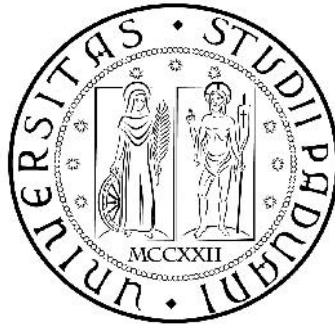


# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



## Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biologia  
Curriculum: Biologia Generale

Elaborato di laurea

Titolo dell'elaborato:

*“Visualizzazione della sensibilità ai glucocorticoidi endogeni  
mediante ibridazione in situ sulla linea transgenica di zebrafish  
Tg(9xGCREHSV.Ul23:EGFP)ia20 responsiva a tali ormoni.”*

**Tutor:** Dott.ssa Luisa Dalla Valle

**Cotutor:** Dott.ssa Francesca Benato

Dipartimento di Biologia

**Laureanda:** Venturelli Ilaria

**Anno Accademico:** anno 2012/2013



# INDICE

<b>PREMESSA</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
1.1. Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	3
1.2. Il ciclo circadiano	3
1.3. I glucocorticoidi e il ciclo circadiano	6
1.4. La linea transgenica di zebrafish Tg(9xGCREHSV.U123:EGFP)ia20	8
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>11</b>
2.1. Allevamento dello zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	11
2.2. Fissazione e conservazione degli embrioni	12
2.3. Ibridazione <i>in situ</i>	12
2.4. Soluzioni	14
2.5. Preparazione degli embrioni per la microscopia ed acquisizione delle immagini	15
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>17</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>21</b>



## **PREMESSA**

Nel laboratorio di Endocrinologia comparata dove ho svolto il tirocinio ho potuto utilizzare la linea transgenica di zebrafish Tg(9xGCREHSV.U123:EGFP)ia20 nella quale l'espressione della proteina fluorescente verde (GFP) è guidata da nove elementi di risposta glucocorticoidi (GRE) ripetuti a monte di un promotore minimo. L'attività dei glucocorticoidi può essere visualizzata sia al microscopio a fluorescenza che mediante la tecnica di ibridazione *in situ* per la visualizzazione del messaggero della GFP. Nel corso del tirocinio ho analizzato la sensibilità di questa linea transgenica alle variazioni endogene dei glucocorticoidi, durante specifiche ore nell'arco della giornata in larve di zebrafish 5 giorni dopo la fecondazione.

I risultati ottenuti mostrano come questa linea transgenica sia molto sensibile e come vi siano, nella larva di zebrafish, tessuti ed organi che rispondono in modo dinamico alle fluttuazioni giornaliere di questo ormone.









# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Zebrafish (*Danio rerio*)

*Danio rerio*, comunemente detto zebrafish, è un pesce teleosteo della famiglia dei *Cyprinidae*, genere *Danio*. In natura lo zebrafish vive in laghi e corsi d'acqua della regione nord-orientale dell'India.

Il nome di zebrafish, letteralmente pesce zebra, deriva dalla presenza di 4 o più strisce colorate di scuro intramezzate da strisce argento o giallo, disposte orizzontalmente sul corpo (Fig. 1).

Lo zebrafish è attualmente utilizzato come organismo modello per studi di biologia dello sviluppo e di genetica grazie alla sua economicità ed a una serie di caratteristiche che lo rendono accessibile e semplice da utilizzare: è molto piccolo (raggiunge una lunghezza di 4-6 cm), arriva a maturità sessuale in 2-3 mesi, produce un elevato numero di uova, anche centinaia ogni 2-3 giorni. Le uova sono dotate di un *corion* trasparente che permette il monitoraggio *in vivo* dello sviluppo dell'embrione. La fecondazione è esterna.

Inoltre, nonostante la distanza filogenetica che separa lo zebrafish dall'uomo e dai mammiferi in generale, i suoi meccanismi molecolari, sia per quanto riguarda lo sviluppo embrionale che altri processi metabolici, sono altamente conservati (Hill *et al.*, 2005).



Fig. 1. *Danio rerio*, immagine da:

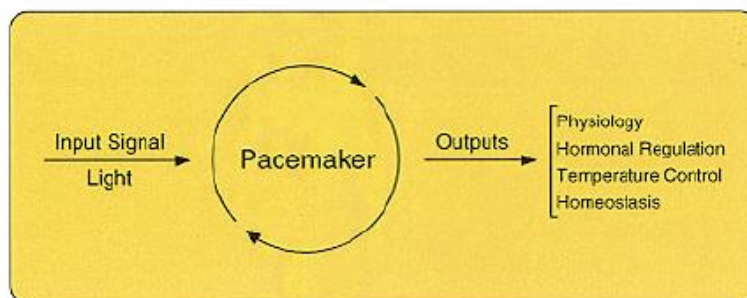
<http://bioinformatica.upf.edu/2007/projectes07/B.5/taulaortolegsube4b.html>.

## 1.2. Il ciclo circadiano

Gli esseri viventi vivono in un ambiente scandito ciclicamente da eventi come l'alternanza di luce tra il giorno e la notte o le stagioni.

In relazione con queste variazioni cicliche ambientali, anche il comportamento e la fisiologia degli organismi ha bisogno di cambiare per permettere all'essere vivente di adattarsi in modo appropriato all'ambiente. Tra i comportamenti

maggiormente soggetti a questa ritmicità troviamo: la ricerca di cibo, il sonno e la veglia, la riproduzione.



