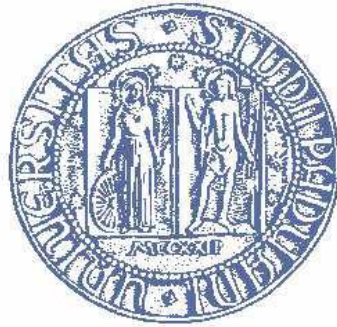


Università degli Studi di Padova
Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elabotato di laurea
**La WISH in zebrafish applicata all'analisi di colocalizzazioni
e xenotrapianti**

Tutor: Dott.ssa Natascia Tiso
Dipartimento di Biologia

Laureando: Anna Clocchiatti

Anno Accademico 2011/2012

ABSTRACT

Danio rerio (zebrafish) è un piccolo teleosteo utilizzato con successo per studi di genetica e biologia dello sviluppo. Tra le numerose tecniche messe a punto per questo modello vertebrato, la WISH (*whole mount in situ hybridization*) è una delle più versatili e utilizzate di routine, in quanto consente di visualizzare l'espressione genica nello spazio e nel tempo mediante una colorazione istochimica su embrioni interi. Durante il tirocinio, la WISH è stata applicata per determinare i profili di espressione genica in neuroni dei gangli della radice dorsale in via di differenziamento, relativamente a quattro geni coinvolti nel differenziamento cellulare tramite la segnalazione cellulare giuxtacrina Notch. Per la prima volta inoltre, la medesima tecnica WISH è stata utilizzata con successo per re-individuare, a distanza di giorni, cellule di glioblastoma umano xenotrapiantate nell'encefalo di embrioni di zebrafish.

1. INTRODUZIONE

1.1 Organismo modello

Danio rerio (zebrafish) è un piccolo pesce tropicale d'acqua dolce che si è affermato di recente come uno dei più importanti organismi modello per lo studio della genetica dello sviluppo.

L'adozione di questa specie come modello è legata innanzitutto alla facilità di allevamento ad alta densità e bassi costi; l'adulto infatti misura solo 5 cm circa, richiede acqua dolce ricircolante ad una temperatura di 28°C e una nutrizione piuttosto economica a base di artemie e cibo secco. E' possibile, inoltre, allestire incroci specifici ed ottenere una progenie numerosa, con l'ulteriore vantaggio di uno sviluppo piuttosto rapido, che porta alla maturità sessuale in circa 3 mesi.

Una peculiarità di zebrafish è la trasparenza dell'embrione, caratteristica infrequente tra i vertebrati, che permette l'osservazione dei tessuti marcati senza la necessità di effettuare sezioni del corpo. Proprietà altrettanto importanti sono la modalità di fecondazione esterna, la trasparenza del *chorion*, un sottile guscio protettivo, e la grandezza della cellula uovo (1 mm), in quanto determinano accessibilità e facilità di manipolazione degli embrioni ad ogni stadio dello sviluppo, comprese le prime divisioni mitotiche. In questa fase, inoltre, i blastomeri hanno delle dimensioni sufficientemente grandi da permettere la microiniezione di molecole di interesse, quali oligo "morpholino", mRNA o costrutti per la transgenesi. Con queste tecniche si può studiare in modo mirato un gene specifico, osservando gli effetti della perturbazione della sua espressione o analizzando l'attività del suo promotore. Sono anche stati effettuati esperimenti di

mutazione chimica casuale su larga scala, che hanno permesso di costruire famiglie con individui portatori di mutazioni di interesse.

Il genoma di zebrafish, costituito da 1.7×10^9 bp distribuite in 25 cromosomi, è in avanzata fase di sequenziamento. Dall'analisi di gruppi di geni annotati, sono emerse numerose ed estese regioni di sintenia con il genoma umano, che confermano l'adeguatezza di questo modello per lo studio di malattie genetiche umane.

1.2 Whole mount *In Situ* Hybridization (WISH)

L'ibridazione *in situ* è una tecnica che permette di evidenziare il profilo di espressione di uno specifico gene, tramite una reazione istochimica cromogenica in tessuti fissati ad un particolare stadio dello sviluppo. In zebrafish può essere realizzata su embrioni interi – *whole mount* – data la caratteristica trasparenza, che permette l'osservazione di cellule marcate anche nei tessuti più profondi.

La tecnica permette di rilevare il prodotto di trascrizione di un gene di interesse; si utilizza infatti come sonda una molecola di RNA antisenso complementare al mRNA bersaglio: l'ibridazione tra queste molecole si verifica solo nei distretti anatomici dell'embrione in cui il gene è espresso. La sonda reca un aptene legato covalentemente ad una frazione delle uridine, quindi può essere rilevata tramite specifici anticorpi monoclonali, coniugati ad un'attività enzimatica (Fosfatasi Alcalina o Perossidasi). Una volta fornito il substrato adeguato, quest'ultima genera un composto fluorescente e/o colorato nel visibile, insolubile e poco diffusibile, che costituisce una marcatura specifica e ad alta risoluzione. In particolare, durante il tirocinio è stata utilizzata la Perossidasi per ottenere una marcatura fluorescente nel verde (Tyramide 488), oppure la Fosfatasi Alcalina per ottenere un composto blu in luce visibile e fluorescente nel rosso lontano (Fast Blue).

