



Università di Pisa
Facoltà di scienze fisiche, matematiche e naturali

Laurea magistrale in biologia molecolare e cellulare

**Studio del ruolo del gene *xpdzrn3* nello sviluppo del
pronefro di *Xenopus laevis***

RELATORI

D.ssa. **Silvia Marracci**

Prof.ssa. **Luciana Dente**

CANDIDATO

Alberto Vangelisti

*Ai miei genitori,
ai miei amici e a Lara,
a Silvia e Luciana,
grazie.*

Riassunto

Il gene *pdzrn3* (PDZ domain containing ring finger 3) codifica per una proteina contenente domini specializzati per mediare le interazioni con altre proteine: un dominio RING finger coinvolto in attività ubiquitinasi di tipo E3 e due domini PDZ. La sua sequenza è conservata in tutti i Vertebrati. Nel topo è espresso nel sistema nervoso centrale (SNC), nella regione del cuore, nei muscoli scheletrici, nel fegato e nel rene. Finora, i dati presenti in letteratura mettono in evidenza un ruolo di *pdzrn3* nello sviluppo muscolare, in particolare nella rigenerazione dopo lesione, e nella plasticità sinaptica del SNC.

L'obiettivo della mia tesi è quello di studiare la funzione di *pdzrn3* nello sviluppo del rene; per comprendere la funzione di questo gene abbiamo utilizzato come organismo modello *Xenopus laevis* poichè possiede un rene embrionale molto semplice chiamato pronefro.

Nei Vertebrati il pronefro è il rene primitivo embrionale che, durante le fasi precoci di sviluppo, svolge sia la funzione escretoria sia la funzione di regolazione omeostatica degli ioni, fatta eccezione per gli embrioni dei mammiferi che possiedono un pronefro non funzionale. Negli anamni il pronefro sarà sostituito dal rene adulto chiamato mesonefro, mentre negli amnioti subirà un successivo sviluppo nel metanefro. Il pronefro si origina a partire dal mesoderma ed è costituito da tre componenti principali: il glomus, i tubuli e il dotto. Il glomus, che costituisce la porzione vascolare, ha la funzione di filtrare dalla circolazione gli scarti prodotti dall'organismo che poi verranno riversati nella cavità celomatica adiacente. I tubuli, che si originano a partire dal mesoderma laterale intermedio, hanno il compito di riassorbire dal celoma, tramite i nefrostomi, soluti organici e ioni, rilasciando invece nel dotto pronefrico i prodotti di rifiuto che verranno escreti tramite la cloaca. Grazie alla sua organizzazione anatomica il pronefro può essere considerato come l'unità funzionale minima del rene.

In *Xenopus laevis*, il pronefro si forma a partire dallo stadio embrionale 12,5 (gastrula tardiva) ed è completamente funzionale a stadi embrionali più tardivi (stadio 37-38).

L'analisi di espressione del gene *xpdzrn3* (l'omologo di *pdzrn3* di *Xenopus*) durante lo sviluppo, mostra un segnale specifico a livello di differenti regioni embrionali; già a partire dagli stadi più precoci analizzati (stadio 22-23) risulta espresso a livello dei somiti e del territorio presuntivo dell'occhio. Embrioni a stadio 23 mostrano inoltre espressione di *xpdzrn3* a livello delle isole ematiche e nel territorio presuntivo di formazione del pronefro. Stadi più tardivi (fino a stadio 37-38), mostrano, oltre alle regioni embrionali sopra riportate, un segnale specifico anche in alcune regioni del SNC, nella regione dell'occhio, negli archi branchiali, nel pronefro e nella cloaca.

Sono stati effettuati esperimenti di perdita di funzione utilizzando un oligonucleotide "morpholino" diretto contro una regione di mRNA di *xpdzrn3*, lungo circa 20 nucleotidi contenente il codone di inizio traduzione "ATG". Il morpholino Mo-*xpdzrn3*, avente funzione di reprimere la traduzione di *Xpdzrn3*, è stato iniettato in embrioni a stadio di 2 cellule a livello della zona marginale, che è la zona presuntiva di formazione mesodermica. Gli embrioni iniettati sono stati ibridati tramite l'uso di alcuni marcatori pronefrici.

A stadio 37-38, abbiamo osservato un'alterazione del "looping" dei tubuli prossimali e del posizionamento nefrostomico, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo, messa in

evidenza dai geni *pax8*, *hnf1 β* e dal marcatore pan-pronefrico *Na⁺/K⁺ ATPase*. A stadio 22-23 i marcatori precoci del pronefro, *pax8* e *hnf1 β* , mostrano un'alterazione del loro dominio di espressione nell'area presuntiva di formazione del pronefro in seguito a iniezione di morfolino diretto contro *xpdzrn3*. Esperimenti di controllo effettuati con un morfolino "standard" disegnato su una sequenza umana non omologa a *Xenopus*, non hanno evidenziato alcuna significativa alterazione fenotipica a livello del pronefro, indicando la specificità dei fenotipi ottenuti con Mo-*pdzrn3*. Inoltre i saggi di "rescue", effettuati utilizzando il trascritto *pdzrn3* di *Danio rerio*, hanno evidenziato il recupero delle alterazioni osservate con i marcatori sopra citati.

In conclusione possiamo sostenere che *xpdzrn3* ha un'espressione regolata e dinamica durante lo sviluppo del pronefro di *Xenopus*. Con i dati ottenuti dagli esperimenti di "loss of function" ipotizziamo un ruolo di *xpdzrn3* nella regolazione dello sviluppo precoce del pronefro (st. 22-23) e, a stadi più tardivi (st. 37-38), un possibile coinvolgimento di questo gene nello sviluppo delle anse prossimali dei tubuli pronefrici.

Sommario

1. Introduzione	7
<hr/>	
1.1. Struttura del gene <i>pdzrn3</i>.	7
1.2. Struttura del pronefro di <i>Xenopus laevis</i>.	11
1.3. Formazione e sviluppo del pronefro di <i>Xenopus laevis</i>	14
1.3.1. Sviluppo dell'area presuntiva del pronefro	16
1.3.2. Sviluppo del glomus	20
1.3.3. Sviluppo dei tubuli	21
1.3.4. Sviluppo del dotto	24
2. Scopo della tesi	25
<hr/>	
3. Materiali e metodi	26
<hr/>	
3.1. Trattamento degli embrioni di <i>Xenopus</i>	26
3.2. Iniezioni di morfolino ed esperimenti di "rescue"	27
3.3. Colorazione degli embrioni mediante aggiunta del substrato dell β-galattosidasi	29
3.4. Ibridazione in situ "whole -mount"	30

3.5. Inclusione in paraffina per taglio al microtomo	33
3.6. Colorazione delle sezioni in DAPI	33
4. Risultati	35
<hr/>	
4.1. Analisi dell'espressione genica di <i>xpdzrn3</i>	35
4.2. Esperimenti di “loss of function”	39
4.2.1. Analisi dei fenotipi mediante uso dei marcatori del pronefro	40
4.2.1.1. ibridazione con Na ⁺ /K ⁺ ATPase a stadio 37- 38	40
4.2.1.2. Ibridazione con <i>pax 8</i> a stadio 22-23, 37-38	43
4.2.1.3 ibridazione con <i>hnf1β</i> a stadio 2-23 e 37-38	46
4.2.1.4. Ibridazione con <i>nefrina</i> a stadio 37-38	48
4.2.1.5 Iniezioni di morfolino “standard”	50
4.3. Saggi di “rescue”	51
5. Discussione e conclusioni	54
<hr/>	
6. Referenze	59
<hr/>	

1. Introduzione

1.1. Struttura del gene *pdzrn3*

Il gene *pdzrn3* (*PDZ domain containing ring finger 3*) codifica per una proteina contenente due domini PDZ ed un dominio “Ring finger”. Il dominio “Ring finger”, presente nella porzione N-terminale, contiene specifici residui di cisteina in grado di chelare ioni bivalenti di Zinco. Al dominio “Ring finger” è stata associata un’azione di tipo ubiquitin-ligasica (Ko et al., 2006) I domini PDZ sono ripetuti in duplice copia e sono capaci di legarsi a differenti proteine che presentano un motivo proteico di consenso.

Nel nostro laboratorio è stato isolato un potenziale interattore di *Pdzrn3*: la proteina *Kidins220*, che è principalmente espressa nel sistema nervoso ed è coinvolta in meccanismi di neurogenesi e di differenziamento neuronale (Andreazzoli et al., 2011; Marracci et al., 2013).

Il gene *pdzrn3* mostra un elevato livello di conservazione nei Vertebrati. Esso fu inizialmente isolato mediante analisi bioinformatica dal confronto con *lnx3/semcap3*, a causa dell’alta similarità di sequenza con il gene *lnx1*, che codifica per una proteina con attività ubiquitin-ligasica di tipo E3, implicata nella regolazione del “pathway” di *notch* (Kato e Kato 2004; Ko et al., 2006) (Fig 1.).

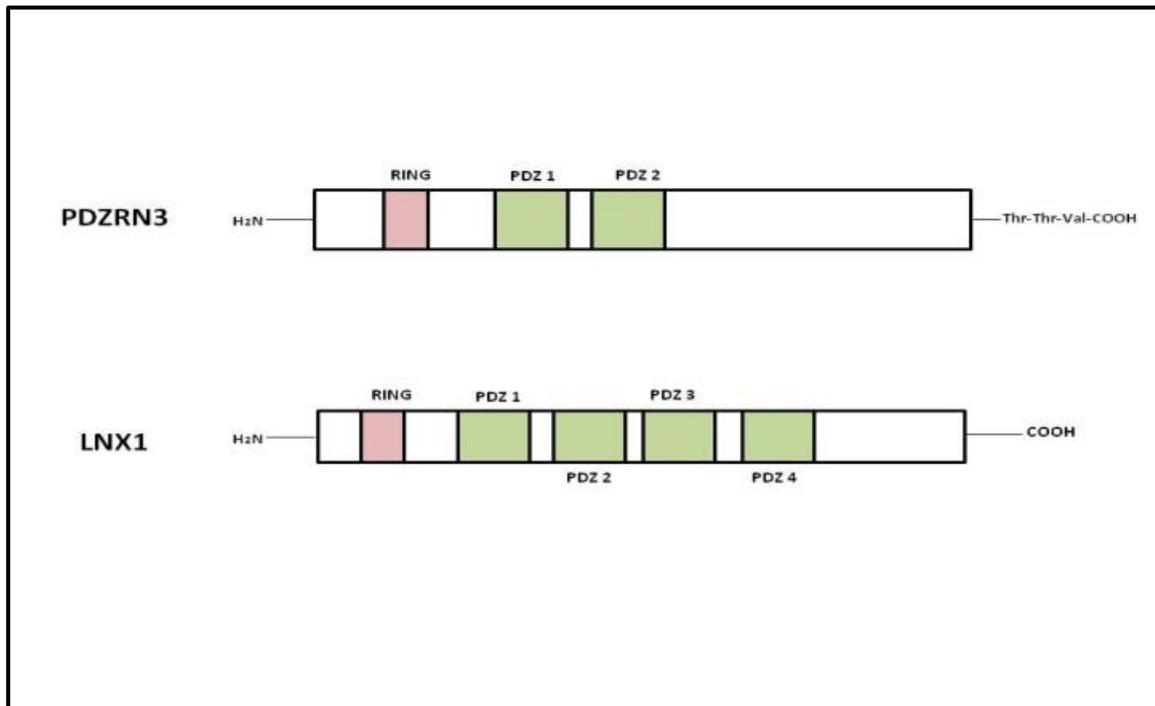


Fig1. Rappresentazione schematica delle proteine PDZRN3 e LNX1 di uomo. Entrambe contengono un dominio ring finger in posizione N-terminale. PDZRN3 contiene due domini PDZ, LNX1 ne possiede quattro. All'estremità C-terminale di PDZRN3 è presente un motivo di sequenza-legame a PDZ (Ko et al., 2006).

Nell' uomo *pdzrn3* viene principalmente espresso in differenti tessuti tra cui: muscolo scheletrico, fegato, cuore, cervello colon, intestino tenue, placenta e polmone (Ko et al., 2006). In *Danio rerio*, l'espressione del gene *pdzrn3* è stata osservata nel sistema nervoso centrale, nei somiti, nella notocorda, nella retina ventrale e nel dotto pronefrico (Dente et al., 2011). Dati preliminari, ottenuti nel nostro laboratorio prima dell'inizio del mio internato di tesi, hanno messo in evidenza una significativa espressione di *pdzrn3* nel pronefro di embrioni di *Xenopus laevis*, la cui analisi è stata successivamente approfondita con il mio lavoro sperimentale.

La funzione di *pdzrn3* è ancora poco conosciuta, tuttavia recenti studi hanno messo in evidenza un potenziale ruolo di questo gene nel differenziamento dei miociti. E' stato dimostrato in cellule in coltura C2C12, derivanti da precursori di miociti di topo, cresciute in condizioni tali da indurne il differenziamento da mioblasti a miotubi, che la

concentrazione di *Pdzrn3* aumenta con un profilo di espressione simile a quello della miogenina, mentre la relativa formazione di catene pesanti della miosina è più tardiva (Ko et al., 2006). Gli stessi autori hanno dimostrato che invece il silenziamento di *pdzrn3* porta alla mancata formazione dei miotubi. Inoltre, studi “in vivo” hanno messo in evidenza che durante la rigenerazione muscolare a seguito di ferite o danni muscolari, l’espressione di *pdzrn3* aumenta, suggerendo una sua implicazione nella miogenesi (Ko et al., 2006).

Sempre in colture cellulari è stato osservato che l’espressione di *pdzrn3* riesce a bloccare differenti “pathway” di sviluppo:

In colture cellulari C2C12, l’attivazione di BMP-2 mediante la via Wnt/ β catenina, inibisce la formazione di miociti, facendo invece differenziare queste cellule in osteoblasti. L’espressione di *pdzrn3* durante questo processo, inibisce il differenziamento in osteoblasti, attraverso l’inibizione del “signaling” Wnt- β catenina (Honda et al., 2010).

Il gene *pdzrn3* interviene anche nella regolazione del differenziamento di cellule in coltura in adipociti (Honda et al., 2013). L’espressione di *pdzrn3* nella linea cellulare di topo 3T3-L1, costituita da precursori di adipociti, è in grado di bloccare il differenziamento verso la via adipocitica stessa. In particolare, *pdzrn3* può regolare negativamente la concentrazione cellulare delle proteine STAT5b e C/EBP β , le quali attivano in modo sinergico il gene master-regolatore per l’adipogenesi, PPAR γ , bloccando di conseguenza questo pathway differenziativo (Honda et al., 2013).

Un ulteriore ruolo di *pdzrn3* è stato osservato nella plasticità sinaptica a livello di giunzione neuromuscolare. La proteina PDZRN3 è presente nelle giunzioni neuromuscolari di topo dove, a livello post-sinaptico, interagisce con MuSK, uno specifico recettore tirosin-chinasico, richiesto per la formazione della giunzione neuromuscolare. Saggi biochimici

dimostrano che PDZRN3 promuove l'ubiquitinazione di MuSK, con conseguente endocitosi del recettore stesso e riduzione del segnale (Lu et al., 2007). Questo suggerisce che durante lo sviluppo delle giunzioni neuromuscolari PDZRN3 possa agire da regolatore negativo del recettore MuSK (Lu et al., 2007).

Nell'uomo alcune patologie potrebbero essere associate a cambiamenti della sequenza genica di *PDZRN3*: analisi GWAS (genome wide association scan) hanno mostrato che individui che presentano un determinato SNP (single nucleotide polymorphism) denominato "rs11128347", all'interno di una delle sequenze introniche di *PDZRN3*, mostrano un'alta probabilità di sviluppare sensibilità elevata per l'irinotecano, un farmaco anti-tumorale (Han et al., 2012). Lo stesso SNP risulta associato ad alto livello di mortalità, in seguito a dialisi, in pazienti diabetici di tipo due, appartenenti ad una popolazione afro-americana (Murea et al., 2011). Un ulteriore caso di associazione è la delezione di una regione di 12,5 Mb nel braccio corto del cromosoma 3 umano, che include anche la sequenza genica di *PDZRN3*, con patologie legate al mancato sviluppo del sistema nervoso centrale e a ritardo mentale (Tutulan-Cunita et al., 2013).

Infine una è stata descritta una potenziale correlazione di *pdzrn3* con la patologia OSPC (Ovarian Serus Papillary Carcinoma) in cui questo gene viene sotto espresso (Santin et al., 2004).

In questo lavoro di tesi, ho focalizzato lo studio sull'espressione e il ruolo di *pdzrn3* nel pronefro di *Xenopus laevis*, per cui nel successivo capitolo sarà riportata una descrizione delle attuali conoscenze sulla struttura e sui processi di sviluppo di quest'organo.

1.2. Struttura del pronefro di *Xenopus laevis*:

Lo sviluppo del sistema escretore dei Vertebrati è caratterizzato dalla successiva formazione di tre forme di reni: il pronefro, il mesonefro e il metanefro. Il pronefro è il rene embrionale più primitivo. Esso è funzionale solo durante lo sviluppo embrionale negli animali che possiedono una fase larvale legata all'acqua, svolgendo il ruolo di

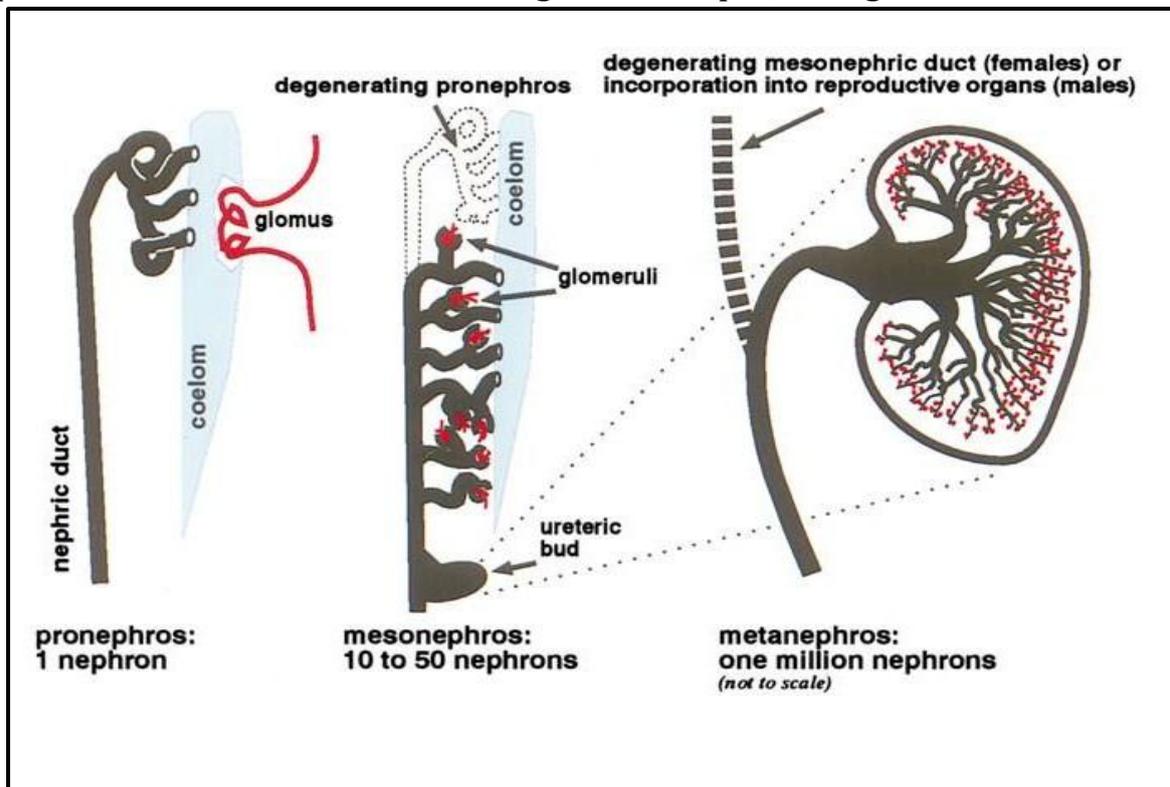


Fig 2. Evoluzione dei reni: pronefro, mesonefro e metanefro (Vize et al., 1997)

regolatore osmotico tra ambiente esterno ed interno. In assenza di questa regolazione gli embrioni sviluppano un edema che porterà alla morte. Il pronefro è comunque un organo transitorio che nei Vertebrati inferiori (anfibi, pesci) verrà sostituito dal mesonefro. Il mesonefro permane negli anamni, in fase adulta, come rene definitivo, mentre negli amnioti rappresenta una formazione transitoria che funziona solo durante lo sviluppo embrionale (Wessely et al., 2011). Il metanefro permane come rene definitivo negli Amnioti adulti. La differenza fra i tre tipi di reni si trova nella complessità della struttura e nel numero di nefroni. Il

pronefro è costituito da un'unica struttura che presenta una forte somiglianza con un nefrone umano, il mesonefro completo contiene dai 10 ai 50 nefroni, mentre il metanefro può arrivare fino a un milione di nefroni (Vize et al., 1997) (Fig 2.).

