

**UNIVERSITA' DI PISA**  
**Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali**  
**Corso di Laurea in Neurobiologia – Curriculum Molecolare**

**Tesi di Laurea Specialistica**  
**Anno Accademico 2008-2009**



**Generazione di fotorecettori a partire da cellule pluripotenti della calotta  
animale di *Xenopus laevis* tramite sovraespressione di *noggin* e *Xotx5***

Candidato:  
**Michele Bertacchi**

Relatori:  
**Prof. Robert Vignali**  
**Dott.ssa Simona Casarosa**

## SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b>	5
<b>INTRODUZIONE</b>	8
<i>La neurulazione e lo sviluppo del SNC nei Vertebrati</i>	8
<i>Morfogenesi dell'occhio dei Vertebrati: lo sviluppo della retina</i>	9
<i>Struttura della retina matura</i>	10
<i>Le molecole dell'induzione neurale</i>	12
<i>Noggin nei Vertebrati superiori</i>	14
<i>Competenza, specificazione e differenziamento del tessuto retinico</i>	16
<i>Il campo morfogenetico dell'occhio (eye field) e i geni di specificazione delle cellule staminali retiniche</i>	17
<i>La retinogenesi: lo sviluppo dei tipi cellulari retinici nell'anfibio <i>Xenopus laevis</i></i>	22
<i>    Specificazione del destino cellulare</i>	25
<i>Controllo trascrizionale e traduzionale dei fattori homeobox <i>Xotx5</i>, <i>Xotx2</i> e <i>Xvsx1</i></i>	27
<i>Degenerazioni retiniche: la Retinite pigmentosa</i>	29
<i>Terapia cellulare</i>	29
<i>Cellule staminali embrionali: parallelismi tra cellule ES di mammifero e cellule di animal cap di <i>Xenopus laevis</i></i>	31
<i>    Sviluppo precoce del topo e caratteristiche delle cellule ES</i>	31
<i>    Sviluppo precoce di <i>Xenopus</i> e caratteristiche delle "Xenopus animal cap embryonic stem cells" (cellule ACES)</i>	32
<i>Induzione di destino retinico in cellule di animal cap di <i>Xenopus laevis</i> mediante sovraespressione di noggin</i>	35
<i>Effetti della sovraespressione di noggin in cellule di animal cap di <i>Xenopus laevis</i> in vitro</i>	35
<i>Saggio di recupero mediante trapianto in vivo di animal cap di <i>Xenopus laevis</i></i>	38
<i>Obiettivi della tesi</i>	41
<b>MATERIALI e METODI</b>	42
<i>Plasmide pCS2+ e cloni utilizzati</i>	42
<i>Trasformazione batterica per shock termico</i>	43
<i>Trattamento dei batteri trasformati: piastratura, preinoculo e inoculo</i>	43
<i>Estrazione e purificazione di DNA plasmidico su media scala mediante colonne NUCLEOBOND ("Midi-prep")</i>	44
<i>Elettroforesi su gel di agarosio</i>	46
<i>Determinazione della concentrazione e della qualità del materiale nucleotidico mediante lettura allo spettrofotometro</i>	47

<i>Linearizzazione di plasmidi per trascrizione di sonde antisenso o di mRNA senso</i>	47
<i>Purificazione di acidi nucleici: estrazione fenolica e precipitazione alcolica</i>	48
<i>Purificazione di acidi nucleici con kit SIGMA</i>	49
<i>Trascrizione di sonde RNA antisenso marcate con DIG-11-UTP</i>	49
<i>Trascrizione in vitro dell'mRNA da microiniettare (mMESSAGE mMACHINE Ambion)</i>	50
<i>Raccolta degli embrioni di Xenopus laevis</i>	51
<i>Allevamento e cura dei girini; riconoscimento degli stadi di sviluppo</i>	52
<i>Microiniezione di embrioni di Xenopus laevis</i>	53
<i>Espianti ectodermici ("animal cap") ed esperimenti di trapianto</i>	54
<i>Istologia</i>	54
<i>Fissazione, disidratazione e inclusione di materiale biologico</i>	54
<i>Taglio di sezioni al criostato</i>	56
<i>Inclusione in paraffina e taglio di sezioni al microtomo</i>	56
<i>Colorazione istologica con Ematossilina-Eosina</i>	57
<i>Ibridazione in situ su sezione</i>	58
<i>Rivelazione immunoistochimica</i>	60
<i>Acquisizione di immagini al microscopio e successiva elaborazione</i>	61
<i>Estrazione di RNA totale con "TRIzol Reagent"</i>	61
<i>Trattamento con DNasi sull'RNA estratto</i>	62
<i>Retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA</i>	63
<i>Real Time q-PCR</i>	63
<i>Real Time q-PCR: analisi dei dati</i>	65
<i>Elettrofisiologia</i>	67
<b>RISULTATI</b>	<b>71</b>
<hr/>	
<i>Indagine sulla funzionalità degli occhi derivanti da trapianto: obiettivi e piano sperimentale generale</i>	71
<i>Dissezione di retine da occhi di girini st. 46/47</i>	72
<i>Dissociazioni meccaniche e/o enzimatiche per l'ottenimento di fotorecettori, da analizzare con la tecnica del patch-clamp perforato o whole-cell</i>	73
<i>Dissociazione meccanica mediante "pipettamento".</i>	74
<i>Dissociazione enzimatica con Papaina.</i>	76
<i>Tecnica del patch-clamp in configurazione perforata o whole-cell</i>	77
<i>Registrazione di correnti voltaggio-dipendenti</i>	78
<i>Preparazione di frammenti di retina da utilizzare nella tecnica della suzione del segmento esterno</i>	80
<i>Registrazione di risposte alla luce con tecnica della suzione del segmento esterno</i>	82
<i>Altre evidenze sulla funzionalità degli occhi derivanti da trapianto</i>	83