**Fig. 2.** Schema classico del ciclo circadiano e le sue tre principali componenti.

Figura da: Pando e Sassone-Corsi (2002).

I cicli endogeni, comparsi e conservati nel corso dell'evoluzione degli esseri viventi, permettono all'organismo di rispondere a queste esigenze anticipando i cambiamenti dell'ambiente esterno e permettendo un migliore adattamento dell'organismo stesso (Fig. 2).

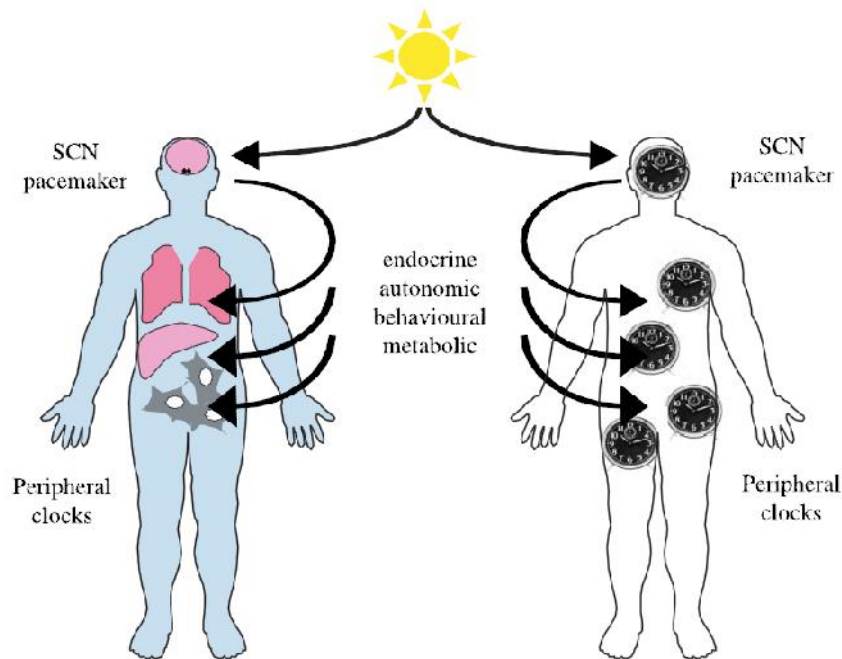
In particolare, il ciclo circadiano riflette il ciclo giorno/notte, organizzando eventi comportamentali e metabolici, con una ritmicità che si avvicina alle 24 ore. Da qui deriva anche il termine "circadiano": dal latino *circa* cioè quasi e *dies* che significa giorno.

Per mantenersi realmente adattato all'ambiente ed al vero ciclo luce/buio, l'orologio circadiano è in grado di calibrarsi utilizzando dei segnali esterni, detti Zeitgeber (dal tedesco "informatore"), che possono essere naturali come per esempio la luce o la temperatura ambientale o stimoli di natura sociale (ora del pranzo) (Weger *et al.*, 2013).

Inizialmente si pensava che il ciclo circadiano fosse controllato da un unico orologio centrale in grado di regolare direttamente il metabolismo dell'organismo. In realtà è stato recentemente scoperto che le cellule stesse dell'organismo seguono un ciclo circadiano autoregolato e funzionante. Si è visto infatti che cellule *in vitro* mantengono l'oscillazione circadiana senza necessità di input da un ulteriore pacemaker (Pando e Sassone-Corsi, 2002). Questa attività è stata dimostrata in zebrafish nel cuore, nel rene e anche in linee cellulari provenienti da embrioni, in cui si è potuto constatare che *in vitro* l'oscillazione dell'orologio periferico viene mantenuta per due o più cicli (Cahill, 2002).

L'orologio biologico mantiene il ciclo circadiano attraverso dei complessi sistemi di dialogo incrociato tra diversi elementi. Uno di questi è il "master clock" o

pacemaker (segnatempo) endogeno che riceve i segnali esterni attraverso i fotorecettori ed è utile alla calibrazione del ciclo. Questo pacemaker invia segnali ai numerosi “slave clocks” ovvero agli orologi periferici che possono trovarsi in varie cellule e tessuti dell’organismo stesso. Il pacemaker centrale e gli orologi periferici si mantengono in contatto attraverso messaggi nervosi o ormonali, ed entrambi funzionano come degli oscillatori ad autoregolazione.



**Fig. 3.** Sincronizzazione del pacemaker centrale e degli orologi periferici. Figura da: Hastings et al., (2007).

Il pacemaker centrale nei mammiferi è stato ritrovato nel nucleo soprachiasmatico dell’ipotalamo (SNC), il quale riceve le informazioni di luce e buio da parte delle cellule fotosensibili della retina. Nello zebrafish, come in altri vertebrati, questo ruolo spetta alla ghiandola pineale che è anche la principale produttrice di melatonina, un ormone che regola la ciclicità del sonno. Nonostante sia coinvolto anche il nucleo soprachiasmatico, nello zebrafish è stato visto che l’organo pineale contiene un orologio endogeno che è sufficiente per la regolazione sia del ciclo della melatonina che per la ricezione di stimoli luminosi necessari alla sincronizzazione del ciclo (Noche *et al.*, 2011).