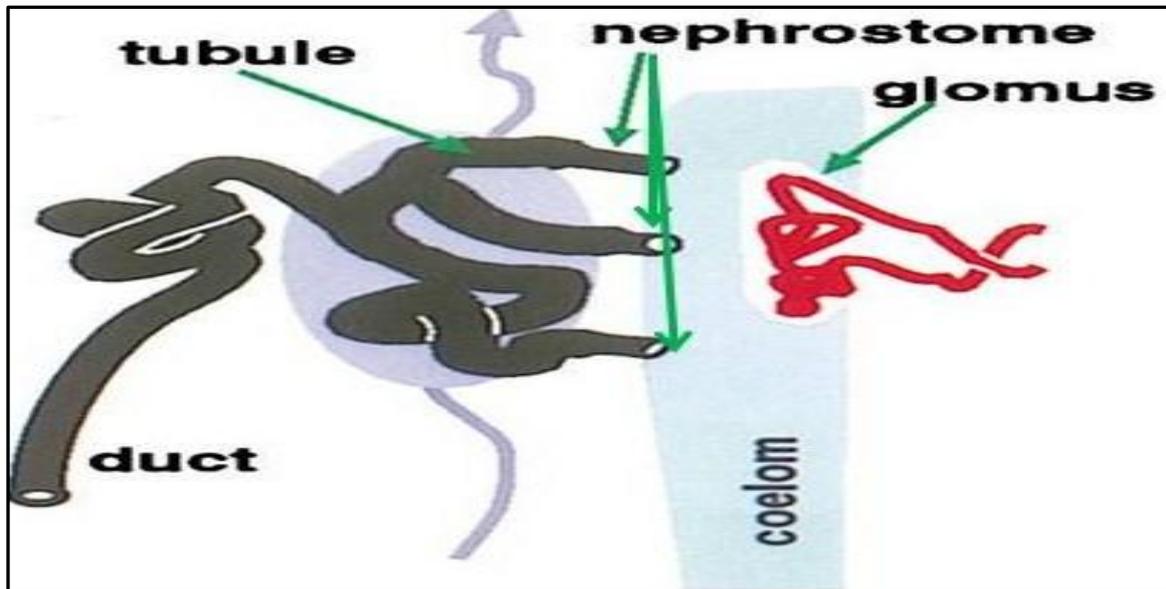


Fig 3 Rappresentazione schematica dell'anatomia del pronefro di *Xenopus laevis* (Vize et al., 1997)

Grazie alla sua relativa semplicità anatomica e alla forte somiglianza con i nefroni umani, il pronefro di *Xenopus* è stato scelto come modello di studio per lo sviluppo del rene (Hensey et al., 2002).

Il pronefro di *Xenopus* è costituito da tre parti principali: il glomus, i tubuli e il dotto (Fig 3.). Il glomus, costituito da vasi sanguigni che si originano dall'aorta dorsale, si affaccia sulla cavità celomatica in cui vengono riversati i prodotti di scarto derivanti dalla circolazione sanguigna (Fig 3). Le pareti dei vasi sanguigni presenti nel glomus possiedono delle ampie fenestrazioni attraverso le quali avviene la filtrazione del flusso sanguigno, con conseguente formazione del filtrato glomerulare che verrà depositato nel celoma (Vize et al., 1997). Tre differenti tipi cellulari compongono la struttura del glomus: cellule dell'endotelio fenestrato, cellule tipo-mesangiali che sono coinvolte nel

mantenimento della struttura tridimensionale del glomus e infine i podociti ovvero cellule epiteliali specializzate che presentano protrusioni cellulari atte a regolare le dimensioni della barriera di esclusione e a

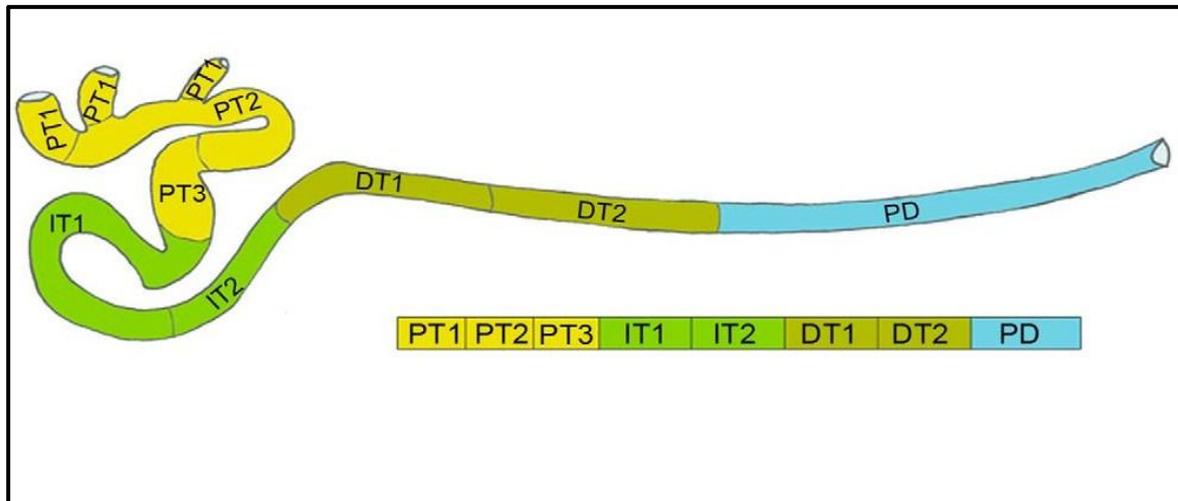


Fig 4. Rappresentazione schematica della suddivisione tubulare; PT, tubuli prossimali; IT, tubuli intermedi; DT, tubuli distali; PD, dotto pronefrico

prevenire l'uscita di grandi molecole dal flusso sanguigno. L'ultrafiltrato glomerulare entra nella cavità celomatica ed è convogliato nei tubuli pronefrici dai nefrostomi (Wessely et al., 2011).

I tubuli prossimali si affacciano nella cavità celomatica grazie a tre strutture chiamate nefrostomi (Fig 3.). I nefrostomi sono formati da cellule multiciliate in grado di convogliare flusso di liquido celomatico all'interno dei tubuli prossimali (Wessely et al., 2011).

Come rappresentato schematicamente in Fig.4, I tubuli sono divisi in: prossimali, intermedi e distali. Ogni segmento ha una funzione specifica che si riflette in una distinta morfologia cellulare. I tubuli prossimali sono divisi in 3 regioni, PT1, PT2 e PT3, responsabili per il riassorbimento di ioni, amino acidi, glucosio e acqua. I tubuli intermedi, IT1 e IT2, hanno la funzione di riassorbire sali e ioni. Essi esprimono marcatori genetici conservati nei mammiferi sia a livello dell'ansa di Henle che dei tubuli distali. Tuttavia gli anfibi non hanno necessità di condensare urina, poiché si trovano in un mezzo acquoso, in cui è possibile diluire

concentrazioni tossiche di urina concentrata. Proprio per questo motivo negli anfibi non si forma l'ansa di Henle, che ha come compito principale la formazione dell'urina concentrata nei mammiferi (Wessely et al., 2011). I tubuli distali, DT1 e DT2 hanno il ruolo di riassorbire ioni magnesio e trasportare ioni ammonio (Wessely et al., 2011). Il riassorbimento di Mg^{2+} avviene a carico di trasportatori di membrana in grado di riconoscere e discriminare specifiche molecole, favorendo il riassorbimento di ioni, ma non di macromolecole né di acqua (Zouh et al., 2004).

Una volta avvenuto il riassorbimento dal filtrato glomerulare, i prodotti di scarto saranno riversati nel dotto pronefrico che trasporterà il filtrato fino alla cloaca, dove avverrà l'escrezione.

1.3. Formazione e sviluppo del pronefro di *Xenopus laevis*:

In *Xenopus laevis* la regione presuntiva di formazione del pronefro inizia ad essere specificata sin dallo stadio di gastrula tardiva (stadio 12,5) (Brennan et al., 1999). Il rene pronefrico risulta completamente formato e funzionale in embrioni a stadio 37-38 di sviluppo (Nieuwkoop e Faber., 1964).

Come già riportato nel paragrafo precedente, il network di capillari che formerà il glomus si origina a partire da un'evaginazione dell'aorta dorsale, mentre tubuli e dotto derivano dal mesoderma laterale intermedio (Brandli et al., 1999).

La prima indicazione morfologica di sviluppo del pronefro è a stadio 21 (Fig 5.): a questo stadio di sviluppo si può notare un ispessimento della porzione somitica del mesoderma laterale, posta tra i somiti 3-5; tale ispessimento è dovuto al fatto che le cellule mesodermiche assumono un

aspetto colonnare. A stadio 24 l'ispessimento si prolunga fino al somite 6; a stadio 27 il pronefro risulta come una massa cellulare distinta, in cui le cellule sono disposte in modo radiale, distaccandosi dalla piastra laterale mesodermica (Vize et al., 1997) (Fig 5.).

Gli attivatori molecolari del territorio presuntivo del pronefro sono l'acido retinoico e l'activina; la combinazione di questi due fattori attiva i geni regolatori della zona pronefrica (Brandli et al., 1999. Brennan et al., 1999).

Nei paragrafi successivi verrà descritto lo sviluppo molecolare delle tre parti anatomiche fondamentali del pronefro, alcuni dei geni elencati sono stati utilizzati anche come marcatori genici durante gli esperimenti di ibridazione "in situ whole mount".

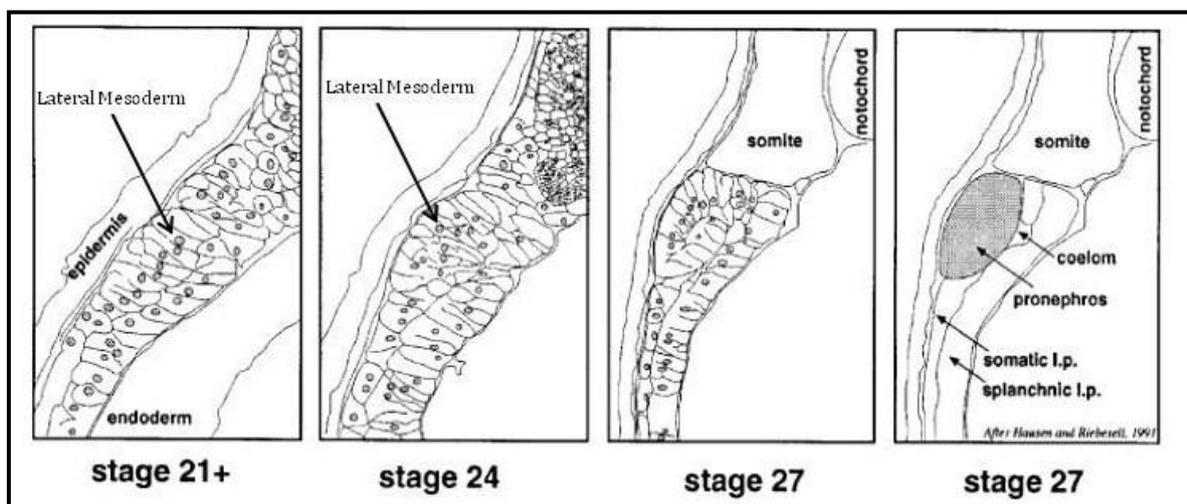


Fig 5. Rappresentazione della formazione del pronefro a partire dal mesoderma laterale intermedio durante lo sviluppo embrionale di *Xenopus laevis* (Vize et al., 1997)

1.3.1. Sviluppo dell'area presuntiva del pronefro:

Il "pathway" molecolare di sviluppo del pronefro di *Xenopus* è determinato dall'accensione di tre geni fondamentali, *lim1*, *pax8* e *hnf1 β* (Brandli et al., 1999).

Il gene *pax8* gioca un ruolo determinante a stadi precoci dello sviluppo pronefrico embrionale (stadio 21-22) (Carrol and Vize., 1999). *Pax8* è un gene evolutivamente conservato, codificante per una proteina che possiede una regione di 128 amino acidi, chiamata "paired domain", all'N-terminale e una sequenza ricca di residui serina-treonina-prolina al C-terminale, ambedue coinvolte in meccanismi di regolazione (Plachov et al., 1990, Dorfler et al., 1996).

Pax8 ha un pattern di espressione simile a quello dell'omologo *pax2* e nel topo si ritrova durante la segmentazione del mesonefro e del metanefro. Questi due geni hanno potenziale nefrogenico, giocando un ruolo fondamentale nello sviluppo tubulare del nefrone (Plachov et al., 1990). Nel nefrone umano, a livello di tubulo, una sovraregolazione di *pax8*, nella maggior parte dei casi analizzati, porta alla formazione del "tumore di Wilms" (Poleev et al., 1992, Michael et al., 1995).

L'espressione di *pax8* in *Xenopus* inizia nell'embrione durante la neurula precoce (st 12-13) nel placode otico e nell'area del mesoderma intermedio, restringendosi successivamente a livello dell'area del pronefro a stadio 21 (Heller et al., 1999). La sua importanza per l'iniziale formazione dell'area pronefrica di *Xenopus*, è stata dimostrata, analizzando l'espressione ectopica di *pax,8* ottenuta tramite microiniezione a stadio 3-4 nella zona marginale, che produce un'espansione dell'area pronefrica in formazione a stadio 21 (Carrol and Vize, 1999).

Saggi in "animal caps" di *Xenopus* coltivati in vitro hanno dimostrato che il trattamento con activina e acido retinoico porta all'espressione di

pax8 (rivelata tramite esperimenti di ibridazione in situ) (Heller et al., 1999).

Il gene *pax2*, espresso a stadio 21 nella zona presuntiva di formazione del pronefro, mostra un ruolo ridondante e di supporto rispetto a *pax8* e a *Xlim1* durante lo sviluppo di questo organo (Heller et al., 1999). In *Xenopus*, le proteine Pax8 e Xlim1 sono ad oggi considerate i fattori di trascrizione principali che, interagendo sinergicamente, servono da innesco per stabilire i primi passi della formazione dell'area pronefrica (Carroll and Vize., 1999).

Embrioni di topo *knockout* doppi omozigoti negativi per *pax8*, mostrano una totale assenza di formazione del pronefro e dei tratti urogenitali in fasi embrionali tardive (18,5 d) (Bouchard et al., 2002).

Nel topo Pax8 agisce da fattore di trascrizione, attivando la trascrizione del gene *gata3*, codificante per una proteina implicata nella proliferazione cellulare del pronefro. Una sua mancanza nel topo porta a difetti dello sviluppo della gemma ureterica (Grote et al., 2006).

Nell'uomo esistono diverse patologie legate a mutazioni del gene *pax8*:
-la cistinuria è un disordine in cui manca il riassorbimento attivo della cisteina a causa della mancanza della proteina SLC7A9 la quale viene regolata dall'attivazione di *pax8*. Una scorretta espressione di questo gene porta ad una successiva alterazione di SLC7A9 con conseguente cistinuria (Boutrus et al., 2005)

-il tumore di Wilms, citato sopra, e il carcinoma renale (Renal Cell Carcinoma) sono malattie associate alla mancata regolazione dell'espressione di *pax8*, per cui attualmente *pax8* è utilizzato come marcatore tumorale (Tonga et al., 2009, Ozcan et al., 2011).

Un altro gene implicato nello sviluppo precoce dell'area pronefrica è *hnf1β*. Questo gene è espresso durante diversi stadi di sviluppo in

Xenopus, sia nelle fasi più precoci, sia in quelle più tardive a livello del pronefro.

Il gene *hnf1 β* codifica per un fattore di trascrizione che contiene un'omeodominio, una sequenza conservata di 60 aminoacidi, in grado di prendere contatto con il DNA. In particolare, Hnf1 β contiene un omeodominio modificato, chiamato *POU domain*. Sempre all'interno della sua sequenza sono presenti altri domini di interazione e dimerizzazione per proteine (Mendel et al., 1991).

Questo fattore di trascrizione è stato identificato inizialmente in estratti nucleari di epatociti tramite esperimenti di "footprinting". Hnf1 β è capace di legare i promotori del fibrinogeno alfa e beta, entrambi specifici del tessuto epatico (Mendel et al., 1991). Nel ratto codifica per una proteina, che ha un peso approssimativo di 88 kDa, altamente espressa a livello del fegato e dei reni. Hnf1 β può legare molti promotori regolando l'espressione di geni legati allo sviluppo di differenti tessuti, tra i quali alfa-fibrinogeno, l'albumina, alfa-fetoproteina, alfa-1-antitripsina e transtiretina (Mendel et al., 1991).

In *Xenopus* l'accensione di *hnf1 β* avviene allo stadio di blastula nella parte vegetativa dell'embrione (Vignali et al., 2000). Questo fattore di trascrizione è implicato nell'induzione mesodermica. Infatti interferendo con l'espressione di *Hnf1 β* si ha un mancato sviluppo del mesoderma durante l'embriogenesi (Vignali et al., 2000).