<i>Indagine sulle potenzialità di Xotx5 nell'indurre un differenziamento fotorecettoriale: obiettivi e piano sperimentale generale</i>	86
<i>Trascrizione di mRNA Xotx5 in vitro</i>	87
<i>Saggio di attività biologica e scelta della quantità da microiniettare per Xotx5 mRNA trascritto in vitro</i>	88
<i>Microiniezione di Xotx5 assieme a noggin</i>	91
<i>Analisi del differenziamento cellulare degli animal cap: tecniche utilizzate e parametri valutati</i>	92
<i>Analisi qualitativa del differenziamento tramite immunostochimica anti-opsina e ibridazione in situ anti-IRBP</i>	93
<i>Conteggio di cellule opsina-positive</i>	98
<i>Analisi quantitativa del differenziamento tramite Real Time RT-PCR: Estrazione di RNA totale, Retrotrascrizione e Real Time PCR</i>	100
<i>Analisi del livello di espressione di Opsina, NRL, Xotx2 e Xotch</i>	103
 <i>Appendice</i>	 111
 <b>DISCUSSIONE</b>	 112
 <i>Il ruolo di Noggin: induttore neurale generico o specifico induttore retinico?</i>	 112
<i>Noggin determina l'acquisizione di un destino retinico in cellule staminali embrionali multipotenti, tramite un programma di sviluppo ancora da chiarire</i>	113
<i>Noggin e Xotx5 come fattori di differenziamento di cellule staminali multipotenti, da utilizzare nella terapia cellulare sostitutiva</i>	114
<i>Indagine sulla funzionalità degli occhi derivanti da trapianto: conclusioni e implicazioni</i>	115
<i>I modelli animali più vicini all'uomo: prospettive future</i>	116
<i>Differenziamento cellulare e morfogenesi: considerazioni sul ruolo di Xotx5 nel facilitare l'organizzazione morfologica della retina</i>	116
 <b>Bibliografia</b>	 118
 <i>Lei Lan, Antonio Vitobello, Michele Bertacchi, Massimiliano Andreazzoli, Federico Cremisi, Robert Vignali, Gian Carlo Demontis, Giuseppina Barsacchi, Simona Casarosa. <b>Noggin elicits retinal fate in Xenopus animal cap embryonic stem cells.</b> Stem cells, (2009).</i>	125
 <b>Ringraziamenti</b>	 126

## RIASSUNTO

La retina dei Vertebrati è l'organo di senso deputato alla trasduzione del segnale luminoso. Istologicamente, la retina presenta una tipica organizzazione trilaminare: lo strato nucleare esterno, contenente i fotorecettori, lo strato nucleare interno, contenente cellule bipolari, orizzontali, amacrine e cellule della glia di Müller, e lo strato di cellule gangliari, che con i loro assoni costituiscono il nervo ottico. Le malattie degenerative della retina, come la Retinite pigmentosa, portano alla graduale perdita della vista mediante l'attuazione di un programma multifasico di morte cellulare e di perdita dell'organizzazione trilaminare retinica. Tale neurodegenerazione potrebbe essere efficacemente contrastata con una terapia basata sulla "sostituzione cellulare", cioè sul trapianto in organo di cellule staminali o progenitori capaci di sostituire le cellule in degenerazione dell'ospite. Tale approccio richiede anzitutto una fase di differenziamento *in vitro* di cellule staminali multipotenti, al fine di ottenere cellule indirizzate verso un destino retinico, capaci di integrarsi nel tessuto ospite e differenziarsi in tutti i sottotipi cellulari affetti dalla degenerazione.

*Xenopus laevis* rappresenta un buon modello per lo studio della funzione genica e dello sviluppo dell'occhio. I suoi embrioni possono essere microiniettati durante le prime fasi di sviluppo con RNA messaggeri trascritti *in vitro*. Successivamente, allo stadio di blastula, gli emisferi animali (*animal cap*), ai quali compete un destino epidermico se non diversamente trattati, possono essere asportati e coltivati in soluzione salina. Ciò consente di utilizzare queste cellule come materiale biologico di partenza per saggi di differenziamento, dove la sovraespressione di geni coinvolti nella specificazione di tipi cellulari retinici può istruire le cellule dell'*animal cap* e indirizzarle verso un particolare destino.

