



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA DI SCIENZE MM.FF.NN.**

LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOLOGIA MOLECOLARE

Elaborato di Laurea

**ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI NR5A2 E XBP1 NEL
PANCREAS ESOCRINO DI DANIO RERIO.**

Tutor: Prof.sor Francesco Argenton
Dipartimento di Biologia
Co-tutor: Dott. Enrico Vaccari
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Carlotta Ronda

Anno Accademico 2008/2009

Indice

Abstract	I
I. Introduzione	3
1.1 L'organismo modello.....	3
1.2 Il Pancreas.....	4
1.3 L'organogenesi del pancreas.....	5
1.4 <i>Nra5a2</i>	7
1.5 <i>Xbp1</i>	8
2. Materiali e Metodi	9
2.1 Clonaggio <i>nra5a2</i> e <i>xbp1</i>	9
2.1.1 Preparazione cDNA.....	9
2.1.2 Consultazione database e costruzione dei primer.....	9
2.1.3 Amplificazione <i>nr5a2</i> e <i>xbp1</i>	10
2.1.4 Gel elettroforesi orizzontale.....	11
2.1.5 Estrazione di DNA da gel di agarosio.....	11
2.1.6 Preparazione del vettore di clonaggio TA cloning.....	12
2.1.7 Trasformazione dei batteri competenti.....	13
2.1.8 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico dai batteri.....	15
2.2 Costruzione delle sonde.....	16
2.2.1 Quantificazione miniprep e restrizione dei vettori.....	17
2.2.2 Linearizzazione dei vettori.....	17
2.2.3 Costruzione delle sonde antisenso.....	17
2.3 Trattamenti farmacologici con sostanze teratogene.....	18
2.4 Ibridazione in situ su embrioni trattati.....	20
2.4.1 Ibridazione doppia <i>nr5a2</i> - insulina e <i>xbp1</i> – insulina.....	23
2.5 Montaggio vetrini e foto.....	23
3. Risultati e Discussione	25
3.1 Clonaggio.....	25
3.2 Ibridazione <i>in situ</i> su embrioni trattati.....	26
4. Conclusioni	35
Bibliografia	37

Abstract

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare come, nel pancreas esocrino di *Danio rerio*, l'espressione dei geni *xbp1* e *nr5a2* venga alterata dopo l'esposizione degli embrioni a differenti sostanze farmacologiche. A tale scopo sono stati clonati i geni d'interesse per poter sintetizzare le sonde con cui effettuare esperimenti di ibridazione *in situ*. Inizialmente sono stati disegnati primer per amplificare selettivamente da cDNA, tramite PCR, *xbp1* e *nr5a2*; i prodotti ottenuti sono stati inseriti in vettori di trascrizione e con questi trasformati degli *E. coli* elettrocompetenti. Una volta individuate le colonie idonee, tramite il saggio di α -complementazione e l'analisi di restrizione del DNA plasmidico, si sono sintetizzate le sonde antisense utilizzando nucleotidi coniugati con digossigenina, rivelabili quindi tramite reazione anticorpale. Per monitorare l'espressione dei geni d'interesse sono state fatte delle ibridazioni *in situ* su embrioni precedentemente trattati con sostanze farmacologiche in due distinte finestre temporali (tra le 32 e le 52 hpf e tra le 52 e le 72 hpf) durante l'organogenesi pancreatica. Le sostanze utilizzate sono inibitori o agonisti delle più importanti vie di segnale coinvolte nello sviluppo embrionale.



Introduzione

I.1 L'ORGANISMO MODELLO: *Danio Rerio*

Lo ricerca dei geni coinvolti nello sviluppo dei vertebrati e lo studio dei loro meccanismi d'azione sono cresciuti progressivamente, soprattutto in funzione dei loro risvolti in campo medico. La comprensione dei principali processi e vie di segnale che regolano l'embriogenesi e l'organogenesi in organismi modello ha permesso, attraverso la comparazione, di spiegare l'eziologia di svariate patologie. *Danio rerio*, o *zebrafish*, è un teleosteo appartenente alla famiglia dei *Cyprinidae*, particolarmente vantaggioso per lo studio della biologia dello sviluppo nei vertebrati grazie alle sue di piccole dimensioni (5-6 cm), semplicità di allevamento in spazi limitati, ciclo riproduttivo breve (circa 12 settimane; dopo 24hpf sono riconoscibili la maggior parte degli organi). Zebrafish ha genoma diploide, con 25 coppie di cromosomi, quasi completamente sequenziato del quale sono stati identificati numerosi mutanti. L'elevata prolificità di zebrafish (una singola femmina può deporre circa 100-200 uova per evento riproduttivo) permette analisi genetiche su larga scala; la fecondazione esterna permette l'analisi della progenie, senza il sacrificio della madre e del singolo embrione, a diversi stadi di sviluppo. Altro vantaggio è la trasparenza dell'embrione che è rivestito solo da una membrana esterna, il *corion*, e sprovvisto di guscio calcareo; gli embrioni infatti, crescendo in acqua, sono immuni dalla disidratazione. Tali caratteristiche, oltre a rendere possibile la visualizzazione dell'intero sviluppo embrionale al microscopio ottico, rendono il modello adatto alla manipolazione attraverso microiniezione di RNA e DNA o tecniche di trapianto cellulare. È così possibile ottenere linee di pesci transgeniche, sovra esprimere particolari mRNA, impedire la traduzione proteica con l'uso di *morpholino* (oligonucleotidi antisense modificati), creare embrioni chimera: tutti strumenti indispensabili per studi funzionali in vivo.

I.2 IL PANCREAS

Il pancreas è una ghiandola oggetto di numerosi studi dal momento che patologie a suo carico hanno notevole rilevanza e impatto sulla salute dell'uomo. Tra quelle con maggior incidenza nella popolazione occidentale troviamo il diabete, una patologia causata dall'assenza o disfunzione delle cellule beta del pancreas endocrino e dai conseguenti problemi di omeostasi del glucosio. Esistono diverse forme genetiche di questa patologia, la più comune è il Diabete mellito, che può essere raggruppato in due classi principali: Diabete di tipo I, o diabete mellito insulina-dipendente (IDDM), nel quale le cellule beta vengono distrutte a causa di una reazione autoimmune; diabete di tipo II o diabete mellito insulina-indipendente (NIDDM) causato da una mancata risposta delle cellule beta a particolari stimoli cellulari e subcellulari in via di caratterizzazione. Inoltre diverse patologie colpiscono la componente esocrina del pancreas: tra le più frequenti troviamo pancreatiti e neoplasie.

Il pancreas ha origine endodermica e si compone di diversi tipi cellulari. La porzione esocrina comprende le cellule degli acini, adibite alla secrezione di enzimi digestivi, e le cellule dei dotti, che convogliano gli enzimi nel lume del duodeno. La porzione endocrina si compone invece delle cellule delle isole, coinvolte essenzialmente nel controllo dell'omeostasi del glucosio, sparse principalmente nella regione centrale dell'organo.

Il pancreas esocrino è una ghiandola tubulo-acinosa costituita da cellule secretici piramidali orientate radialmente attorno ad un lume centrale. Queste sono raggruppate in acini la cui porzione apicale presenta granuli di zimogeno contenenti enzimi digestivi sotto forma di proenzimi inerti (Tripsinogeno, Chimotripsinogeno, Procarbosipeptidasi, Proelastasi, Callicreinogeno, Pirofosfatasi A e B, Amilasi, Lipasi). Il pancreas esocrino comprende inoltre cellule miste e epiteliali appiattite che costituiscono le pareti dei dotti. Quest'ultime permettono il trasporto degli enzimi digestivi nel lume del duodeno e secernono inoltre, nei dotti di piccole dimensioni, liquido ricco di bicarbonato, mentre nei dotti di maggior calibro, mucina.

Il pancreas endocrino si compone di diversi tipi cellulari che si organizzano in isole compatte e sferoidali, dette isole del Langerhas nei mammiferi. Nei teleostei queste cellule si concentrano (almeno a livello embrionale) in un'unica struttura separata dal tessuto esocrino, l'isola di Brockmann. Le isole contengono cellule beta, alfa, delta, PP e, di più recentemente scoperta, cellule epsilon, (Prado et al., 2004), secernenti rispettivamente insulina, glucagone, somatostatina, peptide pancreatico e grelina. La disposizione delle cellule nell'isola è ben definita sia in topo che in zebrafish e consiste di cellule beta centrali e degli altri tipi nella porzione periferica

I.3 ORGANOGENESI DEL PANCREAS

Il pancreas è un organo di origine endodermica. Durante lo sviluppo l'endoderma subisce una regionalizzazione in senso antero-posteriore e dorso-ventrale. Questa si realizza attraverso l'attivazione differenziale di diverse vie di segnale che permettono la giusta collocazione degli organi lungo gli assi. L'endoderma dei vertebrati dà origine all'epitelio del sistema digerente, al pancreas, al fegato, alla tiroide e al timo. La morfologia definitiva del pancreas, e degli organi ad esso associati, è il prodotto del differenziamento di sottogruppi di cellule progenitrici di origine endodermica ed è ottenuto attraverso un processo di interscambio di segnali locali con il mesoderma limitrofo (Kumar et al., 2003). La specificazione del pancreas dipende inizialmente dell'organizzazione antero-posteriore e dorso-ventrale dell'endoderma ed è il risultato della sinergia di diverse vie di segnale, tra le quali quella del TGF-*beta* (*Nodal*, *BMP*), la via di *Wnt*, acido retinoico (*AR*) e *FGF*.

In un primo momento i segnali precoci, generati dai membri della via di *Nodal* (Zhang, et al., 2008), determinano la formazione del mesendoderma reso poi nel corso dello sviluppo competente nel rispondere a diversi segnali induttivi. La risposta a questi segnali conferisce la prima specificazione in senso pancreatico di parte del foglietto endodermico. A questo punto gli abbozzi iniziano ad emergere, in tempi diversi e da due distinte regioni della porzione mediana dell'intestino, e da qui migrano in successione gruppi di cellule a comporre l'abbozzo dorsale posteriore e ventrale anteriore che, in seguito ad una rotazione dell'intestino (a 52 hpf), si fonderanno a formare l'organo completo (*Fig. 1.1*) (Field et al., 2003). L'endoderma che forma il primo abbozzo (24 hpf) darà origine all'intera porzione endocrina ed una esigua parte dell'esocrino, esprimendo, già a questo stadio, i primi geni pancreas-specifici (insulina, somatostatina e glucagone). Tale struttura, inizialmente esposta ad un contatto prolungato con la notocorda e con l'aorta dorsale, già a 34 hpf si presenta separata dall'endoderma e posizionata sul lato destro del tubo digerente (Field et al., 2003). È proprio la precoce vicinanza alla notocorda e all'aorta che permette lo sviluppo dell'abbozzo. La notocorda e il mesenchima sono infatti fonte di *FGF* che assieme al *BMP* interagiscono con la via di *Nodal* e limitano il numero di progenitori endodermici indotti da quest'ultima, cooperando così alla corretta formazione del pancreas. Inoltre *FGF* riveste un ruolo importante anche nella formazione dell'abbozzo ventrale pancreatico. Ma in questo caso vengono prodotte dal mesoderma cardiogenico e, a differenza dell'abbozzo dorsale in cui sono richieste per l'induzione, qui è la loro assenza che permette lo sviluppo dell'abbozzo. Un secondo tipo di segnale prodotto dalla notocorda è Sonic Hedgehog (*Shh*) (diIorio et al., 2002; Roy et al., 2001) che è indispensabile per l'espressione dei geni *Pdx1* e *islet1* la cui funzione è cruciale nello sviluppo del pancreas.