Dallo stadio embrionale 21 fino agli stadi più tardivi esaminati (stadio 32) *hnf1 β* ha un ruolo cruciale per lo sviluppo del pronefro di *Xenopus*, mediato dal dominio proteico POU. In particolare alterazioni nella regione funzionale che va dall'aminoacido 229 fino al 319 causano una completa agenesi del pronefro (Wu et al., 2004). La sovraespressione di *hnf1 β* conduce all'agenesi dei tubuli prossimali e del dotto (Wild et al., 2000). Mutazioni nella sequenza nucleotidica di *hnf1 β* portano ad un

errato sviluppo dei tubuli prossimali a stadi tardivi (Sauert et al., 2012). Il dominio di espressione di *hnf1β* coincide spazio-temporalmente con quello dei due geni *pax8* e *lim-1*, essendo tutti e tre i geni co-espressi nella regione presuntiva di formazione del pronefro a stadi precoci di sviluppo (Wu et al., 2004). Sulla base di esperimenti funzionali, è stato proposto che *hnf1β* possa regolare sia *pax8* che *lim1*, funzionando da antagonista di questi due geni (Wu et al., 2004). Infatti è stato dimostrato che sovraesprimendo *hnf1β*, è possibile recuperare il fenotipo, ottenuto dalla co-sovraespressione di *pax8* e *xlim1*, che provoca l'allargamento della zona presuntiva di formazione del pronefro a stadi precoci e la formazione ectopica di tubuli pronefrici a stadi più tardivi (Wu et al., 2004; Carroll and Vize, 1999).

In saggi di "doppio ibrido" in lievito è stato osservato che la proteina Hnf1β interagisce tramite la sua porzione N-terminale con le proteine E4F1 e ZFP36L. Entrambe, in *Xenopus*, interferiscono con il normale sviluppo del pronefro: E4F1 è una proteina *zinc-finger* in grado di legare altre proteine, implicata nella formazione dei tubuli; ZFP36L appartiene alla famiglia delle tristetraproline, dotate di sequenza di localizzazione nucleare (NLS), capace di legare Hnf1β bloccandolo nel citoplasma e reprimendo la sua azione (Dudziak et al., 2008).

Un altro interattore di Hnf1 è la proteina Zyxina che può regolare la migrazione cellulare attivando *hnf1β*; la Zyxina è una navetta proteica che può passare da citoplasma a nucleo. In condizioni normali viene attivata da EGF tramite la via di Akt e si reca nel nucleo dove interagirà con il promotore di *hnf1β* (Hee et al., 2012). Nel topo la delezione in omozigosi del gene *hnf1β* porta a letalità embrionale intorno al giorno 7,5 (Wu et al., 2004). Alterazioni di questo gene nell'uomo sono associate a malattie renali come la PKD (polycystic kidney disease) (Wu et al., 2004).

1.3.2. Sviluppo del glomus:

Dopo l'accensione della zona pronefrica a carico dei geni *pax8*, *hnf1 β* e *lim1*, la prima componente pronefrica che si forma durante la fase di midblastula è la regione del glomus il cui sviluppo viene regolato dal gene *wt1*. Il gene *wt1* codifica per un fattore di trascrizione che contiene un dominio *zinc finger* in grado di riconoscere peptidi con motivo di legame "GCGGGGGCG". L'attivazione di *wt1* è determinata dall'iniziale espressione di *pax8* il quale è in grado di legare il suo promotore (Dehebi et., 1996). A stadio 18-21, *wt1* è espresso in tutto il mesenchima nefrogenico ma a stadi avanzati di gemma caudale la sua espressione viene ridotta a livello dei podociti. La mancata espressione di questo gene in *Xenopus* porta a un collasso della struttura glomerulare (Carrol et al., 1996).

Lo sviluppo del glomus in *Xenopus* è strettamente legato all'accensione di *pdgf- β* , mentre la formazione del complesso vascolare che circonda il glomus è a carico della zona presuntiva ematopoietica con attivazione di geni quali *flk1* e *Gata2* che promuovono un'attiva migrazione delle cellule emopoietiche (Brandli et al., 1999).

Un altro gene importante per lo sviluppo della regione del glomus è la *nefrina*. La *nefrina* inizialmente è stata identificata nella sindrome nefrotica acuta dell'infanzia in soggetti appartenenti ad una popolazione Finlandese. Questo gene nell'uomo codifica per una proteina evolutivamente molto conservata, contenente otto domini "Ig-like" ed un dominio transmembrana (Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999). In particolare, tramite i domini di tipo "Ig-like" può formare dimeri implicati nella formazione di giunzioni aderenti (Tryggvason et al., 1999). Nell'uomo la nefrina si trova espressa a livello del diaframma fenestrato del glomerulo (regione corrispondente alla regione del glomus di *Xenopus*) formando delle giunzioni aderenti con altre nefrine grazie alla formazione di ponti disolfuro (Tryggvason et al., 1999). Nello *Xenopus* il

gene *nefrina* viene espresso a livello dei podociti del glomus, a partire dallo stadio di gemma caudale (stadio 26)(Gerth et al., 2005). A stadi più avanzati (stadio 34) è espressa nella regione più anteriore di formazione del pronefro, situata di sotto dei somiti 5 e 6 (Gerth et al., 2005). E' stato dimostrato, mediante saggi a doppio ibrido in Lievito, che la nefrina può interagire con "Anion Exchanger 1" (AE1), una proteina di trasporto appartenente alla famiglia "Solute Carrier" (SLC), che può legare la *nefrina* in posizione N-terminale, formando così un complesso che stabilizza la struttura cellulare dei podociti (Wu et al., 2010).

1.3.3. Sviluppo dei tubuli:

Lo sviluppo dei tubuli renali richiede l' accensione del gene *notch*, la cui espressione nel pronefro segue due picchi di espressione, il primo a stadio 21 e il secondo a stadio 32. Durante la seconda fase di espressione si ha lo sviluppo dei tubuli. In *Xenopus* Notch è correlato all'attivazione diretta del "pathway" di *wnt 4* (Naylor and Jones., 2009) che pure svolge un ruolo cruciale durante la fase di tubulogenesi. In particolare, l' alterazione di *wnt4* durante lo sviluppo del pronefro causa alterazione della morfogenesi dei tubuli (Saulnier et al., 2002).

Altri geni espressi durante la formazione dei tubuli pronefrici sono:

- il *beta-distroglicano*, che codifica per una proteina transmembrana di ancoraggio alla laminina. Nel pronefro di *Xenopus* il beta-distroglicano ha il ruolo di fissare il tubulo alla membrana basale ed una sua mancanza crea disgregazione cellulare con conseguente agenesi renale (Bello et al., 2008).

- il gene *pteg*,(*proximal tubular expression gene*) codificante per una proteina con un motivo "PDZ-binding". Esperimenti di "loss of function" effettuati in *Xenopus* dimostrano che la mancata espressione di questo

gene conduce ad una mancata formazione della zona tubulare (Lee et al., 2010).

Recentemente è stato dimostrato che, anche durante stadi tardivi (tailbud) di sviluppo di *Danio rerio*, il gene *hnf1 β* svolge un ruolo nella suddivisione dei tubuli in segmenti prossimali, intermedi e distali (Naylor et al., 2013). Infatti in mutanti zebrafish mancanti di questo gene non avviene il corretto differenziamento dei tubuli prossimali e non vengono espressi i marcatori molecolari d'identità, sia dei segmenti distali che del dotto.

Che il gene *hnf1 β* giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella suddivisione dei tubuli è stato confermato anche nel topo (Naylor et al., 2013). È stato dimostrato che Hnf1 β può legarsi alla regione trascrizionale del gene *dll1*, interattore di *notch* che, a sua volta, è considerato un "master regulator" della tubulogenesi. Hnf1 β interagisce anche con le proteine Irx1 e Osr2, anch'esse legate allo sviluppo del tubulo prossimale del nefrone (Massa et al., 2013). Le proteine Irx1 e Irx3 sono richieste per lo sviluppo della porzione dei tubuli intermedi durante lo sviluppo del pronefro sia di *Xenopus* che di topo; la mancata espressione di *hnf1 β* conduce a una successiva deregolazione dei geni *irx* con conseguente sotto espressione di *notch*. La conseguenza è un malformazione dei segmenti prossimali del pronefro (Heliot et al., 2013).

A partire dallo stadio 26 di sviluppo embrionale di *Xenopus* inizia l'espressione del gene codificante l'enzima Na⁺,K⁺-ATPasi, sia a livello dei tubuli che del dotto pronefrico (Eid et al., 2001). Questo enzima, che costituisce un complesso di membrana localizzato baso-lateralmente all'epitelio, utilizza l'energia derivante dall'idrolisi di ATP per estromettere dalla cellula tre ioni sodio ed intromettere due ioni potassio, contro il loro gradiente elettrochimico. Il gradiente di sodio generato dalla Na⁺,K⁺-ATPasi provvede a fornire energia per altri

trasportatori che utilizzano il sodio per trasportare all'interno della cellula glucosio, amino acidi, fosfati, solfati, e altri soluti (Eid et al., 2001). La Na^+, K^+ -ATPase è formata da due subunità non legate covalentemente: la subunità alfa, una proteina transmembrana di 110 kDa e la subunità beta, una glicoproteina più piccola di 40-60 kDa. Entrambe le subunità sono richieste per la corretta funzionalità della Na^+, K^+ -ATPasi ma l'attività catalitica risiede nella subunità alfa, questa infatti porta il sito di legame per l'ATP e il sito catalitico. La glicoproteina beta è una proteina transmembrana che agisce come "chaperon" nella maturazione funzionale della subunità alfa. In alcuni tessuti si trova anche la subunità gamma che si associa al dimero alfa-beta, ma che non è richiesta per il corretto funzionamento della Na^+, K^+ -ATPasi (Eid et al., 2001).

L'enzima Na^+, K^+ -ATPasi svolge funzioni omeostatiche di recupero degli ioni dal filtrato glomerulare a livello della zona tubulare del nefrone; questa attività è regolata dall'ormone aldosterone, che principalmente stimola il riassorbimento degli ioni. In risposta alla stimolazione dell'aldosterone, le cellule epiteliali del rene incominciano la biosintesi "ex novo" del trascritto *Na⁺,K⁺-ATPase* (Verrey et al., 1987, De La Rosa et al., 2006). Un altro segnale di regolazione è rappresentato dall' ipo-osmolarità, che agisce aumentando l'attività specifica della Na^+, K^+ -ATPase (Niisato et al., 1999).

1.3.4. Sviluppo del dotto:

Al contrario delle altre zone pronefriche sopra descritte lo sviluppo del dotto non ha una bibliografia molto ampia.

Lo sviluppo del dotto prevede un elevato livello di espressione della proteina Id2, un fattore di trascrizione bHLH (*basic Helix Loop Helix*); per la specificazione iniziale della regione presuntiva del dotto, sembra avere rilievo il gene *fgf8* (Brandli et al., 1999; Campenouth et al., 2006). Durante le fasi di allungamento del dotto è richiesto il gene *evil*: una sua sovraespressione porta al blocco dello sviluppo del glomus e dei tubuli prossimali . Questo gene viene regolato negativamente dalla presenza di *notch*, che invece è correlato direttamente allo sviluppo dei tubuli prossimali (Campenouth et al., 2006).

2. Scopo della tesi

L'obiettivo della tesi è la caratterizzazione del coinvolgimento del gene *xpdzrn3* di *Xenopus laevis* durante lo sviluppo del pronefro.

Il primo passo dello studio è stato verificare il pattern di espressione spazio-temporale di *xpdzrn3* durante l'embriogenesi di questo organismo modello.

In seguito sono stati effettuati esperimenti funzionali di “perdita di funzione”, tramite utilizzo di un oligonucleotide antisenso-morfolino, complementare ad una regione nella zona di inizio della traduzione di *xpdzrn3*. Per valutare gli effetti del morfolino sono stati utilizzati, tramite ibridazione in situ, diversi marcatori genici del sistema pronefrico a differenti stadi di sviluppo: *Na⁺,K⁺-ATPase*, *pax8*, *hnf1β*, *nefrina*.

L'analisi del ruolo di *xpdzrn3* nello sviluppo del pronefro è stata condotta a stadi precoci di sviluppo (st. 22-23) e tardivi (st.37-38).

3. Materiali e metodi

3.1. Trattamento degli embrioni di *Xenopus*:

Gli embrioni utilizzati per gli esperimenti di microiniezione e per l'ibridazione in situ sono stati ottenuti con fertilizzazione in vitro.

Il maschio di *Xenopus* viene anestetizzato tramite immersione in una soluzione allo 0,1% di MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate). Dopo l'operazione il testicolo viene rimosso e conservato per alcuni giorni a 4 C° in una soluzione composta da MMR 1X e gentamicina (20 µg/ml).

Le femmine di *Xenopus* vengono stimulate circa 12 ore prima della deposizione con un iniezione di gonadotropina corionica per uso veterinario, per ogni femmina viene iniettato l'equivalente di 800 UI. L'iniezione avviene nel sacco perilinfatico.

Il giorno successivo gli oociti vengono ottenuti premendo con delicatezza l'addome della femmina e raccogliendoli in una piastra petri contenente MMR 1X.

Gli oociti vengono quindi fertilizzati utilizzando un volume adatto di soluzione ottenuta da un omogeneizzato di testicolo. Il processo di fertilizzazione è caratterizzato dalla rotazione della cortex.

Dopo circa 40 minuti dalla fertilizzazione gli oociti vengono deprivati della loro copertura gelatinosa utilizzando una soluzione di "de-jellyng" contenente tris-HCl a pH 8,8 e DTT 1M (ditiotreitolo). L'MMR 0,1X viene rimpiazzato con la "de-jellyng solution", nella quale gli embrioni rimangono per circa 5 minuti, finchè non si osserva la perdita della copertura gelatinosa. Dopo questo procedimento la soluzione di "de-jellyng" viene rimossa e gli embrioni vengono lavati con MMR 0,1X.

Una volta ottenuti gli embrioni, questi vengono fatti crescere a 14 C° finchè non raggiungono lo stadio desiderato, il quale può essere identificato utilizzando i criteri descritti nelle tavole di Nieuwkoop and Faber (1967). Una volta raggiunto lo stadio gli embrioni sono fissati in 5 ml di MEMFA 1X, una soluzione ottenuta con formaldeide 3,7% e sali di MEM 1X (MOPS 1M pH 7,4, EDTA 20 mM, MgSO₄ 10 mM), con agitazione orizzontale per 1 ora a temperatura ambiente. Una volta fissati, il MEMFA viene rimosso e vengono eseguiti passaggi graduali a concentrazioni ascendenti di etanolo. Gli embrioni vengono quindi conservati a -20C° in etanolo assoluto finchè non verranno utilizzati per i successivi esperimenti.

Xenopus laevis rappresenta un ottimo organismo modello per studi riguardanti la biologia dello sviluppo. I principali vantaggi nell'utilizzo di *Xenopus* sono dovuti a: gli embrioni si possono ottenere tramite stimolazione ormonale durante tutto l'anno, le uova possono essere fertilizzate in vitro, non richiedono nutrimento fino a circa 6 giorni di sviluppo, le dimensioni esterne degli embrioni di rana permettono una facile manipolazione genica e l'adulto si forma nel giro di 4-6 mesi (Jones et al., 2005).

3.2. Iniezioni di morfolino ed esperimenti di “rescue”

Per studiare la funzione del gene *xpdzrn3* è stato utilizzato un morfolino antisenso costruito contro l'mRNA della sequenza. Il morfolino ha una dimensione di 20 basi ed è stato disegnato per complementarsi alla regione di inizio traduzione contenente il codone ATG.

Per effettuare esperimenti di controllo di specificità ho utilizzato morfolino standard la cui sequenza è stata disegnata su una regione intronica mutata del gene della *β-globina* umana, in modo che il

morfolino standard non possa complementarsi ad alcun gene presente in *Xenopus*. Il morfolino standard è stato fornito dalla Gene-Tools (OR, USA).

Mo-Xpdzrn3: CCAGTTCAAAGCCCATGGTCGGTGTC

Mo-Standard: CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

Gli embrioni sono stati microiniettati in una soluzione di MMR 1X (NaCl 0,1M, KCl 2mM, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ mM, HEPES 5mM, EDTA 0,1μM, H₂O fino a volume) e Ficoll al 3%, questa soluzione evita che ci sia un'eccessiva perdita citoplasmatica dalle cellule durante l'iniezione.

Le microiniezioni sono state eseguite a stadio di 2 cellule nella regione marginale; quindi gli embrioni sono stati trasferiti in MMR 0,1X e cresciuti in incubazione a 14C° fino agli stadi 22-23 e 37-38.

Come tracciante genico negli embrioni è stato iniettato mRNA di *β-galattosidasi* (200-300 pg)(vedi paragrafo successivo).

Per i saggi di rescue abbiamo utilizzato il trascritto omologo di *pdzrn3* proveniente da *Danio rerio* che possiede un'affinità di sequenza pari al 65,38%, l'omologia rimane conservata nei domini funzionali PDZ (60%) e Ring finger (67%).

La sequenza di *pdzrn3* proveniente da zebrafish presenta mismatch e delezioni nella zona di legame del morfolino diretto contro *xpdzrn3*, garantendo in questo modo la sua traduzione nell'embrione senza andare incontro a silenziamento dato da morfolino:

```

mO_PDZRN3.X1      -----GCACCGACCATGGGCTTTGAACTGG----- 25
X1                TCCAACGGGCACCGACCATGGGCTTTGAACTGGATCGCTTCAATGGGGAG 50
Dr                TCCACCTCACAT--AGTATGGGCTTTGACTTAGACCGTTTTGAGGGTCTCT 48
                  **      *      *****      *      *

```

3.3. Colorazione degli embrioni mediante aggiunta del substrato della β -galattosidasi:

Tale colorazione permette di localizzare il punto di espressione della β -gal usato come tracciante per riconoscere la metà iniettata degli embrioni. Il trascritto β -gal viene iniettato negli embrioni così la sua traduzione rende possibile rintracciare la distribuzione dell'mRNA iniettato:

- Gli embrioni arrivati allo stadio desiderato vengono fissati in MEMFA 1X per circa 30 minuti a temperatura ambiente.
- Due lavaggi da 15 minuti in washing solution (NaDeOH 10X, NP40 1X, MgCl₂ 10mM, PBS 1X a volume), questa soluzione serve a eliminare i residui di MEMFA e, a causa della presenza di detergenti, permettere la penetrazione del substrato nel mesoderma.
- Lavaggio da 5 minuti in Soluzione "Ferri" 1X (K₃Fe(CN)₆ 30 mM, K₄Fe(CN)₆·3H₂O, PBS 1X) e successivamente incubazione per circa 30minuti a 37 C° con soluzione Ferri 1X e 25 μ l di Salmon-Gal (disciolta in 5% in metanolo). La "Salmon Gal" è il substrato di colorazione per la β -Gal, la sua scomposizione porta ad una colorazione rossa.
- Una volta avvenuta la rivelazione, vengono effettuati altri due lavaggi di 5 minuti in "washing solution" e successivamente gli embrioni vengono nuovamente rifissati in MEMFA 1X per 40 minuti. Questo passaggio serve a evitare di perdere la colorazione ottenuta quando gli embrioni vengono trasferiti in etanolo assoluto.
- Gli embrioni sono conservati a -20C° in etanolo assoluto e utilizzati nei successivi esperimenti.

