zebrafish. *olig4* è espresso medialmente al marcatore delle creste neurali *sox10* (a, ingrandimento del lato destro della regione del romboencefalo) e a *dlx3* (d); nel tronco il dominio comprende la regione degli interneuroni che esprimono *ngn1* (b). Il confine anteriore è delimitato da *krox 20* nel rombomero 5 (c); allo stadio di 5 somiti il dominio laterale si è allungato rostro-caudalmente (f, f'). (Filippi et al., 2005).

L'inattivazione di *olig4* mediante iniezione di oligo morfolino antisense causa ritardi nello sviluppo, scarsa motilità ed aumento notevole della pigmentazione (Filippi et al., 2005); quest'ultimo effetto è la conseguenza dell'aumento nel numero delle cellule delle creste neurali da cui si originano anche i melanociti.

Gli embrioni morfanti di *olig4* (embrioni cioè in cui *olig4* è stato inattivato dall'iniezione di morfolino antisense, Fig.2.8) sono privi degli interneuroni *islet1*- e *islet2*-positivi, e dell'astroglia, marcata da *gfap* (*glial fibrillar acidic protein*;

Nielsen e Jorgensen, 2003).

Inoltre, mostrano un numero leggermente ridotto di interneuroni *lim1*-positivi.

Aumentano, invece, le cellule di Rohon-Beard (RB), neuroni sensitivi primari derivati dalle creste neurali.

Olig4 svolge la sua funzione sotto il controllo negativo della via di segnale Notch, necessaria per la specificazione delle cellule delle creste neurali, e si comporta come un tipico gene proneurale in quanto la sua sovraespressione, analogamente a quanto avviene sovraesprimendo i geni proneurali in rana e topo, determina un corrispondente aumento dei geni *delta* che codificano per i ligandi della via di segnale di Notch (Chitnis e Kintner, 1996; Ma et al., 1998).

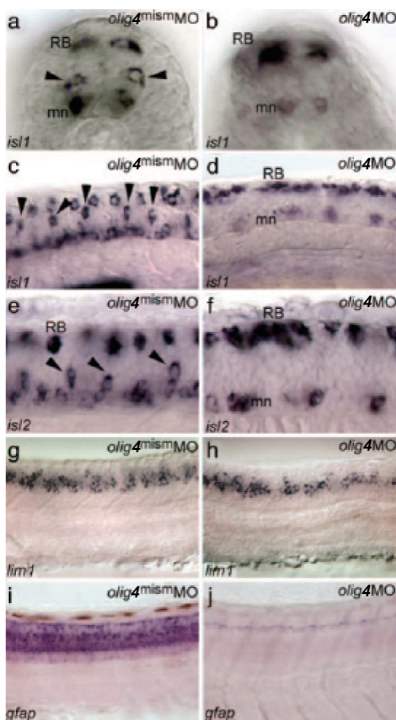


Figura 2.8.: Vedi descrizione nel testo (da Filippi et al, 2005)

Il dominio di espressione di *olig4* è limitato dal BMP signaling che, contrastando l'azione repressiva di *olig4* sui geni delle creste, consente alle cellule competenti di acquisire un destino di creste neurali, secondo il modello riportato nella pagina seguente (Filippi et al., 2005). La sovraespressione di *olig4* mediante iniezione del messaggero causa invece una netta diminuzione della pigmentazione, associata a una ridotta espressione dei marcatori delle cellule delle creste neurali.

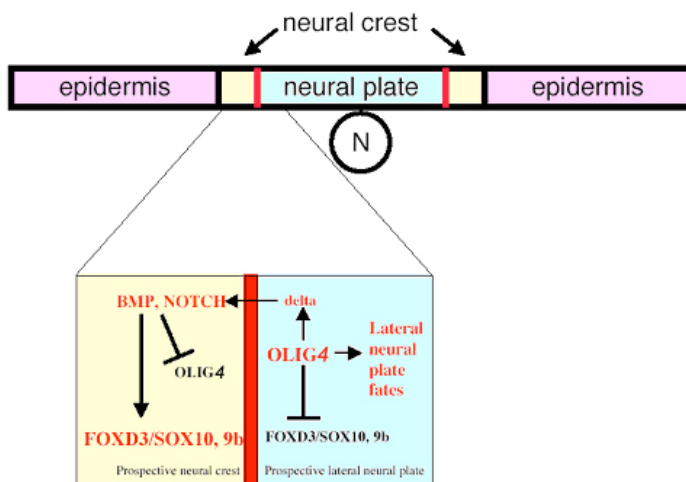


Figura 2.9:
 Schema riassuntivo del ruolo di *olig4* nella specificazione delle NC . (modificato da Filippi et al, 2005).

Avendo chiarito il ruolo di *olig4* introduciamo ora *olig3*, così denominato in seguito a comparazione filogenetica (Bronchain et al., 2007), il più recente membro della famiglia Olig, da me clonato nell'ultimo anno di dottorato.

Dall'analisi del membro *olig3*, tramite ibridazione *in situ*, è emerso che la somma dei profili d'espressione dei geni *olig3* ed *olig4*, le sequenze dei quali presentano tra loro significativa similarità, ricapitola il profilo d'espressione del gene *Olig3* in topo (ove il membro *Olig4* non è stato individuato). In seguito al clonaggio di questo nuovo membro, ne ho esaminato il profilo d'espressione in relazione agli altri membri della famiglia genica e ad alcuni marcatori del tubo neurale. Infine, ho svolto un'analisi della regolazione genica utilizzando trattamenti con teratogeni specifici per alcune vie di segnale implicate nello sviluppo del SNC di zebrafish.

2.5 Le vie di segnale

Studi genetici e biochimici hanno dimostrato che sono sufficienti solo poche classi di vie di segnale per determinare un'ampia varietà di tipi cellulari, tessuti e apparati. La specificità di queste vie di segnale è basata sulla storia delle cellule (competenza cellulare), l'intensità del segnale e le interazioni regolatorie con altre vie di segnale.

Le interazioni cellula-cellula, durante la trasduzione del segnale, sono cruciali per la coordinazione dello sviluppo embrionale. Tipicamente, le vie di segnale sono attivate dal legame di un ligando ad uno specifico recettore transmembrana, che sovrintende alle modificazioni dei secondi messaggeri citoplasmatici, trasduttori del segnale. Successivamente, questi trasduttori attivano fattori di trascrizione che a loro volta modificano l'espressione genica.

Alcune delle più importanti vie di segnale responsabili dello sviluppo embrionale della maggior parte dei vertebrati e di molti invertebrati sono ad esempio: Hedgehog (Hh), Nodal, Notch, la via di segnale BMP, transforming growth factor-beta (TGF- β),

L'osservazione che lo stesso insieme di vie di segnale viene usato molte volte nello sviluppo indica che il sistema di segnalazione è altamente flessibile nella generazione di risposte diverse in tessuti e specie differenti. In effetti, risulta evidente che le vie di trasduzione del segnale non siano basate sull'attivazione sequenziale lineare dei componenti della via, ma abbiano la possibilità di ramificarsi in molti punti della cascata.

La specificità delle risposte cellulari può essere ottenuta con almeno cinque meccanismi, che in alcuni casi possono agire in combinazione.

- 1 Lo stesso recettore può attivare differenti trasduttori intracellulari in tessuti differenti.

- 2 Differenze nella cinetica del sistema recettore-ligando possono generare risultati cellulari diversi.

- 3 L'attivazione combinatoria di più vie di segnale può dare come risultato la regolazione di specifici geni.

- 4 Cellule che esprimono fattori di trascrizione diversi possono rispondere in maniera differente se esposte agli stessi segnali.

- 5 La compartimentazione del segnale nelle cellule può contribuire alla specificità (Pires-daSilva e Sommers., 2003).

2.5.1 Hedgehog

La via di segnale Hedgehog (Hh) è essenziale per molti processi di sviluppo ed organogenesi e per il mantenimento di determinati tessuti nell'adulto. In molti casi, la risposta al segnale Hh è dose dipendente; diverse concentrazioni di Hh generano effetti differenti. Questo è dovuto ad una duplice risposta a Hh: basse dosi di Hh causano repressione trascrizionale, dosi elevate attivano la trascrizione. Nel caso dei geni *olig*, in zebrafish si è visto che nell'encefalo, trattando gli embrioni con ciclopamina che annulla il contributo di Hh, l'espressione di *olig2* si riduce fortemente. Nel tubo neurale l'espressione di *olig2* è totalmente annullata, mentre il dominio dorsale di *olig4* non viene compromesso. A livello quindi della piastra neurale ventrale il gradiente di Hh è essenziale per l'espressione di geni con dominio ventrale (quali *olig2* ed *olig1*), per contro nel lato dorsale del tubo neurale, un gradiente di concentrazione di BMP svolge la stessa funzione limitando il dominio dei geni espressi in quella porzione di tubo neurale, come la porzione dorsale di *olig4*.

2.5.2 Nodal

Lo sviluppo embrionale dei vertebrati richiede numerosi fattori induttivi conservati inclusi Nodal, Bmp e Wnt. Nodal, che è un membro della superfamiglia dei fattori TGF β (Trasforming Growth Factor beta), attiva una via di trasduzione del segnale che è simile a quella di altri TGF β . I geni Nodal, che sono stati identificati in numerose specie di vertebrati, sono espressi in specifici tessuti e tipi cellulari durante lo sviluppo embrionale.

Il segnale di trasduzione Nodal gioca un ruolo fondamentale nell'induzione e nello sviluppo del mesoderma e dell'endoderma, nella regolazione della neurogenesi e nella regionalizzazione dell'asse destra-sinistra. L'azione induttiva di Nodal è fortemente modificabile da parte di segnali antagonisti che agiscono in differenti momenti nella via di trasduzione del segnale Nodal (Tian e Meng, 2006).

2.5.3 Notch

Notch e i suoi ligandi Delta e Serrate sono proteine integrali di membrana in grado di trasmettere segnali tra cellule a diretto contatto.

L'attivazione di Notch ha un diretto ed immediato effetto sull'espressione genica, mediato dal dominio intracellulare libero dello stesso Notch, che agisce come un regolatore trascrizionale nel nucleo. Notch può pertanto prontamente accendere gli interruttori genetici che determinano il destino cellulare.

Il livello di attivazione di Notch dipende dal livello di espressione del suo ligando nelle cellule vicine e viceversa; questo permette alla via di segnale di coordinare il destino di cellule adiacenti e di determinare finemente l'organizzazione spaziale del differenziamento. L'intero processo è denominato inibizione laterale. Con questo meccanismo

un gruppo di cellule inizialmente equivalenti viene trasformato in un mosaico di cellule in stati differenti. In alcuni casi Notch può essere responsabile di un fenomeno opposto, l'induzione laterale, dove l'attivazione di Notch induce la produzione dei propri ligandi; in tal caso cellule adiacenti prendono un destino comune. Storicamente la via di segnale Notch è stata implicata nel controllo della neurogenesi, tanto in *Drosophila* quanto nei vertebrati; il meccanismo è tuttavia attivo anche in tessuti non neurali (Lewis J., 1998).

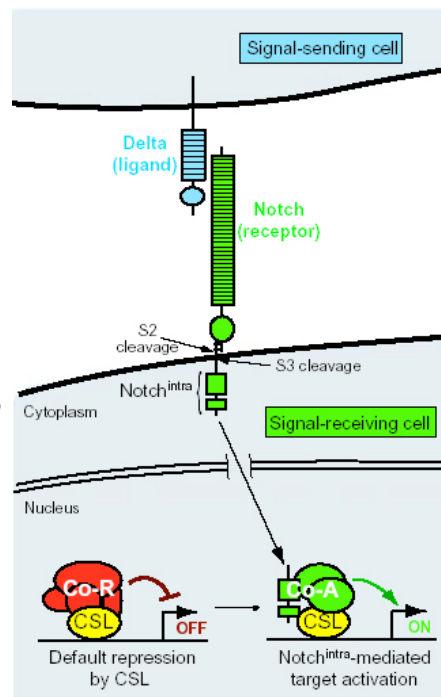


Figura 2.10. Rappresentazione schematica della via di segnale Delta/Notch (tratta da Lai E.C., 2004). I componenti principali sono il ligando (tipo Delta), il recettore (tipo Notch) e il fattore di trascrizione CSL. Le ripetizioni EGF nei domini extracellulari di ligando e recettore sono raffigurati con dei rettangoli. Il legame del ligando al recettore provoca due tagli proteolitici (S2 e S3). Il taglio S3 libera la porzione intracellulare di Notch, che può traslocare nel nucleo e legarsi a CSL. Il complesso co-repressore è sostituito da un complesso co-attivatore contenente Notch^{intra}, che attiva la trascrizione di geni bersaglio.

In zebrafish, l'inattivazione di *olig4* comporta un evidente aumento delle NC e, dunque, l'azione di *olig4* è quella di limitare il loro sviluppo.

Dal momento che la via di segnale Delta/Notch, è coinvolta nella specificazione delle stesse creste neurali (Cornell e Eisen 2002; Glavic et al; 2004), nel precedente studio di Filippi et al. (2005) si è visto che l'attivazione della via di segnale Delta/Notch promuove la formazione delle NC reprimendo l'espressione del gene *olig4*.

2.5.4 La via di segnale TGF- β e la regolazione dell'ematopoiesi in zebrafish.

La superfamiglia dei Transforming Growth Factors β (TGF- β) comprende le famiglie dei TGF- β , delle activine e inibine, dei GDF (Growth/Differentiation Factors), dei BMP (Bone Morphogenetic Proteins), dei Nodal, e di altre proteine. Essa è composta da più di 40 membri che regolano alcuni dei processi fondamentali dello sviluppo di un organismo.

Questi fattori sono solitamente sintetizzati come pre-pro-proteine che subiscono elaborazione (o maturazione) proteolitica, in seguito alla quale viene liberata la porzione C-terminale matura.

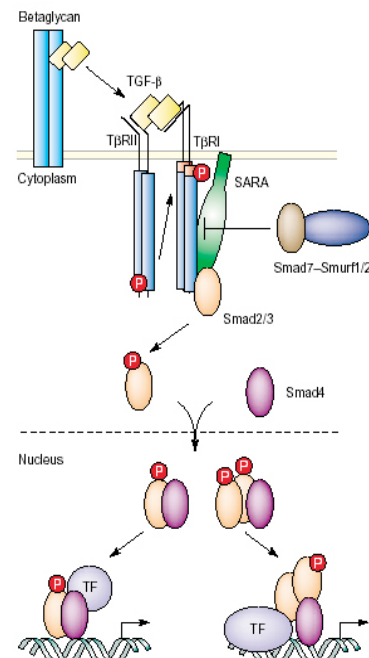


Figura 2.11. Rappresentazione schematica della via di segnale TGF- β /Smad canonica (tratta da ten Dijke e Hill, 2004). Recettori accessori, quali il betaglicano omodimerico, possono presentare il TGF- β ai suoi recettori. L'accesso delle R-Smad (Smad2/3) al recettore è facilitato da proteine ausiliarie, quali SARA (*Smad anchor for receptor activation*). Complessi costituiti da Smad7 e Smurf1/2 mediano la terminazione del segnale promuovendo la poliubiquitinazione e la degradazione dei recettori attivati. Smad4 = Co-Smad; TF = Fattore di trascrizione.

I peptidi maturi formano poi omodimeri o eterodimeri, che costituiscono le forme biologicamente attive delle proteine, e vengono secreti dalla cellula.

I recettori dei TGF- β sono di due tipi (tipo I e tipo II) e sono entrambi coinvolti nella trasduzione del segnale che porta all'attivazione dei membri della famiglia di fattori trascrizionali Smad (Heldin et al., 1997). Il legame del ligando TGF- β al recettore TGF- β di tipo II consente a quest'ultimo di legarsi a sua volta al recettore TGF- β di tipo I. Una volta che i due tipi di recettore sono in contatto, il recettore di tipo II fosforila uno specifico residuo di serina o treonina sul recettore di tipo I, attivandolo. A questo punto, il recettore di tipo I, attivato, è in grado di fosforilare a sua volta specifici substrati intracellulari (proteine R-Smad) (Fig.2.7). Le proteine Smad vengono attualmente suddivise, secondo la loro struttura e funzione, in tre sottoclassi (Kawabata e Miyazono, 1999). Le R-Smad (Smad regolate dal recettore), che vengono direttamente fosforilate dal recettore di tipo I. Le Co-Smad (partner comune delle Smad), che formano eterodimeri legandosi alle R-Smad attivate. Viene così generato un complesso che è in grado di traslocare nel nucleo e regolare l'espressione di specifici geni. Infine, le I-Smad (Smad inibitorie) possono ostacolare la fosforilazione delle R-Smad associandosi al recettore di tipo I, oppure promuovere la sua ubiquitinazione e degradazione reclutando altre proteine. In seguito all'attivazione da parte del recettore di tipo I, le proteine R-Smad dimerizzano con le Co-Smad nel citoplasma e il complesso così formato entra nel nucleo e attiva o reprime specifici geni, in associazione con altri fattori di trascrizione.

Le proteine Nodal costituiscono un'altra famiglia appartenente alla superfamiglia dei TGF- β . I membri conosciuti nei vertebrati sono uno in topo (Nodal), cinque in *Xenopus* (Xnr1, Xnr2, Xnr4, Xnr5 e Xnr6) e due in zebrafish (Cyclops [Cyc/Ndr2] e Squint [Sqt/Ndr1]). Essi sono essenziali per la formazione del mesoderma e la determinazione della regionalità dell'asse destra/sinistra. Inoltre l'attività di Nodal si è dimostrata critica per la specificazione dell'endoderma. Studi condotti hanno evidenziato che le molecole Nodal innescano una serie di eventi che portano le cellule che si trovano vicine a quelle che secernono Nodal a formare endoderma (Peyrieras et al., 1998; Thisse e Thisse, 1999; Alexander e Stainier, 1999; Kumar et al., 2001). Pertanto è stato ipotizzato che alti livelli di segnale Nodal portino alla formazione di endoderma e bassi livelli alla

formazione di mesoderma. A sostegno di questa ipotesi, diverse manipolazioni genetiche e biochimiche che portano all'abbassamento dei livelli di segnale di Nodal penalizzano selettivamente la formazione dell'endoderma (Schier et al., 1997; Thisse e Thisse, 1999).

Il legame di Cyc e Sqt al loro recettore richiede la presenza del cofattore Oep (*one-eyed pinhead*; Zhang et al., 1998), un membro della famiglia di proteine EGF-CFC associate alla membrana. Gli embrioni che mancano del gene *oep*, sia zigotico, sia materno, hanno un fenotipo analogo a quello dei doppi mutanti *cyc:sqt*, in cui non si forma l'endoderma (Zhang et al., 1998). Quindi la presenza di Oep è essenziale per la formazione di un complesso di membrana che trasduca il segnale Nodal e conduca alla fosforilazione di Smad2 (e forse anche Smad3).

Nell'ambito delle analisi sulle principali vie di segnale che determinano lo sviluppo nei vertebrati, l'interesse di una parte di questo lavoro di ricerca è stato indirizzato ai meccanismi d'azione della via di TGF β . In particolare è stata focalizzata l'attenzione sul gene *moonshine* (*mon*) in zebrafish che, sia in fase embrionale, sia negli individui adulti, è importante per il regolare processo di ematopoiesi (Ransom et al., 2004).

Il gene *moonshine* di zebrafish è stato identificato come l'ortologo del gene dei mammiferi *TIF1 γ* (*transcriptional intermediate factor 1 γ*), un membro della famiglia di fattori di trascrizione del tipo cofattori e corepressori (Le Douarin et al., 1995; Friedman et al., 1996; Kim et al., 1996; Venturini et al., 1999; Peng et al., 2002). Il gene *moonshine* di zebrafish codifica per una proteina che lega il DNA, chiamata Trimm33, la cui assenza, nei mutanti per il gene *mon*, provoca l'alterazione del processo di ematopoiesi sia a livello embrionale, sia negli individui adulti, portando alla perdita completa degli eritrociti (Ransom et al., 2004).

2.6 Analisi microarray del knock-down genico di *Olig4*

L'analisi microarray rappresenta una tecnica largamente utilizzata per comparare profili d'espressione di tessuti in condizioni normali o patologiche (organismo malato/sano, organismo knock-out o knock-down/organismo selvatico, organismi a diversi stadi di sviluppo).

La tecnica dei microarray prevede l'utilizzo di vetrini sui quali vengono disposte serie punteggiate in microgocce (spot) di oligonucleotidi specifici per diverse sequenze geniche dell'organismo in esame. Nella prima fase viene estratto l'RNA dai due campioni da analizzare nelle diverse condizioni e viene marcato con due diversi fluorofori. I due tipi di RNA (ad esempio del campione trattato e di quello non trattato, marcati con differenti fluorofori) vengono poi ibridati sullo stesso vetrino e competono per il legame alla schiera dei vari oligonucleotidi. I risultati vengono rilevati evidenziando la fluorescenza emessa dai fluorofori. Se un RNA è espresso in modo differenziale in una delle due condizioni considerate, la fluorescenza data dal legame dell'RNA in una delle due condizioni risulterà maggiore o minore rispetto a quella della condizione opposta. I dati vengono acquisiti con specifici programmi ed interpretati in base ad analisi statistica.