La WISH può essere effettuata simultaneamente con due o più sonde diverse, marcate con apteni distinti (sono disponibili UTP legati a Digossigenina, Fluoresceina o Dinitrofenolo), in modo da generare una colorazione diversa per ciascuno dei geni d'interesse. Una possibilità per ottenere tale distinzione è utilizzare anticorpi coniugati alla stessa attività enzimatica che può agire su substrati cromogenici alternativi. Questo comporta la necessità di rilevare ciascuna sonda in tappe successive: occorre trattare l'embrione con un anticorpo contro la prima sonda, sviluppare la colorazione e inattivare l'attività enzimatica, per poi procedere con l'incubazione con il secondo anticorpo e ottenere una diversa colorazione fornendo un substrato alternativo.

Per rendere più veloce questa fase, nel laboratorio ospitante è stato elaborato un protocollo che prevede l'utilizzo di due attività enzimatiche distinte coniugate ai due tipi di anticorpi. Mediante questa strategia è possibile effettuare un'unica

incubazione con una miscela di anticorpi e sviluppare entrambe le colorazioni in successione, nella giornata seguente. Viene evitata inoltre la fase di inattivazione, con i problemi derivati da una sua parziale inefficienza, quali l'interferenza della prima attività enzimatica residua con la seconda reazione cromogenica. Quest'ultimo aspetto è di cruciale importanza in esperimenti volti a valutare la sovrapposizione tra due profili di espressione, ove si desideri ovviare al problema dei segnali falsi positivi.

Durante il tirocinio è stata applicata la WISH nell'ambito di due diverse domande biologiche.

1.3 Domande biologiche considerate

Co-localizzazioni di mRNA nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) di zebrafish

L'esperimento è volto ad indagare il profilo di espressione di cellule del SNC in via di differenziamento verso neuroni dei gangli della radice dorsale (DRG), in relazione a quattro geni codificanti altrettanti ligandi del recettore Notch. Sono stati utilizzati embrioni wild-type, fissati allo stadio di 30 e 38 ore post-fecondazione.

Nei vari esperimenti è stata utilizzata la sonda relativa al gene *neurogenin 1*, un marcatore impiegato per identificare i neuroni dei DRG, in quanto è noto essere essenziale per determinare questo e molti altri destini neuronali.

I medesimi embrioni sono stati suddivisi in quattro lotti, distinti in base alla seconda sonda utilizzata, relativa ad uno dei quattro geni di cui si vuole verificare l'espressione nei DRG: *deltaA*, *deltaC*, *deltaD* e *jagged 1a*.

In ogni gruppo la coppia di sonde marca specifiche popolazioni cellulari del tubo neurale, ma un'eventuale sovrapposizione dei due profili, in una posizione anatomica tipica dei DRG, può fornire una un'evidenza di effettiva espressione del gene di interesse nelle cellule oggetto d'indagine.

Re-individuazione di cellule umane xeno trapiantate nel SNC di zebrafish

Nel laboratorio ospitante sono stati effettuati degli esperimenti pilota per sviluppare una tecnica di xenotrapianto di cellule umane in embrioni di zebrafish. Sono state utilizzate cellule di glioblastoma umano, marcate con il composto fluorescente DiI poco prima dell'iniezione in embrioni allo stadio di due giorni post-fecondazione. Gli embrioni sono stati cresciuti per altri sei giorni e poi fissati. Su di essi durante il tirocinio sono state effettuate delle ibridazioni *in situ* per reindividuare le cellule trapiantate, facendo uso della sonda per il gene *ACTB* (*Actin beta*), espresso ubiquitariamente nelle cellule umane.

1.4 Marcatori utilizzati

Neurogenina 1

ngn1 codifica per un fattore di trascrizione essenziale per la determinazione del destino di molti tipi neuronali nel SNC. Marca alcuni gruppi di cellule nei territori presuntivi dell'encefalo e del midollo spinale, già nella fase tardiva della gastrulazione (70% epibolia). In fasi successive, risulta determinante per la formazione dei neuroni dopaminergici nel prosencefalo, dell'epifisi, dei gangli cranici e dei neuroni sensitivi dei DRG e di Rohon-Beard.

Il gene mappa sul cromosoma 14 ed è costituito da 2 esoni. Il fattore di trascrizione presenta un unico dominio basic-Helix-Loop-Helix (bHLH), con la funzione di interagire con la regione E-box dei promotori bersaglio. Per un legame ad alta affinità con il DNA è necessaria la dimerizzazione con un'altra proteina con lo stesso dominio bHLH.

deltaA, deltaD, deltaC, jagged 1a

I geni della famiglia Delta/Serrate/Jagged codificano per proteine di membrana che agiscono da ligandi per recettori della famiglia Notch e sono coinvolte nella via di segnale Notch: si tratta di una segnalazione "giuxtacrina" in quanto può intercorrere solo tra cellule con superfici adiacenti. La trasduzione del segnale comporta, nella cellula ricevente, l'inibizione del medesimo destino intrapreso dalla cellula esprime il ligando. Tramite questo processo di inibizione laterale, l'espressione dei ligandi gioca un ruolo centrale nella decisione dei destini cellulari e, in ultima analisi, nel differenziamento di molti tessuti durante lo sviluppo.