Nel laboratorio dove ho svolto il mio internato di tesi da molti anni si studiano i meccanismi molecolari del differenziamento retinico nell'anfibio *Xenopus laevis*. Diversi fattori di trascrizione di tipo homeobox, come *Xotx5*, *Xotx2* e *Xvsx1*, sono importanti per il differenziamento di specifici neuroni retinici. La trascrizione e la traduzione dei geni sopraelencati vengono finemente regolate nel tempo e nello spazio all'interno della retina di *Xenopus*. Esperimenti di trasfezione *in vivo* hanno dimostrato che *Xotx5* promuove il destino di fotorecettori, mentre *Xotx2* e *Xvsx1* promuovono entrambi il destino bipolare.

Più recentemente è stato evidenziato il ruolo di *noggin* nell'indurre un destino retinico in cellule embrionali multipotenti, quali le cellule staminali embrionali della calotta animale (ACES). L'iniezione di mRNA di *noggin* determina l'espressione di marcatori terminali di differenziamento retinico in cellule animali (*animal cap cells*) della blastula di *Xenopus*, coltivate *in vitro*.

In seguito a trapianto *in vivo*, cellule della calotta animale esperimenti alte dosi di *noggin* formano occhi ben sviluppati, sia quando trapiantate nella regione presuntiva dell'occhio sia

quando inserite in posizione ectopica posteriore, anche se negli occhi derivanti dai trapianti posteriori non si ha mai la formazione del cristallino.

Lo scopo del mio lavoro di tesi è stato duplice:

- Innanzitutto mi sono occupato di verificare la funzionalità degli occhi derivati da trapianto di *animal cap* iniettati con *noggin* mRNA. Questo è stato realizzato con tecniche di elettrofisiologia, quali *patch-clamp* e registrazione di risposta alla luce. In particolare, ho effettuato trapianti di *animal cap in vivo*, rimuovendo metà del campo morfogenetico dell'occhio di embrioni di *Xenopus* a stadio di neurula (st. 15) e sostituendolo con *animal cap* iniettati con *noggin* mRNA. Ho quindi allevato i girini, sia *wild type* (WT) di controllo che animali sottoposti a trapianto, fino a stadi tardivi: da questi ho recuperato gli occhi a stadio di sviluppo 46/47 tramite dissezione sotto luce infrarossa o rossa; ho poi ripulito gli occhi da epitelio pigmentato e cristallino, e ho infine ridotto il materiale in frammenti adatti all'applicazione di tecniche di elettrofisiologia, dissociando o meno le cellule con opportuni enzimi a seconda delle esigenze. Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con il Prof. Gian Carlo Demontis<sup>1</sup>, che ha effettuato le registrazioni elettrofisiologiche. La tecnica del *patch-clamp* perforato è servita a verificare la presenza di canali voltaggio-dipendenti caratterizzanti i fotorecettori, mentre la suzione del segmento esterno è stata il punto di partenza per la registrazione di risposte a lampi di luce con lunghezza d'onda di 520 nm (adatta alla stimolazione dei bastoncelli).
- Inoltre, nel mio lavoro di tesi ho anche indagato sulla potenzialità di *Xotx5* nell'indurre un differenziamento fotorecettoriale. Senza la compresenza di altri fattori implicati nel differenziamento retinico, l'azione della sola proteina Noggin induce un differenziamento retinico generale, dove la calotta animale risulta arricchita di popolazioni cellulari corrispondenti ai vari tipi retinici dell'occhio WT. Mi sono occupato quindi di analizzare se la microiniezione di *noggin* + *Xotx5* fosse in grado di indirizzare le cellule della calotta animale non più verso destini retinici generali bensì verso lo specifico destino di fotorecettore. Tecniche quali ibridazione *in situ*, immunisto chimica e PCR quantitativa *Real Time* hanno consentito di analizzare il differenziamento cellulare avvenuto all'interno degli *animal cap*.

Per quanto riguarda la prima parte del mio lavoro, l'analisi dei risultati ha mostrato notevole somiglianza di funzionamento e differenziamento tra fotorecettori WT e fotorecettori derivanti da occhi trapiantati: in entrambi i casi viene espresso in membrana lo stesso set di canali ionici e si riscontrano risposte alla luce equivalenti. Inoltre la circuiteria retinica è perfettamente funzionante nel recepire e trasdurre, attraverso neuroni di secondo ordine, lo stimolo luminoso captato *in primis* dai fotorecettori.

---

<sup>1</sup> Dipartimento di Psichiatria, Neurobiologia, Farmacologia e Biotecnologie, Università di Pisa.

I risultati ottenuti durante la seconda parte del mio internato di tesi, invece, hanno mostrato come la coiniezione di *Xotx5* con alte dosi di *noggin* determini un aumento di espressione del gene opsina, marcatore di fotorecettori terminalmente differenziati, oltre a un aumento percentuale di cellule opsina-positive e alla facilitazione dell'organizzazione di tali cellule in strati ordinati. Ciò candida *Xotx5* come possibile fattore di differenziamento da impiegare in associazione a *noggin* per l'ottenimento di fotorecettori *in vitro*, da utilizzarsi in protocolli di terapia cellulare sostitutiva.