Allo scopo di analizzare l'effetto dell'inattivazione di *olig4* sul profilo trascrizionale dell'embrione di zebrafish, rispetto ad una condizione di tipo selvatico, è stato effettuato un knock-down genico mediante iniezione di oligo morfolino antisense in embrioni allo stadio di 1-4 cellule. Gli embrioni sono poi stati bloccati e fissati allo stadio di 5 e 20 somiti. Come controlli sono stati utilizzati embrioni iniettati con un morfolino mutato, in cui la sostituzione di alcuni residui rende l'oligonucleotide inattivo.

Dato che il gene *olig4* codifica per un fattore di trascrizione del tipo bHLH, è plausibile che la sua inattivazione possa causare delle variazioni nel livello di espressione dei geni da esso regolati. Dagli embrioni iniettati con il morfolino del gene *olig4* e con il morfolino mutato (morfanti e controlli) è stato quindi estratto l'RNA totale, col quale poter effettuare l'analisi microarray che potesse individuare geni espressi in modo differenziale negli embrioni knock-down rispetto ai controlli selvatici.

Tra tutti i geni che sono risultati differenzialmente espressi nell'analisi microarray ne sono stati scelti una decina sulla base di alcuni parametri (alta significatività nei livelli di sovra- o sotto-espressione; presenza dei trascritti nel sistema nervoso centrale; coinvolgimento in vie di segnale note) e le loro variazioni di espressione sono state sottoposte a verifica mediante ibridazione *in situ* su embrione *in toto*. Successivamente, a conferma della bontà dell'esperimento, ripetuto anche con le ibridazioni *in situ*, il lavoro di studio funzionale su *olig4* è stato ulteriormente supportato dall'utilizzo di un mutante genetico per confermare i principali risultati ottenuti in precedenza.

3. Materiali e metodi.

3.1 Abbreviazioni.

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

BSA: albumina di siero bovino

DIG: digossigenina

dpf: giorni dopo la fecondazione (days post fertilization)

EDTA: acido etilen-diammino-tetracetico

FLUO: fluoresceina

HM: miscela di ibridazione (hybridization mix)

hpf: ore dopo la fecondazione (hours post fertilization)

LB: terreno Luria-Bertani

NBT: 4-nitro-blu-cloro-tetrazolio

NTP: ribonucleotidi trifosfato

O/N: tutta la notte (over night)

PBS: tampone fosfato salino (phosphate buffered saline)

PBT: tampone fosfato con l'aggiunta di 0.1% di Tween20 (phosphate buffered tween)

PFA: paraformaldeide

PTU: 1-fenil-2-tiourea

RT: temperatura ambiente (room temperature)

SSC: saline standard citrate

ssDNA: DNA a singolo filamento (single stranded DNA)

TAE: Tris-Acido acetico-EDTA

Tris: Tris-(idrossimetil)-metilammina

TE: Tris-ETDA;

Tris: Tris-(idrossimetil)-metilammina;

WT: ceppo selvatico (wild type).

3.2 Zebrafish: stabulazione e mantenimento.

In laboratorio, gli zebrafish sono allevati in acquari da 5l, in cui vengono raccolti circa 20 individui tra maschi e femmine, e in vaschette da 1l, qualora vi sia la necessità di mantenere singolarmente particolari individui. Tutte le vasche, dotate di aperture per permettere un continuo ricambio di acqua, si trovano allocate in armadi per gli adulti (“Aquarienbau Schwarz”; Göttingen-Germania) e in una nursery per l'allevamento dei piccoli (ZebTech, TECNIPLAST), utilizzata dal quindicesimo giorno di sviluppo, fino al raggiungimento della maturità sessuale. Tutti gli acquari, giornalmente, effettuano un ricambio di acqua pari a 30l, prelevandola da cisterne che sono rifornite, attraverso un sistema di pompaggio ad osmosi inversa, di acqua deionizzata arricchita con una composizione salina adeguata alle esigenze dei pesci (23.55g CaSO₄, 3g NaHCO₃, 15g Istant Ocean), costantemente mantenuta ad una temperatura di 28.5°C e ad un pH neutro.

Il regime alimentare di *Danio rerio* si compone di tre pasti giornalieri: una razione di cibo secco a scaglie la mattina (TetraMin), e due razioni (a mezzogiorno e verso sera) di naupli vivi di *Artemia salina*, un piccolo crostaceo che viene acquistato allo stadio di cisti e allevato fino alla schiusa all'interno di un apposito apparato. Questo apparato è formato da un cono in plexiglas di circa 15 l che contiene circa 8 l di acqua deionizzata, arricchita con 192 g di sale marino, nella quale vengono immersi 80 g di cisti costantemente ossigenate tramite un areatore, e illuminate da una lampada al neon. Dopo due giorni i naupli sgucciati possono essere raccolti, filtrati al fine di eliminare i sali in eccesso, i resti dei gusci vuoti e le cisti non ancora schiuse (che sono indigeribili), e quindi distribuiti agli zebrafish (Westerfield, 1995).

Le larve vengono alimentate, a partire dal sesto giorno di vita, quando tutto il tuorlo di riserva è stato assorbito completamente. Per le prime tre settimane di vita, viene somministrata una razione di un particolato finissimo a base di artemie disidratate (Novo Tom, ditta JBL), e una razione di coltura liquida di parameci, preparata su una base di granturco bollito, lasciata proliferare per due settimane, filtrata e distribuita alle larve di zebrafish. In seguito, il cibo dei giovani zebrafish consiste in mangime a scaglie fini (AZ 300 ditta, Tetra) e coltura di parameci, fino

alle sei settimane di vita, a partire dalle quali viene somministrata anche una razione di naupli di *A. salina*.

Il ciclo biologico degli zebrafish in laboratorio è regolato sulla base di un fotoperiodo che prevede 14 ore di luce e 10 ore di buio.

Seguendo le indicazioni dello Zebrafish Book per la riproduzione dei pesci (Westerfield, 1995), gli individui vengono accoppiati la sera, al termine dell'ultimo pasto, utilizzando una vaschetta apposita nella quale viene inserita un'altra vaschetta il cui fondo è costituito da una rete. Per facilitare il corteggiamento, in questa vaschetta più interna sono poste delle biglie colorate e delle alghe finte e, la mattina, con l'accensione delle luci, vi è l'emissione dei gameti. Le uova fecondate attraversano la rete e si vanno a depositare sul fondo della vaschetta più esterna, per evitare che gli adulti si cibino delle loro stesse uova che, quindi, possono essere raccolte (circa 200 per ogni covata) e ripulite da eventuali escrementi e resti di cibo. Gli embrioni in via di sviluppo vengono incubati alla temperatura di 28°C in piastre Petri da 30ml contenenti Fish Water, un'acqua appositamente preparata, con una specifica composizione salina (vedi oltre) e un'aggiunta di blu di metilene che svolge azione disinfettante. A partire dal sesto giorno dopo l'evento fecondativo, le larve vengono trasferire in vaschette da 1l e mantenute sempre nell'incubatore e, successivamente, suddivise in più vaschette durante la fase di crescita, per evitare un'eccessiva competizione per lo spazio vitale e le risorse alimentari, fino all'età di circa 15-20 giorni dall'evento fecondativo, quando i pesci sono stabulati in un armadio adeguato alla stabulazione dei giovani zebrafish. Al raggiungimento della maturità sessuale, intorno al terzo mese, i pesci vengono trasferiti nelle vasche di stabulazione per gli adulti.

3.3 Soluzioni utilizzate.

FISH WATER 1X (per 5 l):

100 ml di SOLUZIONE SALINA MADRE 50x

50 µl di BLU DI METILENE 1000X

H₂O deionizzata fino a volume.

SOLUZIONE SALINA MADRE 50X (per 5l):

25 mM NaH₂PO₄ (3.43g)

25 mM Na₂HPO₄ (4.45g)

75 g INSTANT OCEAN

PTU:

0.003% PTU

10% PBS

H₂O deionizzata fino a volume.

TRICAINA (3-aminobenzoate methanesulfonate salt SIGMA)

400 mg tricaina in polvere

97.9 ml acqua deionizzata

2.1 ml Tris 1 M (pH 9)

SOLUZIONI PER L'IBRIDAZIONE *in situ*:

HYBRIDIZATION MIX (HM):

60% formammide

460 µl Ac. citrico (1M) pH 6 per 100 ml

SSC 5X

0.1% Tween-20

50 mg/ml eparina

500 mg/ml tRNA.

HIBRIDIZATION MIX (HM) PER LAVAGGI:

HM senza tRNA ed eparina

PBS 1X:

150 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄

H₂O-DEPC fino a volume.

PBT 1X:

1X PBS

0.1% Tween-20

PFA:

4% paraformaldeide in PBS 1X

ANTICORPI ANTI DIGOSSIGENINA/FLUORESCENZA:

Gli anticorpi sono forniti dalla ditta Roche, vengono diluiti 1:1000 in una soluzione di PBT/2% sheep serum/200mg/ml BSA e pre-assorbiti in presenza di embrioni spezzettati (a vari stadi, a seconda di quelli utilizzati per i campioni su cui verranno eseguite le ibridazioni *in situ*). 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 consentirne una migliore conservazione.

SSC 1X:

150 mM NaCl

15 mM Citrato sodico salino

in H_2O DEPC.

NBT/BCIP STAINING BUFFER:

100 mM Tris-HCl pH 9.5

50 mM MgCl_2

100 mM NaCl

0.1% Tween20

NBT/BCIP STAINING SOLUTION:

NBT/BCIP (La Roche) 20 $\mu\text{l/ml}$

Staining buffer

FAST RED STAINING BUFFER:

100 mM Tris-HCl pH 8.2

0.1% Tween20

FAST RED STAINING SOLUTION:

1 pastiglietta di Fast Red (Roche) ogni 2 ml di staining buffer;
filtrare la soluzione usando un filtro sterile.

STOP SOLUTION:

1X PBS pH5.5

1 mM EDTA

BENZIL BENZOATO-BENZIL ALCOOL

Nella soluzione devono essere presenti rispettivamente nella proporzione 2:1

SOLUZIONI PER LA SINTESI DI mRNA E SONDE:

TERRENO LB (1 l):

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.

TE 1X:

40 mM Tris acetato

1 mM EDTA pH 8

SOLUZIONI PER L'ELETTROFORESI

TAE (50X) TAMPONE DI CORSA ELETTROFORETICA

Per 1 lt:	Tris base	240 g
	Acido acetico glaciale	57.1 ml
	0.5M EDTA	100 ml
	Acqua distillata a volume	

LOADING BUFFER

30% glicerolo in H₂O deionizzata

0.25% blu di bromofenolo

Blue /Orange 6X Loading Dye (Promega)

1 kb DNA ladder (Promega) 83.3 ng/ μ l

100 bp DNA ladder (Promega) 100 ng/ μ l

SOLUZIONI PER LA MICROINIEZIONE

DANIEAU (1X)

50 mM NaCl

0.7 mM KCl

0.4 mM MgSO₄

0.6 mM Ca(NO₃)₂

5 mM HEPES pH 7.6

SOLUZIONI PER IL PROTOCOLLO DI MICROARRAY

TAMPONE SSC 20 X

175,3 gr NaCl

88,2 gr sodio citrato

800 ml H₂O

Portare a pH 7 con NaOH 10 N.

Aggiustare il volume ad 1 litro con H₂O

BUFFER DI PRE-IBRIDAZIONE

500 µl SSC 20 X
20 µl SDS 10%
200 µl ss DNA 2 mg/ml
200 µl Denhardt's solution 50 X
1180 µl H₂O milliQ AF

BUFFER DI IBRIDAZIONE

500 µl SSC 20 X
20 µl SDS 10%
50 µl ss DNA 2 mg/ml
500 µl formammide
930 µl H₂O mQ AF

Reagenti per la frammentazione dell'RNA

10 X Fragmentation Reagents: 200 ml soluzione tamponata di un sale di Zn

Stop Solution: 200 mM EDTA pH 8.0

Ricetta dei lavaggi post-ibridazione

1°lavaggio: 2 ml SSC 20X, 800 ml SDS 10% in 40 ml H₂O mQ AF

2°lavaggio: 200 ml SSC 20X, 800 ml SDS 10% in 40 ml H₂O mQ AF

3°lavaggio: 400 ml SSC 20X in 40 ml H₂O mQ AF

4°lavaggio: 200 ml SSC 20X in 40 ml H₂O mQ AF

DENHARDT'S SOLUTION 50X

1 gr BSA;
1 gr Ficoll;
1 gr PVP;
100 ml H₂O mQ A.

3.4 Sintesi delle sonde antisenso.

La sintesi *in vitro* delle sonde di RNA antisenso utilizzate nelle ibridazioni *in situ* ha richiesto l'inoculo del clone batterico, contenente i costrutti d'interesse, in terreno liquido LB in presenza di antibiotico appropriato, in concentrazione 25 mg/ml.

In seguito si è proceduto con la purificazione del DNA plasmidico, utilizzando le soluzioni e il protocollo forniti dalla ditta Promega (Wizard® Plus SV Minipreps). Il DNA è stato quantificato su gel di agarosio all'1.5%, usando il programma Quantity One della ditta Bio-Rad.

Prima di effettuare la trascrizione di RNA antisenso è stato operato un passaggio preliminare di linearizzazione del plasmide con un enzima di restrizione che tagliasse unicamente a monte dell'inserto da trascrivere. Questo perché la sintesi di RNA antisenso, a partire da un plasmide circolare, generalmente, permette di ottenere trascritti molto lunghi e l'RNA polimerasi, durante il processo di trascrizione procederebbe oltre il 5' dell'inserto di interesse. Il plasmide viene pertanto linearizzato, in modo da permettere la terminazione della trascrizione, per distacco della polimerasi a monte del DNA che si intende trascrivere e di cui si sta costruendo la sonda antisenso (sintesi *run-off*).

Poiché il processo di trascrizione *in vitro* richiede almeno 1µg di DNA stampo ed il volume di reazione ottimale è di 20µl (vedere oltre), è stato necessario linearizzare 5 µg di plasmide, in modo tale da avere la garanzia di una resa sufficiente al termine della digestione e della successiva purificazione del DNA.

Le digestioni di linearizzazione sono state eseguite in un volume di 50 µl:

- DNA plasmidico 5 µg;
- Buffer per l'enzima di restrizione 1X;
- Enzima di restrizione 1-2 µl (10-15 unità µl)
- H₂O-DEPC fino a volume

La miscela è stata poi incubata a 37°C per 2 ore e il plasmide linearizzato così ottenuto è stato purificato utilizzando il protocollo ed i reagenti forniti dalle ditte Promega (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) o Zymoresearch (DNA

Clean & Concentrator). In alternativa la purificazione del DNA linearizzato avviene secondo il protocollo di purificazione Fenolo/Cloroformio a cui segue un passaggio di precipitazione e successiva concentrazione del prodotto:

- aggiungere 0,1 volumi di NaCl 4M e 2,5 volumi di etanolo 100%;
- mescolare delicatamente la soluzione e lasciar precipitare a -80°C per 2 ore, oppure O/N;
- aggiungere alla miscela 2µl di glicogeno;
- centrifugare a 14000g per 20 minuti alla temperatura di 4°C;
- scartare il surnatante ed eseguire 3 lavaggi con 200µl di etanolo 70%;
- centrifugare a 14000 g per 2 minuti e togliere il surnatante dopo ogni lavaggio;
- togliere l'etanolo e lasciar asciugare bene il pellet;
- risospendere il pellet in 15µl di Nuclease Free Water (Promega).

A questo punto la qualità e la quantità del DNA linearizzato vengono controllate tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Per la trascrizione della sintesi delle sonde antisense è stato seguito il seguente protocollo che prevede la preparazione della reazione di sintesi di RNA, in un volume totale di 20µl:

- | | |
|--|-------------|
| • Plasmide linearizzato | min 1 µg |
| • NTP-digossigenati o fluoresceinati mix (Roche) | 2 µl; |
| • Buffer per T7, T3 o SP6 (Roche) | 10X (2 µl); |
| • RNase inhibitor (Promega) | 0.2 µl; |
| • T7, T3 o SP6 mix (La Roche) | 2 µl; |

Le reazioni di trascrizione vengono incubate alla temperatura di 37°C, da un minimo di due ore a O/N a seconda della lunghezza dell'inserito da trascrivere, al fine di ottimizzare la resa della polimerasi.

Successivamente è necessario degradare i filamenti stampo di DNA incubando la miscela di reazione per 15 minuti, sempre a 37°C, in presenza di 2µl di DNAsi

mix, priva di RNAsi, (Promega). La digestione del DNA viene quindi bloccata aggiungendo alla miscela 1µl di EDTA 0.5M a pH 8.0 e, in seguito, la soluzione contenente la sonda di RNA antisenso viene purificata usando le soluzioni e il protocollo forniti dalla ditta Ambion (kit MEGAclean) oppure dalla ditta Zymoresearch (RNA Clean Up Kit).

Infine, le miscele di RNA delle sonde vengono controllate e quantificate tramite elettroforesi su gel di agarosio. Le miscele ottenute sono conservate a -80°C per preservarne l'integrità.

Nel protocollo di ibridazione *in situ* viene impiegata una quantità di sonda di circa 100-200 ng per ogni campione.

3.5 Ibridazione in situ.

L'utilizzo delle tecniche di ibridazione *in situ* su embrioni *in toto* consente di evidenziare ed analizzare l'espressione di un determinato gene, utilizzando sonde antisenso di RNA sequenza-specifiche marcate con UTP-digossigenati o fluoresceinati (DIG o FLUO RNA Labelling Mix, Roche). La procedura viene svolta applicando tutti gli accorgimenti necessari per evitare la contaminazione da RNAsi.

3.6 Ibridazione singola.

In situ-PRIMO GIORNO:

- Reidratazione. Gli embrioni, 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.
- Digestione con proteinasi K. I campioni vengono trattati con una soluzione 10 µg/ml di proteinasi K per digerire parzialmente le strutture proteiche e creare così dei fori attraverso i quali possa diffondere la sonda. Il trattamento viene eseguito a temperatura ambiente, e il tempo di incubazione varia a seconda dello

stadio degli embrioni da trattare. Successivamente, è necessario fissare gli embrioni, per circa 20 minuti, in una soluzione di PFA (4% in PBS) per preservare l'integrità del campione.

- Pre-ibridazione. Gli embrioni vengono pre-ibridati con 800 µl di soluzione HM per 2-5 ore alla temperatura di 65°C.
- Ibridazione. La soluzione della fase di pre-ibridazione viene rimossa e sostituita con 200 µl di HM fresca contenente 100-200 ng di sonda. I campioni vengono incubati O/N in un bagnetto a 65°C.

La presenza di eparina e di tRNA nella miscela di ibridazione assicura che la sonda non si leghi a bersagli aspecifici.

In situ-SECONDO GIORNO:

1. Lavaggi. Utilizzando soluzioni pre-riscaldate alla temperatura di ibridazione (65°C), si deve effettuare una serie di lavaggi in modo da rimuovere tutta la sonda che non si è legata al bersaglio specifico. Si effettuano i seguenti lavaggi:
 1. 75% di HM per lavaggi, 25% SSC 2X per 15 minuti
 2. 50% di HM per lavaggi, 50% SSC 2X per 15 minuti
 3. 35% di HM per lavaggi; 75% SSC 2X per 15 minuti
 4. SSC 2X per 15 minuti (2 lavaggi)
 5. SSC 0.2X per 15 minuti (RT).
- Pre-incubazione. Attraverso una serie di passaggi a concentrazione crescente di PBT e decrescente di SSC 0,2X, si riportano i campioni in una soluzione al 100% di PBT. A questo punto si sostituisce il PBT con una soluzione di PBT/2% sheep serum/200mg:ml BSA e si lasciano gli embrioni in questa miscela, per almeno 2 ore, a temperatura ambiente.
 - Incubazione con anticorpi. I campioni vengono incubati in agitazione O/N alla temperatura di 4°C, in 300-400 µl di una soluzione contenente l'anticorpo pre-assorbito anti-digossigenina, la nostra sonda è stata preparata con NTP

(nucleotidi tri-fosfato) coniugati con digossigenina. L'anticorpo è coniugato con fosfatasi alcalina, un enzima che manifesta proprietà cromogene se viene messo a contatto con il substrato appropriato.

In situ-TERZO GIORNO:

- Lavaggi. Gli embrioni vengono sottoposti ad una serie di lavaggi in PBT 1X al fine di rimuovere tutto l'anticorpo che non si è legato in maniera specifica alla sonda (si eseguono 6 lavaggi da 15 minuti a temperatura ambiente).
- Pre-colorazione. Questa fase prevede 3 lavaggi da 5 minuti utilizzando lo staining buffer specifico per il substrato utilizzato per la colorazione che, in questo caso è eseguita con NBT/BCIP. Questi passaggi servono per preparare i campioni al nuovo tampone di reazione prima di fornire il substrato per la fosfatasi alcalina.
- Colorazione. Gli embrioni vengono trasferiti dalla provetta ad una piastra con pozzetti a "vetrino di orologio" e incubati al buio nella soluzione di colorazione. Il substrato utilizzato è NBT/BCIP che, reagendo con la fosfatasi alcalina, forma un precipitato di colore blu nei punti in cui la sonda si sarà legata ai bersagli specifici. Per monitorare correttamente la reazione colorimetrica è necessario osservare i campioni al microscopio da dissezione ogni 10-15 minuti. Se la colorazione è lenta, è possibile farla procedere più velocemente ad una temperatura di 37°C in stufa, ma questa procedura aumenta il rumore di fondo, e che può interferire con le successive analisi, quindi è necessario procedere con cautela. Inoltre, gli embrioni possono essere conservati per una notte a 4°C, temperatura alla quale la reazione procede molto lentamente. Una volta raggiunto il livello di colorazione desiderato, la reazione viene bloccata lavando gli embrioni con la stop solution.

