

Università degli Studi di Padova
Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di Laurea

**Analisi di marcatori ossei in larve di
zebrafish trattate con conduritol beta-
eossido**

Tutor: Prof. Francesco Argenton
Dipartimento di Biologia

Co-Tutor: Dott. Ilaria Zancan
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Stefania Mazzi

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Indice

Abstract	1
Introduzione	2
La malattia di Gaucher	2
Generazione di un modello animale per la Gaucher attraverso l'impiego del conduritol β -eossido (CBE)	2
L'organismo modello zebrafish	3
L'ossificazione in zebrafish	4
Materiali e metodi	7
Trattamento con conduritol β -eossido	7
Ibridazione <i>in situ</i> su larva intera	8
Montaggio vetrini e foto	10
Risultati e discussione	12
<i>coll10a1</i>	12
<i>cyp26b1</i>	14
Conclusioni	16
Bibliografia	17

Abstract

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la variazione di espressione in *Danio rerio* di due marcatori ossei, *col10a1* e *cyp26b1*, in seguito al trattamento con conduritol- β epossido (CBE), un inibitore irreversibile di un enzima lisosomiale: la glucocerebrosidasi. La somministrazione della sostanza è stata effettuata utilizzando due approcci differenti al fine di identificare il più efficace. In un gruppo di larve la sostanza è stata microiniettata all'interno del corion, in un altro gruppo di larve il CBE è stato disciolto nel mezzo di crescita per l'allevamento (*fish water*). Per monitorare la variazione di espressione dei due marcatori ossei, sono state effettuate delle ibridazioni *in situ* sulle larve fissate. I risultati ottenuti dimostrano che l'inibizione dell'enzima risulta più efficace se il CBE viene microiniettato all'interno del corion. Inoltre, l'effetto dell'inibizione dell'enzima è stato quello di ridurre, anche se in misura limitata, l'espressione dei marcatori *col10a1* e *cyp26b1*, particolarmente in regioni specifiche a livello cefalico.

Introduzione

La malattia di Gaucher

La malattia di Gaucher è una patologia autosomica recessiva, causata da mutazioni a carico del gene *Gba*, che codifica per un enzima lisosomiale, la glucocerebrosidasi (GBA), la cui funzione è di scindere la glucosilceramide in glucosio e ceramide.

L'alterazione funzionale dell'enzima causa un accumulo della glucosilceramide a livello dei lisosomi, con conseguenti anomalie biochimiche e morfologiche cellulari. La popolazione cellulare maggiormente colpita sono i macrofagi, che ingrossati a causa dell'accumulo di substrati non degradati nei lisosomi, vengono anche chiamate "cellule di Gaucher".

La malattia di Gaucher ha un'incidenza di 1 su 20000 nati vivi (ad eccezione della popolazione degli ebrei Ashkenazi dove l'incidenza raggiunge 1 nato su 450 nati vivi).

Nonostante le caratteristiche alterazioni fenotipiche individuabili nei soggetti affetti possano avere gradi di severità distinti, è possibile, in base al grado di coinvolgimento neurologico, riconoscere tre sottotipi di malattia:

- Tipo I: forma cronica, non neuropatica, può manifestarsi in età adulta (94%)
- Tipo II: infantile, forma neuropatica acuta (1%)
- Tipo III: giovanile, forma neuropatica cronica (5%)

I principali sintomi, comuni a tutti e tre i sottotipi di malattia sono epatosplenomegalia, trombocitopenia, anemia e complicazioni a livello scheletrico come osteopenia e osteonecrosi. La terapia adottata per la cura di questa malattia è la terapia enzimatica sostitutiva (ERT) che prevede la somministrazione di un enzima ingegnerizzato (Imiglucerasi, Genzyme Corporation, Cambridge, MA) con il quale è possibile sopperire alla mancanza della glucocerebrosidasi. Tuttavia la ERT permette un miglioramento solo del fenotipo viscerale, senza avere particolari effetti sul fenotipo osseo.

Generazione di un modello animale per la Gaucher attraverso l'impiego del conduritolo β -epossido (CBE)

Il CBE è una sostanza nota sin dagli anni '70 che, grazie alla sua struttura molecolare, è in grado di legarsi covalentemente al sito attivo della GBA inibendo il legame di questa con i suoi substrati. Il meccanismo di inattivazione prevede un primo legame tra l'anello epossidico incorporato nel CBE e un gruppo

carbossilico con funzione di sito catalitico, presente sull'enzima. Questo legame attiva il CBE che si lega covalentemente quindi ad un altro gruppo carbossilico presente nel sito attivo dell'enzima impedendo il legame di quest'ultimo al suo substrato (Fig. 1).