Di particolare importanza per il mantenimento dell’oscillazione negli “slave clocks”, sono i fattori di trascrizione Clock (Circadian locomotor output cycle kaput) e Bmal1 (Brain and muscle Arnt-like protein 1) i quali si uniscono a formare un eterodimero in grado di legare le regioni E-box di uno svariato numero di geni dell’orologio. Tra i geni attivati da Clock/Bmal1 e fondamentali per l’oscillazione, troviamo le isoforme di *Per* (period) e *Cry* (cryptochrome) che

vanno ad agire sul controllo della proliferazione e del ciclo cellulare. Questa trascrizione avviene nel nucleo soprachiasmatico e continua durante la notte fino a quando i livelli nucleari delle proteine Per e Cry diventano sufficientemente alti per reprimere l'attivazione di *Clock/Bmal1*. La diminuzione dei livelli di Per/Cry nelle prime ore del mattino permette poi una nuova trascrizione dei geni e l'inizio di un nuovo ciclo. Questo feedback negativo mantiene il ciclo di trascrizione/repressione con un'oscillazione di circa 24 ore e permette ai geni attivati di andare a dialogare con specifiche funzioni fisiologiche dell'organismo in modo autonomo (Lahiri *et al.*, 2005; Dickmeies e Foulkes, 2011).

Questo circuito reattivo trascrizionale/traduzionale costituisce il circuito centrale dell'orologio. Altri circuiti retroattivi interagiscono con il circuito centrale e contribuiscono alla sua stabilità e alla possibilità di una modulazione molto fine dello stesso (Dickmeies e Foulkes, 2011).

### **1.3. I glucocorticoidi e il ciclo circadiano**

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei che agiscono controllando un grandissimo numero di processi fisiologici che includono le risposte allo stress, il controllo del metabolismo, la proliferazione cellulare e persino la regolazione del ciclo circadiano e degli orologi biologici.

La produzione di glucocorticoidi è sotto il controllo dell'asse HPA (ipotalamo-ipofisi-surrene) attraverso una stimolazione coordinata tra i vari elementi. L'ipotalamo secerne il neurotrasmettitore CRH (ormone di rilascio della corticotropina), il quale stimola l'ipofisi (più precisamente l'adenoipofisi) a produrre l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) detto anche corticotropina. La corticotropina agisce sulla surrenale che in risposta sintetizza glucocorticoidi (Nader *et al.*, 2010).

I glucocorticoidi sono ormoni che possono diffondere attraverso la membrana plasmatica e legarsi a specifici recettori chiamati GR (glucocorticoid receptor). I GR, in assenza di glucocorticoidi, si trovano nel citoplasma, ma quando si uniscono al loro ligando sono in grado di traslocare assieme all'ormone nel nucleo e permettere il legame con specifiche sequenze (GRE, Glucocorticoid Responsive Element) che si trovano nelle regioni promotrici dei geni bersaglio di questi ormoni.

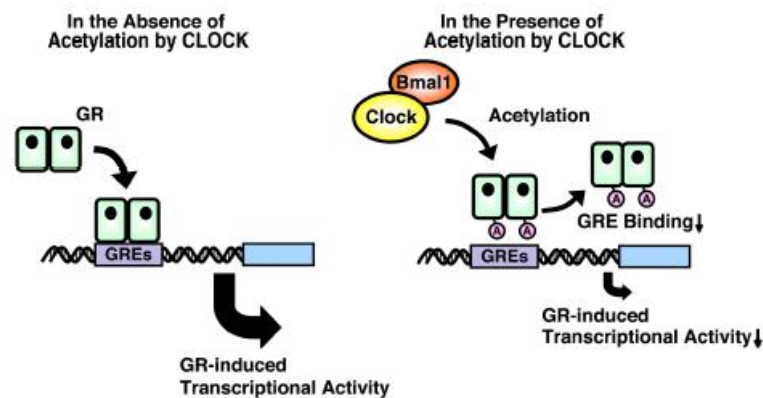
La concentrazione dei glucocorticoidi fluttua nell'organismo con un andamento circadiano. Negli animali diurni i livelli di glucocorticoidi raggiungono un picco massimo di mattina, mentre negli animali notturni il picco è evidenziabile all'inizio del periodo notturno. Il ritmo diurno di secrezione dei glucocorticoidi si

sovrapponere ad un ritmo di secrezione pulsatile che presenta tra 1 e 2 picchi ogni ora (Dickmeies e Foulkes, 2011).

L'attività circadiana dell'asse HPA è sotto il controllo del SCN come dimostrato dalla perdita del ritmo circadiano dei glucocorticoidi in seguito a lesioni a livello di questa struttura (Engeland e Arnhold, 2005).

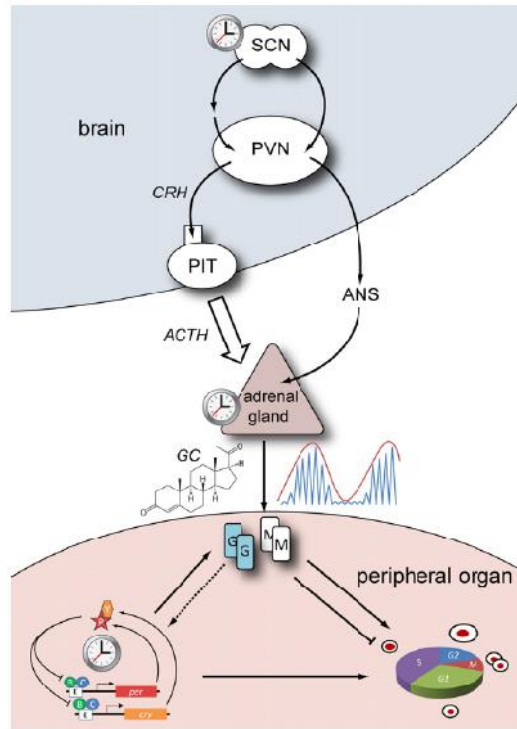
A loro volta, i glucocorticoidi agiscono sul ciclo circadiano, in particolare sugli orologi periferici di alcuni organi e tessuti, influenzandone l'espressione genica. Ad esempio il gene *Per1* (gene presente nei ratti e anche nell'uomo) possiede nel suo promotore una serie di sequenze GRE ripetute e la sua trascrizione è quindi dipendente dai glucocorticoidi e dalla presenza di GR (Nader *et al.*, 2010).