Fissaggio. Gli embrioni vengono fissati O/N a 4°C con PFA al 4% in PBS al fine di preservarne le caratteristiche acquisite dopo il trattamento.

3.7 Ibridazione doppia.

La procedura per l'ibridazione doppia è uguale alla singola, fino al terzo giorno di ibridazione. Terminata la prima colorazione, gli embrioni sono lavati con PBT (3 lavaggi di 5 minuti ciascuno) e si procede con:

1. Rimozione (stripping) dell'anticorpo. Gli embrioni sono trattati con la soluzione di stripping (3 lavaggi per 5 minuti), per rimuovere il primo anticorpo.
2. Preincubazione. Seguono dei lavaggi in PBT e la preincubazione nella soluzione PBT/sheep serum/BSA.
3. Incubazione. Sono aggiunti 300-400 μ l di soluzione contenente l'anticorpo specifico per la seconda sonda e si mette ad incubare per tutta la notte a 4°C in agitazione.

Gli embrioni vengono poi sottoposti ad una serie di lavaggi in PBT per rimuovere l'eccesso di anticorpo, prima di fornire il substrato per la fosfatasi alcalina. Sono stati eseguiti 3 lavaggi da 5 minuti utilizzando lo staining buffer specifico (ad esempio, se in precedenza è stato usato Dig-staining buffer ora si utilizzerà il Fluo-staining buffer). È consigliabile effettuare la prima rivelazione in blu e la seconda in rosso e non viceversa. Il substrato utilizzato per effettuare la colorazione in rosso è il FAST RED (1 tavoletta in 2 ml di buffer di colorazione; Sigma), che nella reazione colorimetrica forma un precipitato rosso. Il monitoraggio della reazione è identico a quanto descritto per la prima colorazione.

3.8 Osservazione degli embrioni al microscopio.

Dopo la colorazione, gli embrioni sono conservati in PFA al 4%. Per poterli montare su vetrino devono essere trasferiti in una soluzione di glicerolo 85%. Il passaggio è effettuato gradualmente. Viene rimossa la PFA e sono eseguiti alcuni lavaggi in PBS. Si procede quindi alla sostituzione del PBS con soluzioni a concentrazione crescente di glicerolo (30%, 50%, 70% e 85% di glicerolo in PBS).

Utilizzando un microscopio da dissezione e dei piccoli aghi, si rimuove il tuorlo dagli embrioni, in modo da poterli osservare e fotografare ventralmente. Si

dispongono dei pezzetti di scotch sovrapposti sul vetrino portaoggetti, che vengono poi incisi con una lametta per rimuoverne un quadratino e creare così una tasca in cui alloggiare l'embrione. Per embrioni allo stadio di 24 hpf e di 30 hpf sono sufficienti due o tre pezzi di scotch, mentre gli embrioni a 3 gg necessitano di almeno 5 strati, essendo più spessi. L'embrione è posto sul portaoggetti con una goccia di glicerolo e viene coperto da un coprioggetto. E' possibile, muovendo delicatamente il coprioggetto, ruotare l'embrione per disporlo nella posizione desiderata.

Le foto sono state acquisite con una fotocamera digitale DC 500 Leica, montata su microscopio composto Leica DMR. Le immagini sono state elaborate con il programma Adobe Photoshop 6.

3.9 Creazione di linee transgeniche.

I geni *olig1* e *olig4*, come già ampiamente illustrato, svolgono un ruolo critico nel differenziamento degli oligodendrociti e del tubo neurale dorsale. Per comprendere meglio le interazioni che hanno questi due fattori trascrizionali con gli altri geni, uno degli obiettivi di questo lavoro di ricerca è stato quello di produrre linee transgeniche di zebrafish. I costrutti sintetizzati sono stati iniettati *in vivo* nelle uova a stadi precoci, permettendo di visualizzare, tramite esposizione dei campioni alla luce UV, la proteina fluorescente GFP espressa sotto il controllo dei promotori di nostro interesse, rispettivamente dei geni *olig1* e *olig4*.



Figura 3.1: Gel d'agarosio, che ci permette di visualizzare nella parte superiore il prodotto della PCR rispettivamente dei promotori di *olig1* e *olig4* di 3kb ciascuno. Nella parte inferiore è visualizzato il plasmide PG1 aperto con i relativi enzimi di restrizione con cui verranno clonati i due promotori. HindIII/BamH1 per il promotore di *olig4*, e SalI/EcoR1 per il promotore di *olig1*.

Inizialmente, utilizzando come stampo il DNA genomico di zebrafish, sono state amplificate mediante specifici primer (MWG), regioni bersaglio di 3000bp a monte dei geni *olig1* e *olig4*. Le regioni sono state amplificate tramite PCR (Reazione a Catena della Polimerasi), con le seguenti condizioni:

-Per il gene *olig4*: utilizzando la Pfu DNA Polimerase (Promega) e partendo come stampo da 3 µl di DNA genomico di zebrafish

- Denaturazione iniziale: 94°C per 1'
 - Denaturazione: 94°C per 1'
 - Appaiamento: 63°C per 30''
 - Estensione: 72°C per 6'
 - Estensione finale: 72°C per 5'
- 35 cicli

Per il gene *olig1*: utilizzando la Pfu DNA Polimerase (Promega) e partendo come stampo da 3 µl di DNA genomico di zebrafish

- Denaturazione iniziale: 94°C per 2'
 - Denaturazione: 94°C per 1'
 - Appaiamento: 65°C per 30''
 - Estensione: 70°C per 3'
 - Estensione finale: 70°C per 5'
- 35 cicli

I prodotti, dopo purificazione, sono stati clonati in un vettore d'espressione quale il plasmide pG1, a monte della sequenza codificante per la Proteina Fluorescente Verde GFP (Figura: 3.1).

Enzimi delle estremità inserto: <i>olig4-3kb</i> Fw: HindIII Rev: BamH1	Primers utilizzati per clonare in pG1: Fw: GAAGCTTTGACACATACACCAGACAAAACCTG Rev: CTTTGAAAGTCTTCTCAGAAACAACCTAGGG
---	--

Enzimi delle estremità inserto: <i>olig1-3kb</i> Fw: SalI Rev: EcoRI	Primers utilizzati per clonare in pG1: Fw:GGTCGACTTTATTTAAACCAATTTAGGAGTGACC Rev:TCTGAAAAAAGATATTCAGAGAACATGCTTAAGG
--	---

Una volta identificati i cloni positivi, tramite opportune analisi di restrizione, si procede con la microiniezione di questi costrutti per transgenesi all'interno delle uova di zebrafish allo stadio di zigote (1-4 cellule).

Allo stadio in cui inizia l'espressione del gene d'interesse (*olig1* o *olig4* in questo caso), si può apprezzare, con l'ausilio di una luce UV con spettro di emissione nel blu, la fluorescenza verde della GFP a livello dei territori di espressione dei geni che si stanno considerando.

Gli embrioni iniettati con i costrutti transgenici, chiamati "transienti" in quanto il transgene non è ancora stato integrato nel loro genoma, vengono cresciuti fino alla maturità sessuale. A questo punto gli individui vengono incrociati tra loro, oppure genotipizzati, per identificare i soggetti nei quali il costrutto transgenico si è integrato nel genoma ospite. Se è stata interessata anche la linea germinale, il transgene passerà alla generazione successiva. Questi individui sono i cosiddetti fondatori di una linea transgenica del gene d'interesse.

Al fine di ottimizzare l'integrazione del transgene nel genoma sia dal punto di vista della percentuale di integrazione che dalla qualità del profilo d'espressione è stata utilizzata una metodica che impiega un costrutto, chiamato pT2AL200R150G dal Prof Koichi Kawakami (2004).

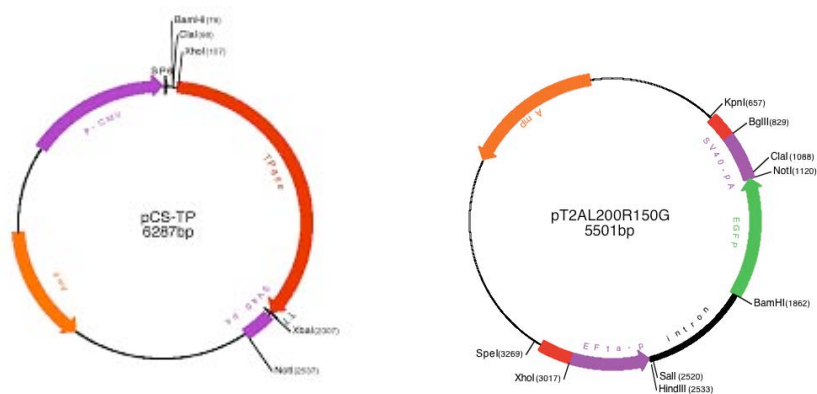


Figura 3.2: Nella figura a destra è visualizzata la mappa di restrizione del plasmide da me utilizzato, pT2AL200R150G del Prof Koichi Kawakami. Mentre a sinistra vi è la mappa di restrizione in cui è contenuto il messaggero della trasposasi T_pase da sintetizzare e co-iniettare insieme al costrutto precedentemente sintetizzato.

Per quanto riguarda il gene *olig4* sono stati utilizzati i seguenti primers, in cui l'enzima reverse sull'inserto precedentemente utilizzato resto lo stesso, mentre viene preparata una nuova estremità appiccicosa funzionale mediante PCR e nuovo set di oligonucleotidi.

<p>Enzimi delle estremità inserto: <i>olig4-3kb</i> Fw: Sall Rev: BamH1</p>	<p>Primers utilizzati per clonare in Tol2a: Fw:GTGTCGACTGACACATACACCAGACAAAAGT Rev:CTTTGAAAGTCTTCTCAGAAACAACCTAGGG</p>
--	--

Nella reazione di PCR (Reazione a Catena della Polimerasi), il programma utilizzato e':

-Per il gene *olig4*: Triple Master DNA Polimerase (Promega) con buffer HF, partendo come stampo da 3 µl di DNA genomico di zebrafish.

- Denaturazione iniziale: 94°C per 1'
- Denaturazione: } 94°C per 1'
- Appaiamento: } 56°C per 30'' 35 cicli
- Estensione: } 72°C per 3'
- Estensione finale: 72°C per 5'

Il costrutto viene quantificato con gel d'agarosio e iniettato direttamente nelle uova allo stadio di una cellula.

La concentrazione ottimale di costrutto sia aggira intorno ai 25 ng/ul in buffer da iniezione.

Buffer 5X:

5 mM Tris/HCl(pH 8)
0.5 mM EDTA
0.1 M KCl

Soluzione da iniettare:

1X buffer per iniezione
0.5% rosso fenolo
25 ng/ul DNA
H₂O milliQ

3. 10 Microiniezione.

RACCOLTA ED INIEZIONE DELLE UOVA

Le uova raccolte dalla vasca dei pesci in accoppiamento sono poste in fish water ed analizzate al microscopio per verificarne qualità e stadio di sviluppo.

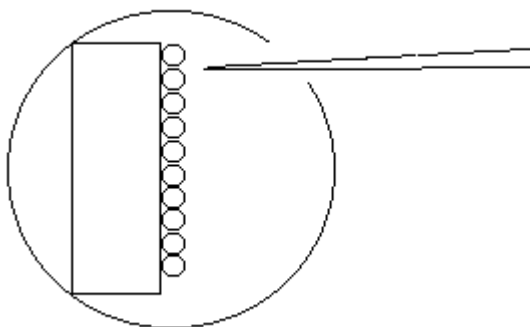


Figura. 3.3: Disegno schematico illustrante la disposizione lungo un vetrino delle uova destinate alla microiniezione. L'ago è posizionato a destra delle uova.

Le uova vengono disposte lungo il bordo bagnato di un vetrino inserito in una capsula Petri. A causa della tensione superficiale, le uova fecondate rimangono sufficientemente stabili per poterle iniettare (vedi figura 3).

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 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". Questo strumento 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 stereo-microscopio 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. Quest'area deve corrispondere all'incirca ad 1/8 del volume dell'uovo, per poter ottenere un'appropriata quantità di soluzione.

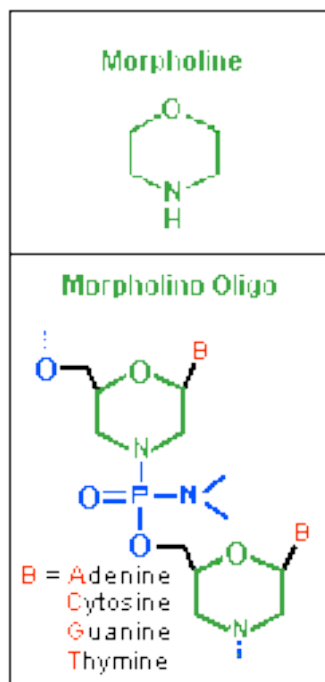
Negli esperimenti iniziali ci siamo prefissati di iniettare 1 ng di morpholino nel tuorlo. Partendo da soluzioni concentrate 1 μ g/ μ l, si deduce la necessità di iniettare 1 nl.

1 nl corrisponde ad una sfera di raggio $r = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \times V}$ ($1 \text{ ml} = 1 \text{ mm}^3$), ovvero a 0,062 mm, misura che è circa 1/8 del raggio dell'uovo, il quale può essere approssimato a 0,5 mm. Successivamente, in base alla necessità di diminuire o aumentare la quantità di soluzione, è stata cambiata la concentrazione iniziale allo scopo di mantenere invariato il volume di riferimento nella microiniezione.

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.

3.11 Gli oligo-Morpholino.

I morpholino sono oligo antisense modificati. Il loro nome deriva dalla struttura delle unità che li compongono, ciascuna delle quali contiene una delle quattro basi azotate (A, C, G o T) legata ad un anello morpholinico a sei atomi (Fig. 3.4). 18-



25 subunità sono unite tra loro con un legame fosfordiamidato che sostituisce il legame fosfodiesterico presente negli acidi nucleici (Fig. 3.4).

Gli oligonucleotidi così sintetizzati acquistano proprietà peculiari che li rendono adatti all'impiego in studi di inibizione genica (Summerton e Weller, 1997).

Il meccanismo d'azione dei morpholino coinvolge il blocco della traduzione proteica (Summerton, 1999).

L'oligonucleotide è progettato complementare ad una regione compresa tra il CAP-5' e i primi venti nucleotidi (circa) dopo l'AUG di inizio traduzione.

Oltre questa distanza l'attività inibitoria dell'oligo crolla.

Figura 3.4: Struttura dell'anello morpholinico, e legame tra le subunità. Tratto dal sito: (WWW.gene-tools.com).

L'antisense riesce ad invadere la struttura secondaria dell'RNA messaggero ed impedisce il riconoscimento del ribosoma. Di conseguenza, la proteina non viene tradotta.

Rispetto agli oligonucleotidi usati in passato, i morpholino presentano notevoli vantaggi:

- Sono più stabili perché insensibili alle nucleasi, consentendo un'azione prolungata per giorni. Si possono pertanto utilizzare in esperimenti di microiniezione di uova fecondate ed il loro effetto può essere analizzato anche su embrioni di 5-6 giorni.
- Hanno una migliore efficienza poiché agiscono a concentrazioni nanomolari e la loro tossicità è ridotta.
- La sequenza di riconoscimento è specifica. Se si sostituiscono anche solo quattro nucleotidi il morpholino non è più in grado di legarsi all'mRNA (Nasevicius e Ekker, 2000). Sono ridotte anche le attività aspecifiche dovute ad interazione con proteine cellulari che rischierebbero di falsare i risultati.

Dai test effettuati sullo zebrafish, i morpholino si sono dimostrati molto promettenti. E' stato, infatti, analizzato il loro effetto su geni per i quali si dispone di linee mutanti. L'iniezione di morpholino nei selvatici ha prodotto alterazioni nel fenotipo e nell'espressione dei marcatori molecolari corrispondenti a quelle dei mutanti (Nasevicius e Ekker, 2000).

Per concludere, va sottolineato che si osserva una certa variabilità nel grado di alterazione dell'embrione iniettato, dipendente dal dosaggio del morpholino. A concentrazioni maggiori gli effetti sono più marcati. Tuttavia è sconsigliato eccedere nella quantità perché alte dosi possono talvolta indurre attività aspecifiche.

Preparazione della soluzione di morpholino da iniettare

Gli oligo antisense morpholino vengono spediti dalla ditta Gene Tools in forma liofilizzata. Sono risospesi in soluzione Danieau 1X per ottenere una soluzione 1 mM (circa 8 µg/µl) e conservati a 4°C. La soluzione Danieau causa una minore

mortalità negli embrioni microiniettati, senza alterare la penetranza dei fenotipi osservati (Nasevicius and Ekker, 2000).

La soluzione da iniettare è composta da:

- Morpholino: in concentrazione finale variabile (tipicamente 1 µg/µl)
- Danieau: 1X
- Rosso fenolo 2%: fino a volume di 16 µl

Concentrazioni iniettate: 2 µg/µl

La soluzione deve essere conservata a -20°C.

Prima di iniettare, la soluzione deve essere incubata a 70-80°C per 10', centrifugata per qualche secondo e messa in ghiaccio.

Gli embrioni di controllo sono stati iniettati con una soluzione di rosso fenolo o con un morpholino di controllo negativo *mismatched*.

Sequenze morfolino (MO):

- *olig4^{AUG}* MO: TCT GAA TCC ATC TTT GAA AGT CTT C (regione AUG)
- *olig4^{UTR}* MO: GAA ACA ATC CGC TTG AAG TGA GGC G (regione 5' UTR)
- *olig4^{mism}* MO: GAA AgA ATa CGa TTG AAG TcA GcC G (morpholino *mismatched*, le mutazioni sono rappresentate in minuscolo).

3.12 Estrazione del DNA dal taglio della coda di zebrafish adulto.

- Porre lo zebrafish selezionato in Tricaina 0.02%
- Utilizzando un coperchio pulito di una capsula Petri, adagiare il pesce al centro del coperchio
- Utilizzare una forbice di precisione precedentemente pulita con soluzione alcalina o acida per una maggiore sicurezza di pulizia.
- Tagliare l'angolo inferiore della pinna caudale facendo attenzione a non asportare una quantità troppo elevata (circa un 15-20%) per agevolare la ricrescita che avverrà entro la prima settimana dal taglio.

- Recuperare il pezzo di pinna con l'ausilio di pinzette e riporlo in una eppendorf sterile da 1,5 ml con 500 μ l di buffer di lisi precedentemente preparato con l'aggiunta di 2.5 μ l of Proteinasi K (20 mg/ml)

buffer di lisi:	Volumi per 100 ml	Conc. di partenza:
100 mM Tris/HCl pH 8	10 ml	1M
200 mM NaCl	6.7 ml	3M
0.2% SDS	2 ml	10%
5mM EDTA	1 ml	0.5 M

- Mantenere la provetta a 55 °C per tutta la notte e occasionalmente vortexare.
- Aggiungere 300 μ l di Isopropanolo.
- Vortexare molto bene.
- Porre a 4°C per 30 minuti.
- Centrifugare a 12000 rpm/ 15 minuti.
- Lavare il pellet ottenuto con etanolo 75%.
- Porre a 4°C per 10 minuti.
- Centrifugare a 12000 rpm/ 15 minuti. a temperatura ambiente.
- Asciugare il pellet ottenuto.
- dissolvere il pellet in 500 μ l di TE 1X pH=8.
- vortexare bene.
- stoccare a 4°/-20/-80°C.

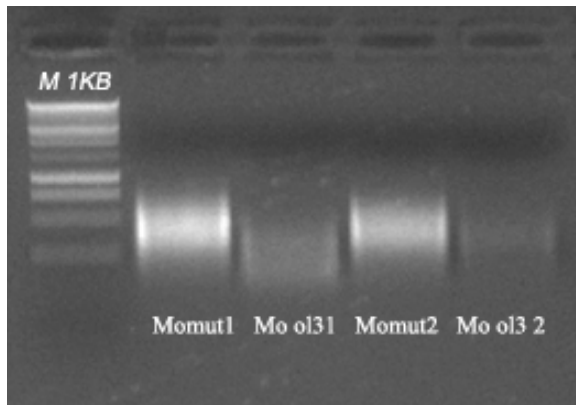
3.13 Estrazione del DNA da embrioni dopo *in situ*.

- Lavare l'embrione fissato con soluzione di lisi
- (buffer di lisi: 10 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM KCl, 0.3% Tween20)

- Lisare l'embrione con 50 µl del buffer sopraindicato.
- Scaldare per 10 minuti a 98°C la eppendorf.
- Aggiungere 2.5 µl di proteinasiK (20 mg/ml)
- Scaldare a 55°C per un minimo di 4 ore (occasionalmente vortexare)
- Portare poi con l'ausilio del termociclatore a 98°C 10 minuti
- Stoccare la soluzione ottenuta a 4°/-20°/-80°C

3.14 Analisi con microarray.

Gli embrioni iniettati (50 controlli e 50 morfanti per esperimento) sono stati bloccati allo stadio di 5 somiti e 20 somiti in TRIzol (soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato) ed è stato estratto l'RNA totale utilizzando il protocollo della ditta Gibco.