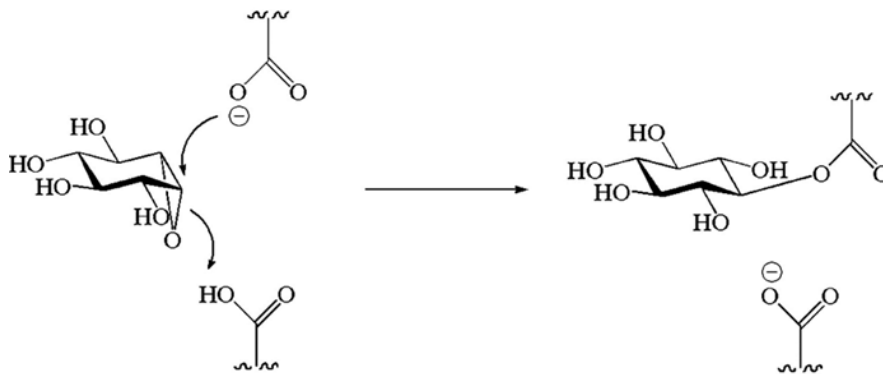


Figura 1 Meccanismo di attivazione del conduritolo β -epossido (Rempel and Withers 2008)

Il primo modello animale trattato con il CBE è stato il topo al quale, in età perinatale, veniva somministrata la sostanza per via intraperitoneale o per via orale (Daniels et al. 1980). Come risultato si è osservata un' elevata diminuzione dell'attività della β -glucocerebrosidasi ed un accumulo del suo substrato nella milza, nel fegato e nel cervello; quando il trattamento veniva sospeso, l'attività della GBA nei topi trattati veniva recuperata. Negli ultimi anni, tuttavia, grazie agli enormi progressi delle tecniche di transgenesi, questo metodo è stato abbandonato a favore della creazione di topi *knockout* o di topi mutanti condizionali. Sebbene questi modelli animali manifestino vari sintomi riscontrabili anche nella patologia umana, presentano tuttavia numerosi limiti: l'elevata mortalità in età perinatale, differenze tra il fenotipo nei modelli murini per la malattia e le caratteristiche fenotipiche dei soggetti affetti dalla malattia di Gacher. Infine, nei modelli murini è molto difficile condurre studi di patogenesi a livello embrionale. (Farfel-Becker et al. 2011).

L'organismo modello zebrafish

Brachidanio rerio (o zebrafish) è un teleosteo appartenente alla famiglia dei Ciprinidi. È un pesce di piccole dimensioni originario del fiume Gange e dei suoi affluenti e vive a temperature di circa 28 °C, caratteristiche che ne permettono la semplicità di allevamento in spazi limitati. Lo sviluppo embrionale e post-larvale rapido (in 24 ore sono riconoscibili la maggior parte degli organi) e l'elevata prolificità (in ogni evento riproduttivo vengono deposte circa 100-200 uova) lo rendono adatto per studi genetici che richiedano *screening* veloci. Zebrafish possiede un genoma diploide organizzato in 25 coppie di cromosomi, quasi completamente sequenziati con numerosi geni duplicati. La fecondazione, che è esterna e regolata dal fotoperiodo, e la trasparenza del corion e dell'embrione

permettono di osservare lo sviluppo embrionale a partire dallo stato di zigote. Proprio per queste caratteristiche zebrafish viene molto utilizzato negli studi di Biologia e Genetica dello Sviluppo. La fecondazione esterna permette, inoltre, di microiniettare già allo stadio di zigote, macromolecole, DNA o RNA, che interagendo con il sistema di trascrizione ne alterano il funzionamento. Negli ultimi anni si è affermato l'utilizzo di oligo morfolino, oligo antisense in grado sia di resistere alle nucleasi sia di non provocare la risposta immunitaria dell'organismo. Queste particolari macromolecole possono essere disegnate su sequenze nei pressi dell'ATG, così da impedire l'attacco del ribosoma e quindi l'inizio della traduzione, oppure possono essere disegnati su siti accettori o donatori di *splicing*, così da non permettere il legame dello spliceosoma, portando alla formazione di trascritti alterati per uno specifico gene bersaglio.



Figura 2 Due esemplari di *Danio rerio*. A destra si trova la femmina riconoscibile per la pancia prominente piena di uova, mentre a sinistra si trova il maschio più snello.

L'ossificazione in zebrafish

L'ossificazione è un processo che può avvenire attraverso due distinti meccanismi: l'ossificazione intramembranosa ed endocondrale.

L'ossificazione intramembranosa, o diretta, è un processo che prevede il differenziamento degli osteoblasti, ovvero cellule ossee, direttamente da cellule mesenchimali progenitrici. Al termine del loro differenziamento gli osteoblasti, iniziano a secernere una matrice priva di sali minerali, l'osteoido, che successivamente mineralizza portando alla formazione dell'osso.