3.4. Ibridazione in situ “whole-mount”:

L'analisi dell'ibridazione in situ su embrione intero serve a localizzare l'espressione di mRNA di un determinato marcatore genico all'interno dell'embrione. In questo procedimento sono usate sonde di RNA antisenso rispetto al trascritto di interesse. Per effettuare gli esperimenti di ibridazioni in situ whole-mount sono state utilizzate le seguenti sonde:

-*xpdzrn3*, ottenuta digerendo il plasmide con l'enzima Nco1 e trascrivendo con SP6 RNAPol

- *Na⁺,K⁺-ATPase*,

-*pax8*,

-*hnf1β*,

-*nefrina*

La sonda possiede ribonucleotidi legati a digossigenina e lega in maniera specifica le sequenze di mRNA complementare. Questa analisi richiede particolare attenzione per maneggiare le sonde, considerato che l'RNA è facilmente degradabile.

Gli embrioni vengono prelevati da “vials” in cui sono conservati in etanolo assoluto e sottoposti alla seguente procedura in accordo con il protocollo descritto da Harland (a cui sono state aggiunte delle modifiche) (1991).

- Lavaggio in etanolo al 75% in PTw (PBS1X, Tween-20 0,1%) per 5 minuti in agitazione
- Lavaggio in etanolo al 50% in PTw per 5 minuti in agitazione.
- Lavaggio in etanolo al 25% in PTw per 5 minuti in agitazione.
- Due lavaggi da 5 minuti in Ptw in agitazione.

- Incubazione in proteinasi K 10 µg/ml (1:2000 in Ptw 0,1%) per 5-15 minuti a seconda dello stadio (gli stadi tardivi vengono incubati più a lungo) a temperatura ambiente.
- Due lavaggi veloci in Ptw e poi un lavaggio da 5 minuti in Ptw in agitazione a temperatura ambiente.
- Fissazione degli embrioni con PFA 4% in PBS1X per 20 minuti.
- Due lavaggi veloci in Ptw e poi una lavaggio da 5 minuti in PTW.
- Incubazione degli embrioni in 500 µl di soluzione di ibridazione "NIH" per 2 ore a 60 C°. Composizione della soluzione "NIH": "Blocking Reagent" (Roche) 1%, Formammide 50%, SSC 20X 25%, Torula tRNA 1 mg/ml, Heparin 0,1 mg/ml, Chaps 0,1%, Tween-20 0,1%, EDTA 5mM, H₂O a volume.
- Sostituzione del"NIH" con "NIH" contenente la sonda, preparata incubando 50 ng di sonda in 500 µl di "NIH" per 2 minuti a 95C°.
- Durante l'ibridazione, incubare "over night" (ON) a 60 C°.
- Lavare due volte con una soluzione SSC 2X e CHAPS 0,1% per 30 minuti a 60C°.
- Lavare due volte con una soluzione SSC 0,2X e CHAPS 0,1% per 30 minuti a 60 C°.
- Un lavaggio con TBSX (TBS 1X, Triton 10X 0,1%) per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Pre-incubazione della "Blocking Solution" (Lamb Serum 10%, Blocking Reagent 10%, TBSX a volume) per 2 ore a 4 C°.
- Preparare la soluzione contenente anticorpo anti-digossigenina (anti-DIG): l'anticorpo anti-digossigenina coniugato AP viene diluito in "Blocking Solution" 1:2500 e preincubato 2 ore a 4 C°. Poi sostituzione della "Blocking Solution" con la soluzione con

anticorpo, precedentemente preparata, e incubazione a temperatura ambiente per 4 ore in agitazione.

- Lavaggio veloce con TBSX, poi nuovamente riempire la “vial” con TBSX e lasciare ON a 4 C° in agitazione.
- Quattro Lavaggi 4 volte con TBSX per 1 ora a temperatura ambiente e in agitazione.
- Lavaggio con “Ap-Buffer” per 10 minuti a temperatura ambiente senza agitazione. Composizione “Ap-Buffer”: NaCl 0,1M, MgCl₂ 0,05M, Tris HCl 0,1 M pH 9,5, Tween-20 0,1 %, Tetramisole 0,048%, H₂O a volume.
- Reazione cromogenica: Rimpiazzare “Ap-Buffer” con 500 µl di “BM purple” mantenendo al buio finchè il segnale non è completamente visibile. Mantenere in agitazione.
- Quando il segnale di ibridazione ha raggiunto l'intensità desiderata, fermare la reazione cromogenica lavando 10 minuti in TBSX. Successivamente rifissare 1 ora in MEMFA con agitazione.
- Lavare con etanolo assoluto per 15 minuti a temperatura ambiente in agitazione
- Lavare con etanolo al 70% per 5 minuti a temperatura ambiente in agitazione.
- Lavare con etanolo al 50% e SSC 1X per 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente.
- Incubare con la soluzione di “Bleaching” sotto una luce bianca fredda finchè la pigmentazione dell'embrione non è completamente rimossa. Composizione della soluzione di “Bleaching”: H₂O₂ 30%, SSC 20X, Formammide, H₂O.

- Fermare la reazione con un lavaggio in etanolo al 70% per 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Successivamente conservare gli embrioni a -20 C° in etanolo assoluto.

3.5. Inclusione in paraffina per taglio al microtomo:

Gli embrioni precedentemente ibridati sono stati inclusi in paraffina per ottenere sezioni trasversali con tagli al microtomo.

In questa procedura i tessuti vengono disidratati in passaggi graduali di etanolo e xilene per eliminare i residui acquosi e permettere la migliore penetrazione della paraffina nei tessuti. In seguito alla disidratazione vengono effettuati quattro passaggi successivi in paraffina fino a lasciare gli embrioni in blocchi di paraffina pura solidificata. La paraffina commerciale è solida a temperatura ambiente e fonde a temperature intorno ai 65-70 C°.

Una volta che gli embrioni sono inclusi in blocchi di paraffina questi possono essere conservati a 4 C° per un tempo indefinito.

Il microtomo può essere utilizzato per ottenere sezioni dell'embrione che vengono posizionate su vetrini per microscopio e lasciate ad asciugare ON a 42 C°.

3.6. Colorazione delle sezioni in Hoechst :

Gli embrioni così sezionati, possono essere utilizzati per effettuare delle colorazioni istologiche.

Le sezioni utilizzate per la colorazione Hoechst sono state tagliate con uno spessore di 20µm, mentre le sezioni per la colorazione ematossilina-eosina hanno subito un taglio con spessore pari a 12µm.

In entrambi i casi i passaggi iniziali per eliminare gli eccessi di paraffina vengono effettuati in due passaggi successivi di Xilene per 10 minuti ciascuno.

Colorazione Hoechst :

- Lavaggio in soluzione 50% Xilene e Etanolo per 5 minuti.
- Lavaggio in soluzione 50% Etanolo e PBS 1X per 5 minuti.
- Lavaggio in PBS 1X per 5 minuti.
- Preparare la soluzione con l'intercalante della cromatina Hoechst (1:1000 in PBS1X).
- Usare 1ml di soluzione per vetrino e incubare al buio per 30 minuti.
- Togliere l'eccesso di soluzione e lavare per 5 minuti in PBS 1X.
- Mettere tre gocce di montante "Aqua Polimounth" per vetrino e adagiare delicatamente il vetrino coprioggetto.
- Lasciare asciugare il montante ON a temperatura ambiente. Dal giorno successivo conservare i vetrini a 4 C°.

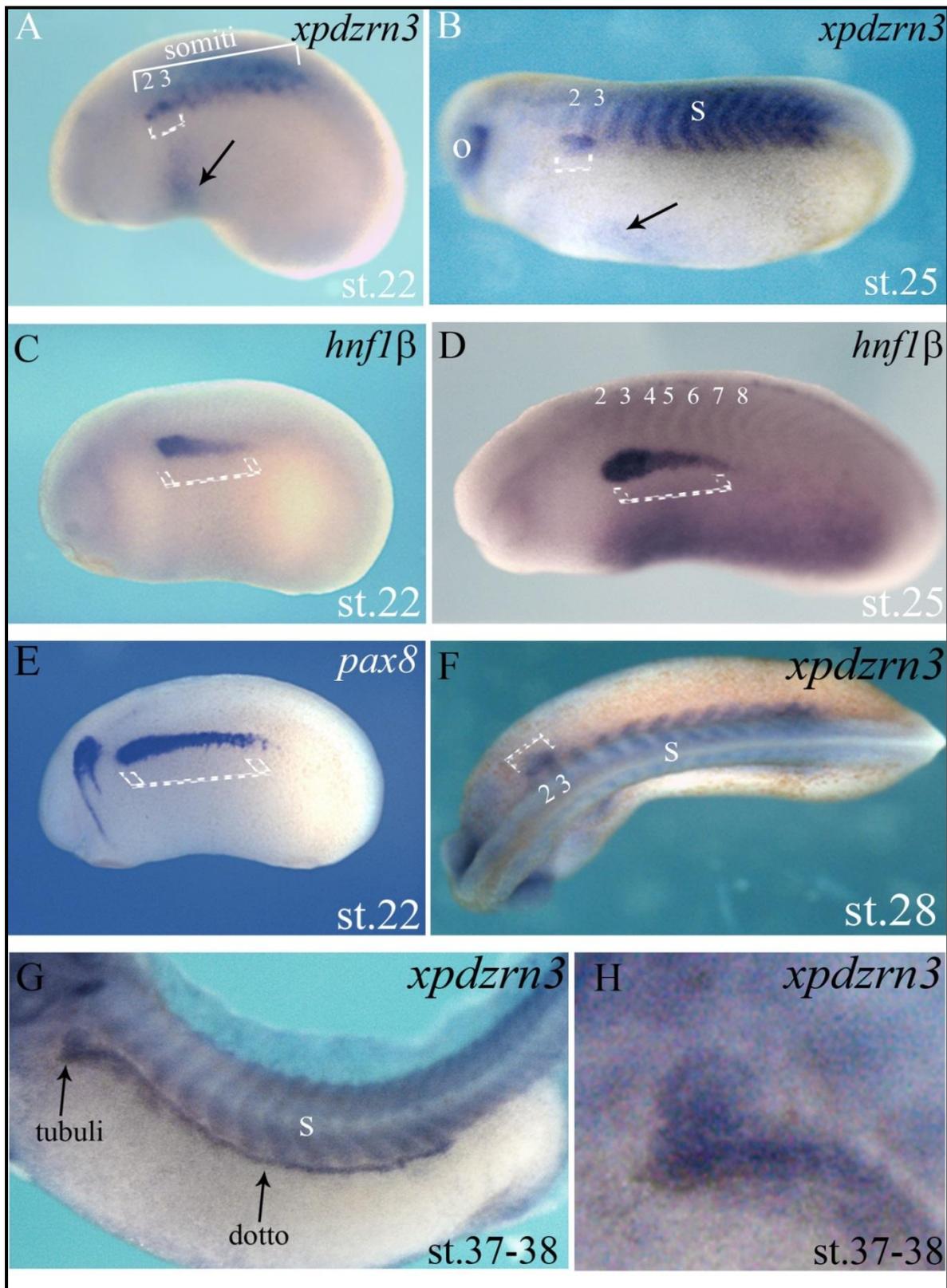
4. Risultati

4.1. Analisi dell'espressione genica di *xpdzrn3* :

Durante il mio lavoro di tesi ho analizzato il pattern di espressione di *xpdzrn3* durante l'embriogenesi di *Xenopus laevis*. A tale scopo è stata usata una sonda antisenso di *xpdzrn3* in esperimenti d'ibridazione in situ su embrione intero. Esperimenti preliminari, effettuati prima dell'inizio della mia tesi, avevano già mostrato espressione di *xpdzrn3* nella regione della linea mediana (stadio 13), all'apice delle pieghe neurali (stadio 16 e 19). Abbiamo quindi deciso di estendere questo studio e di prendere in esame altri stadi di sviluppo partendo dallo stadio 22, momento di inizio di specificazione dell'area pronefrica, fino a stadi più tardivi in cui il pronefro diventa completamente funzionale (st. 37-38) (Nieuwkoop Faber, 1964).

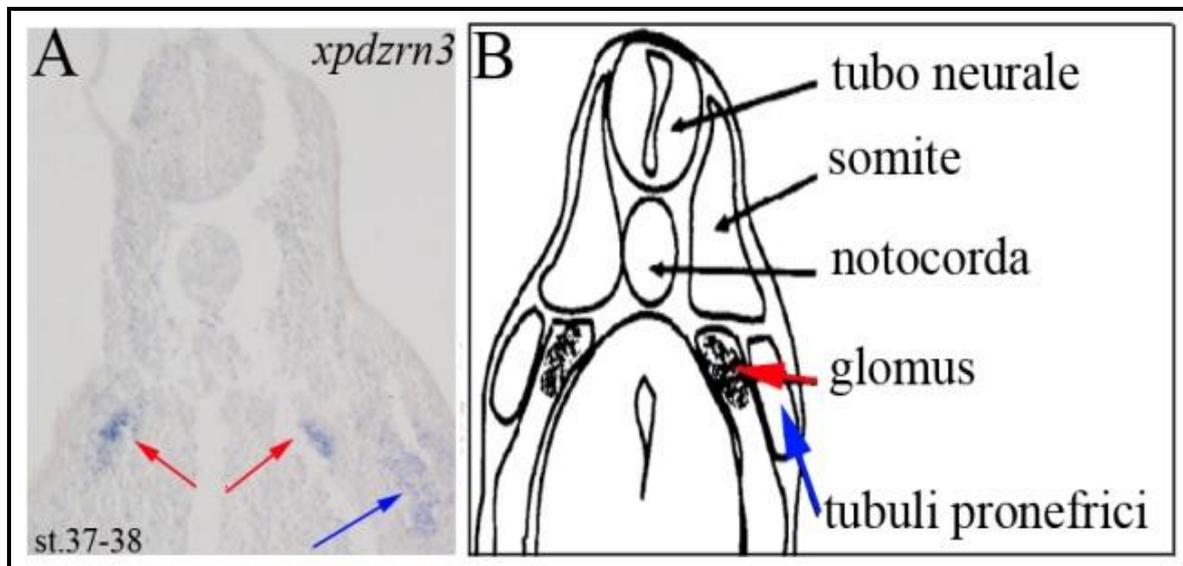
Negli stadi più precoci analizzati (st. 22-23), il segnale di ibridazione di *xpdzrn3* si presenta, sotto forma di "spots", al di sotto dei somiti 2-3, in entrambi i lati dell'embrione (Tav 1. A). Questo dominio di espressione corrisponde per posizione al dominio di espressione di due marcatori precoci del pronefro, *hnf1-β* e *pax8* (Tav 1. C, E). A stadio 25 il dominio di espressione di *xpdzrn3* assume una forma più ovale (che potrebbe risultare dall'unione degli "spots" di cui sopra), mantenendosi localizzato sotto i somiti 2-3 (Tav 1. B). Il dominio di espressione di *hnf1-β* risulta più esteso, essendo localizzato dal somite 2 al somite 8 circa (Tav 1. D). Questo pattern di espressione di *xpdzrn3* è mantenuto anche allo stadio 28 (Tav 1. F).

A stadio più tardivo (stadio 37-38) il trascritto è presente nella regione dei tubuli pronefrici e nel dotto pronefrico in formazione (Tav 1. G, H).



Tav 2. Espressione di *xpdzrn3* durante differenti stadi di sviluppo di *Xenopus laevis*, confrontata con marcatori del pronefro. Gli stadi embrionali sono riportati in ciascuna figura (A-H); La linea tratteggiata in (A-F) indica l'area presuntiva di formazione del pronefro; le frecce nere in (A-B) indicano il segnale nella regione ventrale dell'embrione, H) dettaglio dell'espressione di *xpdzrn3* nei tubuli pronefrici, mostrata in figura (G). I numeri in (A, B, ,D, F) corrispondono ai rispettivi somiti. s, somiti, o, occhio.

Allo scopo di ottenere un'analisi più dettagliata del pattern di espressione nella regione del pronefro, gli embrioni ibridati sono stati successivamente inclusi in paraffina e sottoposti a taglio mediante microtomo. I risultati ottenuti da sezioni trasversali mostrano la presenza del trascritto sia nel glomus pronefrico che nella regione dei



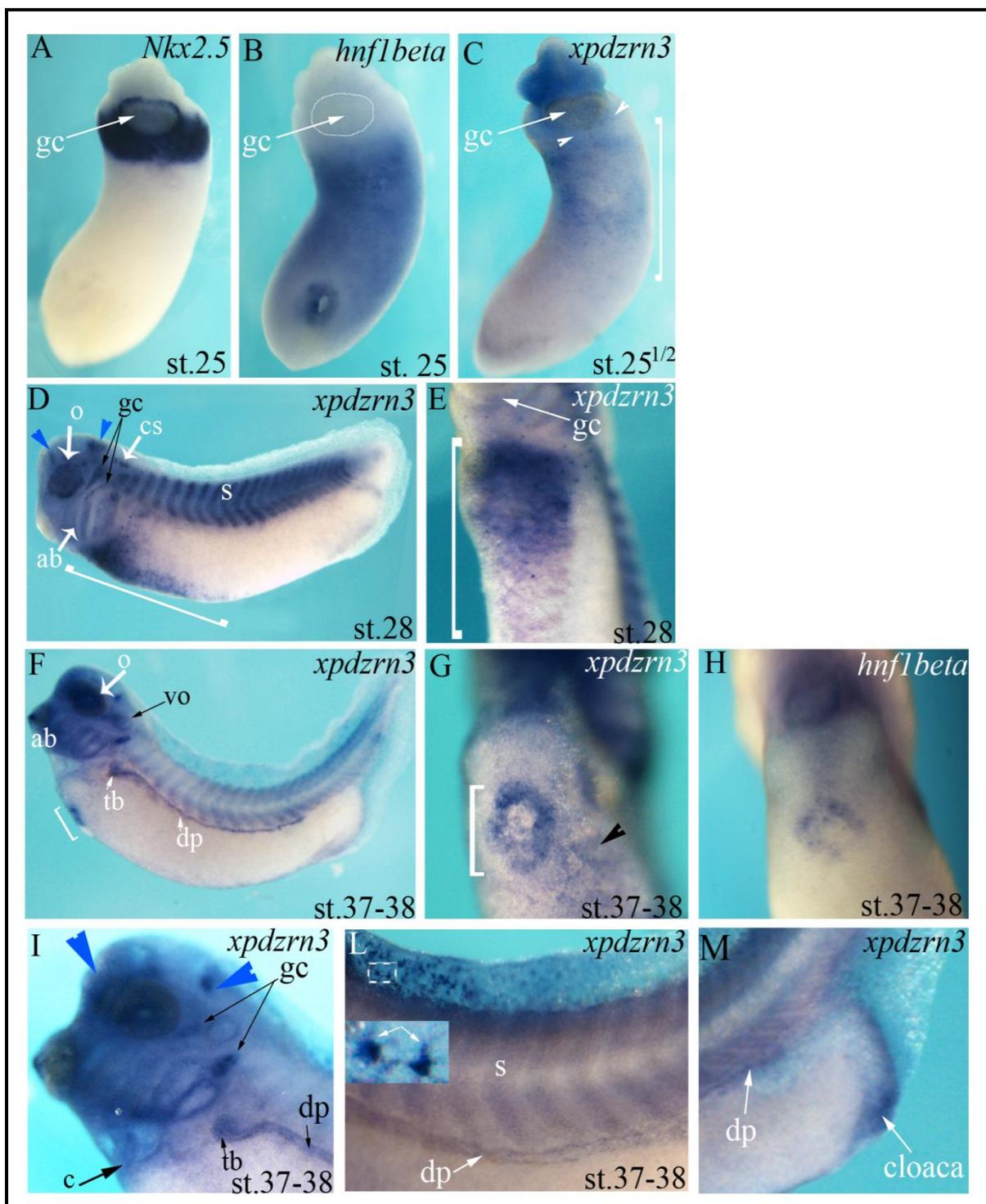
Tav 2. A) Sezione trasversale di un embrione a stadio 37-38 ibridato con la sonda *xpdzrn3*; le frecce rosse in (A) indicano l'espressione nel glomus, la freccia blu in (A) indica l'espressione nei tubuli pronefrici. B: rappresentazione schematica dell'istologia del pronefro in una sezione trasversale (Vize et al., 1997).

tubuli pronefrici (Tav.2 A, B).