Anche l'eterodimero Clock/Bmal1 agisce con un dialogo crociato, utilizzando la regione C-terminale della proteina Clock per interagire con GR, impedendo il legame del recettore con il sito di risposta ai glucocorticoidi e diventandone quindi un regolatore negativo (Fig. 4).



**Fig. 4.** Clock/Bmal1 impediscono la trascrizione di geni controllati da GREs. Figura da: Nader *et al.*, 2010.

I glucocorticoidi sono quindi utilizzati dal pacemaker come segnale per controllare la ritmicità degli orologi periferici dell'organismo e sono a loro volta soggetti al ciclo impostato dall'orologio centrale (Oster *et al.*, 2006; So *et al.*, 2009).



**Fig. 5.** Modello del rapporto tra SCN, produzione di glucocorticoidi e regolazione dell'orologio periferico. Il nucleo soprachiasmatico interviene sull'ipotalamo, nello specifico sui nuclei paraventricolari per andare a influenzare la produzione di glucocorticoidi i quali regolano gli orologi periferici.. Figura da: Dickmeies e Foulkes, 2011.

## 1.4. La linea transgenica di zebrafish

### Tg(9xGCREHSV.U123:EGFP)ia20

Per visualizzare le risposte ai glucocorticoidi è stata creata una linea transgenica di zebrafish chiamata Tg(9xGCREHSV.U123:EGFP)ia20, responsiva ai glucocorticoidi in generale (Benato *et al.*, inviato a Endocrinology) ma anche a progestogeni, androgeni e mineralcorticoidi dato che tutti questi ormoni condividono lo stesso elemento di risposta (Adler *et al.*, 1992). Tale elemento di risposta viene quindi a volte chiamato HRE (hormone response element) invece che GRE. La specificità della linea transgenica per i glucocorticoidi è comunque valida durante le prime fasi dello sviluppo quando non sono ancora presenti significative concentrazioni dei recettori per gli altri ormoni. Nelle fasi successive è invece necessario il contemporaneo uso di antagonisti specifici (Benato *et al.*, inviato a Endocrinology). Questa linea transgenica contiene nove elementi di risposta ai glucocorticoidi (glucocorticoid responsive elements, GREs) posizionati in tandem a monte della sequenza che codifica per la proteina GFP e permette di visualizzare *in vivo* il segnale dei glucocorticoidi grazie all'utilizzo della GFP.

La GFP è una proteina fluorescente verde di 238 amminoacidi, isolata dalla medusa *Aequorea victoria*, in grado di fluorescere senza substrati o cofattori aggiuntivi. Presenta il picco di massima eccitazione quando viene irradiata con luce di  $\lambda = 489$  nm ed emette una luce verde di  $\lambda = 509$  nm. Il gene per la GFP è stato isolato ed è diventato uno strumento molto utile per creare proteine chimeriche di GFP, dove funziona come “etichetta” fluorescente.









## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Allevamento dello zebrafish (*Danio rerio*)

L'acqua in cui vengono allevati gli zebrafish viene prodotta artificialmente e mantenuta ad una temperatura di 28°C. Per ottenere la concentrazione salina ed il pH ottimale, a 150 L di acqua deionizzata vengono aggiunti i seguenti sali: 23.5 g CaSO<sub>4</sub>, 3 g NaHCO<sub>3</sub>, 15 g *instant ocean*. L'acqua inoltre deve essere priva di cloro ed i nitrati non devono superare il valore di 30 mg/L.

L'allevamento prevede la somministrazione di tre pasti giornalieri: uno costituito da cibo secco a scaglie (AZ300, Tetra), e due da nauplii di *Artemia salina*. In vasche da 5 L vengono tenuti fino a 20 pesci adulti, utilizzati come riproduttori. In genere il numero dei maschi è pari a quello delle femmine.

La sera prima della microiniezione vengono selezionate coppie di pesci e trasferite in vaschette da 1 L dotate di un separatore in plastica trasparente e di un doppio fondo attraverso il quale possono passare le uova. Il maschio e la femmina rimangono divisi tutta la notte. La mattina seguente il separatore viene tolto e le vasche vengono poste alla luce per indurre l'accoppiamento e la deposizione delle uova. Il doppio fondo, dove si raccolgono le uova, evita che i pesci si cibino delle uova appena deposte, per compensare le perdite energetiche dovute al frenetico corteggiamento e alla produzione dei gameti. Gli zebrafish hanno un fotoperiodo ottimale di 14 ore di luce e 10 ore di buio, ottenuto utilizzando lampade regolate da un timer per l'erogazione della luce artificiale.

Le uova e le larve, fino a 5 giorni di sviluppo, crescono in *fish water*, in capsule Petri da 20 ml, mantenute a 28,5°C all'interno di un incubatore (Kimmel et al., 1995).

La soluzione è composta da:

- *fish water stock 50X*: 25g *instant ocean*, 39.25 g CaSO<sub>4</sub>, 5 g NaHCO<sub>3</sub>, dH<sub>2</sub>O fino ad un volume finale di 5 L;
- *fish water (1X)*: 200 ml *fish water stock (50x)*, 0,00004% blu di metilene, dH<sub>2</sub>O fino ad un volume finale di 10 L.