Il secondo meccanismo di formazione delle ossa è l'ossificazione endocondrale. Questo processo prevede la formazione di un substrato cartilagineo intermedio sul quale avverrà la formazione dell'osso. Come per l'ossificazione intramembranosa, anche l'ossificazione endocondrale prevede un differenziamento a partire dalle cellule mesenchimali progenitrici, che in questo caso però daranno origine ai condroblasti ovvero cellule cartilaginee. A seguito della secrezione delle componenti di matrice nello spazio extracellulare (ECM), come collagene II e proteoglicani, i condroblasti rimangono racchiusi nelle lacune cartilaginee diventando condrociti. I condrociti vanno quindi incontro ad una fase di elevata proliferazione diventando ipertrofici. In questa fase, i condrociti ipertrofici secernono nella ECM una serie di fattori, che sono in grado di richiamare vasi

sanguigni che permetteranno a fattori di crescita, di differenziamento, a osteoblasti e osteoclasti, di raggiungere il centro di ossificazione. Successivamente, avviene la sostituzione da parte degli osteoblasti, degli spazi precedentemente occupati dai condrociti andati incontro a morte cellulare programmata. (Fig. 3)

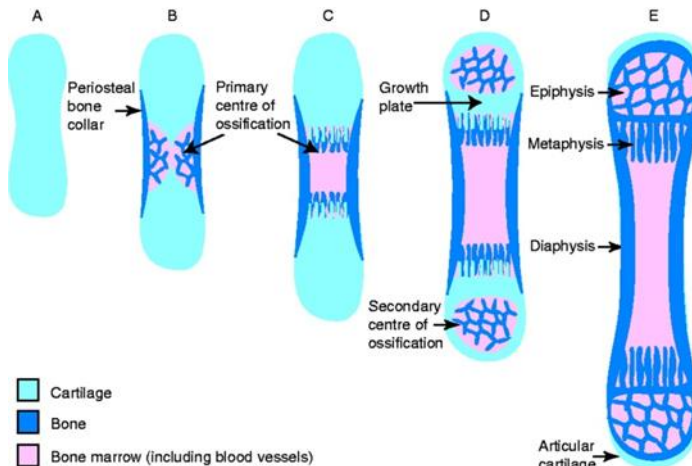


Figura 3. Meccanismo di ossificazione endocondrale (A) abbozzo cartilagineo (B) formazione del periosteo e, successivamente del centro di ossificazione primario (C) espansione del centro di ossificazione primario (D) formazione del centro di ossificazione secondario a ciascuna estremità dell'osso e formazione della piastra di accrescimento (E) formazione dell'osso maturo. Gli unici due punti dove rimane la cartilagine sono le articolazioni alle estremità dell'osso. (Mackie et al. 2011)

Il processo di ossificazione in zebrafish è molto simile a quello che avviene nell'uomo ed è per questa ragione che tale organismo è stato utilizzato in questo studio. In zebrafish, l'osteogenesi che ha inizio a partire dalle 36 ore dopo la fecondazione (o hour post fertilization, hpf), momento in cui iniziano ad essere espressi molti geni che sono stati individuati da vari studi come marcatori per l'ossificazione in diversi stadi di sviluppo.

Il lavoro della mia tesi è stato quello di verificare quali effetti possa avere il CBE sull'espressione di marcatori ossei in zebrafish utilizzando due approcci sperimentali distinti.

Sono stati in particolare selezionati due marcatori specifici, *cyp26b1* e *collagene10a1* (*coll10a1*), espressi in fasi diverse dell'ossificazione.

Per la fase intermedia dell'ossificazione, quando cioè iniziano a differenziarsi i primi osteoblasti, è stato utilizzato *cyp26b1*. Questo marcatore appartiene alla famiglia dei geni *cyp26*. Da letteratura (Laue et al 2008) è noto che la funzione di *cyp26b1* è quella di codificare per un enzima in grado di ridurre la via di segnale dell'acido retinoico.

Il *coll10a1* è espresso nella fase intermedia e tardiva dell'ossificazione (Li et al. 2009). L'espressione di questo gene inizia infatti ad aumentare con la formazione dei condrociti ipertrofici e il differenziamento dei primi osteoblasti, per poi

rimanere elevata anche nella fase tardiva dell'ossificazione quando gli osteoblasti sono maturi. Il *col10a1* codifica infatti per la catena α del collagene X, proteina espressa dai condrociti ipertrofici e dagli osteoblasti.

Diversi studi (Laue et al.2008) hanno dimostrato che nelle cellule che presentano una espressione elevata di *col10a1*, i livelli di *cyp26b1* sono inferiori, dimostrando quindi che l'espressione di quest'ultimo gene diminuisce quando gli osteoblasti diventano attivi.

Materiali e metodi

Trattamento con conduritol β -eossido

Soluzioni utilizzate:

Conduritol eossido 10 μ M per pozzetto:

3ml di Fish Water + PTU (phenylthiourea) all'1%

30 μ l conduritol eossido 1 mM

Soluzione per la microiniezione

5 μ l conduritol 1mM o 5 μ l DMSO (dimetilsolfossido)

50 μ l di Rosso fenolo

445 μ l di Fish Water (soluzione salina utilizzata per l'allevamento delle larve) 1X
senza blu di metilene

Per avere a disposizione larve per il trattamento, vengono allestiti degli accoppiamenti tra pesci selvatici (wild type) il giorno precedente l'esperimento. Le uova prodotte dall'accoppiamento vengono prelevate e suddivise in due gruppi per i due diversi approcci: la somministrazione del CBE per microiniezione o per dispersione nel mezzo. In entrambi gli approcci, il trattamento viene iniziato a 8 hpf. In parallelo al trattamento con CBE, sono effettuati dei trattamenti di controllo con DMSO. La soluzione madre di CBE 1mM viene ottenuta sciogliendo la polvere in DMSO al 100%.