In particolare, si può osservare che nel tubo neurale dei vertebrati questi geni sono inizialmente espressi a bassi livelli; successivamente il tasso di trascrizione aumenta solo in alcune cellule e viene inibito in quelle vicine, assumendo un profilo "a sale e pepe", per poi spegnersi secondo una tempistica definita.

deltaA è localizzato sul cromosoma 1, è espresso nella notocorda e in numerose regioni dell'encefalo: in particolare, è coinvolto nella formazione e nel mantenimento dei confini tra i segmenti del romboencefalo. E' determinante nell'acquisizione del destino di motoneuroni e neuroni sensitivi Rohon Beard, oltre che nello sviluppo della retina e dell'epitelio uditivo.

deltaC è localizzato sul cromosoma 15 ed è determinante, assieme a *deltaD*, nel definire la posizione dei confini tra i somiti; la sua espressione è mantenuta nella metà posteriore di ciascun somite. E' documentato il suo ruolo anche nello sviluppo dei vasi sanguigni e degli epitelii sensoriali dell'occhio, dell'orecchio e della linea laterale

deltaD mappa sul cromosoma 13; ha un ruolo chiave nella somitogenesi, in quanto è espresso nel mesoderma laterale e più tardivamente marca la porzione anteriore di tutti i somiti. E' coinvolto anche nello sviluppo della retina e dei confini tra i rombomeri.

jagged 1a mappa sul cromosoma 1 ed è espresso nell'encefalo sino a fasi più tardive dello sviluppo, mentre nel midollo spinale persiste solo fino a ca. 40 hpf. E' coinvolto in particolare nello sviluppo del tegmento e del confine tra mesencefalo e romboencefalo.

Actina beta

Il gene *ACTB* mappa sul cromosoma umano 7 e la proteina codificata è una delle più importanti costituenti del citoscheletro di tutte le cellule, in quanto contribuisce a determinarne la specifica morfologia, mediando anche i processi di motilità intracellulare.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Abbreviazioni e soluzioni utilizzate

DIG: digossigenina

FLUO: fluoresceina

DNP: 2.4 dinitrofenolo

POD: perossidasi

AP: alcalin fosfatasi

hpf: hours post fertilization - ore dopo la fecondazione

dpf: day post fertilization - giorni dopo la fecondazione

dpi: day post injection - giorni dopo l'iniezione, riferito all'iniezione delle cellule umane negli embrioni

Fish Water 50x: 25 g Istant Ocean

39.5 CaSO₄

5 g NaHCO₃

in 5 l di acqua deionizzata.

PBS: soluzione costituita da sali di fosfato, KCl e NaCl, utilizzata per mantenere il preparato in un ambiente isotonico e a pH costante. Ottenuta tramite la dissoluzione di una pastiglia (fornitore Sigma) in acqua ultrapura “milliQ”.

PBT: PBS

0.1% Tween20 (un tensioattivo che diminuisce la viscosità degli embrioni, che durante le manipolazioni tenderebbero ad aggregarsi)

PFA 4%: paraformaldeide diluita al 4% in PBS.

Mix di preibridazione: 50% formammide

5x SSC

5 mg/ml RNA di torula

50mg/ml eparina

5% destran solfato

0.1% Tween20

diluiti in acqua “milliQ”

HM, mix di ibridazione: 200 ng di ciascuna sonda, diluiti in mix di preibridazione

SSC 20x: 3 M NaCl

0.3 M NaCitrato

diluiti in acqua milliQ

SSCT: SSC

1% Tween20

Blocking solution: 8% *sheep serum* diluito in PBT

TNT: 100mM tris HCl pH 7,5

150 mM NaCl

0.1% Tween20

diluiti in acqua milliQ

Staining buffer (Fast Blue): 100 mM tris HCl pH 8.2

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0.1% Tween20

diluiti in acqua milliQ

Staining solution: 0.25 mg/ml Fast Blue

0.25 mg/ml naftolo

diluiti in *staining buffer*

2.2 Mantenimento delle popolazioni e allestimento degli incroci

Presso il Dipartimento di Biologia le popolazioni di zebrafish vengono allevate in vasche da 5 l disposte in armadi-acquario, dotati di un impianto per il ricircolo dell'acqua e il mantenimento della temperatura a 28°C. Possono essere espanse mediante incroci di popolazione, che coinvolgono coppie di individui casuali, o possono essere allestiti incroci tra una specifica coppia di pesci, isolandoli in una vaschetta separata. Gli embrioni raccolti vengono trasferiti in piastre Petri con Fish Water e si lasciano crescere in un incubatore a 28°C; a 6 dpf sono trasferiti in vasche da 1 l. Gli embrioni o le giovani larve possono essere prelevate e fissate ad un preciso stadio dello sviluppo oppure, una volta raggiunta una taglia adeguata, si trasferiscono in vasche da 5 l.