Il blu di metilene impedisce che le uova siano aggredite da parte di muffe patogene e parassiti che ne comprometterebbero la sopravvivenza.

La schiusa avviene circa 72 h dopo la fecondazione e le riserve del tuorlo si esauriscono dopo 5-6 giorni.

## 2.2. Fissazione e conservazione degli embrioni

Gli embrioni, contenuti in piastre petri ed immersi in *fish water*, una volta raggiunto lo stadio di interesse, vengono prelevati e trasferiti con una pipetta Pasteur in provette da 2 ml nelle quali la *fish water* viene sostituita con paraformaldeide (PFA) al 4%. Il tempo di fissazione varia in base alla temperatura alla quale viene condotta: due ore a temperatura ambiente oppure *over night* (O/N) a 4 °C. Terminata la fissazione, la PFA viene sostituita con PBS e quindi gli embrioni vengono portati in metanolo assoluto, mediante lavaggi intermedi a concentrazioni crescenti di metanolo assoluto e decrescenti di PBS. Questa serie di passaggi permette la disidratazione completa dei tessuti. Gli embrioni in metanolo assoluto possono essere conservati anche per lunghi periodi a -20 °C.

## 2.3. Ibridazione *in situ*

Il saggio dell'ibridazione *in situ* su embrioni *in toto* permette di analizzare l'espressione di un determinato gene, nello spazio e nel tempo, usando sonde antisense di acido ribonucleico sequenza-specifiche, marcate non radioattivamente.

### 2.3.1. Primo giorno

#### 1. Reidratazione.

Gli embrioni fissati, privi del *corion* e conservati in metanolo a - 20°C, vengono reidratati attraverso passaggi seriali in soluzioni decrescenti di metanolo e crescenti di PBS a temperatura ambiente:

- 75% metanolo in PBS per 5 min;
- 50% metanolo in PBS per 5 min;
- 25% metanolo in PBS per 5 min;
- 1X PBT per 5 min.

Per ottenere una migliore permeabilità alle sonde a RNA e agli anticorpi, gli embrioni fissati sono trattati con l'enzima proteinasi K (10 µg/ml in PBT). La durata della digestione dipende dallo stadio di sviluppo degli embrioni usati:

- 24 hpf - 15 minuti
- 36 hpf - 22 minuti
- 48 hpf - 30 minuti
- 72 hpf - 45 minuti

L'attività dell'enzima viene bloccata mediante post-fissaggio degli embrioni in PFA al 4% per almeno 20 min. Dopo questo passaggio i campioni sono lavati in PBT 1X 5 volte per 5 min.

## 2. Ibridazione della sonda.

Dopo i lavaggi in PBT, gli embrioni sono incubati a 65°C per un tempo di 2-5 ore in 300-400 µl di soluzione di pre-ibridazione HM (*Hybridization Mix*). La soluzione viene poi sostituita con 200 µl di HM contenente 100-200 ng di sonda antisenso a RNA marcata con digossigenina. L'incubazione a 65°C dura tutta la notte. La presenza di eparina e di tRNA nella miscela di ibridazione (HM) riduce i legami aspecifici della sonda.

### 2.3.2. Secondo giorno

#### 1. Lavaggi.

Dopo aver recuperato la soluzione di HM contenente la sonda, si eseguono una serie di lavaggi post-ibridazione a 65°C per rimuovere la sonda non legata a bersagli specifici:

- 100% HM per lavaggi, (lavaggio breve);
- 75% HM-25% 2X SSC per 15 min;
- 50% HM-50% 2X SSC per 15 min;
- 25% HM-75% 2X SSC per 15 min;
- 100% 2X SSC per 15 min;
- 100% 0,2X SSC per 15 min;
- 100% SSC 0,2X per 15 min a temperatura ambiente.

Attraverso una serie di passaggi a concentrazione crescente di PBT e decrescente di SSC 0,2X, eseguiti a temperatura ambiente, si riporta la soluzione al 100% di PBT:

- 75% 0,2X SSC-25% PBT per 10 min;
- 50% 0,2X SSC-50% PBT per 10 min;
- 25% 0,2 X SSC-75% PBT per 10 min;
- 100% PBT per 15 min.

#### 2. Legame dell'anticorpo.

Gli embrioni vengono poi incubati a temperatura ambiente per 2-5 ore con una soluzione di PBT contenente siero di pecora al 2% e 2 mg/ml di BSA (*albumine bovine serum*). La soluzione viene rimossa e gli embrioni vengono incubati con anticorpo anti-digossigenina-AP, coniugato con la fosfatasi alcalina (Roche), diluito 1:3.000 in PBT contenente siero di pecora al 2% e 2 mg/ml di BSA. L'enzima fosfatasi alcalina ha proprietà cromogene se fornito del substrato appropriato. La reazione anticorpale è condotta in agitazione O/N alla temperatura di 4°C.

### 2.3.3. Terzo giorno

#### 1. Colorazione.

Il giorno successivo la soluzione con l'anticorpo viene recuperata e gli embrioni sono lavati 6 volte per 15 min in PBT a temperatura ambiente per rimuovere l'anticorpo non legato alla sonda. Gli embrioni vengono quindi lavati 3 volte per 5 min usando la soluzione di colorazione specifica per il substrato che verrà utilizzato. In questo modo l'ambiente viene reso adeguato al tipo di enzima coniugato con l'anticorpo.