Durante lo sviluppo di *Xenopus* il gene *xpdzrn3* si trova espresso, oltre che nel pronefro, in altre regioni dell'embrione.

A partire dallo stadio 22 fino all'ultimo stadio da noi analizzato (stadio 37-38) è possibile osservare la presenza del trascritto nei somiti in segmentazione (Tav 1, A, B, F, G).

Inoltre, gli stadi 22 e 25 mostrano espressione di *xpdzrn3* in una regione ventrale (Tav.1, A, B). In particolare, si osserva presenza del segnale intorno alla ghiandola del cemento e nella regione ventrale posta approssimativamente sotto la ghiandola del cemento nella metà anteriore dell'embrione (Tav.3, C). Come marcatori sono stati utilizzati: il gene *Nkx2.5*, che, a stadio 25, è espresso nell'abbozzo del cuore situato



Tav 3. Espressione di *xpdzrn3* in differenti distretti embrionali durante diversi stadi di sviluppo di *Xenopus laevis*. Le parentesi quadre in (C, D) indicano l'espressione di *xpdzrn3* nella regione ventrale degli embrioni; le punte di freccia bianche in (C) evidenziano un debole segnale intorno e sotto la ghiandola del cemento; la punta di freccia nera in (G) mostra il segnale di *xpdzrn3* diffuso nella regione ventrale mentre la parentesi quadra indica l'espressione di *xpdzrn3* nell'abbozzo epatico, a stadio 37-38; le frecce blu in (D, I) indicano differenti aree del sistema nervoso centrale. gc (in bianco), ghiandola del cemento; gc (in nero), gangli cefalici; o, occhio; vo, vescicola otica; ab, archi brachiali; cs, corda spinale; s, somiti; c, cuore; tb, tubuli pronefrici; dp, dotto pronefrico. A: stadio 25 ibridato con il marcatore cardiaco *nkx2,5*, dettaglio ventrale; B: stadio 25 ibridato con il marcatore *hnf1-β*, dettaglio ventrale; C: stadio 25,5 ibridato con *xpdzrn3*, dettaglio ventrale; D: stadio 28 ibridato con *xpdzrn3*; E: stadio 28 ibridato con *xpdzrn3*, dettaglio ventrale; F: stadio 37,38 ibridato con *xpdzrn3*; G: stadio 37-38 ibridato con *xpdzrn3*, dettaglio ventrale; H: stadio 37-38 ibridato con *hnf1-β*, dettaglio ventrale; I: st-37-38 ibridato con *xpdzrn3*, dettaglio cefalico; L: stadio 37-38 ibridato con *xpdzrn3* dettaglio della pinna dorsale e dei somiti, nel riquadro l'ingrandimento dell'area tratteggiata contenente cellule della pinna dorsale marcate con *xpdzrn3*; M: st 37-38 ibridato con *xpdzrn3* dettaglio caudale.

subito al di sotto della ghiandola del cemento ed intorno ad essa

(Tav.3, A), e il gene *hnf1b*, che, allo stesso stadio di sviluppo, mostra un dominio di espressione esteso in un'ampia regione ventrale, localizzato sotto la ghiandola del cemento (Tav.3, B)

Dallo stadio 28 allo stadio 37-38 il dominio di espressione di *xpdzrn3* pare restringersi in una regione dell'area ventrale, corrispondente alla zona di formazione del fegato, come evidenziato da ibridazioni in situ effettuate con il "probe" *hnf1b* (Tav.3 D- H).

Il segnale di ibridazione è evidente nella regione cardiaca a stadi di sviluppo più tardivi (stadio 37-38) (Tav.3 I).

Da stadio 28 a stadio 37-38 il trascritto *xpdzrn3* è presente in alcune regioni del Sistema Nervoso Centrale incluso la vescicola ottica ed in alcuni gangli cefalici (Tav. 3 D, F, I).

A stadio 37-38 *xpdzrn3* si trova espresso anche (Tav.3 F) in cellule della regione più anteriore della pinna dorsale (Tav 3 L.) e nella cloaca (Tav.1 M).

4.2. Esperimenti di perdita di funzione: "loss of function"

Gli esperimenti di "loss of function" del gene *xpdzrn3* sono stati condotti iniettando un morfolino di 20 basi disegnato sulla zona d' inizio traduzione del relativo trascritto (cf. Materiali e Metodi § paragrafo 3.2).

Le iniezioni sono state eseguite in embrioni di *Xenopus laevis* a stadio di due cellule, iniettando un singolo blastomero e lasciando l'altro come controllo.

La zona scelta per l'iniezione è la zona marginale, che corrisponde al territorio presuntivo mesodermico durante lo sviluppo embrionale di *Xenopus*.

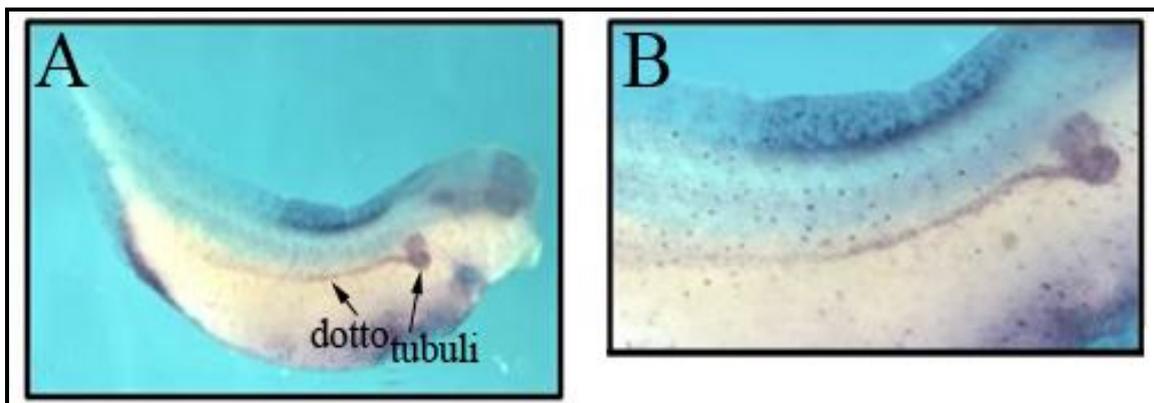
L'utilizzo del gene codificante per la β -galattosidasi usato come tracciante, permette di evidenziare con una colorazione rossa, il lato iniettato per distinguerlo da quello di controllo.

Per lo studio degli effetti provocati dal morfolino abbiamo scelto di esaminare prima gli stadi di sviluppo più tardivi (37-38) quando il pronefro diventa completamente funzionale (Nieuwkoop and Faber., 1964) in modo da accertare eventuali alterazioni nella formazione del pronefro. Successivamente abbiamo esaminato i fenotipi a stadi precoci, (22-23), quando inizia lo sviluppo dell'area presuntiva pronefrica, monitorando l'espressione dei principali geni coinvolti in questo processo.

4.2.1. Analisi dei fenotipi mediante uso di marcatori del pronefro

4.2.1.1. Ibridazione con Na^+, K^+ -ATPase a stadio 37-38:

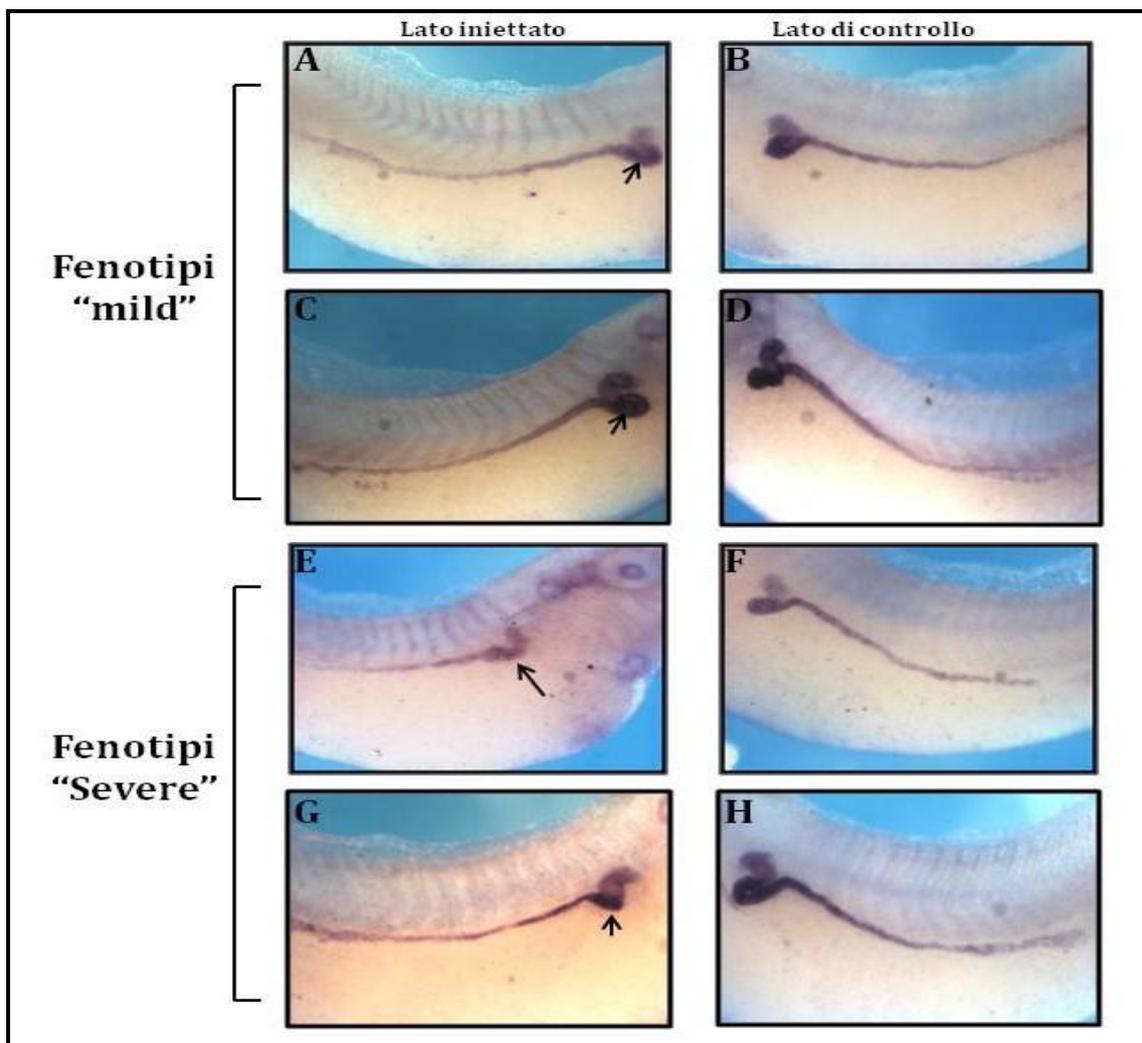
Il gene codificante per la Na^+, K^+ -ATPase è stato utilizzato come marcatore pan-pronefrico, in quanto risulta espresso nel pronefro di embrioni di *Xenopus* a stadio 37-38 sia a livello dei tubuli che del dotto (Tav. 4 A, B).



Tav 4. Espressione della Na^+, K^+ -ATPase in embrioni di *Xenopus laevis* a st 37-38 (A); B) dettaglio dei tubuli e del dotto pronefrico mostrati in (A).

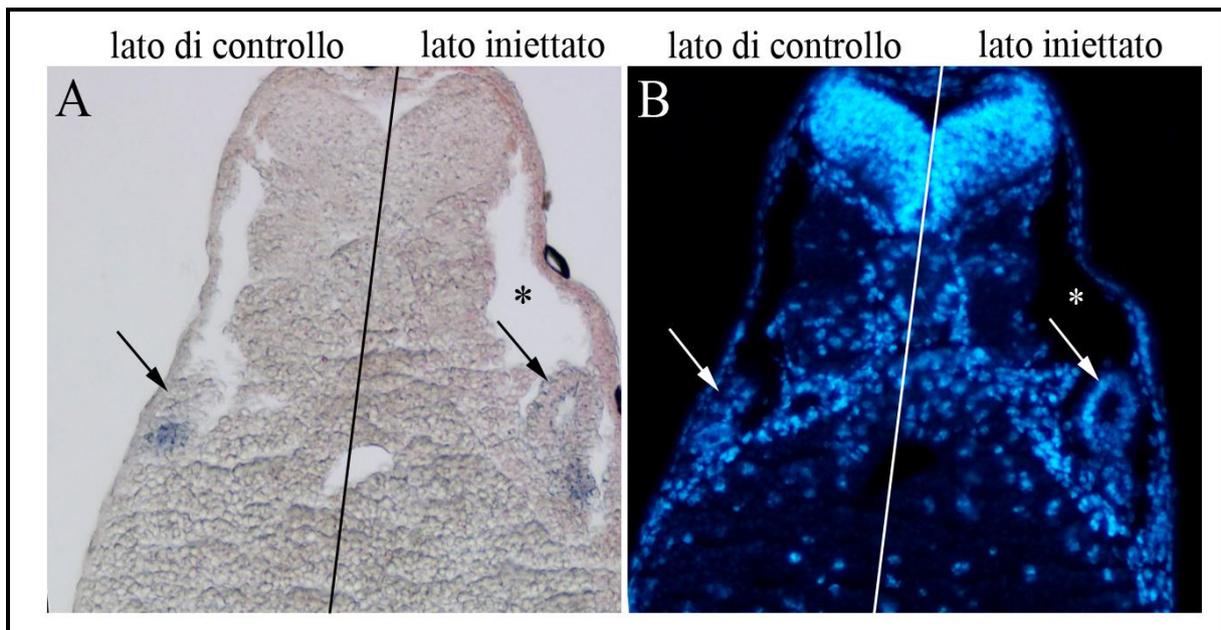
L'ibridazione con la sonda per la Na^+ , K^+ -ATPase, dopo iniezione di morfolino, mette in evidenza un'alterazione della zona tubulare nel lato iniettato rispetto al lato di controllo. In particolare è possibile osservare un'alterazione a livello delle anse dei tubuli prossimali, che sembrano non riuscire a creare una corretta circonvoluzione (embrioni analizzati: n=33, fenotipi alterati=81,8%) (Tav. 5 A-H).

Contrariamente a quanto osservato per i tubuli prossimali del pronefro il dotto invece non sembra subire alterazioni dovute al silenziamento del gene *xpdzrn3*.



Tav 5. Esperimenti di "loss of function" con iniezioni di Mo-*xpdzrn3*; gli embrioni (st.37-38) sono stati ibridati con Na^+ , K^+ -ATPase; le frecce indicano alterazione nei tubuli prossimali nel lato iniettato degli embrioni.

L'analisi dettagliata dei fenotipi ha rivelato una certa variabilità nelle alterazioni del pronefro, abbiamo perciò deciso di distinguere e suddividere le alterazioni fenotipiche in due categorie che sono state denominate: "mild" (60%) e "severe" (40%) (Tav. 5 A-H), in base al livello di deformazione e allargamento del coiling dei tubuli prossimali rispetto al corrispondente lato di controllo: lieve (Tav. 5 A, C), o forte allargamento del "coiling" (Tav. 5 E, G) rispettivamente.



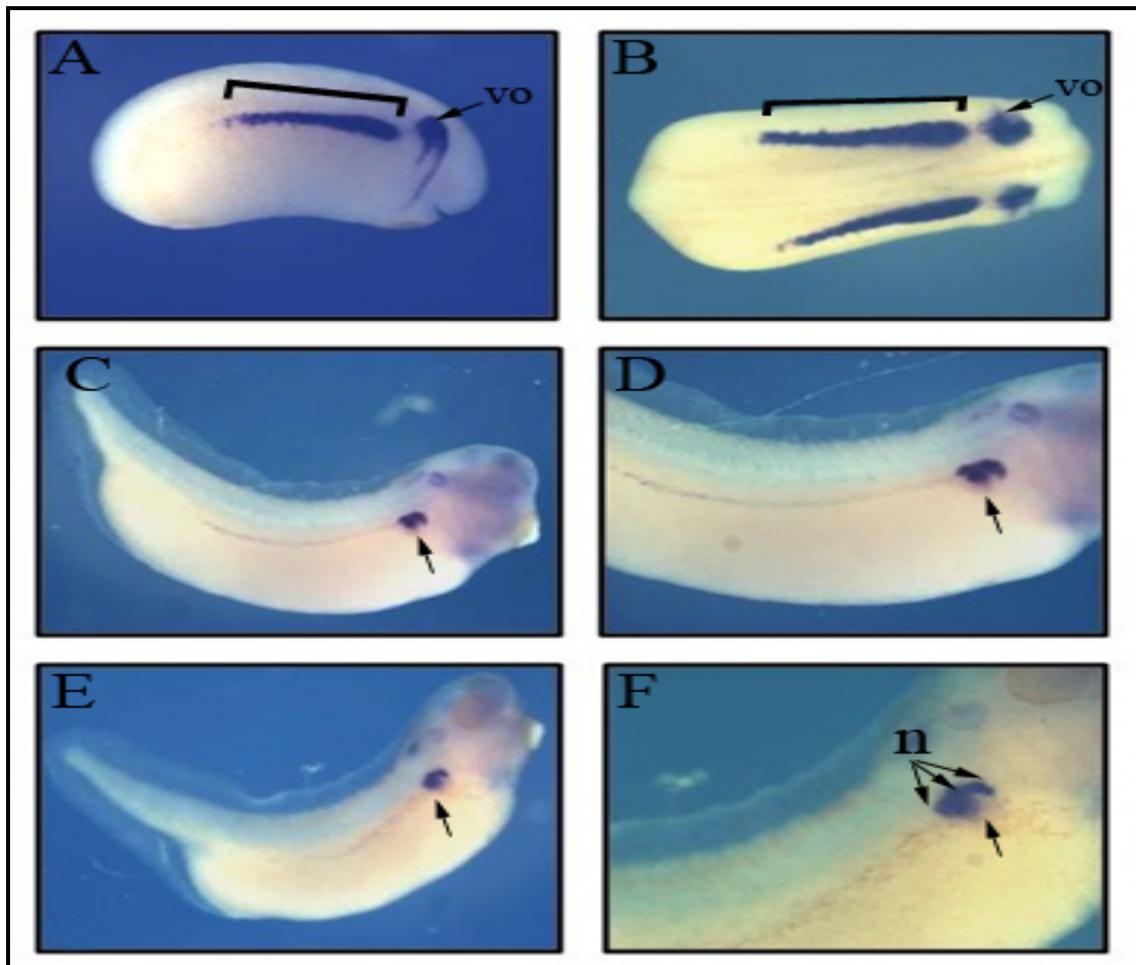
Tav 6. A) Sezione istologica trasversale di un embrione a st. 37-38 iniettato con Mo-*xpdzrn3* e ibridato con Na⁺,K⁺-ATPase. B) Colorazione Hoechst della sezione mostrata in (A). Le frecce indicano i tubuli pronefrici; gli asterischi indicano presenza di edema nel lato iniettato.