2.3 Fissaggio degli embrioni

Per il fissaggio gli embrioni che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo di interesse vengono incubati in 500 µl di PFA 4% per di 2 ore a temperatura ambiente o "overnight" a 4°C. In seguito subiscono alcuni passaggi in metanolo, che li disidrata preservandone i tessuti; infine, sono stoccati in tubi da 2 ml in metanolo 100% e conservati a -20°C anche per molti mesi.

2.4 Sintesi della sonda actina beta

La sonda è stata ottenuta a partire da un plasmide commerciale (pCMU sport6, ditta Source Bioscience) contenente la sequenza codificante di interesse. La procedura di sintesi è costituita da due fasi principali: una reazione di restrizione per eseguire un taglio a monte della sequenza, che funge da punto di terminazione per la successiva reazione di trascrizione, effettuata tramite T7 RNA polimerasi a partire da un promotore a valle del gene: in questo modo si ottiene un RNA antisenso. Nella miscela di reazione viene utilizzata una frazione di UTP legati ad uno specifico aptene, in modo da ottenere una sonda marcata. Il prodotto finale viene purificato e concentrato tramite apposite colonnine di silicio; un campione viene sottoposto a gel elettroforesi per una valutazione quantitativa della concentrazione mediante il software Quantity One (Biorad), dopodichè la soluzione ottenuta è diluita in formammide pura in rapporto 1:1 e così stoccata a -20°C.

2.5 Protocollo della WISH

Primo giorno

- Trattamento degli embrioni fissati con H₂O₂ 2% in metanolo 100% per 20 minuti, al fine di saturare e inattivare le perossidasi endogene e permeabilizzare blandamente i tessuti.
- Reidratazione mediante il passaggio per 5 minuti in soluzioni a concentrazione crescente di PBS e decrescente di metanolo, lavaggio finale in PBT 100%.
- Permeabilizzazione mediante digestione con Proteinasi K 10µg/ml in PBT, della durata di 15 minuti per ogni dpf di età. Il tempo va ridotto a circa 5 minuti per ogni dpf in embrioni xenotrapantati, in quanto risultano più delicati.
- Rifissaggio in PFA 4% in PBS per 20 minuti e successiva rimozione della soluzione tramite lavaggi in PBT (quattro volte per cinque minuti).
- Preparazione degli embrioni in 800 µl di mix di preibridazione per almeno un'ora, posti in un bagno termico a 65°.
- Sostituzione del mix di preibridazione con 200 µl di HM e incubazione overnight a 65°C.

Secondo giorno

- Esecuzione di una serie di lavaggi per la completa rimozione della sonda in eccesso:
50% formammide in SSCT 2X; due lavaggi di 30 minuti a 60°C
SSCT 2X , 15 minuti a 60°C
SSCT 0.2X , due lavaggi di 30 minuti a 60°C
PBT, 5 minuti a RT
 - Preparazione degli embrioni in *blocking solution* per un'ora a RT, in agitazione.
 - Incubazione con gli anticorpi diluiti in *blocking solution* a 4°C overnight, in agitazione.
- Le diluizioni di ciascun tipo di anticorpo utilizzato sono:
anti FLUO-AP 1:3000; anti DIG-POD 1:400, anti DNP-POD 1:200.

Terzo giorno

- Esecuzione di 8 lavaggi in PBT da 15 minuti a RT per rimuovere gli anticorpi in eccesso, dopodichè si sviluppano le colorazioni.
- Rilevazione dell'attività POD (fluorescenza verde): diluizione in *amplification buffer* di H₂O₂ 0.0015% e di *tyramide stock solution* Alexa 488 1:100; trattamento degli embrioni in almeno 200 µl della soluzione così ottenuta per un ora al buio a RT.

➤ Seguono tre veloci lavaggi in TNT e due in PBT per bloccare la reazione cromogenica.

➤ Rilevazione dell'attività AP (Fast Blue): immersione degli embrioni in *staining buffer* per 5 minuti; trasferimento degli embrioni in una piastra da 24 pozzetti, in cui vengono colorati in 500 µl di *staining solution*, posti sull'agitatore e mantenuti al buio per non danneggiare il composto fluorescente sviluppato in precedenza. Il processo di colorazione deve essere monitorato al microscopio ottico entro i primi cinque minuti e successivamente ogni 10 – 15 minuti circa, a seconda di quanto velocemente procede.

Si termina con quattro lavaggi veloci in TNT e due in PBT.

2.6 Reazioni cromogeniche

La POD catalizza una reazione di ossidoriduzione che coinvolge il perossido di idrogeno, come accettore di elettroni, e un substrato donatore, in questo caso una tiramide. Si tratta di un composto fenolico che, ossidato, forma un radicale altamente instabile e tende a legare covalentemente i gruppi aromatici delle proteine. Così stabilizzato, costituisce una marcatura fluorescente, depositata ad alta densità nei pressi dell'enzima associato al mRNA bersaglio. Sono disponibili in commercio kit con tiramidi fluorescenti a diverse lunghezze d'onda, nel nostro caso è stato usato il kit Alexa 488 per ottenere una fluorescenza verde.