I campioni sono poi trasferiti in un vetrino da orologio e la soluzione di colorazione viene sostituita con una soluzione contenente il substrato per la reazione enzimatica. Il substrato utilizzato per la fosfatasi alcalina è l'NBT/BCIP (*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt*) che forma un precipitato di colore blu. La reazione viene condotta al buio e a temperatura ambiente. Per monitorare la reazione colorimetrica è necessario osservare gli embrioni al microscopio da dissezione ogni 10-15 min, fino al raggiungimento dell'intensità di colorazione desiderata. La colorazione viene fermata con due lavaggi in PBT (2 per 5 min) e fissata in PFA al 4% a 4°C O/N.

## 2.4. Soluzioni

### **Soluzione di ibridazione (HM), 100 ml di soluzione:**

60% formammide  
460 µl Acido citrico(1M) pH 6  
25 ml SSC 20X  
0,1% Tween-20  
100 µl 50 mg/ml eparina  
1 ml 50 mg/ml tRNA

### **Soluzione di ibridazione per lavaggi:**

HM senza tRNA ed eparina

### **PFA:**

4% PFA in 1X PBS

### **SSC (20X), 1 L di soluzione:**

175 g di NaCl  
88,2 g citrato sodico

Portare a volume con H<sub>2</sub>O trattata con DEPC a pH 7 e autoclavare

**PBS (1X), 0,1M:**

8 g di NaCl

0,2 g di KCl

1,15 g di Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O

0,25 g di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Portare a volume con H<sub>2</sub>O mQ a pH 7,4

**PBT:**

1X PBS

0,1% *Tween-20*

**Soluzione di colorazione per fosfatasi alcalina:**

100 mM Tris-HCl pH 9,5

50 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM NaCl

0,1% *Tween-20*

**Soluzione di colorazione per fosfatasi alcalina con NBT/BCIP:**

3,4 µl NBT (100 mg/ml)

3,5 µl BCIP (50 mg/ml)

in soluzione di colorazione

## **2.5. Preparazione degli embrioni per la microscopia ed acquisizione delle immagini**

La seguente procedura viene utilizzata per rimuovere l'eccesso di colorazione e rendere trasparente il tuorlo degli embrioni che potrebbe altrimenti disturbare l'osservazione degli embrioni al microscopio:

- La PFA 4% viene sostituita con PBT.
- Si eseguono lavaggi con concentrazioni crescenti di metanolo e decrescenti di PBT fino ad arrivare al metanolo assoluto.
- Si fanno tre lavaggi da 5 minuti con metanolo assoluto.
- Si sostituisce il metanolo assoluto con la miscela BB/BA 2:1 (benzil benzoato/alcol benzilico); questa soluzione è fotosensibile quindi le provette da 2 ml contenenti gli embrioni devono essere mantenute al buio.

- La miscela BB/BA 2:1 va lasciata agire per circa 1 h, al termine della quale viene rimossa e sostituita con metanolo assoluto.
- Si eseguono 3 lavaggi da 5 minuti in metanolo assoluto.
- Si procede la reidratazione graduale degli embrioni con soluzioni a concentrazione crescente di PBT e decrescente di metanolo.

Si eseguono i passaggi in soluzioni a concentrazione crescente di glicerolo in PBT (30%, 50%, 70% e 90%). Una volta posti gli embrioni in glicerolo 90% è possibile osservarli al microscopio e quindi fotografarli posizionandoli su un vetrino a depressione. L'osservazione avviene attraverso un microscopio *Leica DMR* ed è possibile ottenere le fotografie utilizzando una fotocamera digitale *Leica DC500* montata su un microscopio *Leica DMR*. Le immagini ottenute vengono infine elaborate con il programma *Adobe Photoshop CS5*.



### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

La linea transgenica preparata nel laboratorio di Endocrinologia comparata dove ho svolto il mio tirocinio è stata utilizzata per visualizzare le strutture (organi e/o tessuti) coinvolti nella risposta al picco circadiano di glucocorticoidi. Nello stesso tempo questo tipo di analisi ci ha permesso di verificare se la linea transgenica fosse sufficientemente sensibile da visualizzare variazioni endogene dell'ormone e non solo di rispondere a trattamenti esogeni. La linea transgenica è infatti in grado di visualizzare gli organi o i tipi cellulari che rispondono alla presenza di glucocorticoidi endogeni e che sono rappresentati, già a 2dpf, da fegato, pancreas e intestino, vescicole otiche, cellule mesenchimali del derma, cellule della lamina del pavimento del tubo neurale, bulbi olfattori, ipofisi, pronefro, cristallino. A 5 giorni dalla fecondazione, l'espressione è sempre presente in queste strutture e a queste si aggiungono anche il cuore, il pancreas e l'intestino (Benato *et al.*, inviato). Il trattamento con glucocorticoidi o molecole analoghe determina un aumento del segnale e l'identificazione di nuovi siti di risposta quali ghiandola pineale.

Gli esperimenti eseguiti nell'ambito di questo tirocinio hanno cercato di verificare la capacità di questa linea di rispondere a variazioni degli ormoni glucocorticoidi endogeni e per far questo abbiamo deciso di analizzare la risposta al picco circadiano dei glucocorticoidi e non le variazioni indotte da una situazione di stress.

Per questo esperimento abbiamo usato embrioni derivanti da un incrocio tra maschi transgenici eterozigoti con femmine *wild type*. La progenie è stata analizzata al microscopio a fluorescenza per selezionare solo gli embrioni che avevano ereditato il transgene.