Somministrazione del CBE per microiniezione

La microiniezione è effettuata utilizzando un apparato di microiniezione specifico (WPI, Heidelberg, Germania). Le uova vengono allineate sul lato lungo di un vetrino portaoggetti adagiato sul coperchio di una piastra Petri.

Servendosi di un puntale molto sottile montato su una pipetta, si trasferisce la soluzione da microiniettare, 10 μ l, in un ago da microiniezione, che viene inserito nell'apposito supporto. Per accertarsi che il liquido fuoriesca dall'ago, viene aggiunto alla soluzione del rosso fenolo che ne conferisce una colorazione rossa. L'ago trapassa facilmente il corion, e la soluzione viene quindi posta a contatto con l'embrione in corso di sviluppo. Al termine della procedura, le uova vengono messe in una piastra Petri in cui viene versata una soluzione 10 μ M di CBE o DMSO, ottenuta diluendo queste sostanze nel mezzo di crescita (*fish water*). Alle 24 hpf, al mezzo di crescita, viene aggiunta PTU, sostanza che ha la capacità di inibire lo sviluppo delle cellule pigmentate, dette melanofori, e che permette quindi di mantenere i pesci sufficientemente trasparenti.

Somministrazione del CBE per dispersione nel mezzo

La somministrazione del CBE per dispersione nel mezzo richiede che il corion delle uova venga bucato per renderlo maggiormente permeabile alla sostanza. Dopo esser stati perforati, i campioni vengono trasferiti in una piastra da 6 pozzetti. In ogni pozzetto viene aggiunta una soluzione 10 μ M CBE o DMSO, come nel caso delle uova microiniettate.

Da letteratura è noto che l'espressione dei due marcatori scelti varia nelle diverse fasi dell'ossificazione. Per questo motivo il trattamento con il CBE nel caso di *coll0a1* e di *cyp26b1* è stato eseguito fino a 96 hpf. Al termine del trattamento i pesci sono stati fissati in 4% PFA (paraformaldeide) per 1 ora per procedere poi con la tecnica della ibridazione *in situ*.

Ibridazione *in situ* su larva intera (*whole mount*)

Soluzioni utilizzate:

MISCELA DI IBRIDAZIONE (*hybridization mix*) (HM):

60% formaldeide

460 μ l Ac. Citrico 1M pH per 100 ml

SSC 5X

0.1% Tween-20

50 mg/ml eparina

500 mg/ml tRNA

MISCELA DI IBRIDAZIONE (HM) PER LAVAGGI:

soluzione HM senza tRNA ed eparina

NBT/BCIP TAMPONE DI COLORAZIONE (*staining buffer*):

100 mM Tris-HCl pH 9.5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0.1% Tween20

NBT/BCIP SOLUZIONE DI COLORAZIONE (*staining solution*):

20 μ l/ml NBT/BCIP

Staining buffer

Per verificare se l'espressione di alcuni geni coinvolti nel processo di ossificazione (*coll0a1*, *cyp26b1*) risultasse alterata nelle larve trattate con CBE rispetto ai controlli, è stata applicata la tecnica dell'ibridazione *in situ* sulle larve fissate a 96 hpf. Il principio su cui si basa l'ibridazione *in situ* sfrutta la complementarità delle basi degli acidi nucleici per appaiare, in modo specifico, bersagli genomici o trascrittomici a sonde antisense marcate (ssDNA o RNA).

Dopo esser stati fissati in PFA al 4% in tampone fosfato salino (PBS) per 1 ora, i pesci sono stati disidratati a concentrazioni crescenti di MeOH. Le larve sono quindi state lasciate in una soluzione MeOH al 100% e conservati a +4°C.

Primo giorno

Reidratazione: viene prelevata la soluzione di MeOH al 100% e vengono fatti diversi lavaggi aggiungendo concentrazioni crescenti di PBS e decrescenti di metanolo. Questo passaggio rende le barriere tissutali più permeabili alla sonda.

Digestione con proteinasi K: i pesci vengono trattati con una soluzione 10 µg/ml di proteinasi K per digerire parzialmente le strutture e facilitare così l'ingresso delle sonde. Il trattamento, eseguito a temperatura ambiente, varia a seconda dello stadio di sviluppo degli embrioni, in questo esperimento essendo le larve state fissate a 96 hpf, è stato fatto durare 50 minuti. Successivamente i campioni sono stati rifissati in PFA (4% PBS) per 20 minuti così da mantenerne l'integrità. Si sono poi effettuati cinque lavaggi in PBT (tampone fosfato con l'aggiunta di 0.1% Tween20, phosphate buffered tween,) per eliminare tutti i residui di PFA eventualmente presenti.