Il substrato fornito alla AP è un sale di naftolo (naftol AS-MX fosfato disodio), la cui defosforilazione genera un fenolo nucleofilo capace di reagire con il sale di diazonio Fast Blue BB per formare un composto aromatico insolubile, di colore blu nel visibile e fluorescente nel rosso lontano.

2.7 Montaggio e osservazione

Dopo l'ibridazione *in situ*, gli embrioni vengono passati in una serie di soluzioni a concentrazione crescente di glicerolo in PBS, raggiungendo una soluzione finale glicerolo 87%/PBS. Mantenendo gli embrioni in questo mezzo, vengono trasferiti su una piastra Petri e si procede a rimuovere il tuorlo al microscopio ottico, utilizzando aghi sottili da dissezione. Gli embrioni così preparati sono stati disposti su un vetrino portaoggetti, all'interno di una celletta ottenuta intagliando alcuni strati di nastro adesivo sovrapposti, che fungono da sostegno per il vetrino coprioggetti, in modo che l'embrione non sia danneggiato.

Il preparato può essere osservato e documentato attraverso il microscopio ottico e il microscopio confocale a fluorescenza.

3. RISULTATI E CONCLUSIONI

Una volta completato l'esperimento (Tab 1) e montati alcuni embrioni su vetrino, è stata documentata a titolo esemplificativo la colorazione Fast Blue in luce visibile per un embrione del Gruppo 1 (Fig. 1). E' stata utilizzata una fotocamera digitale *Leica DC500*, montata su un microscopio ottico composto *Leica DMR*.

Successivamente, sono state acquisite le immagini al microscopio confocale spettrale per documentare i risultati in fluorescenza. Per ogni preparato sono stati acquisiti i segnali di fluorescenza delle tiramidi e del Fast Blue, dopodichè, rappresentati con i falsi colori verde e rosso e combinati in un'unica immagine, è stata valutata la presenza di colocalizzazioni, indicate dal colore giallo. Tramite il software LAS è stata ottenuta una stima quantitativa delle sovrapposizioni, espressa come coefficiente di correlazione R.

Gruppo 1 – *deltaA/neurogenin1*: in tutti gli embrioni la colocalizzazione è stata osservata in alcune cellule in posizione mediolaterale del tubo neurale (Fig. 2) e in media risulta $R = 32\%$. Le cellule individuate sono poche, ma si può imputare al fatto che a 30 e 38 hpf per entrambi i geni è superato il momento di massima espressione, che è in via di spegnimento con andamento stocastico. Si può concludere che i dati ottenuti sostengono l'ipotesi di coespressione di *deltaA* in cellule *ngn1*-positive nelle tipiche aree di localizzazione dei neuroni dei DRG.

Gruppo 2 – *deltaD/neurogenin1*: entrambe le sonde marcano popolazioni neuronali principalmente in una fascia ventrale del tubo neurale. Si possono osservare (Fig. 3) sovrapposizioni in alcune cellule in posizione dorsale e ventrale. Le prime potrebbero essere neuroni Rohn-Beard, le seconde potrebbero essere motoneuroni o neuroni dei DRG in una fase più avanzata della migrazione in direzione dorso-ventrale. Tali colocalizzazioni trovano conferma nel valore ottenuto $R=23\%$. Come per *deltaA* i dati non permettono di convalidare con assoluta sicurezza l'espressione di *deltaD* nei DRG; sono necessari ulteriori esperimenti con marcatori DRG-specifici per risolvere questa incertezza.

Gruppo 3 – *deltaC/neurogenin1*: si osserva una netta separazione dei due profili di espressione (Fig. 3) ed è stato attribuito mediamente un valore $R = 1,4\%$, corrispondente per lo più ad una sovrapposizione dei segnali di background. I dati, quindi, permettono di escludere l'ipotesi di co-localizzazione.

Si può osservare che *deltaC* è espresso in numerosi *cluster* di cellule piuttosto superficiali, disposti con una certa periodicità in direzione antero-posteriore: probabilmente si tratta di cellule della linea laterale.

Gruppo 4 – *jagged1a/neurogenin1*: i due profili interessano gruppi di cellule piuttosto separati, in quanto allo stadio considerato *jagged1a* marca per lo più la porzione dorsale del tubo neurale, mentre *neurogenin1* marca soprattutto la regione ventrale. I domini si sovrappongono a livello di alcune cellule in posizione mediana, tuttavia con un valore R=12% piuttosto basso, probabilmente da imputare all'esiguo numero di cellule con potenziale co-espressione in relazione alla numerosità di cellule appartenenti a domini nettamente separati. Va osservato che allo stadio di ca. 40 hpf, più idoneo all'osservazione delle cellule DRG, il gene *jagged1a* è già in forte spegnimento trascrizionale.