La porzione di endoderma che darà il secondo abbozzo, antero-ventrale, emerge attorno alle 32 hpf. Questa struttura mantiene il contatto con l'endoderma e originerà la porzione pancreatica esocrina, il sistema dei dotti ed alcune cellule endocrine, interagendo con la piastra del mesoderma laterale e poi con il mesoderma cardiogenico e il setto trasverso. Il secondo abbozzo si forma dal lato ventrale dell'intestino, in posizione anteriore rispetto all'isola e riceve segnali di tipo istruttivo prodotti dal mesoderma della piastra laterale. Durante l'organogenesi entrambi gli abbozzi migrano dall'intestino e, fino al terzo giorno di sviluppo, il secondo abbozzo antero-ventrale si estende prima in direzione dell'isola endocrina, poi intorno ad essa, ma senza mai separarsi dall'epitelio intestinale. L'ulteriore estensione in direzione dorsale porta poi alla definizione della caratteristica struttura testa-collo-coda del tessuto esocrino, suggerendo che l'abbozzo anteriore corrisponda ai precursori del pancreas esocrino (Field et al., 2003). Questa conclusione è stata recentemente supportata dall'analisi di espressione del fattore di trascrizione pancreatico *ptf1a* (*pancreas transcription factor 1*), conosciuto anche come *p48*. (Zecchin et al., 2004). Infine, dopo la rotazione dell'intestino, sia l'abbozzo dorsale che il ventrale entrano a stretto contatto con i vasi sanguigni; questa vicinanza promuove l'accrescimento del pancreas ed è importante considerando che il compartimento endocrino (cellule β) regola l'omeostasi del glucosio nel sangue.

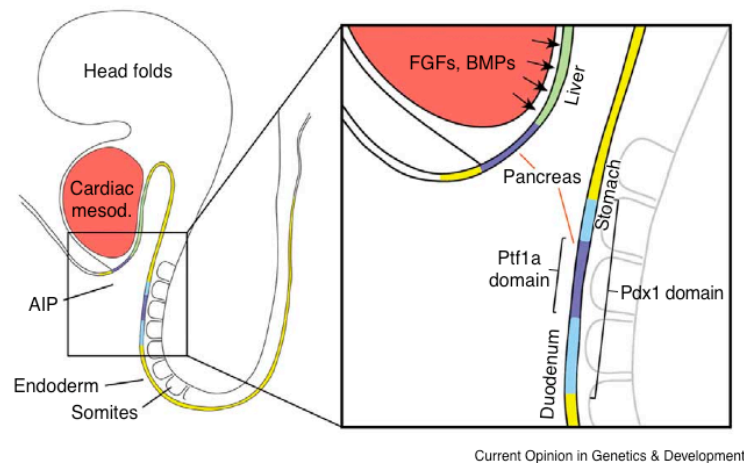


Fig. 1.1: Induzione concorrente di organi vicini. Una schematica rappresentazione dell'intestino di topo in formazione allo stadio di e8.5. I piani di osservazione sono dal lato anteriore verso l'alto e ventrale verso sinistra. I segnali provenienti dal mesoderma cardiogenico adiacente (rosso) verso l'endoderma dell'intestino in formazione inducono l'espressione dei marcatori del fegato (verde). L'endoderma ventrale che non riceve segnali (FGF) dal mesoderma cardiogenico esprime marcatori pancreatici di default (blu). Non tutte le cellule dell'endoderma che esprimono *pdx1* (azzurro) danno origine poi al pancreas (blu). Infatti l'espressione di *ptf1a* all'interno del dominio di *pdx1* definirà quali cellule adotteranno un destino pancreatico.

I primi progenitori pancreatici descritti in *zebrafish* sono cellule che esprimono i fattori di trascrizione *Hlxb9* (homeobox gene HB9) e *pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox 1) (Milewski et al, 1998). Il primo marcatore appare precocemente in una regione più ampia rispetto al dominio di *pdx1*, ma in seguito scompare per riapparire nuovamente durante il differenziamento dell'isola endocrina. *Pdx1* appare allo stadio di 8 somiti, bilateralmente alla notocorda, nella parte dorsale dell'intestino in formazione (Argenton et al., 1999) e nell'epitelio pancreatico durante la formazione degli abbozzi. *Pdx1* è necessario per la crescita e la morfogenesi degli abbozzi pancreatici, cooperando con numerosi altri fattori (Kim and Mac Donald, 2002). *Pdx1* è necessario per la morfogenesi e il differenziamento di tutti i componenti esocri e per il mantenimento della funzionalità degli acini e delle cellule beta negli adulti (Kim and Mac Donald, 2002).

All'interno del dominio di espressione di *pdx1*, allo stadio di 12 somiti, è rilevabile la presenza del primo marcatore endocrino, rappresentato dall'insulina (Biemar et al., 2001) seguito dalla somatostatina (16 somiti) e dal glucagone (24 ore). A 32 hpf, inizia l'espressione di *ptf1a* in una porzione ventrale del dominio di *pdx1* (Zecchin et al 2003). Questo fattore di trascrizione è necessario, in un primo momento, per istruire le cellule degli abbozzi verso un destino pancreatico e, successivamente, per la proliferazione e il differenziamento dell'esocrino.

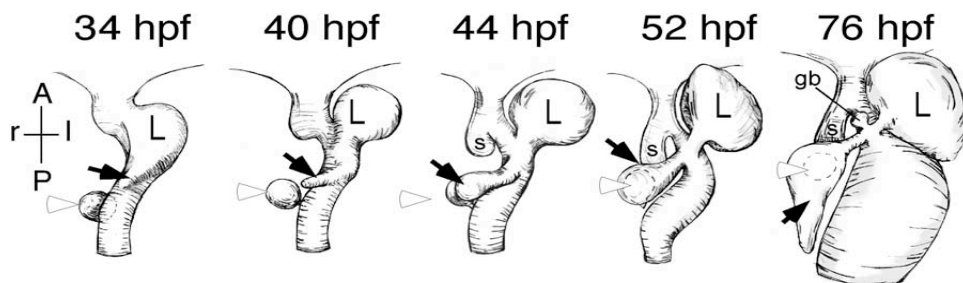


Fig. 1.2: Sviluppo del pancreas di zebrafish a partire da un abbozzo anteriore (freccia in nero) e posteriore (freccia in bianco) dalle 34 alle 76 hpf. (Field et al. 2003). S: vescica natatoria, L: fegato, gb: cistifellea. Per monitorare l'organogenesi è stata utilizzata una linea transgenica Gut:GFP.

1.4 Nr5a2

Inizialmente individuato in *Drosophila*, come regolatore dell'espressione dell'omeobox *fushi tarazu* (*ftz*), *fushi tarazu factor-1* (FTZ-F1) è stato successivamente identificato in diverse specie appartenenti a differenti phyla. A tali omologhi sono stati dati nel tempo diversi nomi, tra i quali liver receptor homologue-1 (LRH-1), fino a quando la comunità scientifica non ha deciso di raggrupparli sotto il nome di NR5A. Tali proteine sono recettori nucleari che tramite un dominio a dita di zinco sono in grado di agire come fattori di trascrizione regolando geni coinvolti nel meta-

bolismo di steroli e steroidi e importanti nello sviluppo e nel differenziamento di diversi organi. Mentre nel genoma di mammifero sono noti fino ad oggi due omologhi di FTZ-F1 (NR5A1 e NR5A2) in zebrafish gli omologhi sono 4: *ff1a*, *ff1b*, *ff1c* e *ff1d*. Studi filogenetici dimostrano come *ff1b* e *ff1d* siano gli omologhi di NR5A1 e che derivano da un evento di duplicazione genica, *ff1a* lo sia di NR5A2 e che *ff1c* non sia assegnabile a nessuno dei due precedenti gruppi. Studi condotti sull'omologo di topo LRH-1 (Elisabeth Fayard et al., 2004) hanno evidenziato la sua espressione durante lo sviluppo in tessuti di origine endodermica, incluso intestino, fegato, pancreas esocrino e ovaie. In questi tessuti LRH-1 gioca un ruolo predominante nello sviluppo embrionale, nel trasporto del colesterolo, nella steroidogenesi e nella determinazione del sesso. Inoltre è stato dimostrato che nella regione regolatrice di LRH-1 sono presenti 3 siti di legame per *pdx1* che ne può quindi regolare l'espressione (Annicotte et al., 2003) durante lo sviluppo quando entrambi vengono espressi nei precursori pancreatici. Infatti inizialmente LRH-1 viene co-espresso e coinvolto in un loop regolativo con *pdx1* a livello del tessuto presuntivo del pancreas. Successivamente però, mentre *pdx1* si regionalizza a livello del tessuto endocrino, LRH-1 si esprime solo nel tessuto esocrino sia durante lo sviluppo, sia nei tessuti adulti (Annicotte et al., 2003).

1.5 Xbp1

Questo fattore di trascrizione è richiesto per la biogenesi e il funzionamento dell'apparato secretore nelle ghiandole esocrine, tra cui il pancreas esocrino (Lee et., al 2005). Infatti esso attiva l'espressione del pathway UPR (unfolded protein response), necessario per la risposta a stress del reticolo endoplasmatico (RE) e altri geni coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del RE, nel folding delle proteine (chaperon) e successivamente nella loro secrezione, degradazione e nel misfolding operate dal RE. Inoltre *xbp1* promuove, almeno in parte, il differenziamento attraverso la regolazione della biogenesi e dell'espansione degli organelli coinvolti nella secrezione come RE e Golgi. Dunque *xbp1* è necessario e sufficiente per l'intera biogenesi dell'apparato secretorio delle cellule esocrine ed in caso di sua assenza gli acini pancreatici vanno incontro ad apoptosi durante lo sviluppo embrionale. Diversamente, nell'endocrino, non è stata riscontrata nessuna anomalia nello sviluppo in assenza di *xbp1*. È interessante notare che studi di Acosta-Alvear (Acosta-Alvear et al., 2007) hanno dimostrato che uno dei target di *xbp1* è un gene, appartenente alla famiglia dei bHLH transcription factor, denominato *mist1*. Il suo prodotto è necessario per il differenziamento e per il mantenimento sia dell'organizzazione delle cellule del pancreas esocrino che dell'identità degli acini dando così ulteriori evidenze al perché la perdita di *xbp1* comporti difetti nello sviluppo del pancreas.

2

Materiali e Metodi

2.1 CLONAGGIO *nr5a2* e *xbp1*

2.1.1 PREPARAZIONE cDNA.

Per poter amplificare le sequenze codificanti dei geni di interesse è necessario partire dal cDNA retro trascritto a partire dall'RNA estratto da embrioni utilizzando degli oligodT. L'RNA utilizzato per la retro trascrizione proveniva da pool di embrioni a differenti stadi di sviluppo (24 hpf, 48 hpf e 72 hpf). Il cDNA utilizzato è stato preparato precedentemente nel laboratorio.

2.1.2 CONSULTAZIONE DATABASE E COSTRUZIONE PRIMER.

Basandosi sui dati presenti su database disponibili in rete (ad es. Genbank dell'NCBI), tramite il programma PRIMER3 sono stati disegnati dei primer adatti ad amplificare, mediante PCR, i geni d'interesse da cDNA totale. Gli oligo per l'innescamento della DNAPol (primers) devono possedere alcuni requisiti tra cui: una lunghezza intorno alle 20-30pb, una percentuale in GC simile e temperature di fusione (*T_m: melting temperature*) molto vicine; non devono formare strutture secondarie complesse, non devono contenere unità ripetute o ripetute in tandem per evitare l'appaiamento aspecifico e non devono avere le estremità 3' complementari per evitare che si amplifichino solo loro.

nr5a2_for: CGAAGTCAAGCCGAGGATTTG

nr5a2_rev: CGTTCGGTGCACATTCACACT

xbp1_for: GAAATTTCCCACCCCTAATCA

xbp1_rev: CGACAAAAATACTGGGTCACG

2.1.3 AMPLIFICAZIONE *nr5a2* E *xbp1*.

Con primers specifici si sono isolati i geni d'interesse dal cDNA totale (a 24, 48 e 72 hpf). Come controllo positivo si sono usati primers specifici per la β actina; come controllo negativo, si è usato un campione contenente tutti i reagenti ma privo di cDNA.