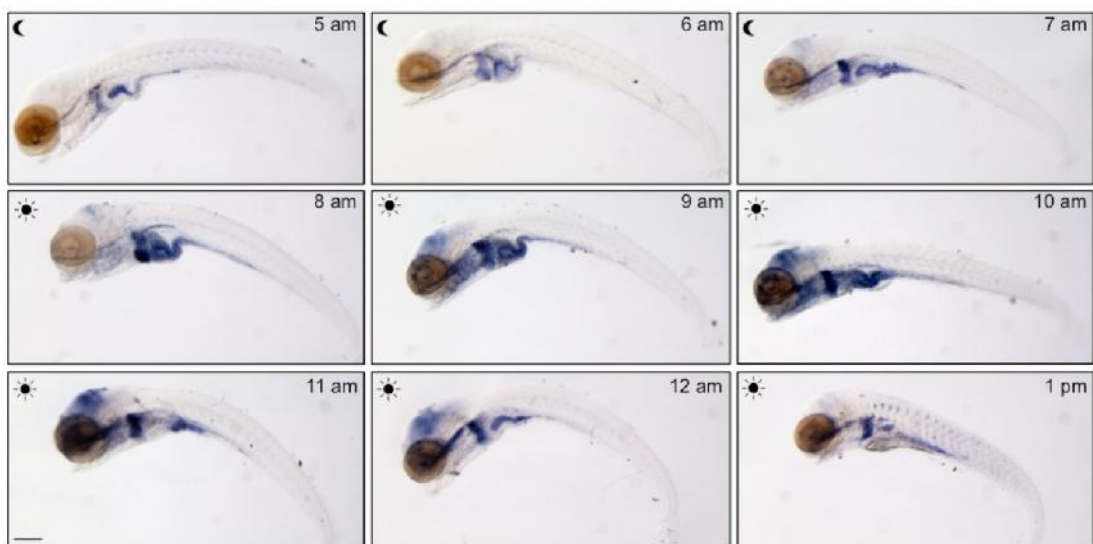
Gli embrioni selezionati sono stati sottoposti ad un regime standard di fotoperiodo con 14 ore di luce e 10 ore di buio con luce che viene accesa ogni giorno alle ore 8 e spenta alle ore 22.

Il quinto giorno dopo la fecondazione dalle capsule sono stati prelevati embrioni a intervalli di 1 ora, partendo da 3 ore prima dell'accensione della luce (ovvero alle 5 di mattina) fino alle 13 (9 prelievi diversi). L'esperimento è stato ripetuto 3 volte.

Gli embrioni di ogni esperimento sono stati quindi analizzati mediante ibridazione *in situ* con una sonda marcata con digossigenina e complementare agli mRNA della GFP. La colorazione risultante alla fine del procedimento ha messo in evidenza gli organi che sono bersagli specifici del picco circadiano di glucocorticoidi.

Come è possibile vedere nella figura 6 abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

- Tra le ore 5 e 6 il segnale è già presente ma si mantiene basso e limitato al tratto digerente.
- Tra le ore 7 e 8, ovvero poco prima e nel momento di accensione della luce, il segnale presente nel tratto digerente si intensifica notevolmente, rendendo bene visibile il fegato e l'intestino. In queste sedi il segnale rimane molto forte fino alle ore 11 con un picco di intensità alle ore 10.
- A livello degli occhi e della testa il segnale è completamente assente almeno fino alle ore 6. Dalle ore 7 in poi il segnale in queste sedi diventa via via più intenso fino alle ore 11, quando inizia nuovamente a diminuire fino a scomparire alle ore 13.
- Alle ore 13 il segnale a livello della testa non è più evidente ed è anche estremamente ridotto lungo il tratto gastro-intestinale.



**Fig 7.** Espressione dell'mRNA per la GFP nella linea transgenica Tg(9xGCREHSV.UI23:EGFP)ia20 come messo in evidenza mediante analisi di *whole mount in situ hybridization* su larve di zebrafish (5 dpf) mantenute con un regime standard di fotoperiodo. Figura da: Benato *et al.*, inviato a *Endocrinology*.

È importante sottolineare che la visualizzazione del segnale non corrisponde esattamente al probabile picco dei glucocorticoidi, ma è ritardata rispetto ad esso del tempo necessario perché l'ormone arrivi al recettore, si leghi, venga trasportato nel nucleo e promuova la trascrizione dell'mRNA per la GFP.

La validità di questi risultati è stata confermata (Benato *et al.*, inviato) mediante real time PCR eseguita sui trascritti per la *GFP* e per il gene *Fkbp5*, un marcatore dell'attività dei glucocorticoidi (Jääskeläinen *et al.*, 2002). L'analisi è stata

condotta alle ore 5, 8 e 11 di mattina (Fig. 7). I livelli di espressione alle ore 5 sono stati tenuti come livello di base e posti uguale ad 1.

Con la real time PCR si è potuto confermare l'aumento del livello di trascrizione del gene *GFP* che coincide con l'accensione della luce e corrisponde all'intensificazione del segnale visto con l'ibridazione *in situ*. Alle ore 11 si assiste ad una diminuzione dei livelli di trascrizione, in parallelo con la diminuzione del segnale dell'ibridazione *in situ*. I livelli di trascrizione del gene *Fkbp5*, che rappresentano il segnale dell'attività dei glucocorticoidi non sul transgene ma sul genoma dello zebrafish, mostrano lo stesso andamento della trascrizione del gene *GFP* confermando la bontà dei risultati ottenuti.