In conclusione, l'ipotesi di espressione di ligandi della via di segnale Notch in cellule *ngn1*-positive allo stadio di 30-38 hpf, stadio in cui si generano le cellule dei DRG, può essere confermata con una buona probabilità per il gene *deltaA*, con minor precisione per il gene *deltaD* ed in misura ancora minore, per *jagged1a*, mentre si può escludere per il gene *deltaC*.

Un ulteriore esperimento potrebbe consistere nell'allestimento di una WISH con una sonda che marchi esclusivamente i DRG, quale la sonda *drg11*, in alternativa al marcatore di più ampio spettro *neurogenin1*. Purtroppo, all'epoca del tirocinio, tale sonda, richiesta ad un gruppo collaboratore, non è pervenuta in tempi idonei allo svolgimento di tali esperimenti.

	sonda	anticorpo	colorazione
Gruppo 1	<i>deltaA</i> <i>neurogenin1</i>	antiFLUO - AP antiDIG - POD	Fast Blue/fluor. rossa fluorescenza verde
Gruppo 2	<i>deltaD</i> <i>neurogenin1</i>	antiFLUO - AP antiDIG - POD	Fast Blue/fluor. rossa fluorescenza verde
Gruppo 3	<i>deltaC</i> <i>neurogenin1</i>	antiFLUO - AP antiDNP - POD	Fast Blue/fluor. rossa fluorescenza verde
Gruppo 4	<i>jagged1a</i> <i>neurogenin1</i>	antiDIG - POD antiFLUO - AP	fluorescenza verde Fast Blue/fluor. rossa

Tab 1: Schema riassuntivo degli esperimenti di co-localizzazione. Sono indicati i quattro gruppi di embrioni ibridati, ciascuno comprende individui sia di 30 hpf che 38 hpf. Per ogni gruppo è indicata la coppia di sonde utilizzate, la relativa coppia di anticorpi, ed infine la colorazione associata ad ogni sonda.



Fig. 1: Espressione di *deltaA* in un embrione wild-type di 30 hpf, con colorazione Fast Blue osservata in luce visibile. A) Visione laterale e B) visione dorsale della regione dell'encefalo, anteriore a sinistra. Si può notare la colorazione nei pressi di ogni confine tra i segmenti del romboencefalo (la freccia indica in A il confine tra rombomero 1 e rombomero2). C) Visione laterale del tronco, anteriore a sinistra. Si noti il profilo a "sale e pepe" delle cellule marcate nel tubo neurale.