Per questa metodica si è utilizzato il termociclatore "iCicler" (Bio-Rad), con piastra da 96 pozzetti. I reagenti (Promega®) utilizzati per la PCR, di volume totale 20 μ l, sono i seguenti:

Quantità	Reagenti
2 μ l	cDNA
2 μ l	Buffer 10 X
0,4 μ l	Taq-Pol
1 μ l	Primer Forward 20 X
1 μ l	Primer Reverse 20 X
0,5 μ l	dNTPs 40 X
13,1 μ l	Acqua MilliQ

Il buffer contiene concentrazioni di Sali e pH specifici per il funzionamento della Taq-polimerasi. Questa è la Dna-polimerasi di un particolare archea-batterio, *Thermus Aquaticus*. La peculiarità di questa polimerasi è quella di essere termoresistente ad alte temperature (94°C); per funzionare necessita della presenza di un cofattore, il Mg²⁺.

I dNTPs sono deossinucleotidi trifosfato.

Dopo aver preparato i reagenti, si sono controllate le temperature (T_m) ottenute durante la progettazione dei primers.

Per *nr5a2* la temperatura di annealing è di 58°C

Per *xbp1* la temperatura di annealing è di 55° C

Per β actina la temperatura di annealing è di 58°C

CONDIZIONI PER LA POLIMERIZZAZIONE

Step	Cicli	Temperatura	Durata	Descrizione
1°	1	94° C	2'	Prima denaturazione
		94° C	40''	Denaturazione per ogni ciclo
2°	30	55°-58° C	30''	Appaiamento primers
		72° C	2' 20''	Polimerizzazione
3°	1	72° C	4' 20''	Polimerizzazione finale

Sapendo che la processività della Taq-pol è di 1 Kb al minuto e che i nostri amplificati dovrebbero essere all'incirca di 1,8 Kb, si sono calcolati circa 2' 20'' per la polimerizzazione. E si sono aggiunti 2' all'ultimo ciclo per permettere alla polimerasi di concludere tutto.

2.1.4 GEL ELETTROFORESI ORIZZONTALE.

Questa tecnica permette di separare molecole di acidi nucleici sulla base delle loro dimensioni in presenza di un campo elettrico. Questo perché gli acidi nucleici, carichi negativamente, sono attratti verso l'anodo (carico positivamente) ma per raggiungerlo devono attraversare il mezzo di agarosio che oppone una resistenza direttamente proporzionale alle loro dimensioni. Infatti questo è costituito da polimeri ramificati che creano un reticolo con pori di diversa dimensione a seconda della concentrazione di agarosio (più concentrato sarà e minore sarà il diametro dei pori). Tale struttura reticolata conferisce una consistenza gelatinosa al mezzo.

Nei nostri esperimenti è stato usato un gel di agarosio all'1% (peso/volume) composto da:

Quantità	Composto	Descrizione
0,5 g	Agarosio	Bio-Rad
50 ml	TAE 1X (Tris-idrossimetilmetilammina-Acido acetico-EDTA)	Utilizzato sia come soluzione per il gel che come tampone di corsa
5 µl	Etidio bromuro	

Successivamente vengono caricati:

- 20 µl di cDNA + 3 µl Loading dye orange 5X (Promega®)
- 3 µl di 1Kb ladder (Promega®)

L'etidio bromuro è un intercalante del DNA. Questa sua proprietà viene utilizzata per vedere gli acidi nucleici sul gel poiché emette fluorescenza negli UV. Perciò, esponendo il gel ad una fonte UV, è possibile visualizzare le bande contenenti l'acido nucleico.

1. Una volta polimerizzato nell'apposita vaschetta per elettroforesi.
2. Il gel viene immerso nel tampone di corsa (TAE 1X).
3. Vengono caricati nei pozzetti i campioni di cDNA miscelato con un loading dye orange. Quest'ultimo reagente è necessario per far precipitare il cDNA e permettergli di correre sul gel con maggiore facilità, inoltre gli conferisce una lieve colorazione arancione che permette all'operatore di monitorare la corsa.
4. Viene caricato il marcatore di pesi molecolari 1Kb ladder Promega®.
5. In fine si applica il campo elettrico e si attende il tempo necessario che il cDNA migri verso l'anodo.
6. Poi si visualizzeranno le bande agli UV.

2.1.5 ESTRAZIONE DI DNA DA GEL DI AGAROSIO.

Questa procedura permette di recuperare il DNA, in questo caso il cDNA, da gel di agarosio in cui ha corso. Si utilizza il Kit della Promega®, il Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System:

1. Tagliare il pezzetto de gel contenente la banda d'interesse, metterlo in una Eppendorf da 1,5 ml (0,93 g) e pesarlo:
 - *xbp1*: 0,27 g netti (1,20 g - 0,93 g)
 - *nr5a2*: 0,1 g netti (1,03 g - 0,93 g)
2. Aggiungere 10 µl di Membrane Binding Solution ogni 10 mg di gel
 - *xbp1*: 270 µl
 - *nr5a2*: 100 µl
3. Vortex per 30" e si lascia incubare a 50-65°C per 10' finché il gel non è completamente sciolto, poi si centrifuga brevemente a temperatura ambiente.
4. Per ogni campione inserire una minicolonna provvista di filtro (SV Minicoloumn) in un tubo (Collection Tube), forniti dal Kit.
5. Trasferire la miscela di gel e prodotto di PCR ottenuta nella minicolonna e incubare per 1'.
6. Centrifugare la minicolonna a 16000g.
7. Eliminare il percolato poiché il cDNA dovrebbe essere trattenuto dal filtro.
8. Fare un lavaggio della minicolonna con 700 µl di Membrane Wash Solution (al cui interno c'è etanolo) necessario per togliere eventuali impurità dal cDNA. Centrifugo la minicolonna a 16000g per 1'.
9. Eliminare il liquido percolato sul fondo.
10. Fare un secondo lavaggio con 500 µl di Membrane Wash Solution. Centrifugare a 16000g per 5'.
11. Eliminare il liquido percolato e fare un'ultima centrifuga a 16000g per 1' per eliminare il liquido restante.
12. Trasferire la minicolonna in una eppendorf sterile da 1,5 ml ed eluire il cDNA con 20 µl di acqua MilliQ (tiepida per migliorare l'eluizione).
13. Lasciare incubare per 1' a temperatura ambiente.
14. Centrifugare a 16000g per 1'.
15. Eliminare la minicolonna. I 20 µl di liquido percolati contengono il cDNA diluito con acqua che si può conservare tranquillamente a -20°C.

Si è poi fatto correre un altro gel all' 1% con una piccola aliquota dei miei cDNA purificati per stimare approssimativamente le concentrazioni presenti per poter poi calcolare le quantità necessarie per il clonaggio.

2.1.6 PREPARAZIONE DEL VETTORE DI CLONAGGIO "TA: CLONING".

I geni *xbp1* e *nr5a2* sono stati inseriti nel vettore commerciale Invitrogen pCR®II-TOPO. Il vantaggio nell'utilizzare questo vettore consiste nel fatto che permette l'inserimento diretto del prodotto di PCR ottenuto con una *Taq polimerasi*. Non sono

infatti necessarie reazioni di defosforilazione, restrizione e ligazione. Viene sfruttata l'attività spontanea di terminal-transferasi delle *Taq polimerasi*. L'enzima fornisce infatti prodotti con estremità 3' sporgenti di un nucleotide A. Il vettore viene fornito linearizzato, con estremità 3' sporgenti di una singola timidina e con una Topoisomerasi I legata covalentemente alle sue estremità. La strategia di clonaggio sfrutta l'attività di ligasi della Topoisomerasi I, perciò la ligazione del vettore con il prodotto di PCR avviene spontaneamente e con grande efficienza a temperatura ambiente in pochi minuti.

1. Si assembla la reazione come riportato nel protocollo:

Quantità	Reagenti
2 µl	Prodotto di PCR purificato <i>xbp1</i>
1 µl	Soluzione salina *
1 µl	TOPO® Vector
2 µl	Acqua

Quantità	Reagenti
4 µl	Prodotto di PCR purificato <i>nr5a2</i>
1 µl	Soluzione salina *
1 µl	TOPO® Vector

2. Agitare dolcemente.
3. Incubare la reazione 5 minuti a temperatura ambiente.
4. Trasferire la reazione in ghiaccio.
5. Procedere con la trasformazione dei batteri.

* nel caso si vogliono trasformare batteri elettrocompetenti si deve utilizzare una soluzione salina diluita 4 volte.

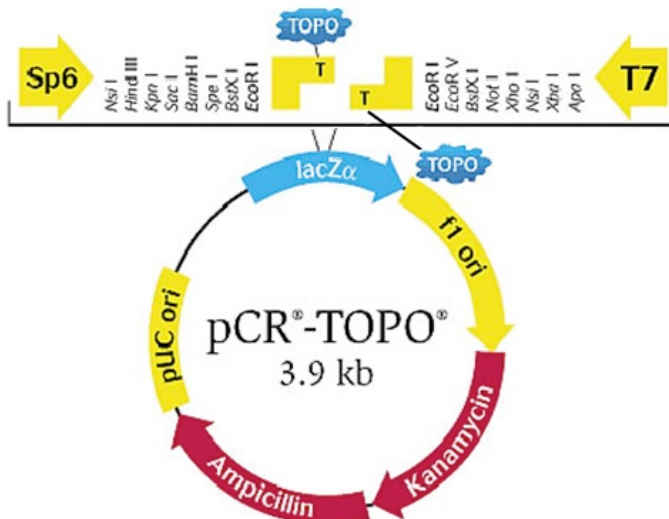


Fig. 2.1: Plasmide Invitrogen pCR®II-TOPO utilizzato per il T-A cloning. Possiede delle topoisomerasi legate all'estremità del sito di policonnessione per favorire la ligazione.

2.1.7 TRASFORMAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI.

Il processo di trasformazione comporta l'introduzione di DNA esogeno in una cellula procariote. Questa può essere ottenuta trattando le cellule in modo da cambiare temporaneamente le caratteristiche della membrana cellulare, per esempio, mediante *shock* termico oppure applicando un campo elettrico tra due elettrodi immersi nella sospensione cellulare. In entrambi i casi si generano sulle membrane dei punti di rot-

tura localizzati che permettono lo scambio di molecole tra l'interno e l'esterno della cellula. Per aumentare l'efficienza di trasformazione i batteri subiscono un pretrattamento che li rende competenti.

Elettroporazione:

Materiali:

- Batteri *E. coli* "Electrocomp One Shot TOP10" ("Invitrogen")
- DNA plasmidico
- Terreno di coltura SOC
- LB-agar con antibiotico per selezione (LB: terreno Luria-Bertani Medium)

Procedimento:

1. I batteri, conservati a -80° C, vengono lasciati scongelare in ghiaccio per circa dieci minuti.
2. Successivamente gli si aggiunge il plasmide che si intende espandere (100-200 ng) mescolando gentilmente.
3. La soluzione ottenuta di batteri e DNA esogeno viene trasferita in un'apposita cuvetta per l'elettroporazione e viene dato lo *shock* elettrico (1.8 kV).
4. Immediatamente vengono aggiunti alle cellule 250 µl SOC *medium* a temperatura ambiente. I batteri vengono poi recuperati e trasferiti in un tubo da coltura in cui si aggiungono altri 750 µl di SOC *medium*. Segue un'incubazione di un'ora a 37° C in agitazione (200 rpm).
5. Al termine dell'incubazione aliquote (20-100 µl) della trasformazione vengono seminate su piastre con terreno selettivo contenente Kanamicina e incubate a 37°C per tutta la notte.

Le colonie che crescono saranno quelle che hanno incorporato il plasmide che porta la resistenza all'antibiotico Kanamicina. Dunque, queste colonie, si possono successivamente far espandere ed analizzate in merito all'identità del plasmide contenuto. Nelle colonie che rimarranno bianche dopo l'aggiunta dei Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattopiranoside) e IPTG (isopropil-β-D-tiogalattopiranoside) l'inserzione sarà avvenuta con successo, mentre in quelle di colore blu il vettore si sarà richiuso senza inserzione comportando il ripristino dell'attività della β galattosidasi.