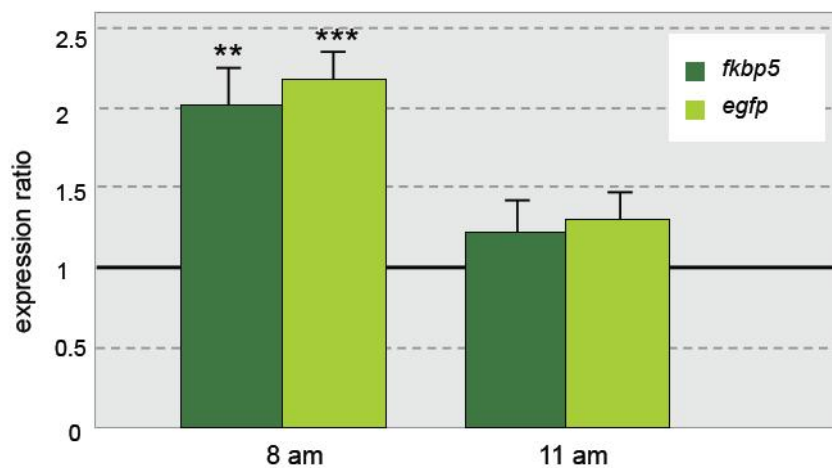


Fig. 8. Benato et al., inviato a Endocrinology

In conclusione queste analisi hanno confermato la possibilità di questa linea transgenica di rispondere alle variazioni endogene dei glucocorticoidi. L'mRNA della proteina GFP è stato rilevato negli organi dell'apparato gastro-intestinale e nel cervello.

Nei ratti è stato dimostrato che i glucocorticoidi hanno la funzione di far maturare le cellule del tratto intestinale inducendo la formazione di giunzioni strette, lo sviluppo di microvilli, la riorganizzazione del reticolo endoplasmatico e del Golgi, e la regolazione del ciclo cellulare (Quaroni et al., 1999).

Sulla base di questi dati, i risultati ottenuti portano ad ipotizzare che i glucocorticoidi agiscano sull'attivazione di fegato e apparato digerente subito prima dell'accensione della luce, permettendo allo zebrafish, animale diurno, di prepararsi all'assorbimento e alla digestione dei nutrienti.

Questa attivazione pre-metabolica dell'apparato digerente nonché la segnalazione a livello di occhi e cervello, è probabilmente una risposta alla necessità

dell'organismo di attivare e preparare gli organi che serviranno, durante il giorno per la cattura del cibo e per la digestione ed assorbimento dei nutrienti.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler A. J., Danielsen M., Robins D. M. (1992). Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptors factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 11660-11663.
- Balsalobre A., Brown S.A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H.M., Schutz G., Schibler U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289, 2344-2347.
- Benato F., Colletti E., Skobo T., Moro E., Colombo L., Argenton F., Dalla Valle L. (2013). A living biosensor model to dynamically trace glucocorticoid signaling during development and adult life in zebrafish. *Inviato a Endocrinology*.
- Cahill G. M. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res*, 309, 27–34.
- Dickmeis T., Foulkes N. S. (2011). Glucocorticoids and circadian clock control of cell proliferation: At the interface between three dynamic systems. *Mol Cell Endocrinol*, 331,11–22.
- Engeland W. C., Arnhold M. M. (2005). Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine*, 28(3), 325–331.
- Hastings M., O’Neill J. S., Maywood E. S. (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol*, 195, 187–198.
- Hill A. J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science*, 86(1), 6-19.
- Jääskeläinen I., Makkonen H., Palvimo J.J. (2011) Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling. *Curr Opin Pharmacol*, 11, 326-331
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.
- Lahiri K., Vallone D., Gondi S. B., Santoriello C., Dickmeis T., Foulkes N. S. (2005) Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLOS Biology*, 3, (11), e351.

- Li Y., Li G., Wang H., Du J., Yan J. (2013). Analysis of a Gene Regulatory Cascade Mediating Circadian Rhythm in Zebrafish. *PLOS Comput Biol*, 9, (2), e1002940.
- Nader N., Chrousos G. P., Kino T. (2010). Interactions of the Circadian CLOCK System and the HPA Axis. *Trends Endocrinol Metab*, 21(5), 277–286.
- Noche R. R., Lu P., Goldstein-Kral L., Glasgow E., O Liang J. (2011). Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci*, 12, 7.
- Oster H., Damerow S., Kiessling S., Jakubcakova V., Diya Abraham D., Tian J., Hoffmann M. W., Eichele G. (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab*, 4, 163–173.
- Quaroni A., Tian J. Q., Goke M., Podolsky D. K. (1999). Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol*, 277, G1027-G1040.
- Reddy A. B., Maywood E. S., Karp N. A., King V. M., Inoue Y., Gonzalez F. J., Lilley K. S., Kyriacou C. P., Hastings M. H. (2007) Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology*, 45(6), 1478-88.
- So A. Y.-L., Bernal T. U., Pillsbury M. L., Yamamoto K. R., Feldman J. B. (2009). Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *PNAS*, 106, (42), 17582-17587.
- Vatine G., Vallone D., Gothilf Y., Foulkes N. S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett*, 585, 1485–1494.
- Weger M., Weger B. D., Diotel N., Rastegar S., Hirota T., Kay S. A., Strähle U., Dickmeis T. (2013). Real-time in vivo monitoring of circadian E-box enhancer activity: A robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Developmental Biology*, 380, 259-273.