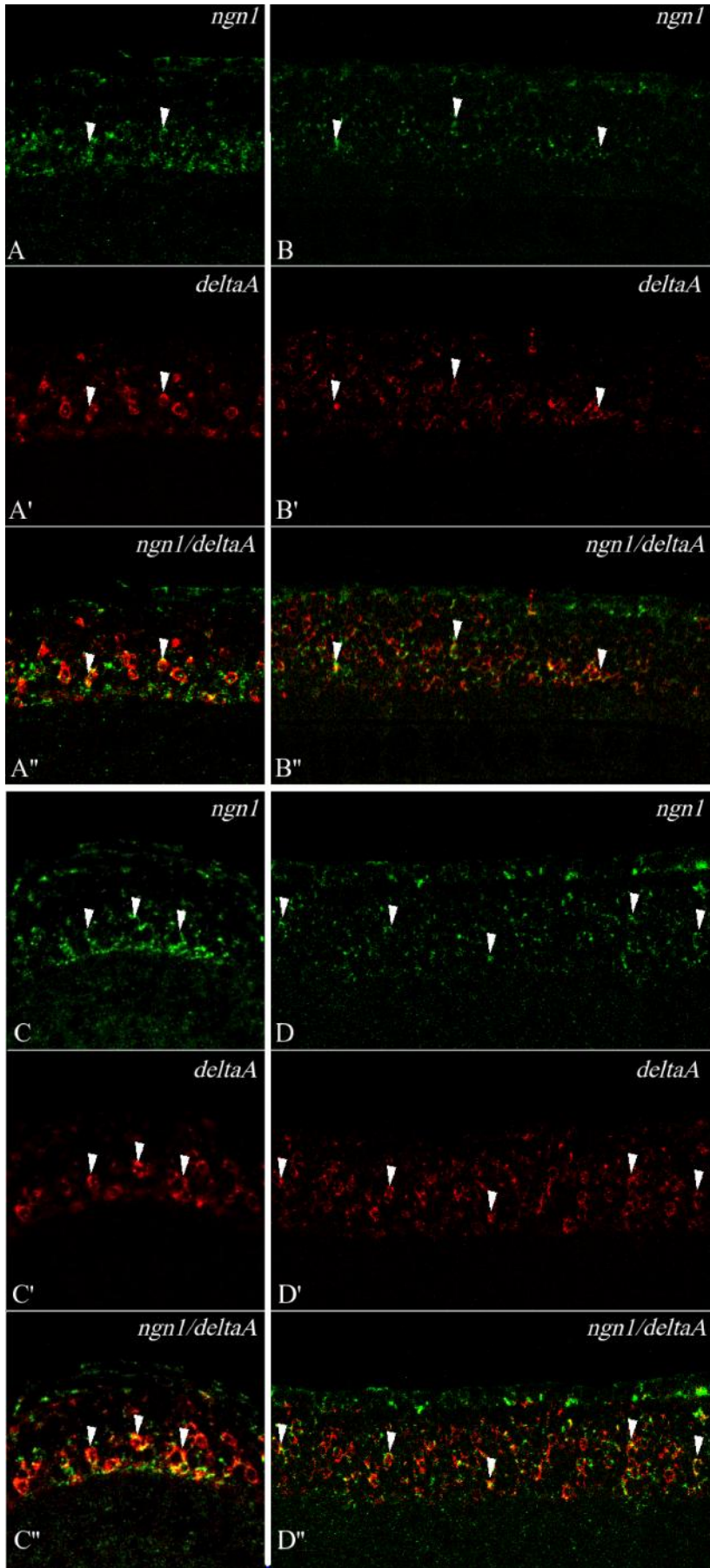


Fig.2: sezioni di tronco in visione laterale, anteriore a sinistra. Per il gruppo 1 sono stati documentati due embrioni allo stadio 30 hpf (A-A'' e C-C'') e due allo stadio 38 hpf (B-B'' e D-D''). Per ognuno di essi è riportato il profilo di *ngn1*, il profilo di *deltaA* e la sovrapposizione dei profili. Le frecce bianche indicano alcune cellule con colocalizzazione.