Dunque si sono scelte un paio di colonie bianche e per verificare la presenza dell'inserito è stata fatta una PCR da colonia.

Quantità	Reagenti
2 µl	Buffer
1 µl	Primer Forward 20 X
1 µl	Primer Reverse 20 X
0,5 µl	dNTPs
0,2 µl	Taq
15,3 µl	Acqua MilliQ
1	Colonia bianca

Si sono poi scelte le colonie che hanno dato amplificato e le si è trasferite in un terreno di coltura selettivo (LB liquido + Kanamicina) e lasciate crescere in sospensione a 37° C per tutta la notte.

2.1.8 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DAI BATTERI (Miniprep).

A questo punto si è estratto DNA plasmidico dai batteri utilizzando il *kit* “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega®), seguendo le istruzioni riportate nel manuale.

Materiali utilizzati:

- Terreno LB + antibiotici
- Soluzioni del *kit*:
 - soluzione di risospensione;
 - tampone di lisi;
 - soluzione contenente la proteasi alcalina;
 - tampone di neutralizzazione;
 - soluzione di lavaggio alla quale viene aggiunto etanolo;
- Colture batteriche in soluzione

Procedimento:

1. Una singola colonia di batteri *E. Coli*, contenente il plasmide da isolare, viene prelevata dalla piastra con una punta sterile ed inoculata in 5 ml di terreno LB sterile contenente l'antibiotico per la selezione. La coltura viene incubata a 37° C per tutta la notte in agitazione continua (200 rpm).
2. Il mattino successivo un'aliquota della coltura satura di batteri (2-5 ml) viene centrifugata a 5000g per 5 minuti a temperatura ambiente.
3. Il sovrantante ottenuto viene rimosso, mentre il *pellet* di cellule batteriche viene risospeso accuratamente utilizzando 250 µl della soluzione di risospensione.
4. Si aggiungono 250 µl del tampone di lisi e si mescola delicatamente invertendo il tubo 4 volte: in tal modo i batteri vengono lisati.
5. Si aggiungono 10 µl della soluzione contenente la proteasi alcalina, si mescola invertendo il tubo 4 volte e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti. La proteasi alcalina inattiva le endonucleasi, rilasciate durante la lisi, che potrebbero degradare il DNA. Inoltre, degradando le proteine in modo aspecifico, riduce il livello di contaminazione proteica nel prodotto finale.
6. Si aggiungono 350 µl del tampone di neutralizzazione e si mescola invertendo

il tubo 4 volte. A questo stadio si può osservare la presenza di un precipitato bianco in conseguenza della precipitazione dei detriti cellulari del lisato (proteine, membrane e DNA genomico). Si centrifuga alla massima velocità per 10 minuti a temperatura ambiente.

7. Si preleva il sovrantante, lo si carica in una colonnina (“spin column”) inserita in un tubo da 2 ml, e si centrifuga alla massima velocità per un minuto a temperatura ambiente. Il DNA plasmidico rimane legato alla resina della colonnina, mentre i residui della lisi vengono eliminati.
8. Per eliminare tutti i componenti che si sono legati in modo aspecifico alla resina si eseguono in successione 2 lavaggi rispettivamente con 750 μ l e 250 μ l della soluzione di lavaggio con etanolo aggiunto, centrifugando alla massima velocità per 1 minuto ed eliminando la soluzione raccolta nella provetta.
9. Si centrifuga a vuoto alla massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente per far scendere il tampone residuo contenuto nella colonnina.
10. La colonnina viene trasferita in un tubo sterile da 1,5 ml. Il DNA plasmidico, legato mediante legami covalenti alla resina, viene eluito aggiungendo al centro della colonnina 100 μ l di acqua priva di nucleasi e centrifugando a temperatura ambiente per 1 minuto alla massima velocità.
11. Il DNA così purificato viene conservato a -20° C.

Mentre le colonie che non sono state utilizzate vengono fatte crescere e poi vengono stoccate in glicerolo al 20-30% a -80° C.

2.2 COSTRUZIONE DELLE SONDE

2.2.1 QUANTIFICAZIONE MINIPREP E RESTRIZIONE DEI VETTORI.

Dopo la miniprep è stato fatto correre un altro gel all'1% di agarosio con il DNA plasmidico estratto con la miniprep e con il software Molecular Analyst (Biorad) è stato quantificato il DNA a disposizione. In seguito si è fatta una restrizione dei vettori contenenti *xbp1* e *nr5a2* per capire il verso in cui gli inserti si sono integrati. Quest'ultimo passaggio è necessario per sintetizzare le sonde poiché i plasmidi utilizzati come vettori possiedono 2 promotori disposti in direzioni opposte: il promotore per la polimerasi del fago T7 e quella del fago SP6.

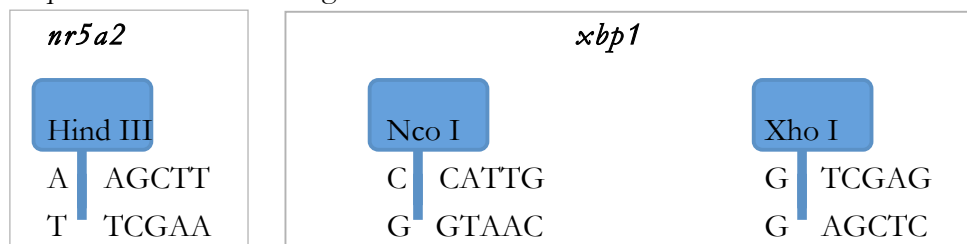
RESTRIZIONE *xbp1* E *nr5a2*

Questa tecnica consiste nella creazione di mappe di restrizione* per i nostri 2 geni in modo da poterli identificare con l'elettroforesi. Per la creazione di mappe di restrizione ci si è avvalsi del programma Webcutter (disponibile in rete). Questo programma controlla la sequenza da noi inserita, generando in automatico una mappa di

restrizione con indicati tutti gli enzimi che tagliano all'interno o alle estremità UTR 5' e UTR 3' della nostra sequenza. Si è così scelto degli enzimi specifici e, conoscendo i siti di taglio all'interno dei nostri geni, si sono stimate le dimensioni dei frammenti che si sarebbero prodotti.

*Si definisce mappa di restrizione l'insieme dei frammenti generati dalla digestione da parte di endonucleasi sito specifiche (enzimi di restrizione). Di questi frammenti è possibile, conoscendo la lunghezza del gene, prevederne le dimensioni. Inoltre ogni gene ha una mappa di restrizione unica per ogni enzima usato ed è diversa da quella di qualsiasi altro gene digerito con lo stesso enzima.

Sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione:



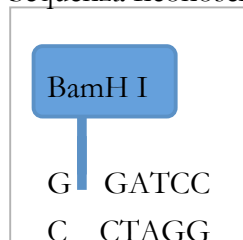
GEL DI AGAROSIO:

Campione caricato	Composizione	Quantità
Digerito con enzima	Campione di DNA per ogni gene	20 µl
	Loading dye orange 5X	5 µl
Controllo indigerito	Capione di DNA indigerito	1 µl
	Loading dye orange 5X	2 µl
	Acqua MilliQ	2 µl

2.2.2 LINEARIZZAZIONE VETTORI.

Per la sintesi delle sonde è necessario linearizzare prima i vettori utilizzando l'enzima BamHI.

Sequenza riconosciuta da BamH I:



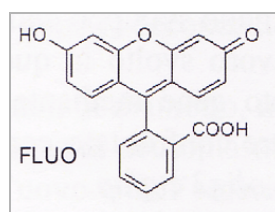
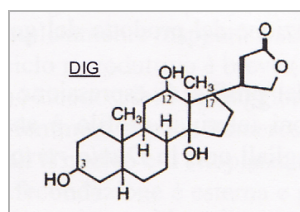
Quantità	Reagenti
25 µl	DNA (in media ci sono 200ng/µl)
5 µl	Buffer 10 X
1 µl	BSA 100 X
1 µl	BamH I
18 µl	AcquaMilliQ

2.2.3 COSTRUZIONE DELLE SONDE ANTISENSENDO.

Dopo aver stabilito l'orientamento degli inserti, per la sintesi di sonde antisense di RNA, si è utilizzata la polimerasi fagica T7 il cui promotore si trova in un lato del polilinker del vettore plasmidico pCRII-TOPO. Per la reazione vengono utilizzate miscele di ribonucleotidi contenenti una frazione di UTP (desossiridintrifosfato) marcate con digossigenina (NTPs-DIG), molecola bersaglio di anticorpi specifici.

Quantità	Reagenti
2 µl	Buffer di reazione 5 X
2 µl	NTPs-DIG10X
5 µl (1µg)	DNA
1 µl	RNasi Inibitore
1 µl	T7
9 µl	Acqua MilliQ

La reazione viene incubata a 37° C per 2 ore al termine delle quali vengono aggiunti 2µl di DNasi priva di RNasi per degradare lo stampo. La reazione viene lasciata per 20 minuti a 37°C. A questo punto le sonde vanno purificate utilizzando il kit Mege-CLEAR (Ambion), quantificate con un gel di agarosio al 1,5% e infine conservate a -80°C.



2.3. TRATTAMENTI FARMACOLOGICI CON SOSTANZE TERATORGENE

Si sono scelte come finestre temporali in cui fare il trattamento : 32-52 hpf e 52-72h hpf. Questo perché si vuole monitorare l'espressione dei geni d'interesse nel pancreas in formazione. Infatti durante le 32-52h inizia la morfogenesi del pancreas esocrino mentre tra le 52 e 72 hpf avviene l'allungamento.

DAPT

Il DAPT in polvere (Sigma ®) viene sciolto in DMSO (dimetilsolfossido) per preparare una soluzione madre 100mM. Gli Embrioni allo stadio di interesse vengono trattati con DAPT diluendo la soluzione madre in fish water* fino alla concentrazione di 1mM. Gli embrioni di controllo vengono posti in fish water contenente la stessa concentrazione di DMSO.

Acido Retinoico

L'acido retinoico in polvere (Sigma®) viene disciolto in DMSO per preparare la soluzione madre 100 µM. Gli embrioni vengono posti in una soluzione diluita in fish water fino alla concentrazione finale 0,1 µM. Poi vengono posti in incubatore a 28.5° C tutta la notte, isolati dalla luce. I controlli vengono trattati con la medesima concentrazione di DMSO.

DEAB

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

SU5402

Come per il DAPT anche questa sostanza viene acquistata in polvere e sciolta in DMSO per ottenere una soluzione madre di 10mM. Il trattamento va effettuato al buio ponendo gli embrioni in *fish water** contenente SU5402 in concentrazione 20 μ M. Anche in questo caso per gli embrioni di controllo si utilizza il DMSO.

SB431542

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

Alsterpaullone (AP)

L'AP in polvere (Sigma®) viene sciolto in DMSO per ottenere una soluzione madre di 100 μ M. Per il trattamento degli embrioni si è utilizzata una soluzione finale avente concentrazione 1 μ M. Gli embrioni dello stadio desiderato vengono immersi in Alsterpaullone diluito in *fish water** fino alla concentrazione finale desiderata e posti in incubatore a 28.5° C tutta la notte, isolati dalla luce. I controlli vengono trattati con la medesima concentrazione di DMSO priva di AP.

Dorsomorphina

La DM (Sigma®) viene disciolta in DMSO ad una concentrazione 100 μ M nella soluzione madre. Gli embrioni dello stadio desiderato vengono immersi in dorsomorfina diluita in *fish water** fino alla concentrazione finale di 10 μ M e posti in incubatore a 28.5° C per tutta la notte, isolati dalla luce. I controlli vengono trattati con la medesima concentrazione di DMSO.