Pre-ibridazione: gli embrioni vengono pre-ibridati in 800 µl di soluzione HM per 3 ore a 65 °C.

Ibridazione: la soluzione HM viene rimossa e si aggiunge la stessa soluzione contenente però le sonde marcate (180 ng di sonda). I campioni sono incubati O/N in un bagnetto a 60 °C.

Nella miscela di ibridazione sono presenti eparina e tRNA che assicurano che la sonda non si leghi a bersagli aspecifici.

Secondo giorno

Lavaggi: gli embrioni sono presi dal bagnetto e viene prelevata la soluzione di ibridazione contenente le sonde (le sonde possono essere recuperate fino a un massimo di 8 volte). Si procede con un primo lavaggio molto veloce di HM a 70 C° e poi con dei lavaggi che permettono l'eliminazione di eventuali residui:

- 75% HM/25% 2xSSC (saline standard citrate) a 70C° per 15 minuti
- 50%HM/50% 2 xSSC a 70 C° per 15 minuti
- 25% HM/75% 2x SSC a 70C° per 15 minuti
- 2xSSC a 70 C° per 15 minuti
- 0.2 x SSC a 65 °C per 15 minuti

- 0.2 x SSC a temperatura ambiente per 15 minuti

Pre-incubazione: si portano i campioni ad una concentrazione PBT al 100% effettuando dei lavaggi a concentrazione crescente di PBT e decrescente di SSC 0,2X. Le larve vengono quindi passate in una soluzione PBT/2% sheep serum/2mg:ml BSA (albumina di siero bovino) e vengono lasciate in questa soluzione per diverse ore.

Incubazione con anticorpi: i campioni vengono incubati in agitazione O/N a 4°C in 600 µl di soluzione contenente l' anti-digossigenina, anticorpo monoclonale coniugato alla fosfatasi alcalina, enzima che manifesta delle proprietà cromogene in presenza del substrato specifico. Poiché la fosfatasi alcalina e l'anticorpo anti-DIG sono fotosensibili, le provette vengono avvolte in alluminio.

Terzo giorno:

Lavaggi: viene prelevata la soluzione contenente l'anticorpo (si può recuperare al massimo 5 volte). I campioni vengono lavati in soluzioni di PBT a temperatura ambiente così da rimuovere i residui di anticorpo che non si sono legati in maniera specifica alle sonde.

Pre-colorazione: si eseguono tre lavaggi da 5 minuti utilizzando il tampone specifico per la colorazione (in questo caso NBT/BCIP). Questi lavaggi preparano i campioni alla colorazione con il substrato della fosfatasi alcalina.

Colorazione: i campioni vengono trasferiti dal tubino Eppendorf in una piastra con 12 pozzetti e incubati al buio nella soluzione di colorazione. Il substrato NBT/BCIP reagendo con la fosfatasi alcalina forma un precipitato di colore blu; poichè la velocità di reazione può variare è necessario monitorarla costantemente (ogni 10-15 minuti).

Fissaggio: le larve vengono fissate O/N a 4°C con PFA 4% in PBS, per preservare le caratteristiche acquisite dopo il trattamento.

Montaggio vetrini e foto

Per acquisire le immagini dopo le ibridazioni *in situ*, le larve precedentemente fissate in PFA 4% vengono trasferite in una soluzione di glicerolo 85%. Il passaggio è effettuato gradualmente. Viene prima rimossa la PFA e si eseguono dei 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).

Per poter fotografare ventralmente e dorsalmente le larve, utilizzando un microscopio da dissezione e dei piccoli aghi si rimuove il tuorlo. Si dispongono dei pezzetti di nastro adesivo sovrapposti sui vetrini portaoggetti, che vengono poi incisi con una lametta per rimuoverne un quadratino e creare così una tasca in cui alloggiare il campione.

Risultati e discussione

In questo studio è stata valutata la variazione di espressione di due marcatori ossei, *cyp26b1* e *col10a1*, durante la formazione dell'osso in larve di zebrafish, in seguito al trattamento con il CBE, inibitore dell'enzima lisosomiale GBA. Somministrando la sostanza attraverso due vie differenti, attraverso microiniezioni a 8 hpf o attraverso la dispersione nel mezzo a partire dalle 8 hpf, è stato possibile valutare quale dei due approcci permetta un miglior assorbimento del farmaco inibitore della GBA. La somministrazione del CBE attraverso dispersione nel mezzo presuppone che tutte le larve assorbano la sostanza in ugual misura. Tuttavia questo non sempre accade a causa di una distribuzione non del tutto omogenea del CBE. Attraverso la microiniezione della sostanza ci si aspetta, quindi, una minore variabilità.

In seguito, per osservare gli effetti del trattamento, sono state effettuate delle ibridazioni *in situ* su larve trattate e sui controlli sperimentali.