L'RNA è stato successivamente trattato con DNAsi (Promega), (vedi figura a lato) purificato con il kit RNAeasy (Qiagen) e quantificato con analisi su gel di agarosio e allo spettrofotometro (BioRad SmartSpec™3000).

La produzione di aRNA (RNA amplificato) e la marcatura sono state effettuate con il kit Ammino Allyl MessageAmp™ aRNA della ditta Ambion.

I vetrini microarray con copertura di poli-lisina (Compugen/Sigma-Genosys Zebrafish OligoLibrary) sono stati ibridati in una Gen Machine Hyb Chamber, seguendo le indicazioni del Leiden Genome Technology Center (LGTC), e analizzati mediante il programma Scan Array Express; per ogni stadio sono state effettuate 4 repliche, due di morfanti e due di controlli.

Le immagini sono state elaborate dal programma Spotfinder e normalizzate dal software MIDAS (TIGR). Alla fine le 4 repliche sono state analizzate con il software SAM (Significance Analysis of Microarrays).

3.15 Mutanti di zebrafish per il gene *olig4*.

Per lo studio funzionale del gene *olig4*, il sottoscritto è riuscito ad identificare i carrier di una linea stabile di mutanti di zebrafish per tale gene, ove una mutazione puntiforme che sostituisce una T con una G crea un codone di stop TGA nella sequenza codificante, annullando l'attività di *olig4* nello sviluppo del SNC.

La linea mutante così denominata è 07L06 e di seguito è possibile vedere una breve parte della sequenza mutata di interesse: 5'- CACCACAAAT (G>T) GAGCTCAAAC -3'. Per riuscire a identificare questo tipo di mutazione, dopo aver purificato del DNA dal taglio della coda, e' stata effettuata una PCR.

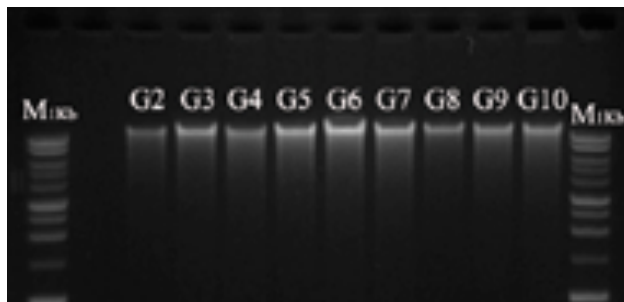


Figura 3.5: Gel d'agarosio in cui sono visualizzati i DNA genomici estratti da 9 embrioni utilizzati per l'identificazione dei carrier mutanti per il gene *mon* come si può notare il peso molecolare è molo elevato indice di un buon prodotto d'estrazione.

Primer di PCR (prodotto atteso: 910 bp):

Fw: CCTCACTTCAAGCGGATTGTT

Rev: CTTCCCATACAATCTGCTGC

E' stato utilizzato il seguente programma:

- Denaturazione iniziale: 95°C per 3'
- Denaturazione: 94°C per 1'
- Appaiamento: 60°C per 1' 35 cicli
- Estensione: 72°C per 1'

- Estensione finale: 72°C per 5'

In seguito a purificazione, il prodotto è stato digerito con l'enzima *Tas1*; confrontando il profilo delle bande risultanti è possibile identificare i possibili carrier di questa linea mutante. Il profilo per i carrier dopo la digestione è rappresentato da un set di 5 bande: 848bp, 614bp, 238bp, 70bp, 28bp. Per gli individui selvatici sono attese solamente 3 bande: la più alta di 848bp, e le due più basse di 70bp e 28bp.

L'utilizzo di questo mutante genetico ha lo scopo di comprendere meglio il ruolo di *olig4* durante lo sviluppo, oltre che di confermare i risultati dei microarray, eseguiti nel corso del secondo anno in embrioni nei quali in know-down di *olig4* era stato ottenuto con la strategia degli oligo morpholino antisense.

Nella figura 3.6 viene presentata una parte del cromatogramma che rivela in un carrier eterozigote *olig4*:MUT la presenza della base T in uno dei due filamenti (doppio picco), con conseguente formazione di un codone di stop TGA. Sempre in figura, a destra, è mostrata un'ibridazione *in situ* con la sonda antisense *neurogenina1* che identifica diverse popolazioni neuronali.

Nell'embrione di destra, mutante, manca il domino degli interneuroni (frecche in rosso), mentre nell'embrione di sinistra, di tipo selvatico, gli interneuroni sono ben visibili (stadio 5 somiti).

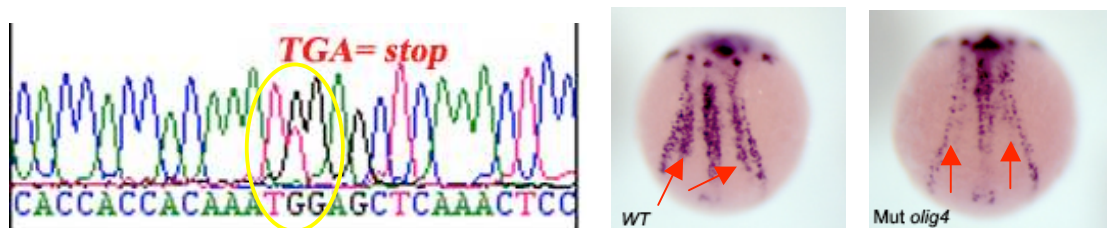


Figura 3.6: Mostra una parte del cromatogramma che rivela in un carrier eterozigote *olig4*:MUT la presenza della base T in uno dei due filamenti (doppio picco), con conseguente formazione di un codone di stop TGA. A destra, è mostrata un'ibridazione *in situ* con la sonda antisense *neurogenina1* che identifica diverse popolazioni neuronali. Nell'embrione di destra, mutante, manca il domino degli interneuroni (frecche in rosso), mentre nell'embrione di sinistra, di tipo selvatico, gli interneuroni sono ben visibili (stadio 5 somiti).

3.16 Clonaggio del nuovo membro della famiglia *olig*: *olig3*.

La sequenza di riferimento per questo nuovo membro, identificato nel corso del 2007, corrisponde al codice Genbank XM690014. Questo nuovo gene, citato per la prima volta nello studio svolto da Bronchain et al. (2007), e nominato *olig3* per comparazione filogenetica, è stato identificato in seguito all'immissione di nuove sequenze genomiche di zebrafish da parte del centro di sequenziamento del *Sanger Centre Institute*.

In zebrafish, *olig3* è stato mappato sul cromosoma 13 (dalla posizione 40,954,170 fino alla posizione 40,954,922) nello stesso cromosoma in cui è localizzato *olig4*, descritto in questa tesi (precedentemente nominato *olig3* in Filippi et al., 2005). Anche *olig3*, come *olig4*, è un gene privo di introni. Per l'amplificazione di *olig3* ed il successivo clonaggio nel vettore TA-Cloning (Invitrogen), è stata utilizzata una coppia di primer (Sigma), ed uno stampo di cDNA ricavato da zebrafish adulto:

olig3 Fw: GCAGATCTTCCTCTCCAGACAT

olig3 Rev: GTTCTCTGTGGAGATCCTGCTC

Il prodotto risultante è di 728bp. Per la PCR è stata usata la Pfu DNA Polimerase (Promega)

Programma:

- Denaturazione iniziale: 94°C per 2'
- Denaturazione: 94°C per 1'
- Appaiamento: 58°C per 1' } 38 cicli
- Estensione: 72°C per 1' }
- Estensione finale: 72°C per 3'

Una volta clonata la sequenza, è stata sintetizzata la sonda antisenso successivamente utilizzata negli esperimenti di ibridazioni *in situ* esposti nella sezione dei risultati di questo elaborato di tesi.

4. Risultati.

4.1 Espressione dei geni *olig* nello zebrafish adulto.

Per verificare l'espressione in zebrafish allo stadio adulto dei geni *olig*, è stata effettuata l'analisi con gel-elettroforesi dei prodotti di PCR ottenuti da cDNA retrotrascritto a partire dall'RNA di nove tessuti di zebrafish.

Tutti i membri della famiglia *olig* vengono espressi nel cervello. I geni *olig1* ed *olig2* sono espressi anche nell'occhio (*olig1* più debolmente di *olig2*). In base ai dati di ibridazione *in situ* è noto che oligodendrociti *olig1*-positivi popolano in gran numero il nervo ottico. *olig2* ed *olig4* sono inoltre espressi nel testicolo e nell'ovario, due tessuti ad elevata attività trascrizionale.

I risultati di RT-PCR (Fig.4.1) trovano riscontro con i dati riguardanti l'espressione anche in fase embrionale dei geni considerati. Nell'embrione, tutti e tre i geni *olig* sono espressi in popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale.

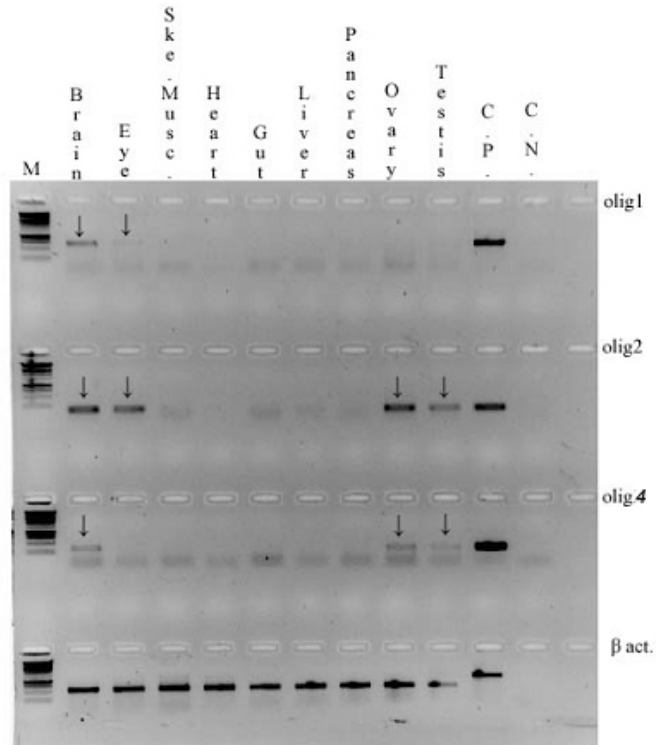


Figura 4.1: Gel-elettroforesi della RT-PCR dei geni *olig*.

I geni *olig2* e *olig4* sono espressi nell’embrione di zebrafish già a partire dalla gastrulazione, evidenza che indicherebbe un ruolo precoce, per entrambi i geni, durante lo sviluppo. La loro presenza nell’ovario potrebbe suggerire un contributo materno alla presenza dei trascritti negli stadi precoci dello sviluppo embrionale. Mediante ibridazione *in situ* è stato poi possibile evidenziare, durante le fasi dello sviluppo, i profili d’espressione dei membri della famiglia genica *olig*. Mentre il profilo d’espressione di *olig2* è già stato descritto in precedenza nello studio di Appel e Chitnis, 2002, per quanto riguarda i geni *olig3* (clonato ed analizzato in questa tesi) ed *olig1* non ci sono ancora dati rilevanti in letteratura. Solo di recente è stato chiarito il ruolo di *olig4* da altri membri del nostro laboratorio (Filippi et al., 2005).

4.2 profilo di espressione di *olig1*.

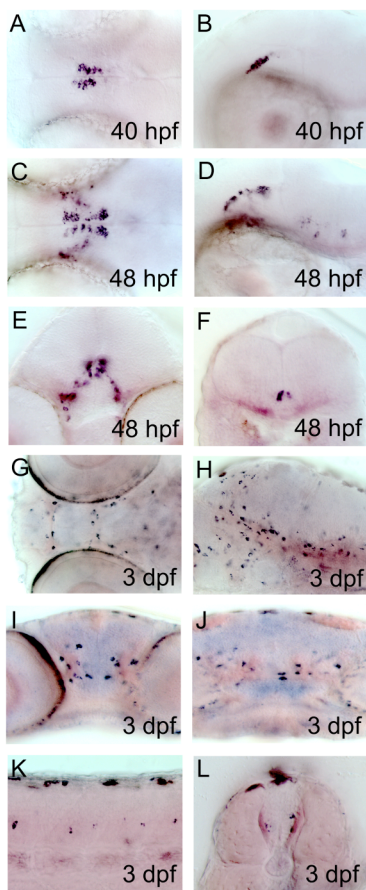


Figura 4.2: profilo di espressione di *olig1*.

In zebrafish, *olig1* mappa sul cromosoma 9, in un locus adiacente ad *olig2*. L’ortologo umano *OLIG1* è localizzato sul cromosoma 21q22.3, anche in questo caso strettamente associato ad *OLIG2*, in una regione sintenica al cromosoma 16 di topo (dove anche *Olig1* e *Olig2* murini risultano adiacenti).

Grazie ad esperimenti di ibridazione *in situ* è stato studiato il profilo di espressione di *olig1* che, in zebrafish, compare a 28 hpf in corrispondenza della regione dell’ipotalamo. Proseguendo con lo sviluppo, a 48 hpf si vede aumentare il numero di cellule *olig1*-positive ed il segnale è individuabile in modo disperso nel mesencefalo, nel romboencefalo e lungo i nervi ottici.

A 3dpf la dispersione delle cellule *olig1*-positive è ancora più evidente, anche se, ad un'attenta osservazione, la disposizione delle cellule non appare casuale ma direzionata verso specifiche regioni dell'encefalo, che rappresenteranno la futura componente oligodendrogliale dell'embrione.

A 4 dpf e 5 dpf si nota una maggiore presenza di queste cellule marcate con *olig1* in tutto l'encefalo. Inoltre, con l'utilizzo della tecnica dell'RT-PCR, è stato fatto uno screening di una libreria di cDNA da cervello adulto di zebrafish, osservando che *olig1* è trascrizionalmente attivo anche nell'adulto di zebrafish.

Tramite la comparazione del profilo di espressione del gene che codifica per la proteina associata alla guaina mielinica DM20, che consente la stretta associazione tra il plasma gliale e le lamelle, è possibile verificare che le cellule marcate da *olig1* siano effettivamente oligodendrociti.

A 48 ore post fertilizzazione il segnale di *dm20* è praticamente impercettibile, mentre a 4 giorni si può osservare un segnale consistente lungo il fascio ventrale del mesencefalo e lungo il midollo spinale. Confrontando un embrione di 3 dpf marcato con *dm20* con uno a 48 hpf marcato con *olig1*, risulta evidente il buon livello di sovrapposizione dei domini di espressione dei due marcatori, suggerendo che *olig1* in zebrafish sia effettivamente un gene espresso negli oligodendrociti, comparabilmente ai suoi ortologhi in altri vertebrati.

Inoltre, si ha una misura di quanto l'espressione iniziale di *olig1* preceda quella di altri tipici marcatori per gli oligodendrociti. Con un giorno di anticipo rispetto a marcatori oligodendrogliali, cellule *olig1*-positive sono già in consistente numero e distribuite nel diencefalo (nervi ottici), nel mesencefalo e nel romboencefalo.

E' pertanto possibile concludere che, anche in zebrafish, similmente a quanto osservato in altri vertebrati, *olig1* rappresenta il marcatore attualmente più precoce per l'identificazione dei precursori degli oligodendrociti.

4.3 Profilo di espressione di *olig4*.

Anche per *olig4* il profilo d'espressione è stato determinato sottoponendo ad ibridazione *in situ* embrioni di ceppo selvatico a diversi stadi di sviluppo.

Olig4 è rilevabile inizialmente allo stadio di scudo embrionale (shield, 6 hpf) in una striscia di cellule che circonda l'embrione in posizione ventrale, e in due sottili domini dorsali (Fig.4.3).

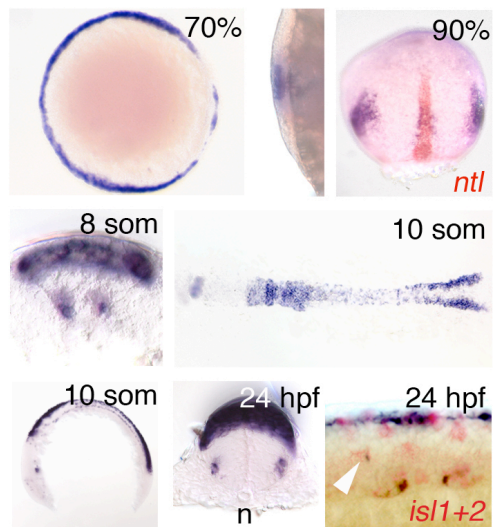
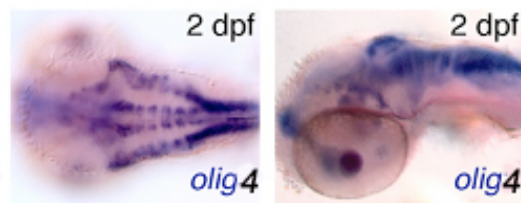


Figura 4.3: profilo d'espressione di *olig4* . Espressione del gene *olig4* dallo stadio di 70% di epibolia a 2 dpf in embrioni di ceppo selvatico.



Sulla base delle mappe dei destini neurali (Woo e Fraser, 1995), le regioni *olig4*-positive nella gastrula precoce corrisponderebbero ai territori presuntivi dell'encefalo e del tubo neurale. Man mano che la gastrulazione procede, il dominio ventrale si divide in due larghe bande laterali, mentre i domini dorsali si allungano in senso antero-posteriore, in posizione mediana. Durante lo sviluppo embrionale, il profilo di espressione di *olig4* è molto dinamico ma sempre confinato nel neuroectoderma. In nessuno degli stadi esaminati si è riscontrata espressione a livello dell'endoderma o del mesoderma.

Durante la somitogenesi, i due domini laterali di *olig4* si allungano originando due strisce neuroectodermiche (Fig.4.3, 10 somiti) che, con il procedere dello sviluppo, si avvicinano sempre più tra loro fino ad unirsi dorsalmente, mentre il dominio mediano risulta posizionato ventralmente. Durante il processo di neurulazione, quindi, le cellule *olig4*-positive vanno a popolare la regione dorsale del tubo neurale e parte della regione ventrale (Fig. 4.3).

A partire dallo stadio di 24 hpf, l'intensità del segnale è particolarmente diffusa e intensa nella regione dorsale del romboencefalo, mentre nella regione ventrale è identificabile un segnale intervallato ricalcante l'organizzazione dei rombomeri (Fig. 4.3, 2 dpf).

Nel complesso, il profilo di espressione di *olig4* in zebrafish è molto simile a quello di *Olig3* in topo (Takebayashi et al., 2002), suggerendo così una regolazione evolutivamente conservata per questo gene.

4.4 Comparazione di *olig4* con altri marcatori.

La comparazione dell'espressione di *olig4* con quella di altri marcatori neurali è risultata di grande interesse in particolare per quanto riguarda la sua sub-localizzazione della regione ventrale del tubo neurale.

Dopo aver analizzato il profilo d'espressione dei geni *olig* singolarmente, sono state eseguite delle ibridazioni *in situ* doppie, per evidenziare come i vari domini siano disposti all'interno del tubo neurale.

Per il confronto tra *olig4* e *olig2*, nella parte ventrale del tubo neurale, i due tipi di domini sono stati evidenziati con diverso colore, sia in sezioni trasversali a diverse altezze di taglio del tronco verso la porzione cefalica, sia in visioni laterali in cui la testa è sempre a sinistra e la coda a destra (Fig. 4.4).

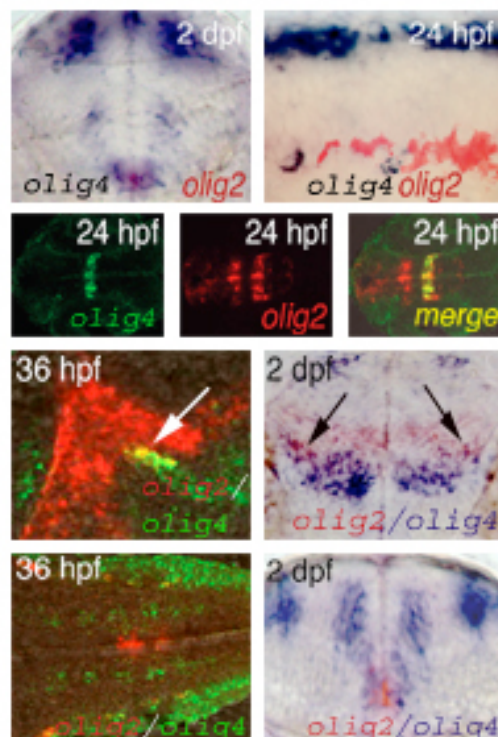


Figura 4.4: Comparazione del profilo di espressione di *olig4* e di *olig2*.

In una sezione trasversale del tronco allo stadio di 48 ore, osservando l'espressione di *olig2*, in rosso, nel dominio dei motoneuroni, e quella di *olig4*, in blu, si può notare che quest'ultimo risulta essere adiacente ad *olig2* solamente nel suo dominio ventrale.

Osservando una visione laterale di un embrione di 24 ore, *olig4* marca alcune cellule del dominio motoneuronale, che sono ben distinte rispetto a quelle marcate da *olig2*.