Ciclopamina

Anche questa sostanza viene acquistata in polvere alla (Sigma®) e viene disciolta in etanolo 95% per ottenere la soluzione madre di concentrazione 10 mM. Gli embrioni vengono trattati con una soluzione 10 μ M in *fish water**. Gli embrioni di controllo sono invece trattati con etanolo.

Il giorno successivo tutti gli embrioni vengono sciacquati più volte in *fish water* pulita contenente PTU*.

Gli embrioni sono poi stati trattati con PFA (paraformaldeide) per circa 2h per bloccare lo sviluppo allo stadio desiderato (52 e 72 hpf). Poi sono stati passati in metano-

lo per 30' a -20°C. Il metanolo serve per permeabilizzarli ed, eventualmente, per conservarli.

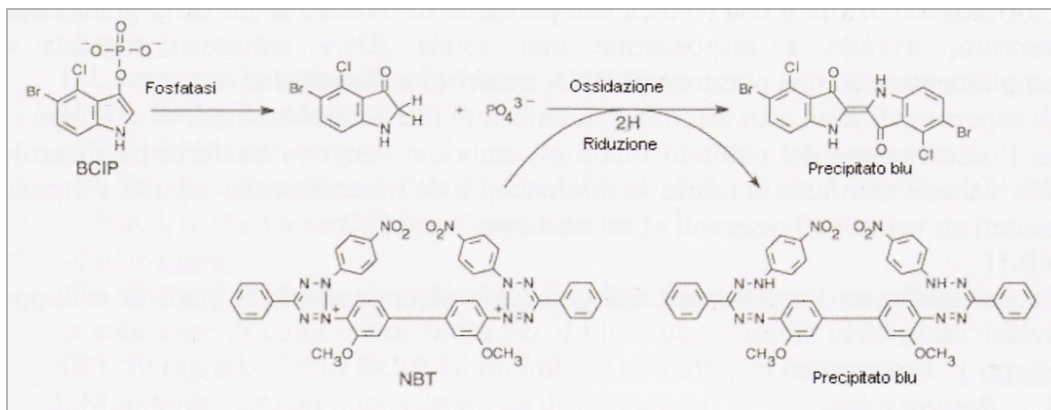
*Fish water (50X): 25 g instant ocean
 39,5 CaSO₄
 5 g NaHCO₃
 in 5L di acqua deionizzata

*PTU(1X): 10% PBS e
 0,003% 1-fenil-2-tiourea
 Disciolte in acqua MilliQ

La PTU è necessaria per evitare che si formi la pigmentazione negli embrioni.

2.4 IBRIDAZIONE IN SITU SU EMBRIONI TRATTATI

Il saggio dell'ibridazione *in situ* su embrioni *in toto* permette di analizzare l'espressione dei geni d'interesse, nello spazio e nel tempo, usando sonde antisense ad RNA sequenza-specifiche marcate non radioattivamente. Questa tecnica si basa sull'appaiamento specifico della sonda al trascritto del gene di interesse e la loro interazione può essere poi rilevata sfruttando la marcatura della sonda. Infatti all'interno della sonda sono stati incorporati dei nucleotidi modificati contenenti Digossigenina o Fluoresceina, queste 2 molecole vengono riconosciute da anticorpi specifici coniugati all'enzima fosfatasi alcalina. Questa, in presenza di un substrato cromogenico appropriato, produce un composto colorato nel sito di localizzazione dell'enzima. Il segnale viene inoltre amplificato dalla conversione di numerose molecole di substrato ad opera di ogni molecola di enzima. Il substrato cromogenico è una soluzione di NBT/BCIP (nitro-blu di tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolofosfato). La fosfatasi alcalina catalizza una reazione di ossido riduzione in cui vi è la rimozione di un gruppo fosfato dal composto BCIP che si ossida, mentre NBT si riduce. Entrambi i prodotti di ossido-riduzione sono dei composti insolubili che formano un precipitato di colore blu-viola. La procedura viene effettuata utilizzando tutti gli accorgimenti necessari per evitare la contaminazione da RNAsi.



PRIMO GIORNO DI IBRIDAZIONE

1. Reidratazione. Gli embrioni fissati, privi del corion e conservati in metanolo a -20°C, reidratati con soluzioni concentrazione crescente di PBT e decrescente di metanolo.

PBT: tampone fosfato (Phosphate buffered saline Sigma®) + Tween20 0,1%.

2. Digestione con proteinasi K. Vengono aggiunti alla soluzione di PBT, 10 µg/ml di proteinasi K in PBS per digerire facilitare la successiva incorporazione della sonda. Il tempo di incubazione, dipendente dallo stadio degli embrioni usati, nel nostro caso è di 45 min.

Subito dopo è necessario il fissaggio in PFA (paraformaldeide) al 4% in PBS (Phosphate buffered saline Sigma®) per almeno 20 minuti.

3. Preibridazione. Preibridare gli embrioni con 300-400 µl di soluzione HM (miscela di ibridazione - *hybridization mix*) per 2-5 ore alla temperatura di 65°C.

HM: - formamide 50%

- SSC 5X
- Tween20 0,1%
- Acido citrico a pH 6.0 (460 µl di 1M for 100ml)
- Eparina 50 µg
- tRNA 500 µg/ml

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

SECONDO GIORNO DI IBRIDAZIONE

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

- 100% di HM (priva di tRNA ed eparina) : lavaggio rapido alla temperatura di ibridazione
- 75% di HM 25% SSC 2X per 15 minuti alla temperatura di ibridazione
- 50% di HM, 50% SSC 2X per 15 minuti alla temperatura di ibridazione
- 25% di HM, 75% SSC 2X per 15 minuti alla temperatura di ibridazione
- 100% SSC 2X per 15 minuti
- 50% SSC 0.2X 50% formamide per 30 minuti alla temperatura di ibridazione (2 lavaggi)

2. Preincubazione. Attraverso una serie di passaggi a concentrazione crescente di PBT e decrescente di SSC 0.2X si riporta la soluzione al 100% di PBT.

- 75% SSC 0.2X 25% PBT per 10 minuti a temperatura ambiente
- 50% SSC 0.2X 50% PBT per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 25% SSC 0.2X 75% PBT per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 100% PBT per 10 minuti a temperatura ambiente.

Si sostituisce il PBT con una soluzione di PBT/Sheep serum/BSA e si lasciano gli embrioni per almeno 2 ore a temperatura ambiente in questa miscela.

3. Incubazione. In base alla marcatura della sonda, l'anticorpo utilizzato deve riconoscere la digossigenina o la fluoresceina. La reazione anticorpale è condotta in agitazione tutta la notte alla temperatura di 4°C in circa 300-400 µl di soluzione. La soluzione, in questo caso contiene: - la sonda, anti-DIG, diluiti 1:3000 in PBT, 2% sheep serum e 2mg/ml BSA.

TERZO GIORNO DI IBRIDAZIONE

1. Lavaggi. Gli embrioni vengono sottoposti ad una serie di lavaggi in PBT per rimuovere tutto l'anticorpo che non si è legato in maniera specifica alla sonda (6 lavaggi da 15 minuti a temperatura ambiente).

2. Precolorazione. Per preparare gli embrioni all'ambiente adeguato prima di fornire il substrato per la fosfatasi alcalina, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 5 minuti utilizzando lo tampone di colorazione specifico per il substrato utilizzato per la colorazione.

Tampone di colorazione (DIG staining buffer):

- 100mM Tris HCL pH9.5,
- 50mM MgCl₂,
- 100mM NaCl, 0,1% tween 20

3. Colorazione. Gli embrioni trasferiti in un vetrino orologio sono stati incubati al buio nella soluzione di colorazione. Il substrato utilizzato è l'NBT-BCIP. Per monitorare la reazione colorimetrica è necessario osservare gli embrioni al microscopio dissezione ogni 10-15 minuti. Se la colorazione è lenta, è possibile farla procedere più velocemente ad una temperatura di 37° C. Gli embrioni possono, inoltre, essere conservati per una notte a 4° C, temperatura alla quale la reazione procede molto lentamente. Una volta raggiunto il livello di colorazione desiderato, la reazione viene bloccata lavando gli embrioni con PBT 3 x 5'.

Materiale per colorazione:

- NBT 375 mg/ml
- BCIP 175mg/ml
- Tampone di colorazione 50ml

4. Fissaggio. Viene rimossa la soluzione di colorazione; gli embrioni vengono lavati in PBT 3 x 5' e poi fissati tutta la notte con PFA al 4% a 4°C.

2.4.1 IBRIDAZIONE DOPPIA *nr5a2* - INSULINA, *xbp1* - INSULINA.

La procedura per l'ibridazione doppia è uguale alla singola, fino al terzo giorno di ibridazione. Una volta terminati i lavaggi con PBT procede con:

Rimozione (*stripping*) dell'anticorpo. Per rimuovere il primo anticorpo gli embrioni sono trattati con la soluzione di stripping (3 lavaggi per 5 minuti) e poi lavati in PBT(3 lavaggi da 5").

Soluzione di stripping: - 100mM Glicina-HCl pH 2.2

- 0,1% tween 20

Preincubazione. Seguono dei lavaggi in PBT e la preincubazione nella soluzione PBT/sheep serum/BSA.

Incubazione e colorazione. Sono aggiunti 300-400 ul di soluzione contenente l'anticorpo (anti-FLUO 1:3000 diluiti in PBT/sheep serum/BSA) specifico per la sonda FLUO (fluoresceina) procedendo come per la prima colorazione. 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.

Tampone di colorazione: 100mM Tris HCl pH 8.2, 0.1% tween 20.

2.5 MONTAGGIO VETRINI E FOTO

Per acquisire le immagini dopo le ibridazioni *in situ* gli embrioni fissati sono stati immersi in glicerolo 85% / PBS, privati del tuorlo e montati su vetrini portaoggetti (menzel-Glaser). E' stata utilizzata una fotocamera digitale *Leica* DC500, montata su un microscopio *Leica* DMR, dotato di ottica Nomarski. Le immagini sono poi state processate con il programma *Adobe Photoshop CS*.

3

Risultati e discussione

3.1 CLONAGGIO

La strategia utilizzata per clonare le sequenze di *nr5a2* e di *xbp1* in vettori plasmidici, per la successiva produzione di sonde antisenso da utilizzare in esperimenti di ibridazione *in situ*, è stata quella di retrotrascrivere l'mRNA totale di *zebrafish*, estratto da embrioni a differenti stadi di sviluppo, utilizzando oligo dT; successivamente dal cDNA ottenuto si sono amplificate tramite PCR e primers specifici le sequenze di interesse. I prodotti di PCR sono stati quindi inseriti all'interno del vettore commerciale pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen).

Una volta avvenuta la reazione di ligazione con il vettore ottenuto si sono trasformati dei batteri elettro-competenti. A questo punto si sono piastrate due aliquote di batteri su terreno LB-Agar selettivo in presenza di IPTG e X-Gal. La presenza del gene della β galattosidasi all'interno del plasmide ha permesso la selezione dei cloni contenenti l'inserito mediante il saggio di α -complementazione. Alcune delle colonie batteriche cresciute sulla piastra e di colore bianco sono state inoculate in coltura liquida in presenza di Kanamicina per una notte. Il mattino successivo si è estratto il DNA plasmidico. Per tale operazione ci si è serviti del kit "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" ("Promega"). Una volta ottenuto il DNA plasmidico e stimata la concentrazione si è proceduto con l'analisi di restrizione dei costrutti per confermare la presenza dell'inserito e stabilirne l'orientamento rispetto al sito di policlونaggio. Il vettore Invitrogen pCR[®]II-TOPO[®] contiene due promotori fagici (T7 e SP6) all'estremità del sito di policlونaggio in cui si inserisce il gene d'interesse, per cui è necessario conoscere la disposizione dell'inserito per poter scegliere la polimerasi adatta per sintetizzare la sonda antisenso.