Col10a1

Il *col10a1* codifica per una catena della proteina collagene X, componente fondamentale della matrice extracellulare. Questo gene è espresso dai condrociti ipertrofici e dagli osteoblasti ed è presente quindi nella fase intermedia e tardiva della formazione dell'osso. Per effettuare l'ibridazione *in situ* in un momento di elevata espressione del gene, le larve sono state fissate a 96 hpf. Poiché attraverso il trattamento con il CBE a partire dalle 8 hpf l'enzima lisosomiale GBA è stato inibito, ci si aspetterebbe una forte variazione dell'espressione di questo gene dovuta ad un'alterazione dell'ossificazione. Tuttavia dai risultati ottenuti non si riscontra una netta variazione sia nelle larve in cui il CBE è stato microiniettato ($N_{\text{DMSO}}=29$; $N_{\text{CBE}}=29$) (*Fig. 4*) che in quelle in cui la sostanza è stata dispersa nel mezzo ($N_{\text{DMSO}}=25$; $N_{\text{CBE}}=25$) (*Fig. 5*). È possibile tuttavia osservare delle variazioni a livello di alcune ossa, come per esempio il cleitro (*Fig. 4 C e F*; *Fig. 5 A e C*). Quest'ultimo è un osso che si forma attraverso un processo di ossificazione intramembranosa la cui mineralizzazione inizia a partire dalle 72 hpf, a differenza di altre ossa craniofacciali che iniziano il processo di mineralizzazione solo successivamente (Li et al 2009). A 96 hpf, quindi, nel cleitro si ha un maggior numero di osteoblasti attivi mentre i condrociti ipertrofici stanno diminuendo di numero. In altre ossa, come per esempio l'opercolo, invece, il processo di mineralizzazione è appena iniziato e per questo l'espressione di *col10a1* che si osserva nelle ibridazioni *in situ*, deriva sia dai condrociti ipertrofici, ancora presenti, che dai primi osteoblasti che si stanno differenziando. Questo permetterebbe di spiegare il perché, a livello di alcune ossa, si osservi una variazione di espressione non visibile in altre.

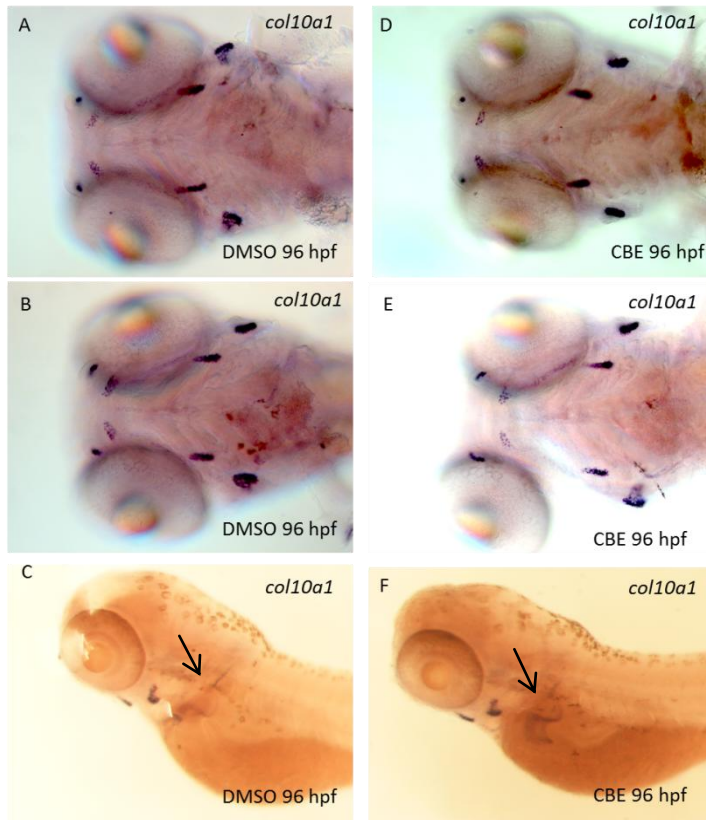


Figura 4 Larve allo stadio di 96 hpf trattate con CBE. Il CBE è stato somministrato effettuando delle microiniezioni a 8 hpf. Se paragonati agli embrioni di controllo (A, B, C), nei trattati (D, E, F) non si osservano particolari differenze nell'espressione di *col10a1*. A-B-D- E sono visioni dorsali, mentre C ed F sono visioni laterali di una larva rappresentativa. C ed F la freccia indica il cleitro: nelle larve trattate si osserva una riduzione dell'espressione di *col10a*.