I dati istologici di embrioni a stadio 37-38 iniettati con Mo-*xpdzrn3* mostrano, nei lati iniettati, un allargamento della regione dei tubuli evidenziata con il marcatore Na⁺,K⁺-ATPase (Tav 6. A-B). Non abbiamo riscontrato alterazioni del dotto nei lati che hanno subito iniezione (Tav. 5 A, C, E, G).

Gli embrioni con fenotipo “mild” mostrano allargamento del lume dei tubuli prossimali nel lato iniettato rispetto a quello di controllo e presenza di edema nel lato iniettato (Tav.6 A, B).

4.2.1.2. Ibridazione con *pax8* a stadio 22-23 e 37-38:

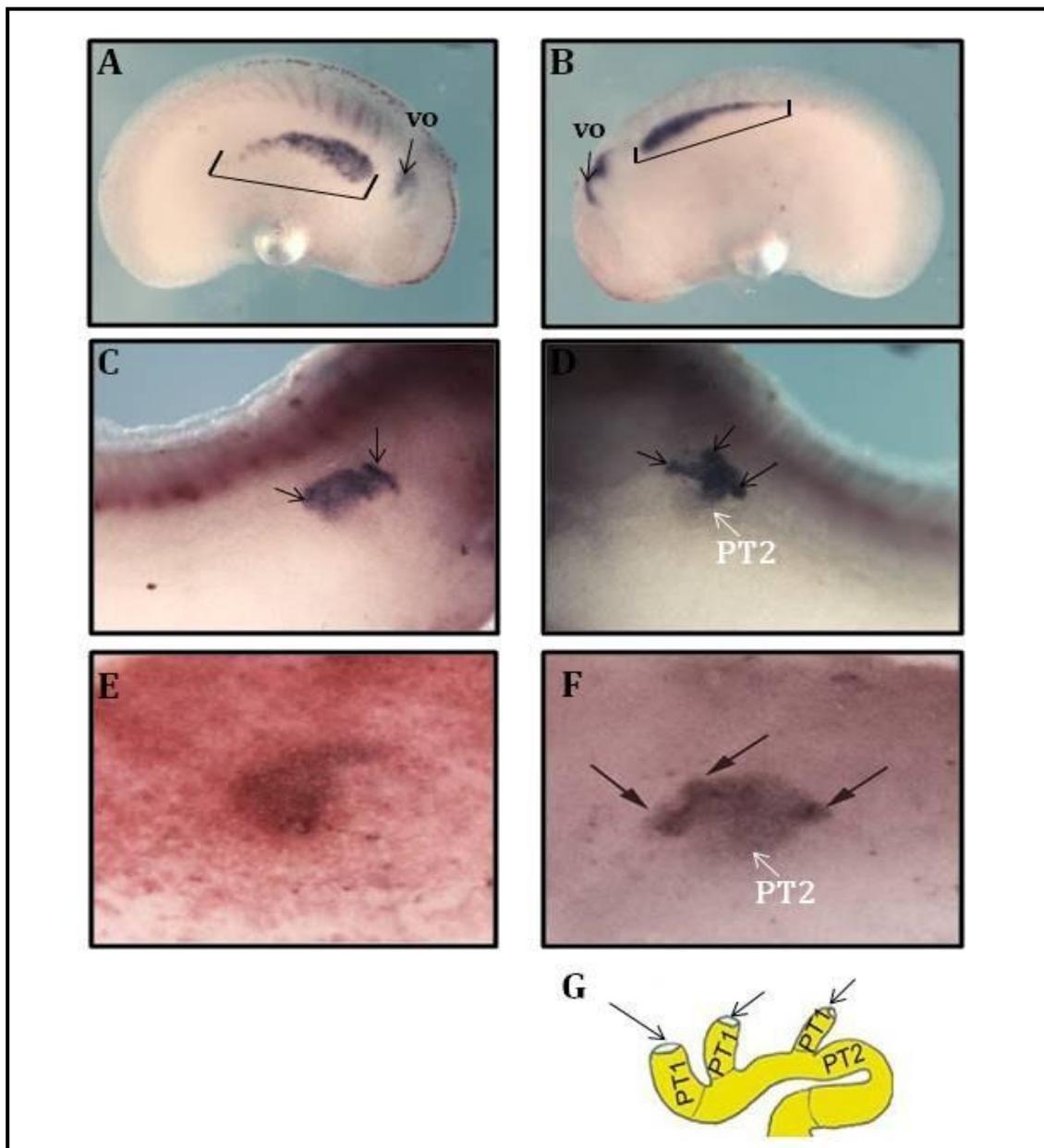
In *Xenopus laevis* l'espressione di *pax8* inizia durante le fasi di nerula precoce a livello del pronefro in formazione e della vescicola otica. Negli stadi di sviluppo più avanzati il dominio di espressione si restringe progressivamente ai tubuli prossimali, interessando in modo particolare la zona nefrostomica (Tav 7. A-F).



Tav 7. Espressione del gene *pax8* in *Xenopus laevis* in differenti stadi dell'embriogenesi. le frecce nere in C-F indicano i tubuli pronefrici; la parentesi quadra in A-B mette in evidenza l'area pronefrica precoce; n, nefrostomi; VO, vescicola otica. A: st. 22-23; B: st 22-23 vista dorsale; C: st. 33-34 D: stadio, 33-34 dettaglio dei tubuli prossimali; E: st. 37-38; F: st. 37-38, dettaglio dei tubuli prossimali.

Ho utilizzato *pax8* sia come marcatore dell'area presuntiva del pronefro a stadi precoci di sviluppo, st 22-23, sia come marcatore della regione nefrostomica durante stadi più tardivi, st 37-38 (Tav 7. A-F).

I fenotipi ottenuti a stadio 22-23 mostrano come il silenziamento di *xpdzrn3*, dovuto ad iniezione di morfolino, porti ad un accorciamento e una diffusione del segnale di *pax8* nel lato iniettato rispetto al lato di



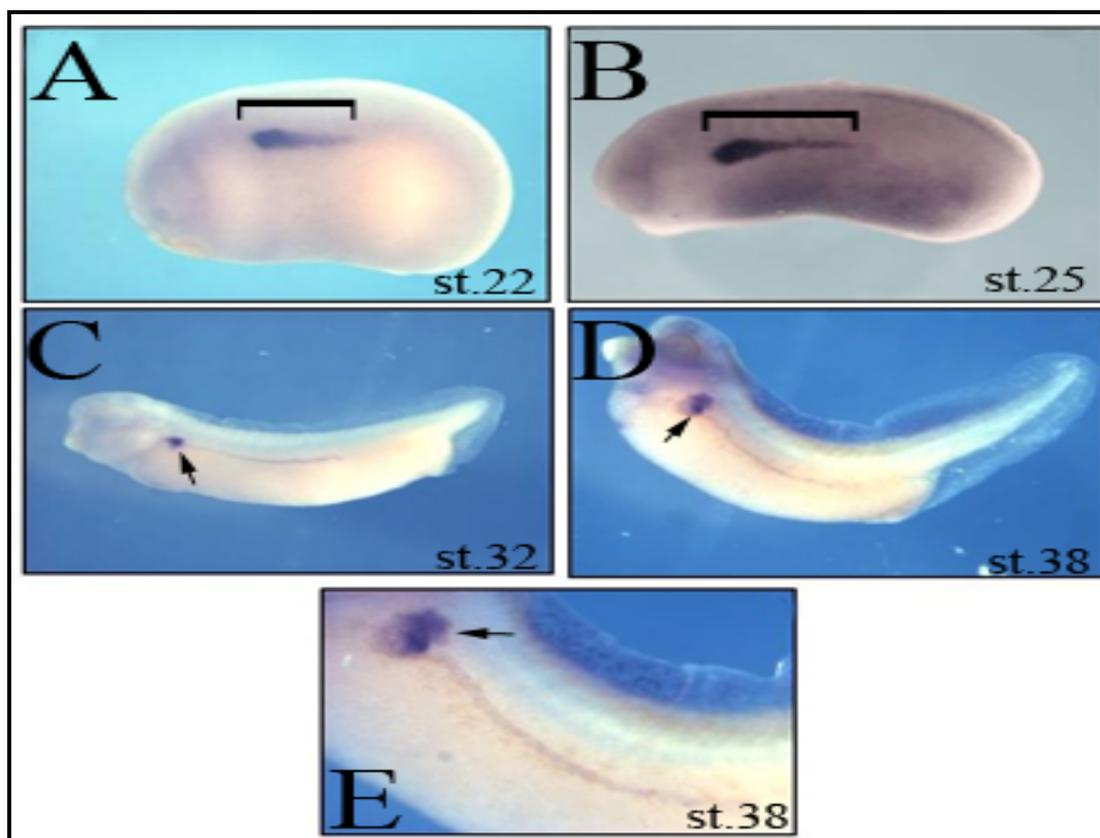
Tav 8. Esperimenti di "loss of function" con iniezioni di Mo-*xpdzrn3*, gli embrioni sono stati ibridati con il marcatore genico *pax8*. La parentesi quadra in A-B mostra la zona pronefrica; le frecce nere indicano la posizione dei nefrostomi in C, D, F; VO, vescicola otica; PT, "proximal tubular". A: st. 22-23, lato iniettato; B: st.22-23, lato di controllo; C, E: st.37-38, lato iniettato; D, F: st 37-38, lato di controllo; G: rappresentazione schematica dei tubuli prossimali PT1, PT2 e dei nefrostomi (Li et al., 2012).

controllo (Tav. 8 A-B); questo fenotipo si ripete nell' 80,6% degli embrioni iniettati (n= 36).

Anche negli stadi tardivi, st 37-38, la mancata traduzione di *xpdzrn3* mostra, tramite utilizzo di *pax8* come marcatore, un'alterazione dovuta principalmente allo scorretto posizionamento dei nefrostomi, rispetto al lato di controllo non iniettato (Tav. 8 C, E). Normalmente nel lato di controllo i tre nefrostomi si dispongono sulla cavità celomatica formando una struttura triangolare (come evidenziato da frecce nere nel pannello D, F di Tav. 8); nel 65,7% dei casi (n=35), i nefrostomi mostrano una posizione alterata o addirittura uno dei tre nefrostomi viene a mancare (Tav. 8 C, E).

4.2.1.3. Ibridazione con *hnf1β* a stadio 22-23 e 37-38:

Il gene *hnf1β* è espresso a livello dell'area presuntiva pronefrica in



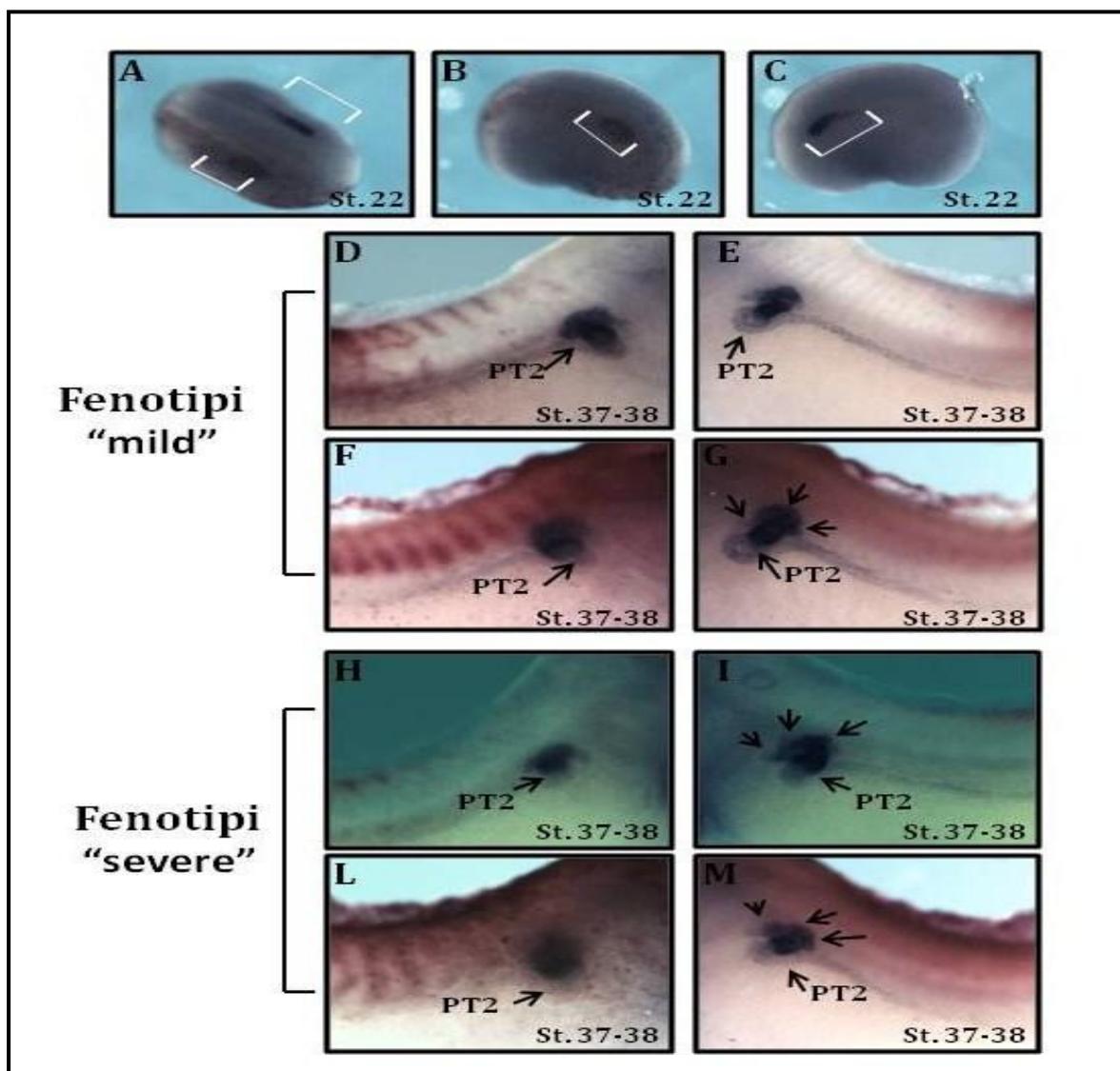
Tav. 9. Espressione di *hnf1-β* durante differenti stadi di sviluppo in *Xenopus laevis*. Le parentesi quadre in (A, B) evidenziano l'area presuntiva del pronefro a stadi precoci; le frecce nere in (C-E) indicano i tubuli prossimali E) dettaglio della marcatura di *hnf1-β* prossimali mostrata in (D).

embrioni di *Xenopus* a st. 21-22. A stadi più avanzati questo gene si trova espresso principalmente nei tubuli prossimali e parzialmente nel dotto (Tav. 9 A-E).

Abbiamo utilizzato *hnf1β* come marcatore sia dell'area di sviluppo precoce del pronefro (st. 22-23), che del "looping" tubulare a stadio 37-38.

A stadio 22-23 il lato iniettato evidenzia nel 82% degli embrioni iniettati (n=39) un'alterazione del dominio di espressione di *hnf1b*, rispetto a lato di controllo. In particolare, nel lato iniettato, abbiamo osservato un effetto di espansione/diradazione del segnale di ibridazione di *hnf1b* (Tav. 10 A-C).

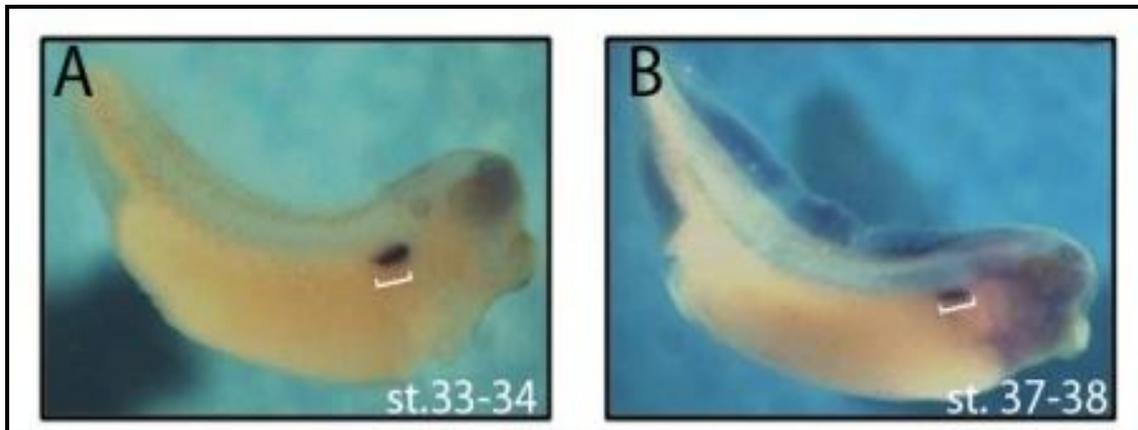
A stadio 37-38 il 71,8% degli embrioni iniettati (n= 39), mostra un'errato "coiling" o circumvoluzione delle anse dei tubuli prossimali nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (Tav 10 D-M). In particolare, il 39,3% dei casi mostra una riduzione con mancata chiusura dell'ansa PT2 (cf. Fig. 4_paragrafo 1.2.) e sono stati classificati come fenotipo "severe" (Tav. 10 H, L); il 60,7% dei casi presenta una leggera apertura del "coiling" dei tubuli prossimali, con tentativo di chiusura dell'ansa PT2 questi fenotipi sono stati classificati come "mild" (Tav. 10 D, F).