Per stabilire l'orientamento di *nr5a2* si è utilizzato l'enzima HindIII. L'enzima taglia due volte l'inserito e una il vettore generando 3 frammenti con due possibili pattern: uno da 200 pb, uno da 900 pb e uno da 4600 pb nel caso in cui l'inserito sia orientato

3'-5' rispetto al promotore di T7; mentre uno da 200 pb, uno da 600 pb e uno da 4900 pb ne caso in cui sia 5'-3'. Per l'analisi di restrizione di *xbp1* si sono scelti gli enzimi NcoI e XhoI: se l'inserto è orientato 3'-5' rispetto al promotore T7, si otterranno 2 prodotti, uno da 4600 pb e uno da 800 pb. Nel caso invece l'orientamento rispetto al promotore T7 sia 5'-3' i prodotti saranno da 4800 pb e 600 pb.

Dopo aver verificato con un'elettroforesi su gel di agarosio le dimensioni dei prodotti di restrizione (Fig. 3.1) si sono scelte le colonie in cui il gene d'interesse si fosse inserito in direzione 3'-5' rispetto al promotore T7. Per confermare i dati ottenuti tramite analisi di restrizione i plasmidi selezionati sono stati mandati a sequenziare presso la BMR Genomics. L'allineamento delle sequenze ottenute con quelle depositate nella banca dati Gene Bank ha confermato l'orientamento dedotto dall'analisi di restrizione.

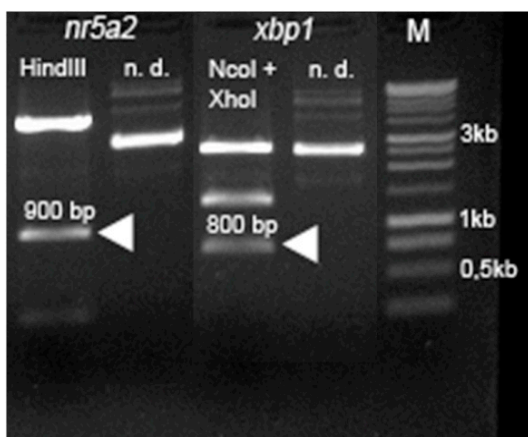


Fig. 3.1: In figura è mostrata l'analisi di restrizione dei vettori contenenti i geni *nr5a2* e *xbp1*. All'apice delle corsie di corsa elettroforetica sono indicati il nome del gene e gli enzimi utilizzati per l'analisi. A fianco dei vettori digeriti sono stati caricati gli stessi non sottoposti a restrizione (n.d.). Il pattern di restrizione permette di determinare l'orientamento degli inserti rispetto al sito di policonnessione: in particolare la presenza delle bande da 900 bp e da 800 bp indicano che i cloni in questione sono orientati in direzione 3' - 5' rispetto al promotore della polimerasi T7. Sulla corsia di destra è caricato il marcatore di peso molecolare (M).

Poiché le polimerasi fagiche non riconoscono sequenze specifiche di fine trascrizione per sintetizzare RNA è necessario utilizzare come stampo un plasmide linearizzato in modo da evitare che la sintesi continui fino al distacco casuale dell'enzima dallo stampo generando trascritti lunghi ed eterogenei. Per linearizzare entrambi i plasmidi si è scelto un enzima che li tagliasse in un solo punto a monte del 5' dell'inserto: in entrambi i casi la scelta è caduta su BamHI. Una volta ottenuto il vettore linearizzato e determinatane la concentrazione sono state sintetizzate le sonde antisense: la loro integrità e concentrazione sono state valutate tramite una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

3.2 IBRIDAZIONI *IN SITU* SU EMBRIONI TRATTATI

Le ibridazioni *in situ* sono un mezzo molto potente per poter analizzare il pattern di espressione di un gene. Lo studio intrapreso si riproponeva di valutare l'espressione di *nr5a2* e di *xbp1* nel pancreas esocrino di embrioni selvatici cercando di comprende-

re come questa sia influenzata dalle principali vie di segnale durante lo sviluppo. Aggiungendo al medium di crescita degli embrioni sostanze antagoniste o agoniste delle vie del TGF β (Nodal e BMP), del Wnt, dell'Acido Retinoico, dell'FGF, del Delta-Notch e dell'Hedgehog, si è potuto osservare come queste condizionino l'espressione dei geni d'interesse.

Per ogni sostanza farmacologica testata gli embrioni sono stati separati in quattro gruppi. Due gruppi sono stati utilizzati come controllo sperimentale, gli altri due sottoposti a trattamento farmacologico in due distinte finestre temporali: dalle 32 hpf alle 52 hpf il primo, dalle 52 hpf fino alle 72 hpf il secondo. Al termine dei trattamenti gli embrioni e i rispettivi controlli sono stati fissati in PFA 4% e successivamente impiegati per esperimenti di ibridazione *in situ*.

Trattamento con Acido Retinoico (AR)

Il trattamento con Acido retinoico esogeno (*Fig. 3.2*) sia a 32-52 hpf che 52-72 hpf per entrambi i geni comporta una riduzione dell'espressione (B, D, F, H). Nel caso di *nr5a2* però la riduzione è più drastica, soprattutto a 52 hpf (B). Questo risultato appare essere in contraddizione con quello ottenuto con DEAB, inibitore della via dell'AR, dove anche in quel caso è presente una riduzione, addirittura meno drastica (*Fig. 3.3*). Perciò è plausibile ipotizzare che la via dell'acido retinoico influenzi a vari livelli, in un rapporto dose-dipendente, l'espressione e il ruolo di *nr5a2*. Tale caratteristica di morfogeno concentrazione-dipendente dell'AR si riscontra spesso in letteratura come nel caso dell'induzione dei progenitori pancreatici e del loro futuro differenziamento in β cellule. Studi condotti in uomo e topo hanno dimostrato che l'AR è necessario per specificare i progenitori pancreatici e successivamente, con un rapporto dose-dipendente, è necessario per indurre il differenziamento dell'endocrino. Nel caso però di sovra dosaggio di AR esogeno le cellule rimangono nello stato di progenitori indifferenziati (Öström et al., 2008).

Dunque è possibile che l'alta concentrazione di AR induca le cellule a rimanere in uno stato indifferenziato e che perciò *nr5a2* non venga espresso. La mancanza di marcatura non indicherebbe una perdita di tessuto ma semplicemente la presenza di un tessuto non differenziato. Interessante è notare che studi condotti su l'omologo di *nr5a2* in topo e uomo provano il suo coinvolgimento diretto, in sinergia con le β catenine (Wnt), nella regolazione del ciclo cellulare attivando alcune cicline e inducendo così la proliferazione cellulare (Botrugno et al., 2004).

Anche l'espressione di *xbp1* nei trattati con AR (*Fig. 3.2 E-H*) mostra una riduzione in entrambe le finestre temporali (F, H). Nei trattati più tardivamente (52-72 hpf) la diminuzione del segnale nel pancreas esocrino è meno accentuata e pare che ci sia un

aumento dell'isola endocrina; tuttavia questo dato va verificato utilizzando anche alle 72 ore di sviluppo un marcatore della parte endocrina del pancreas.

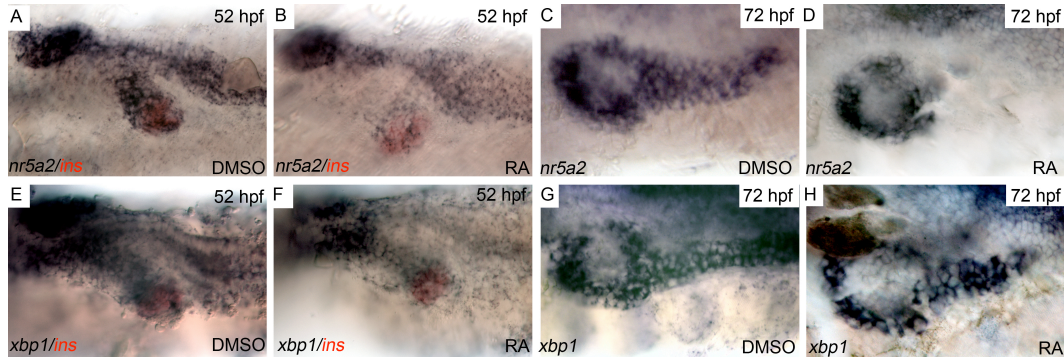


Fig 3.2: Embrioni trattati con AR esogeno e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *ins* (A, B, E, F). Se paragonati agli embrioni di controllo (A, C) gli embrioni trattati con AR e ibridati con *nr5a2* a 52 hpf (B) e a 72 hpf (D) presentano una evidente riduzione della marcatura. Anche nel caso degli embrioni marcati con *xbp1* a 52 hpf (F) vi è riduzione di marcatura rispetto ai controlli (E). A 72 hpf (H) gli la marcatura di *xbp1* è ridotta nella coda dell'esocrino; l'isola endocrina sembra inoltre più grande rispetto ai controlli (G) (A-H) Gli embrioni sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

Trattamento con DEAB

I trattati con DEAB (Fig. 3.3), inibitore della retinaldeide deidrogenasi (RALDH), presentano una riduzione dell'espressione di *nr5a2* in entrambe le finestre temporali in cui si sono fatti i trattamenti (B, D). Nel caso invece di *xbp1* vi è una riduzione meno severa (F, H).

In entrambi i casi i trattati fenocopiano, in parte e maniera meno drastica, i mutanti *neckless (nls)* (Begemann et al., 2001) in cui l'inibizione della biosintesi dell'acido retinoico provoca l'assenza del pancreas sia esocrino che endocrino. Questi risultati perciò dimostrano l'importanza che riveste l'AR nel corretto sviluppo del pancreas: la totale assenza di AR potrebbe non permettere la proliferazione e il differenziamento

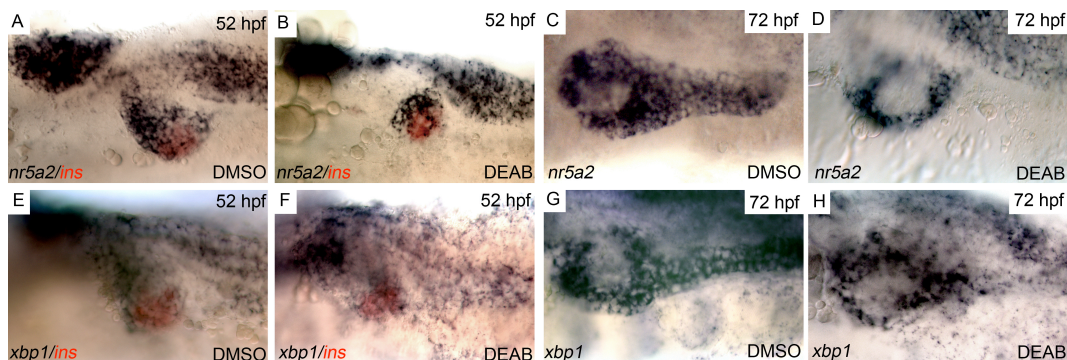


Fig 3.3: Embrioni trattati con il DEAB (Dietilaminobenzaldeide), inibitore della via dell'AR e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *ins* (A, B, E, F). A 52hpf gli embrioni trattati (B, F) mostrano una riduzione evidente della marcatura nel pancreas esocrino se paragonati ai controlli(A, E), mentre l'*insulina* non sembra subire variazioni. A 72 hpf la marcatura negli embrioni trattati (D, H) è presente solo nella regione della testa del pancreas mentre scompare dal corpo e dalla coda. (A-H) Gli embrioni sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

cellulare attraverso il blocco del Wnt e dunque bloccare l'accrescimento e il differen-

ziamento del tessuto esocrino, almeno quello che si sarebbe dovuto sviluppare dopo la finestra temporale in cui sono stati trattati gli embrioni.