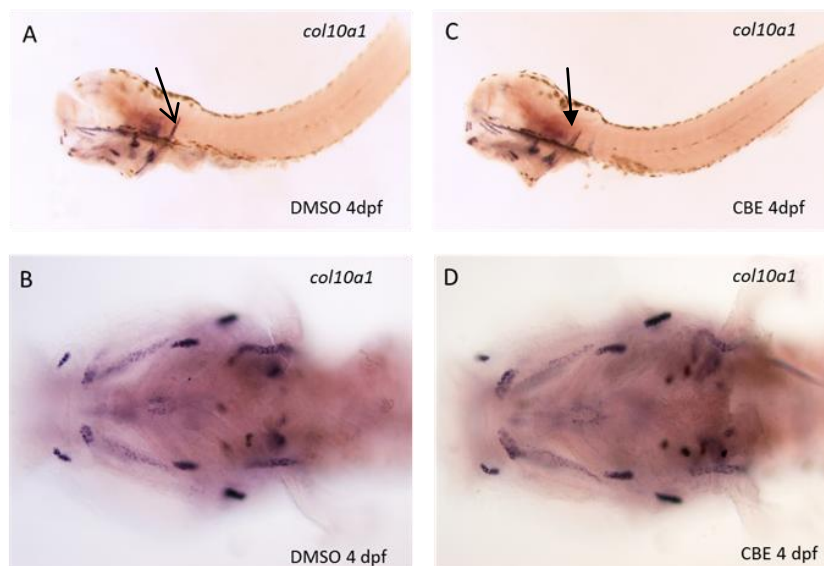


Figura 5. Larve a 96 hpf trattate con CBE somministrato per dispersione nel mezzo. A e C sono visioni laterali, mentre B e D sono visioni ventrali di un larva rappresentativa. A e C la freccia indica il cleitro: nelle larve trattate è possibile vedere una riduzione dell'espressione di *col10a*.

Cyp26b1

cyp26b1 è espresso dai precursori degli osteoblasti, quindi il suo picco di espressione lo si ha nella fase intermedia dell'ossificazione, quando dall'abbozzo cartilagineo si sta iniziando a formare l'osso. Come per *coll10a1*, anche per *cyp26b1* le larve sono state fissate a 96 hpf. Da letteratura (Laue et al 2008) è noto che l'espressione di questo gene è associata sia alle ossa che si formano per via intramembranosa che alle ossa che si formano per via endocondrale, suggerendo che questo gene è espresso principalmente dagli osteoblasti non ancora attivi. Nel mio esperimento è stato scelto di fissare i pesci a 96 hpf poiché è noto che le ossa craniofacciali si possono sviluppare a diversi stadi: quelle di origine intramembranosa iniziano a formarsi tra i 3 e i 4 giorni dopo la fecondazione (days post fertilization, dpf); quelle di origine endocondrale iniziano a formarsi tra i 5 e i 6 dpf.

Come per *coll10a1*, non si osserva una grossa variazione di espressione tra le larve trattate e i controlli sperimentali. Tuttavia è stato osservato che nelle larve in cui il CBE è stato somministrato attraverso microiniezione ($N_{DMSO}=23$; $N_{CBE}=32$) (Fig. 8) è possibile notare una maggiore variazione di espressione di *cyp26b1* rispetto a quanto osservato nel caso in cui la sostanza è stata somministrata per dispersione nel mezzo di crescita ($N_{DMSO}=8$; $N_{CBE}=10$) (Fig.7). Infatti nelle larve trattate con CBE mediante microiniezione si è notato una diminuzione dell'espressione del gene a ridosso della cartilagine ceratoiale, ovvero la cartilagine presente a livello del secondo arco branchiale. (Fig 6).

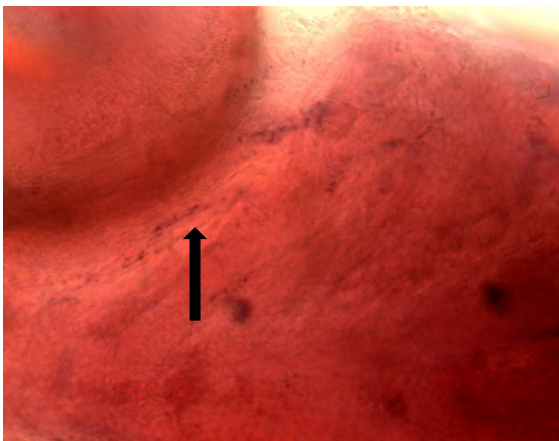


Figura 6 Visione dorsale di una larva allo stadio di 96 hpf trattata con DMSO. La freccia indica l'espressione di *cyp26b1* in cordoni di cellule della cartilagine ceratoiale non presenti nelle larve trattate con CBE.

Si può invece osservare una dimensione differente tra i controlli e i pesci trattati (Fig 7; Fig.8) Durante il trattamento è stato infatti possibile osservare che il CBE aveva diversi effetti sulle larve: i pesci trattati apparivano di dimensioni minori e si muovevano più freneticamente dei controlli. Questo dimostra che, come è già ben noto, l'attività carente della GBA influisce sulla crescita dell'organismo e

svolge una funzione importante anche nelle cellule del sistema nervoso (Sidransky et al. 2004).