Tav 10. Esperimenti di "loss of function" con iniezioni di *Mo-xpdzrn3*, gli embrioni sono stati ibridati con il marcatore *hnf1-β*. Le parentesi quadre nelle figure (A-C) sottolineano l'area presuntiva del pronefro; le frecce indicano, dove visibili, i nefrostomi (G, I, M); PT2, prossimal tubular 2. A: embrione st. 22 iniettato, vista dorsale; B: st.22, lato iniettato; C: st.22, lato di controllo; D, F, H, L: st 37-38, lato iniettato; E, G, I, M: st 37-38, lato di controllo.

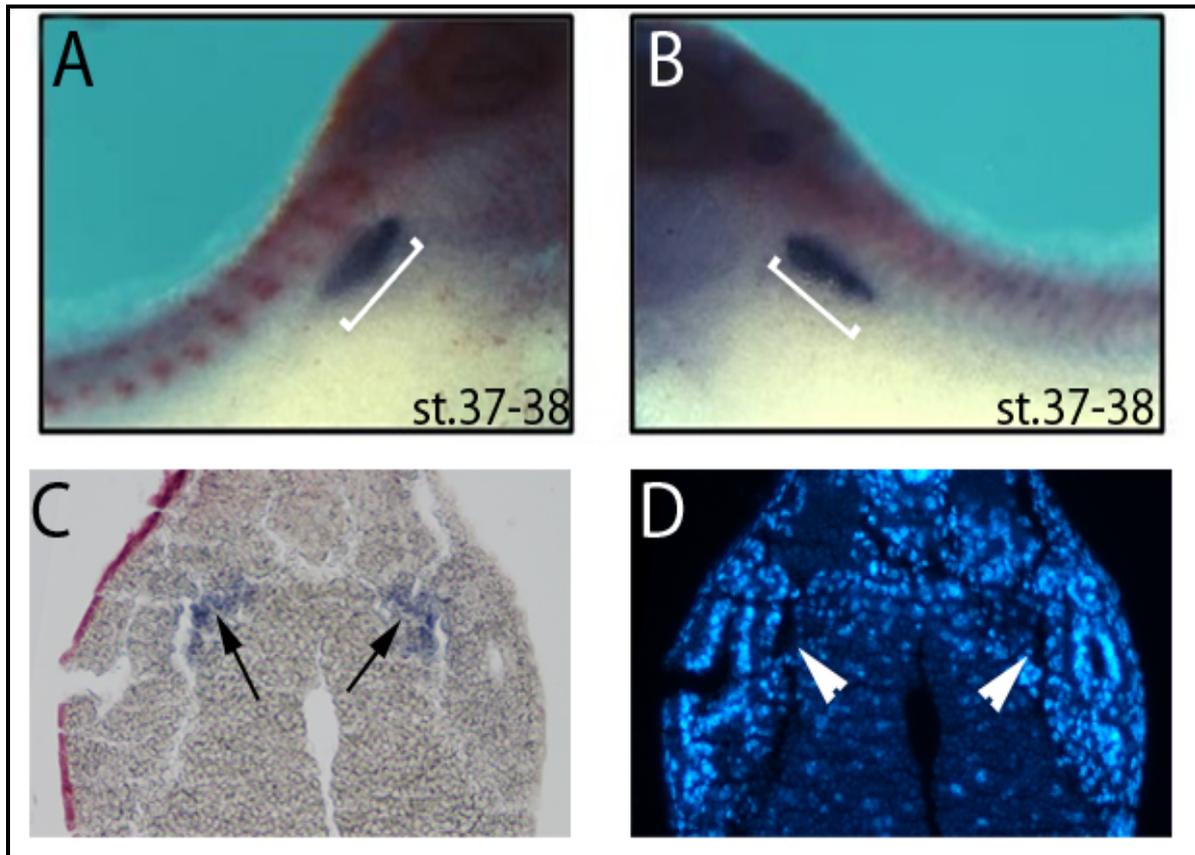
4.2.1.4. Ibridazione con *nefrina* a stadio 37-38:

A stadio embrionale 33-34 di *Xenopus*, il trascritto *nefrina* si trova espresso in una regione situata al di sotto dei somiti 2-4 ed evidenzia la regione del glomus fino agli stadi più tardivi da noi esaminati (st. 37-38) (Tav. 11 A-B).



Tav 11. Espressione della *nefrina* in differenti stadi di sviluppo di *Xenopus laevis*. La parentesi quadra evidenzia l'espressione della *nefrina* nel glomus di *Xenopus*. A: stadio 33-34; B: stadio 37-38

Gli embrioni iniettati con morfolino Mo-pdzn3 (n=23) e successivamente ibridati con la sonda nefrina, mostrano assenza di alterazioni a livello del glomus nel 60,9% dei casi (Tav 12. A-D). Il 39,1% degli embrioni mostrava un fenotipo variabile, rivelando per circa il 50% dei casi espansione del dominio della nefrina, mentre per il restante 50% riduzione dello stesso dominio.



Tav 12. Esperimenti di "loss of function" tramite iniezioni di *Mo-xpdzrn3*, gli embrioni iniettati sono stati ibridati con *nefrina*, nella tavola sono mostrate l'espressione e le sezioni istologiche. La parentesi quadra in A-B mostra l'espressione della *nefrina* nel glomus; le frecce nere in C indicano l'espressione della *nefrina* nelle sezioni di embrioni a st-37-38; Le punte di freccia bianche indicano il nefrocele. A: st.37-38, lato iniettato; B: st. 37-38, lato di controllo; C: sezione trasversale st 37-38, il lato sinistra è iniettato il lato destro è di controllo; D: sezione trasversale 37-38 in Hoechst

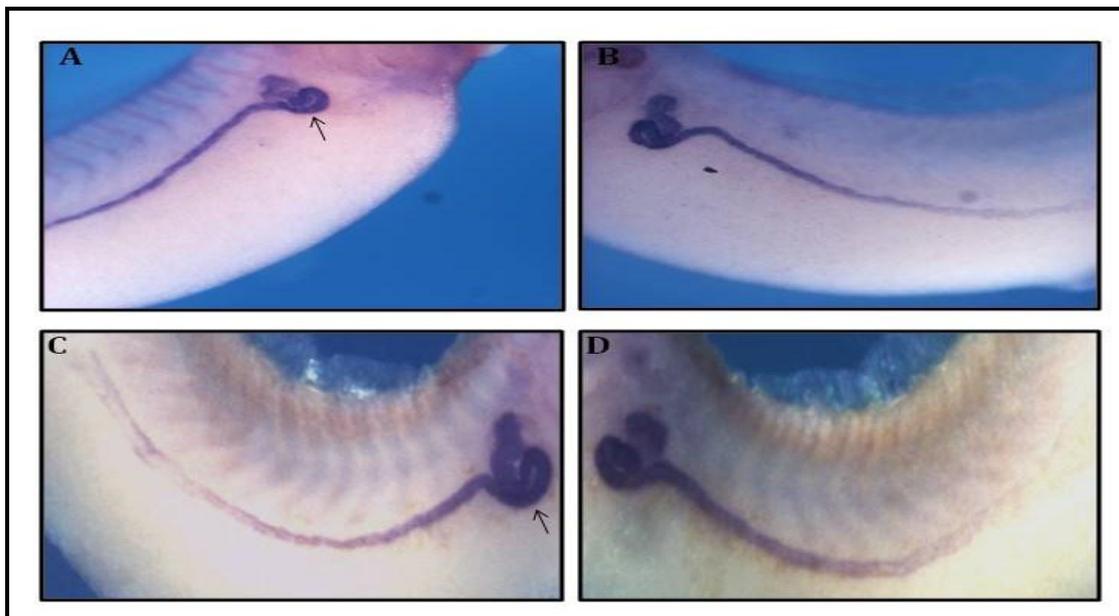
L'analisi istologica degli embrioni con assenza di fenotipo conferma i risultati visibili su embrione intero, presentando mancanza di evidenti alterazioni a livello del glomus in seguito ad iniezione (Tav. 12 C, D).

4.2.1.5. Iniezioni di morfolino “standard”:

Il morfolino standard, usato in esperimenti di controllo, è stato iniettato, analogamente a Mo-*pdzrn3*, con una concentrazione di 1pmole a stadio di 2 cellule in un singolo blastomero nella zona marginale, territorio presuntivo di formazione mesodermica, utilizzando come tracciante la β -galattosidasi.

Il 67,9% degli embrioni iniettati con morfolino standard ed ibridati con $Na^+,K^+-ATPase$ (n=28), non mostrano evidenti alterazioni dei tubuli o del dotto pronefrico, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (Tav 13 A, C).

Quindi riteniamo che i risultati ottenuti tramite iniezione di morfolino diretto contro *xpdzrn3* possano essere effettivamente dovuti al silenziamento del gene *xpdzrn3*.



Tav 13. Iniezioni di Mo-standard, ibridati con $Na^+,K^+-ATPase$; le frecce indicano i tubuli prossimali. A-C: st. 37-38, lato iniettato; B-D: st.37-38, lato di controllo.

4.3. Saggi di “rescue” :

Gli esperimenti di “rescue” sono stati eseguiti iniettando il trascritto dell’omologo del gene *pdzrn3* di *Danio rerio* (cf. Materiali e Metodi § 3.2).

Il trascritto è stato co-iniettato insieme a *Mo-xpdzrn3* allo stadio embrionale di due cellule in un singolo blastomero, utilizzando come tracciante la β -galattosidasi.

Prima di eseguire i saggi di rescue abbiamo effettuato delle prove di tossicità iniettando *pdzrn3* di zebrafish in un singolo blastomero di embrioni a stadio 2. Questi embrioni sono stati cresciuti fino a stadio 37-38 e i fenotipi sono stati analizzati mediante ibridazione “whole-mount” diretta contro il marcatore pan-pronefrico *Na⁺,K⁺-ATPase*. Le concentrazioni scelte per le analisi di tossicità sono state di 200, 300 e 600 *pg*.

In seguito ai dati abbiamo deciso di utilizzare la concentrazione minore di mRNA di *pdzrn3* proveniente da zebrafish (200 *pg*) che garantiva una sopravvivenza elevata ed una bassa alterazione pronefrica.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti, mediante uso di differenti marcatori, negli esperimenti di “rescue”. Le percentuali sono riferite al recupero del lato iniettato che assume un fenotipo simile al lato di controllo:

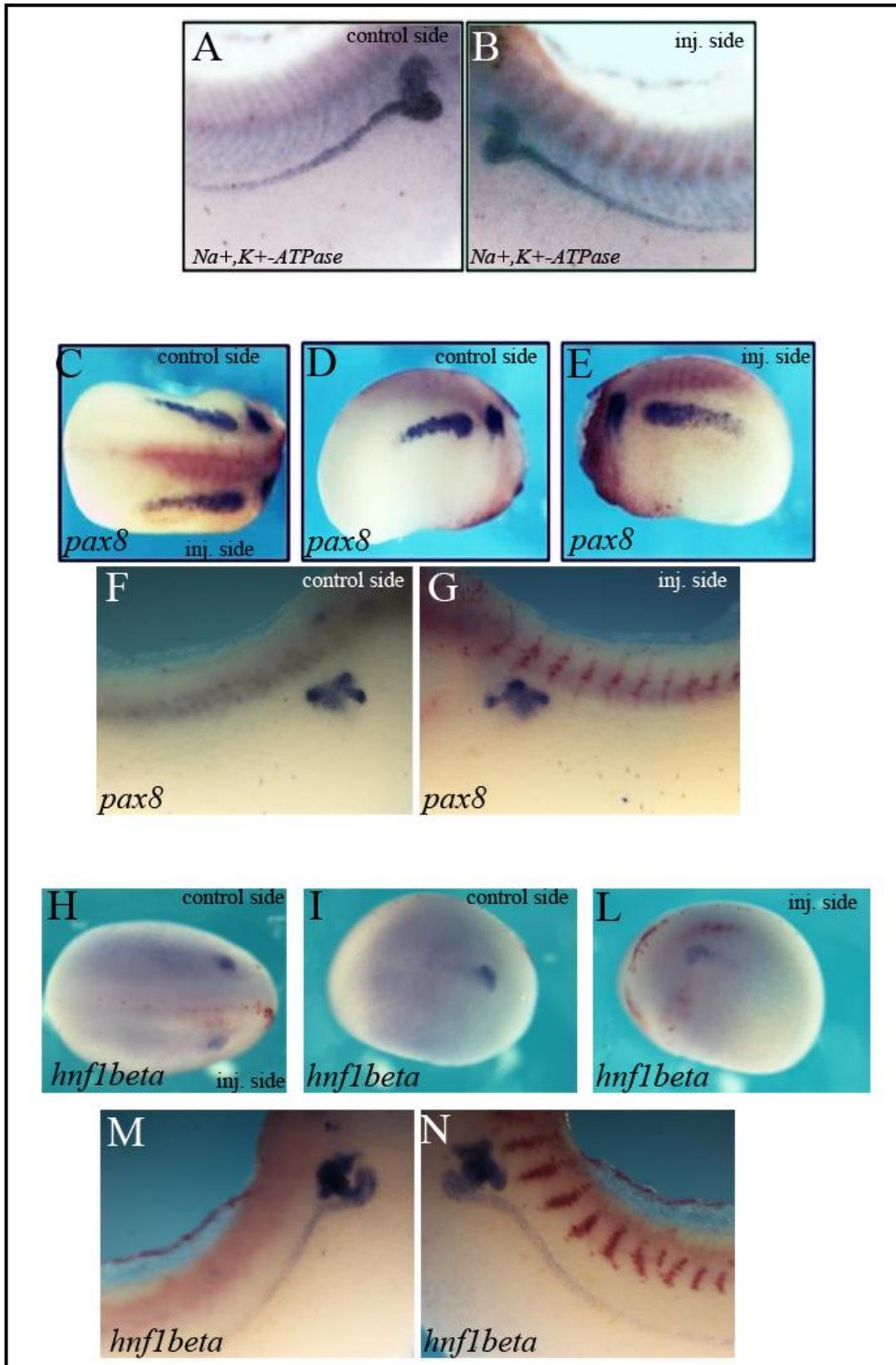
-il marcatore *Na⁺,K⁺-ATPase* a stadio 37-38 mostra un recupero del fenotipo pari al 69,65%, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (n=51) (Tav 14. A, B).

-il marcatore *pax8* a stadio 22-23 mostra un recupero del fenotipo pari al 69,7%, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (n=43) (Tav 14. C-E).

-il marcatore *pax8* a stadio 37-38 mostra un recupero del fenotipo pari al 70%, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (n=40) (Tav 14. F, G).

-il marcatore *hnf1 β* a stadio 22-23 mostra un recupero del fenotipo pari al 63%, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (n=35) (Tav 14. H, L).

-il marcatore *hnf1 β* a stadio 37-38 mostra un recupero del fenotipo pari al 68%, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo (n=50) (Tav 14. M, N).



Tav 14. (A-N) embrioni iniettati per saggi di "rescue". (C,D,E,H,I,L) st 22-23; (A,B,F,G,M,N) st 37-38; M) lato di controllo; N) lato iniettato

5. Discussione e conclusioni

Il gene *pdzrn3* codifica per una proteina contenente due domini PDZ e un dominio “Ring finger” implicato nei processi di ubiquitinizzazione proteica (Ko et al., 2006). Il ruolo di *pdzrn3* è ancora poco conosciuto, fra le funzioni note vi è il differenziamento di culture cellulari in miociti e il blocco di “pathway” adipogenici e osteogenici (Ko et al., 2006; Honda et al., 2010 e 2013).

Durante il mio lavoro di tesi è stata caratterizzata l'espressione genica dell'omologo di *pdzrn3*, *xpdzrn3*, nell'organismo modello *Xenopus laevis*.

Durante la caratterizzazione abbiamo osservato un'espressione del gene *xpdzrn3* nel pronefro, sia durante gli stadi precoci di sviluppo di quest'area (stadio 22), sia durante le fasi tardive (stadio 37-38), in cui il pronefro diviene completamente funzionale (Vize et al., 1997; Nieuwkoop and Faber, 1964).

Nelle fasi iniziali di formazione dell'area pronefrica, stadio 22, il segnale d'espressione di *xpdzrn3* si presenta con degli “spots” al di sotto dei somiti 2 e 3. Il dominio di espressione di *xpdzrn3* è stato confrontato con due marcatori dell'area presuntiva pronefrica, *pax8* e *hnf1β*. Entrambi i geni sono fattori di trascrizione implicati nel corretto sviluppo dell'area pronefrica precoce (Carrol and Vize., 1999; Wu et al., 2004).

L'espressione di *xpdzrn3* durante le fasi precoci di sviluppo del pronefro, stadio 22, si trova compresa nel dominio di espressione sia di *pax8* che di *hnf1β*, indicando quindi la presenza del trascritto nell'area pronefrica in formazione.

Negli stadi successivi, stadio 25 e stadio 28, il segnale, da “spotted-like”, diviene uniforme, rimanendo al di sotto dei somiti 2 e 3 nella zona pronefrica in formazione.

A stadio 37-38 *xpdzrn3* si trova espresso a livello dei tubuli, del dotto del pronefro e, come dimostrato dalle sezioni istologiche, anche nel glomus, suggerendo che il gene *xpdzrn3* sia legato allo sviluppo del pronefro durante l'embriogenesi di *Xenopus laevis*.

Xpdzrn3 mostra un'espressione non solo nel pronefro in formazione ma anche in altri distretti embrionali di *Xenopus*. Negli stadi da noi osservati (stadio 22, 25, 28, 37-38) è evidente un'espressione di *xpdzrn3* nei somiti in formazione, analogamente a quanto dimostrato per il suo interattore proteico Kidins220 (Nieuwkoop and Faber., 1967; Andreazzoli et al., 2011; Marracci et al., 2013).

Da stadio 22 a stadio 28, il trascritto *xpdzrn3* è presente in una regione ventrale dell'embrione che, per posizione, potrebbe corrispondere ad una delle zone di formazione della linea emangioblastica denominata VBI (ventral blood island). Da questa linea originano le cellule staminali ematopoietiche ed endoteliali di *Xenopus* (Godin and Cumano, 2006; Mead et al., 2001). A stadio 37-38, il segnale di *xpdzrn3* presente nella regione ventrale, si restringe nella zona di formazione del fegato come dimostrato dal marcatore epatico *hnf1 β* (Mendel et al., 1991).

A stadio 37-38, *xpdzrn3* viene espresso in cellule della pinna dorsale, analogamente a quanto già osservato con l'interattore proteico di *Xpdzrn3*, Kidins220 (Marracci et al., 2013). A stadio 25 il segnale di *xpdzrn3* è presente nella regione embrionale situata intorno e subito al di sotto della ghiandola del cemento. Questo distretto embrionale corrisponde alla zona di formazione dell'abbozzo cardiaco, come evidenziato dal "master regulator" cardiaco *Nkx 2.5* (Nagao K et al., 2008). A stadi più tardivi (stadio 37-38), è evidente la presenza del trascritto *xpdzrn3* nella regione cardiaca. Analogamente a quanto già osservato con l'interattore proteico di *Xpdzrn3*, Kidins220 (Marracci et al., 2012) l'espressione di *xpdzrn3* è stata osservata, nella finestra

temporale di sviluppo da noi analizzata, in ulteriori tessuti tra cui, sistema nervoso centrale incluso l'occhio, gangli cefalici, vescicola otica, archi brachiali.