Trattamento con Alsterpaullone (AP)

Nei trattati con Alsterpaullone (Fig. 3.4), agonista del Wnt è stata riscontrata una diminuzione dell'espressione di *nr5a2* (B, D). Un aumento della concentrazione di β catenine potrebbe aver sbilanciato la risposta cellulare verso la via non canonica a scapito della via canonica (Harada et al., 2007): la mancata entrata nel ciclo differenziativo avrebbe causato la diminuzione dell'espressione di *nr5a2*. Gli embrioni trattati con AP (Fig. 3.4) mostrano una riduzione di *xbp1* più drastica a 52 hpf (F) piuttosto che a 72 hpf (H). ma vi è comunque più marcatura rispetto agli embrioni ibridati con la sonda di *nr5a2*.

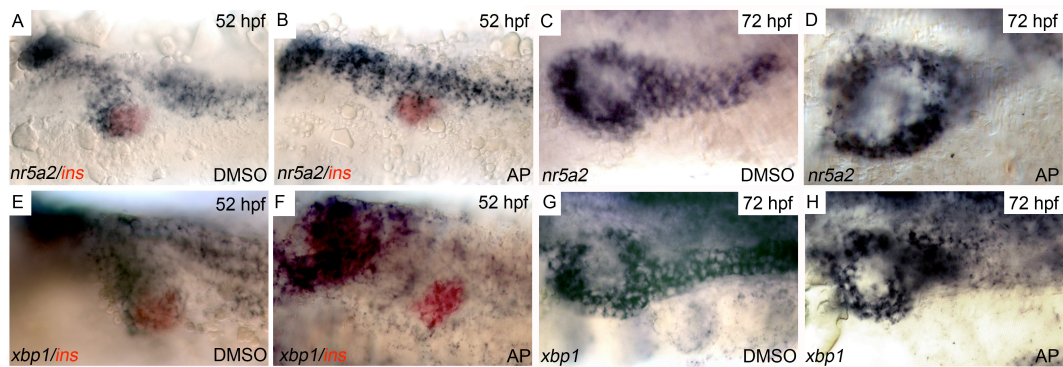


Fig 3.4: Embrioni trattati con AP, agonista del Wnts e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *ins* (A, B, E, F). Il trattamento con AP causa una riduzione dell'espressione nel pancreas esocrino dei geni *nr5a2* e *xbp1* (B, D, F, H) mentre lascia inalterata l'espressione del gene per l'insulina (B, F). (A-H) Gli embrioni sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

Trattamento con DAPT

Il trattamento con DAPT (Fig. 3.5) comporta il blocco della via di segnale del Notch coinvolta nello sviluppo pancreatico, nel mantenimento dei precursori nell'endocrino e nel differenziamento dell'esocrino. Il DAPT è un inibitore della γ -secretasi (Geling et al., 2002) che, impedendo il rilascio e la traslocazione nel nucleo delle porzioni intracellulare di Notch, ne impedisce la modulazione dell'espressione dei geni bersaglio. Applicando il DAPT dalle 30 alle 52 ore di sviluppo, ossia quando si è già formato l'abbozzo pancreatico postero-dorsale ed inizia la formazione e l'allungamento dell'abbozzo antero-ventrale (la porzione esocrina), si riscontra una diminuzione dell'espressione di *nr5a2* (B). Questo risultato conferma i dati di letteratura, ricavati dai risultati di saggi di ibridazione *in situ* negli embrioni mutanti genetici per la via di segnale Delta-Notch, *mind bomb* (*mib*), e in quelli trattati con DAPT che fenocopiano il mutante (Yee et al., 2005; Zecchin et al., 2007). Anche gli embrioni trattati dalle 52 alle 72 ore presentano l'espressione di *nr5a2* notevolmente ridotta (D): non sono vi-

sibili il corpo e la coda del pancreas. La riduzione del tessuto esocrino è evidente anche negli embrioni marcati con la sonda per *xbp1* (F, H).

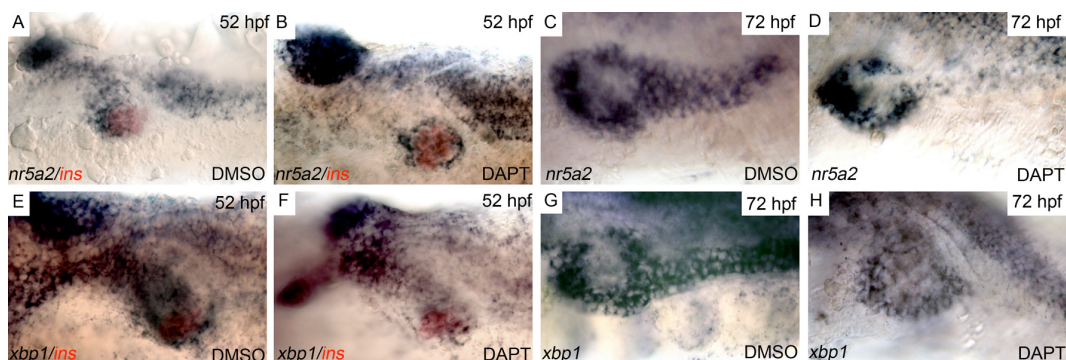


Fig 3.5: Embrioni trattati con DAPT, inibitore della via del Notch e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *ins* (A, B, E, F). Se paragonati agli embrioni di controllo (A, C) gli embrioni trattati con DAPT e ibridati con *nr5a2* a 52 hpf (B) e a 72 hpf (D) presentano una evidente riduzione di marcatura che è presente soltanto attorno all'isola endocrina. Anche nel caso degli embrioni marcati con *xbp1* sia a 52 hpf (F) che a 72 hpf (H) vi è riduzione di marcatura rispetto ai controlli (E, G). (A-H) Gli embrioni sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

Trattamento con SU5402

Si è osservato che applicando la sostanza chimica SU5402 (Fig. 3.6), che va ad inibire l'attività dei recettori FGF (Mohammadi et al., 1997), sia dalle 30-52 hpf che dalle 52-72 hpf, vi è una diminuzione dell'espressione dei *nr5a2* (B, D). Anche i trattati con SU5402 ibridati con *xbp1*, presentano una riduzione della marcatura (F, H). Questi dati sono facilmente spiegabili visto il ruolo cruciale che le FGF giocano nello sviluppo generale del pancreas. È infatti stato dimostrato nello studio di Manfroid

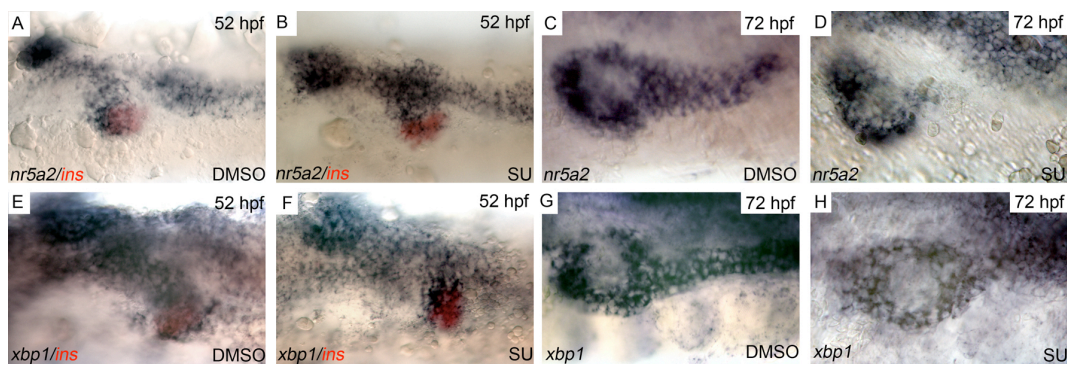


Fig 3.6: Embrioni trattati con SU5402, inibitore della via del FGF e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *ins* (A, B, E, F). Se paragonati agli embrioni di controllo (A, C) gli embrioni trattati con SU5402 e ibridati con *nr5a2* a 52 hpf (B) e a 72 hpf (D) presentano una riduzione di marcatura. Anche nel caso degli embrioni marcati con *xbp1* sia a 52 hpf (F) che a 72 hpf (H) vi è riduzione di marcatura rispetto ai controlli (E, G). La marcatura con *insulina* è paragonabile in controlli e trattati. (A-H) Gli embrioni sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

(Manfroid et al., 2007) che trattando larve di zebrafish con SU5402 nell'intervallo 24-29 ore di sviluppo, l'espressione di *ptf1a* è assente; facendo invece lo stesso trattamento nell'intervallo 32-36 ore, quando l'abbozzo pancreatico antero-ventrale è già

stato specificato, l'espressione di *ptf1a* a tre giorni di sviluppo è presente, ma notevolmente ridotta e circoscritta alla porzione anteriore.

Trattamenti con SB431542

I trattamenti con SB431542 (Fig.7), inibitore del TGF β signaling-attivina, hanno portato ad una riduzione dell'espressione, più drastica nell'intervallo tra le 32-52 hpf piuttosto che tra le 52-72 hpf di *nr5a2* (B, D) e di *xbp1* (F, H). Nel primo gruppo di embrioni infatti l'espressione dei due geni sembra indicare una scomparsa pressoché totale del tessuto pancreatico esocrino mentre negli embrioni trattati più tardivamente porzione anteriore è presente anche se ridotta. Mentre la riduzione di *xbp1* può essere spiegata dagli studi condotti da Bennet e i suoi collaboratori sul ruolo del Nodal signaling nel differenziamento di zebrafish (Bennet et al., 2007) in cui si dimostra inoltre che *xbp1* è un bersaglio diretto di questa via di segnale, la diminuzione dell'area di espressione di *nr5a2* è probabilmente dovuta alla mancanza di tessuto pancreatico.

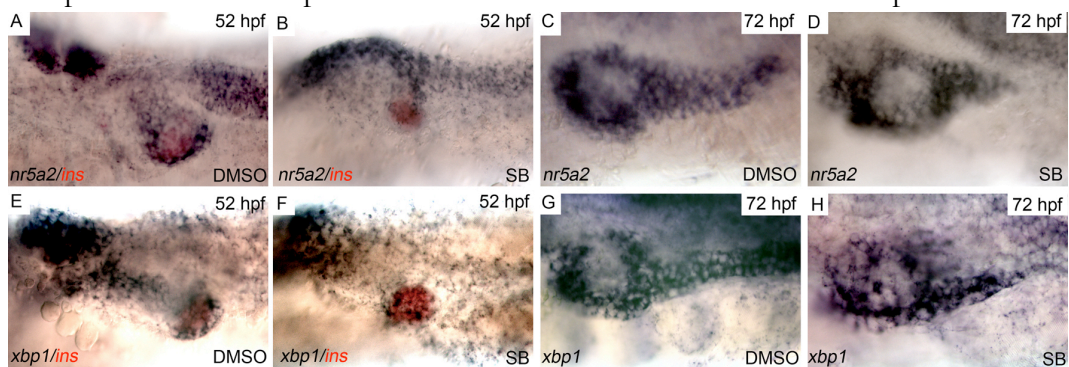


Fig 3.7: Embrioni trattati con SB431542, inibitore della via del TGF β - attivina e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *insulina* (A, B, E, F). Se paragonati agli embrioni di controllo (A, E) gli embrioni trattati con SB431542 di 52 hpf (B, F) presentano una riduzione di marcatura evidente nel pancreas esocrino mentre l'isola endocrina è presente e inalterata. Anche a 72 hpf nei trattati (D, H) la marcatura di *nr5a2* e di *xbp1* è ridotta e presente solo nella testa del pancreas rispetto ai controlli (E, G). La marcatura con *insulina* è paragonabile in controlli e trattati. (A-H) Gli embrioni sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

Trattamento con Dorsomorphina

I trattati con Dorsomorphina (Fig. 3.8), un inibitore del BMPs (che fa sempre parte della famiglia del TGF β) mostrano sempre un'importante riduzione dell'espressione di *nr5a2* (B, D). Questo è in armonia con ciò che è stato riscontrato in letteratura. Infatti bassi livelli di BMP comportano una riduzione del pancreas, viceversa con alti livelli i primordi pancreatici sono espansi. Anche i trattati con Dorsomorphina ibridati con *xbp1* mostrano una drastica riduzione (F, H). Ciò è in armonia con i dati di letteratura: *xbp1* è coinvolto nella via di segnale del BMP durante lo sviluppo in *Xenopus* (Zhao et al., 2003) ed inoltre è stato dimostrato formare un loop regolativo con BMP4 durante differenziamento neurale e mesodermico (Cao et al., 2005).