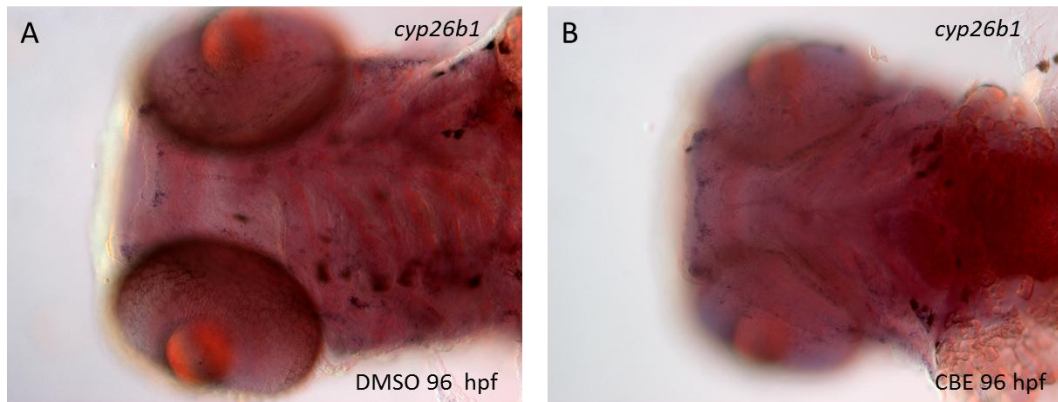


Figura 7 Visioni dorsali di due larve rappresentative allo stadio di 96 hpf in cui il CBE è stato somministrato attraverso dispersione nel mezzo. L'ingrandimento delle foto è lo stesso. L'accrescimento della larva in B è minore che in A.

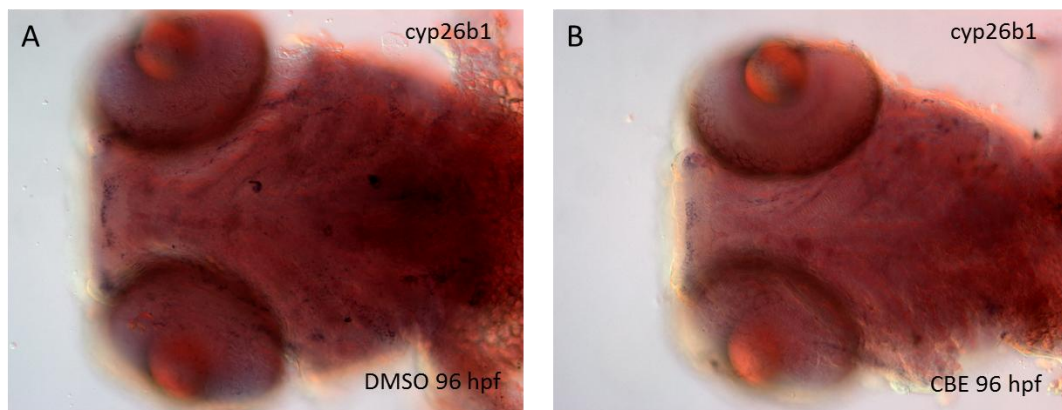


Figura 8 Visioni dorsali di due larve allo stadio di 96 hpf in cui il CBE è stato somministrato effettuando delle microiniezioni allo stadio di 8 hpf. . Visivamente si apprezza una diminuzione dell'espressione del marcatore nei pesci trattati con CBE (a destra). L'ingrandimento delle foto è lo stesso. L'accrescimento della larva in B è minore che in A.

Conclusioni

L'analisi svolta in questo lavoro ha permesso di effettuare delle osservazioni preliminari riguardo alla variazione di espressione dei due marcatori ossei *coll0a1* e *cyp26b1* in seguito al trattamento con CBE. Gli effetti più consistenti del trattamento sull'espressione dei geni bersaglio sono stati individuati maggiormente quando il farmaco veniva somministrato attraverso la microiniezione. È stato inoltre osservato che l'alterazione dell'attività della GBA influisce sulla formazione delle ossa già negli stadi precoci alterando l'espressione di geni importanti per lo sviluppo della cartilagine come dimostra la ridotta espressione di *coll0a1* a livello del cleitro e di *cyp26b1* a livello di regioni cartilaginee cefaliche.

Bibliografia

- 1) Brian P Rempel and SG Withers 2008. Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology. *Glycobiology* vol. 18 no. 8 pp. 570-586
- 2) Daniels LB, Glew RH, Radin NS, Vunnam RR, 1980. A revised fluorometric assay for Gaucher's disease using conduritol-beta-epoxide with liver as the source of Beta-glucosidase. *Clin Chim Acta* 106, 155-63
- 3) T Farfel-Becker, EB Vitner, AH Futerman, 2011. Animal models for Gaucher disease research. *Disease Models & Mechanism DMM*
- 4) EJ Mackie, L Tatarczuch, M Mirams, 2011. The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology* 211, 109-121
- 5) N Li, K Felber, P Elks, P Croucher, Hh Roehl, 2009. Tracking Gene Expression During Zebrafish Osteoblast Differentiation. *Developmental Dynamics* 238:459-466
- 6) K Laue, M Jänickle, N Plaster, C Sonntag, M Hammerschmidt. Restriction of retinoic acid activity by Cyp26b1 is required for proper timing and patterning of osteogenesis during zebrafish development. *Development* 135, 3775-3787
- 7) E Sidransky 2004. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol. Genet. Metab.* 83, 6-15.