Da questo studio di espressione è emerso che il gene *xpdzrn3* si trova espresso in maniera dinamica durante lo sviluppo del pronefro. Per questo motivo è stato deciso di intraprendere uno studio di funzione mediante esperimenti di "loss of function", analizzando l'area di formazione del pronefro.

Tali esperimenti sono stati condotti utilizzando un oligonucleotide morfolino, costruito sulla sequenza del trascritto di *xpdzrn3*. Lo studio dello sviluppo precoce del pronefro è stato seguito analizzando due marcatori di quest'area, *pax8* e *hnf1-β*, in embrioni a stadio 22-23. *Pax8* è un fattore di trascrizione espresso nel pronefro in formazione, implicato nel corretto sviluppo dell'area pronefrica precoce di *Xenopus* (Carol and vize., 1999; Heller et al., 1999); il gene *hnf1β*, agisce da antagonista di *pax8* e ne regola l'espressione nel pronefro di *Xenopus* (Wu et al., 2004).

L'utilizzo di morfolino contro *xpdzrn3* ha evidenziato nel lato iniettato di embrioni a stadio 22-23 un'alterazione dei domini di espressione sia di *pax8* che di *hnf1β*. In particolare si osserva, in seguito ad iniezione di morfolino contro *xpdzrn3*, accorciamento e diffusione del dominio di espressione di *pax8*; *hnf1-β*, nel lato d'iniezione, subisce una espansione/diradazione del suo dominio. Questi esperimenti suggeriscono un ruolo di *xpdzrn3* durante le fasi di sviluppo precoce dell'area presuntiva pronefrica.

L'analisi degli stadi tardivi di sviluppo pronefrico, stadio 37-38, è stata condotta utilizzando i marcatori *Na⁺,K⁺-ATPase*, *hnf1-β* e *pax8*. La proteina codificante per l'enzima *Na⁺,K⁺-ATPase* è espressa in *Xenopus* sin dalla stadio 26, sia nei tubuli pronefrici che nel dotto pronefrico (Eid et al., 2001).

Le iniezioni di morfolino diretto contro *xpdzrn3* nel lato iniettato evidenziano un'alterazione dell'espressione della *Na⁺,K⁺-ATPase* a livello dei tubuli, lasciando inalterata l'espressione nel dotto pronefrico. Dall'analisi dei fenotipi ottenuti sembra che l'alterazione coinvolga le circonvoluzioni dei tubuli pronefrici. In particolare, l'analisi istologica mette in evidenza un allargamento del lume tubulare.

In seguito all'utilizzo del marcatore *Na⁺,K⁺-ATPase* abbiamo deciso di concentrare l'attenzione sulla zona tubulare utilizzando nuovamente come marcatori *pax8* e *hnf1 β* . Entrambi i marcatori a stadio 37-38 vengono espressi a livello dei tubuli di embrioni a stadio 37-38. *Pax8* viene espresso a livello dei tubuli prossimali, marcando la zona nefrostomica; questo gene è correlato allo sviluppo dei tubuli prossimali di *Xenopus* (Carroll and Vize, 1999; Heller et al., 1999). *Hnf1 β* viene espresso in tutta la zona tubulare, portando alla segmentazione dei tubuli prossimali, intermedi e distali in *Danio rerio* e topo (Naylor et al., 2013; Heliot et al., 2013; Massa et al., 2013).

L'inibizione traduzionale di *xpdzrn3* tramite iniezione di morfolino mostra nel lato iniettato un'alterazione tubulare evidenziata soprattutto dal marcatore *hnf1- β* . In particolare si osserva una mancata circonvoluzione delle anse tubulari a livello della zona PT2 (vedi Introduzione § 1.2. Fig 4.).

Il marcatore *pax8* mette in evidenza nel lato iniettato, rispetto a quello di controllo, un alterato posizionamento dei nefrostomi. Questo fenotipo potrebbe essere dovuto all'alterazione dei tubuli a carico della zona PT2: secondo questa ipotesi, lo scorretto avvolgimento di questa zona porterebbe alla conseguente alterazione posizionale dei nefrostomi.

Inoltre, durante la caratterizzazione di *xpdzrn3*, abbiamo osservato l'espressione di questo gene anche nel glomus di embrioni a stadio 37-38. Pertanto abbiamo studiato una possibile alterazione di questa regione

pronefrica utilizzando il marcatore *nefrina*. La maggior parte dei fenotipi non ha mostrato alterazioni del glomus, nel lato iniettato rispetto al lato di controllo.

In parallelo, sono state effettuate iniezioni di morfolino standard utilizzando la sonda *Na⁺,K⁺-ATPase*. Nella maggior parte dei casi la zona iniettata non mostrava nessuna alterazione rispetto al controllo, indicando perciò che le alterazioni osservate nel pronefro sono legate in modo specifico all'iniezione di morfolino diretto contro *xpdzrn3*.

I saggi di "rescue" hanno mostrato nella maggior parte dei casi un recupero dei fenotipi osservati in seguito alle iniezioni di morfolino diretto contro *xpdzrn3*.

In conclusione possiamo sostenere che:

- il gene *xpdzrn3* ha un'espressione dinamica durante lo sviluppo del pronefro di *Xenopus laevis*.
- da quanto emerso dagli studi di funzione è possibile ipotizzare che, negli stadi precoci, *xpdzrn3* sia implicato nella regolazione della corretta formazione dell'area presuntiva pronefrica e a stadi più tardivi, *xpdzrn3* possa svolgere un ruolo nello sviluppo e nel corretto avvolgimento delle anse dei tubuli prossimali.

6. Referenze

- Andreazzoli M., Gestri G., Landi E., D'Orsi B., Barilari M., Iervolino A., Vitiello M., Wilson S W., Dente L. (2011) . Kiddins 220/ARMS interacts with Pdzn3, a protein containing multiple bindings domains. *Biochimie*, 94: 2054-2057.
- Bello V., Sirour C., Moreau N., Denker E., Darribère T. (2008). A function for dystroglycan in pronephros development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 317: 106-120.
- Bouchard M., Souabni A., Mandler M., Neubuser A., Busslinger M. (2002). Nephric lineage specification by Pax2 an Pax8. *Genes and Development*, 2958-2970.
- Boutros M., Vicanek C., Rozen R., Goodyer P. (2005). Transient neonatal cystinuria. *Kidney International*, 67: 443-448.
- Brandli A W. (1999). Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. *Internal Journal of Development Biology*, 43: 381-395.
- Brennan H C., Nijar S., Jones E A. (1999). The specification and growth factor inducibility of the pronephric glomus in *Xenopus laevis*. *Development*, 126: 5847- 5856.
- Campenhout C V., Nichane M., Antoniou A., Pendeville H., Bronchain O J., Marine J C., Mazabraud A., Voz M L., Bellefroid E J. (2006). *Evil* is specifically expressed in the distal tubule and duct of the *Xenopus* pronephros and plays a role in its formations. *Developmental Biology*, 294: 203-219.
- Carrol J., Vize P D. (1996). Wilms' tumor suppressor gene is involved in the development of disparate kidney forms: evidence from

- expression in the *Xenopus* pronephros. *Developmental Dynamics*, 206: 131-138.
- Carroll T J., Vize P D. (1999). Synergism between Pax-8 e Lim-1 in embryonic kidney development. *Developmental Biology*, 214: 46-59.
 - Crambert G., Fuzesi M., Garty H., Karlsh S., Geering K. (2002). Phospholemman (FXYD1) associates with Na,K-ATPase and regulates its transport properties. *PNAS*, 99: 11476-11481.
 - De La Rosa D A., Gimenez I., Forbush B., Canessa C M. (2006). SGK1 activates Na⁺-K⁺-ATPase in amphibian renal epithelial cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 290: C492-C498.
 - Dehbi M., Pellettier J. (1996). PAX8-mediated activation of wt1 tumor suppressor gene. *The EMBO Journal*, 15: 4297-4306.
 - Dente L., Gestri G., Tsang M., Kudoh T., Wilson S W., Dawid I B., Andreazzoli M. (2011). Cloning and developmental expression of zebrafish pdzrn3. *Internal Journal of Development Biology*, 55: 989-993.
 - Dorfler P., Busslinger M. (1996). C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8. *The EMBO journal*, 15: 1971-1982.
 - Dudziak K., Mottalebi N., Senkel S., Edghill E L., Rosengarten S., Roose M., Bingham C., Ellar D., Ryffel G U. (2008). Transcription factor HNF1 β and a novel partners affect nephrogenesis. *Kidney International*, 74: 210-217.
 - Eccles M R., Yun K., Reeve A E., Fidler A E. (1995). Comparative in situ hybridization analysis of Pax2, Pax8, and WT1 gene transcription in human fetal kidney and Wilms' tumors. *American Journal of Pathology*, 146: 40-45.

- Eid S R., Brandli A W. (2001). *Xenopus* Na,K-ATPase: primary sequence of the β 2 subunit and *in situ* localization of α 1, β 1, and γ expression during pronephric kidney development. *Differentiation*, 68: 115-125.
- Geering K., Kraehenbul J P., Rossier B C. (1987). Maturation of the catalytic α -subunit of Na,K-ATPase during intracellular transport. *The Journal of Cell Biology*, 105: 2613-2619.
- Gerth V E., Zhou X., Vize P D. (2005). Nephric expression and three dimensional morphogenesis of the *Xenopus* pronephric glomus. *Developmental Dynamics*, 233: 1131-1139.
- Godin I., Cumano A. (2006). Hematopoietic stem cell development. *Kluwe academic/ Plenum publishers*.
- Grote D., Souabni A., Busslinger M., Bouchard M. (2005). Pax2/8-regulated Gata3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Development*, 133: 53-61.
- Han J Y., Shin E S., Lee Y S., Ghang H Y., Kim S Y., Hwang J A., Kim J Y., Lee J S. (2013). A genome wide association study for irinotecan-related severe toxicities in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics Journal*, 13: 417-422.
- Hee Choi Y., McNally B T., Igarashi P. (2013). Zyxin regulates migration of renal epithelial cells through activation of hepatocyte nuclear factor-1 β . *American Journal of Physiology Renal Physiology* , 305: 100-110.
- Heller N., Brandli A W. (1999). *Xenopus* Pax-2/5/8 orthologues: novel insights into Pax gene evolution and identification of Pax-8 as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages. *Developmental Genetics*, 24: 208-219.

- Heliot C., Desgrange A., Bulsson I., Prunskalte-Hyyrylälänen R., Shan J., Valnlo S., Umbhauer M., Cereghini S. (2013). HNF1B controls proximal-intermediate nephron segment identity in vertebrates by regulating Notch signalling components and *Irx1/2*. *Development*, 140: 873-885.
- Hensey C., Dolan V., Brady H. (2002). The *Xenopus* pronephros as a model system for the study of kidney development and pathophysiology. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17: 73-74.
- Honda T., Ishii A., Inui M. (2013). Regulation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by PDZRN3. *American Journal of Cell Physiology*, 34: 1091-1097.
- Honda T., Yamamoto H., Ishii A., Inui M. (2010). PDZRN3 Negatively Regulates BMP-2-induced Osteoblast Differentiation through inhibition of Wnt Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 21: 3269-3277.
- Jones E A. (2005). *Xenopus*: a prince among models for pronephric kidney development. *Journal of America of Social Nephrology*, 16: 313-321.
- Kestila M., Lenkkeri U., Manniko M., Lamerdin J., McCready P., Putaala H., Ruotsalainen V., Morita T., Nissinen M., Herva R., Kashtan C E., Peltonen L., Holmberg C., Olsen A., Tryggvason K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-Nephrin- is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell*, 1: 575-582.
- Ko j., Kimura H., Matsuura K., Yamamoto H., Gondo T., Inui M. (2006). PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. *Journal of Cell Science*, 119: 5106-5113.
- Lee S J., Kim S., Choi S C., Han J K. (2010). Xpteg (*Xenopus* proximal tubules-expressed gene) is essential for pronephric mesoderm

- specification and tubulogenesis. *Mechanism of Development*, 127: 49-61.
- Li L., Wen L., Gong Y., Mei G., Liu J., Chen Y., Peng T. (2012). *Xenopus* as a model system for the study of GOLPH2/GP73 function: *Xenopus golph2* is required for pronephros development. *Plos one*, 7:1-12.
 - Lu Z., Je H S., Young P., Gross J., Lu B., Feng G. (2007). Regulation of synaptic growth and maturation by a sinapse-associated E3 ubiquitin ligase at the neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology*, 177: 1077-1089.
 - Lubarski I., Karlsh J D S., Garty H. (2007). Structural and functional interactions between FXD5 and the Na⁺-K⁺-ATPase. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 293: F1818-F1826.
 - Marracci S., Giannini M., Vitiello M., Andreazzoli M., Dente L. (2013). Kidins220/ARMS is dynamically expressed during *Xenopus laevis* development. *The International Journal of Developmental Biology*, 57: 787-792.
 - Massa F., Garbay S., Bouvler R., Sugitani Y., Noda T., Gubler M C., Heldet L., Pontoglio M., Fischer E. (2013). Hepatocyte nuclear factor 1β controls nephron tubular development. *Development*, 140: 886-896.
 - Mead P., Deconinck A E., Huber T L., Orkin S H., Zon L I. (2001). Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development*, 128: 2301-2308.
 - Mendel D B., Crabtree G R. (1991). HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 15: 677-680.
 - Murea M., Lu L., Lijun M., Hicks P J., Divers J., McDonough C W., Langefeld C D., Bowden D W., Freedman B I. (2011). Genome-wide association scan for survival on dialysis in african-americans with type 2 diabetes. *American journal of nephrology*, 33: 502-509.

- Nagao K., Taniyama Y., Kietzmann T., Doi T., Komuro I., Morishita R. (2008). Hif-1 α signaling upstream of NKX2.5 is required for cardiac development in *Xenopus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 11841-11849.
- Narlis M., Grote D., Gaitan Y., Boualia S K., Bouchard M. (2007). Pax2 and Pax8 regulate branching morphogenesis and nephron differentiation in the developing Kidney. *Journal of American Society of Nephrology*, 18: 1121- 1129.
- Naylor R W., Davidson A J. (2013). Hnf1beta and nephron segmentation. *Pediatric Nephrology*, 10: 1007-1013.
- Naylor R W., Jones E A. (2009). Notch activates Wnt-4 signalling to control medio-lateral patterning of the pronephros. *Development*, 136: 3585-3595.
- Nieuwkoop P.D., Faber j. (1964). Normal table of *Xenopus laevis*, a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *North-Holland publishing company*.
- Niisato N., Marunaka Y. (1999). Activation of the Na⁺-K⁺ pump by hyposmolality through tyrosine kinase-dependent Cl⁻ conductance in *Xenopus* renal epithelial A6 cells. *Journal of Physiology*, 518.2: 417-432.
- Ozcan A., Shen S S., Hamilton C., Anjana K., Coffey D., Krishnan B., Truong L D. (2011). PAX8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Modern Pathology*, 24: 751-764.
- Plachov D., Chowdhury K., Walther C., Simon D., Guenet J L., Gruss P. (1990). Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development*, 110:643-651.
- Poleev A., Fickenscher H., Mundlos S., Winterpacht A., Zabel B., Filder A., Gruss P., Plachov D. (1992). Pax8, a human paired box gene:

isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development*, 116: 611-623.

- Ruotsalainen V., Ljungberg P., Wartiovaara J., Lenkerri U., Kestila M., Jalanko H., Holmberg C., Tryggvason K. (1999). Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Cell Biology*, 96: 7962-7967.
- Santin A D., Zhan F., Bellone S., Palmieri M., Cane S., Bignotti E., Anfossi S., Gokden M., Dunn D., Roman J J., O'Brien T J., Tlan E., Cannon M J., Shaughnessy J., Pecorelli S. (2004). Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Internal Journal of Cancer*, 112: 14-25.
- Sauert K., Kahnert S., Roose M., Guli M., Brandli A W., Ryffel G U., Waldner C. (2012). Heat-Shock mediated overexpression of HNF1 β mutations has differential effects on gene expression in the *Xenopus* pronephric kidney. *Plos One*, 7:1-11.
- Saulnier D M E., Ghanbari H., Brandli A W. (2002). Essential function of Wnt-4 for tubulogenesis in the *Xenopus* pronephric kidney. *Developmental Biology*, 248: 13-28.
- Tong X G., Yu W M., Beaubier N T., Weeden E M., Hamel-Bena D., Mansukhani M M., O'Toole K M. (2009). Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissue: an immunohistochemical study. *Modern Pathology*, 22: 1218-1227.
- Tryggvason K. (1999). Unraveling the mechanism of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. *Journal of American Society of Nephrology*, 10:2440-2445.
- Tutulin-Cunita A C., Papuc S M., Arghir A., Rotzer K M, Deshpande C., Lungeanu A., Budistenau M. (2012). 3p interstitial deletion: novel case report and review. *Journal of Child Neurology*, 1062: 2012-2027.

- Verrey F., Schaerer E., Zoerkler P., Paccolat M P., Geering K., Kraehenbuhl J P., Rossier B C. (1987). Regulation by Aldosterone of Na⁺,K⁺-ATPase mRNAs, protein synthesis, and sodium transport in cultured kidney cells. *The Journal of Cell Biology*, 104: 1231-1237.
- Vignali R., Poggi L., Madeddu F., Barsacchi G. (2000). HNF1 β is required for mesoderm induction in the *Xenopus* embryo. *Development*, 127: 1455-1465.
- Vize P D., Seufert D W., Carrol T J., Wallingford J B. (1997). Model system for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Developmental Biology*, 188: 189-204.
- Wessely O., Tran U. (2011). *Xenopus* pronephros development- past, present and future. *Pediatric Nephrology*, 26(9): 1545-1551.
- Wild W., Von Strandmann E P., Nastos A., Senkel S., Lingott-Frieg A., Bulman M., Bingham C., Ellard S., Hattersley A T., Ryffel G U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 β inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Developmental Biology*, 97: 4695-4700.
- Wu F., Saleem M A., Kampik N B., Satchwell T J., Williamson R C., Blatner S M., Ni L., Toth T., White G., Young M T., Parkers M D., Alper S L., Wagner C A., Toyne A M. (2010). Anion exchanger 1 interacts with Nephron in podocytes. *Journal of American Society of Nephrology*, 21: 1456-1467.
- Wu G., Bohn S., Ryffel G U. (2004). The HNF1 β has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/Lim1-induced kidney malformations. *European Journal of Biochemistry*, 271: 3715-3728.

- Zhou X., Vize P D. (2004). Proximo-distal specialization of epithelial transport process within the *Xenopus* pronephric kidney tubules. *Developmental Biology*, 271: 322-338.