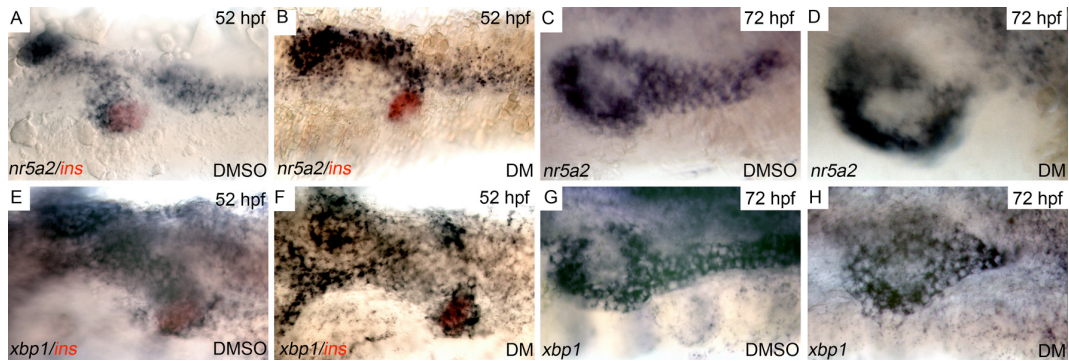


Fig 3.8: Embriani trattati con Dorsomorphina, inibitore della via del BMP e ibridati con le sonde *nr5a2* (A,B,C,D), *xbp1* (E,F,G,H) e *ins* (A, B, E, F). Se paragonati agli embriani di controllo (A, C) gli embriani trattati con Dorsomorphina e ibridati con *nr5a2* a 52 hpf (B) e a 72 hpf (D) presentano una riduzione di marcatura. Anche nel caso degli embriani marcati con *xbp1* sia a 52 hpf (F) che a 72 hpf (H) vi è riduzione di marcatura rispetto ai controlli (E, G). La marcatura con *insulina* è paragonabile in controlli e trattati. (A-H) Gli embriani sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

Trattamenti con Ciclopamina

Invece i trattati con Ciclopamina (Fig. 3.9), inibitore del Shhs, non mostrano alcun effetto evidente sia con *nr5a2* (B, D) che con *xbp1* (F, H), a dimostrazione che in queste finestre temporali i geni presi in considerazione non risentono dell'influenza di Shh.

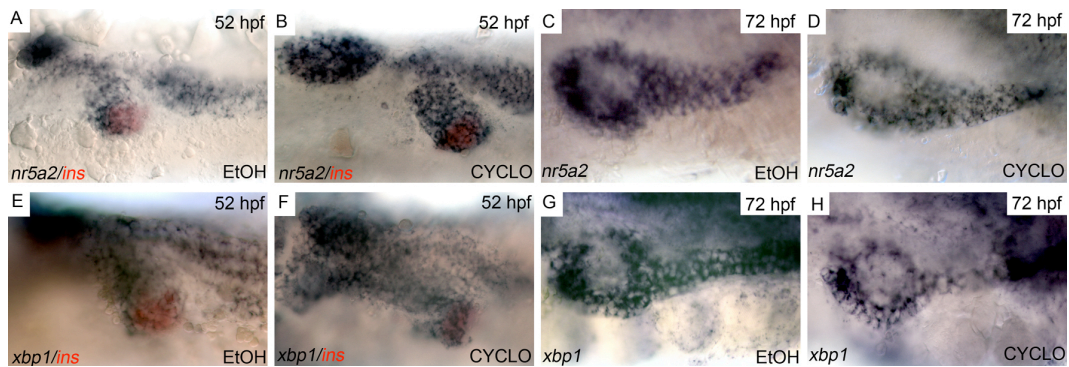


Fig 3.9: Embriani trattati con Ciclopamina, inibitore della via di Shh. In entrambe le finestre temporali e con tutte le sonde utilizzate *nr5a2* (B,D), *xbp1* (F,H) e *insulina* (B, F) non vi è cambiamento fenotipico rispetto ai controlli (A,E,C,G). (A-H) Gli embriani sono in visione ventrale con la testa verso sinistra.

nr5a2			
Incubazione	Trattamento	Fenotipo wt	Fenotipo non wt
30 hpf – 52 hpf	DMSO	6/6	0/6
	AR	1/11	10/11
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	AR	5/15	10/15
30 hpf – 52 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DEAB	5/14	9/14
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DEAB	3/33	30/33
30 hpf – 52 hpf	DMSO	8/8	0/5
	AP	7/18	11/18
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	AP	5/23	18/23
30 hpf – 52 hpf	DMSO	4/4	0/4
	DAPT	2/20	18/20
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DAPT	4/28	24/28
30 hpf – 52 hpf	DMSO	4/4	0/4
	SB	1/14	13/14
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	SB	6/21	15/21
30 hpf – 52 hpf	DMSO	7/7	0/7
	SU	0/10	10/10
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	SU	5/27	22/27
30 hpf – 52 hpf	EtOH	7/7	0/7
	CYCLO	20/21	1/21
52 hpf – 72 hpf	EtOH	5/5	0/5
	CYCLO	15/17	2/17
30 hpf – 52 hpf	DMSO	6/6	0/6
	DM	0/24	24/24
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DM	1/20	20/20

Tabella 1: Risultati delle ibridazioni *in situ* con *nr5a2* a seguito di trattamenti con differenti sostanze farmacologiche in diverse finestre temporali durante lo sviluppo di *zebrafish*.

<i>xbp1</i>			
Incubazione	Trattamento	Fenotipo wt	Fenotipo non wt
30 hpf – 52 hpf	DMSO	6/6	0/6
	AR	2/15	13/15
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	AR	1/12	11/12
30 hpf – 52 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DEAB	0/16	16/16
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DEAB	10/20	10/20
30 hpf – 52 hpf	DMSO	7/8	1/8
	AP	3/18	15/18
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	AP	2/18	16/18
30 hpf – 52 hpf	DMSO	4/5	0/5
	DAPT	3/23	20/23
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DAPT	0/18	18/18
30 hpf – 52 hpf	DMSO	5/5	0/5
	SB	5/15	10/15
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	SB	0/14	14/14
30 hpf – 52 hpf	DMSO	6/6	0/6
	SU	2/14	12/14
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	SU	5/15	10/15
30 hpf – 52 hpf	EtOH	8/8	0/8
	CYCLO	17/17	0/17
52 hpf – 72 hpf	EtOH	5/5	0/5
	CYCLO	36/42	6/42
30 hpf – 52 hpf	DMSO	3/3	0/3
	DM	2/17	15/17
52 hpf – 72 hpf	DMSO	5/5	0/5
	DM	1/15	14/15

Tabella 2: Risultati delle ibridazioni *in situ* con *xbp1* a seguito di trattamenti con differenti sostanze farmacologiche in diverse finestre temporali durante lo sviluppo di *zebrafish*.

4

Conclusioni

Il lavoro di analisi dell'espressione genica svolto in questa tesi si basa su evidenze sperimentali secondo le quali i geni *nr5a2* e *xbp1* hanno ruoli fondamentali per la formazione del pancreas esocrino durante lo sviluppo embrionale. Pur essendo quello intrapreso uno studio preliminare, che si riprometteva di monitorare l'espressione dei geni d'interesse durante lo sviluppo del pancreas esocrino valutando come queste dipendano dall'interazione di differenti pathways molecolari, i risultati ottenuti ci hanno permesso di individuare alcuni possibili sviluppi futuri: lo studio più approfondito delle relazioni tra la via *Nodal* e *xbp1* e delle interazioni tra *nr5a2* e le vie dell'AR e del Wnt nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare.

Bibliografia

- Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. 2007. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27:53-66.
- Annicotte JS, Fayard E, Swift GH, Selander L, Edlund H, Tanaka T, Kodama T, Schoonjans K, Auwerx J. 2003. Pancreatic-duodenal homeobox 1 regulates expression of liver receptor homolog 1 during pancreas development. *Mol Cell Biol* 23:6713-6724.
- Argenton F, Zecchin E, Bortolussi M. 1999. Early appearance of pancreatic hormone-expressing cells in the zebrafish embryo. *Mech Dev* 87:217-221.
- Begemann G, Schilling TF, Rauch GJ, Geisler R, Ingham PW. 2001. The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128:3081-3094.
- Bennett JT, Joubin K, Cheng S, Aanstad P, Herwig R, Clark M, Lehrach H, Schier AF. 2007. Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation. *Dev Biol* 304:525-540.
- Biemar F, Argenton F, Schmidtke R, Epperlein S, Peers B, Driever W. 2001. Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol* 230:189-203.
- Botrugno OA, Fayard E, Annicotte JS, Haby C, Brennan T, Wendling O, Tanaka T, Kodama T, Thomas W, Auwerx J, Schoonjans K. 2004. Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Mol Cell* 15:499-509.
- Cao Y, Knochel S, Oswald F, Donow C, Zhao H, Knochel W. 2006. XBP1 forms a regulatory loop with BMP-4 and suppresses mesodermal and neural differentiation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 123:84-96.
- diIorio PJ, Moss JB, Sbrogna JL, Karlstrom RO, Moss LG. 2002. Sonic hedgehog is

required early in pancreatic islet development. *Dev Biol* 244:75-84.

- Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K. 2004. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 14:250-260.
- Field HA, Dong PD, Beis D, Stainier DY. 2003. Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev Biol* 261:197-208.
- Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C. 2002. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* 3:688-694.
- Harada Y, Yokota C, Habas R, Slusarski DC, He X. 2007. Retinoic acid-inducible G protein-coupled receptors bind to frizzled receptors and may activate non-canonical Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 358:968-975.
- Kim SK, MacDonald RJ. 2002. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12:540-547.
- Kumar M, Melton D. 2003. Pancreas specification: a budding question. *Curr Opin Genet Dev* 13:401-407.
- Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH. 2005. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J* 24:4368-4380.
- Manfroid I, Delporte F, Baudhuin A, Motte P, Neumann CJ, Voz ML, Martial JA, Peers B. 2007. Reciprocal endoderm-mesoderm interactions mediated by fgf24 and fgf10 govern pancreas development. *Development* 134:4011-4021.
- Milewski WM, Duguay SJ, Chan SJ, Steiner DF. 1998. Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish. *Endocrinology* 139:1440-1449.
- Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J. 1997. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276:955-960.
- Ostrom M, Loffler KA, Edfalk S, Selander L, Dahl U, Ricordi C, Jeon J, Correa-Medina M, Diez J, Edlund H. 2008. Retinoic acid promotes the generation of pancreatic endocrine progenitor cells and their further differentiation into beta-cells. *PLoS ONE* 3:e2841.
- Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2924-2929.
- Roy S, Qiao T, Wolff C, Ingham PW. 2001. Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr Biol* 11:1358-1363.
- Yee NS, Lorent K, Pack M. 2005. Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol* 284:84-101.

- Zecchin E, Mavropoulos A, Devos N, Filippi A, Tiso N, Meyer D, Peers B, Bortolussi M, Argenton F. 2004. Evolutionary conserved role of ptf1a in the specification of exocrine pancreatic fates. *Dev Biol* 268:174-184.
- Zecchin E, Filippi A, Biemar F, Tiso N, Pauls S, Ellertsdottir E, Gnugge L, Bortolussi M, Driever W, Argenton F. 2007. Distinct delta and jagged genes control sequential segregation of pancreatic cell types from precursor pools in zebrafish. *Dev Biol* 301:192-204.
- Zhang YQ, Sterling L, Stotland A, Hua H, Kritzik M, Sarvetnick N. 2008. Nodal and lefty signaling regulates the growth of pancreatic cells. *Dev Dyn* 237:1255-1267.