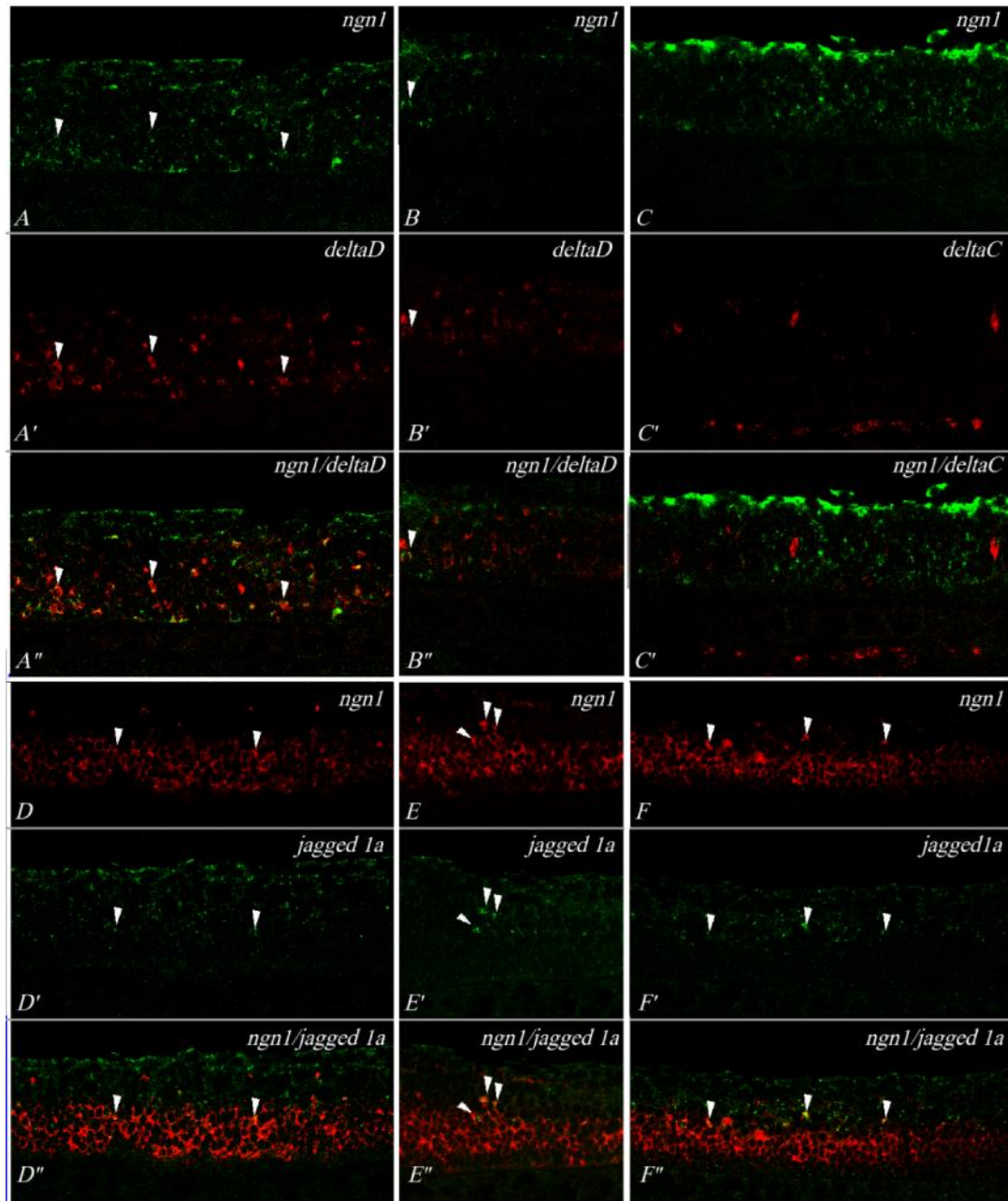


Fig. 3: sezioni di tronco in visione laterale, anteriore a sinistra. Sono raffigurati due embrioni del gruppo 2, appartenenti allo stadio 30 hpf (A-A'' e B-B''), un embrione del gruppo 3, di 30 hpf (C-C'') e tre individui del gruppo 4, di 30 hpf (D-D'', E-E'', F-F''). Sono indicate le cellule con colocalizzazione e sono riportati i profili di espressione ottenuti con ciascuna sonda e il risultato della sovrapposizione dei profili.

La WISH, effettuata con sonda per l'*ACTB* umana su embrioni xenotrapiantati con cellule di glioblastoma umano, ha avuto successo nel re-identificare *post mortem* cellule umane rimaste localizzate per 6 giorni nell'encefalo di zebrafish (Fig. 4 A e A'). Nell'individuo in figura è stata documentata con Fast Blue in luce visibile la reindividuazione delle cellule umane, sopravvissute nel tessuto per sei giorni. In questo periodo è in parte persistito anche il composto fluorescente DiI (Fig. 4 A'), il quale era associato alla membrana plasmatica delle cellule al momento dell'iniezione nell'embrione.

Embrioni di controllo non trapiantati, sottoposti alla medesima WISH, non hanno mostrato segnali di espressione di *ACTB* umana (Fig. 4 B e B').

La strategia si dimostra quindi specifica per l'individuazione in zebrafish di cellule di origine umana, anche nel caso in cui i traccianti originali vengano persi, e si dimostra un'alternativa molto semplice ed economicamente conveniente rispetto all'uso di anticorpi specie-specifici.

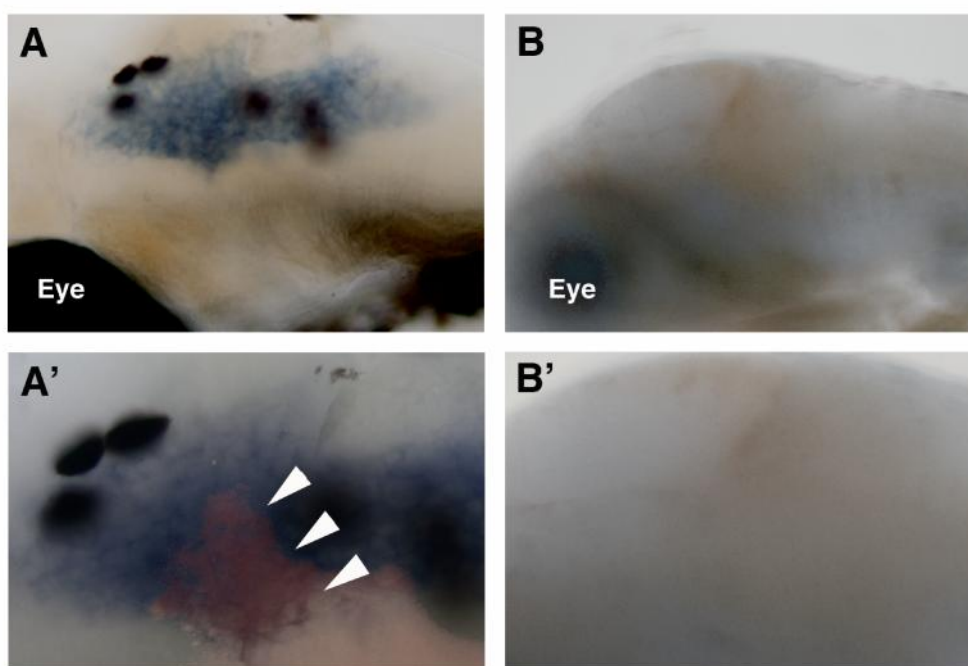


Fig 4: A) Espressione di *ACTB* umana in un embrione a 6 dpi, 8 dpf. Dettaglio del capo in visione laterale, anteriore a sinistra. A') Ingrandimento dell'area dello xenotrapianto; mediante una sovrapposizione di immagini, è rappresentata in rosso la fluorescenza residuale del DiI in una parte delle cellule umane. B) Embrione a 8 dpf, non trapiantato ed ibridato con *ACTB* come controllo negativo. B') Ingrandimento della regione encefalica corrispondente all'area mostrata in A'.

4. BIBLIOGRAFIA

Lauter G., Söll I. and Hauptmann G. (2011): Two-color fluorescent in situ hybridization in the embryonic zebrafish brain using differential detection systems. *BMC Developmental Biology* 11:43.

Thisse B, Thisse C. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc.* 3(1):59-69.

Charles B. Kimmel, William W. Ballard, Seth R. Kimel, Bonnie Ullmann, and Thomas F. Schilling (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203:253-310