Dalla figura 4.4 degli embrioni di 24 hpf in visione dorsale, sottoposti ad ibridazione *in situ* in fluorescenza (TSA system), si nota che nella regione encefalica è presente un piccolo dominio di sovrapposizione tra *olig4* e *olig2* marcato in giallo, in posizione laterale, adiacente agli occhi. Sezioni longitudinali e trasversali di embrioni, sottoposti ad ibridazione fluorescente o classica a due colori, confermano ad altri stadi (36 hpf e 2dpf) la posizione di tali aree di sovrapposizione.

Nelle rimanenti figure possiamo vedere la disposizione spaziale dei domini di *olig4* e *olig2* nel romboencefalo dell'embrione, in visione dorsale ed in sezione trasversale. Queste immagini evidenziano come nel romboencefalo le cellule *olig4*-positive e quelle *olig2*-positive occupino regioni distinte.

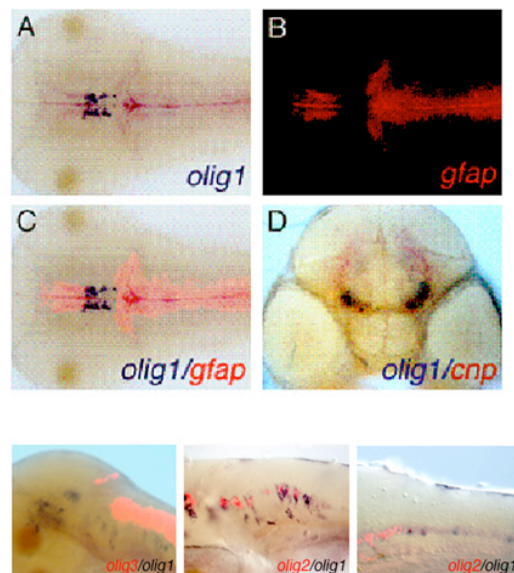


Figura 4.5: ibridazione *in situ* doppia. A, B, C visione dorsale con il gene *olig1* marcato in blu, e *gfap* in rosso. D, sezione trasversale a livello dell'encefalo. Le rimanenti figure sono sezioni a livello del tronco.

Il marcatore *olig1* è stato messo in relazione con un marcatore degli astrociti, *gfap*, per vedere se, oltre che nell'oligodendroglia, *olig1* fosse espresso nella linea astrogliale.

I risultati delle ibridazioni in situ doppie, in embrioni di 2 giorni dalla fecondazione, evidenziano che i due domini, contraddistinti dai colori rosso per *gfap* (astrociti), e blu per *olig1* (oligodendrociti), sono adiacenti ma mai sovrapponibili.

Confrontando poi l'espressione di *olig1* con quella di *olig4*, entrambi i domini, anche in questo caso, sono ben distanziati senza sovrapposizioni, mentre possiamo dire che l'espressione di *olig1* segue quella di *olig2* ed è in parte sovrapponibile (Fig. 4.5, ultime tre immagini)

Dal precedente lavoro di Filippi et al. (2005) è stato chiarita la funzione di *olig4* quale repressore delle creste neurali (NC). Infatti, se *olig4* è inattivato, (utilizzando la tecnica degli oligo Morfolino antisense), si osserva un netto incremento delle NC, mentre diminuiscono le popolazioni cellulari del tubo neurale dorsale, quali interneuroni ed astrociti. Partendo da questo risultato, è stato svolto uno studio accurato del profilo di espressione di *olig4*, in relazione ai diversi marcatori molecolari delle popolazioni di cellule neuronali derivanti dalle creste neurali, come i neuroni sensitivi, e dalla piastra neurale laterale, quali astrociti e interneuroni. In parallelo è stata fatta un'analisi di microarray tra una condizione in cui *olig4* è stato silenziato con l'utilizzo del Morfolino, e quella selvatica per cercare di individuare quali potessero essere i geni bersaglio interessati dall'azione di *Olig4*.

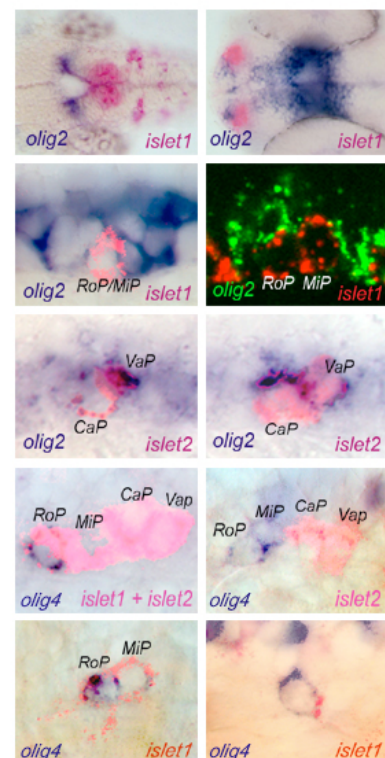


Figura 4.6: ibridazioni *in situ* doppie che mostrano il profilo di espressione dei geni *olig2* e *olig4* in relazione a marcatori dei motoneuroni, degli interneuroni dorsali e delle cellule di Rohon-Beard *islet1*, *islet2*.

Islet-1 e *Islet-2* (Fig. 4.6) sono due geni che codificano per fattori di trascrizione espressi nel sistema nervoso che, nel tubo neurale, marcano i neuroni sensitivi primari (cellule Rohon-Beard, RB) nella regione dorsale, la classe D2 di interneuroni dorsali e i motoneuroni nella regione ventrale (Appel et al., 1995).

In zebrafish, le popolazioni sia dei motoneuroni primari, sia di quelli secondari sono suddivisi in

diversi sottotipi caratterizzati da Eisen et al. (1986) considerando la posizione del soma e la morfologia dell'assone. Sono stati classificati tre tipi di motoneuroni primari, denominati RoP, MiP e CaP, in ciascun emi-segmento spinale dell'embrione (Fig. 4.8 da Lewis et al., 2003). Il motoneurone di tipo RoP ha il corpo cellulare localizzato nella posizione più rostrale, e innerva le fibre muscolari nella regione mediana del miotomo, le cellule MiP hanno un soma che si trova in una posizione intermedia tra i corpi cellulari di RoP e CaP e innerva le fibre muscolari del miotomo dorsale, infine, il motoneurone di tipo CaP ha il corpo cellulare posto più caudalmente, rispetto alle precedenti due categorie, e innerva le fibre muscolari del miotomo ventrale (Lewis et al., 2003). Inoltre, circa a metà degli emi-segmenti spinali contengono un quarto motoneurone primario, denominato VaP che, inizialmente è equivalente ad un motoneurone CaP, ma in seguito va incontro ad apoptosi (Eisen et al., 1990).

Considerata questa disposizione spaziale dei motoneuroni nella zona ventrale del tubo neurale, ho eseguito delle ibridazioni *in situ* con i geni *islet1* e *islet2* e con i geni *olig2* e *olig4*.

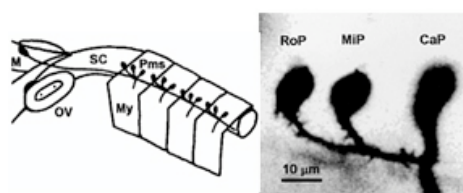


Figura 4.7: Da Lewis et al., 2003. Schematizzazione dei tre tipi di motoneuroni primari dell'embrione di zebrafish, denominati RoP, MiP, CaP.

In base ai risultati di co-localizzazione, possiamo associare l'espressione di *olig4* alle cellule RoP e MiP, mentre quella di *olig2* alle cellule CaP e VaP.

Infine, è stato analizzato il profilo di espressione di *olig4* in relazione al gene *id3*, espresso nelle creste neurali a stadi precoci di sviluppo.

Dalla figura 4.9, allo stadio di tail bud (fine gastrulazione) si può vedere che *olig4* ha un dominio adiacente ad *id3* ma rispetto a questo marcatore rimane delimitato in territori distinti. Dalla tarda gastrulazione, le cellule che andranno a formare le creste neurali vengono pertanto identificate da *id3* come due regioni più esterne rispetto ad *olig4*, espresso invece nel margine laterale della piastra neurale.

Con il procedere dello sviluppo, i territori marcati da *olig4* si manterranno ben distinti da quelli di *id3* (non mostrato) e, col processo della neurulazione, da domini laterali della piastra passeranno a domini dorsali del tubo neurale, in posizione adiacente e più ventrale rispetto al marcatore della cresta *id3*.

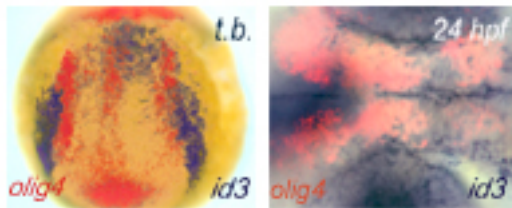


Figura 4.8: Ibridazione in situ allo stadio di tail bud, *olig4* ha un dominio adiacente ad *id3* ma rispetto a questo marcatore rimane delimitato in territori distinti. Le cellule che andranno a formare le creste neurali vengono pertanto identificate da *id3* come due regioni più esterne rispetto ad *olig4*.

Oltre all'analisi fine del profilo d'espressione di *olig4*, in relazione agli altri membri della famiglia genica e ai marcatori del tubo neurale durante il suo differenziamento, si è cercato di capire quali potessero essere i segnali con i quali il gene *olig4* interagisce durante le prime fasi dello sviluppo embrionale di zebrafish. Con l'utilizzo di sostanze teratogene in grado di bloccare le principali vie di segnale, sono state perturbate le condizioni standard di sviluppo e, dopo il trattamento, è stata analizzata la variazione del profilo di espressione di *olig4*.

A tale scopo, embrioni di zebrafish sono stati trattati con sostanze chimiche ciclopamina, DAPT e SB, specifiche per le vie di segnale Hedgehog, Notch e Nodal, rispettivamente. In seguito, gli embrioni sono stati fissati e sottoposti ad ibridazione *in situ* con la sonda del gene *olig4* (e anche con quelle degli altri membri della famiglia *olig*). I risultati ottenuti dimostrano che le tre vie di segnale considerate sono in grado di regolare l'espressione dei membri di questa famiglia genica.

Negli embrioni analizzati, la ciclopamina, un noto inibitore della via di segnale Hedgehog (Incardona et al., 1998), ha effetto sull'espressione di tutti i geni *olig*. La dipendenza di *olig2* dal segnale Hedgehog era stata precedentemente dimostrata su mutanti di tale via (Park et al., 2002) ed è stata riconfermata in queste analisi dalla totale assenza del segnale di *olig2* lungo il tubo neurale, e dalla diminuzione della sua espressione nell'encefalo degli embrioni trattati.

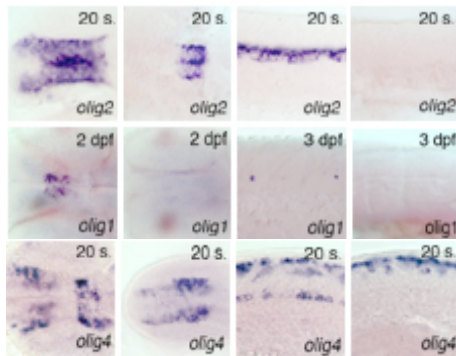


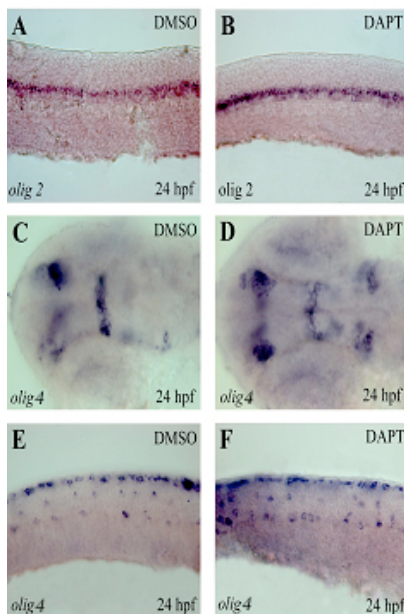
Figura 4.9: Trattamento con ciclopamina, un inibitore della via di segnale Hedgehog per i geni *olig2*, *olig1*, e *olig4*. Per tutti i trattamenti è stato utilizzato lo stadio di 20 somiti.

In seguito a trattamento con ciclopamina inoltre, il gene *olig1*, espresso successivamente ad *olig2*, ed in un suo sottodominio (Argenton et al., dati in manoscritto), sparisce totalmente dall'encefalo, mostrando anch'esso stretta dipendenza dal segnale Hedgehog (Fig 4.10).

Il segnale di *olig4* nell'encefalo è ridotto ma è comunque presente nel tronco, dove il dominio dorsale del gene *olig4*, che è noto essere regolato dalla via di segnale Bmp (Filippi et al., 2005), non viene alterato dal trattamento, mentre sparisce completamente il segnale ventrale, coerentemente con il fatto che tale dominio sia più prossimo alla notocorda e alla lamina del pavimento, tipiche sorgenti di segnale Hedgehog.

Il teratogeno DAPT, un inibitore dell'enzima gamma-secretasi, necessario per il rilascio della porzione intracellulare di Notch, è utilizzato quando si vuole inibire chimicamente la via di segnale Delta/Notch. (Geling et al., 2002). Negli embrioni trattati ed analizzati a stadi tardivi si evidenzia che, nella regione encefalica, gli oligodendrociti *olig1*-positivi sono presenti, se pur lievemente ridotti in numero. I domini encefalici di *olig2* e di *olig4* sono confrontabili con i risultati ottenuti sugli embrioni di controllo. Particolarmente interessante risulta essere l'analisi di *olig2* e di *olig4* nel tubo neurale ad uno stadio più precoce. Allo stadio di sviluppo di 24 hpf, il segnale *olig2* è presente nei campioni trattati e risulta essere lievemente

aumentato rispetto ai controlli, dato che suggerirebbe un controllo negativo di Notch sull'espressione di *olig2*. Nel tubo neurale, infatti, la sua espressione risulta dipendere dal gene Delta, come osservato da Appel e collaboratori (Park et al., 2003). Allo stesso stadio, il segnale di *olig4* risulta lievemente più intenso nei soggetti trattati con DAPT, evidenza che era stata precedentemente rilevata anche in fase di gastrulazione (Filippi et al., 2005). Allo stadio qui considerato, gli embrioni trattati con DAPT mostrano un aumento nel numero di cellule ventrali



olig4-positive, situate nel dominio dei motoneuroni spinali, dove anche *olig2* è espresso. Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che l'espressione di *olig2* e di *olig4* nel dominio ventrale del tubo neurale, sia negativamente regolata da Notch.

Figura 4.10: Trattamento con DAPT su embrioni di 24 hpf ibridati con le sonde rispettivamente di *olig2* e *olig4*.

il segnale *olig2* nel tronco, è presente nei campioni trattati e risulta essere lievemente aumentato rispetto ai controlli, dato che suggerirebbe un controllo negativo di Notch sull'espressione di *olig2*. il segnale di *olig4* risulta lievemente più intenso nei soggetti trattati con DAPT nel suo dominio ventrale.

L'ultimo trattamento utilizzato per comprendere a quale via regolativa influenzasse l'espressione del gene *olig4* durante le fasi più precoci di sviluppo, è stato quello con il teratogeno SB-43154, un inibitore della via di segnale di Nodal.

In questo esperimento (Fig. 4.12) gli embrioni sono stati trattati con SB, disciolta in DMSO (dimetilsolfossido) dallo stadio di divisione (cleavage) in poi. I controlli sono stati trattati con il solo DMSO. (Ho et al., 2006)

Lo stadio considerato per questa analisi è 70% epibolia, stadio in cui *olig4* è il solo membro della famiglia *olig* espresso. Negli embrioni trattati con SB, il dominio di espressione di *olig4* si presenta ampliato verso il margine dell'embrione in gastrulazione. Inoltre, rispetto ai controlli, dove il suo dominio è limitato dalla presenza dell'effetto di Nodal, l'intensità del segnale di *olig4* appare aumentata. Come controllo positivo utilizzato per questa analisi di espressione, è stato scelto il marcatore *gooseoid* (*gsc*), un gene strettamente dipendente dalla

via di segnale Nodal (Gritsman et al., 2000), il cui domino d'espressione risulta completamente abolito negli embrioni di zebrafish trattati con SB.

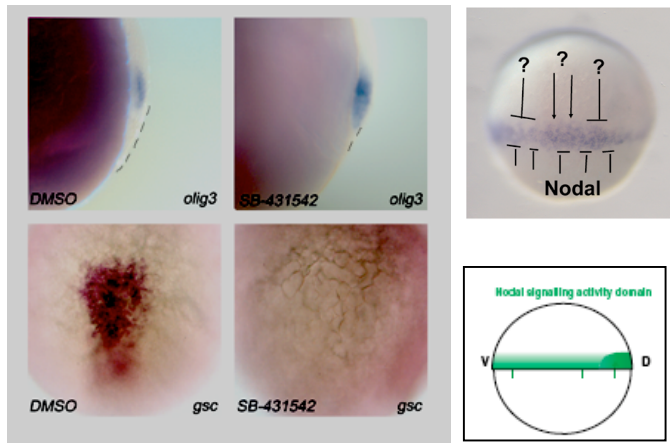


Figura 4.11: Trattamento con l'inibitore SB per la via di segnale di nodal. Visioni dorsali della gastrula, anteriore in alto. Per il controllo positivo è stato scelto il marcatore *gooseoid* (*gsc*), un gene strettamente dipendente dalla via di segnale Nodal

Parallelamente all'analisi del trattamento con la sostanza SB, è stato svolto uno studio utilizzando, come agente teratogeno, la sostanza SU-5402 che inibisce la via di segnale di FGF.

In seguito all'inibizione della via di segnale FGF, gli embrioni di zebrafish si sviluppano privi dei tessuti del tronco e della coda (Amaya et al., 1991; Amaya et al., 1993; Griffin et al., 1995).

È stato dimostrato che, in zebrafish, il segnale FGF è richiesto, tra le altre cose, anche per l'induzione neurale (Streit et al., 2000; Wilson et al., 2001; Böttcher and Niehrs, 2005), per l'induzione indipendente da quella dell'organizzatore dei tessuti neurali posteriori (Kudoh et al., 2002; Kudoh et al., 2004), per la formazione del neuroectoderma anteriore (Hongo et al., 1999) e per lo sviluppo del mesoderma posteriore (Draper et al., 2003).

Dopo aver trattato gli embrioni in gastrulazione con l'inibitore SU-5402 ho potuto constatare che, per il corretto mantenimento dell'espressione di *olig4* è strettamente necessaria la presenza di FGF, in quanto la marcatura di *olig4* sparisce completamente dopo il trattamento. Come controllo interno è stato scelto il gene *pea3*, un marcatore che risponde al segnale di FGF e che è dinamicamente

espresso in svariate strutture ectodermiche e mesodermiche dell’embrione di zebrafish.

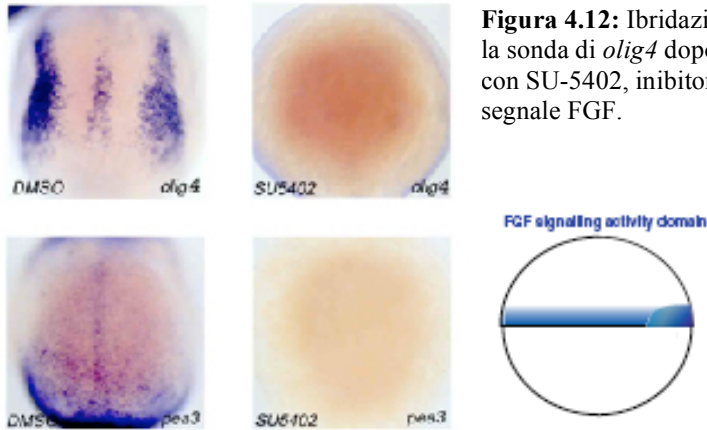


Figura 4.12: Ibridazione *in situ* con la sonda di *olig4* dopo trattamento con SU-5402, inibitore della via di segnale FGF.

4.5 Analisi microarray del knock-down genico di *olig4*.

I risultati degli esperimenti di microarray vengono elaborati considerando come parametro principale l’intensità delle diverse fluorescenze rilevate dopo la scansione dei vetrini in ogni replica. I due canali 1 e 2 nell’esperimento rappresentano rispettivamente le fluorescenze rilevate nei morfanti di *olig4* e nei controlli marcati con due fluorofori differenti ed indicati come “Ch1” e “Ch2”.

L’intensità misurata per ogni canale viene utilizzata per calcolare due valori che definiscono:

- a) quanto più differenzialmente espressi sono determinati geni rispetto al tipo selvatico (*log₂ ratio*)
- b) quanta variabilità c’è stata durante le varie repliche eseguite (*d-value*).

Il *log₂ ratio* rappresenta il logaritmo in base 2 del rapporto tra le somme delle intensità per ogni canale nelle varie repliche; esso fornisce una misura diretta (log in base due) di quanto sia effettivamente sovra o sottoespresso un particolare gene. Questo valore non tiene conto della variabilità durante le quattro repliche, pertanto viene introdotta la misura del *d-value* come rapporto tra il *log₂ ratio* e la deviazione standard calcolata per tutte le repliche dell’array. Per interpretare al

meglio i dati si devono quindi considerare entrambi i valori, perché un gene espresso in modo differenziale secondo il valore di \log_2 ratio, potrebbe essere però statisticamente poco significativo (e quindi poco attendibile) se nelle varie repliche mostra un'elevata deviazione standard (e quindi un basso d -value).

L'utilizzo del logaritmo in base 2 implica che un valore di \log_2 ratio pari a 1 corrisponde ad un gene due volte sovraespresso nel morfante rispetto al controllo (rapporto Ch1/Ch2); lo stesso principio si può applicare per i geni sottoespressi, che daranno valori negativi del log.

Per l'esperimento sui morfanti di *olig4* è stato considerato un valore soglia di \log_2 ratio pari a 0.7 e un d -value pari a 1.5, in modo da tenere in considerazione solamente le alterazioni di espressione più significative ed attendibili.

In base a questi parametri, l'analisi dell'array, su embrioni allo stadio di 4 somiti, ha prodotto, come risultato, 44 geni espressi in modo differenziale nei morfanti per il gene *olig4* rispetto agli embrioni di controllo, di cui 34 sovraespressi e 10 sottoespressi. Per i morfanti allo stadio di 20 somiti è risultata alterata l'espressione di 80 geni, di cui 28 sovraespressi e 52 sottoespressi.

Di seguito è presentata una tabella nella quale sono riportati alcuni dei geni espressi in modo differenziale che rientrano nel range da noi stabilito di valori soglia (\log_2 ratio pari a 0.7 e un d -value pari a 1.5), quindi particolarmente interessanti, perché risultano di particolare interesse in quanto coinvolti in vie di trasduzione del segnale (*dvr1*) e in particolare nello sviluppo del sistema nervoso, o alcuni di loro codificano per proteine di adesione cellulare come *cdh2*, *ankd11*, *ta-krp*. nei morfanti di *olig4*. I geni sovraespressi nei morfanti sono riportati in rosso e quelli sottoespressi in verde. In grassetto sono indicati i geni che sono stati anche sottoposti a verifica mediante ibridazione *in situ*.

Nell'altra tabella (Tabella 2) sono inoltre presenti alcuni geni che sono risultati differenzialmente espressi in entrambi gli esperimenti, a 5 e a 20 somiti.

Alcuni dei geni identificati, codificano per proteine di adesione cellulare, spesso coinvolte in processi morfogenetici (*cdh2*, *ankd11*, *ta-krp*); altri sono invece geni tipicamente neuronali (*vamp3*).

GenBank codice	Nome Unigene	d value	log2_ratio
<i>BM186492</i>	Fatty acid binding protein 10, liver basic (<i>GH-responsive protein II-like</i>)	3,74	1,5
AI943148	Wu:fc85b02 <i>hmg20</i> (<i>brca2-associated factor</i>)	3,42	1,2
BI886030	Non identificato. Da BLAST: <i>ankrd11</i>	2,51	1,3
Y07906	<i>zp-12</i> POU	2,51	1,1
U00931	Decapentaplegic and Vg-related 1 (<i>dvr1</i>)	2,23	1,1
BM095389	<i>ke4</i> Zinc transporter <i>SLC39A7</i> (Solute carrier family 39 member 7)	2,07	0,8
<i>AF201764</i>	Non-metastatic cells 2, protein (NM23B)	2,05	0,7
<i>BM103297</i>	Zgc:73378 <i>vamp3</i>	2,03	0,9
<i>AW115868</i>	Zgc:55290. Similar to Protein CGI-27	1,94	0,8
<i>BM154725</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1b	1,71	0,7
<i>AF287006</i>	T-box 1, brain (<i>tbr1</i>)	1,56	0,9
BG303872	Wu:fc57a10. Da BLAST: <i>ta-krp</i> (<i>kelch</i>)	-2,35	-1
X67648	Cadherin 2, neuronal (<i>cdh2</i>)	-2,48	-0,9

Tabella 1 :Sono rappresentati alcuni dei geni risultati differenzialmente espressi dell'analisi microarray sui morfanti di *olig4* allo stadio di 4 somiti. Rispettivamente: il codice Genbank dei singoli geni, il loro nome associato al database Unigene, il valore del d value e il valore del Log2_ratio. In ordine dal gene maggiormente sovraespresso, a quello meno sovraespresso, in colore rosso. In verde i geni sottoespressi, dal minore al maggiore.

<i>BM186492</i>	Fatty acid binding protein 10, liver basic	3,36	1,53
BI886030	Non identificato. Da BLAST: <i>ankrd11</i>	3,21	1,37
BG728815	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	2,55	1,34
<i>AW115868</i>	Zgc:55290 Similar to Protein CGI-27	2,09	1,57
<i>BM154725</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1b	1,85	0,76
X67648	Cadherin 2, neuronal (<i>cdh2</i>)	-1,51	-0,71

Tabella 2: Sono rappresentati alcuni dei geni risultanti dall'analisi microarray sui morfanti di *olig4* allo stadio di 20 somiti, in comune con l'esperimento precedente dove sono stati utilizzati embrioni di 4 somiti. Rispettivamente: il codice Genbank dei singoli geni, il loro nome associato al database Unigene, il valore del d value e il valore del Log2_ratio che è compreso fra la soglia da noi stabilita di: *log2_ratio* pari a 0.7 e un *d-value* pari a 1.5.

Il gene definito *GH responsive protein II-like* è stato considerato per la convalida mediante ibridazione *in situ* perché presentava il più alto valore di *log2 ratio* e di *d-value*, in entrambi gli esperimenti, a 5 e a 20 somiti. Questo gene in zebrafish non è ancora stato identificato, ma l'analisi bioinformatica ha rivelato una similarità con un gene di uomo e topo codificante per la Gastrotropina (Fatty acid-binding protein), e un gene di *Ctenopharyngodon idella* codificante per una proteina GH-responsive protein II-like.

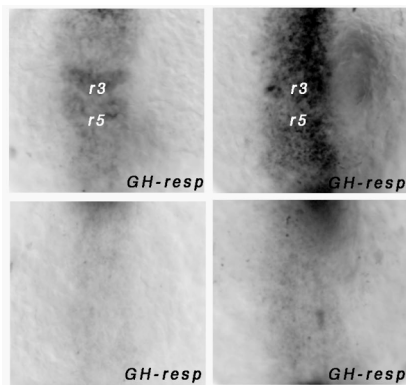


Figura 4.13: ibridazione *in situ* con sonda antisenso del gene *GH responsive protein II-like* su embrioni di controllo (a sinistra) e morfanti (a destra) allo stadio di 5 somiti. La sonda marca la regione anteriore dell'embrione in posizione dorsale. I rombomeri 3 e 5 (r3, r5), marcati con la sonda del gene *krox20*, sono utilizzati come indicatori di posizione.

L'ibridazione *in situ* su embrioni di zebrafish a 5 somiti ha rivelato un'espressione ubiquitaria del gene *GH responsive protein II-like* (Fig 4.14), ed ha confermato la sua sovraespressione nei morfanti di *olig4*, poiché sono evidentemente più scuri degli embrioni iniettati con il morpholino *mismatched* di controllo.

Il gene *hmg20* è il secondo tra quelli maggiormente sovraespressi nell'esperimento di microarray allo stadio di 5 somiti, mentre non è risultato sovraespresso nell'esperimento a 20 somiti. La EST di zebrafish non è ancora stata caratterizzata ma l'analisi bioinformatica ha rivelato una similarità con geni di uomo e topo codificanti per una proteina contenente un dominio chiamato High Mobility Group. Nell'uomo e nel topo la proteina hmg sembra essere coinvolta nella regolazione della trascrizione (in particolare nella repressione di geni neurali) attraverso processi di rimodellamento della cromatina.

Anche se la sua espressione non è particolarmente intensa negli embrioni di controllo a 5 somiti, la comparazione con gli embrioni morfanti ha confermato la sovraespressione del gene *hmg20* (Fig. 4.15).

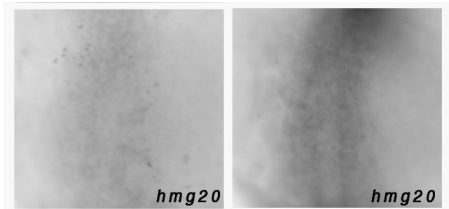


Figura 4.14: Espressione di *hmg20* in controlli (a sinistra) e morfanti (a destra) a 5 somiti. Vista dorsale, regione anteriore in alto.

Il terzo gene considerato è risultato uno tra i più sovraespressi in entrambi gli esperimenti di microarray. Questo gene, indicato come *ankrd11* (*ankyrin repeat domain 11*), codifica per una proteina di zebrafish non ancora caratterizzata, contenente un dominio anchirinico, dominio che caratterizza le proteine di membrana della famiglia delle anchirine.

L'ibridazione *in situ* su embrioni di zebrafish a 5 somiti ne ha rivelato un'espressione ubiquitaria, ed ha confermato la sua sovraespressione nei morfanti di *olig4* (Fig. 4.16).

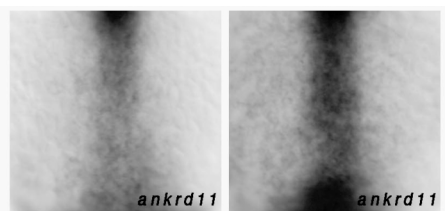


Figura 4.15: Ibridazione *in situ* con la sonda del gene *ankrd11* su embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti.

Il quarto gene considerato appartiene alla famiglia genica *POU* (*pou12*), i cui membri codificano per fattori di trascrizione che regolano diverse vie di segnale coinvolte in processi di sviluppo; in particolare i geni *pou* di classe III, in zebrafish, sono coinvolti nello sviluppo dell'encefalo (Spaniol et al. 1996).

Dall'analisi microarray il gene *pou12* è risultato sovraespresso solamente nell'esperimento a 5 somiti e l'ibridazione *in situ* ne ha confermato l'alterata espressione nei morfanti di *olig4*. L'espressione di *pou12* rimane principalmente circoscritta nella parte anteriore dell'embrione (Fig. 4.17).

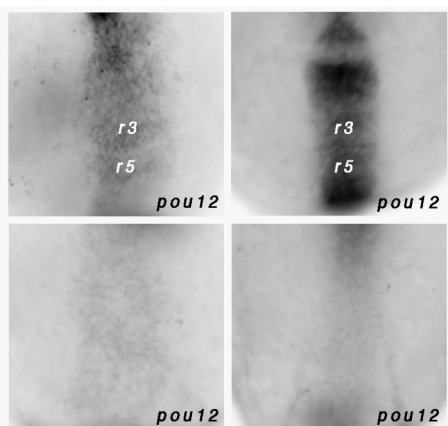


Figura 4.16: ibridazione in situ con la sonda del gene *pou12* su embrioni di controllo (sinistra), e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti. Vista dorsale anteriore (sopra) e posteriore (sotto). I rombomeri 3 e 5, marcati con la sonda del gene *krox20*, sono utilizzati come marcatori di posizione.

Il quinto gene considerato è *dvr1* (*decapentaplegic and Vg-related*), codificante per una proteina con dominio TGF β responsabile dell'induzione del mesoderma. Esso è risultato sovraespresso solamente nell'esperimento di microarray allo stadio di 5 somiti. L'ibridazione *in situ* ha confermato l'alterata espressione nei morfanti di *olig4* (Fig. 4.18).

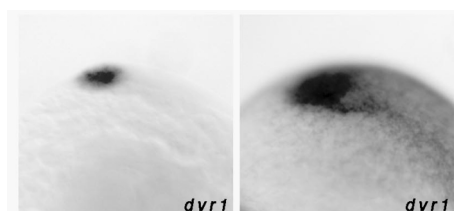


Figura 4.17: espressione del gene *dvr1* a livello dell'abbozzo della coda in embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti.

Anche il gene *vamp3* è risultato sovraespresso nell'esperimento di microarray a 5 somiti ma non a 20 (Fig. 4.19). Questo gene codifica per una proteina che mostra elevata similarità con la *Vamp2* (Vesicle-Associated Membrane Protein 2) di uomo e topo, coinvolta nella fusione delle vescicole alle terminazioni sinaptiche. In zebrafish, il trascritto di *vamp3* è localizzato nella piastra neurale dell'embrione ed il suo livello aumenta nei morfanti di *olig4*.

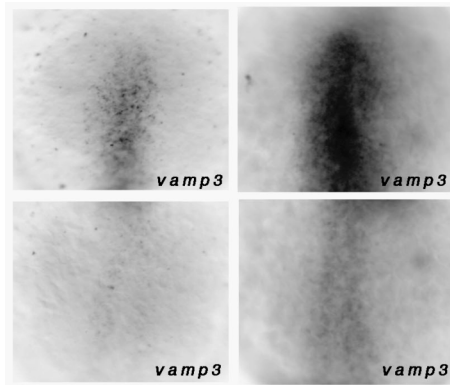


Figura 4.18: ibridazione in situ con la sonda del gene *vamp3* su embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti. Vista dorsale anteriore (sopra) e posteriore (sotto).

Il gene *tbr1* appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione T-box; è omologo del gene murino *Brachyury* ed è coinvolto nello sviluppo dell'encefalo. Questo gene risulta essere espresso in modo differenziale nei morfanti di *olig4*, sia negli esperimenti di microarray (a 5 somiti) sia nell'ibridazione in situ (Fig. 4.20).

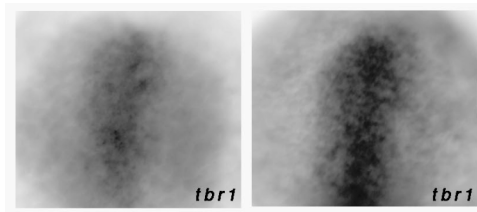


Figura 4.19: espressione del gene *tbr1* nella regione anteriore di embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti.

L'ultimo dei geni sovraespressi nei microarray (5 somiti), considerato per la convalida mediante ibridazione *in situ*, è il gene *slc39a7*, gene che codifica per una proteina di membrana con la funzione di trasportatore di zinco. L'ibridazione *in situ* ne ha confermato l'alterata espressione nei morfanti di *olig4*, in particolare a livello della regione cefalica (Fig. 4.21).

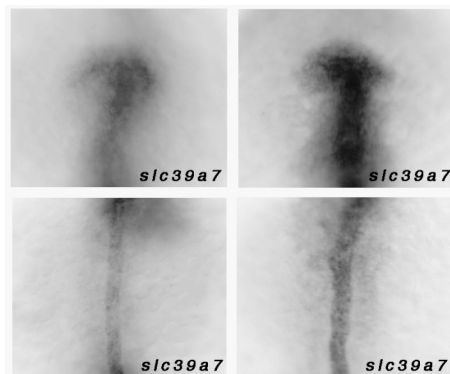


Figura 4.20: ibridazione *in situ* con la sonda del gene *slc39a7* su embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti. Vista dorsale anteriore (sopra) e posteriore (sotto).

L'analisi microarray a 5 somiti ha rivelato un numero di geni sottoespressi minore rispetto al numero di quelli sovraespressi. Tra questi ne sono stati scelti 2: il gene codificante per la caderina neuronale (*cdh2*) ed il gene *ta-krp* per la convalida tramite ibridazione in situ. Il gene *cdh2* è risultato essere significativamente sottoespresso in entrambi gli esperimenti di microarray (5 e 20 somiti) e nell'ibridazione *in situ* (Fig. 4.22).

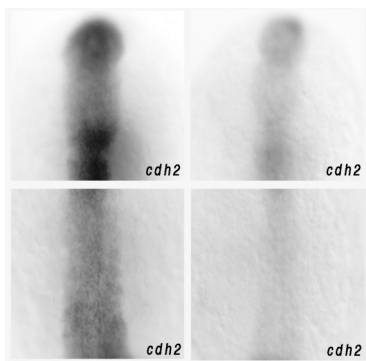


Figura 4.21: ibridazione *in situ* con la sonda del gene *cdh2* su embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti. Vista dorsale anteriore (sopra) e posteriore (sotto).

Il gene *ta-krp* (*T-cell activation kelch repeat protein*) è risultato sottoespresso solamente nei microarray allo stadio di 5 somiti. Nell'ibridazione *in situ* il gene *ta-krp* risulta espresso nella piastra neurale anteriore, nei precursori delle cellule germinali, nell'abbozzo della coda e in precursori di cellule muscolari. La sua sottoespressione sembra limitata al dominio di espressione più laterale, mentre il dominio mediale rimane sostanzialmente inalterato (Fig. 4.23).

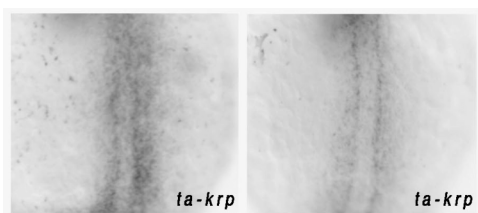


Figura 4.22: espressione del gene *ta-krp* in embrioni di controllo (sinistra) e morfanti (destra) allo stadio di 5 somiti. La marcatura evidenzia le cellule adassiali e i precursori delle cellule germinali nella regione del tronco. Vista dorsale.

La conferma dell'alterata espressione dei geni fin qui considerati negli embrioni morfanti per il gene *olig4* è il risultato di esperimenti multipli di ibridazione in situ.

Di seguito è presentata una tabella nella quale sono riportate le percentuali dei morfanti di *olig4* che presentano un aumento, per quanto riguarda i primi 10 geni,

o una diminuzione, riferita agli ultimi 2 geni, di espressione dei geni considerati. Tutte le percentuali superano il valore di 80% a conferma della bontà dell'esperimento.

Gene	MO / MOtot (%)	Contr / ContrTot (%)
GH-respons. prot. II-like	24/27 (89%)	22/22 (100%)
<i>hmg20</i>	23/23 (100%)	19/19 (100%)
<i>ankrd11</i>	17/18 (94%)	19/21 (90%)
<i>pou12</i>	24/26 (92%)	22/22 (100%)
<i>dvr1</i>	27/32 (84%)	34/36 (94%)
<i>slc39a7</i>	36/37 (97%)	31/31 (100%)
<i>vamp3</i>	23/28 (82%)	31/31 (100%)
<i>tbr1</i>	22/22 (100%)	22/22 (100%)
<i>cdh2</i>	30/30 (100%)	30/30 (100%)
<i>ta-krp</i>	29/30 (97%)	43/43 (100%)

Tabella 3: Tabella riassuntiva dei risultati precedentemente esposti, Il valore: MO / MOtot rappresenta il numero di morfanti (MO*olig4*) con fenotipo come nelle figure precedenti, rispetto ai morfanti totali. Contr / ContrTot rappresenta il numero di controlli (MO*mism*) con fenotipo come nelle figure, rispetto ai controlli totali. Le iniezioni di MO*olig4* e MO*mism* sono state eseguite ad una concentrazione di 2 µg/µl, in embrioni a 1 fino 2 cellule, e successivamente bloccati e ibridati con le sonde viste fino ad ora allo stadio di 5 somiti.

4.6 Linea mutante per il gene *olig4*.

Per concludere lo studio funzionale del gene *olig4*, il sottoscritto è riuscito ad identificare i carrier di una linea stabile di mutanti di zebrafish per tale gene, ove una mutazione puntiforme che sostituisce una T con una G crea un codone di stop TGA nella sequenza codificante di tale gene.

L'utilizzo di questo mutante genetico ha lo scopo di comprendere meglio il ruolo di *olig4* durante lo sviluppo, oltre che di confermare i risultati dei microarray, che erano stati ottenuti con la strategia degli oligo morpholino antisense.

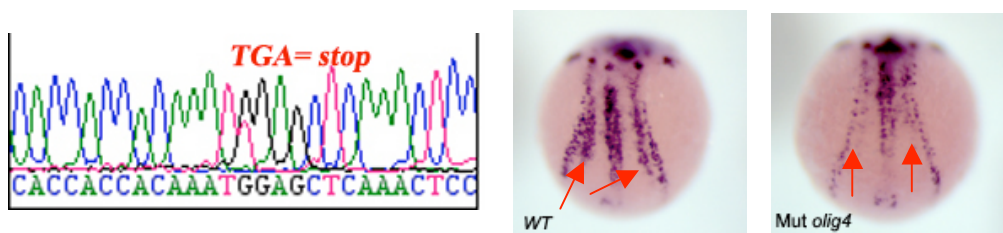


Figura 4.23: Cromatogramma che evidenzia il codone di STOP presente nella linea mutante di *olig4*. A destra ibridazione *in situ* con *ngn1*, a sinistra embrione selvatico a destra embrione mutante.

Nella Fig. 4.24 viene presentata una parte del cromatogramma che rivela in un carrier eterozigote *olig4*:MUT la presenza della base T in uno dei due filamenti (doppio picco), con conseguente formazione di un codone di stop TGA.

Nella figure di destra, è mostrata un'ibridazione *in situ* su un embrione selvatico e in uno mutante, con la sonda antisense *neurogenina1* (*ngn1*) (Blader et al., 1997), un fattore di trascrizione bHLH che risente dell'azione di *olig4* (Filippi et al., 2005) come nei morfanti nell'embrione mutante, manca il domino degli interneuroni (frece rosse), dove sono ben visibili nell'embrione selvatico a sinistra (stadio 5 somiti).



Figura 4.24: Figura presa al microscopio da dissezione di un embrione di 4 *dpf* a sinistra di tipo mutante, e a destra il suo corrispettivo fratello selvatico. La cosa più rilevante oltre alla forma del corpo tozza e accorciata, è la sua maggiore pigmentazione.

Il fenotipo caratteristico di embrioni di zebrafish mutanti per il gene *olig4* è identificabile solo a partire dal quarto giorno dopo la fecondazione. Le larve sono caratterizzate da motilità quasi assente, tronco ricurvo con pinne pettorali molto piccole, coda arricciata e soprattutto, come osservato anche nei morfanti, una pigmentazione molto più pronunciata.

Questo risultato molto confortante sul fenotipo dei mutanti genetici convalida i risultati visti in precedenza dal lavoro di Filippi et al. (2005) ove, mediante l'utilizzo del morfolino, era stato osservato un aumento di melanociti negli embrioni morfanti, associato ad un aumento delle creste neurali. Questa evidenza conferma l'azione che *olig4* svolge nella piastra neurale laterale, azione che limita l'estensione del dominio delle creste neurali e promuove lo sviluppo delle popolazioni cellulari derivanti dalla piastra neurale laterale e mediale.

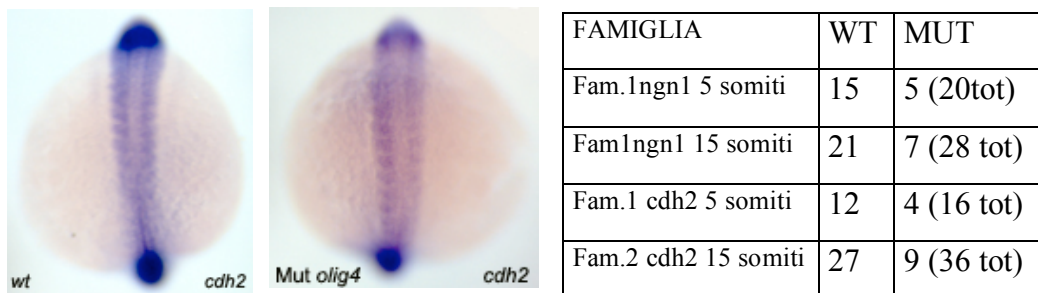
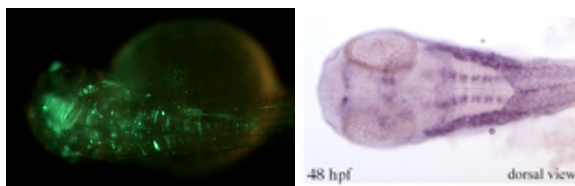


Figura 4.25: Ibridazione in situ con la sonda del gene *cdh2* effettuata su embrioni selvatici (wt) a sinistra, e su embrioni mutanti a destra allo stadio di 15 somiti. Come si può notare il risultato è assolutamente paragonabile a quello ottenuto con l'utilizzo del Morfolino. Più a destra una tabella riassuntiva di due esperimenti eseguiti di recente ad entrambi gli stadi considerati (5 e 15 somiti).

4.7 Creazione di due linee transgeniche per i geni *olig4* e *olig1*

Per un'analisi di espressione più approfondita, *in vivo* ed in tempo reale, dei geni *olig1* ed *olig4*, ho messo a punto in zebrafish la produzione di due linee transgeniche per tali fattori.



Ho utilizzato come primo approccio dei vettori d'espressione *in vivo* per la GFP, del tipo PG1.

Per quanto riguarda la linea transgenica di *olig4*, ho studiato il profilo d'espressione del transgene nella

prole di individui F1, a suo tempo iniettati in fase zigotica col costrutto (PG1-derivato) *olig4*:GFP. Ho tuttavia riscontrato che il segnale emesso dalla proteina GFP era debole e più diffuso rispetto al profilo d'espressione del gene di riferimento *olig4*.

Per un'analisi più accurata del profilo del transgene, alternativa all'osservazione della GFP agli UV, ho eseguito un'ibridazione in situ con la sonda antisense della *gfp* sugli embrioni transgenici, dopo averli fissati a vari stadi di sviluppo. (vedi figura). Ho poi confrontato il profilo d'espressione della *gfp* con quello noto di *olig4* al medesimo stadio di sviluppo.

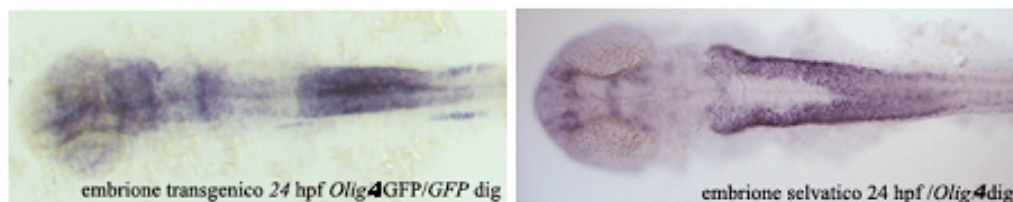
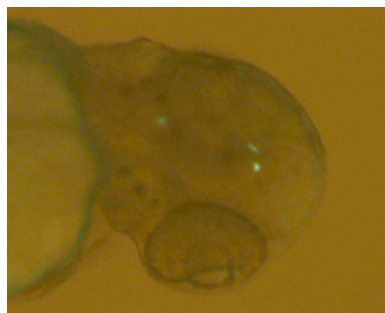


Figura 4.26: A destra è visualizzata un'ibridazione in situ con la sonda di *olig4* su di un embrione selvatico di 24 hpf, mentre a sinistra su di un embrione transgenico per la linea Olig4:GFP è visualizzata un'ibridazione in situ con la sonda della *gfp*. Il dominio d'espressione ricalca discretamente i domini d'espressione di *olig4*.

Come si può notare dalla figura 4.26, la marcatura ottenuta dall'ibridazione *in situ*, ricalca discretamente i domini d'espressione di *olig4*.

Discrepanze nei risultati potrebbero essere dovuti al fatto che il mio costrutto si sia inserito in una porzione del DNA genomico dove non viene attivamente promossa la trascrizione, ad esempio in vicinanza di sequenze *silencer*, e questo fatto potrebbe spiegare la debolezza del segnale che ho ottenuto. Inoltre, è

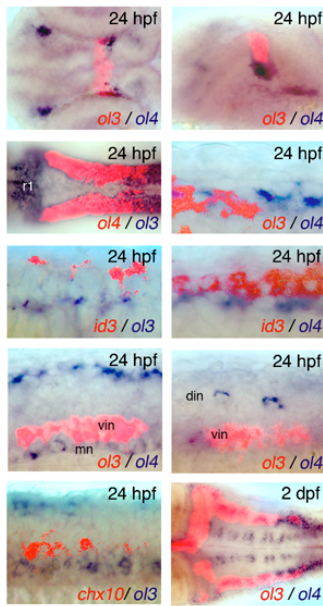
possibile che la lunghezza scelta per il promotore di *olig4* non sia sufficientemente lunga da comprendere tutte le regioni regolative necessarie per la piena e precisa espressione del transgene. Ho svolto quindi una serie di comparazioni bioinformatiche prendendo in considerazione in vari vertebrati la zona a monte



della trascrizione per il gene *olig4*, non trovando, tuttavia, zone di interesse

particolare, che potessero giustificare un ulteriore allungamento della porzione promotrice considerata.

Questo primo insuccesso mi ha poi spinto ad utilizzare un nuovo tipo di vettore per l'inserzione della mia cassetta all'interno del genoma, studiato da Kawakami (2004). Al momento nella nostra facility sto facendo crescere i nuovi fondatori di



questa linea transgenica, e i primi risultati dopo l'iniezione sono stati molto convincenti, del tutto paragonabili ai profili d'espressione di *olig4*.

Per quanto concerne la linea transgenica *olig1:GFP*, (figura a lato) ho utilizzando lo stesso tipo di vettore utilizzato per il gene *olig4*, ma la debolezza del segnale e la difficoltà di individuare i singoli oligodendrociti a 4 giorni

post-fecondazione mi hanno indotto a tentare una nuova strada, che mi permettesse di visualizzare meglio le strutture di mio interesse.

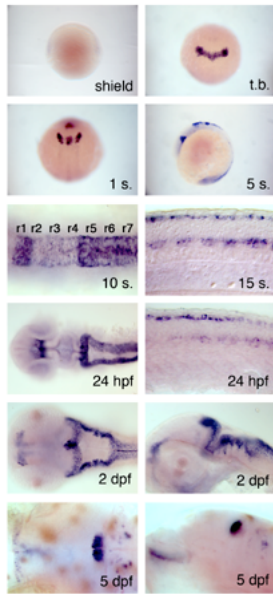
Figura 4.27: Confronto mediante ibridazione in situ doppia, dell'espressione di *olig3*, con quella di *olig4* a 24hpf su embrioni di tipo selvatico.

Per il futuro vorrei sintetizzare una nuova cassetta che fosse più efficiente nell'amplificazione del segnale. Il costrutto, denominato Prom3kb-*olig1*-(Gal4VP16UAS-GFPmRNA), (Pauls et al., 2007) sarà il prossimo passo per la produzione di una nuova linea transgenica per il gene *olig1*.

4.8 Profilo di espressione di *olig3*.

Nel corso di questo terzo anno d'attività, ho clonato un quarto membro della famiglia *Olig*, il gene denominato *olig3*. Questo nuovo gene ha permesso di comparare in modo complessivo entrambi i profili di espressione dei geni *olig3* ed

olig4 di zebrafish in relazione al gene murino *Olig3*. L'espressione di *olig3* inizia



più tardi rispetto a quella di *olig4*, e precisamente intorno alle 10 ore dopo la fecondazione. Durante la somitogenesi, il suo dominio di espressione si organizza in porzioni che saranno poi distinte e permanenti nell'encefalo, e in una parte più caudale che decrescerà in intensità con il progredire dello sviluppo.

Durante la somitogenesi l'espressione di *olig3*

Figura 4.28: Profilo d'espressione di *olig3* a partire dallo stadio di shield (6 ore post fertilizzazione), fino allo stadio di 5 dpf. Allo stadio di 10 somiti sono segnati i rombomeri marcati da *olig3* nell'encefalo.

interessa la regione diencefalica e, nel romboencefalo, il rombomero 1 ed i rombomeri 5 e 7. Nel tronco risultano positive la regione dorsale ed una fascia sub-ventrale del tubo neurale. Questa regionalizzazione è osservabile anche allo stadio di 24 hpf. Con il progredire dello sviluppo, il segnale si localizza in zone più ristrette dell'encefalo, nelle quali l'espressione è permanente (almeno fino a 5 giorni dopo la fecondazione).

Successivamente, ho confrontato, mediante ibridazioni doppie, la marcatura di *olig3* con quella di *olig4* e di altri marcatori neurali, al fine di delucidare l'espressione dei due geni *olig* tra loro ed in relazione ai diversi domini del tubo neurale.

Allo stadio di 24 hpf, si può notare come il segnale di *olig3* nell'encefalo sia più dorsale rispetto al dominio diencefalico di *olig4*. Nel romboencefalo, il segnale di *olig4* è dorsale ad *olig3* ed escluso dal rombomero 1, interessato dalla sola espressione di *olig3*.

Nel tronco, in visione laterale, si nota che nella parte dorsale del tubo neurale, dove si trovano i neuroni sensitivi primari e gli interneuroni dorsali, cellule *olig3*-positive risultano adiacenti alle *olig4*-positive, ma non coincidenti.

Allo stadio di 24 hpf, ibridazioni doppie con il marcatore *id3* (espresso nelle creste neurali) mostrano che entrambi i geni *olig3* e *olig4* sono espressi in una porzione ventrale rispetto ad *id3*, in corrispondenza della regione degli interneuroni dorsali (din). Il dominio di *olig4* si estende più ventralmente rispetto ad *olig3*, interessando la fascia più estrema degli interneuroni dorsali (gli *islet*-positivi, come ricavabile anche dalla figura 4.6).

Nella parte ventrale del tubo neurale, dove vi sono gli interneuroni ventrali (vin), *olig3* è espresso in una porzione più ventrale rispetto a quella marcata da *chx10*, un marcatore per gli interneuroni ventrali di classe 2a. Subito al di sotto di questa porzione si colloca il dominio motoneuronale. Nella figura sottostante, nei primi due pannelli è stata presa in considerazione la parte dorsale del tubo neurale, dove vengono mostrati i domini di *islet1* e *islet2* nei neuroni sensitivi (cellule di Rohon-Beard). Si può notare che *olig3* non viene espresso da tale tipo di cellule. Nel tubo neurale ventrale (rimanenti pannelli della figura), *olig3* è espresso in una fascia sovrastante e non adiacente al dominio motoneuronale marcato da *islet1* (motoneuroni RoP e MiP) e da *islet2* (motoneuroni CaP e VaP).

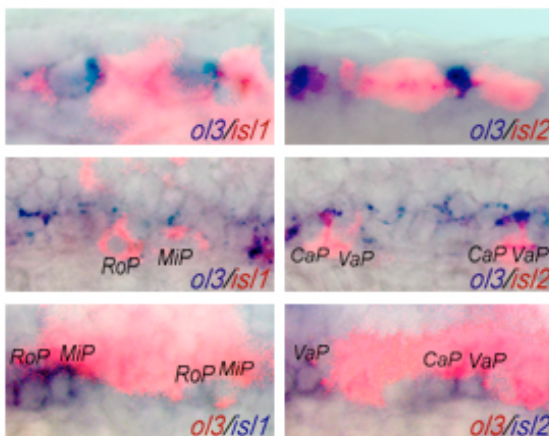


Figura 4.29: Confronto con ibridazione doppia l'espressione di *olig3* con quella dei marcatori *islet1*, e *islet2* nei motoneuroni sensitivi. Sono stati utilizzati embrioni selvatici di 24 hpf.

4.9 Studio sul gene *moonshine mon*.

L'ultimo lavoro da me svolto è stato in collaborazione con il lab del Prof. Piccolo sul gene *moonshine* (*mon*) di zebrafish, che codifica per la proteina Trim33 di

legame con il DNA, responsabile dell'ematopoiesi nell'adulto. Il prodotto del gene *mon* in zebrafish è in relazione con vari co-attivatori e co-repressori appartenenti alla via di segnale del TGFβ.

Nel corso di questa ricerca ho prima identificato e successivamente prodotto una linea stabile di zebrafish carriers mutanti per questo gene che ci è stata spedita dall'Università di Tuebingen. Questa linea, chiamata tg234, possiede una mutazione puntiforme che genera un codone di stop. Nei pochi e rari omozigoti adulti che riescono a sopravvivere determina la presenza di un edema polmonare molto ampio e l'assenza di cellule sanguigne circolanti. Ho utilizzato embrioni derivanti da questa linea stabile per effettuare degli esperimenti di ibridazione *in situ* e trattamenti con sostanze teratogene. Sapendo che questa mutazione segrega in modo mendeliano, ho esaminato delle coppie di carrier precedentemente identificate, attendendo nella prole un rapporto 1:2:1 tra omozigoti mutanti, eterozigoti carrier ed omozigoti selvatici. Nel corso dello studio ho trattato embrioni derivanti da una coppia di carrier *moonshine* con una sostanza chimica (SB-431542) che inibisce la via di segnale Activin/Nodal, in grado di fenocopiare chimicamente *in vivo* il mutante genetico *one-eyed pinhead* (*oep*). La sostanza inibisce la fosforilazione della proteina Smad2, un trasduttore del segnale. Dopo il trattamento con SB ho confrontato l'espressione del marcatore *gata1* nei mutanti omozigoti recessivi, con l'espressione dello stesso marcatore in embrioni selvatici e in embrioni omozigoti mutanti non trattati. Come controlli in questi esperimenti, una parte della prole derivata dai carrier della mutazione è stata trattata solo con DMSO (dimetilsolfossido), verificando anche in questo caso i rapporti di segregazione. Infine, ho estratto il DNA dagli embrioni e, mediante PCR e sequenziamento, ho confermato i risultati ottenuti. Negli embrioni selvatici l'espressione di *gata1* è ben visibile al di sopra del tuorlo nella coda, in una porzione chiamata mesoderma ventrale, dove sono situati i precursori dell'ematopoiesi nell'adulto. Nel mutante omozigote tg234 (Figg. 4.31 A, B, C) non vi è la presenza di cellule *gata1*-positive, mentre negli embrioni derivanti dalla coppia trattata si può notare che in seguito a tale trattamento, è stato ottenuto nei mutanti un recupero dell'espressione di *gata.1*

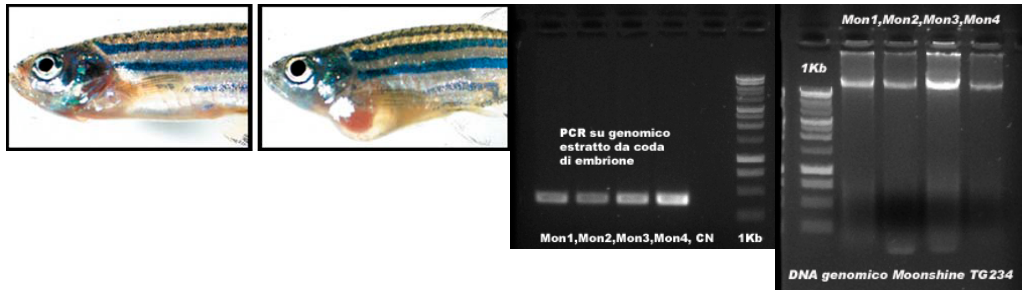


Figura 4.30: A sinistra un immagine (tratta da Ransom et al., 2004) di un individuo selvatico a confronto con un raro omozigote recessivo per l'allele *tg234* dove vi è la presenza di un edema polmonare molto ampio e l'assenza di cellule sanguigne circolanti. Mentre a destra nel primo gel d'agarosio è visualizzato il prodotto della PCR che successivamente purificato e sequenziato ci dirà quali sono gli individui carrier per questa mutazione. Nell'altro gel d'agarosio è visualizzato il prodotto dall'estrazione del DNA genomico utilizzato poi come stampo per la reazione di PCR.

Questo risultato preliminare ci ha permesso di capire come il gene *mon* sia coinvolto a monte della via Activin/Nodal nel processo emopoietico in zebrafish. Inseguito si potrà andare a verificare in maniera più precisa come il gene *mon* sia in relazione con i vari co-attivatori e co-repressori appartenenti alla via di segnale del TGF β .



Figura 4.31 A: Embrione selvatico allo stadio di 25 somiti, espressione di *gata1* normale.



Figura 4.31 B: Embrione mutante *tg²³⁴* allo stadio di 25 somiti, espressione di *gata1* assente.



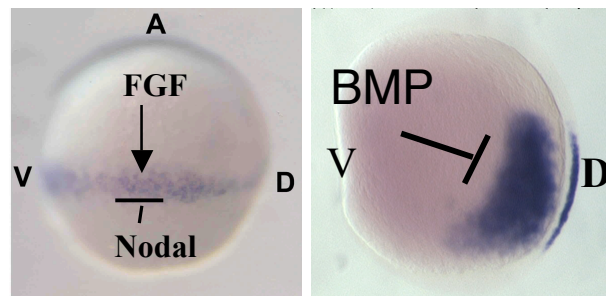
Figura 4.31 C: Embrione mutante *tg²³⁴* allo stadio di 25 somiti, trattato con l'inibitore chimico del segnale di *Nodal*. Espressione di *gata1* reuperata.

5. Discussione.

In questo studio è stata analizzata l'espressione della famiglia genica *olig* in zebrafish. Negli amnioti sono noti tre membri *Olig*, mentre in pesci ed anfibi sono stati identificati quattro membri: *olig1*, *olig2*, *olig3* ed *olig4*. Similmente ad altri vertebrati, anche nell'embrione di zebrafish i geni *olig1* ed *olig2* sono espressi in popolazioni cellulari ventrali del tubo neurale, mentre il membro *olig4* ha domini di espressione sia nella regione dorsale che ventrale (Park et al., 2002 e Filippi et al., 2005). In particolare, il gene *olig2* è espresso nei precursori comuni ad oligodendrociti e motoneuroni, mentre l'espressione di *olig1* è limitata ai soli oligodendrociti. Il membro *olig4* (precedentemente nominato *olig3* in Filippi et al., 2005) è implicato nella formazione di destini neurali dorsali, quali interneuroni ed astrociti. Il suo ruolo nella parte dorsale del tubo neurale consiste anche nel reprimere il destino delle creste neurali (NC). In effetti, inattivando *olig4* con la tecnica degli oligo morpholino antisenso, si osserva un netto incremento delle NC, mentre parallelamente diminuiscono le popolazioni del tubo neurale dorsale, quali interneuroni ed astrociti.

Il ruolo di *olig4* nel dominio ventrale ad oggi non era ancora stato chiarito, quindi con questo lavoro di tesi ho cercato di delucidare la sua funzione nella specificazione dei vari tipi cellulari durante lo sviluppo embrionale, e di capire come venisse regolato prendendo in esame le principali vie di segnale alle quali è sottoposto l'embrione durante lo sviluppo.

Attraverso questo studio ho dimostrato che durante le prime fasi di sviluppo *olig4* è regolato dai segnali FGF, BMP e Nodal, secondo lo schema illustrato qui a fianco. FGF promuove l'espressione di *olig4* mentre BMP lo limita ventralmente e Nodal lo esclude



dal margine di gastrulazione, ove è localizzato il territorio mesendodermico.

Per quanto riguarda il dominio ventrale di *olig4*, esso è stato messo in relazione con quello di *olig2*. In particolare, si è visto che l'espressione ventrale di *olig4* risente dall'attività di *sonic hedgehog (Shh)*, come già dimostrato per il membro *olig2*. Inoltre, risulta di particolare interesse il fatto che tale espressione ventrale di *olig4* identifichi modo specifico una particolare sub-popolazione motoneuronale; i motoneuroni RoP e MiP. Altri tipi di motoneuroni, VaP ed CaP, esprimono invece *olig2*.

Per quanto riguarda il membro *olig1*, questa tesi ha mostrato che la sua espressione è distinta da quella di *olig4*, mentre risulta parzialmente sovrapponibile a quella di *olig2*.

Gli studi funzionali su *olig4* hanno dimostrato un suo ruolo nella regione del tronco, sulla scelta tra neuroni dorsali e cellule delle creste neurali. Con l'analisi microarray svolta durante il secondo anno di dottorato, ho confermato il ruolo di *olig4* nella specificazione dei destini dorsali del tubo neurale, ed ho fatto luce su alcuni geni candidati che, interagendo con *olig4*, ne possano chiarire il ruolo come repressore delle creste neurali.

Dall'analisi svolta è emerso che la caderina neurale in zebrafish (*cdh2*), coinvolta, tra i vari processi, nella morfogenesi del tubo neurale e nella regionalizzazione dorsoventrale, è sotto la regolazione di *olig4*. La caderina neurale (similmente a topo e pollo) è sottoespressa nelle cellule delle creste neurali, durante la fase di migrazione, e la sua espressione è regolata dal fattore di trascrizione Snail (marcatore delle cellule delle creste neurali) e dal Wnt signaling (Nakagawa and Takeichi, 1998; Dorsky et al., 1998 Nieto, 2001; Taneyhill and Bronner-Fraser, 2005; Morales et al., 2005).

La sottoespressione di *cdh2* nei morfanti di *olig4* utilizzati nell'analisi è probabilmente un evento indiretto essendo *cdh2* regolato da *snail* (gene della cresta neurale), ma è ugualmente indicativa del fatto che l'inattivazione di *olig4* abbia effetto sul destino di cresta, confermando i dati in letteratura (Filippi et al.,

2005). Geni delle creste come *snail* non sono risultati tra i geni sovraespressi nell'esperimento di microarray; d'altra parte l'alterata espressione di questi geni è rilevabile dall'ibridazione *in situ* solo a partire dai 20 somiti in poi (Filippi et al., 2005). Il fatto che i microarray, concordemente con l'*in situ*, non rilevino precocemente questa sovraespressione, potrebbe dipendere dal numero esiguo di cellule delle creste neurali rispetto alla totalità delle cellule dell'embrione. Inoltre, tali cellule potrebbero avere inizialmente bassi livelli di trascritto. Di conseguenza, sottili alterazioni nell'espressione dei geni delle creste non risulterebbero rilevabili né dai microarray né dall'ibridazione *in situ*, contrariamente a *cdh2*, un gene ad alto livello di espressione embrionale precoce. Nel corso del dottorato ho ripetuto delle ibridazioni *in situ* sul mutante genetico, utilizzando alcuni dei marcatori più significativi emersi dall'analisi microarray eseguita su morphanti, convalidando i risultati esposti nella sezione precedente, a conferma del buon risultato ottenuto in precedenza.

Per quanto riguarda la produzione delle linee transgeniche di *olig4*, sembra che con l'utilizzo della tecnica Tol2 i risultati siano migliorati rispetto al precedente vettore pG1, in termini di espressione transiente e numero di embrioni fluorescenti. Occorrerà comunque attendere il controllo della prole F1, ottenuta dalla generazione parentale F0 iniettata con questo nuovo costrutto, per verificare la stabilità del transgene.

Per quanto riguarda la linea transgenica di *olig1*, in futuro proverò a sintetizzare un nuovo costrutto prom3kboldig1-Gal4VP16UAS-GFPmRNA. Tale strategia si è resa necessaria a causa della difficoltà nell'identificare gli oligodendrociti a 4 giorni post-fecondazione.

Nel corso dello svolgimento del mio dottorato durante quest'ultimo anno ho individuato e clonato un altro membro della famiglia *olig* in zebrafish, nominato *olig3* in base a comparazione filogenetica.

Dall'analisi del membro *olig3* tramite ibridazione *in situ* è emerso che la somma dei profili d'espressione dei geni *olig3* ed *olig4*, le sequenze dei quali presentano tra loro significativa similarità, ricapitola il profilo d'espressione del gene *Olig3* in topo (ove il membro *Olig4* non è stato individuato).

In seguito al clonaggio di questo nuovo membro, ho esaminato il suo profilo d'espressione che inizia più tardi rispetto a quella di *olig4*, e precisamente intorno

alle 10 ore dopo la fecondazione. Durante la somitogenesi sia *olig3* che *olig4* presentano espressione intervallata nei segmenti del romboencefalo (rombomeri). In particolare, se comparati al marcatore *krox20*, espresso nei rombomeri 3 e 5, si ricava che entrambi i geni sono espressi in tali rombomeri. In aggiunta, *olig3* è anche fortemente espresso nei rombomeri 1 e 7 (Fig. 5.2).

Questi dati sono riassunti nello schema in alto a destra e illustrati nelle figure a sinistra, mediante ibridazioni *in situ* a due colori di ciascun gene *olig* in combinazione con *krox20* (*ol3.1* = *olig3*; *ol3.2* = *olig4*).



Figura 5.2: Ibridazione *in situ* che mostra l'espressione dei geni *olig3* (*ol3.1*) e *olig4* (*ol3.2*) a livello del romboencefalo in zebrafish, visione dorsale. A destra: schema riassuntivo dell'organizzazione del romboencefalo

Il nuovo membro *olig3* ci ha permesso di comprendere meglio la stratificazione del tubo neurale e proporre un modello, in base al quale nella parte dorsale del tubo neurale, sotto l'influenza di BMP, si distinguono dorsalmente neuroni sensitivi primari Rohon-Beard. In corrispondenza del territorio ove risiedono i precursori degli interneuroni dorsali, vengono espressi i geni *olig3* e *olig4*, i domini dei quali sono adiacenti ma ben distinti. Vi è più al di sotto una popolazione di interneuroni dorsali, *islet1*-positivi, esprimenti il membro *olig4*.

Nella regione del tubo neurale ove sono situati gli interneuroni ventrali *chx10*-positivi, vi è una regione adiacente a questi, ove è espresso il gene *olig3*. Saranno necessari ulteriori studi di co-localizzazione con altri marcatori per stabilire se *olig3* identifichi una particolare sub-popolazione intraneuronale *chx10*-negativa, e/o eventuali popolazioni gliali di quel territorio neurale (fig. 5.3).

Infine, nel tubo neurale ventrale, dove l'attività di Shh è più forte, ho dimostrato che cellule della linea oligodendrogliale esprimono *olig2* ed *olig1* mentre, più dorsalmente, cellule della linea motoneuronale esprimono *olig3* oppure *olig4* (motoneuroni RoP e MipP, oppure VaP e CaP, rispettivamente).

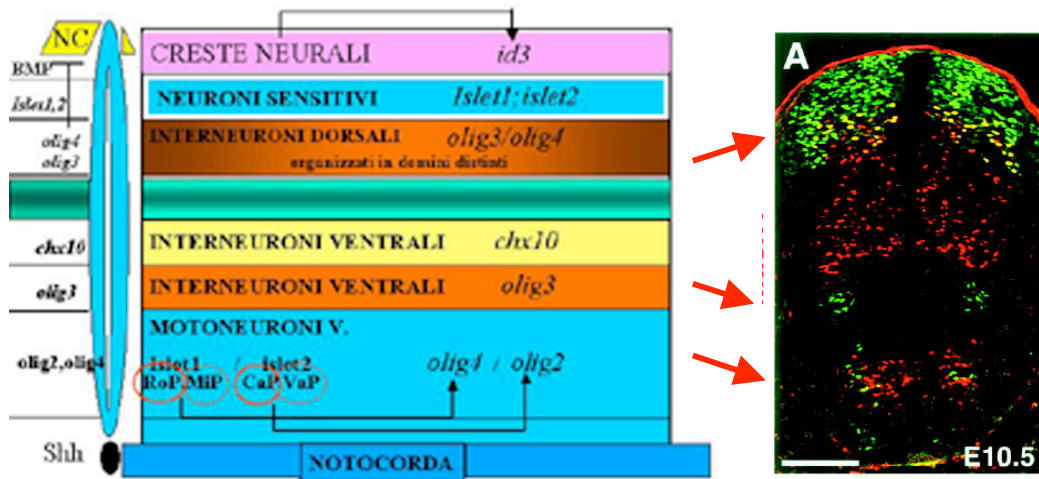


Figura 5.3: A sinistra vi è lo schema riassuntivo del profilo di espressione e la distribuzione spaziale in senso dorso ventrale dei geni che contribuiscono alla differenziazione del tubo neurale in via di sviluppo nell’embrione di zebrafish. A destra vi è il confronto con l’espressione (in verde) di Olig3 a livello del tronco nel topo allo stesso stadio durante la formazione del tubo neurale. Come si può notare i domini di espressione di Olig3 (in verde) sono pari alla somma dei domini d’espressione presenti nello schema di sinistra di *olig3* e *olig4* rispettivamente nella sua componente dorsale, e in quella ventrale.

6. Bibliografia.

Alexander J., Stainier D.Y. (1999). "A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish". *Curr. Biol.*, **9**: 1147-1157.

Amaya E., Musci T. J. e Kirschner M. W. (1991). "Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos". *Cell*, **66**: 257-270.

Amaya E., Stein P. A., Musci T. J. e Kirschner M. W. (1993). "FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*". *Development*, **118**: 477-487.

Appel B. e Chitnis A. (2002). "Neurogenesis and specification of neuronal identity". *Results Probl. Cell Differ.*, **40**: 237-251.

Appel B., Korzh V., Glasgow E., Thor S., Edlund T., Dawid I.B. e Eisen, J.S. (1995). "Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish". *Development* **121**: 4117-4125.

Arnett H. A., Fancy S. P., Zhao C., Plant S. R., Kaing S., Raine C. S., Rowitch D. H., Franklin R. J. e Stiles C. D. (2004). "bHLH transcription factor *Olig1* is required to repair demyelinated lesion in the CNS". *Science*, **306**: 2111-2115.

Blader P., Fischer N., Gradwohl G., Guillemont F. e Strahle U. (1997). "The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo". *Development*, **124**: 4557-4569.

Böttcher R. T. e Niehrs C. (2005). "Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development". *Endocr. Rev.*, **26**: 63-77.

Bronchain O. J., Pollet N., Ymlahi-Ouazzani Q., Dhorne-Pollet S., Helbling J. C., Lecarpentier J. E., Percheron K. e Wegnez M. (2007). "The *Olig* family: phylogenetic analysis and early gene expression in *Xenopus tropicalis*". *Dev. Genes Evol.*, **217**: 485-497.

Bunge R. P. (1968). "Glial cells and the central myelin sheath". *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**: 517-530.

Chitnis A. and Kintner C. (1996). "Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos". *Development* **122**: 2295-2301.

Cornell R. A. e Eisen J. S. (2002). "Delta/Notch signalling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin1 function". *Development*, **129**: 2639-2648.

Ding L., Takebayashi H., Watanabe K., Ohtsuki T., Tanaka K. F., Nabeshima Y., Chisaka O., Ikenaka K. e Ono K. (2005). "Short-term lineage analysis of dorsally derived *Olig3* cells in the developing spinal cord". *Dev. Dyn.*, **243**: 622-632.

Draper B. W, Stock D. W. e Kimmel C. B. (2003). "Zebrafish *fgf24* functions with *fgf8* to promote posterior mesodermal development". *Development*, **130**: 4639-4654.

Driever W., Solnica-Krezel L., Schier A. F., Neuhauss S. C., Malicki J., Stemple D. L., Stainier D. Y., Zwartkruis F., Abdelilah S., Rangini Z., Belak J., Boggs C. (1996) "A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish". *Development*, **123**: 123-137.

Dorsky R. I., Moon R. T. e Raible D. W. (1998). "Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway". *Nature*, **396**: 370-373.

Eisen J. S., Myers P. Z. e Westerfield M. (1986). "Pathway selection by growth cone of identified motoneurons in live zebrafish embryos". *Nature*, **320**: 269-271.

Eisen J. S., Pike S. H. e Romancier B. (1990). "An identified neuron with variable fates in embryonic zebrafish". *J. Neurosci.*, **10**: 34-43.

Filippi A., Tiso N., Deflorian G., Zecchin E., Bortolussi M. e Argenton F. (2005). "The basic helix-loop-helix *Olig3* establishes the neural plate boundary of the trunk and is necessary for the development of the dorsal spinal cord". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **102**: 4377-4382.

Friedman J. R., Fredericks W. J., Jensen D. E., Speiches D. W., Huang X. P., et al. (1996). "KAP-1, a novel corepressor of the highly conserved KRAB repression domain". *Genes Dev.*, **10**: 2067-2078.

Geling A., Steiner H., Willem M., Bally-Cuif L., Haass C. (2002). "A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signalling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish". *EMBO Rep* **3**: 688-694.

Glavic A., Silva F., Aybar M. J., Bastidas F. e Mayor R. (2004). "Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos". *Development*, **131**: 347-359.

Goris A., Yeo T. W., Maranian M., Walton A., Ban M., Gray J., Compston A. e Sawcer S. (2006). "Novel *Olig1* coding variants and susceptibility to multiple sclerosis". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **77**: 1296-1297.

Griffin K., Patient R. e Holder N. (1995). "Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail". *Development*, **121**: 2983-2984.

Gritsman K., Talbot W.S. e Schier A. (2000). "Nodal signalling patterns the organizer". *Development*, **127(2)**: 921-32.

Grunwald D. J. e Eisen J. S. (2002). "Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate". *Nat. Rev. Genet.*, **3**: 717-724.

Heldin C. H., Miyazono K. e ten Dijke P. (1997). "TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins". *Nature*, **390**: 465-471.

Ho D. M., Chan J., Bayliss P. e Withman M. (2006). "Inhibitor-resistant type I receptors reveal specific requirements for TGF- β signalling in vivo". *Dev. Biol.*, **295**: 730-742.

Hongo I., Kengaku M. e Okamoto H. (1999). "FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*". *Dev. Biol.*, **216**: 561-581.

Incardona J.P., Gaffield W., Kapur R.P. e Roelink H. (1998). "The teratogenic veratrum alkaloid cyclopamine inhibits Sonic hedgehog signal transduction". *Development*, **125**: 3553-62.

Kawabata, M. e Miyazono K. (1999). "Signal transduction of the TGF- β superfamily by Smad proteins". *J. Biochem.*, **125**: 9-16.

Kawakami K. (2004). "Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element". *Methods Cell Biol.*, **77**: 201-222.

Kim S. S., Chen Y. M., O'Leary E., Witzgall R., Vidal M., et al. (1996). "A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A

transcriptional repressor domain of zinc finger proteins". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 15299-15304.

Kimmel, C. B. (1993). "Patterning the brain of zebrafish embryo". *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**: 707-732.

Kudoh T., Wilson S. W., Dawid I. B. (2002). "Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm". *Development*, **129**: 4335-4346.

Kudoh T., Concha M. L., Houart C., Dawid I. B. e Wilson S.W. (2004). "Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains". *Development*, **131**: 3581-3592.

Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A.J., Wolfman, N.M., ten Dijke, P., Kuehn, M.R. (2001). "Nodal signaling uses activin and transforming growth factor- β receptor-regulated Smads". *J. Biol. Chem.*, **276**: 656-661.

Lai E.C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate". *Development*, **131**: 965-973.

Le Douarin B., Zechel C., Garnier J. M., Lutz Y., Tora L., et al. (1995). "The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18". *EMBO J.*, **14**: 2020-2033.

Lewis J. (1998). "Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates". *Academic Press*, **9**: 583-589.

Lewis K. E. e Eisen J. S. (2003) "From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord". *Prog Neurobiol.* **69**: 419-49.

Lu Q.R., Yuk D., Alberta J. A., Zhu Z., Pawlitzky I., Chan J., McMahon A. P., Stiles C. D., Rowitch D. H. (2000). "Sonic hedgehog-regulated

oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system". *Neuron*, **25**: 317-329.

Ma Q., Chen Z., del Barco Barrantes I., de la Pompa J.L. e Anderson D.J. (1998). "*neurogenin1* is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia". *Neuron* **20**: 469-482.

Morales A. V., Barbas J. A. e Nieto M. A. (2005). "How to become neural crest: from segregation to delamination". *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **16**: 655-662.

Müller T., Anlag K., Wildner H., Britsch S., Treier M., e Birchmeier C. (2005). "The bHLH factor *Olig3* coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord". *Genes. Dev.* **19**: 733-743.

Nakagawa S. e Takeichi M. (1998). "Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression". *Development*, **125(15)**: 2963-2971.

Nasevicius A. e Ekker S. C. (2000). "Effective targeted gene knockdown in zebrafish". *Nat. Genet.*, **26 (2)**: 216-220.

Nielsen A.L., e Jorgensen A.L. (2003). "Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP". *Gene* **310**: 123-132.

Nieto M. A. (2001). "The early steps of neural crest development". *Mech. Dev.*, **105**: 27-35.

Park H. C., Metha A., Richardson J. S. e Appel B. (2002). "*Olig2* is required for zebrafish primary neuron and oligodendrocyte development". *Dev. Biol.*, **248**: 356-368.

Pauls S., Zecchin E., Tiso N., Bortolussi M. e Argenton F. (2007). "Function and regulation of zebrafish *nkx 2.2a* during development of pancreatic islet and duct". *Dev. Biol.*, **304**: 875-890.

Peng H., Feldman I., Rauscher F. J. III (2002). "Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: A potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression". *J. Mol. Biol.*, **320**: 629-644.

Peyrieras, N., Strahle, U., Rosa, F. (1998). "Conversion of zebrafish blastomeres to an endodermal fate by TGF- β -related signaling". *Curr. Biol.*, **8**: 783-786.

Pires-daSilva A., Sommers R. J. (2003). "The evolution of signalling pathways in animal development". *Mol. Cel. Biol.*, **4**: 39-49.

Ransom D. G., Bahary N., Niss K., Traver D., Burns C., Trede N. S., Paffet-Lugassy N., Saganic W. J., Anthony Lim C., Hersey C., Zhou Y., Barut B. A., Lin S., Kingsley P. D., Plai J., Orkin S. H. e Zon L. I. (2004). "The zebrafish *moonshine* gene encodes Transcriptional Intermediary Factor1 γ , an essential regulator of hematopoiesis". *PLoS Biol.*, **8 (2)**: 1188-1196.

Riechmann V., van Cruchten I. e Stablitzky F. (1994). "The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein is distinct from Id1, Id2 and Id3". *Nucleic Acid Res.*, **22**: 749-755.

Samanta J. e Kessler J. A. (2004). "Interaction between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation". *Development*, **131**: 4131-4142.

Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Helde, K.A., Talbot, W.S., Driever, W. (1997). "The *one-eyed pinhead* gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with *no tail*". *Development*, **124**: 327-342.

Spaniol P., Bornmann C., Hauptmann G. e Gerster T. (1996). "Class III POU genes of zebrafish are predominantly expressed in the central nervous system". *Nucleic Acid Res.*, **24**: 4874-4881.

Streit A., Berliner A. J., Papanayotou C., Sirulnik A. e Stern C. D. (2000). "Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation". *Nature*, **406**: 74-78.

Summerton J. (1999). "Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type". *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**: 141-158.

Summerton J. e Weller D. (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **7(3)**: 187-195.

Takebayashi H., Nabeshima Y., Yoshida S., Chisaka O. e Ikenaka K. (2002). "The basic helix-loop-helix factor *Olig2* is essential for the development of motoneuron and oligodendrocytes lineages". *Curr. Biol.*, **12**: 1157-1163.

Tanehyll L. A. e Bronner-Fraser M. (2005). "Dynamic alterations in gene expression after Wnt-mediated induction of avian neural crest". *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 5283-5293.

ten Dijke P. e Hill C. S. (2004). "New insights into TGF- β -Smad signalling". *Trends. Biochem. Sci.*, **29**: 265-273.

Thisse, C. and Thisse, B. (1999). "Antivin, a novel and divergent member of the TGF β superfamily, negatively regulates mesoderm induction". *Development*, **126**: 229-240.

Tian T. e Meng AM. (2006). "Nodal signals pattern vertebrate embryos". *Cell Mol Life Sci.* **63**: 672-85.

Venturini L., You S., Stadler M., Galien R., Lallemand V., et al. (1999). "TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family". *Oncogene*, **18**: 1209-1217.

Walker C. and Streisinger G. (1983) "Induction of mutations by gamma-Rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos". *Genetics*, **103**: 125-136.

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

Wilson S. I., Rydström A., Trimborn T., Willert K., Nusse R., Jessell T. M. e Edlund T. (2001). "The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo". *Nature*, **411**: 325-330.

Woo, K. and Fraser, S.E. (1995). "Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system". *Development* **121**: 2595-2609.

Zhang, J., Talbot, W.S., Schier, A.F. (1998). "Positional cloning identifies zebrafish One-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation". *Cell*, **92**: 241-251.

Zhou Q. e Anderson D. J. (2002). "The bHLH transcription factors Olig1 e Olig2 couple neuronal and glial subtype specification". *Cell*, **109**: 61-73.

Zhou Q., Wang S. e Anderson D. J. (2000). "Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors ". *Neuron*, **25** : 331-343.